

Nisin Dirençlilik ve Regülasyon Genlerinin Laktisin 481 Üreticisi *L. lactis subsp. lactis* MBLL9 Suşunda Anlatımı

Ercan KOCA * Nefise AKKOÇ * Pınar ŞANLIBABA ** Mustafa AKÇELİK * 

* Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, TR-06100 Ankara - TÜRKİYE

** Ankara Üniversitesi Kalecik Meslek Yüksekokulu, TR-06870 Kalecik, Ankara - TÜRKİYE

Makale Kodu (Article Code): KVFD-2009-1667

Özet

Bu çalışmada, nisin dirençlilik (*nisFEG* ve *nisI*), regülasyon (*nisRK*) ve regülasyon/dirençlilik (*nisRKFEG*) genlerinin laktisin 481 üreticisi *Lactococcus lactis subsp. lactis* MBLL9 suşundaki ifadesi araştırıldı. *nisFEG* (LL175), *nisI* (LL176), *nisRK* (LL177), *nisRKFEG* (LL178) genlerini ifade eden rekombinant suşların ve kontrol suşun (MBLL9) laktisin 481 üretiminin, sırasıyla 80.000 AU L⁻¹, 80.000 AU L⁻¹, 40.000 AU L⁻¹, 40.000 AU L⁻¹ ve 80.000 AU L⁻¹ düzeylerinde olduğu tespit edildi. Rekombinant suşlarda nisin dirençliliğinin, LL175, LL176 ve LL178 suşlarında sırasıyla 300 IU mL⁻¹, 350 IU mL⁻¹ ve 500 IU mL⁻¹ düzeylerine yükseldiği, LL177 suşunda ise 100 IU mL⁻¹ düzeyine düştüğü saptandı.

Anahtar sözcükler: *L. lactis subsp. lactis*, Laktisin 481, Nisin, Dirençlilik, Regülasyon

Expression of Nisin Resistance and Regulation Genes in Lacticin 481 Producer Strain *L. lactis subsp. lactis* MBLL9

Summary

In this study, expression of nisin resistance (*nisFEG* ve *nisI*), regulation (*nisRK*) and regulation/resistance (*nisRKFEG*) genes in lacticin 481 producer strain *Lactococcus lactis subsp. lactis* MBLL9, was investigated. Lacticin 481 production levels for recombinant strains expressing *nisFEG* (LL175), *nisI* (LL176), *nisRK* (LL177), *nisRKFEG* (LL178) genes and control strain (MBLL9) were determined as 80.000 AU L⁻¹, 80.000 AU L⁻¹, 40.000 AU L⁻¹, 40.000 AU L⁻¹ and 80.000 AU L⁻¹, respectively. Nisin resistance levels in recombinant LL175, LL176 and LL178 strains were increased to 300 IU mL⁻¹, 350 IU mL⁻¹ and 500 IU mL⁻¹ levels, respectively, however it was decreased to 100 IU mL⁻¹ in recombinant strain LL177.


Keywords: *L. lactis subsp. lactis*, Lacticin 481, Nisin, Resistance, Regulation


GİRİŞ

Bakteriyosinlerin, gıdaların mikrobiyel güvenlik ve kalite özelliklerinin artırılmasında katkı maddesi olarak kullanımları yanında, bakteriyosin üreticisi suşların doğrudan gıda sistemlerinde kullanımı da endüstriyel gıda koruma programlarının ana çalışma alanlarından biri haline gelmiştir. Bu doğrultuda en yaygın kullanım alanı bulan laktokok suşları nisin üreticileridir ^{1,2}. Ancak son 20 yıldır, nisine yakın bir antimikrobiyel aktivite etkinliği gösteren laktisin üreticisi *L. lactis* üyeleri de özellikle starter kültür suşu olmayan laktik asit bakterilerinin inhibisyonunun gerçekleştirilmesi amacı ile fermente süt ürünlerinin üretiminde kullanılmaktadır. Diğer yandan,

laktisin 481 üreticilerinin üreme oranlarının, diğer starter kültür suşlarına kıyasla daha düşük oluşu, yavaş olgunlaştırılan peynir türlerinde starter kültür suşu olarak kullanımlarında büyük bir avantaj sağlamaktadır ³⁻⁶. Bakteriyosinlerin gıda katkı maddesi olarak etkinliklerinin artırılmasında genel kabul gören yeni yaklaşım, bu antibakteriyel bileşiklerin farklı kombinasyonlarının kullanımınıdır. Konserve gıdalar ve fermente süt ürünlerinin bu uygulamaya tabi tutulmasında öne çıkan bakteriyosinler nisin ve laktisindir ⁷⁻⁹. Nisin geniş antimikrobiyel etkinliğe sahip olmasından dolayı ana koruyucu ajan olarak, genellikle doğrudan söz konusu

 İletişim (Correspondence)

 +90 312 2126720/1119

 akcelik@science.ankara.edu.tr

gıdalara katılmakta, laktisin 481 üreticileri ise hem gıda koruyucu ve hem de gıda kalitesine katkı amacı ile canlı kültürler halinde kullanılmaktadır. Bu kombinasyonların kullanılmasında ana sorun, nisin canlı kültürler olarak ilave edilen bakteriyosin üreticilerine karşı antagonistik etki oluşturmalarıdır^{10,11}.

Bu çalışmada, gıda sistemlerinde birlikte kullanımları halinde, kalite ve güvenlik açısından yüksek düzeyde katkı sağlayacak nisin preparatları ve laktisin 481 üreticisi suşlarda antagonistik etkiyi ortadan kaldıracak genetik düzenlemelerin yapılması hedeflenmiştir.

MATERYAL ve METOT

Bakteri suşları ve plazmidler: *Escherichia coli* ECO123, *E. coli* TG1 ve rekombinant plazmidleri taşıyan diğer *E. coli* suşları ve indikatör bakteri *Micrococcus luteus* Luria Bertani (LB, Fluka) ortamında 37°C'de üretilmiştir. Doğal ve rekombinant *L. lactis* suşları %0.5 glukoz içeren M17 (Merck) ortamında 30°C'de üretilmiştir. Seçici ortamlara eritromisin, *L. lactis* suşları için 5 µg mL⁻¹, *E. coli* suşları için ise 200 µg mL⁻¹ oranında ilave edilmiştir.

Laktisin 481 üretim düzeyinin belirlenmesi: Laktisin 481 üretim düzeyinin saptanmasında kuyu difüzyon yöntemi kullanılmıştır¹². Nisin indüklemesinin laktisin 481 üretimine etkisinin belirlenmesi için, GM17 besiyerine, son konsantrasyonu 1 IU mL⁻¹ olacak şekilde nisaplin (Sigma) eklenmiştir. Örneklerin kuyulara aktarılması ve 37°C'de 1 gece inkübasyonu sonrasında, inhibisyon zonları ölçülmüştür. Aktivite hesaplamasında (AU L⁻¹); her petride inhibisyon zonu mevcut olan son kuyu saptanmış ve 1000/kuyulara aktarılan sıvı hacmi X seyreltme faktörü (inhibisyon zonu tanımlanan son kuyucuktaki seyreltme gücü) formülünden yararlanılmıştır. Özgül laktisin aktivitesi, tespit edilen laktisin 481 aktivitesinin, söz konusu örneğin alımında ölçülen OD₆₀₀ değerine bölümü ile hesaplanmıştır.

Nisin dirençlilik düzeylerinin belirlenmesi: Son konsantrasyonlarında 100 IU mL⁻¹, 200 IU mL⁻¹, 250 IU mL⁻¹, 300 IU mL⁻¹, 350 IU mL⁻¹, 400 IU mL⁻¹, 500 IU mL⁻¹ nisaplin (Sigma) içeren ve içermeyen GM17 ortamlarına aktif suş kültürlerinden 1/100 oranında inoküle edilerek, 30°C'de inkübe edilmiş ve 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ve 12. saatlerdeki OD₆₀₀ değerleri ölçülerek zamana karşı üreme eğrileri çıkarılarak, suşların nisin dirençlilik düzeyleri belirlenmiştir.

Nisin dirençlilik ve regülasyon genlerinin klonlanması: Nisin dirençlilik ve regülasyon genleri, nisin üreticisi *L. lactis subsp. lactis* LL27 suşundan, *Tablo 1*'de verilen primerler kullanılmak suretiyle çoğaltılmıştır. Kromozomal DNA izolasyonunda, genomik DNA saflaştırma kiti (Fermentas, EU) kullanılmıştır. Plazmid DNA izolasyonlarında ise alkali liziz yöntemi¹³ esas alınmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonlarında (PZR), 1 çevrimden oluşan başlangıç denatürasyonu (94°C'de 5 dak.), 30 çevrimden oluşan çoğaltma (her bir çevrim; 94°C'de 30 saniye/63.1°C'de 30 saniye/72°C'de 3 dak.) ve 1 çevrimden oluşan son uzama (72°C'de 10 dak.) basamaklarını içeren PZR protokolü uygulanmıştır. PZR uygulaması sonrasında, DNA örnekleri %1 agaroz içeren jelde yürütülmüş ve etidyum bromit içeren tamponda bekletildikten sonra Kodak Gel Logic 200 Imaging System (Kodak, USA) kullanılarak jel fotoğrafları alınmıştır¹⁴.

BULGULAR

Tablo 1'de verilen primerler kullanılarak *L. lactis subsp. lactis* LL27 genomik DNA'sından çoğaltılan nisin regülasyon ve dirençlilik genleri, indüklenebilir P45 promotörü içeren pLEB124 plazmidine aktarılmıştır. Son aşamada; nisin dirençlilik (*nisFEG* ve *nisI*), regülasyon (*nisRK*) ve regülasyon/dirençlilik (*nisRKFEG*) genlerini içeren bu plazmidlerin *L. lactis subsp. lactis* MBLL9 suşuna ayrı ayrı aktarımları gerçekleştirilerek dört farklı rekombinant suş oluşturulmuştur. Rekombinant plazmidler, doğal suşun plazmid profillerindeki değişimler

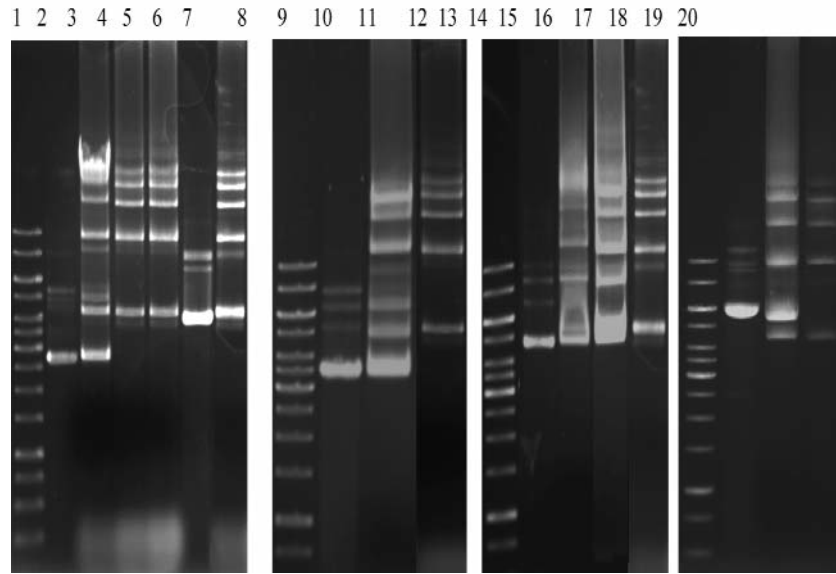
Tablo 1. Polimeraz zincir reaksiyonlarında kullanılan primerler

Table 1. Primers used in the polymerase chain reaction

Primer	Dizilim 5'-3'
NisFG İleri-HindIII	AGATACAAGCTTGGGCCCTAAAGTGAGGAAATATAATGCAGGTA
NisFG Geri-SalI	AGATTCGTGCACTTCCCGGGAGGTTAAATGCACCTTTATATGTCTATC
NisI İleri-BamHI	ACTATGGATCCATGAAAGGAGGGAAGAGGAAATGAGA
NisI Geri-ApaI	TATCAGGGCCCACTCTAGTTTCCTAACTTCGTTG
NisRK İleri-HindIII	TATCATAAGCTTAATCGGAGGTTAAAGTGGTGATA
NisRK Geri-ApaI	AGATAGGGCCCTTCAGAAACAAAAAAGTAATCCTTGA
NisRG İleri-HindIII	TATCATAAGCTTAATCGGAGGTTAAAGTGGTGATA
NisRG Geri-ApaI	AGATTCGGGCCAGGTTAAATGCACCTTTATATGTCTATC

esas alınarak alıcı suşta tanımlanmıştır (Şekil 1). Rekombinant plazmidlerin ilave regülasyon ya da dirençlilik fragmentini içerip içermedikleri, moleküler klonlamada kullanılan restriksiyon endonukleaz enzim kesimleri ile de kontrol edilmiştir.

Özgül laktisin 481 üretimi, laktisin üretim düzeyi sonuçlarının, yine aynı tabloda bulunan optik yoğunluk (OD_{600}) değerlerine bölünmesi ile elde edilmiştir (Tablo 2). Özgül laktisin 481 üretimi ile ilgili grafiklerde doğal suş *L. lactis subsp. lactis* MBLL9 ve rekombinant suşların



Şekil 1. *L. lactis subsp. lactis* MBLL9 ve rekombinant *L. lactis* suşlarının plazmid profilleri.

Hatlar: 1, 8, 12, 17) Marker DNA; 2) pLEB124 (vektör); 3) LL179 (pLEB124 vektörünü içeren MBLL9); 4, 5, 11, 16, 20; MBLL9 (doğal suş); 6) pNFG (nisFEG genlerini içeren pLEB124); 7) LL175 (pNFG plazmidini içeren MBLL9); 9) pNI (nisI genini içeren pLEB124); 10) LL176 (pNI plazmidini içeren MBLL9); 13) pNRK (nisRK genlerini içeren pLEB124); 14, 15) LL177 (pNRK plazmidini içeren MBLL9), 18) pNRG (nisRKFEF genlerini içeren pLEB124); 19) LL178 (pNRG plazmidini içeren MBLL9)

Fig 1. Plasmid profiles of *L. lactis subsp. lactis* MBLL9 ve rekombinant *L. lactis* strains

Lanes: 1, 8, 12, 17) Marker DNA; 2) pLEB124 (vector); 3) LL179 (MBLL9 contains vector pLEB124); 4, 5, 11, 16, 20; MBLL9 (wild-type strain); 6) pNFG (pLEB124 contain nisFEG genes); 7) LL175 (MBLL9 contains pNFG plasmid); 9) pNI (pLEB124 contains nisI gene); 10) LL176 (MBLL9 contains pNI plasmid); 13) pNRK (pLEB124 contain nisRK genes); 14, 15) LL177 (MBLL9 contains pNRK plasmid), 18) pNRG (pLEB124 contain nisRKFEF genes); 19) LL178 (MBLL9 contains pNRG plasmid)

Tablo 2. *L. lactis subsp. lactis* MBLL9 doğal suşu ve rekombinantların üreme düzeyleri ve laktisin 481 üretim düzeyleri

Table 2. Growth rates and lacticin 481 production levels of *L. lactis subsp. lactis* MBLL9 wild type strain and the recombinants

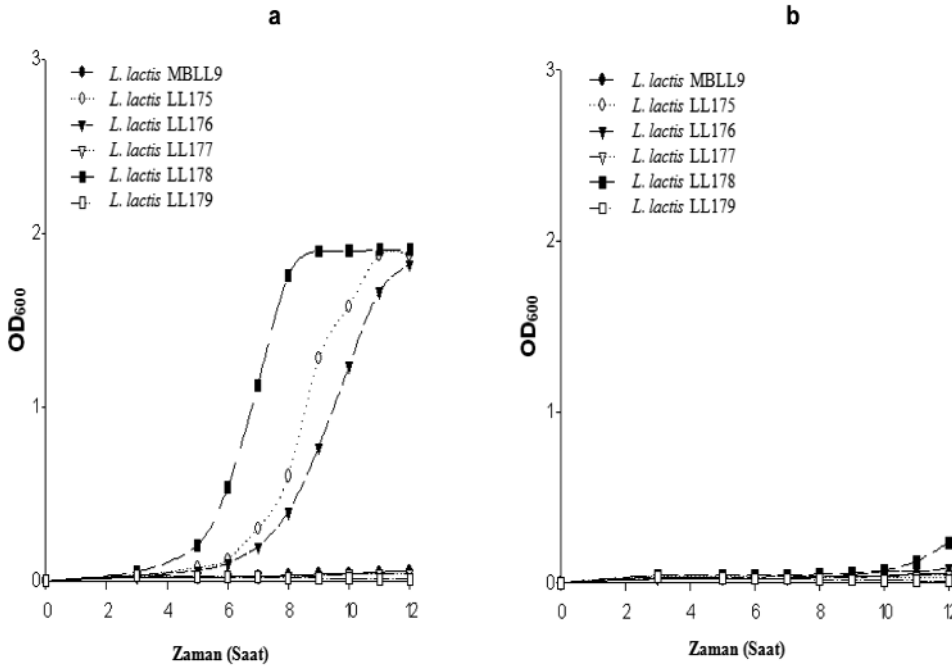
Suş Kod No.	Bakteriyel Gelişme ve Laktisin Üretimi									
	6. Saat		8. Saat		10. Saat		12. Saat		24. Saat	
	OD_{600}	AU L ⁻¹	OD_{600}	AU L ⁻¹	OD_{600}	AU L ⁻¹	OD_{600}	AU L ⁻¹	OD_{600}	AU L ⁻¹
MBLL9	1.892	20.000	1.922	40.000	1.927	80.000	1.922	80.000	1.950	80.000
MBLL9 (1 IU mL ⁻¹ nisin varlığında)	1.880	20.000	1.909	40.000	1.931	80.000	1.922	80.000	1.940	80.000
LL175	1.827	20.000	1.904	40.000	1.913	80.000	1.917	80.000	1.959	80.000
LL175 (1 IU mL ⁻¹ nisin varlığında)	1.868	20.000	1.909	40.000	1.931	80.000	1.936	80.000	1.969	80.000
LL176	1.904	20.000	1.927	40.000	1.931	80.000	1.927	80.000	1.940	80.000
LL176 (1 IU mL ⁻¹ nisin varlığında)	1.900	20.000	1.927	40.000	1.931	80.000	1.927	80.000	1.922	80.000
LL177	1.945	20.000	1.964	20.000	1.974	40.000	1.959	40.000	1.989	40.000
LL177 (1 IU mL ⁻¹ nisin varlığında)	1.945	20.000	1.979	20.000	1.979	40.000	1.974	40.000	1.995	40.000
LL178	1.852	20.000	1.954	20.000	1.974	40.000	1.974	40.000	1.979	20.000
LL178 (1 IU mL ⁻¹ nisin varlığında)	1.830	20.000	1.959	40.000	1.964	40.000	1.974	40.000	1.979	40.000

üretim düzeyleri oransal olarak karşılaştırıldığında, dikkat çekici farklılıklar görülmemiştir. Laktisin 481 ve özgül laktisin üretim düzeyi çalışmalarının sonuçları birlikte değerlendirildiğinde, doğal suş *L. lactis subsp. lactis* MBLL9 ile kıyaslanan *L. lactis* LL175 ve *L. lactis* LL176 suşlarının laktisin 481 üretiminde değişiklik olmadığı, *L. lactis* LL77 ve *L. lactis* LL178 suşlarının laktisin 481 üretiminde ise %50 oranında azalmanın olduğu saptanmıştır.

Nisin içermeyen ortamda tüm suşlar (*L. lactis subsp. lactis* MBLL9, *L. lactis* LL175, *L. lactis* LL176, *L. lactis* LL177 ve *L. lactis* LL178, *L. lactis* LL179) benzer üreme karakteristikleri göstermiştir. Nisin içeren ortamda, 12 saat sonunda *L. lactis subsp. lactis* MBLL9'un, 250 IU mL⁻¹ nisin konsantrasyonuna dirençli olduğu tespit edilmiştir (Şekil 2a). Boş vektörü (pLEB124) içeren *L. lactis* LL179 suşunda da nisin dirençlilik düzeyi 250 IU mL⁻¹ olarak tanımlanmıştır. *L. lactis* LL175 (*nisFEG* rekombinantı), *L. lactis* LL176 (*nisI* rekombinantı) ve *L. lactis* LL177 (*nisRK* rekombinantı) suşları sırasıyla; 300 IU mL⁻¹, 350 IU mL⁻¹ ve 100 IU mL⁻¹ nisin düzeylerine dirençli bulunmuştur. *L. lactis* LL178 (*nisRKFEG* rekombinantı) ise 500 IU mL⁻¹ nisin düzeyine dirençlilik göstermiştir (Şekil 2b).

regüle edilmektedir. *NisK*, çevresel nisin konsantrasyonu sinyaline bağlı olarak çalışan bir histidin kinaz enzimidir. Bu çevresel sinyali histidin kinaz fosforilasyon yolu ile *NisR* yanıt proteinine aktarır ve aktive olan *NisR*, nisin operonundan transkripsiyonu indükler^{15,16}. Tipik bir yeter sayı algılama sistemi olan bu mekanizmanın laktisin 481 üreticisi suşlarda bir varyasyonunun bulunduğu öngörülmektedir. Lantibiyotik 481 regülasyonu üzerinde yürütülen çalışmalar sonucunda, hücre içi asitliğin artışına paralel olarak, laktisin 481 üretiminin arttığı belirlenmiştir^{17,18}.

Çalışmamızda *nisRK* genlerinin laktisin 481 üreticisinde ifade edilmesi durumunda laktisin üretimini %50 gibi yüksek oranda düşürmesi, birbirinden bağımsız çalışan ancak aynı sinyal iletim mekanizmasına sahip olan sistemlerden, güçlü bir promotor ile etkinleştirilmiş olanın (vektörde bulunan P45 promotoru), diğerini baskılaması (laktisin 481 üretiminde etkin olan P1 ve P3 promotorları) en olası sonuçtur. Bu çalışmalardan elde edilen diğer bulgular da bu olasılığı destekler niteliktedir. Zira rekombinantların üreme ortamına 1 IU mL⁻¹ oranında indükleyici molekül nisin ilavesi, laktisin 481 üretiminde bir değişikliğe yol açmamıştır.



Şekil 2. *L. lactis subsp. lactis* MBLL9 suşu ve rekombinantlarının nisin varlığında üreme kinetikleri (a: 250 IU mL⁻¹, b: 500 IU mL⁻¹ nisin ilave edilmiş)

Fig 2. Growth kinetics of *L. lactis subsp. lactis* MBLL9 and the recombinants in the presence of nisin (a: 250 IU mL⁻¹, b: 500 IU mL⁻¹ nisin added)

TARTIŞMA ve SONUÇ

Laktisin 481 üreticisi suşa *nisRK* ya da *nisRKFEG* genlerinin aktarımı sonrasında laktisin üretiminde meydana gelen azalmaların *nisI* ya da *nisFEG* genlerinin aktarıldığı rekombinantlarda görülmemesi, bu baskılayıcı etkinin *nisRK* genlerinin ifadesinden kaynaklandığına işaret etmektedir. Nisin sentezi, *nisRK* genleri tarafından

nisRK genlerinin laktisin 481 üreticisi suşuna klonlanması halinde laktisin üretim seviyesinde meydana gelen düşmenin, aynı zamanda bu suşun içsel nisin dirençlilik düzeyinde de saptanması, nisin ve laktisin 481 üretimini kontrol eden ikili regülatör sistemler arasındaki uyumsuzluğu desteklemektedir. Bununla beraber *nisRKFEG* genlerinin birlikte aktarıldığı laktisin 481 üreticisi suşunda (*L. lactis* LL178) nisin dirençlilik düzeyi 250 IU mL⁻¹den

500 IU mL⁻¹'ye çıkmıştır. Sadece *nisFEG* genlerinin aktarıldığı *L. lactis* LL175 suşunda bu direnç düzeyi 300 IU mL⁻¹ olarak tespit edilmiştir. *nisFEG* genlerinin analogu *lctFEG* genleri, yüksek düzeyde homoloji gösteren dirençlilik proteinlerini kodlamaktadır. Sadece *nisFEG* genlerinin klonlandığı *L. lactis* LL175 suşunda *nisRKFEF* genlerinin beraber klonlandığı *L. lactis* LL178 suşuna oranla nisin dirençlilik düzeyinde daha düşük bir düzeyde artışın meydana gelmesi, *nisRK* genlerinin otoindüksiyon işlevini desteklemektedir. Bu çalışma sonuçları da *L. lactis* LL178 (*nisRKFEF* genlerini içeriyor) rekombinantında *nisRK* genlerinin ifadesinin, *nisFEG* ürünlerinin artışına yol açtığını, yani P45 promotöründen yapılan transkripsiyonu indüklediğini kanıtlamaktadır. Dirençlilik çalışmalarından elde edilen bir diğer önemli bulgu, *nisl* geni aktarılan *L. lactis* LL176 suşunda nisin dirençlilik düzeyinin 250 IU mL⁻¹'den 350 IU mL⁻¹'ye çıkmasıdır. *nisl* geni ürünü bir lipoproteindir. *nisl*'nin dirençlilikteki rolü hücre membranı yüzeyinde lokalize olarak hücre dışındaki nisinin gevşek bağlanmasını yönlendirmek suretiyle, hedef hücredeki etkinliğini düşürmek olarak tanımlanmaktadır ^{11,19-21}. Diğer lantibiyotik üreticilerinde *nisl* geninin benzer bir mekanizmaya sahip olduğu bugüne kadar belirlenmemiştir. Bu çalışma *nisl* gen ürününün laktisin 481 üreticisi suşta da aynı etkinliğe sahip olduğunu göstererek, *nisl* fonksiyonunu tanımlaması açısından kritik bir değer taşımaktadır.

Çalışmamızda geliştirilen *L. lactis* LL175 (*nisFEG* genleri klonlanan) ve *L. lactis* LL176 (*nisl* genleri klonlanan) rekombinantları, üretici suşta laktisin üretim düzeyini engellemeksizin nisin dirençlilik gelişimi görülmesi açısından önemlidir. Zira bu rekombinantlar, nisinin gıda koruyucusu olarak kullanıldığı ürünlerde starter kültürler olarak kullanılabilirler. Nisin gıdalara genellikle 50-200 IU mL⁻¹ düzeylerinde ilave edilmektedir. Bu rekombinantların kullanımı halinde, katılan nisinden etkilenmeleri engellenecek ve ürettikleri laktisin 481 sayesinde de ilave bir koruyucu özellik kazandıracaktır. *nisRKFEF* genlerinin klonlandığı *L. lactis* LL178 rekombinatında ise laktisin 481 üretimi önemli ölçüde düştüğü için pratik kullanımı önerilmemektedir. Ancak bu rekombinant lantibiyotiklerin regülasyon sistemlerinin tanımlanması açısından önemlidir.

KAYNAKLAR

1. **Chen H, Hoover DG:** Bacteriocins and their food applications. *Comp Rev Food Sci Food Safety*, 2, 82-100, 2003.
2. **Patton GC, van der Donk WA:** New developments in lantibiotic biosynthesis and mode of action. *Curr Opin Microbiol*, 8, 543-551, 2005.
3. **McAuliffe O, Ross RP, Hill C:** Lantibiotics: biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol*, 25, 285-308, 2001.
4. **Rodríguez E, González B, Gaya P, Nuñez M, Medina M:** Diversity of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from raw milk. *Int Dairy J*, 10, 7-15, 2000.
5. **Uguen P, Hindré T, Didelot S, Marty C, Haras D, Le Pennec JP, Vallée-Réhel K, Dufour A:** Maturation by LctT is required for biosynthesis of full-length lantibiotic lactacin 481. *Appl Environ Microbiol*, 71, 562-565, 2005.
6. **Wiley JM, van der Donk WA:** Lantibiotics: Peptides of Diverse Structure and Function. *Ann Rev Microbiol*, 61, 477-500, 2007.
7. **Akçelik O, Tükel C, Özcengiz, G, Akçelik M:** Characterization of bacteriocins from two *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolates. *Mol Nutr Food Res*, 50, 306-313, 2006.
8. **Dufour A, Hindré T, Haras D, Le Pennec JP:** The biology of lantibiotics from the lactacin 481 group is coming of age. *FEMS Microbiol Lett*, 31, 134-167, 2007.
9. **Özkalp B, Özden B, Tuncer Y, Şanlıbaba P, Akçelik M:** Technological characterization of wild-type *Lactococcus lactis* strains isolated from raw milk and traditional fermented milk products in Turkey. *Lait*, 87, 521-534, 2007.
10. **Akkoç N, Simşek Ö, Akçelik M:** Determination of metabolic plasmids and their effects on the growth of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* MN24. *Int J Dairy Technol*, 62, 118-125, 2009.
11. **Draper LA, Ross RP, Hill C, Cotter PD:** Lantibiotic immunity. *Curr Protein Peptide Sci*, 9, 39-49, 2008.
12. **Schillinger U, Lücke FK:** Antimicrobial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl Environ Microbiol*, 55, 1901-1906, 1989.
13. **Anderson DG, McKay LL:** A simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from lactic streptococci. *Appl Environ Microbiol*, 46, 549-552, 1983.
14. **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T:** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: CSH Laboratory Press, USA, 1989.
15. **Hindré T, Le Pennec JP, Haras D, Dufour A:** Regulation of lantibiotic lactacin 481 production at the transcriptional level by acid pH. *FEMS Microbiol Lett*, 231, 291-298, 2004.
16. **Kleerebezem M:** Quorum sensing control of lantibiotic production; nisin and subtilin autoregulate their own biosynthesis. *Peptides*, 25, 1405-1414, 2004.
17. **Diep DB, Skaugen M, Salehian Z, Holo H, Nes I:** Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins. *PNAS*, 104, 2384-2389, 2007.
18. **Lubelski J, Rink R, Khusainov R, Moll, GN, Kuipers OP:** Biosynthesis, immunity, regulation, mode of action and engineering of the model lantibiotic nisin. *Cell Mol Life Sci*, 65, 455-476, 2008.
19. **Koponen O, Tolonen M, Qiao M, Wahlström G, Helin J, Saris PEJ:** *NisB* is required for the dehydration and *NisC* for the lanthionine formation in the post-translational modification of nisin. *Microbiology*, 148, 3561-3568, 2002.
20. **Li H, O'Sullivan DJ:** Identification of a *nisl* promoter within the *nisABC* operon that may enable establishment of nisin immunity prior to induction of the operon via signal transduction. *J Bacteriol*, 188, 8496-8503, 2006.
21. **Takala TM, Koponen O, Qiao M, Saris PEJ:** Lipid-free *Nisl*: Interaction with nisin and contribution to nisin immunity via secretion. *FEMS Microbiol Lett*, 237, 171-177, 2004.