

1. GİRİŞ

Başta tıp ve gıda endüstrisi olmak üzere, hayatın her alanında patojen ve gıda bozulması etmeni mikroorganizmalar ile mücadele yoğun bir şekilde sürdürülmektedir. Bu mücadele Robert Koch'un 19 yy sonlarında yapmış olduğu çalışmalar neticesinde bakterilerin hastalıklardan sorumlu organizmalar olduğunun belirlenmesiyle başlamıştır. Penisilin antibiyotığının, Aleksander Fleming tarafından 1928'de keşfi ve patojen bakterilerin engellenmesi yönünde kullanılmaya başlanması ise bu alanda atılan en önemli adımdır. Günümüze kadar bakterilere karşı etkili çok sayıda antibiyotik ve kimyasal ajan geliştirilmiştir. Ancak son yıllarda bakterilerin kullanılan antibiyotiklere karşı hızla dirençlilik kazanması, yeni antimikrobiyel bileşiklerin araştırılmasını ve geliştirilmesini hedefleyen çalışmaları ön plana çıkartmıştır. Diğer taraftan gıdaların korunması amacıyla kullanılan koruyucuların insan sağlığını tehdit edici boyutlarının bulunması ve çeşitli alerjik reaksiyonlara neden olması, tüketici tercihlerini daha güvenli ve doğal antimikrobiyel ajanların kullanılması yönünde değiştirmiştir. Bu doğrultuda laktik asit bakterileri gibi insan tüketimi açısından güvenli bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinler, mikroorganizmalarla mücadelede yeni nesil antimikrobiyel ajanlar olarak ortaya çıkmıştır.

Nisin, tip I lantibiyotik grubuna dahil olan ve bir laktik asit bakterileri üyesi *Lactococcus lactis* tarafından sentezlendiği tespit edilmiş ilk bakteriyosindir. Bu bakteriyosin oldukça geniş bir etki spektrumuna sahip olması nedeniyle gıda endüstrisinde koruyucu, medikal alanda ise terapötik ajan olarak kullanılmaktadır. Nisin FDA tarafından GRAS (İnsan ve hayvan tüketiminde güvenilir) ajan olarak tanımlanmış ve belgelendirilerek (E234) kullanımına izin verilmiştir. Bu bakteriyosin günümüzde 50'den fazla ülkede süt ve süt ürünleri, konserve ürünler ve hazır çorbalar gibi gıdaların korunmasında kullanılmaktadır. Ayrıca diş macunu ve sargı bezlerini içeren çeşitli sağlık ürünlerinde de kullanımı mevcuttur.

Nisinin antimikrobiyel ajan olarak yaygın kullanımını kısıtlayan ana nedenler üretim tekniği ve dolayısı ile ürün maliyetinden kaynaklanmaktadır. Zira üretici suşlarda nisin verimi düşük olmakta ve halen endüstriyel süreçlerde kesikli fermentasyon sistemlerinden yararlanılmaktadır. Nisinin yüksek ticari potansiyeli, üretimin artırılması yönündeki çalışmalara hız kazandırmıştır. Bu amaçla yapılan çalışmalar; üretici suşun (*L. lactis*) farklı

fermentasyon koşullarındaki davranışları ve nisin üretimini kodlayan genlerin regölasyon sistemleri esas alınarak verimli fermentasyon sistemlerinin tasarlanması ve üretici suşların geliştirilmesini hedeflemektedir.

Bu tez çalışmasında da Türkiye kökenli bir nisin üreticisi suşta; nisin biyosentezi regölasyonu ve dirençliliğinden sorumlu genlerin kopya sayılarının artırılması suretiyle, ürün veriminin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Oluşturulan genetik varyantların nisin üretim koşulları, kesikli ve sürekli fermentasyon sistemleri kullanılarak optimize edilmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 Nisin

Nisin, ilk kez İngiltere’de yapılan çalışmalarda laktokokların diğer laktik asit bakterilerinin gelişimlerini inhibe ettiğinin belirlenmesi sonucu saptanmıştır (Rogers 1928; Rogers and Whittier 1928). Bu çalışmalarda tanımlanan antimikrobiyel bileşiğin ısı stabil, çözünebilen ve difüze olabilen bir yapıda olduğu belirlenmiştir. Daha sonra Whitehead (1933) bu bileşiği izole etmiş ve protein yapısında olduğunu kanıtlamıştır. Mastitis ile mücadele ve II. Dünya savaşı sırasında ortaya çıkan penisilin kıtlığı, bu bileşik üzerinde araştırmaların yoğunlaşmasına yol açmıştır. İlk kez Mattick and Hirsch (1944) bu bileşiği konsantre etmeyi başarmış ve birçok bakteri üzerinde antimikrobiyel etkinliğe sahip olduğunu saptamıştır.

İlk nisin üreticisi *L. lactis* suşu çiğ süttten izole edilmiştir (Rogers 1928, Whitehead 1933, Mattick and Hirsch 1944). Daha sonra farklı nisin üreticilerinin peynir mikroflorasında da bulunduğu tespit edilmiştir (Hirsch and Wheeler 1951). Ancak bu organizmaların sadece süt ve süt ürünlerinde bulunmadığı; Alman tipi lahana turşusu (Haris *et al.* 1992), fermente sucuk (Noonpakdee *et al.* 2003), nehir suyu (Zendo *et al.* 2003), insan sütü (Beasley and Saris 2004) gibi çeşitli kaynaklardan da izole edilebildiği tespit edilmiştir. Diğer yandan Wirawan *et al.* (2006) nisinin laktokoklar dışında *Streptococcus uberis* tarafından da üretebildiğini belirlemiştir.

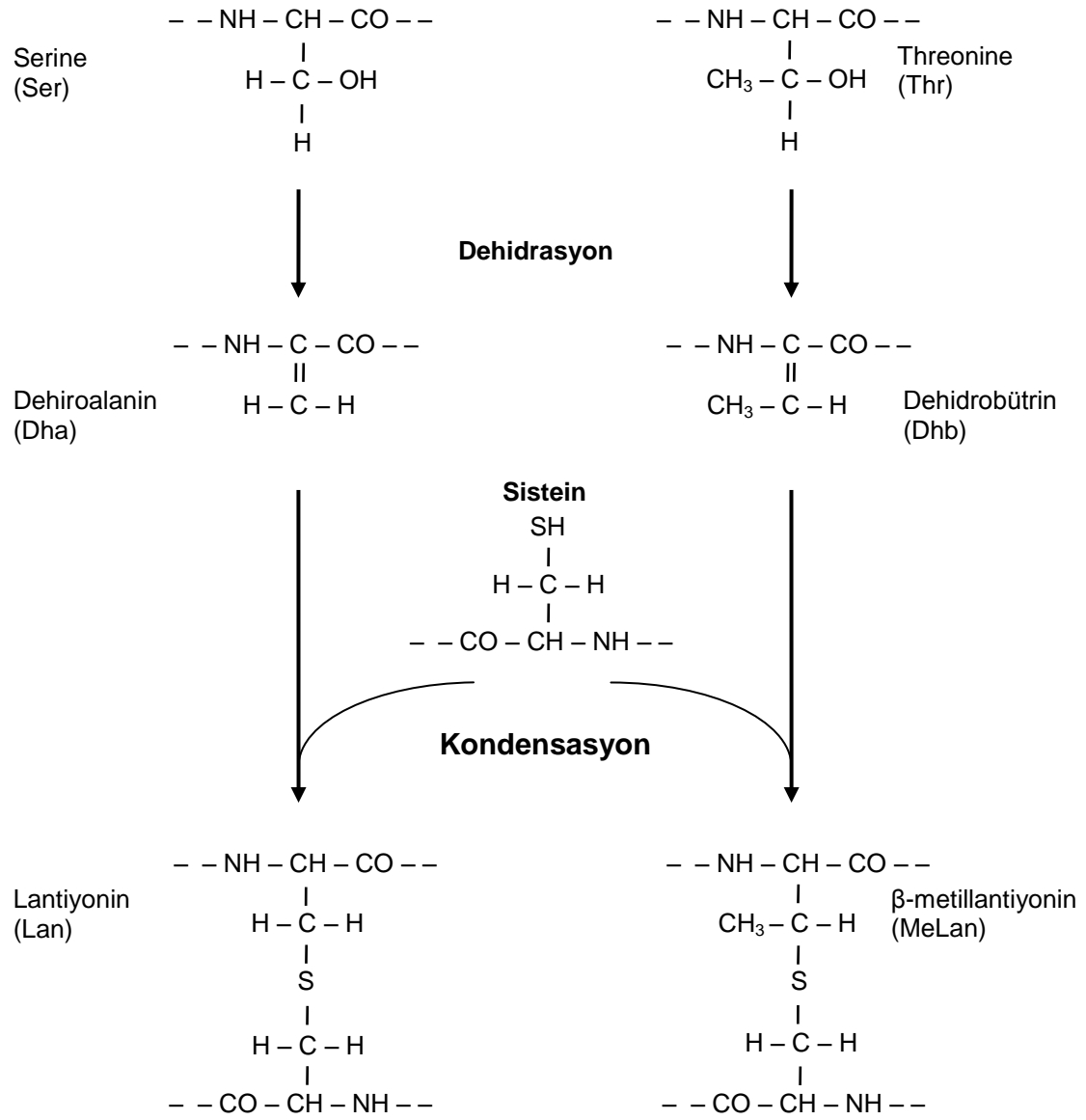
Nisin, ticari önemi nedeni ile en yoğun araştırılan lantibiyotik olmuştur. Yapılan çalışmalarda nisinin toksik etkisinin sofr tuzu ile eşdeğer düzeyde (LD_{50} 7 g kg^{-1} vücut ağırlığı) olduğu tanımlanmıştır (Hurst 1981). Gerek geniş antimikrobiyel kapasitesi ve gerekse insan ve hayvan sağlığına karşı olumsuz etki içermemesi bu lantibiyotiği endüstriyel uygulamalarda ön plana çıkartmıştır. Nisin FAO/WHO tarafından 1969 yılında güvenli bir doğal gıda katkısı olarak kabul edilmiştir. 1983’te nisin EEC gıda katkı maddeleri listesine dahil edilmiş ve E234 kod numarası verilmiştir. Nisin 1996’dan itibaren Avrupa ülkeleri, Çin ve Amerika başta olmak üzere 50’den fazla ülkede yaygın olarak kullanılmaktadır (Delves-Broughton *et al.* 1996).

Birçok gram pozitif bakteri nisine karşı duyarlıdır. Ancak nisin gram negatif bakteriler üzerinde de çok düşük antimikrobiyel etkisi bulunmaktadır (de Vuyst and Vandamme 1994). Nisinin gram pozitif bakterilerin vejetatif formları yanında, *Clostridium* ve *Bacillus* sporlarına karşı da etkili olduğu saptanmıştır. Bu karakteristikleri nedeniyle nisin yüksek sıcaklıktan etkilenen ya da ısıl işlem uygulanmayan asidik gıdalarda patojen ya da gıda bozulması etmeni birçok bakterinin vejetatif (*Listeria* ve laktik asit bakterilerinin kontamine üyeleri gibi) ve spor formlarının (*Clostridium* ve *Bacillus* sporları gibi) inhibisyonu amacı ile kullanılmaktadır (Hurst 1981, Abee *et al.* 1994, Delves-Broughton *et al.* 1996).

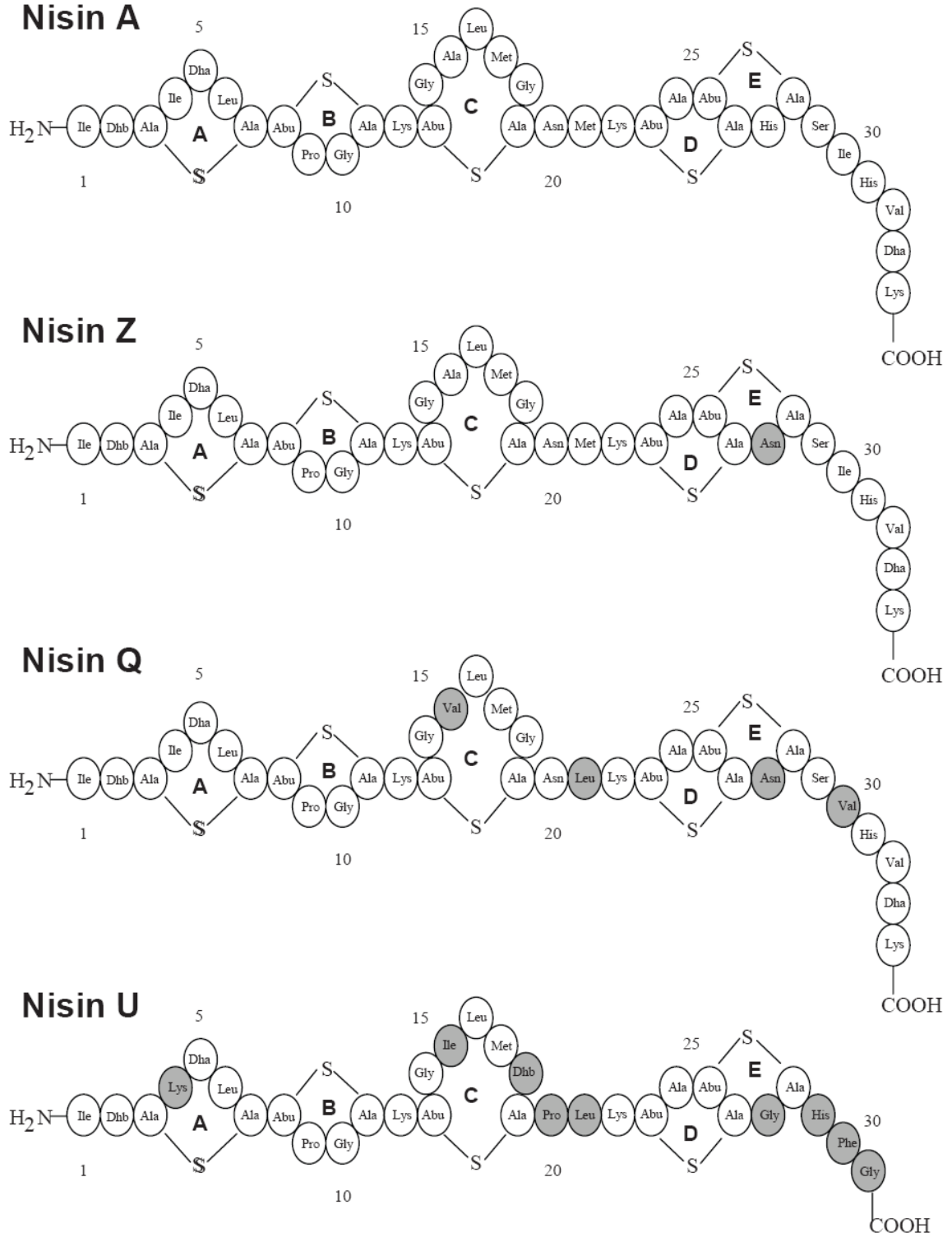
2.1.1 Nisinin yapısal özellikleri

Nisinin primer yapısı 1971 yılında Gross and Morell tarafından yürütülen çalışmalar neticesinde aydınlatılmıştır. Bu yapının doğruluğu daha sonra, kütle ve NMR spektroskopi çalışmaları ile desteklenmiştir (Barber *et al.* 1988, Nielsen and Roepstorff 1988, van de Ven *et al.* 1991, van den Hooven *et al.* 1993). Nisinin moleküler ağırlığı yaklaşık 3350 dalton olup, yapısında 34 amino asit bulunmaktadır. Bu yapıtaşlarının bazıları; lantiyonin, metillantiyonin (Met Lan), 2-3 dehidroksialanin (Dha) ve 2-3 dehidroksibutirin (Dhb) gibi doğada ender rastlanan amino asitlerdir. Nisinin yapısındaki bu lantiyoninler 5 adet halka yapısı oluşturmaktadır (Bu halkalar A, B, C, D ve E olarak isimlendirilmiştir) (Şekil 2.1 ve 2.2). İçerdiği lantiyonin köprülerinden dolayı, nisin lantibiyotikler sınıfına dahil edilmiştir (Schnell *et al.* 1988).

Bugüne kadar nisin A (Gross and Morell 1971), nisin Z (Graeffe *et al.* 1991; Mulders *et al.* 1991), nisin Q (Zendo *et al.* 2003), nisin U (Wirawan *et al.* 2006) ve nisin F (Kwaadsteniet *et al.* 2008) olmak üzere 5 farklı nisin varyantı karakterize edilmiştir (Şekil 2.2). Bu varyantlardan nisin A, Z, U üreticileri süt ve süt ürünlerinden (Gross and Morell 1971, Graeffe *et al.* 1991, Mulders *et al.* 1991), nisin Q üreticisi nehir suyundan (Zendo *et al.* 2003), nisin F üreticisi (Kwaadsteniet *et al.* 2008) ise yayın balığından izole edilmiştir. Bu varyantlardan yalnız nisin U, *L. lactis* suşları dışında bir bakteri tarafından (*Streptococcus uberis*) üretilmektedir.



Şekil 2.1 Doğada nadir bulunan dehidroalanin, dehidrobütrin, lantiyonin, ve β-metil lantiyonin amino asitlerin sentez mekanizması (Ingram, 1970)



Şekil 2.2 Nisin A, Z, Q ve U'nun yapısı. Lantiyonin köprüleri A-E olarak gösterilmiştir. Dha= Dehidroalanin, Dhb= Dehidrobütrin; Ala-S-Ala, lantiyonin; Abu-S-Ala, β -metil lantiyonin. Varyantlarda Nisin A'dan farklı olan amino asitler gri tonla işaretlenmiştir (Gross and Morell 1971; Chatterjee *et al.* 2005; Wirawan *et al.* 2006)

Nisin varyantları arasındaki temel farklılık, primer yapıda bazı pozisyonlarında görülen amino asit değişimleridir. Nisin Z, nisin A'dan farklı olarak 27. pozisyonda histidin yerine asparajin aminoasitini içermektedir (Graeffe *et al.* 1991, Mulders *et al.* 1991). Nisin Q'da nisin Z'ye göre üç amino asit (Val 15, Leu 21, Val 30) bakımından farklı bulunmuştur. Bugüne kadar bu varyant üreticisi olan sadece bir suş tanımlanmıştır (Zendo *et al.* 2003). *Streptococcus uberis* tarafından üretilen nisin U; yaygın rastlanılan nisin A ve nisin Z'ye göre 9 amino asit (Lys 4, Lle 15, Dhb 18, Pro 20, Leu 21, Gly 27, His 29, Phe 30 ve Gly 31) bakımından farklılık göstermektedir. Ayrıca diğer varyantlardan farklı olarak 34 aminoasit yerine, 31 amino asit içermektedir. Bununla birlikte bu varyantta da modifiye amino asitlerin ve lantiyonin köprülerinin yerleşimi, diğer varyantlarla benzerdir. Son olarak yayın balığı izolatu olan *L. lactis* tarafından üretilen nisin F, nisin A ve nisin Z'den sadece 30. pozisyondaki aminoasitin valin olmasıyla farklılaşmıştır. Ancak bu varyanta ait lantiyonin köprülerinin yerleşimi henüz aydınlatılmamıştır (Gross and Morell 1971, Graeffe *et al.* 1991, Mulders *et al.* 1991, Zendo *et al.* 2003, Wirawan *et al.* 2006, Kwaadsteniet *et al.* 2008).

Üç farklı grup tarafından yürütülen NMR çalışmaları neticesinde nisin molekülünün oldukça esnek bir yapıda olduğu saptanmıştır (Slijper *et al.* 1989, Chan *et al.* 1989, Palmer *et al.* 1989). Nisin yapısındaki B, D ve E halkalarında yer alan 1. ve 4. amino asitlerin tiyoeter bağı ile bağlanması sonucu, β dönüş pozisyonları oluşmaktadır. A ve C halkaları ise, değişken yapılar göstermesi nedeniyle net olarak tanımlanamamıştır.

Nisin molekülü oldukça esnek olmasına rağmen, sulu ortamda amfipatik yapıda iki farklı bölge içermektedir. Birinci bölge A, B, C lantiyonin halkalarını içeren Ala 3-Ala 19 amino asitlerinden diğeri ise birbirine sarılmış D ve E lantiyonin halkalarını içeren Ala 23-Ala 28 amino asitlerinden meydana gelmiştir. N- ve C- uçları ayrıca "ABC" ve "DE" bölgelerini birleştiren ve Met 21 pozisyonunda bulunan esnek bir "menteşe" yapısına sahiptir. Nisin molekülünde hidrofilik ve yüklü amino asitler çoğunlukla C- uçta yer alırken, N- uçtaki aminoasitlerin önemli bir kısmı hidrofobik yapıdadır. Burada sadece, Lys 12 yüklü bir amino asittir. Bu nedenle nisin molekülünün amfipatik özelliğinden söz etmek olasıdır (Palmer *et al.* 1989).

van den Hooven *et al.* (1993) nisin moleküllerini sodyum dodesil sulfat (SDS) ve dodesil fosfokolin (DPC) misellerine tutundurarak, molekülün bağlanma özelliklerini araştırmıştır. Molekülün misellere bağlanması, nisin molekülünün antimikrobiyel etkisinde ilk basamak olan sitoplazmik membrana bağlanmasının modelini oluşturmuştur. Araştırma sonuçları, nisinin misellere bağlandığında amfipatik özelliğinin devam ettiğini ve bu tutunmanın A halkası üzerinde konformasyonel bir değişikliği tetiklediğini göstermiştir.

2.1.2 Nisinin fiziksel ve kimyasal özellikleri

Nisin molekülü katyonik özellikte olup, nisin A'nın pozitif net yükü 5, diğer varyantların ise 4'tür. Bu moleküllerin tümü alkali ortamda izoelektrik noktaya sahiptir (Jung 1991). Nisin molekülü, yapısında aromatik amino asitlerin bulunmaması nedeniyle 260 nm ve 280 nm dalga boyunda ışık absorpsiyonu göstermez. Nisin molekülünün stabilitesi, çözünürlüğü ve biyolojik aktivitesi, pH değerinin artışıyla birlikte azalmaktadır. Özellikle alkali ortamlarda çözünürlüğü tamamen düşmektedir. Örneğin, ticari kullanımı bulunan nisin A'nın çözünürlüğü pH 2'de 57 mg mL⁻¹ iken, pH 6'da 1.5 mg mL⁻¹'ye düşmektedir. pH 8.5'in üzerinde ise bu değer 0.25 mg mL⁻¹ civarındadır (Hurst 1981, Liu and Hansen 1990). Alkali ortamlarda, molekül içi veya moleküller arası kimyasal modifikasyonlar nedeniyle, nisin molekülünde geri dönüşümsüz inaktivasyon meydana gelmektedir. Özellikle hidroksil (OH) iyonlarının etkisiyle dehidro amino asitler modifiye olabilmektedir (Liu and Hansen 1990). Nisin Z ve nisin Q, nisin A'ya göre daha fazla çözünebilme yeteneğindedir. Bu durum asparajin amino asitinin histidine göre daha fazla hidrofilik özellikte olmasından kaynaklanmaktadır (Davies *et al.* 1998). Nisin pH 2'de aktivite kaybı olmadan sterilize edilebilir. Ancak pH 5'de % 90'dan fazla aktivite kaybı meydana gelir. Ayrıca nisin molekülü α -kimotripsin ve proteinaz K uygulamasına karşı duyarlıdır (de Vuyst and Vandamme 1994, Motlagh *et al.* 1991).

2.1.3 Nisinin antimikrobiyel etki mekanizması

Nisinin antimikrobiyel aktivitesi, hedef hücre sitoplazmik membranında por oluşumunu teşvik etmek ve murein sentezini engellemek suretiyle ortaya çıkmaktadır (Ruhr and Sahl 1985, Kordel and Sahl 1986). Ortama nisin ilavesi durumunda hassas hücrelerde membran potansiyeli düşmekte ve bu durum proton motivasyon gücünün kaybı ile sonuçlanmaktadır (Gao *et al.* 1991, Garcia *et al.* 1993). Nisin varlığında porların oluşmasıyla hücreler için

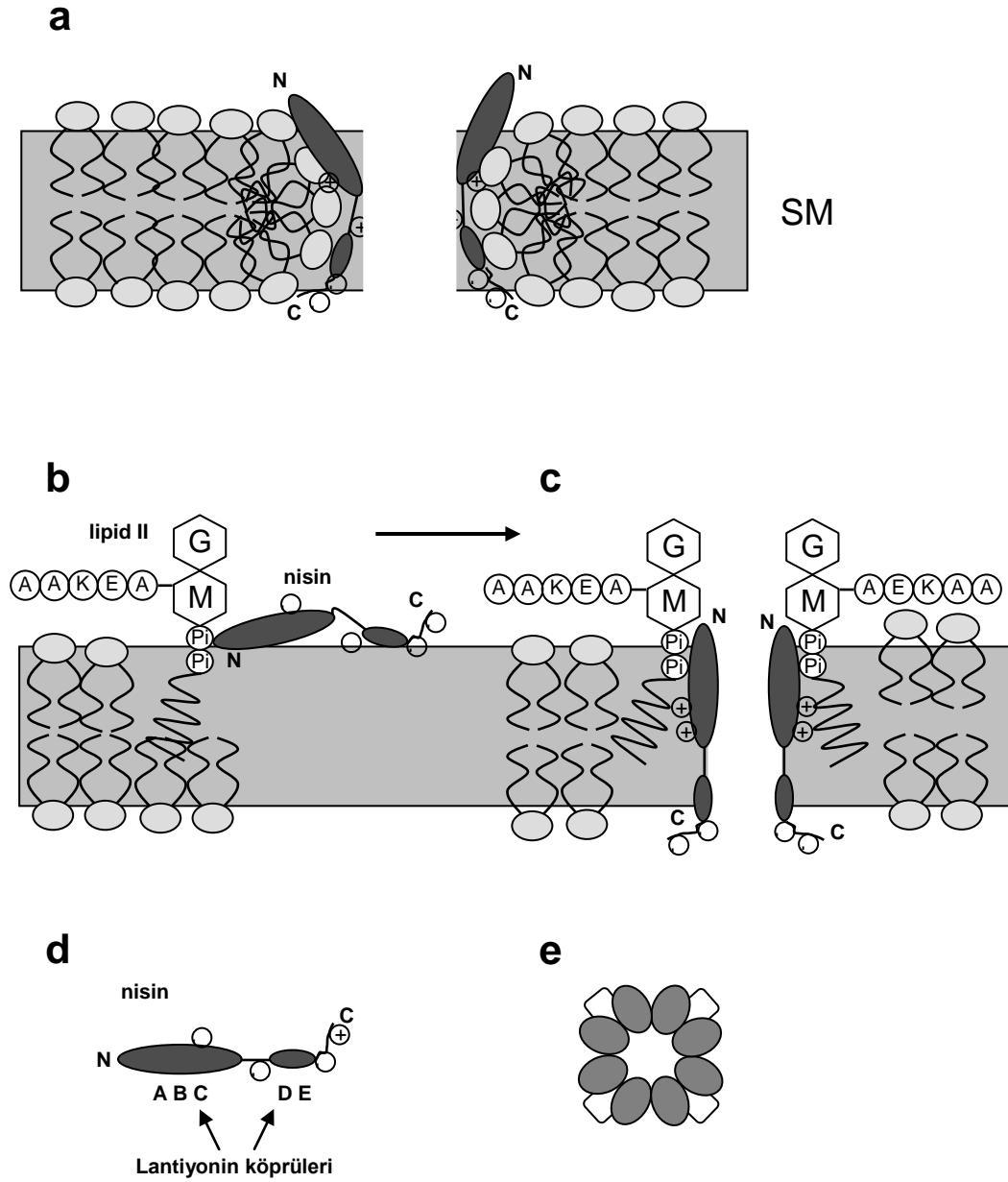
gerekli olan aminoasitlerin, ATP ve monovalent katyonların kaybı meydana gelmektedir (Ruhr and Sahl 1985). Sonuç olarak hassas hücredeki tüm biyokimyasal reaksiyonlar durmaktadır.

Nisin sitoplazmik membran üzerinde por oluşumunu, hem mikromolar hem de nanomolar konsantrasyonda teşvik edebilmektedir. Nisinin membran üzerinde por oluşturma mekanizmasının açıklanmasını sağlayan ilk veriler, bu bakteriyosinin mikromolar konsantrasyonda kullanılmasıyla elde edilmiştir. Driessen *et al.* (1995) yüksek konsantrasyondaki nisinin zivitteryonik fosfatilkolin (PC) yapay membranından 6-karboksiflorasan bileşiklerinin difüzyonunu indüklediğini fakat anyonik karakterli fosfatilgliserol (PG) membranından herhangi bir bileşiğin salınımına yol açmadığını belirlemiştir. Bu durum nisinin zivitteryonik fosfolipit yapılarla etkileşime girdiği ve por oluşumuna neden olduğu şeklinde açıklanmıştır. Ancak daha sonra yapılan çalışmalarda, nisinin yüksek konsantrasyonda bulunması durumunda, sitoplazmik membranda anyonik fosfolipitlerle de etkileşime girerek por oluşturabildiği saptanmıştır (Demel *et al.* 1996, Martin *et al.* 1996). Son olarak Breukink *et al.* (1998) nisin molekülünün hücre yüzeylerinde yerleşimini inceledikleri çalışmada; molekülün her iki ucunun da lipit faz içerisine girdiğini ve membran yüzeyine paralel olduğunu saptamıştır. Nisin molekülünün mikromolar konsantrasyondaki por oluşum mekanizması, sıkıştırma (Wedge) modeli olarak adlandırılmıştır (Şekil 2.3a). Bu modele göre yüksek konsantrasyondaki nisin, lipit dinamiğini bozmakta ve membrandaki anyonik fosfolipitleri eğerek por oluşumuna yol açmaktadır. Söz konusu porlar, hücrenin membran potansiyelinin ve proton motivasyon gücünün kaybına neden olmaktadır (van den Hooven *et al.* 1996).

Nisinin nanomolar konsantrasyondaki antimikrobiyel etki mekanizması, hücre duvarı öncü molekülü lipit II'nin nisinle olan ilişkisinin anlaşılması sonucunda aydınlatılmıştır. Söz konusu ilişki ilk defa lipit II molekülünün birleştirici fonksiyonunun belirlenmesiyle ortaya çıkmıştır (Brötz *et al.* 1998). Ancak por oluşumu için gerekli nisin miktarının lipit II tarafından düşürüldüğü ve bunun nisinin etkinliğinde anahtar rol oynadığı Breukink *et al.* (1999) tarafından yapılan deneylerle kanıtlanmıştır. Araştırmacılar, lipozom içerisinde bir molekül lipit II'nin bulunması durumunda bile, nisinin bu moleküle yüksek ilgi gösterdiğini ve model membranlarda por oluşturarak sızıntının meydana gelmesine yol açtığını saptamıştır. İleri çalışmalarda, sitoplazmik membranda por oluşumu için öncelikle nisinin N- ucundaki İle-1 aminoasidinin, lipit II'nin fosfat gruplarına bağlandığı, ardından

C- ucunun bu molekülle ilişkilendiği ve son aşamada membrana tutunduğu belirlenmiştir (Wiedemann *et al.* 2001, Hsu *et al.* 2002, Bonev *et al.* 2004, Bauer and Dicks 2005) (Şekil 2.3 b ve c). Bu bulgulara ilave olarak, nisinın tutunması için lipit II üzerinde bir başka ikincil yapının olduğu da öne sürülmüştür (Bonev *et al.* 2004). Tüm bu bulgular nisinın sitoplazmik membran yüzeyinde por oluşumuna yol açabilmek için lipit II'ye gereksinim duyduğuna işaret etmektedir. Nisinın lipit II ile etkileşimde bulunarak gösterdiği antimikrobiyel aktivite sistemi, fiç-delme modeli olarak adlandırılmaktadır. Bu model sisteminde 8 adet nisin molekülünün ve 4 adet lipit II'nin etkinlik gösterdiği saptanmıştır (Wiedemann *et al.* 2001, Hasper *et al.* 2006) (Şekil 2.3e).

Nisin vejetatif bakteri formlarının yanı sıra spor gelişimini de engellemektedir. Nisinın sporlar üzerindeki inhibisyon etkisinin, didehidro amino asitlerin membranda bulunan sülfidril grupları ile reaksiyona girmesinden kaynaklandığı görüşü giderek yaygınlık kazanmaktadır (Morris *et al.* 1984, Buchman *et al.* 1988). Bu görüşü destekleyen en önemli kanıt, yapısında dehidroalanin yerine, alanin amino asidi bulunan mutant nisinın, *Bacillus* sporlarına karşı daha düşük inhibisyon etkinliği gösterdiğinin tespitidir (Chan *et al.* 1996).



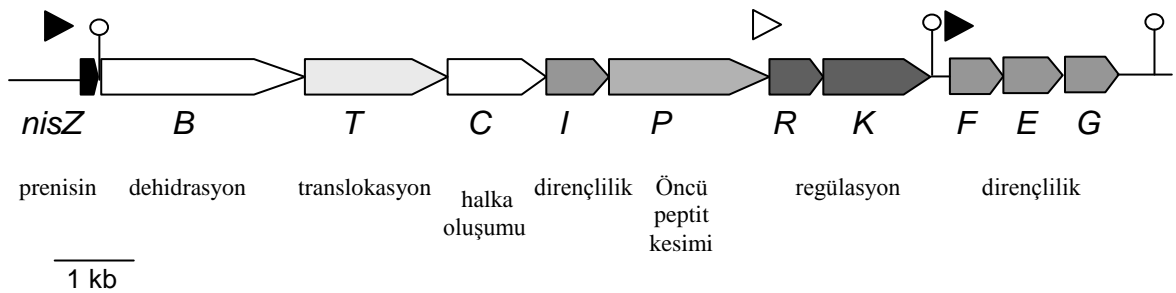
Şekil 2.3 Nisin tarafından indüklenen membran por modelleri a) Sıkıştıma modeli; hedef bağımsız por. Mikromolar konsantrasyonlarda nisin fosfolipitlerin hidrofilik kısımları ile etkileşimde bulunmakta ve membran bütünlüğünün bozulmasına neden olmaktadır. b) Nisin N- ucu aracılığıyla fosfatların lipid II kısmına bağlanmaktadır. c) Nisinin C- ucu membran boyunca transloke olmakta ve nisin-lipid II poru oluşmaktadır. d) Nisinin fonksiyonel açıdan önemli kısımları: N- uç köprüleri, ABC, C- uç köprüleri DE ve aralarında bulunan esnek menteşe bölgesi. e) Nisin-lipid II kompleksinin üstten görünümü. SM: Sitoplazmik membran, G: N-asetilglukozamin, M: N-asetilmuramik asit (Wiedemann *et al.* 2001)

2.1.4 Nisin üretiminden sorumlu gen kümesinin organizasyonu

Klasik mutasyon denemelerinden elde edilen veriler ışığında nisin üretim özelliğinin stabil olmadığını belirlenmesi ve konjugal yolla aktarılabilişliğinin tanımlanması, bu özelliğın plazmid doğasına işaret etmiştir (Kozak *et al.* 1974, Leblanc *et al.* 1980, Gasson 1984, Gonzales and Kunka 1985, Tsai and Sandine 1987, Kaletta and Entian 1989). Kaletta and Entian (1989) tarafından yürütölen araştırmalarda *L. lactis* subsp. *lactis* 6F3 suşunda nisin üretiminden sorumlu *nisA* geninin büyük bir konjugatif plazmid üzerinde bulunduğu belirlenmiştir. Ayrıca *L. lactis* subsp. *lactis*'te 30 Mda ve *L. lactis* ATCC11454 suşunda 28 Mda'luk plazmidlerin nisin üretimi ve dirençliliğinde görev aldığı ileri sürölmüştür (Gasson 1984, Piard *et al.* 1990). Bu bulgulara rağmen, nisin üretimini kodlayan genlerin detaylı fiziksel karakteristikleri, ancak nisin biyosentez genlerinin klonlanması ve sonda olarak kullanılması sonucu anlaşılmıştır. Nitekim nisin üretim yeteneğinin plazmid içermeyen bir suşa konjugal yolla aktarılması neticesinde, alıcı suşun kromozomunda yer alan restriksiyon kesim fragmentinin kaybolması, nisin üretiminin kromozomal DNA kökenli bir transpozon tarafından kodlandığına işaret etmiştir. İleri analizler sonucu IS904 insersiyon serilerinin, aktarılan genlerin kromozomal DNA ile temas bölgelerinde tespit edilmesi, nisin transpozonların kompozit doğasını düşöndürmüştür. Ancak bu yaklaşım da, daha sonra konjugatif transpozon Tn5301'in bulunması ve karakterize edilmesi ile geçerliliğini yitirmiştir (Horn *et al.* 1991). Ayrıca dalgalı alan jel elektroforezi analizleri ile nisin-sakkaroz gen blokunun taşıdığı transpozonun, 70 kb büyüklükte olduğu saptanmıştır. Transpozonlar üzerinde yoğunlaşan çalışmalarda, nisin üreticisi *L. lactis* suşlarında farklı yapısal özelliklere sahip Tn5276, Tn5301, Tn5306, Tn5307, Tn5278 ve Tn5481 transpozonları tespit edilmiştir (Buchman *et al.* 1988, Dodd *et al.* 1990, Rauch *et al.* 1991, Thompson *et al.* 1991, Engelke *et al.* 1992, Rauch and de Vos 1992, Kuipers *et al.* 1993, Rauch *et al.* 1994, Siegers and Entian 1995, Immonen and Saris 1998). Bu transpozonlar, Rauch *et al.* (1994) tarafından 13 farklı nisin üreticisi laktokok suşu kullanılarak yürütölen sistematik çalışmada, üç ana grup altında toplanmıştır. I. sınıfta yer alan transpozonların tamamı sol terminal ucunda IS1068 serilerini içeren konjugatif yapılardır. II. sınıf transpozonlar ise I. sınıfta yer alanların aksine, tanımlanmış bir insersiyon serisi içermeyen konjugatif transpozonlardır. III. sınıfta yer alan transpozonlar ise, sol uçtaki delesyondan dolayı konjugal aktarım yeteneğini kaybetmiştir. Ayrıca bu transpozonlarda sakkaroz operonunun bulunmadığı belirlenmiştir. Tüm bu veriler ışığında günümüzde nisin üretimi

ve dirençliliğinden sorumlu genlerin kromozomal kökenli olduğu ve konjugatif transpozonlar tarafından taşındığı kesinlik kazanmıştır.

Bugüne kadar nisin biyosentezi ve dirençlilik genlerini taşıyan transpozonların tam DNA dizi analizleri çıkarılmamıştır. Ancak *L. lactis* 6F3 suşunda nisin temel geni *nisA*'nın, transpozonun sol ucundaki insersiyon serisinden 800 bç aşağıda yer aldığı belirlenmiştir. Ayrıca nisin üretiminden sorumlu diğer genlerin sırası da saptanmıştır (Dodd *et al* 1990). Genetik tamamlama testleri sonucunda transpozonda nisin üretiminden sorumlu genleri içeren bölgenin, 14 kb büyüklüğünde ve 11 gene sahip bir regülon olduğu belirlenmiştir (Şekil 2.4) (Buchman *et al.* 1988, McAuliffe *et al.* 2001, Takala and Saris 2007). Bu regülon *nisA/Z/Q BTCIPRK* ve *nisFEG* olmak üzere, nisin tarafından teşvik edilebilen iki operon içermektedir (Kuipers *et al.* 1995, de Ruyter *et al.* 1996). Ayrıca regülonda *nisRK* genleri önünde sürekli çalışan bir promotor yer almaktadır. Son yıllarda yapılan bir çalışmada, nisin teşvikinin olmadığı durumda bile *nisI* transkriptinin varlığı saptanmıştır. Bu bulgu *nisI* geni önünde yer alan ve sürekli çalışan bir iç promotorun daha varlığına işaret etmiştir (Li and O'Sullivan 2006). Nisin regülonunda yer alan genler; biyosentez (*nisBTCIPRK*), regülasyon (*nisRK*) ve dirençlilik (*nisFEG*) genleri olarak sınıflandırılmaktadır. Nisin U varyantının gen organizasyonu, diğer varyantlardan farklıdır (*nsuPRKFEGABTCI*). Bu durum evrimsel süreçte gen gruplarının farklı organizmalardan alınmış olabileceği şeklinde yorumlanmaktadır (Wirawan *et al.* 2006).



Şekil 2.4 Nisin üretimi, regülasyonu ve dirençliliğinde görev alan genlerin organizasyonu. Açık ve koyu olarak işaretlenmiş üçgen şekiller, nisinle teşvik edilebilen ve konstütatif çalışan promotorları tanımlamaktadır. Saç tokası şekiller transkripsiyon terminatörlerinin yerini ifade etmektedir (McAuliffe *et al.* 2001, Zendo *et al.* 2003)

2.1.4.1 Biyosentez genleri

Nisin biyosentezinden sorumlu ilk gen olan *nisB*, temel nisin geninin (*nisA*) 108 bç altında yer almaktadır. Bu gen ilk defa, DNA dizi analizi sonucunda büyük bir kodlama bölgesinin varlığının anlaşılması ile saptanmıştır (Buchman *et al.* 1988, Kaletta and Entian 1989). Steen *et al.* (1991) söz konusu açık okuma kalıbının 2556 bç uzunluğunda olduğunu ve 100.5 kDa büyüklüğünde bir proteini kodladığını tanımlamıştır. Ancak günümüzde gelişmiş bilgisayar program analizleriyle NisB proteininin 117,5 kDa büyüklüğünde olduğu kesinlik kazanmıştır (Lubelski *et al.* 2008). *nisB* geninin 917. amino asitinden sonra bir “dur” kodonunun yerleştirilmesi, nisin biyosentezini kesintiye uğratmamış ve bu durum kodlanan proteinin C- ucunun biyosentezde zorunlu bir rolününün olmadığı şeklinde yorumlanmıştır. Ancak *nisB* genine homolog olan *SpaB* ve *EpiB* genlerinin diğer lantibiyotiklerin biyosentezinde mutlak gerekli olduklarının belirlenmesi, *nisB* geninin de nisin biyosentezinde eşdeğer bir rol aldığını düşündürmüştür. Nitekim delesyon çalışmaları sonucu NisB proteininin, nisin biyosentezinde serin ve treonin aminoasitlerinin dehidrasyonundan sorumlu olduğu saptanmıştır (Engelke *et al.* 1992, Kuipers *et al.* 1993, Karakas *et al.* 1999, Koponen *et al.* 2002, Okeley *et al.* 2003). NisB proteini hücre sitoplazmik membranında lokalize olmaktadır. Bu tespit ilk kez Steen *et al.* (1991) tarafından söz konusu proteinin kloroplast membran proteinleriyle homolog olduğunun belirlenmesiyle yapılmıştır. Daha sonra maya ikili hibrit sistemleri ve de kütle spektroskopisi analizleri kullanılarak, NisB proteininin hidrofilik yapıda, amfipatik α -helisler içerdiği ve membranların sitoplazmik kısmında yer aldığı kanıtlanmıştır (Siegers *et al.* 1996, Kuipers *et al.* 2006, Lubelski *et al.* 2008).

Nisin biyosentezinden sorumlu bir diğer gen (*nisT*), *nisB* geni dur kodonunu izlemektedir. Bu açık okuma kalıbı bölgesi, 600 aminoasit içeren ve 69 kDa büyüklüğünde olan bir protein kodlamaktadır (Engelke *et al.* 1992). *nisT* geni bir diğer lantibiyotik olan subtilinin biyosentezinde görev alan *spaT* geni ile yüksek oranda benzerlik göstermektedir (Klein *et al.* 1992). Bu benzerlikten hareketle, *nisT* geninin ATP-bağımlı transfer proteinlerini kodladığı öne sürülmüştür (Engelke *et al.* 1992). Siegers *et al.* (1996) maya ikili hibrit sistemlerini kullandığı çalışmada, NisT proteininin NisC proteini ile etkileşime girdiğini tespit etmiş ve iki NisT proteininin, bakteriyel ABC taşıyıcılara benzer şekilde bir kompleks oluşturduğunu örneklemiştir. Qiao and Saris (1996), *nisT* geninde delesyon bulunduran mutant *L. lactis* suşlarının nisin üretmediğini, ancak bu hücrelerin

parçalanması durumunda ortama nisin geçtiğini saptamıştır. Mutant suşa *nisT* kodlayan bir plazmidin aktarılması durumunda ise nisin üretimi tekrar gerçekleşmiştir. Genellikle bakteriyel ABC tip taşıyıcılar güçlü bir substrat özgüllüğü göstermektedir. Ancak Kuipers *et al.* (2006) NisT'nin tamamen modifiye edilmiş veya modifiye edilmemiş peptitleri de transfer edebildiğini belirlemiştir.

Dizi analizleri *nisT* geninin son kısmıyla üst üste çakışan yeni bir açık okuma kalıbının bulunduğunu ve söz konusu bölgenin yaklaşık 47.3 kDa moleküler büyüklükte bir proteini kodladığını göstermiştir (Engelke *et al.* 1992). Bu dizi subtilin ve epidermin biyosentezinden sorumlu *spaC* (Klein *et al.* 1992) ve de *epiC* (Schnell *et al.* 1992) genleriyle yüksek homoloji içermektedir. Siegers *et al.* (1996) maya ikili hibrit ve ko-immunopresipitasyon sistemleri kullanarak, NisC proteininin membranla ilişkili olduğunu ve prenisinle etkileşimde bulunduğunu kanıtlamıştır. Bu nedenle üretici hücrede *nisC* genin fonksiyonun kesintiye uğratılması, nisin üretiminin durması ile sonuçlanmıştır (Ra *et al.* 1999). İleri araştırmalar NisC proteininin serbest sistein amino asitlerinin dehidrasyonunda ve metil-lantiyonin köprülerinin katalizinde görev aldığını göstermiştir (Koponen *et al.* 2002). *E. coli*'de üretilen NisC proteini ile prenisinin birlikte inkübe edilmesi durumunda, lider peptidin uzaklaştırılarak, aktif nisin molekülünün oluşması, bu durumu desteklemiştir (Li *et al.* 2006).

Nisin biyosentezinden sorumlu olan son gen *nisP*'dir. Bu gene ait ilk veri van der Meer *et al.* (1993) tarafından Tn5276 konjugatif transpozonunun 12 kb'lık DNA fragmentinin klonlaması ile elde edilmiştir. Araştırmacılar söz konusu genin 682 amino asit içeren ve N-terminal sinyal dizisine sahip bir proteini kodladığını saptamıştır. Ayrıca kodlanan proteinin subtilin benzeri serin proteazlara homolog özellikte katalitik bir bölgeye ve C-terminal membran tutunma bölgesine sahip olduğu da tespit edilmiştir (Siezen 1999). *E. coli*'de üretilerek saflaştırılan NisP proteininin proteaz aktivitesinin, biyolojik aktif nisin oluşumunda rol oynadığı deneysel olarak saptanmıştır (van der Meer *et al.* 1993). Detaylı fonksiyonel analizler NisP proteazının prenisine özgüllük gösterdiğine ve lider peptidin prenisini inaktif tutmak için gerekli olduğuna işaret etmiştir (Kuipers *et al.* 1993, Li *et al.* 2006).

2.1.4.2 Regülasyon genleri

Nisin regülönünde, nisin biyosentezinin regülasyonundan sorumlu iki farklı genin (*nisR* ve *nisK*) görev aldığı saptanmıştır (van der Meer *et al.* 1993, Engelke *et al.* 1994, Kuipers *et al.* 1995, Ra *et al.* 1996). Bu çalışmalarda *nisR* geni tarafından kodlanan proteinin (689 aminoasit) iki bileşenli sinyal transdüksiyon sistemlerinin üyesi olduğu ve transkripsiyonel regülasyon proteinleri ailesine benzer amino asit dizilimi içerdiği belirlenmiştir. Ayrıca, *nisR* geninin kesintiye uğratılması halinde, nisin üretiminin durduğu tespit edilmiştir.

nisR geninin tanımlanmasından bir yıl sonra, nisin regülasyonunda görevli diğer gen olan *nisK* rapor edilmiştir (Engelke *et al.* 1994). NisK proteini sitoplazmik membranda yer alan histidin sensör kinaz fonksiyonuna sahiptir. NisK proteini hücre dışında bulunan nisin ile etkileşime girmekte ve histidinin fosforilasyonu ile başlayan sinyal iletim aşaması gerçekleştirilmektedir (Kuipers *et al.* 1995).

nisR geni üst akış bölgesinin, *E. coli*'deki promotor içermeyen glukoronidaz geni (*gusA*) üzerine yerleştirilmesi durumunda glukoronidaz aktivitesinin tespit edilmesi, regülasyon genlerinin bu bölgede yer alan bir promotor tarafından ifade edildiğine işaret etmiştir. Bu bölgede yürütülen DNA dizi analizleri sonucu, promotorun -10 ve -35 bölgelerinde konsensüs dizileri içerdiği tespit edilmiştir. Nisin regülönünde bulunan diğer promotorlardan (*P_{nisA}* ve *P_{nisF}*) farklı olarak, nisin teşviki olmadan da *nisR* promotorundan glukoronidaz geni transkriptinin çıkarılabilmesi, bu promotorun kesintisiz çalıştığını kanıtlamıştır. Regülasyon genlerine ait diğer spesifik özellikler *nisR* geninin GTG başlama kodonunu kullanması ve *nisK* geninin optimal olmayan bir ribozom bağlanma bölgesine sahip olmasıdır. Bu nadir rastlanılan özelliklerin; NisR ve NisK proteinlerinin translasyonel regülasyonunda rol aldığı düşünülmektedir (Kuipers *et al.* 1995, de Ruyter *et al.* 1996).

2.1.4.3 Dirençlilik genleri

Birçok gram pozitif bakteride olduğu gibi, nisin üreticilerinin membranları da nisine karşı hassastır. Nisin üreticilerinin, bu metabolite karşı dirençliliğinin sağlanmasında görev alan proteinler, nisin operonunda yer alan *nisI*, *nisF*, *nisE* ve *nisG* genleri tarafından kodlanmaktadır (Kuipers *et al.* 1993, Qiao *et al.* 1995, Siegers and Entian 1995, Immonen

and Saris 1998, Stein *et al.* 2003). Bu genlerden üçü (*nifF*, *nifE* ve *nifG*) nisin operonunda, diğer genlerden ayrı olarak, *nifF* promotörü altında ve nisinin transkripsiyonel indüksiyonu yolu ile ifade edilmektedir (de Ruyter *et al.* 1996). *nifFEG* genlerinde kodlanan proteinlerin ABC transport kompleksini oluşturduğu belirlenmiştir (Kuipers *et al.* 1993, Qiao *et al.* 1995, Siegers and Entian 1995, Immonen and Saris 1998, Stein *et al.* 2003). Bu komplekste NifF sitoplazmik ATP-bağlama proteini, NifE ve NifG hidrofobik integral membran proteinleri olarak görev almaktadır (Stein *et al.* 2003). Bu genlerin nisin dirençliliğindeki önemlerini belirlemek amacıyla nisin üreticisinde *nifG* ve *nifE* genleri antisens-RNA tekniği kullanılarak susturulmuş ve sonuçta nisine karşı dirençliliğin tamamen kaybolduğu tespit edilmiştir (Immonen and Saris 1998).

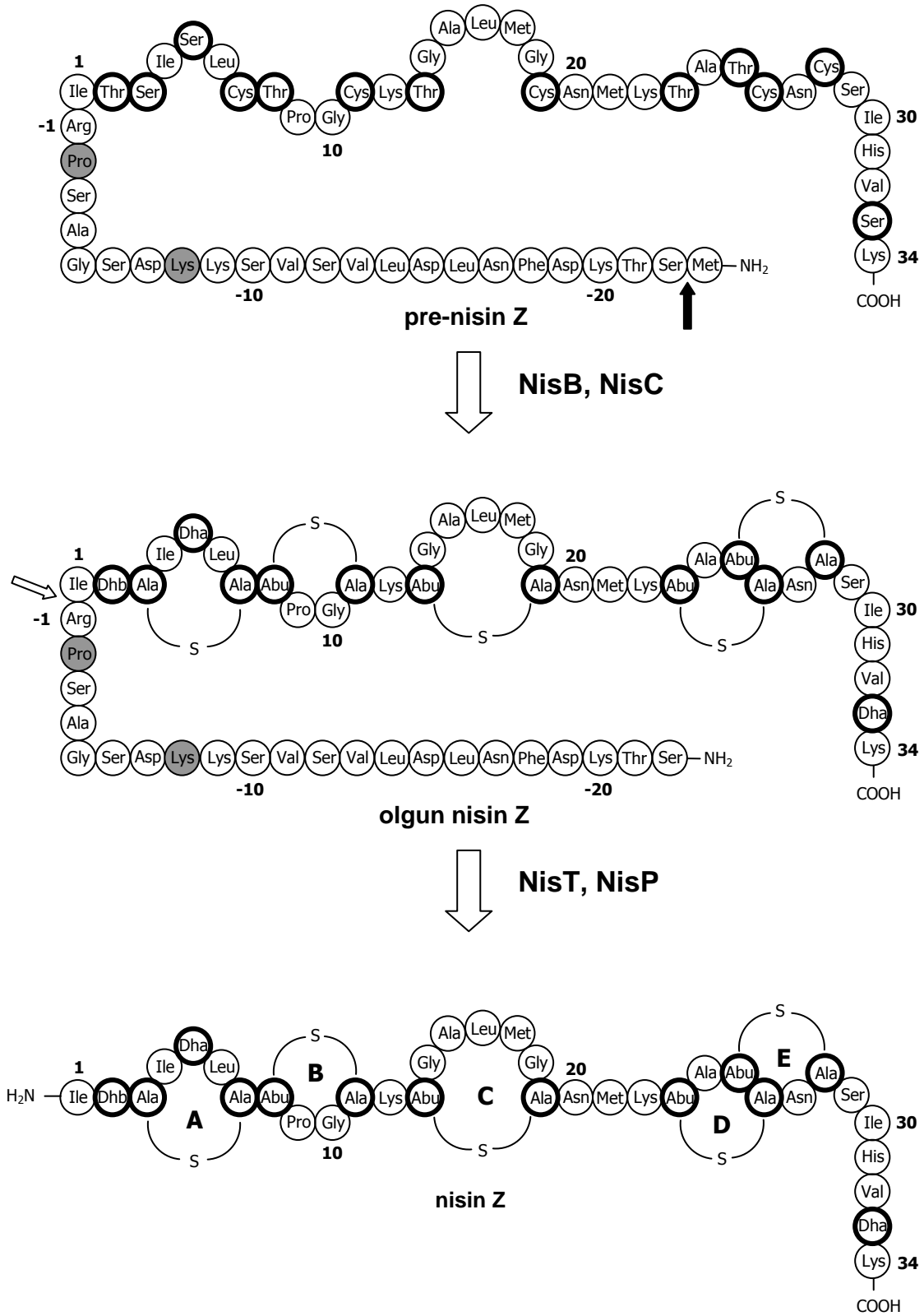
nifI geni, Tn5276 nisin-sakkaroz transpozonunda dirençlilikle ilişkili tanımlanan ilk genidir (Kuipers *et al.* 1993). Bu gen tarafından kodlanan NifI proteini, veri tabanlarındaki diğer proteinlerle hiçbir homoloji taşımamaktadır. Ancak karboksil ucundaki sinyal dizisi, NifI proteininin periferik membran proteini olduğuna işaret etmektedir. *nifI* geninin nisine hassas *L. lactis* MG1614 suşuna klonlanması ve ifadesi neticesinde, bu suşta nisin dirençliliğinin önemli oranda arttığı saptanmıştır (Kuipers *et al.* 1993). Bunun aksine *nifI* geninde meydana getirilen çerçeve kayması mutasyonu, üretici suşun dirençlilik seviyesinde düşüşe neden olmuştur (Ra *et al.* 1999). *nifI* geni, *nifA* promotörü tarafından transkribe edilen operonda, *nifC* ve *nifP* genleri arasında yer almaktadır. Bu genin ifadesinin *nifA* promotöründen başlatıldığı düşünülmektedir. Ancak yapılan bir çalışmada *nifI* genin önünde internal bir promotörün varlığına dair bulguların elde edilmesi (Li and O'sullivan 2006), söz konusu genin ifadesinin daha karmaşık bir süreç olduğuna işaret etmektedir.

2.1.5 Nisin biyosentezi

Nisin biyosentezi, ribozomal olarak sentezlenen öncü peptidin post-translasyonel modifikasyonları ile tamamlanmaktadır. Öncelikle ribozomal sentez sonucu yüksek moleküler ağırlığa sahip lineer ve biyolojik olarak inaktif öncü peptit sentezlenir. Daha sonra bu öncü peptit bir veya daha fazla enzimin katalizörlüğünde; biyolojik olarak aktif, beş halkalı, olgun peptite dönüştürülür. Öncü nisinde 57 amino asit bulunmaktadır. Bu öncü peptitte yer alan lider peptit, modifikasyon ve hücre dışına taşınma süreçlerinde tanınma fonksiyonunu üstlenmektedir (Kuipers *et al.* 1993, Siegers *et al.* 1996). Aktif nisin

molekölünün oluşturulmasında ilk basamak; öncü molekülde yer alan serin ve treonin amino asitlerinin, NisB dehidrataz enzimi ile dehidre edilmesidir (Koponen *et al.* 2002). Dehidre edilen amino asitler, daha sonra siklaz enziminin (NisC) rol aldığı siklasyon reaksiyonlarına tabi tutulmaktadır (Koponen *et al.* 2002, Li *et al.* 2006). İki post-translasyonel enzimin etkisiyle modifiye edilen öncü peptit, ABC transfer fonksiyonu olan NisT proteini ile sitoplazma dışına taşınmaktadır (Qiao and Saris 1996, Kuipers *et al.* 2006). Son aşamada lider peptit NisP proteazın etkisiyle modifiye öncü molekülden uzaklaştırılır (Qiao *et al.* 1996). Nisin biyosentezinde post-translasyonel aşamalar Şekil 2.5'te, bu sentezin hücresel süreçleri ise Şekil 2.6'da verilmiştir.

Nisin biyosentezi iki elemanlı bir sistem (*nisRK*) tarafından regüle edilmektedir. Hücre dışında olgun nisin moleküllerinin birikimi kritik seviyeye ulaştığı zaman, hücre membranına bağlı kinazın (NisK) korunmuş bölgesinde yer alan His-238 amino asidi fosforile edilerek aktif hale geçer ve bu fosforil grubu NisR proteinine transfer edilir. İndüklenen NisR proteini ise, *nisABTCIP* ve *nisFEG* genlerinin önünde yer alan promotorları aktive ederek transkripsiyonunun başlamasını sağlar (Chandrapati and O'Sullivan 1999, Breukink *et al.* 2003). Nisinin otoindüksiyon mekanizması üzerinde yürütülen analizler, molekülün yapısındaki 1. ve 11. aminoasitlerin önemine işaret etmiştir (Kuipers *et al.* 1993, Kuipers *et al.* 1995, Takala and Saris 2007).



Şekil 2.5 Translasyon sonrası nisin biyosentez aşamaları. Lantiyonin köprüleri A-E harfleri ile belirtilmiştir. Siyah ok N-terminal metiyonin çıkarılma işlemi göstermektedir. Beyaz ok lider peptidin koparıldığı yere işaret etmektedir (Kuipers *et al* 1995)

kaynaklarının çeşit ve konsantrasyonu yanında, katyonlar ve sıcaklık değerleri ile ortamda oluşan nisin miktarının, nisin üretimi üzerindeki etkilerine yönelik çeşitli araştırmalar yapılmıştır (de Vuyst and Vandamme 1992, de Vuyst and Vandamme 1993, Matsusaki *et al.* 1996, Bertrand *et al.* 2001, Lv *et al.* 2004a, Lv *et al.* 2004b, Pongtharangkul and Demirci 2006).

2.1.6.1 Karbon kaynağının etkisi

Karbon kaynağının seçimi, hücre gelişimini ve nisin biyosentezini doğrudan etkilemesinden dolayı, nisin üretiminde temel kontrol basamağı olarak ele alınmaktadır (de Vuyst and Vandamme 1992, Lv *et al.* 2004a). Gelişme ortamında bulunan karbon kaynağı hücre gelişimini teşvik ettiği gibi, yüksek oranda bulunması halinde bakteriyel üreme ve nisin üretimi üzerinde baskılayıcı etki yapmaktadır. Bu nedenle farklı şeker türlerine ve bunların başlangıç konsantrasyonlarına bağlı olarak, nisin üretim miktarı değişebilmektedir (Pongtharangkul and Demirci 2006). Birçok araştırmacı, sakkaroz ve laktoz başta olmak üzere; glukoz, galaktoz, ksiloz, maltoz şekerlerini içeren besiyeri ortamlarını kullanarak, nisin üretim düzeylerini ve nisin biyosentezinin moleküler detaylarını incelemiştir (de Vuyst and Vandamme 1992, Amiali *et al.* 1998, Chandrapati and O'sullivan 1999, Lv *et al.* 2004a, Liu *et al.* 2005, Cheigh and Pyun 2005, Pongtharangkul and Demirci 2006).

Nisin üretimi ile sakkaroz fermentasyonu arasındaki ilişki, ilk olarak 1951'de Hirsch and Wheeler tarafından tanımlanmıştır (de Vuyst and Vandamme 1992, Lv *et al.* 2004a, Lv *et al.* 2004b, Cheigh *et al.* 2002). de Vuyst and Vandamme (1993) tarafından yürütülen bir çalışmada, 27 farklı *L. lactis* subsp. *lactis* suşunda nisin üretim kapasiteleri incelenmiş ve sakkaroz fermentasyon yeteneğinin, nisin üretimi ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir. pH kontrollü koşullarda sakkaroz konsantrasyonu 10 g L⁻¹'den 40 g L⁻¹'ye çıkarıldığında en yüksek nisin miktarı 3267 IU mL⁻¹ olarak hesaplanmıştır. Araştırmacılar 40 g L⁻¹ üzerindeki oranlarda ilave edilen sakkarozun, ortamda kaldığını ve nisin üretim miktarının azaldığını tespit etmiştir.

Lv *et al.* (2005) kesikli ve yarı kesikli fermentasyon sistemlerinde sakkarozun nisin üretimi ve hücre gelişimi üzerine etkisini araştırdıkları çalışmada; kesikli sistemde başlangıç sakkaroz konsantrasyonunun 30 g L⁻¹'yi aşması durumunda, nisin aktivitesinin hızlı bir düşüş gösterdiğini, ancak biyokütle miktarının etkilenmediğini saptamıştır. Temel

besiyerine % 0.5 sakkaroz ilavesini esas alan bir diğ er denemede ise, kontrolsüz koşullarda 2048 IU mL⁻¹ nisin miktarına ulaşılmıştır (Cheigh *et al.* 2002).

Sakkarozun nisin üretimi üzerindeki ana etkisinin, hücre gelişiminin teşvik edilmesi yolu ile gerçekleştiğı düşünölmektedir (de Vuyst and Vandamme 1992, Lv *et al.* 2004b). Nisin üreticisi *L. lactis* subsp. *lactis* suşlarının sakkarozu hızlı kullanabilme yeteneklerinin, fosfoenolpürivat bağımlı fosfotransferaz sisteminin etkinliğine bağılı olduğı tespit edilmiştir (de Vuyst and Vandamme 1992). Ayrıca bazı suşlarda nisin üretim yeteneğı ve sakkaroz fermentasyon kapasitesi arasında genetik bir ilişki bulunmaktadır (Leblanc *et al.* 1980, Gasson 1984, Gonzalez and Kunka 1985, Steele and McKay 1986). Bu suşlarda nisin üretimini ve sakkaroz kullanımını kodlayan genlerin aynı gen blokunda buldukları ve 70 kb'lık bir transpozonu oluşturdıkları belirlenmiştir (Gasson 1990, Steen *et al.* 1991). Bu bilgiler ışığında sakkaroz katabolizması ve nisin üretimi arasında ortak genetik regölasyon veya metabolik kontrol sistemlerinin bulunması, güçlü bir olasılık olarak görölmektedir (de Vuyst and Vandamme 1992).

Nisin üretiminde yaygın olarak kullanılan diğ er bir karbon kaynağı ise laktozdur. Nisin üretici *L. lactis* suşlarının doğıal habitatının süt olması, laktozu diğ er karbon kaynaklarından daha avantajlı kılmaktadır. Ayrıca süt ve süt ürünlerinin işlenmesinden açığı çıkan peyniraltı suyunun nisin üretiminde kullanım olanakları birçok araştırıcı tarafından çalışılmış ve nisin biyosentezinin bu ortamdaki davranışı belirlenmiştir. (Bertrand *et al.* 2001, Cheigh *et al.* 2002, Liu *et al.* 2003). Nisin üretimi üzerine farklı şekerlerin etkisinin kıyaslandığı bir çalışmada, en yüksek verimin laktoz varlığında meydana geldiğı saptanmıştır. Bu çalışmada, temel besiyerine % 0.5 oranında laktoz ilave edilmesi sonucu 16384 AU mL⁻¹ nisin verimi sağılanmıştır. Aynı denemenin sakkaroz, glukoz ve galaktoz varlığında yürütölmesi halinde ise, 8 kat daha düşük değerler elde edilmiştir (Cheigh *et al.* 2002). Benzer şekilde, laktoz içeren peynir altı suyunun kullanıldığı kesikli ve sürekli fermentasyon sistemlerinde nisin üretimindeki verimin 460–20500 IU ml⁻¹ arasında gerçekleştiğı tespit edilmiştir (Amiali *et al.* 1998, Desjardins *et al.* 2001, Bertrand *et al.* 2001, Liu *et al.* 2005). Son çalışmalarda NisR ve NisK sinyal sisteminden yoksun plazmidsiz *L. lactis* LM0230 hücrelerinde, ortamda nisin bulunmaması durumunda bile, *nisA* promotorunun galaktoz ve laktoz tarafından indüklendiğı saptanmıştır (Chandrapati and O'Sullivan 1999, Chandrapati and O'Sullivan 2002). Aynı çalışmada laktoz ve

galaktozun, nisin operonu promotorunun üzerinde bulunan iki tekrar seriyi (-107/-94 ve -39/-26 arasında yer alan) indüksiyon bölgesi olarak kullandığı tanımlanmıştır.

L. lactis subsp. *lactis* A164 suşu ile yürütülen çalışmalarda; laktoz varlığında üretilen *nisZ* yapısal geni transkriptlerinin, diğer şekerlere oranla daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Hücre gelişimi açısından laktoz, sakkaroz ve glukozla aynı düzeyde etkinlik içermesine rağmen, laktozun daha yüksek miktarda nisin üretimine yol açması, laktozun nisin üretiminin regülasyonundaki etkinliğine işaret etmektedir (Cheigh and Pyun 2005).

2.1.6.2 Azot kaynağının etkisi

Nisin üretici *L. lactis* suşları, gelişebilmeleri ve nisin üretebilmeleri için, çok sayıda organik ve inorganik bileşiğe ihtiyaç duyar. Organik bileşikler içerisinde azot kaynakları, hücrelerin gelişebilmeleri için hayati rol oynamaktadır. Özellikle laktokok suşları; besin ortamında maya özütü, proteaz pepton, kazein pepton gibi kompleks azot kaynaklarının bulunması halinde iyi bir gelişme göstermektedir. Bakteriyel gelişimdeki önemleri nedeniyle çeşitli azot kaynaklarının, özellikle peptitlerin ve amino asitlerin nisin üretimi üzerine etkileri, yoğun bir şekilde çalışılmıştır (de Vuyst and Vandamme 1993, de Vuyst 1995, Kim *et al.* 1997a, Cheigh *et al.* 2002, Li *et al.* 2002, Vazquez *et al.* 2004).

Bu yönde yapılan ilk çalışmada, de Vuyst and Vandamme (1993) farklı azot kaynaklarını % 2 sakkaroz bulunan besiyerinde, % 1 oranında kullanmıştır. Çalışmada maya özütü, pepton, et özütü, kan, balık ve soya unlarının kullanılması durumunda, yüksek nisin üretimi ve biyokütle oluşumunun gerçekleştiği belirlenmiştir. En yüksek nisin üretimi % 3 pamuk çiğiti ve % 4 soya ununun kullanılmasıyla elde edilmiştir (2500 IU mL⁻¹). Bu çalışmada kazein hidrolizati, mısır unu ve malt özütü ise nisin üretimi için uygun azot kaynakları olarak tanımlanmamıştır.

Nisin yanında diğer bakteriyosinlerin üretimi üzerine de etkili olduğu tespit edilmiş bir diğer azot kaynağı ise, maya özütüdür (de Vuyst 1995, Kim *et al.* 1997a). Maya özütünün M17 laktoz besiyerine %1 oranında ilave edilmesi durumunda, diğer azot kaynaklarına göre 2 kat daha fazla nisin üretiminin meydana geldiği belirlenmiştir. Ayrıca maya özütü oranının % 1'den % 3'e çıkarılması durumunda, nisin üretiminin ilave özüt oranı ile paralel bir şekilde yükseldiği, ancak bu seviyeden sonra üretimin sabitlendiği tespit edilmiştir. Bu

nedenle maya özütünün nisin üretimi için tek başına ideal azot kaynağı olabileceği ileri sürülmüştür (Cheigh *et al.* 2002). Maya özütü; serbest amino asitler ve kısa peptitlere ilave olarak, hücre gelişiminde önemli faktörleri de içerdiği için, nisin üretiminde diğer azot kaynaklarından daha etkin bulunmuştur (de Vuyst 1995, Cheigh *et al.* 2002).

Nisin üretimine farklı özellikteki aminoasitlerin de etkili olduğu belirlenmiştir (de Vuyst 1995, Vazquez *et al.* 2004). Öncü peptitte yer almayan amino asitlerin (aspartik asit, glisin, hidroksi-prolin, lisin, felinalanin, prolin, triptofan ve tirozin) sentetik besiyerinde % 0.1 oranında kullanılması durumunda, hücre gelişiminin ve nisin üretiminin değişmediği tespit edilmiştir. Hatta prolin, hidroksiprolin, aspartik asit ve lisinin, nisin üretimini durdurduğu saptanmıştır. Aynı çalışmada öncü peptitte yer alan amino asitlerin (serin, treonin ve sistein) hücre yoğunluğu ve nisin üretim seviyesi üzerine etkili olduğu ve sentetik besiyerinde % 0.1 oranında kullanılmaları durumunda nisin üretim düzeyini % 50 oranında artırdıkları belirlenmiştir. Ancak aynı amino asitlerin başlangıç konsantrasyonlarının % 0.5'i geçmesi durumunda üretici hücrelerin gelişimi engellenmiştir (de Vuyst 1995). Klasik yöntemlerle sürekli nötralize edilen sistemlerde yürütülen nisin üretimlerinde, sistein ve triptofanın aktivatör, prolinin ise baskılayıcı rolünün olduğu saptanmıştır (Vazquez *et al.* 2004).

Nisin üretiminde peptitlerin amino asitlere nazaran daha etkili olduğu, değişik çalışmalarda belirlenmiştir (de Vuyst 1995, Cheigh *et al.* 2002, Vazquez *et al.* 2004). Zira laktokoklarda peptit transport sistemleri, amino asit alımından daha aktiftir. Ayrıca amino asitler, peptitler içinde yer aldığı zaman katabolizma etkisinden daha iyi korunmaktadır. Son olarak peptitler, transmembran proteinlerini uyarmak suretiyle oluşturdukları tepki aracılığı ile transkripsiyonu aktive edebilmektedir. Bu durumu destekleyen en iyi kanıt, nisinin kendisinin de hücrede indükleyici rol almasıdır. Ayrıca başka bir bakteriyosin olan sakasinin biyosentezinde 17 aminoasitlik bir peptidin indükleyici rol aldığı saptanmıştır (Vazquez *et al.* 2004).

2.1.6.3 İnorganik bileşiklerin etkisi

Nisin üretimi üzerine etkisi denenen ilk inorganik bileşik fosfat olmuştur. de Vuyst and Vandamme (1993) çalışmalarında, farklı fosfat kaynaklarının (KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Na_2HPO_4 , $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) kesikli sistemlerde

nisin üretimi üzerindeki etkilerini araştırmıştır. Bu fosfat kaynakları içinde, KH_2PO_4 'ün en etkili bileşik olduğu tespit edilmiştir. KH_2PO_4 'ün başlangıç konsantrasyonunun % 5 düzeyinde kullanımı ile nisin aktivitesinin 3500 IU mL^{-1} gibi yüksek bir değere ulaştığı saptanmıştır. Ancak bu seviyeden sonra, hem nisin miktarı ve hem de biyokütle oluşumu hızla azalmıştır. Yapılan başka bir çalışmada ise, aynı KH_2PO_4 konsantrasyonlarının *L. lactis* IO-1 suşunda nisin Z üretimi üzerinde etkili olmadığı belirlenmiştir. Aynı çalışmada KH_2PO_4 'ün aksine, 0.1-0.2 M CaCl_2 ilavesinin nisin Z üretiminde % 20 artışa neden olduğu saptanmıştır. Ayrıca % 0.1 (v/v) Tween 80'nin kullanılması sonucu nisin aktivitesinde % 30 artış tanımlanmıştır (Matsusaki *et al.* 1996).

Nisin üretiminde fosfatın temel rolü, ortamı tamponlaması ve hücre gelişim ajanı olarak işlev görmesi ile açıklanmaktadır (de Vuyst and Vandamme 1992, Li *et al.* 2002, Liu *et al.* 2003). Nitekim yüksek fosfat konsantrasyonu, ATP oluşumunu teşvik ederek hücrelerin yüksek enerji seviyesinde bulunmasını sağlamaktadır. Ca^{+2} 'nin nisin üretimindeki etkisi ise, öncü nisin molekülünü modifiye eden enzimlerden NisP peptidazların aktivasyonuna yol açmasından kaynaklanmaktadır. Çünkü bu enzimler üzerinde, Ca^{+2} iyonlarının bağlanabileceği bölgeler bulunmaktadır. Diğer taraftan Ca^{+2} iyonları üretici suşlarda lipid membran bütünlüğünün korunmasında da rol almaktadır. Bilindiği gibi fosfolipit yapılar lantibiyotiklerin temel hedef bölgeleridir (Matsusaki *et al.* 1996). Tween 80, üretilen nisinin ortamdaki çeperlere tutunmasını engelleyerek çözünürlüğünü artırmakta ve bu yolla nisin üretimini teşvik etmektedir (Liu *et al.* 2005).

2.1.6.4 pH'in etkisi

Nisin üretiminde de, diğer bakteriyosinler ile benzer şekilde, optimal pH aralığı 5.5-6.8 olarak saptanmıştır (de Vuyst and Vandamme 1992, Matsusaki *et al.* 1996, Cheigh *et al.* 2002, Liu *et al.* 2005, Pongtharangkul and Demirci 2006). *L. lactis* IO-1 suşu için, ksiloz bulunan ortamda en verimli nisin üretimi pH 6.0'da gerçekleşirken, glukoz bulunan ortamda bu değere pH 5.5'te ulaşılmıştır (Matsusaki *et al.* 1996). *L. lactis* A164 suşunun kullanıldığı bir diğer çalışmada ise, laktoz içeren ortamda en yüksek nisin üretimi pH 6.0'da gözlenmiştir (Cheigh *et al.* 2002).

Bakteriler, gelişme ortamındaki yüksek pH değişimlerine karşı canlılığını koruyabilse de, sitoplazmik pH'nın, birçok metabolik yol için optimal olan nötral değerlerden uzaklaşması olumsuz durum yaratmaktadır. Bu nedenle birçok asit toleranslı laktik asit bakterisinde olduğu gibi *L. lactis* hücrelerinde de iç pH, dış pH'daki düşüğe bağlı olarak 5–15 dakika içinde ayarlanmakta ve böylece sabit bir pH gradienti sağlanmaktadır (Siegumfeldt *et al.* 2000). Ancak düşük pH seviyelerinde metabolizmaya ait bazı enzimler inhibe edilmektedir. Ayrıca hücre gelişimi, şekerlerin katabolizması sonucu oluşan enerjinin ATPaz tarafından sitoplazmik alkalizasyon için kullanılması nedeni ile, tamamen durmaktadır (Even *et al.* 2002). Nitekim Guerra and Pastrana (2003) *L. lactis subsp. lactis*'te dış ortam pH'sının 5'in altına düşmesi sonucunda, hem hücre gelişiminin hem de nisin üretiminin durduğunu saptamıştır.

Nisin üretimi ile ortam pH'sı arasındaki ilginç bir diğer ilişki; ortam pH'sının nötral pH'ya yaklaşması durumunda, üretilmiş olan nisin, üretici suşun hücre membranına tutunmasıdır. pH'nın 6'ya ayarlanmasıyla nisin; üretici suşun membran yapısının kationik doğasına bağlı olarak, hücre duvarına tutunduğu belirlenmiştir. Aynı ortamda pH'nın 5'in altına düşürülmesi durumunda da hücre duvarına tutunan nisin tekrar ortama salındığı saptanmıştır (Yang *et al.* 1992, Guerra and Pastrana 2003).

2.1.6.5 Nisin miktarının etkisi

Nisin üretimi, ortamda yüksek konsantrasyonda nisin bulunması durumunda inhibe olmaktadır. Bu durum üretici suşlarda, maksimum dirençliliğin sağlanabildiği bir sınır değer bulunmasından kaynaklanmaktadır (Kim *et al.* 1997a, Qiao *et al.* 1997, Kim *et al.* 1998). Örneğin, *L. lactis* N8 ve LAC48 suşlarının dirençlilik gösterebildiği maksimum nisin değerleri, sırasıyla 1000 IU mL⁻¹ ve 5000 IU mL⁻¹ olarak ölçülmüştür (Qiao *et al.* 1997). Nisin miktarının etkisi en fazla kesikli ve yarı kesikli fermentasyonların son evresinde görülmektedir. Nitekim birçok çalışmada nisin üretiminin ulaşılan maksimum değerden sonra düştüğü belirlenmiştir. Bu durumun en önemli nedenlerinden biri, durağan fazda bulunan hücrelerin yüksek nisin konsantrasyonlarından etkilenmesidir (de Vuyst and Vandamme 1992, de Vuyst and Vandamme 1993, Matsusaki *et al.* 1996, Bertrand *et al.* 2001, Lv *et al.* 2004a, Lv *et al.* 2004b, Pongtharangkul and Demirci 2006).

2.1.7 Nisin üretiminde kullanılan model sistemler

Endüstriyel boyutta verimli nisin üretiminin sağlanması amacıyla yürütülen ilk araştırmalar, kesikli sistemlerle başlamıştır (de Vuyst and Vandamme 1992). Bu çalışmaları, verimin daha da artırılması amacıyla yarı-kesikli (Hull and Gibbson 1997, Amiali *et al.* 1998, Guerra and Pastrana 2001) ve sürekli (Sonomoto *et al.* 2000, Scannell *et al.* 2000, Desjardins *et al.* 2001, Tolonen *et al.* 2004, Pongtharangkul and Demirci 2006) sistemler takip etmiştir. Üretim sistemleri, nisin biyosentezi üzerine etkili olan besiyeri kompozisyonu, pH, sıcaklık ve ortamda biriken nisin miktarı gibi faktörler dikkate alınarak geliştirilmiştir. Elde edilen bulgular ışığında nisin üretim sistemleri üzerinde söz konusu faktörlerin olumsuz etkilerini azaltacak yönde modifikasyonlar gerçekleştirilmektedir. Bu modifikasyonlar çoğunlukla üretici suş için stres ortamı oluşturacak fermentasyon metabolitlerinin uzaklaştırılması, fermentasyon ortamının optimizasyonunun sağlanması ve üretici suşun canlılığının ve gelişiminin artırılması üzerine yoğunlaşmaktadır (Hull and Gibbons 1997, Kim *et al.* 1997a, Shimizu *et al.* 1999, Bertrand *et al.* 2001, Yu *et al.* 2002, Guerra and Pastrana 2003, Lv *et al.* 2004a, Lv *et al.* 2004b, Tolonen *et al.* 2004, Liu *et al.* 2005, Pontharangkul and Demirci 2006, Papagianni *et al.* 2007, Wu *et al.* 2008).

Nisin üretimi için kullanılan model sistemlerde, öncelikle tanımlı ya da yarı tanımlı besin ortamları denenmiş ve bu ortamlarında optimizasyonlar sağlanmıştır. Bu çalışmalarda M17 ve MRS besiyerleri, yüksek biyokütle oluşturmaları nedeniyle ön plana çıkmıştır (Cheigh *et al.* 2002, Liu *et al.* 2005). Üretilen nisin kompleks besin ortamlarından geri kazanımının güç olması nedeniyle, uygun minimal besiyerlerinin oluşturulması hedef alınmıştır. Bu doğrultuda endüstriyel üretimler için; peyniraltı suyu başta olmak üzere, çeşitli gıda atıkları, uygun azot ve karbon kaynakları ile takviye edilerek kullanılmaya başlanmıştır (Amiali *et al.* 1998, Desjardins *et al.* 2001, Guerra and Pastrana 2001, Vazquez *et al.* 2004, Pontharangkul and Demirci 2006, Jozala *et al.* 2007).

2.1.7.1 Kesikli ve yarı kesikli sistemler

Kesikli sistemlerde nisin üretimi ilk kez Hirsch and Wheeler tarafından, 1951'de çalışılmıştır. Bu sistemlerde nisin üretimi, hücre gelişimi ile bağlantılı olarak artmaktadır. de Vuyst and Vandamme (1992) tarafından, başlangıç şeker konsantrasyonunun 10 g L^{-1} sakkaroz olarak alındığı kesikli fermentasyonda *L. lactis* subsp. *lactis* NIZO 22186 suşunun

üssel fazda (4-8. saatler arası) 0.66 h^{-1} oranında hızlı bir hücre gelişimi gösterdiği ve buna bağlı olarak nisin üretiminin de yükselerek 1400 IU mL^{-1} değerine ulaştığı belirlenmiştir. Ancak aynı fermentasyonun 8. saatinden sonra hücre gelişiminin durduğu ve nisin üretiminin de azalmaya başladığı tespit edilmiştir. Kesikli sistemler, hücrelerin doğal gelişim eğrilerini gösterdikleri ortamlardır. Bu nedenle fermentasyon ortamında tükenen besin elementleri ve oluşturulan metabolitler, üretici hücre üzerinde oldukça etkilidir. Başlangıç sakkaroz konsantrasyonunun 40 g L^{-1} 'ye yükseltildiği diğer uygulamalarda biyokütle gelişimi $2.1 \text{ g kuru ağırlık L}^{-1}$ 'den, $4.1 \text{ g kuru ağırlık L}^{-1}$ 'ye kadar yükselmiş ve 2371 IU mL^{-1} nisin aktivitesine ulaşılmıştır (Lv *et al.* 2004b). Ancak karbon kaynağının artırılması bile, üremenin durma fazında meydana gelen nisin üretimindeki düşüşü engelleyememektedir. pH kontrollü kesikli sistemlerde sakkarozun karbon kaynağı olarak kullanılmasıyla $2.34 \text{ g kuru ağırlık L}^{-1}$ hücre yoğunluğu elde edilirken, nisin aktivitesi 1793 IU mL^{-1} olarak ölçülmüştür. Üremenin durma fazının sonunda görülen büyük azalma ise kısmen engellenmiştir (de Vuyst and Vandamme 1992). Benzer koşullarda *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 suşunun kullanılması durumunda, üretilen nisin miktarı 2658 IU mL^{-1} olmuştur (Lv *et al.* 2005).

Spesifik nisin üretimin artırılması ve üretici suşların aktif fazının uzatılabilmesi amacıyla yarı-kesikli fermentasyon sistemleri devreye sokulmuştur (Kim *et al.* 1997b, Amiali *et al.* 1998, Guerra and Pastrana 2003, Lv *et al.* 2004a, Lv *et al.* 2004b, Papagianni *et al.* 2007). Bu sistemlerde; diğer üretim teknolojileri için başlangıçta olması gereken yüksek besin konsantrasyonu ve fermentasyon süresince oluşan laktik asit miktarının üretici suş üzerindeki olumsuz etkisinin azaltılması hedeflenmiştir (Lv *et al.* 2004a, Lv *et al.* 2004b). Daha önce de ifade edildiği gibi karbon kaynağının regülasyonu, hücre gelişimini ve nisin biyosentezini doğrudan etkilemektedir (de Vuyst and Vandamme 1992). Bu yaklaşımla yürütülen bir çalışmada besleme çözeltisi, 300 g L^{-1} ve 135 g L^{-1} sakkaroz ve NaOH ilavesi ile hazırlanmıştır. Fermentasyon süresince son sakkaroz konsantrasyonu 40 g L^{-1} olacak şekilde, bu çözeltiden besleme yapılmıştır. Çalışmada en yüksek biyokütle oranı $4.2 \text{ g kuru ağırlık L}^{-1}$ olarak elde edilirken, 5010 IU mL^{-1} gibi oldukça yüksek nisin aktivitesine ulaşılmıştır. Karbon kaynağının kontrollü olarak beslendiği glukostat bir çalışmada; ortamda, 10 g L^{-1} glukozun bulunması halinde 6100 IU mL^{-1} gibi yüksek nisin üretim verimine ulaşıldığı, 25 g L^{-1} glukoz oranının aşılması durumunda ise verimin hızla düştüğü rapor edilmiştir (Papagianni *et al.* 2007). Yarı kesikli fermentasyonda karbon kaynağı besleme hızının belirlenmesini hedefleyen bir diğer çalışmada, 190 g L^{-1} sakkaroz içeren

solusyondan fermentör ortamına saatte 10 ml beslendiğinde, nisin üretim oranının kesikli üretime göre % 51 artış gösterdiği belirlenmiştir (Wu *et al.* 2008). Fakat kesikli sistemlerde görülen maksimum verimden sonraki düşüş, bu sistemde de meydana gelmiştir (Lv *et al.* 2004a). Nisin üretim miktarında meydana gelen düşmenin temel kaynağı, nötralizasyondan dolayı oluşan laktatın ve ortamda biriken nisinin üretici hücre üzerinde oluşturduğu olumsuz etkidir (Hull and Gibbons 1997, Shimizu *et al.* 1999, Tolonen *et al.* 2004). % 1 glukoz içeren minimal besiyeri ortamında, *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 suşu kullanılarak yürütülen yarı-kesikli nisin üretim sisteminde; NaOH yerine, 6 M NH₄OH kullanılması sonucu, nisin üretim miktarı 1080 IU mL⁻¹'den 1260 IU mL⁻¹'ye yükselmiştir (Hull and Gibbons 1997). Fermentasyon esnasında üretici suş tarafından oluşturulan laktik asidin üretici hücreler üzerindeki inhibisyon rolünün minimizasyonuna yönelik olarak tasarlanan bir çalışmada ise, kefirde izole edilen *Kluyveromyces marxianus* mayasının kullanımı önerilmiştir. Uygulama neticesinde saf kültürün kullanıldığı kontrol grubunda 2320 IU mL⁻¹ nisin aktivitesi elde edilirken, mayanın kullanıldığı kesikli fermentasyon sisteminde 3920 IU mL⁻¹ nisin aktivitesine ulaşılmıştır (Shimizu *et al.* 1999).

Kesikli ve yarı kesikli fermentasyon sistemlerinde ortamda oluşan olumsuz faktörlerin (laktat ve nisin) etkilerinin azaltılması amacı ile yararlanılan bir diğer strateji, yüzey aktif ajanların kullanımınıdır. Yu *et al.* (2002) sakkarozun karbon kaynağı olarak kullanıldığı fermentasyon ortamına, amberlit IRA-67 yüzey aktif bileşiğinin ilave edilmesiyle nisin üretim miktarının normal alkali nötralizasyonla yapılan kontrol grubuna göre 2 kat arttığı saptanmıştır. Diğer yandan bu koşullarda sakkaroz yerine galaktoz ve glukozun kullanımı ile sırasıyla 1.5 ve 0.3 kat artış sağlanmıştır. Nisinin, amberlit XAD-4 kullanılarak uzaklaştırılması esasına göre tasarlanan yarı-kesikli fermentasyon sisteminde; kullanılan *L. lactis* N8 ve LAC48 hücrelerinin, durma fazında da nisin üretimine devam ettiği tespit edilmiştir. Bu nedenle amberlit XAD-4'ün, nisinin yüzeyde tutulması için uygun bir materyal olduğu ileri sürülmüştür (Tolonen *et al.* 2004). Nisinin üretici organizma üzerindeki etkisinin azaltılmasını hedefleyen bir başka çalışmada; ortamda biriken nisin, bir çözücü (fenil-metil silika yağı) aracılığı ile ekstrakte edilmiştir. Çalışmada çözücünün üretici hücre üzerine inhibisyon etkisinin olmadığı, hatta hücre gelişimini % 21 oranında artırdığı belirlenmiştir. Ayrıca çözücünün nisini alarak üst faza ayrılması, nisinin üretici hücrelere karşı etkisini azaltmış, dolayısıyla nisin üretiminde % 24 artış kaydedilmiştir (Kim 1997).

2.1.7.2 Sürekli sistemler

Biyokütle miktarının artışı ile birlikte hacimsel nisin üretim miktarının da yükselmesi, endüstriyel nisin üretiminde immobilize hücre teknolojisi (İHT) kullanılarak üretim sürekliliğinin uzatılması düşüncesini doğurmuştur. Bu amaçla nisin üretici suşlar kademeli bir şekilde çoğaltılarak, çeşitli destek materyallerine immobilize edilmiş ve değişik özellikte biyokatalistler oluşturulmuştur. Ayrıca sürekli besleme ve ürün çıkışı sağlanarak, sürekli nisin üretim denemeleri gerçekleştirilmiştir (Wan *et al.* 1995, Scannell *et al.* 2000, Sonomoto *et al.* 2000, Desjardins *et al.* 2001, Bertrand *et al.* 2001).

İmmobilizasyon tekniği kullanılarak nisin üretiminin yapıldığı ilk çalışmada, destek materyali olarak doğal kalsiyum alginat kullanılmıştır. Ancak çalışma sonucunda, amaçlanan yüksek nisin üretimine ve uzun süreli üretim stabilitesine ulaşılamamıştır (Wan *et al.* 1995). Devam eden çalışmalarda; hücre immobilizasyonunun etkin olarak yapılabileceği, besin akışının hızlı olduğu ve yüksek stabiliteye sahip destek materyallerinin kullanıldığı sistemlerin geliştirilmesi üzerinde durulmuştur. Sonomoto *et al.* (2000) nisin Z üreticisi olan *L. lactis* IO-1 suşunu; kalsiyum alginat, K-karegenan, agar ve agaroz, üretan prepolimer, foto-çapraz bağlanabilir rezin prepolimeri gibi materyallere tutuklayarak, ya da kitosan ve foto çapraz bağlı resin jel tanelerine tutundurarak, hücrelerdeki nisin üretim düzeylerini ve söz konusu materyallerin kullanılabilirliklerini araştırmıştır. Tüm tutuklanmış materyallerde besin elementlerinin difüzyonunun kısıtlanması nedeniyle düşük gelişme hızı ve nisin üretimi saptanmıştır. Ayrıca foto-çapraz bağlı resin materyallerinde tutuklama işlemi esnasında kullanılan kısa dalga boyuna sahip ultraviyole ışığın hücrelerin gelişimi üzerindeki inhibisyon etkisinden dolayı, üreme oranını önemli ölçüde düşürdüğü belirlenmiştir. *L. lactis* DPC496 hücrelerinin kalsiyum alginata immobilize edildiği iki farklı çalışmada ise, birbirine zıt sonuçlar elde edilmiştir. Scannell *et al.* (2000) MRS broth besin ortamında 0.3 h^{-1} dilüsyon oranında (D) 5120 AU ml^{-1} nisin aktivitesine ulaşırken, Sonomoto *et al.* (2000) aynı koşullarda bu verimi 1700 AU ml^{-1} olarak saptamıştır. Kullanılan bir diğer immobilizasyon materyali ise K-karegenan/baklagil gamı'dır. Araştırmacılar bu materyale *L. lactis* UL719 suşunu immobilize ettikten sonra, fermentör hacmine göre $3.5 \text{ hacim dk}^{-1}$ havalandırma ve 0.15 h^{-1} dilüsyon oranı kullanarak 2048 IU mL^{-1} nisin verimi elde etmiştir (Desjardins *et al.* 2001).

İmmobilize hücre tekniğinin (İHT) nisin üretiminde uygulanması; hücrelerin immobilize edildiği materyalin kolon şeklinde bir kaba doldurulması ve burada stabilizasyonun sağlanması amacıyla 0.3 M KCl ve 0.03 M CaCl çözeltilerin kullanılması suretiyle yapılmaktadır. Sistemde pH'nın ayarlandığı ve taze hazırlanan besiyerinin bulunduğu ayrı bir karıştırıcı hazne bulunmaktadır. Bir pompa aracılığı ile karıştırıcı bölmede pH'sı 6'ya ayarlanan besin ortamı, hücrelerin bulunduğu immobilizasyon materyalinden geçirilmekte ve üretilen nisin bulduğu ortam tekrar karıştırıcı bölümde toplanmaktadır (Sonomoto *et al.* 2000, Scannell *et al.* 2000, Liu *et al.* 2005). İmmobilize sistemde oluşan metabolitler, belli bir seviyeden sonra üretici hücre üzerine zararlı etki yapmaktadır. Bu etkinin giderilmesi amacıyla Bertrand *et al.* (2001) pH kontrollü besiyeri değişimini önermiştir. K-karegenan/baklagil gamına 10^{11} CFU mL⁻¹ düzeyinde immobilize edilen *L. lactis* subsp. *diacetylactis* hücreleri, bir saatlik zaman aralıklarıyla yeni besi ortamına alınarak süreklilik sağlanmıştır. Bu çalışmada 8200 IU mL⁻¹ toplam ve 5730 IU mL⁻¹ h⁻¹ hacimsel nisin aktivitesine ulaşılmıştır.

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda kullanılan model sistemlerde alınan nisin üretim oranları Çizelge 2.1'de verilmiştir. Buna göre immobilize hücre teknolojisi kullanılması ve hücrelerin saatte bir yeni ortama alınması durumunda en yüksek hacimsel nisin üretimi sağlamıştır. Bu sonuçlar, fermentasyon ortamının sürekli değiştirilmesinin; düşük pH, laktat ve nisin hücreler üzerindeki inhibisyon etkilerini ortadan kaldırdığını açıkça göstermektedir.

Çizelge 2.1 Farklı model sistemlerde nisin üretim miktarlarının karşılaştırılması

Fermentasyon Tipi	Kültür ^b	Canlılık (CFU ml ⁻¹)	Hacimsel Üretim (IU ml ⁻¹ h ⁻¹) ^c	Hücresele Üretim (IU ml ⁻¹ h hücre ⁻¹) ^d	Kaynaklar
RCB (1-h cycles)	İK	1.00 x 10 ¹¹	5720	57,2x 10 ⁻⁹	Bertrand <i>et al.</i> 2001
Kesikli	SK	2,80 x 10 ¹⁰	529	18.9x 10 ⁻⁹	Amiali <i>et al.</i> 1998
Kesikli	SK	6,70 x 10 ⁹	854	127x 10 ⁻⁹	Amiali <i>et al.</i> 1998
Sürekli	SK	2,75 x 10 ⁹	460	167x 10 ⁻⁹	Desjardins <i>et al.</i> 2001
Sürekli	İK	1,07 x 10 ¹¹	1760	16,4 x 10 ⁻⁹	Desjardins <i>et al.</i> 2001
Sürekli ^a	İK	1,37 x 10 ¹⁰	216	15,8x 10 ⁻⁹	Sonomoto <i>et al.</i> 2000
Yarı-Kesikli	SK	1,20 x 10 ⁹	84	61,3x 10 ⁻⁹	Hull and Gibbons 1997
Yarı-Kesikli ^a	SK	2,07 x 10 ⁹	626	302x 10 ⁻⁹	Lv <i>et al.</i> 2004a
Kesikli ^a	SK	3,69 x 10 ⁹	400-450	122x 10 ⁻⁹	De Vuyst and Vandamme 1994 Parente and Ricciardi 1999

^a :Hücre kuru ağırlığı (HKA) verileri Canlılık (CFU mL⁻¹) = HKA= 2.02x10⁻⁹ CFU + 0.012 denklemi kullanılarak CFU mL⁻¹'ye dönüştürülmüştür (Shimizu *et al.* 1999).

^b : SK: Serbest-hücre kültürü; İK: İmmobilize hücre kültürü.

^c : Toplam fermentasyon süresi sonundaki ortalama.

^d : Hücresele üretim (IU mL⁻¹ h⁻¹ hücre)= Hacimsel üretim (IU ml⁻¹ h⁻¹)/Canlılık (CFU mL⁻¹)

2.1.8 Nisin üretimi için geliştirilmiş suşlar

Nisin üretim seviyesi ve miktarı; besin kompozisyonu, pH, sıcaklık gibi faktörlere bağlı olduğu kadar, üretici hücrenin doğası ile de ilişkilidir. Nitekim farklı üretici suşlarda, farklı sınır üretim oranları tespit edilmiştir (Kim *et al.* 1997a, Qiao *et al.* 1997, Kim *et al.* 1998). Bu nedenle yüksek nisin üretme yeteneğine sahip suş taramaları uzun süreden beri uygulanmakta ve günümüzde de devam etmektedir (Beasley and Saris 2004, Akçelik *et al.* 2006). Çevresel faktörlerin optimizasyonu ve çeşitli model sistemlerin geliştirilmesi suretiyle artırılmaya çalışılan nisin üretimi, aynı zamanda moleküler boyutta yapılan

çalışmalarla da desteklenmektedir. Nisin biyosentezinden sorumlu genlerin belirlenmesi ve genetik davranışlarının aydınlatılması, bu yöndeki çalışmalara hız kazandırmıştır.

Endüstriyel nisin üretimine yönelik suş geliştirme çalışmaları, moleküler düzeyde ilk kez konjugasyon uygulamaları ile yürütülmüştür. Ancak bugüne kadar yapılan çalışmalarda, transkonjugantlar için, verici suşta elde edilen nisin üretim düzeyi geçilememiştir. Ayrıca transkonjugatlarda nisin fenotipinin stabil olmadığı da tespit edilmiştir. Nisin üretiminde kullanılan hücrelerin, doğal nisin dirençlilik genlerinin (*nisI*, *nisF*, *nisE* ve *nisG*) yüksek düzeyde ifadesinin sağlanması, bu bakteriyosinin üretimi üzerine olumlu etki yapmaktadır. Çünkü daha önce de söz edildiği gibi, üretici hücrelerin dirençlilik gösterebildiği bir sınır nisin değeri bulunmaktadır. Nitekim *nisI* genlerinin vektör bir plazmid aracılığı ile üretici doğal suşa aktarılması ve bu genlerin ifadesinin sağlanması sonucunda, nisin üretim miktarında % 20'lik bir artışın söz konusu olduğu belirlenmiştir (Kim *et al.* 1998).

Dirençlilikten sorumlu *nisI* geninin kullanılması, operonda yer alan fonksiyonel genlerle yapılan çalışmalara ışık tutmuştur. *L. lactis* subsp. *lactis* 164 suşunda nisin Z üretimi; *nisZ*, *nisR*, *nisK* ve *nisF*, *nisE*, *nisG* genlerinin çoklu kopyaları klonlanarak, artırılmaya çalışılmıştır. Kontrol suşta 16.000 AU mL⁻¹ olan nisin aktivitesi; *nisR* ve *nisK* ve *nisF*, *nisE*, *nisG* genlerinin klonmasıyla 25.000 AU mL⁻¹ değerine ulaşmıştır. *nisR*, *nisK* genlerinin yüksek düzeyde ifadelerinin sağlanması durumunda, *nisZ* geninin transkripsiyonunun da teşvik edildiği belirlenmiştir (Cheigh *et al.* 2005).

L. lactis suşlarında nisin üretimi ve hücre gelişimi üzerine düşük pH'nın olumsuz etkisi, oldukça iyi bilinen bir konudur. Bu inhibisyon etkisinin engellenmesi amacıyla; hücrede karbonhidrat katabolizması, laktik asit yerine, hücre için inhibisyon etkisi olmayan etanol ve alanine dönüştürülmüştür. Bu dönüşümler; etanol için *Zymomonas mobilis* hücrelerinden pürivat dekarboksilaz (PDC) ve alkol dehidrogenaz (ADH), alanin için alanin dehidrogenaz (AlaDH) genlerinin *L. lactis* hücrelerinde yüksek düzeyde ifade edilmesi sonucu başarılmıştır. Metabolik yolun alanine dönüştürüldüğü hücrelerde nisin üretimi 1.7 kat artmıştır (Wardani *et al.* 2006).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Bakteri suşları, plazmidler ve kültür ortamları

Çalışmada kullanılan bakteri suşları ve plazmidler Çizelge 3.1’de verilmiştir. Nisin üreticileri olan *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LL27, *L. lactis* ATCC 11454 ve çalışmada elde edilen rekombinant *L. lactis* suşları % 0.5 glukoz içeren M17 (Merck) besiyeri (GM17) ortamında üretildi. Alıcı suş *Escherichia coli* TG1 ve rekombinant plazmidlerin çoğaltılması için kullanılan diğer rekombinant *E. coli* suşları Luria Bertani besiyeri (LB) ortamında 37 °C ve 250 rpm hızda karıştırılarak inkübe edildi. Seçici ortamlara eritromisin *L. lactis* suşları için 5 µg mL⁻¹, *E. coli* suşları için ise 200 µg mL⁻¹ oranında ilave edildi. Nisin aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan indikatör suş *Micrococcus luteus* NCIMB 86100, LB besiyeri ortamında 37 °C ve 250 rpm karıştırma hızında üretildi.

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan bakteri suşları ve plazmidler

Suşlar ve plazmidler	Özellikleri	Kaynak
<i>E. coli</i> TG1	Transformasyon alıcı suşu	Sambrook <i>et al.</i> 1989
<i>E. coli</i> ECO123	Mekik vektör pLEB124'ü taşımaktadır. Em ^r	Qiao <i>et al.</i> 1996
<i>E. coli</i> ECO710	pLEB673 plazmidini taşımaktadır. Em ^r	Bu çalışma
<i>E. coli</i> ECO711	pLEB672 plazmidini taşımaktadır. Em ^r	Bu çalışma
<i>E. coli</i> ECO712	pLEB674 plazmidini taşımaktadır. Em ^r	Bu çalışma
<i>L. lactis</i> ATCC11454	Nisin üreticisi	Qiao <i>et al.</i> 1996
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> LL27	Nisin üreticisi	Akçelik <i>et al.</i> 2006
<i>L. lactis</i> LAC338	<i>L. lactis</i> LL27 suşuna pLEB672 plazmidi aktarılmıştır. Em ^r	Bu çalışma
<i>L. lactis</i> LAC339	<i>L. lactis</i> LL27 suşuna pLEB673 plazmidi aktarılmıştır. Em ^r	Bu çalışma
<i>L. lactis</i> LAC340	<i>L. lactis</i> LL27 suşuna pLEB674 plazmidi aktarılmıştır. Em ^r	Bu çalışma
<i>L. lactis</i> LAC341	<i>L. lactis</i> LL27 suşuna pLEB124 plazmidi aktarılmıştır. Em ^r	Bu çalışma
pLEB124	Mekik vektör, P45 laktokok promotörünü ve Em ^r direnç genini içermektedir.	Qiao <i>et al.</i> 1996
pLEB672	pLEB124 vektöründeki P45 promotörü altına klonlanan <i>nisRK</i> genlerini içermektedir.	Bu çalışma
pLEB673	pLEB124 vektöründeki P45 promotörü altına klonlanan <i>nisFEG</i> genlerini içermektedir.	Bu çalışma
pLEB674	pLEB124 vektöründeki P45 promotörü altına klonlanan <i>nisRKFEG</i> genlerini içermektedir.	Bu çalışma

Em^r: Eritromisin direnç

3.2 Yöntem

3.2.2 Rekombinant hücrelerin oluşturulması

3.2.2.1 Genomik DNA izolasyonu ve polimeraz zincir reaksiyon (PZR) uygulamaları

Nisin üreticisi *L. lactis* LL27 ve *L. lactis* ATCC11454 suşlarından genomik DNA izolasyonları EZNA bakteriyel DNA kiti (Omega, USA) kullanılarak yapıldı. Kit klavuzunda belirtilen protokole ilave olarak, hücre yoğunluğu OD 0.8 değerine ayarlandıktan sonra lizozim ve proteinaz K uygulamaları yapıldı.

Polimeraz zincir reaksiyonları (PZR), sıcaklık döngüsü uygulanan cihazda (Eppendorf, Germany) gerçekleştirildi. Çalışmanın amacı doğrultusunda nisin gen kümesi içerisinde yer alan ve çoğaltılacak üç farklı fragment için kullanılan primerler (Oligomer Oy, Finland) Çizelge 3.2’de verilmiştir. PZR uygulamaları, yüksek duyarlılıkta çalışan füzyon HotStart DNA polimeraz (New England, Biolabs) kullanılarak gerçekleştirildi. Buna göre reaksiyonun bir çevrimi 98 °C’de 5 saniye, 65 °C’de 30 saniye ve 72 °C’de 5 dk ile tanımlanan, toplam 30 çevrimlik protokol uygulandı. PZR reaksiyonlarında aşağıda verilen oranlar kullanıldı

PZR Reaksiyon Karışımı

dH ₂ O	34.3 µL
5X füzyon HF tamponu	10 µL
10 mM dNTP mix	1 µL
Primer (ileri)	0.6 µL
Primer (geri)	0.6 µL
MgCl ₂	0.5 µL
Kalıp DNA	2.5 µL
Füzyon HotStart	
DNA polimeraz	0.5 µL

Çizelge 3.2 PZR reaksiyonlarında kullanılan primerler. Altı çizili bölgeler restriksiyon endonükleaz kesim bölgeleridir

Primer	Sekans 5'-3'	Tm
NisFEG fw- <i>Hind</i> III	AGATACA <u>AAGCTT</u> GGGCCCTAAAGTGAGGAAATATAATGCAGGTA	67.4
NisFEG rw- <i>Sal</i> I	AGATTC <u>CGTCGACTT</u> CCCGGGAGGTTAAAATGCACTTTATATGTCTA	67.5
NisRK fw- <i>Hind</i> III	TATCATA <u>AAGCTT</u> AATCGGAGGTAAAGTGGTGTATA	64.8
NisRK rw- <i>Apa</i> I	AGATAG <u>GGGCCCTT</u> CAGAAACAAAAAAGTAATCCTTAGA	67.4
NisRG fw- <i>Hind</i> III	TATCATA <u>AAGCTT</u> AATCGGAGGTAAAGTGGTGTATA	64.8
NisRG rw- <i>Apa</i> I	AGATTC <u>GGGCCCCAGGTT</u> AAAATGCACTTTATATGTCTATC	69.5
P45-RTpcr-up	TAGAATAGTGAAAAAATTAACCTTAAGT	55.0
nisB-RTpcr-down	CCAAGATATTGTTCCGATAGTT	54.7
nisR-RTpcr-down	AATATAGTCATCCCCACCAATA	54.7
nisF-RTpcr-down	AGATTGTCACACCTTTAGCTTT	54.7

Tm: Termal ayırışma noktası

3.2.2.2 Restriksiyon endonükleaz, fosfataz ve ligaz uygulamaları

Restriksiyon endonükleaz ve DNA'yı modifiye eden diğer enzimler üretici firmalar tarafından belirtilen koşullar dikkate alınarak kullanıldı. Restriksiyon enzim reaksiyonları 100 µL toplam hacimde gerçekleştirildi. İlk enzim reaksiyonundan sonra DNA; EZNA DNA cyclepure (Omega, USA) kiti ile saflaştırıldı. Bu DNA örneklerine ikinci enzim kesimi uygulandı. *Hind*III (Fermentas) ve *Sal*I (Fermentas) enzimleri için 37 °C, *Apa*I enzimi için 25 °C inkübasyon sıcaklıklarında 2 saat süreyle kesim işlemi gerçekleştirildi.

Fosfataz enzim uygulaması için, karides alkali fosfatazı (USB, Cleveland) kullanıldı. Defosforilasyon işlemi, restriksiyon endonükleaz enzim tamponunda gerçekleştirildi. Buna göre vektörün (pLEB124) son enzim ile muamelesinden sonra, her bir µg DNA için 1 µL (1 Ünite µL⁻¹) karides alkali fosfataz (SAP) ilave edilerek, ortam 37 °C'de 1 saat inkübe edildi. Inkübasyon sonunda fosfataz enziminin tamamen inaktivasyonu için 65 °C'de 15 dakika ısı uygulaması yapıldı. Enzim reaksiyonlarından sonra DNA örnekleri % 1 agaroz içeren jelde yürütülerek görüntülendi (Sambrook *et al.* 1989). Ayrıca DNA örneklerinin konsantrasyonu ve saflık oranları BioPhotometer (Eppendorf, Almanya) spektrofotometre kullanılarak 260 nm UV dalga boyunda tespit edildi.

Ligasyon, T4 DNA ligaz (Fermentas) enzimi kullanılarak 20 µL reaksiyon hacminde gerçekleştirildi. Klonlanacak DNA örnekleri ve vektör (pLEB124) molar konsantrasyonlarına göre 1:1, 2:1, 3:1 oranlarında denendi. DNA-Vektör molar oranlarının hesaplanmasında aşağıda verilen denklemden faydalanıldı.

$$\text{DNA Yoğunluğu (ng)} = \text{Ligasyon Oranı} \times \frac{\text{DNA boyutu (bç)}}{\text{Vektör boyutu (bç)}} \times \text{Vektör Yoğunluğu (ng)}$$

Buradan saptanan uygun oranlar kullanılarak hazırlanan ligasyon ortamı, oda sıcaklığında 4 saat inkübe edildi. Ligasyonda kontrol olarak insert DNA ilave edilmeyen vektör DNA kullanıldı. İnkübasyon sonunda T4 ligaz enziminin inaktivasyonu için 65 °C’de 15 dk ısı uygulaması yapıldı.

Ligasyon Karışımı

Vektör (pLEB124)	400 ng (~5µL)
DNA	DNA boyutuna göre değişken
10X Tampon	2 µL
T4 DNA ligaz	1 µL
dH ₂ O	20 ml’ye tamamlandı.

3.2.2.3 Kompetent *E. coli* hücrelerin hazırlanması

Elektrokompetent *E. coli* hücrelerin hazırlanması, Sambrook *et al.* (1989) tarafından tanımlanan yöntem kullanılarak yapıldı. Öncelikle -20 °C’de muhafaza edilen *E. coli* TG1 suşu, LB ortamında 37 °C’de ve 250 rpm karıştırma hızında 1 gece üretildi. Bu hücreler LB Agar içeren petri plaklarına tek koloni düşürülecek şekilde öze aracılığı ile aktarıldı ve 37 °C’de 1 gece inkübe edildi. Agar ortamlarında üreyen tipik koloniler 5 mL LB ortamı içeren tüplere aktarıldı. Hücreler 250 rpm çalkalama hızında ve 37 °C’de 1 gece geliştirildikten sonra, sıcaklığı 37 °C’ye getirilmiş LB besiyeri ortamına aktarıldı (1/100) ve yukarıda belirtilen koşullarda inkübe edildi. İki saat inkübasyon sonrasında her 15 dk da bir üreme ortamlarının optik yoğunlukları (OD₆₀₀) belirlendi. OD (600 nm) 0.4-0.6 aralığına ulaşıldıktan sonra, inkübasyon sonlandırılarak, ortam sıcaklığı 4 °C’nin altına düşürüldü. Soğutulan hücre süspansiyonları eşit miktarlarda santrifüj tüplerine dağıtılarak,

santrifüj işlemine (10000 rpm'de 20 dk, 4 °C) tabi tutuldu. Üst sıvı uzaklaştırıldıktan sonra, hücre çökeltileri önceden hazırlanarak ve 4 °C'ye soğutulmuş, % 10 gliserol içeren steril deiyonize su içerisinde çözüldü. 4 °C'de muhafaza edilen hücre süspansiyonları 10000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilerek hücre çökeltisi elde edildi. % 10 gliserol içeren deiyonize su ile yapılan yıkama işlemi, 2 kez daha tekrar edildi. Son aşamada hücre çökeltisi başlangıç hücresel hacmin 1/100 oranında % 10 gliserollü deiyonize su ile çözülerek, önceden buz üzerinde soğutulmuş mikrosantrifüj tüplerine 40 µl olacak şekilde dağıtıldı. Bu kompetent hücreler -70 °C'de muhafaza edildi.

3.2.2.4 Rekombinant plazmidlerin *E. coli* hücrelerine elektroporasyonu

Oluşturulan rekombinant plazmidler, GenePulser (Biorad) elektroporatör cihazı kullanılarak alıcı kompetent hücre *E. coli* TG1'e aktarıldı. İlk aşamada, -70 °C'de saklanan kompetent hücreler ve 2 mm aralığa sahip elektroporasyon küvetleri (Biorad) kullanımdan önce buz üzerine alındı. -20 °C'de muhafaza edilen ligasyon karışımı da buz üzerinde çözüldürüldükten sonra 5 µL alınarak, kompetent hücreler ile (40 µL) karıştırıldı. Bu karışım 10 dk buz üzerinde inkübe edildi ve pipet yardımıyla elektroporasyon küveti içerisine hava kabarcığı kalmayacak şekilde aktarıldı. *E. coli* hücreleri için 2.5 kV, 200Ω ve 25 µF değerleri cihaza girilerek yaklaşık 3-4 saniyeye tekabül eden elektrik uygulaması yapıldı. Elektroporasyon uygulanmış hücrelerin üzerine 1 mL rejenerasyon ortamı (SOC ve glukoz) ilave edildi ve 2 saat bu ortamda inkübe edildikten sonra, 200 µg mL⁻¹ eritromisin içeren LB agar plaklarına yayıldı. LB agar ortamları 37 °C'de 48 saat inkübe edildi (Sambrook *et al.* 1989).

SOC Ortamı

Tripton	2 g
NaCl	0.5 g
KCl (1M)	0.25 mL
MgSO ₄ (1M)	2 mL
dH ₂ O	97 mL.

pH, 4 N NaOH kullanılarak 7.0'a ayarlandı ve ortam 121 °C'de 15 dk sterilize edildi. Ortam kullanılmadan hemen önce 18 µL (1 mL için) 1 M glukoz ilave edildi.

3.2.2.5 Kompetent *L. lactis* hücrelerin hazırlanması

-20 °C’de muhafaza edilen *L. lactis* LL27 suşu GM17 ortamında 30 °C’de 12 saat süreyle üretilir. Daha sonra hücreler GM17 agar üzerinde tek koloni oluşturacak şekilde ekim yapılır. Üreyen koloniler % 1 glisin içeren M17-sakkaroz (0.5 M) ortamına aktarılır (1/100) ve optik yoğunluk (OD₆₀₀) 0.2-0.4 aralığına gelinceye kadar inkübe edilir. Hedeflenen yoğunluğa erişildikten sonra ortam buz üzerinde soğutulur ve 8000 rpm’de, (4 °C’de 20 dakika) santrifüj edilerek hücreler toplanır. Üst sıvı uzaklaştırıldıktan sonra hücreler 4 °C’ye soğutulmuş % 10 gliserol ve 0.5 M sakkaroz içeren yıkama çözeltisi içerisinde çözülür. Bu ortam tekrar 8000 rpm’de (4 °C’de 20 dk) santrifüj edilir (Yıkama ve santrifüj işlemi 3 kez yapılır). Son basamakta hücreler başlangıç kültür hacminin 1/100’ü oranındaki yıkama çözeltisi içerisinde çözülerek, önceden soğutulmuş mikrosantrifüj tüplerine (40 µL) dağıtılır ve -70 °C’de saklanır (Holo and Nes 1989).

3.2.2.6 Rekombinant plazmidlerin *L. lactis* hücrelerine elektroporasyonu

L. lactis hücrelerine yapılan elektroporasyon uygulamalarında; *E. coli* hücreleri için takip edilen basamaklar uygulandı. Ancak bu hücreler için elektrik akım uygulaması 200 Ω yerine, 400 Ω değerinde gerçekleştirildi. Ayrıca elektrik akımı uygulandıktan sonra hücreler ifade ortamına alındı ve 2 saat inkübasyona tabi tutuldu. Daha sonra hücre seyreltilerinden 5 µg mL⁻¹ eritromisin içeren M17 glukoz (% 0.5) sakkaroz (0.5 M) agar ortamına yayma ekim yapıldı ve 30 °C’de inkübasyona bırakıldı (Holo and Nes 1988).

İfade Ortamı

2XM17	5 mL
1M Sakkaroz	5 mL
%20 Glukoz	250 µL
1M MgCl ₂	200 µL
1M CaCl ₂	20 µL

3.2.3 *E. coli* ve *L. lactis* suşlarında plazmid DNA izolasyonu

E. coli suşlarından plazmid DNA izolasyonu için EZNA plazmid miniprep kit (Omega, USA) kullanıldı. Kit kullanım protokolünde belirtildiği gibi koloniler 5 mL LB ortamına inoküle edildi. Daha sonra hücreler 37 °C’de ve 250 rpm’de 12 saat süresince üretildi. İnkübasyon sonrasında santrifüj işlemi uygulanarak toplanan hücreler, DNA denatürasyon çözeltileri ile muamele edilmiş ve plazmid DNA HiBind kolonlara tutunduruldu. Son basamakta ise 50 µL geri kazanma tamponu ile plazmidler kolondan alındı. İzole edilen plazmid DNA konsantrasyonu ve saflığı spektrofotometrik olarak ölçüldü (BioPhotometer, Eppendorf, Almanya).

L. lactis suşlarından plazmid DNA izolasyonu için O’Sullivan and Klaenhammer (1993) tarafından önerilen yöntem uygulandı. Plazmid izolasyonu yapılacak suş, GM17 ortamında 30 °C’de 1 gece üretildi. Bu kültürden 10 mL GM17 ortamına % 10 oranında inokülasyon yapılarak 30 °C’de 3 saat tutuldu. 3 saat sonunda kültür ortamları 8000 rpm’de 20 dakika santrifüj edildi. Hücre çökeltileri kurutulduktan sonra 200 µL lizozim (30 mg mL⁻¹) ve % 25 sakkaroz içeren çözelti I’de çözüldü. Ortam steril mikrosantrifüj tüplerine transfer edildi ve 37 °C’de 15 dk tutuldu. Ortama % 3 SDS ve 0.2 N NaOH içeren çözelti II ilave edilerek 7 dk oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra 300 µL buzda soğutulmuş 3 M sodyum asetat (pH 4.8) (Çözelti III) ilave edilerek karıştırıldı ve 14000 rpm’de 15 dk (4 °C) santrifüj işlemi uygulandı. Tüplerde oluşan üst faz, yeni bir mikrosantrifüj tüplerine alınarak üzerine 650 µL izopropanol ilave edildi. Tüpler yavaşça karıştırıldıktan sonra 14 000 rpm’de 15 dk (4 °C) santrifüj işlemi uygulandı ve üst sıvı uzaklaştırıldı. Çökelti 320 µL steril suda çözüldü. Üzerine 200 µL 0.5 mg mL⁻¹ etidyum bromit içeren 7.5 M amonyum asetat (Çözelti IV) ve 350 µL fenol/kloroform (1:1 v/v) ilave edilerek karıştırıldı. Karışım 14000 rpm’de 5 dk santrifüj edildi. Tüplerde oluşan üst faz mikropipet yardımı ile yeni bir mikrosantrifüj tüpüne alındı ve üzerine -20 °C’de muhafaza edilen % 96’lık etanol ilave edildi. Bu ortam -20 °C’de 1 gece bekletildi. Plazmid DNA çökeltisi, ortamın 14000 rpm’de 15 dk santrifüj edilmesi suretiyle elde edildi. DNA çökeltisi kurutuldu ve 40 µL TE tamponu içerisinde çözüldü. Son aşamada ortama 10 mg mL⁻¹ stok RNaz’dan 2 µL ilave edilerek 37 °C’de 45 dk inkübe edildi.

Çözelti I

Sakkaroz	25 g
Tris	0.605 g
EDTA	0.037 g
Distile su	100 mL
pH	8.0

Bu çözelti 30 mg/mL lizozim ilave edilerek kullanıldı.

Çözelti II

SDS	3 g
NaOH	0.80 g
Distile Su	100 mL

Çözelti III

Sodyum asetat	40.80 g
Distile su	100 mL
pH	4.8

Çözelti IV

Amonyum asetat	57.75 g
Ethidyum bromit	0.05g
Distile su	100 mL

Tris-EDTA tamponu

Tris	0.12 g
EDTA	0.03 g
Distile su	100 mL
pH	8.0

3.2.4 RNA izolasyonu ve RT-PZR

L. lactis suşlarından RNA izolasyonu, EZNA Bakteriyel Kit (Omega, USA) kullanılarak yapıldı. Ancak kit protokolüne ilave olarak, liziz aşamasında suşlar 15 mg mL^{-1} lizozim uygulamasına tabi tutuldu. Son aşamada geri kazanma çözeltisi içerisindeki RNA miktarı ve saflığı spektrofotometrik olarak (Biophotometer, Eppendorf, Germany) ölçüldü.

L. lactis hücrelerinden izole edilen toplam RNA esas alınarak yürütülen RT-PZR uygulamaları, Ra ve Saris (1995) tarafından önerilen yönteme göre yapıldı. Bu doğrultuda öncelikli olarak cDNA sentezi gerçekleştirildi. Uygulamada Çizelge 3.1’de belirtilen primerler kullanıldı. cDNA’nın sentezi için gerekli bir reaksiyonun karışımı; 50 mM Tris-HCl (pH 8.2), 6 mM MgCl_2 , 40 mM KCl, 10 mM dithiothreitol (DTT), 4 mM dNTP karışımı, 100 pmol geri yönlü primer, 2 μg kalıp RNA ve 25 U M-MLV ters transkriptaz (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) kullanılarak oluşturuldu. Negatif kontrol amacıyla ayrı bir tüpte ters transkriptaz içermeyen aynı karışım hazırlandı. Hazırlanan reaksiyon karışımları 42°C ’de 60 dk tutuldu. Oluşan cDNA:RNA hibritleri kaynar su banyosunda 10 dk bekletilerek kırıldı ve RNA molekülleri 2 μL RNaz A (10 mg mL^{-1}) uygulanarak parçalandı.

İkinci aşamada, 22 μL olan cDNA ortamına; 8 μL PZR tamponu, 5 μL dNTP, 100 pmol ileri yönlü primer (p45 promotor) 10 μL 25 mM MgCl_2 ve 5 Ünite DNA polimeraz (DyNAzyme II, New England, Biolabs, Beverly, MA, USA) ilave edilerek karışımın toplam hacmi distile su ile 100 μL ’ye tamamlandı. cDNA çoğaltılması için 1 çevrimi 94°C ’de 30 s, 55°C ’de 120 s ve 72°C ’de 180 s olarak oluşturulan ve toplam 30 çevrim uygulanan protokol takip edildi. Son aşamada PZR ürününden 10 μL alındı ve % 1 agaroz jelde yürütülerek görüntülendi.

3.2.5 Gelişme faktörlerinin nisin üretimi üzerine etkilerinin belirlenmesi

Oluşturulan rekombinant hücrelerin nisin üretim miktarları kesikli fermentasyon sisteminde farklı karbon (glukoz, sakkaroz, laktoz, maltoz ve fruktoz), azot (tripton, soyton, kazein, maya özütü ve et özütü) kaynakları, inorganik fosfat (Na_2HPO_4), pH (5.5, 6.0, 6.5) ve sıcaklık değerleri (25, 30 ve 37°C) denenerek belirlendi (Kim *et al.* 2006). *L. lactis* LL27 doğal suşu ve rekombinantlarının nisin üretim seviyesi üzerine karbon

kaynaklarının etkisinin araştırılması için, her bir şeker M17 besiyeri ortamına % 0.5, farklı azot kaynaklarının etkilerinin belirlenmesi için ise bazal ortama (fruktoz % 0.5, askorbik asit % 0.05, MgSO₄ % 0.025, Na₂HPO₄ % 1.9) her bir azot kaynağı % 1 oranında ilave edildi. Bu süreçte en yüksek nisin üretimi tanımlanan şeker, azot ve fosfatın farklı konsantrasyonlarının etkisi de araştırıldı. Şeker için % 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4 ve 5, azot kaynağı için % 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ve 8, inorganik fosfat için % 1.9, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5 ve 5 oranlarında hazırlanan bazal ortamlarda, *L. lactis* LL27 suşu ve rekombinantları 30 °C'de 12 saat inkübe edildi ve nisin üretim miktarları tespit edildi. Farklı inkübasyon sıcaklıklarının nisin üretim seviyesi üzerine etkisini belirlemek için bazal ortama (5 g L⁻¹ fruktoz, 10 g L⁻¹ maya özütü, 0.5 g L⁻¹ askorbik asit, 0.25 g L⁻¹ MgSO₄, 19 g L⁻¹ Na₂HPO₄) inoküle edilen *L. lactis* LL27 doğal suşu ve rekombinantları 25 °C, 30 °C ve 37 °C de inkübasyona tabi tutuldu. pH (5.5, 6.0 ve 6.5) değerlerinin nisin üretim miktarı üzerine etkileri fermentör (Minifors, İsviçre) kullanılarak kesikli fermentasyon sistemde ve 1.5 L hacimde tespit edildi. Fermentör 30 °C'de 100 rpm karıştırma hızında ve havalandırma yapılmadan çalıştırıldı. Fermentasyon; % 1 oranında inoküle edilen bazal ortamın başlangıç pH'sı, denenecek pH (5.5, 6.0 ve 6.5) değerlerine ayarlandıktan sonra, bu pH değerlerinde sabitlenerek gerçekleştirildi. Fermentasyon sürecinde 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 18 ve 24. saatlerde örnekler alınarak hücre gelişimi ve nisin üretim miktarları tespit edildi.

3.2.6 pH kontrollü kesikli fermentasyon koşullarında nisin üretimi

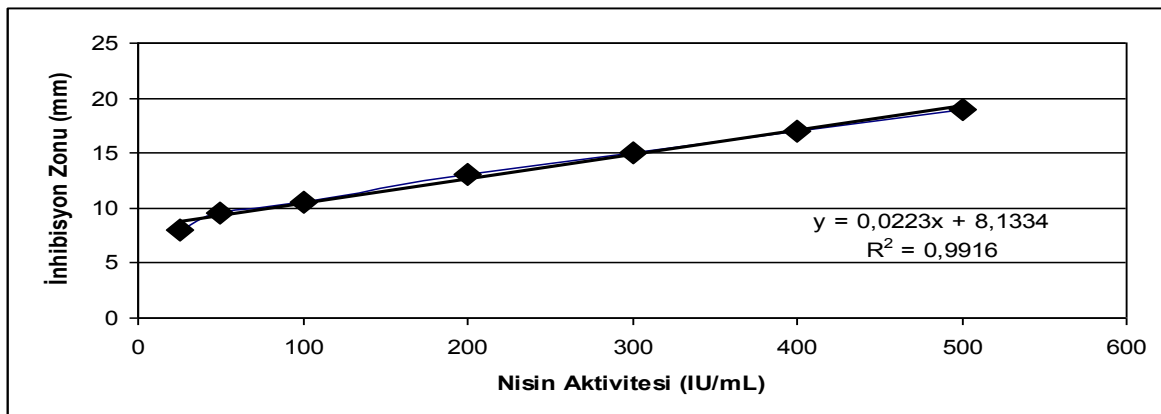
pH Kontrollü fermentasyon uygulamalarında, öncü çalışmalar ile optimize edilen fermentasyon ortamı (10 g L⁻¹ fruktoz, 30 g L⁻¹ maya özütü, 25 g L⁻¹ Na₂HPO₄, 0.5 g L⁻¹ askorbik asit, 0.25 g L⁻¹ MgSO₄, pH 6.9) kullanıldı. Fermentasyon, minifors (İsviçre) fermentörde 1.5 L hacim kullanılarak gerçekleştirildi. *L. lactis* hücreleri fermentasyon ortamına inoküle edilmeden önce, eritromisin içeren besiyerinde iki kez geliştirildi ve fermentör besiyerine % 1 oranında inoküle edildi. Fermentör 30 °C sıcaklıkta, 100 rpm karıştırma hızında ve havalandırma yapılmadan çalıştırıldı. pH, cihaz üzerinde bulunan WTW marka pH probu ile kayıt edildi ve fermentasyon ortamının pH'sı 6.0'a (5 N NaOH) sabitlendi. Fermentasyon 30 saat takip edildi ve 3., 5., 6., 7., 8., 9., 10., 11., 12., 18., 24. ve 30., saatlerde nisin aktivitesinin ve biyokütle miktarının belirlenmesi için 5 ml örnek alındı.

3.2.7 Sürekli fermentasyon koşullarında nisin üretimi

L. lactis hücreleri, eritromisin içermeyen fermentasyon ortamında (10 g L⁻¹ fruktoz, 30 g L⁻¹ maya özütü, 25 g L⁻¹ Na₂HPO₄, 0.5 g L⁻¹ askorbik asit, 0.25 g L⁻¹ MgSO₄, pH 6.9) üssel fazın ortasına (7 h) kadar kesikli fermentasyon sisteminde geliştirildikten sonra, fermentörün besleme ve tahliye pompaları devreye sokularak sürekli fermentasyon uygulamaları gerçekleştirildi. Sürekli fermantasyonda *L. lactis* LL27 doğal suşu ve rekombinantlarının nisin üretim düzeylerinin optimizasyonu için farklı dilüsyon oranları (0.1, 0.2, 0.3, 0.4 ve 0.5 h⁻¹) ve farklı fruktoz konsantrasyonları (7.5, 10.0, 12.5, 15.0, 17.5 ve 20.0 g L⁻¹) kullanıldı. Örnekleme, her bir dilüsyon oranı ve fruktoz konsantrasyonunda, üç fermentör hacmi çalıştırıldıktan sonra yapıldı.

3.2.8 Nisin aktivitesinin belirlenmesi

Nisin üretim miktarının tespiti için Tramer and Fowler (1964) tarafından önerilen yöntem kullanıldı. Fermentörden alınan örnekler 8000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek hücre çökeltisi ayrıldı. Üst sıvı yeni bir tüpe alınarak 80 °C'de 15 dk ısı uygulaması yapıldı ve pH'sı 2.5 olan ve % 0.1 oranında tween 80 içeren çözeltilerde 2⁻¹⁰ oranına kadar seyreltildi. Nisin aktivitesinin belirlenmesi için aktif *M. luteus* hücreleri 5 mL LB yumuşak agar ortamına inoküle edildi ve LB agar alt tabaka yüzeyine yayıldı. Üzerine her bir örnek dilüsyonundan 5 µL (2 paralel) damlatıldı. Aktivite tayininde nisaplin (Sigma) kullanılarak 10-500 IU mL⁻¹ konsantrasyonda şahit çözeltiler hazırlandı. 37 °C'de 1 gece inkübasyon sonucunda standart nisin eğrisi (Şekil 3.1) kullanılarak kültür üst sıvısındaki nisin miktarı hesaplandı.



Şekil 3.1 Standart nisin inhibisyon eğrisi

3.2.9 Optik yoğunluk ve biyokütle eşitliğinin belirlenmesi

Fermentasyonun belirli zaman aralıklarında fermentörden alınan örneklerin hücre yoğunluğu (O.D.) aynı besiyeri kullanılarak 1/6 oranında seyreltme yapıldıktan sonra, spektrofotometrede (Shimadzu) 600 nm dalga boyunda tespit edildi. Optik yoğunluk ve biyokütle eşitliğinin belirlenmesi için, farklı optik yoğunluğa sahip hücre kültürleri 10 000 rpm'de santrifüj edildi ve 2 kez PBS tamponunda yıkandı. Elde edilen hücre çökeltileri 70 °C sıcaklıkta, hücre kuru ağırlıkları sabit bir değere ulaşmaya kadar kurutuldu. Optik yoğunluk ve hücre kuru ağırlığı eşitliği için standart eğri oluşturuldu ve eğrinin denklemi elde edildi. Bu denklem kullanılarak, optik yoğunluk değerlerinden örneklerin hücre kuru ağırlığı hesaplandı.

3.2.10 Fruktoz miktarının tespiti

Fermentasyon süresince alınan örneklerde, kalan fruktoz miktarının tespiti için stokiyometrik esasa göre çalışan Megazyme D-Fructose/D-Glucose analiz kiti (Wicklow, İrlanda) kullanıldı. Fermentasyon ortamından alınan örnekler, öncelikle hücre çökeltisinin ayrılması için 8000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Çökelti kit kullanım klavuzunda yazılan esasa göre 10^{-2} oranında dilue edildi. Örnek içerisindeki fruktoz miktarı; enzim reaksiyonları sonucunda açığa çıkan NADPH'ın 340 nm dalga boyunda verdiği absorbansın 0.6692 katsayısı ile çarpımı sonucu elde edildi.

3.2.11 Rekombinant plazmidlerin kesikli ve sürekli fermentasyon sistemindeki stabilitesinin belirlenmesi

Rekombinant *L. lactis* suşlarında bulunan pLEB672, pLEB673 ve pLEB674 plazmidlerinin pH kontrollü kesikli ve sürekli fermentasyon sistemlerindeki stabilitesinin belirlenmesi için, eritromisin dirençlilik fenotipinden yararlanıldı. Buna göre fermentasyonun belirli zaman dilimlerinde alınan örnekler, GM17 agar ortamına tek koloniler düşürülecek şekilde aktarıldı. 30 °C de bir gece inkübasyon sonunda gelişen kolonilerin $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ eritromisin içeren GM17 agar ortamına nokta ekimleri gerçekleştirildi. Bu ortamda gelişen kolonilerin sayısı, toplam noktalanmış koloni sayısına oranlanarak, suşun taşıdığı plazmidin % stabilitesi hesaplandı.

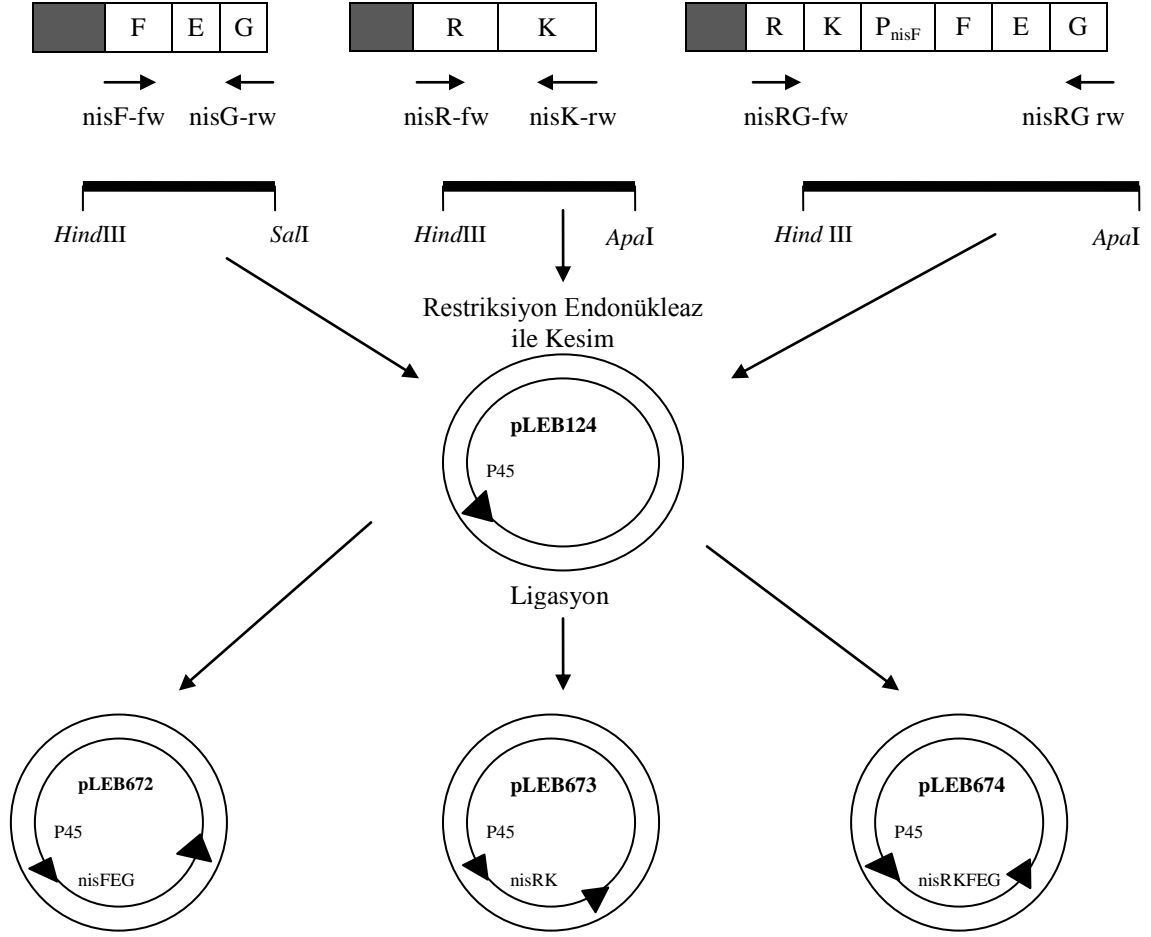
3.2.12 İstatistik ve model analizleri

L. lactis LL27 doğal suşu ve rekombinantların nisin üretim miktarları ve üretime etki eden faktörlerin istatistiki analizi için Student's t-testi ve tek yönlü varyans analizlerinden yararlanıldı. Sürekli fermentasyon ortamında belirlenen dilüsyon oranı ve fruktoz konsantrasyonuna bağlı olarak tanımlanan nisin üretim verimi değerleri merkez kompozit deseni kullanılarak cevap yüzey yöntemiyle modellendi. Modellenme için hazır paket programı olan MINITAB 14.0 (Minitab Inc. State College, PA) kullanıldı.

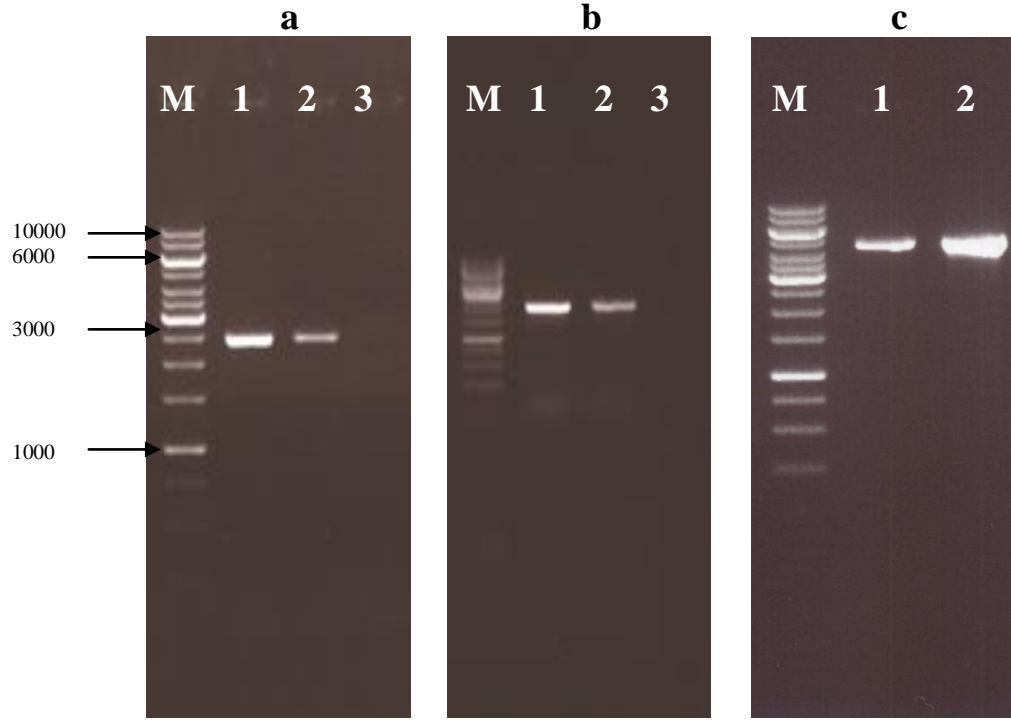
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1 Regülasyon ve Dirençlilik Gen Kopyaları Artırılmış Rekombinant *L. lactis* Suşların Oluşturulması

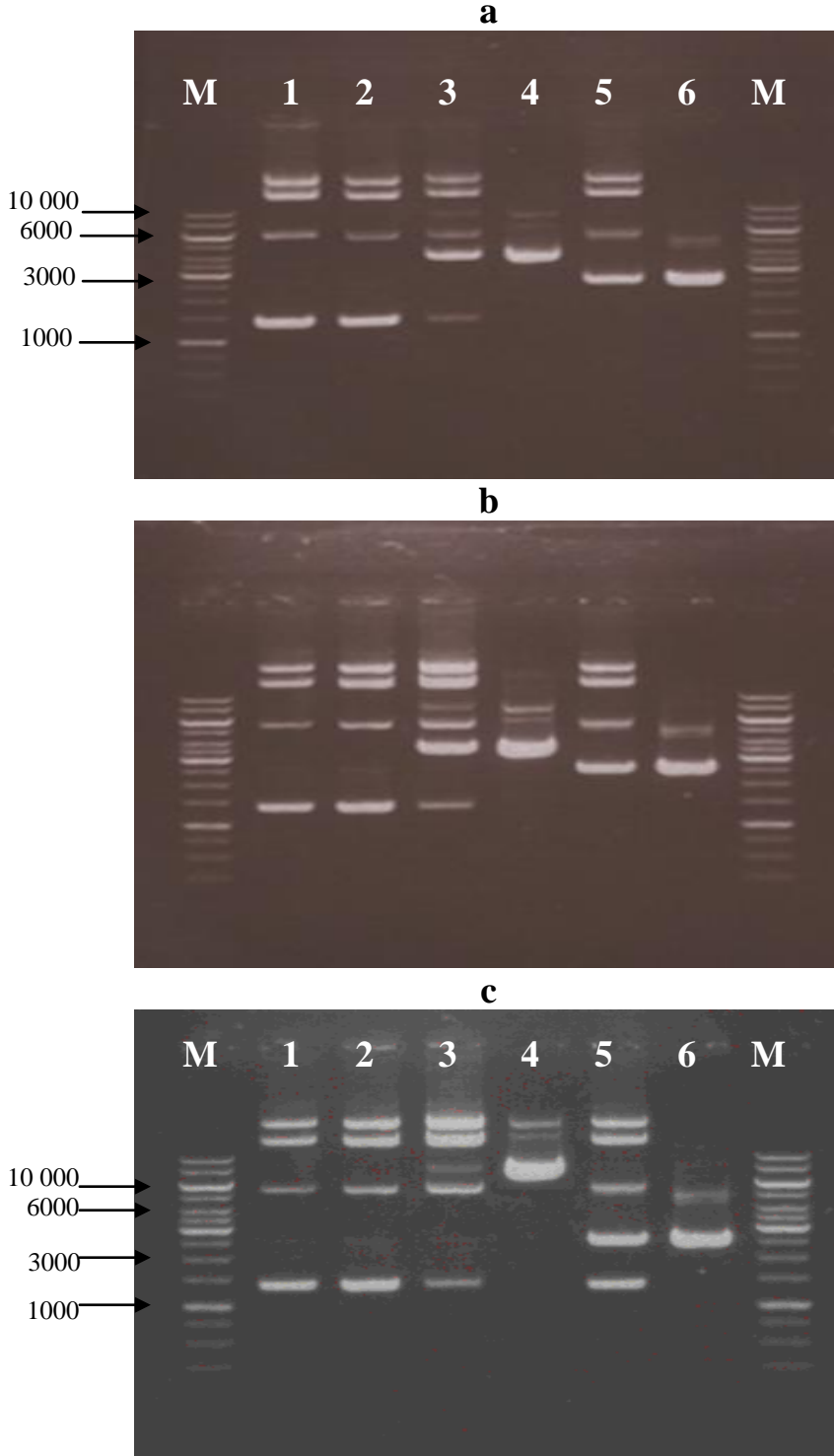
Araştırmada, *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 suşunun nisin üretim yeteneğinin geliştirilmesi amacıyla, regülasyon ve dirençlilik genleri tek tek ve birlikte klonlanarak üç farklı rekombinant suş elde edildi (Şekil 4.1). Bu suşların oluşturulmasında her biri 2.5, 2.3 ve 5.1 kb olan dirençlilik (*nisFEG*), regülasyon (*nisRK*) ve regülasyon/dirençlilik (*nisRKFEG*) genlerini içeren fragmentler Çizelge 3.2’de verilen primerler kullanılarak çoğaltıldı (Şekil 4.2). Daha sonra bu fragmentler güçlü bir laktokok promotörünü (P45) ve eritromisin dirençlilik genini içeren 4.5 kb’lık mekik vektöre (pLEB124) klonlandı (Şekil 4.1). Oluşturulan rekombinant plazmidler (pLEB672, pLEB673 ve pLEB674) ara konakçı olan *E. coli*’de kopya sayıları artırılarak stabil hale getirildi ve nisin üreticisi *L. lactis* LL27 suşuna elektrotransformasyon yolu ile aktarıldı. *L. lactis* LL27 suşunda yürütülen plazmid analizleri sonucunda 28.7, 23.7, 7.2 ve 1.4 kb büyüklüğünde 4 adet plazmid tespit edildi. pLEB672 plazmidinin *L. lactis* LL27 suşuna aktarılmasıyla plazmid profiline 6.5 kb, pLEB673 plazmidinin aktarılmasıyla 6.2 kb ve pLEB674 plazmidinin aktarılmasıyla ise 9.6 kb büyüklüğünde plazmid eklendi. Rekombinant LAC338, LAC339 ve LAC340 suşlarında tespit edilen ilave plazmidlerin rekombinant pLEB672, pLEB673 ve pLEB674 plazmidleri olup olmadıkları, *E. coli* suşlarında çoğaltılarak saflaştırılan pLEB672, pLEB673 ve pLEB674 plazmidlerinin aynı jelde yürütülmesiyle kontrol edildi. LL27 rekombinantlarına ilave olan plazmid büyüklükleri ile kontrol pLEB672, pLEB673 ve pLEB674 plazmidleri jel üzerinde aynı bölgede bant verdi (Şekil 4.3). Bu bulgular oluşturulan rekombinant plazmidlerin başarıyla aktarılabilirdiğini ve *L. lactis* LL27 suşunda replike olabildiklerini kanıtlamıştır.



Şekil 4.1 Rekombinant plazmidlerin (pLEB672, pLEB673 ve pLEB674) oluşturulma şeması



Şekil 4.2 PZR sonucunda elde edilen fragmentler a) nisFEG, b) nisRK ve c) nisRKFEG. M: 1 kb marker (Fermantas), 1: *L. lactis* subsp. *lactis* LL27, 2: *L. lactis* ATCC11454, 3: Negatif kontrol

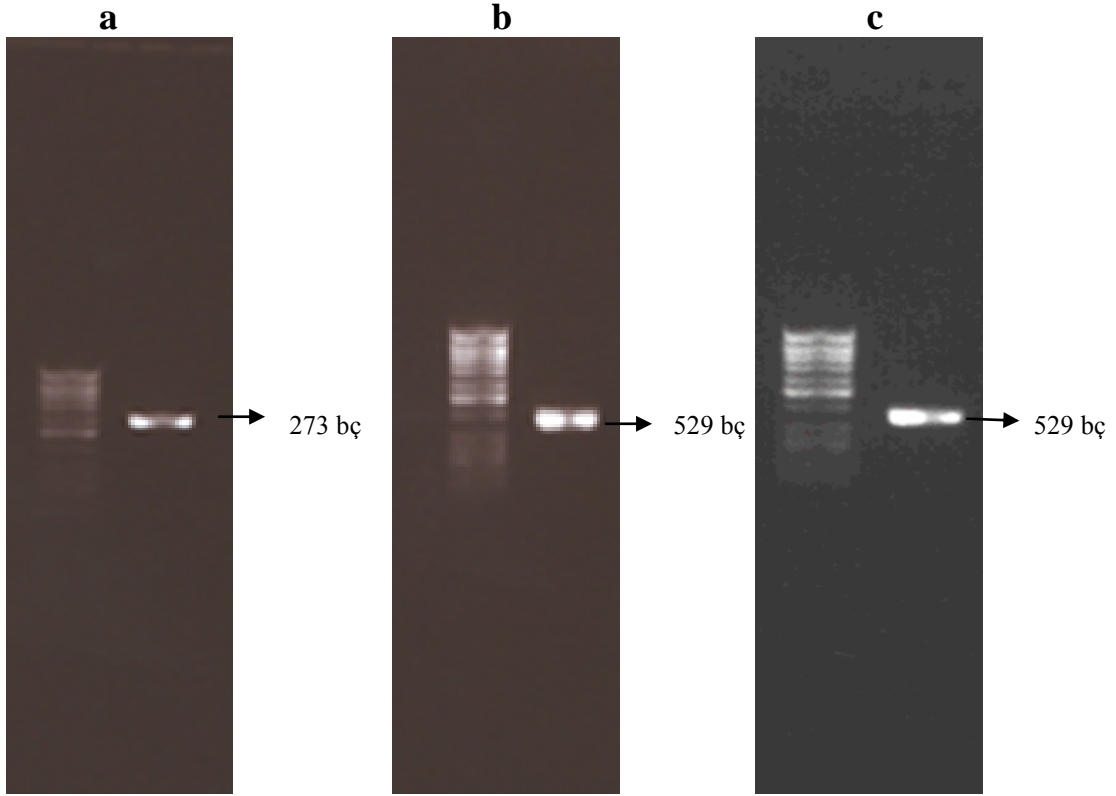


Şekil 4.3 *L. lactis* LL27, rekombinant *L. lactis* LAC338, *L. lactis* LAC339 ve LAC340 suşlarının plazmid profilleri. **a)** *L. lactis* LAC338 (pLEB672), **b)** *L. lactis* LAC338 (pLEB673), **c)** *L. lactis* LAC340 (pLEB674). 1: *L. lactis* LL27 doğal suş 2: *L. lactis* LL27 elektropore edilmiş kontrol suş, 3: Rekombinant plazmidi içeren *L. lactis* suşu, 4: Saflaştırılmış rekombinant plazmidler (pLEB672, pLEB673 ve pLEB674), 5: pLEB124 vektörünü içeren *L. lactis* suşu, 6: Saflaştırılmış pLEB124 vektörü, M: 1 kb marker

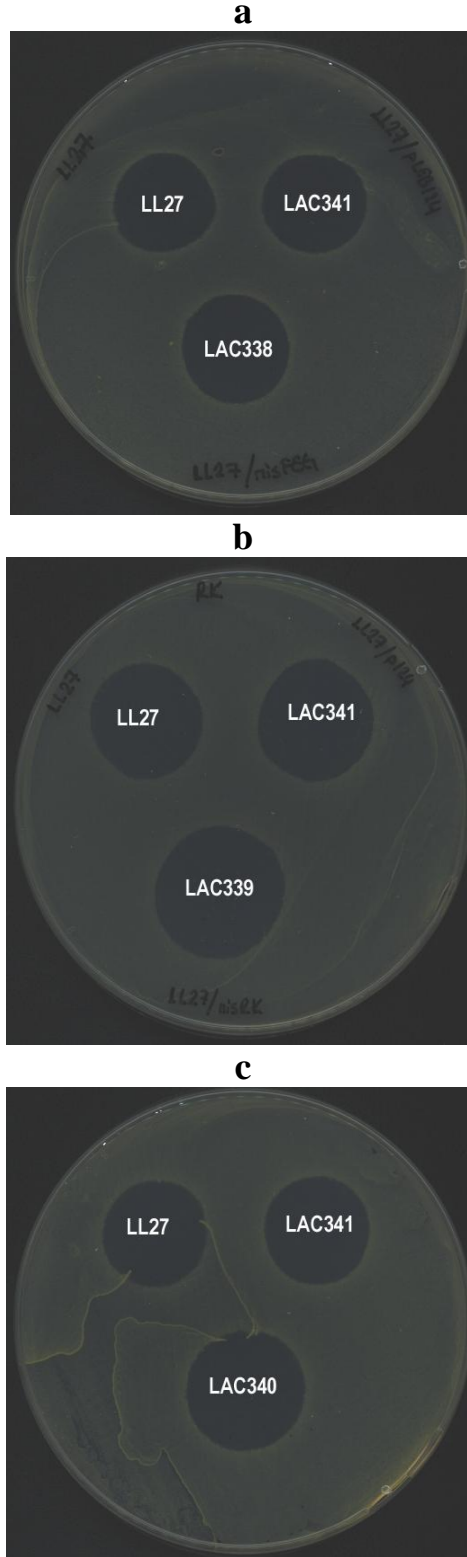
Oluşturulan rekombinant pLEB672, pLEB673 ve pLEB674 plazmidlerinin nisin üreticisi *L. lactis* LL27 suşuna başarıyla aktarımından sonra, bu plazmidler üzerinde bulunan genlerin P45 promotörü altında ifade edilip edilmediği araştırıldı. Bu süreçte rekombinant plazmidleri içeren suşlarda P45 promotöründen başlayan ve *nisFEG*, *nisRK* ve *nisRKFEG* genlerinin ifadesini içeren transkriptler hedef alındı. Bu amaçla, P45 promotörünün ilave kodlama bölgesi ve takip eden ilk genler olan *nisF* ve *nisR* bölgeleri dikkate alınarak hazırlanan primerler kullanıldı (Çizelge 3.2). RT-PZR uygulamalarının sonucunda klonlanan fragmentte ilk geni *nisF* olan pLEB672 plazmidini içeren *L. lactis* LAC338 suşuna ait toplam RNA'nın kullanılması durumunda 273 bp'lik bir bant oluşurken, negatif kontrol gruplarının hiçbirisinde benzeri bir banda rastlanmadı. Diğer taraftan klonlanan fragmentlerde ilk geni *nisR* olan pLEB673 ve pLEB674 plazmidlerini içeren *L. lactis* LAC339 ve *L. lactis* LAC340 suşlarında 529 bp'lik bir DNA bandı elde edildi. Bu veriler P45 promotörü altında klonlanan *nisFEG*, *nisRK* ve *nisRKFEG* genlerinin ifade edilebildiğini gösterdi (Şekil 4.4).

Rekombinant suşların (LAC338, LAC339 ve LAC340) nisin üretim düzeyleri, LL27 doğal suş ve boş vektörü içeren LAC341 suşları ile kıyaslanmıştır (Şekil 4.5). GM17 besi ortamında 12 saat inkübasyon sonucunda LL27 ve LAC341 suşları mg hücre kuru ağırlığı başına, 520 (± 114) IU mL⁻¹, LAC338, LAC339 ve LAC340 suşları ise sırasıyla 650 (± 78) IU mL⁻¹, 750 (± 72) IU mL⁻¹ ve 745 (± 83) IU mL⁻¹ nisin üretti. Bu sonuçlara göre; *nisFEG*, *nisRK* ve *nisRKFEG* genlerinin doğal suşta kopya sayılarının artırılmasıyla, nisin üretim seviyelerinde sırasıyla % 24, % 44 ve % 43 oranlarında ve istatistiki açıdan anlamlı olan ($p < 0.01$) artışlar sağlandı.

Nisin kendi biyosentezinin indükleyici molekülüdür (Kim *et al.* 1998, McAuliffe *et al.* 2001, Ra *et al.* 1996). Kopya sayısı artırılmış *nisRK* genlerini içeren suşta (LAC339) *nisA* ve *nisF* genlerinin önünde yer alan promotörlerin indüklenmesinin temel nedeni bu özellikten kaynaklanmaktadır. Bu durum üretici suşta dirençliliğin artması yanında nisin öncü molekülünün daha fazla sentezlenmesine de katkıda bulunmaktadır. Diğer taraftan *nisFEG* genlerinin dirençlilikten sorumlu olması, bu genlerin kopya sayılarının artırılmasıyla üretici suşun, fermentasyon ortamında biriken yüksek orandaki nisine karşı hassasiyetini azaltmaktadır.



Şekil 4.4 *L. lactis* LAC338 (a), LAC339 (b) ve LAC340 (c) suşlarında P45 promotorundan başlayan, *nisFEG*, *nisRK* ve *nisRKFEG* genlerinin transkripsiyonel ifadesi. RT-PZR’da P45 promotoruna ait transkripsiyonel bölgeyi ve takiben klonlanan ilk geni (*nisF* veya *nisR*) kapsayan transkriptler hedeflenmiştir



Şekil 4.5 *L. lactis* LL27 doğal suşu ve rekombinantların nisin üretim karakteristikleri. a) LAC338, b) LAC339 ve c) LAC340

Regülasyon ve dirençlilik genlerinin birlikte klonlandığı LAC340 rekombinantında yukarıda söz edilen her iki gen gruplarının birlikte bulunması, hem nisin üretiminin teşviki ve hem de üretilen yüksek miktardaki nisine dirençliliğin artması sonucunu doğurmaktadır. Bu suşun nisin üretim yeteneğinde, sadece regülasyon genlerinin klonlandığı LAC339 suşuyla kıyaslandığında istatistiki bir farklanmanın bulunmaması, büyük olasılıkla fermentasyon ortamında 12 saat sonunda ilave nisin dirençlilik sisteminin devreye girmesi için yüksek miktarda nisinin ortamda birikmemesinden kaynaklanmıştır. Nitekim birçok çalışmada, nisin üreticilerinin fermentasyonun geç evresinde (18. ve 24. saatlerde) ortamda biriken yüksek nisin konsantrasyonundan önemli ölçüde etkilendiği saptanmıştır (de Vuyst and Vandamme 1992, Kim *et al.* 1998, Lv *et al.* 2004a)

Regülasyon ve dirençlilikten sorumlu genlerin nisin üretici suşlarda kopya sayılarının artırıldığı benzer çalışmalarda, nisin üretim yeteneğinin 1.5 ve 1.7 kat arttığı rapor edilmiştir (Kim *et al.* 1998, Cheigh *et al.* 2005). Çalışmamızda gerçekleşen artışın literatür verilerinden düşük bulunmasının temel nedeni, çalışmalarda kullanılan nisin miktarını belirleme yöntemlerinin hassasiyetinden kaynaklanmaktadır. Nitekim söz konusu çalışmalarda nisin miktarı kritik dilüsyon yöntemi kullanılarak ve “Arbitrary Unit” cinsinden hesaplanmıştır. Bu belirleme yönteminde dilüsyon oranlarının ikinin katları şeklinde uygulanması ve inhibisyon zonunun kaybolduğu dilüsyonun kullanılması nedeniyle hassasiyet daha düşüktür. Çalışmamızda tercih edilen “International Unit” birimi, standart nisin kullanılarak hazırlanan eğri üzerinden hesaplanması nedeniyle, daha yüksek hassasiyet göstermektedir.

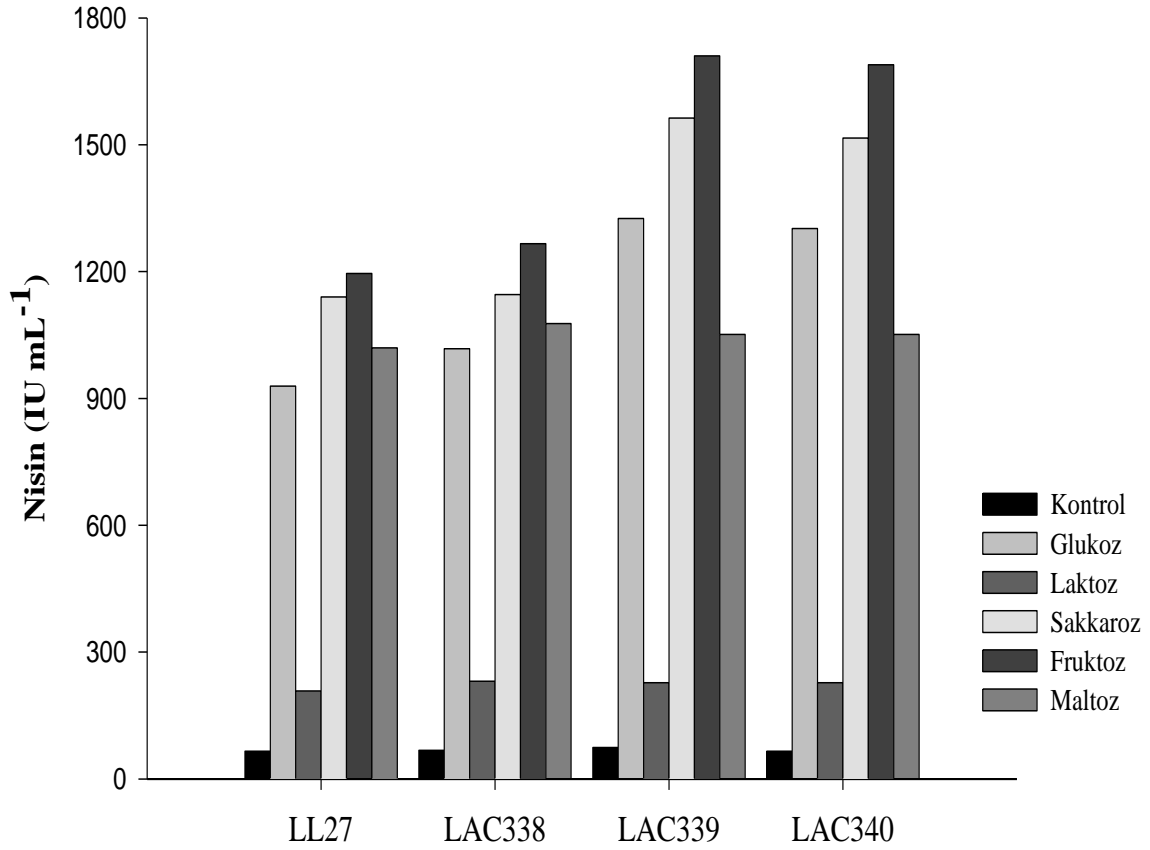
Değişik suşlarda lantibiyotik üretim düzeylerinin artırılması için, ilave regülasyon ve dirençlilik genlerinin aktarımı stratejisi kullanılmıştır (Kim *et al.* 1998, Cheigh *et al.* 2005, Cotter *et al.* 2006, Heinzmann *et al.* 2006). Bu doğrultuda yürütülen en yaygın denemeler regülasyon ve dirençlilik genlerin güçlü bir promotor altına klonlanması (Cheigh *et al.* 2005, Cotter *et al.* 2006) veya kromozom üzerine yerleştirilmesiyle (Heinzmann *et al.* 2006) gerçekleştirilmiştir. Ancak regülasyon ve dirençlilik genlerinin birlikte aktarıldığı bir çalışma henüz rapor edilmemiştir. Dolayısıyla bu tez çalışması kapsamında tanımlanan regülasyon ve dirençlilik genlerinin birlikte aktarımı ilk defa başarılmıştır. Bu iki gen grubunu taşıyan LAC340 suşu benzersiz bir rekombinant olması nedeniyle ayrı bir önem taşımaktadır.

4.2 LL27 Doğal Suşu ve Rekombinantlarında Gelişme Faktörlerinin Nisin Üretimi Üzerine Etkisi

4.2.1 Karbon kaynağının etkisi

Doğal ve rekombinant suşlarda, farklı karbon kaynaklarının nisin üretimi üzerine etkisi; M17 ortamına % 0.5 glukoz, laktoz, sakkaroz, fruktoz ve maltoz şekerlerin ilavesi ile belirlendi (Şekil 4.6). Bu denemede, LL27, LAC338, LAC339 ve LAC340 suşları için en etkin karbon kaynağı olarak fruktoz tespit edildi (LL27’de 1200 IU mL⁻¹, LAC338’de 1270 IU mL⁻¹, LAC339’da 1710 IU mL⁻¹ ve LAC340’da 1690 IU mL⁻¹). Bu şekeri nisin üretim verimi açısından sırasıyla sakkaroz, glukoz ve maltoz takip etti. En düşük üretim ise laktoz kullanımında meydana geldi (LL27’de 210 IU mL⁻¹, LAC338’de 230 IU mL⁻¹, LAC339’da 225 IU mL⁻¹ ve LAC340’da 230 IU mL⁻¹). Dirençlilik ve regülasyon genlerinin bağımsız veya birlikte gen dozlarının artırılmasının, nisin üretici suшта şeker kullanımı açısından bir değişime yol açmadığı saptandı. Rekombinant suşlar arasında laktoz ve maltoz dışındaki tüm şekerlerde en yüksek nisin üretimi LAC339’da tespit edildi. Laktoz ve maltoz şekerlerinde tüm rekombinant suşlar eşit miktarlarda nisin üretti. Dirençlilik genlerini içeren rekombinantta (LAC338) en yüksek nisin üretimi artışı fruktoz kullanımı durumunda meydana gelirken, regülasyon genlerini (LAC339) ve her iki gen grubunu (LAC340) içeren rekombinantlarda glukoz kullanımında meydana geldi.

Fruktozun doğal ve rekombinant suşlar için nisin üretiminde en etkili şeker kaynağı olduğunun tespitinden sonra, fruktozun en verimli konsantrasyonları (% 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4 ve 5) belirlendi (Çizelge 4.1). Tüm suşlarda en yüksek nisin üretiminin gerçekleştiği konsantrasyon % 1 olarak belirlendi ($p < 0.05$). Bu konsantrasyondan sonra tüm suşlarda nisin üretiminde yatay bir seyrin ardından, farklı oranlarda düşüşler meydana geldi ($p < 0.05$). Regülasyon genlerinin klonlandığı rekombinant suшта (LAC339), dirençlilik genlerinin klonlandığı suşlara (LAC338 ve LAC340) göre yüksek fruktoz konsantrasyonlarında daha hızlı bir düşüş tespit edildi. Doğal ve rekombinant suşlarda, nisin üretimi ile benzer şekilde, hücre yoğunluğu da % 1 fruktoz konsantrasyonuna kadar arttı, ancak bu konsantrasyondan sonra hızlı bir şekilde düştü. Diğer yandan % 1.5 fruktoz konsantrasyonundan sonra ortam pH’sının tüm kültürlerde 4.25’e kadar düştüğü saptandı. Bu durum % 1’den daha yüksek fruktoz kullanılması durumunda pH’nın hücreler için stres koşulu oluşturduğuna işaret etti



Şekil 4.6 *L. lactis* LL27 doğal suşu ve rekombinantlarında nisin üretim miktarları üzerine farklı karbon kaynaklarının etkisi. LAC338: pLEB672 plazmidini, LAC339: pLEB673 plazmidini ve LAC340: pLEB674 plazmidini içermektedir. Kontrol olarak şeker ilave edilmeyen M17 kullanılmıştır. Standart sapmalar % 5'in altındadır

Çizelge 4.1 *L. lactis* LL27 doğal suşu ve rekombinantlarının farklı fruktoz konsantrasyonlarındaki nisin üretim düzeyleri. Nisin üretim miktarları üzerindeki farklı harfler istatistiki anlamlılığı ($p < 0.05$) ifade etmektedir. Standart sapmalar %5'in altındadır

% Fruktoz	Suşlar											
	LL27			LAC338			LAC339			LAC340		
	pH	HKA (mg mL ⁻¹)	Nisin (IU mL ⁻¹)	pH	HKA (mg mL ⁻¹)	Nisin (IU mL ⁻¹)	pH	HKA (mg mL ⁻¹)	Nisin (IU mL ⁻¹)	pH	HKA (mg mL ⁻¹)	Nisin (IU mL ⁻¹)
M17	6.65	0.20	70 ^a	6.67	0.19	70 ^a	6.65	0.19	80 ^a	6.65	0.19	80 ^a
0.5	5.22	1.86	1170 ^b	5.27	1.80	1290 ^b	5.23	1.80	1520 ^b	5.22	1.79	1480 ^b
1	4.82	2.30	1330 ^c	4.87	2.30	1480 ^c	4.85	2.32	1900 ^c	4.85	2.31	1620 ^c
1.5	4.25	2.28	1330 ^c	4.26	2.26	1480 ^c	4.26	2.26	1850 ^c	4.25	2.30	1550 ^b
2	4.24	2.28	1330 ^c	4.26	2.25	1330 ^b	4.27	2.23	1760 ^d	4.26	2.24	1550 ^b
3	4.25	2.25	1270 ^b	4.27	2.23	1330 ^b	4.28	2.22	1160 ^e	4.28	2.21	1550 ^b
4	4.27	2.23	1265 ^b	4.29	2.20	1020 ^d	4.29	2.17	1160 ^e	4.29	2.17	1475 ^b
5	4.27	2.19	950 ^b	4.30	2.17	1020 ^d	4.29	2.14	1090 ^e	4.29	2.17	1475 ^b

HKA : Hücre kuru ağırlığı

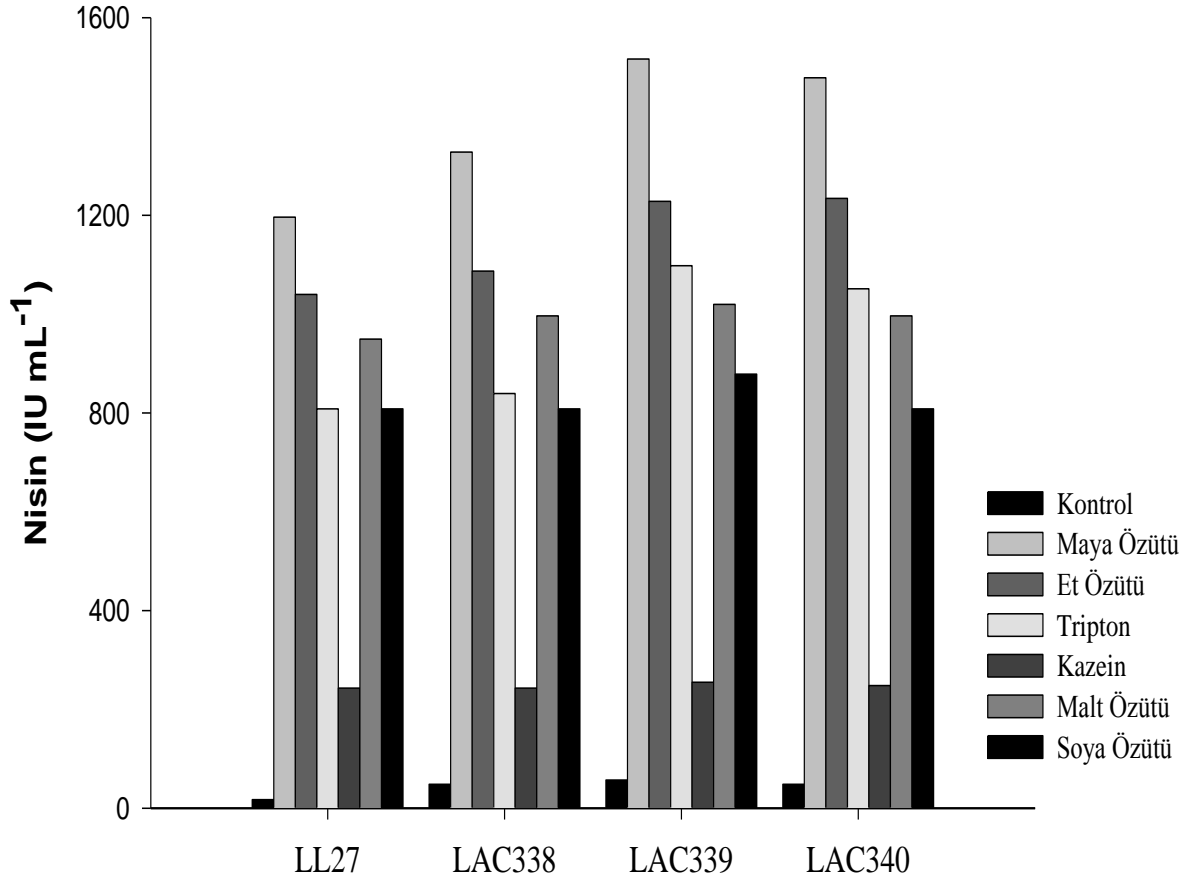
Karbon kaynağının seçimi; hücre gelişimini ve nisin biyosentezini etkilemesinden dolayı, nisin üretiminde temel kontrol basamağı olarak ele alınmaktadır (de Vuyst and Vandamme, 1992, Lv *et al.* 2004a). Birçok araştırmacı sakkaroz ve laktoz başta olmak üzere; glukoz, galaktoz, ksiloz, maltoz, fruktoz arabinoz, rafinoz şekerlerini içeren besiyeri ortamlarını kullanarak, nisin üretim düzeylerini ve nisin biyosentezinin moleküler detaylarını incelemiştir. Bu çalışmalarda sakkaroz ve laktoz şekerleri yüksek nisin üretimi sağlamaları nedeniyle ön plana çıkmıştır (de Vuyst and Vandamme 1992, Amiali *et al.* 1998, Chandrapati and O'Sullivan 1999, Lv *et al.* 2004a, Liu *et al.* 2005, Cheigh and Pyun, 2005, Pongtharangkul and Demirci 2006). *L. lactis* IO-1 suşunda yürütülen bir çalışmada ise en yüksek nisin üretiminin ksiloz üzerinden gerçekleştiği belirlenmiştir (Matsusaki *et al.* 1996). Doğal suş LL27 ve rekombinantları için en uygun karbon kaynaklarından birisinin sakkaroz olması literatür verileri ile uyumlu iken, denenen tüm suşların fruktoz varlığında en yüksek nisin üretim oranına ulaşmaları yeni bir bulgudur. Bu durum büyük olasılıkla kullandığımız suşun yerel kökeninden kaynaklanmaktadır. Nisin üretimi ile karbon kaynağı arasındaki ilişki bazı durumlarda sakkaroz nisin gen bloku gibi genetik bağlantılardan kaynaklanmaktadır (de Vuyst and Vandamme 1992, Cheigh *et al.* 2002). Çalışmamızda karbon kaynaklarının nisin verimi üzerine etkisinin özellikle fruktoz için literatür verilerinden farklılık göstermesi, Türkiye kökenli suşun evrimsel farklılığına işaret etmektedir.

Besin ortamında belirli oranlarda bulunan karbon kaynağı hücre gelişimini teşvik etmekte, yüksek konsantrasyonlarda ise bakteriyel gelişimi ve nisin üretimini baskılamaktadır. Bu nedenle farklı şekerlere ve bunların başlangıç konsantrasyonlarına bağlı olarak, nisin üretim miktarı değişebilmektedir (Pongtharangkul and Demirci 2006). Kontrolsüz bir fermentasyon ortamında başlangıç sakkaroz konsantrasyonunun % 2'nin üzerinde olması halinde hem hücresel gelişimin ve hem de nisin üretiminin hızla azaldığı belirlenmiştir (de Vuyst and Vandamme 1992). Bir başka çalışmada laktozun % 2, glukozun ise % 3 oranında bulunmasının nisin verimliliği için sınır değerler olduğu belirlenmiştir (Matsusaki *et al.* 1996, Cheigh *et al.* 2002, Jozala *et al.* 2007). Çalışmamızda kullanılan tüm suşlarda da optimum düzeyden sonra fruktoz konsantrasyonunun artışına bağlı olarak hücre gelişiminin ve nisin üretim miktarlarının düştüğü saptanmıştır. Bu durum, ortamda biriken yüksek miktardaki laktik asidin hücre gelişimi ve nisin üretimi üzerinde oluşturduğu negatif etkiden kaynaklanmaktadır.

4.2.2 Azot kaynağının etkisi

L. lactis LL27 doğal suşu ve rekombinantlarında nisin üretimi üzerine farklı azot kaynaklarının etkileri; bazal ortama % 1 oranında maya özütü, et özütü, tripton, kazein, malt özütü ve soyton ilave edilerek belirlendi. Maya özütünün kullanılması durumunda tüm suşlarda en yüksek nisin üretimi tespit edilirken (LL27'de 1200 IU mL⁻¹, LAC338'de 1330 IU mL⁻¹, LAC339'da 1520 IU mL⁻¹ ve LAC340'da 1480 IU mL⁻¹), bunu et özütü (LL27'de 1040 IU mL⁻¹, LAC338'de 1090 IU mL⁻¹, LAC339'da 1230 IU mL⁻¹ ve LAC340'da 1235 IU mL⁻¹), malt özütü (LL27'de 950 IU mL⁻¹, LAC338'de 1000 IU mL⁻¹, LAC339'da 1020 IU mL⁻¹ ve LAC340'da 1000 IU mL⁻¹), tripton (LL27'de 810 IU mL⁻¹, LAC338'de 840 IU mL⁻¹, LAC339'da 1100 IU mL⁻¹ ve LAC340'da 1050 IU mL⁻¹) ve soyton (LL27'de 810 IU mL⁻¹, LAC338'de 810 IU mL⁻¹, LAC339'da 880 IU mL⁻¹, LAC340'da 810 IU mL⁻¹) izledi. En düşük nisin üretimi ise kazein hidrolizatının varlığında belirlendi (LL27'de 240 IU mL⁻¹, LAC338'de 245 IU mL⁻¹, LAC339'da 255 IU mL⁻¹ ve LAC340'da 250 IU mL⁻¹). Doğal suşta, dirençlilik ve regülasyon gen gruplarının ayrı ayrı veya her ikisinin birlikte kopya sayılarının artırılması sonucunda da en yüksek nisin üretim artışı maya özütünde oluştu. Ancak ortamda kazein, soya özütü ve malt ekstraktının bulunması, ilgili genlerin kopya sayılarının artırıldığı suşlarda anlamlı nisin üretimi artışına yol açmadı (Şekil 4.7).

Doğal suş (LL27) ve ilave dirençlilik ve/veya regülasyon genlerini içeren rekombinant suşlarda (LAC338, LAC339, LAC340) maya özütü miktarının artışına paralel olarak hücre yoğunluğunun da arttığı belirlendi. Çalışmada, doğal suş ve dirençlilik genlerinin kopya sayılarının artırıldığı LAC338 rekombinantında en yüksek nisin üretimine (LL27'de 1480 ve LAC338'de 1550 IU mL⁻¹) % 3 maya özütü konsantrasyonunda ulaşıldı. Bu iki suştan farklı olarak en yüksek nisin üretimi, regülasyon genlerinin aktarıldığı LAC339 rekombinatında (1900 IU mL⁻¹) % 5 ve dirençlilik/regülasyon genlerinin aktarıldığı LAC340 rekombinantında (1900 IU mL⁻¹) % 4 maya özütünün ilavesi durumunda belirlendi. Denenen tüm suşlarda, yukarıda verilen nisin oranlarına ulaşıldıktan sonra maya özütü konsantrasyonunun artırılmasının nisin üretiminde bir değişime yol açmadığı saptandı (Çizelge 4.2).



Şekil 4.7 *L. lactis* LL27 doğal suşu ve rekombinantlarında nisin üretim miktarları üzerine farklı azot kaynaklarının etkisi. LAC338: pLEB672 plazmidini, LAC339: pLEB673 plazmidini ve LAC340 pLEB674 plazmidini içermektedir. Kontrol olarak azot katılmayan bazal ortam kullanılmıştır. Standart sapmalar % 5'in altındadır

Çizelge 4.2 *L. lactis* LL27 doğal suşu ve rekombinantlarının farklı maya özütü konsantrasyonlarındaki nisin üretim düzeyleri. Nisin üretim miktarları üzerindeki farklı harfler istatistiksel anlamlılığı ($p < 0.05$) ifade etmektedir. Standart sapmalar % 5'in altındadır

% Maya Özütü	Suşlar											
	LL27			LAC338			LAC339			LAC340		
	pH	HKA (mg mL ⁻¹)	Nisin (IU mL ⁻¹)	pH	HKA (mg mL ⁻¹)	Nisin (IU mL ⁻¹)	pH	HKA (mg mL ⁻¹)	Nisin (IU mL ⁻¹)	pH	HKA (mg mL ⁻¹)	Nisin (IU mL ⁻¹)
BM	6.64	0.05	50 ^a	6.61	0.08	50 ^a	6.62	0.07	50 ^a	6.61	0.07	50 ^a
1	5.29	1.81	1190 ^b	5.29	1.75	1290 ^b	5.29	1.75	1520 ^b	5.31	1.78	1460 ^b
2	5.12	2.01	1330 ^c	5.14	1.88	1480 ^c	5.13	1.92	1760 ^c	5.13	2.00	1620 ^c
3	5.06	2.10	1480 ^d	5.08	1.98	1550 ^c	5.07	2.05	1850 ^c	5.06	2.10	1620 ^c
4	5.02	2.22	1480 ^d	5.03	2.11	1480 ^c	5.02	2.15	1850 ^c	5.03	2.20	1900 ^d
5	4.98	2.23	1390 ^d	4.99	2.15	1550 ^c	4.99	2.18	1900 ^c	4.98	2.23	1850 ^d
6	4.96	2.23	1480 ^d	4.97	2.20	1550 ^c	4.97	2.20	1900 ^c	4.97	2.24	1850 ^d
7	4.96	2.23	1480 ^d	4.96	2.21	1480 ^c	4.97	2.24	1760 ^d	4.96	2.25	1850 ^d
8	4.96	2.28	1480 ^d	4.95	2.28	1550 ^c	4.97	2.26	1760 ^d	4.97	2.29	1850 ^d

HKA : Hücre kuru ağırlığı

Azot kaynakları, nisin üreticisi *L. lactis* suşlarının gelişebilmeleri ve nisin üretebilmeleri için hayati rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalarda maya özütü, pepton, et özütü kullanılması durumunda yüksek nisin üretim oranı ve hücre biyokütlesine ulaşılmıştır. En yüksek nisin üretimi ise maya özütü, pamuk çiğiti, soya ununun kullanılmasıyla elde edilmiştir (de Vuyst and Vandamme 1993, Kim *et al.* 1997b, Cheigh *et al.* 2002). Kazein hidrolizatı, mısır unu ve malt özütü de nisin üretimi için uygun azot kaynakları olarak tanımlanmamıştır (de Vuyst and Vandamme 1993, de Vuyst 1995). LL27 doğal suşu ve rekombinantlarının maya özütü başta olmak üzere et özütü ve tripton varlığında yüksek, kazein hidrolizatı varlığında düşük seviyede nisin üretmeleri literatür verileri ile uyum göstermektedir. Maya özütünün nisin üretimini artırıcı etkisi önemli ölçüde hücresel gelişimi teşvik etmesinden kaynaklanmaktadır. Nitekim çalışmamızda bazal ortamda maya özütü miktarının artışına paralel olarak biyokütle ve nisin üretiminin yükseldiği tespit edildi. Bu nedenle birçok literatür verisinde de belirtildiği gibi, maya özütünün nisin üretimi için tek başına ideal azot kaynağı olabileceği ileri sürülebilir (Cheigh *et al.* 2002). Diğer taraftan, regülasyondan sorumlu genlerin ilave edildiği rekombinantlarda (LAC339 ve LAC340) en yüksek nisin üretim miktarına, doğal suşa göre daha yüksek maya özütü konsantrasyonunda ulaşılması, maya özütünün içerdiği peptitlerin bu genler üzerinde aktive edici rollerinin olabileceği olasılığını akla getirmektedir. Nitekim maya özütünün, serbest aminoasitler ve kısa peptitlere ilave olarak, hücre gelişimi için etkili faktörleri de içerdiği bilinmektedir (de Vuyst 1995, Cheigh *et al.* 2002).

4.2.3 Fosfat kaynağının etkisi

İnorganik fosfat konsantrasyonunun doğal ve rekombinant suşların nisin üretim üzerine etkisini belirlemek ve en uygun konsantrasyonu tespit etmek için, modifiye bazal ortama farklı konsantrasyonlarda (% 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5 ve 5) sodyum hidrojen fosfat ilave edildi. LL27 ve rekombinant suşların biyokütlesi, % 3 fosfat konsantrasyonuna kadar arttı ve bu konsantrasyondan sonra hızla azaldı. Doğal suş, rekombinant suşlara oranla tüm fosfat konsantrasyonlarında daha fazla hücresel gelişim gösterdi. Tüm suşlarda nisin üretimi, biyokütle ile benzer şekilde % 3 fosfat konsantrasyonuna kadar arttı ve bu düzeyden sonra hızlı bir düşüş gösterdi. LAC338 rekombinant suşunun dışındaki tüm suşlarda en yüksek nisin üretimine, % 2.5 fosfat konsantrasyonunda ulaşılırken, bu suшта en yüksek nisin üretimi % 3 fosfat konsantrasyonunda meydana geldi. Ancak bu farklılık istatistiki olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$). Optimum fosfat konsantrasyonlarında LL27'nin 1270 IU mL⁻¹, LAC338'in 1380 IU mL⁻¹, LAC339'un 1740 IU mL⁻¹ ve LAC340'ın 1620 IU mL⁻¹ düzeyinde nisin ürettiği saptandı (Çizelge 4.3). Besiyeri ortamında % 3'ün üzerinde fosfat konsantrasyonunun kullanılması durumunda nisin üretimindeki düşüş, hücre gelişimi ile paralellik gösterdi. Dolayısıyla, bu sonuç yüksek fosfat konsantrasyonun hücre gelişimini baskılaması neticesinde nisin üretiminin de azaldığına işaret etti. Ayrıca fermentasyon sonunda ölçülen pH değerlerinin de, söz konusu konsantrasyondan sonra 6'nın üzerinde bulunması bu bulguyu destekledi. Gelişme ortamına ilave edilen fosfat kaynağı, tamponlama ve hücre gelişim ajanı olarak işlev görse de (de Vuyst and Vandamme, 1992, Li *et al.* 2002, Liu *et al.* 2003) belirli bir oranın üzerinde inhibisyon etkisine sahip olduğu ve bu değer nisin verimini olumsuz yönde etkilediği çalışmamızın sonuçları ile de desteklenmiştir. Kim *et al.* (2006) *Micrococcus* sp. G05 suşunda mikrokoksin üretiminin % 3 inorganik fosfat oranından sonra hızla azaldığını belirlemiştir. Bir diğer çalışmada ise kompleks ortam içerisindeki KH₂PO₄ oranının % 5'i aşması durumunda *L. lactis*'de hücre gelişimi ve nisin üretiminin büyük oranda düştüğü saptanmıştır (de Vuyst and Vandamme 1993). Araştırmamızda artan fosfat konsantrasyonunun rekombinant hücrelerdeki nisin üretim artışları üzerine etkisi diğer besiyeri bileşenlerinin kullanılması durumunda oluşan artışlarla kıyaslandığında daha düşük düzeyde bulunmuştur. Bu durum fosfatın, nisin üretimi üzerinde maya özütü ve fruktoz kadar etkili olmadığına işaret etmektedir.

Çizelge 4.3 *L. lactis* LL27 doğal suşu ve rekombinantlarının farklı inorganik fosfat konsantrasyonlarındaki nisin üretim düzeyleri. Nisin üretim miktarları üzerindeki farklı harfler istatistiki anlamlılığı ($p < 0.05$) ifade etmektedir

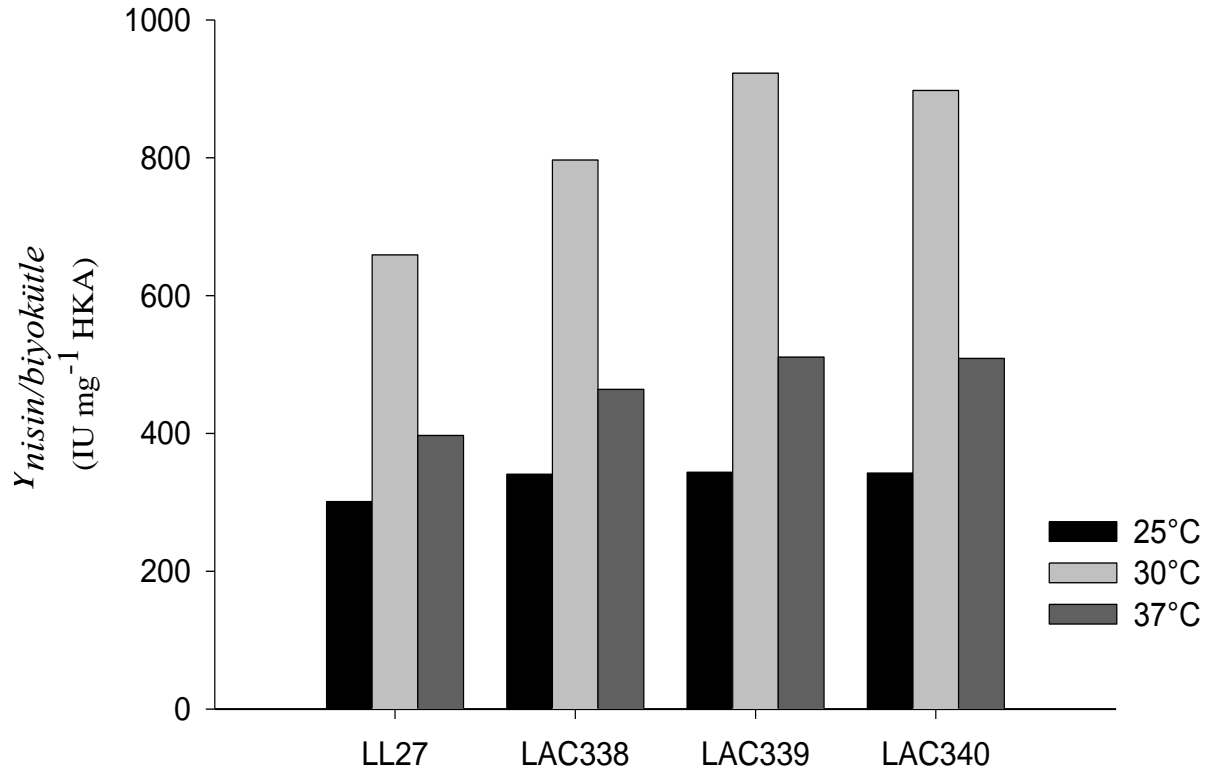
% Sodyum Fosfat	Strains											
	LL27			LAC338			LAC339			LAC340		
	pH	HKA (mg mL ⁻¹)	Nisin (IU mL ⁻¹)	pH	HKA (mg mL ⁻¹)	Nisin (IU mL ⁻¹)	pH	HKA (mg mL ⁻¹)	Nisin (IU mL ⁻¹)	pH	HKA (mg mL ⁻¹)	Nisin (IU mL ⁻¹)
mBM	5.31	1.81	1190 ^a	5.35	1.73	1290 ^a	5.29	1.75	1520 ^a	5.31	1.76	1480 ^a
2.5	5.77	1.87	1270 ^b	5.78	1.76	1290 ^b	5.78	1.77	1740 ^b	5.77	1.78	1620 ^b
3	5.79	1.93	1270 ^b	5.79	1.86	1380 ^b	5.78	1.86	1620 ^b	5.77	1.86	1620 ^b
3.5	6.02	1.33	330 ^c	6.04	1.11	360 ^c	6.04	1.16	400 ^c	6.03	1.16	600 ^c
4	6.14	1.02	330 ^c	6.14	0.93	360 ^c	6.14	0.97	400 ^c	6.12	0.97	400 ^d
4.5	6.22	0.76	110 ^d	6.23	0.65	150 ^d	6.23	0.77	200 ^d	6.23	0.76	360 ^e
5	6.28	0.74	110 ^d	6.32	0.63	150 ^d	6.30	0.76	200 ^d	6.32	0.76	200 ^e

HKA : Hücre kuru ağırlığı

4.2.4 pH ve sıcaklığın etkisi

Nisin üretimi bakımından en verimli inkübasyon sıcaklığının belirlenmesi için, bazal ortama inoküle edilen suşlar 25 °C, 30 °C ve 37 °C’de 12 saat süreyle inkübe edildi ve her bir suşun mg hücre kuru ağırlığı başına düşen nisin üretim miktarı hesaplandı (Şekil 4.8). Şekil 4.8’de görüldüğü gibi, suşlar için optimum inkübasyon sıcaklığının 30 °C olduğu saptandı ($p<0.01$). Bu inkübasyon sıcaklığını ise sırasıyla 37 °C ve 25 °C takip etti. Diğer taraftan dirençlilik ve regülasyon genlerinin kopya sayısının artırılması neticesinde meydana gelen nisin üretim artışı, 30 °C’de, 25 °C ve 37 °C’ye göre anlamlı ($p<0.01$) bulunurken, uygulanan diğer iki sıcaklıkta önemsiz olduğu ($p>0.05$) tespit edildi. 30 °C’de en fazla nisin üretim artışı, regülasyon genlerinin kopya sayılarının artırıldığı LAC339 suşunda meydana geldi (% 32). Bu inkübasyon sıcaklığında LL27 suşunda 1190 IU mL⁻¹, LAC338, LAC339 ve LAC340 suşlarında ise sırasıyla 1390 IU mL⁻¹, 1620 IU mL⁻¹ ve 1580 IU mL⁻¹ nisin üretimi gerçekleşti.

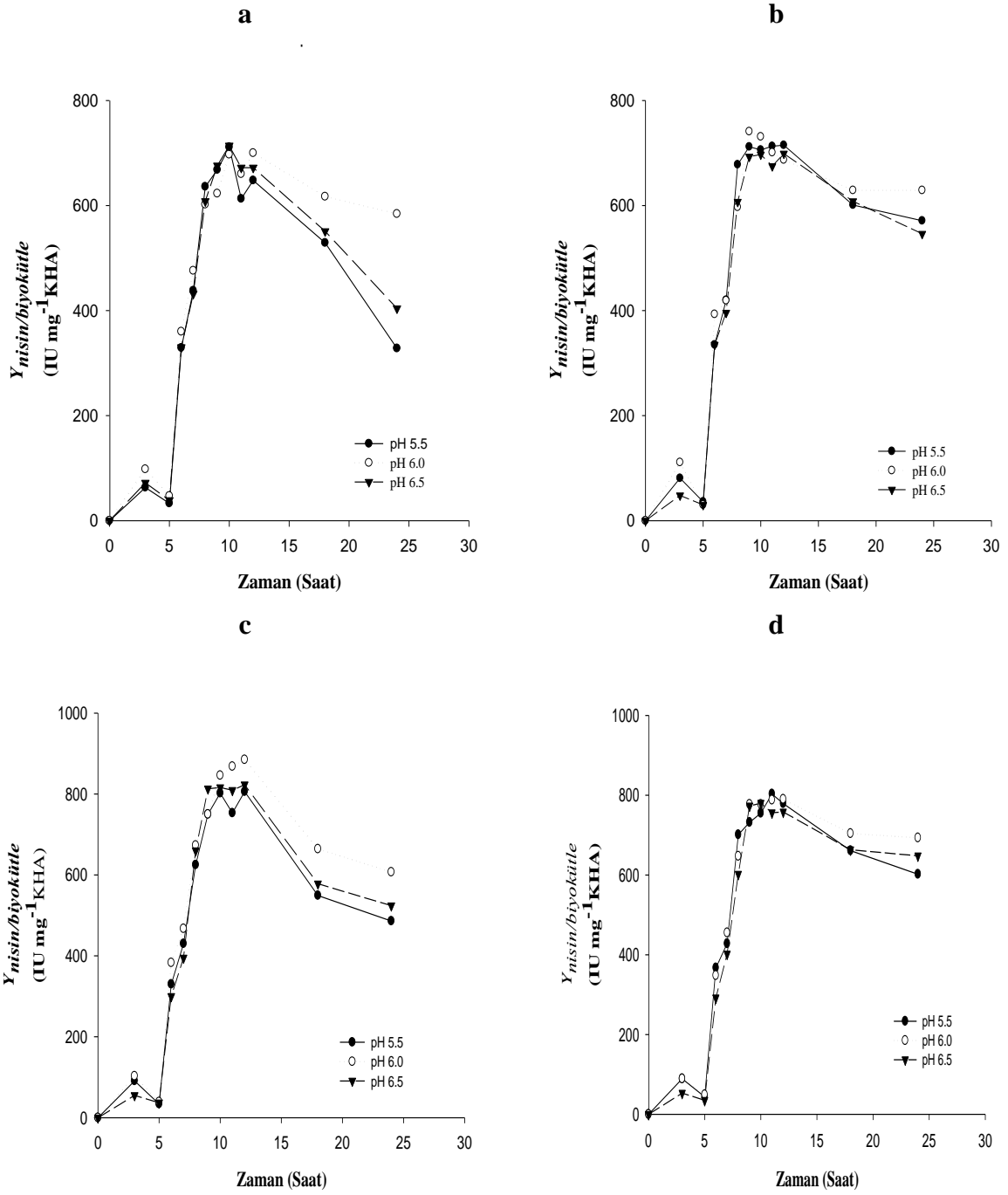
Nisin üretimi üzerine farklı sıcaklıkların etkisinin araştırıldığı çalışmalar sınırlı sayıdadır. Bu yönde yapılan bir çalışmada, nisin üreticisi *L. lactis* subsp. *lactis* A164 suşunun, 25 °C ve 37 °C inkübasyon sıcaklıklarında, 30 °C’ye göre benzer bir hücresel gelişim gösterdiği belirlenmiş ancak 30 °C’de saptanan nisin üretim miktarının; 37 °C’de % 50 ve 25 °C’de ise % 70 düştüğü saptanmıştır (Cheigh *et al.* 2002). Çalışmamızda LL27 doğal suş ve rekombinantlardan elde edilen nisin üretim verimleri, bu çalışma verileriyle tam bir uyum içerisindedir. Dirençlilik ve regülasyon gen kopyalarının artırıldığı suşların, 30 °C’de inkübe edilmesi durumunda en yüksek nisin üretim düzeyi göstermesi, dirençlilik ve regülasyon proteinlerinin fonksiyonları için söz konusu inkübasyon sıcaklığının optimum olduğuna işaret etmiştir. Nitekim Şimşek *et al.* (2008) tarafından yürütülen çalışmada 4-45 °C arasındaki inkübasyon sıcaklıklarının kullanılması neticesinde nisin üreticileri olan *L. lactis* ATCC11454 ve *L. lactis* LL27 suşlarının hücresel gelişimlerinin ve nisin üretim düzeylerinin 30 °C’de en yüksek seviyeye ulaştığı, diğer inkübasyon sıcaklıklarda ise suşlar için stres ortamının olduğu belirlenmiştir. Bu bulgular sıcaklık stres koşullarında geliştirilen yanıtın nisin üretimi üzerinde olumsuz etki yaptığını işaret etmektedir.



Şekil 4.8 *L. lactis* LL27 doğal suşu ve rekombinantlarının farklı inkübasyon sıcaklıklarındaki özgül nisin üretim düzeyleri. Standart sapmalar % 5'in altındadır

LL27 doğal suşu ve rekombinantlarının verimli nisin üretimi için optimal pH değerinin tespiti, farklı pH değerlerine sabitlenen kesikli fermentasyon sisteminde, suşlara ait özgül nisin üretim oranlarının hesaplanmasıyla gerçekleştirildi (Şekil 4.9 a, b, c ve d). Tüm suşların, özgül nisin üretimi, denenen tüm pH değerlerinde 12. saate kadar benzer bulundu. Ancak 18. ve 24. saatlerde pH 6'da diğer pH değerlerine göre daha yüksek özgül nisin üretimi tespit edildi. Ayrıca pH 6'da, diğer pH değerlerinin (5.5 ve 6.5) kullanılması durumunda fermentasyon sonunda meydana gelen nisin üretim kaybı, daha düşük oranda gerçekleşti. Bu pH değerinde fermentasyon sonunda nisin aktivitesi LL27 suşunda 1190 IU mL^{-1} , LAC338, LAC339 ve LAC340 suşlarında sırasıyla 1270 IU mL^{-1} , 1120 IU mL^{-1} ve 1370 IU mL^{-1} olarak belirlendi. Çalışmada, kullanılan pH değerleri arasında nisin üretim miktarı bakımından ciddi bir farklanma görülmemiştir. Ancak fermentasyon sonundaki nisin üretim miktarı göz önüne alındığında, pH 6'nın daha verimli olduğu bulunmuştur. Farklı suşlarla yürütülen çalışmalarda ideal nisin verimi bakımından kesin bir pH değeri tanımlanamamakla birlikte, genelde pH 5.5 - 6.8 arasındaki değerler kullanılmıştır (de Vuyst and Vandamme 1992, Matsusaki *et al.* 1996, Cheigh *et al.* 2002, Liu *et al.* 2005, Pontharangkul and Demirci 2006). Araştırma bulgularımız bu literatür verileri ile paralellik göstermektedir.

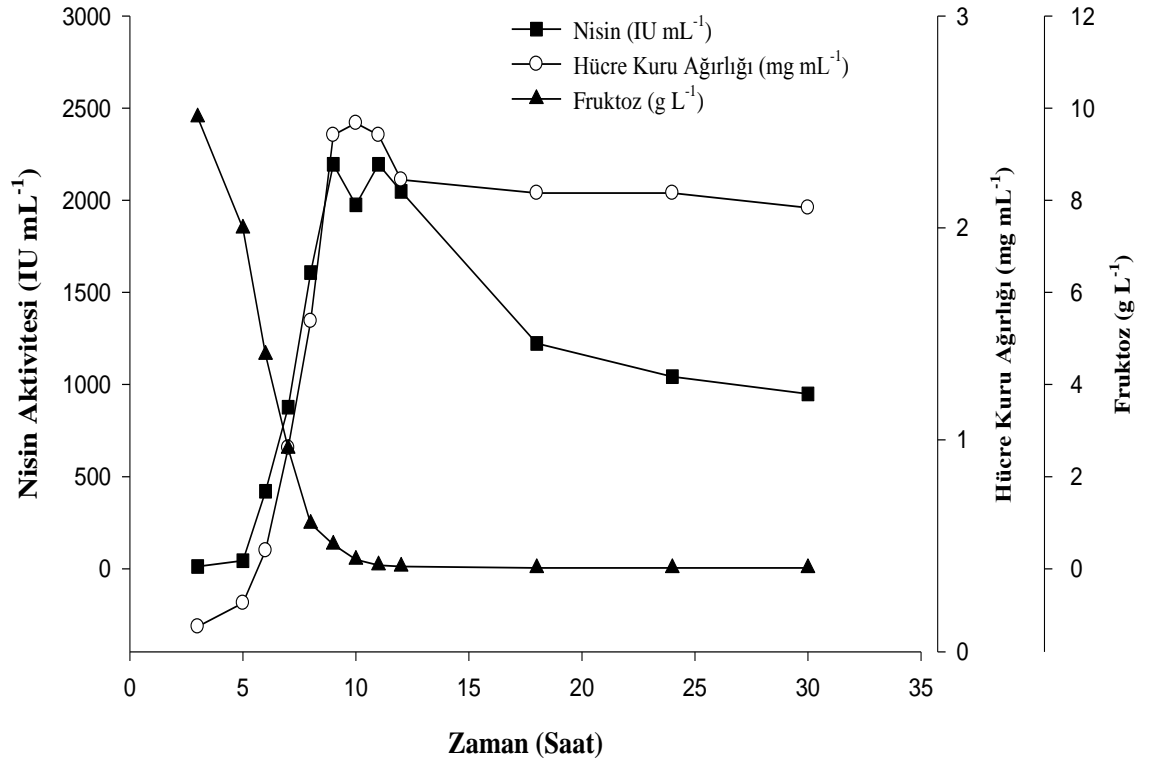
Doğal suş LL27'de dirençlilik genlerinin kopya sayılarının artırılması neticesinde, denenen tüm pH değerlerinde fermentasyon sonunda (18. ve 24. saatler) nisin kaybının daha düşük seviyede olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.9 b ve d). Bu farklanma NisFEG proteinlerin hücre yüzeyine tutunan nisin moleküllerini uzaklaştırılması sonucunda ortaya çıkmaktadır. Nitekim Stein *et al.* (2003) lantibiyotik dirençlilik sisteminde görev alan LanFEG proteinlerinin, nisin moleküllerini hücre duvarından uzaklaştırıcı etkisinin bulunduğunu belirtmiştir.



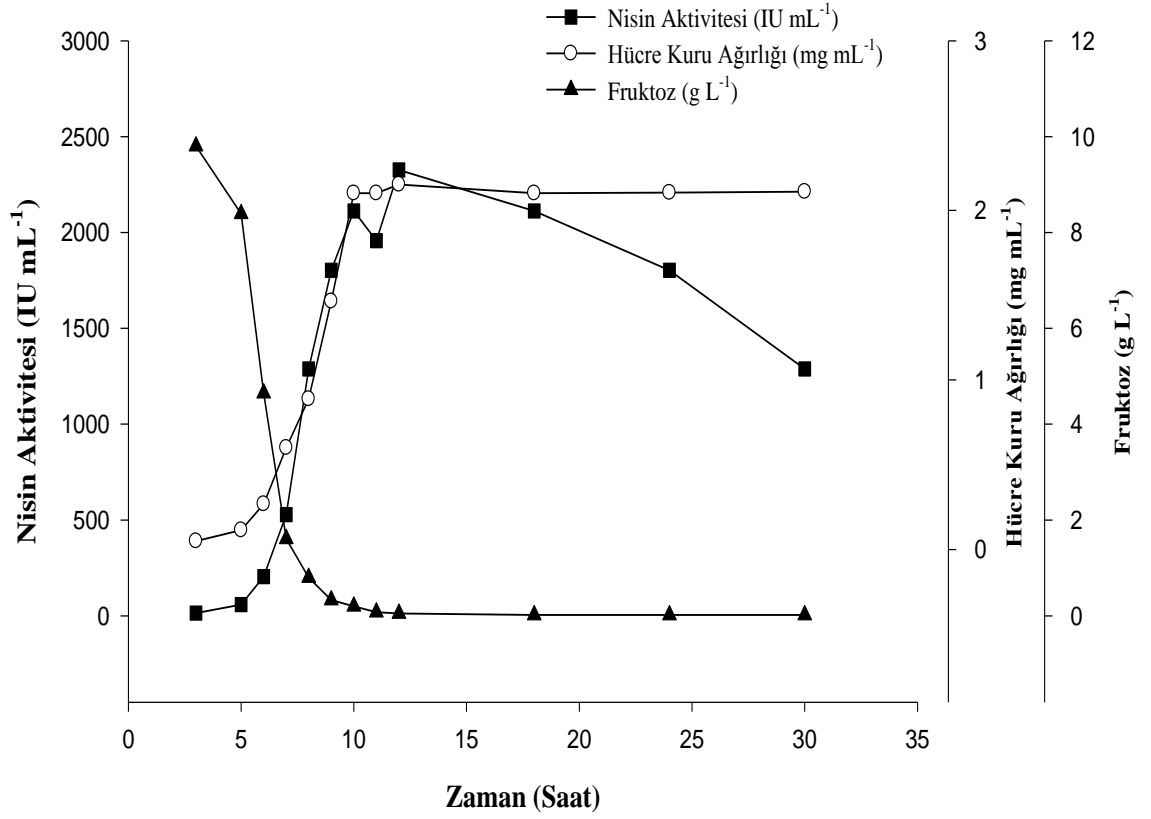
Şekil 4.9 *L. lactis* LL27 doğal suşu ve rekombinantlarının farklı pH değerlerinde özgül nisin üretim düzeyleri. a) LL27, b) LAC338, c) LAC339 ve d) LAC340 Standart sapmalar %5'in altındadır

4.3 pH Kontrollü Kesikli Fermentasyon

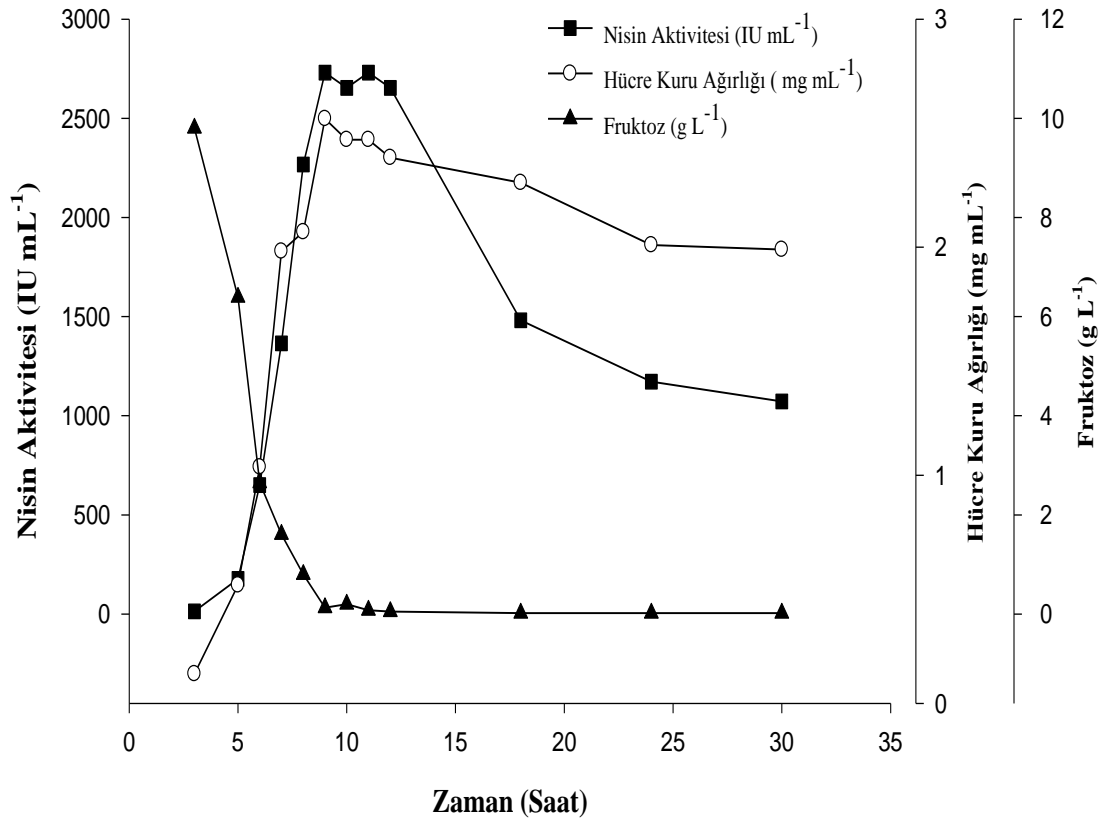
pH kontrollü kesikli fermentasyonda LL27 doğal suşu ve rekombinantları (LAC338, LAC339, LAC340) hücre gelişimi ve şeker kullanımı bakımından benzer davranışlar gösterdi (Şekil 4.10, 4.11, 4.12, 4.13). Buna göre tüm suşlarda 5. ve 9. saatler arasında hücresel yoğunluğunun % 90'nının oluştuğu ve 10. saatten sonra hücre gelişiminin yatay bir seyir izlediği tespit edildi. LL27, LAC339 ve LAC340 suşlarında maksimum hücre gelişimine 9. saatte ulaşılrken, *nisFEG* genlerinin kopya sayılarının artırıldığı LAC338 suşunda en yüksek hücre yoğunluğuna 10. saatte ulaşıldı. Nitekim suşların üssel fazda (3 ve 8. saatler arası) hesaplanan gelişme hızları (μ_{max}) bakımından da LAC338 suşunun en düşük değere sahip olduğu belirlendi (Çizelge 4.4). Bu sonuç dirençlilikten sorumlu genlerin suşun hücresel gelişiminin geciktirilmesi üzerinde rol oynadığına işaret etti. Fermentasyonun son evresinde LAC339 ve LAC338 suşlarının hücresel yoğunluğunda düşüşler tespit edildi (Şekil 4.11 ve 4.12). Fermentasyonun başlangıç aşamasında ortamda bulunan fruktozun (10 g L^{-1}) % 84'ünün tüm suşlar tarafından 8. saate kadar tüketildiği ve 12. saate kadar ise ortamda fruktozun kalmadığı belirlendi (Şekil 4.10, 4.11, 4.12, 4.13). Fermentasyon sürecinde ortamda bulunan fruktoz miktarına karşılık oluşan biyokütle verimi ise, tüm suşlarda benzer bulundu (Çizelge 4.4). LL27 doğal suşu ve rekombinantlarının nisin üretim miktarı, hücre gelişim eğrileriyle paralel olarak artış gösterdi. LL27, LAC339 ve LAC340 suşlarında maksimum nisin üretim seviyesine (LL27'de 2190 IU mL^{-1} , LAC339'da 2730 IU mL^{-1} ve LAC340'da 2780 IU mL^{-1}) 9. saatte ulaşılrken, LAC338 suşunda bu değer 10. saatte gerçekleşti (2330 IU mL^{-1}) (Şekil 4.10, 4.11, 4.12, 4.13). Fermentasyonda 9-12 saatler arasında nisin aktivitesi tüm suşlarda yatay bir seyir izlemesine karşın, daha sonra suşların nisin üretim miktarlarında farklı oranlarda düşüşler belirlendi. Ulaşılan maksimum nisin aktivitesine göre nisin üretimindeki en yüksek düşüş LAC339 suşunda (% 61) olurken, bunu LL27 (% 57) ve LAC338 (% 45) suşları takip etti. En az nisin üretim kaybı ise LAC340 suşunda (% 35) meydana geldi. Dirençlilikten sorumlu genleri içeren rekombinantlarda fermentasyonun geç evresinde daha az nisin üretim kayıplarının oluşması; bu ilave genlerin hücreleri fermentasyon ortamında biriken yüksek nisin konsantrasyonundan koruduğunu göstermektedir. Bu varsayım, hücrelere ait özgül bakteriyosin üretimi ($q_{bakteriyosin}$) ve birim biyokütledeki nisin üretim verimlerinin ($Y_{nisin/x}$) LAC338 ve LAC340 rekombinantlarında yüksek bulunması ile de desteklenmiştir (Çizelge 4.4).



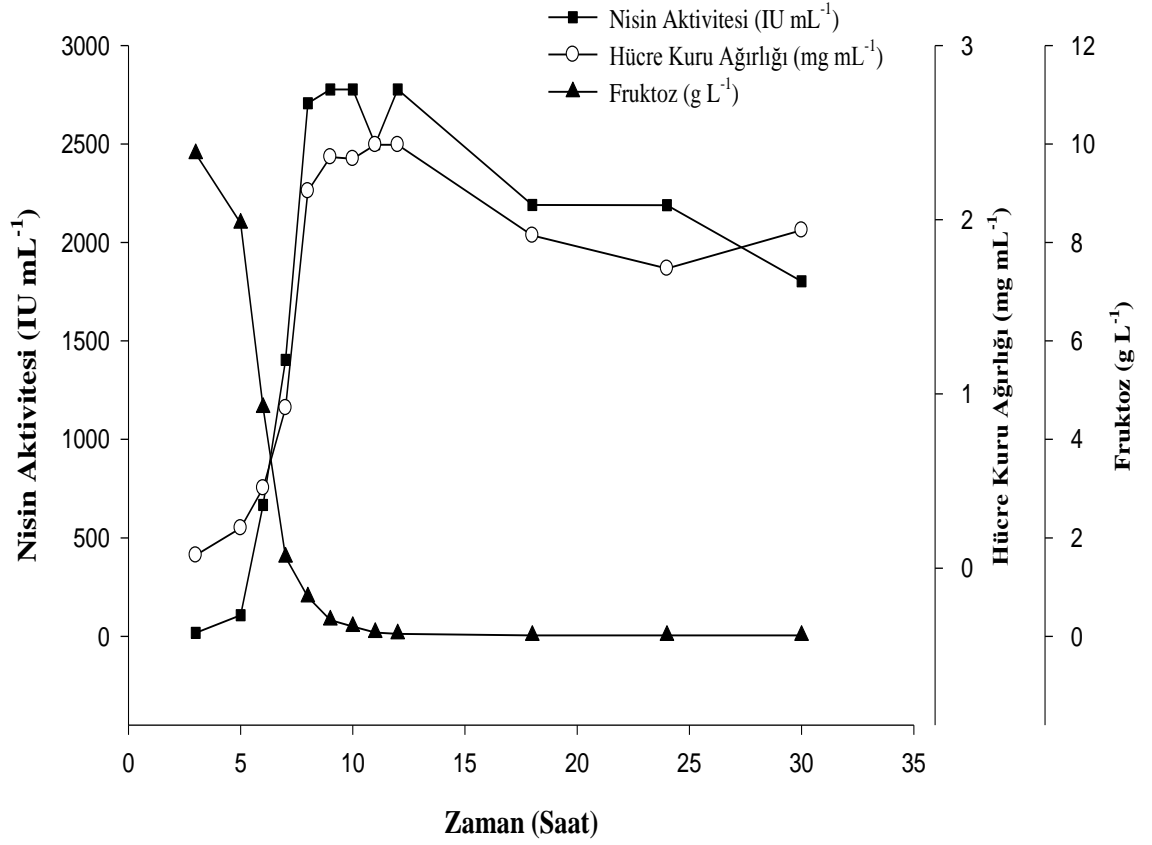
Şekil 4.10 *L. lactis* LL27 suşunun pH kontrollü kesikli fermentasyon sisteminde nisin üretimi, hücre gelişimi ve fruktoz kullanımı. Veriler 3 tekrarın ortalamasıdır. Standart sapma %5'in altındadır



Şekil 4.11 *L. lactis* LAC338 suşunun pH kontrollü kesikli fermentasyon sisteminde nisin üretimi, hücre gelişimi ve fruktoz kullanımı. Veriler 3 tekrarın ortalamasıdır. Standart sapma %5'in altındadır



Şekil 4.12 *L. lactis* LAC339 suşunun pH kontrollü kesikli fermentasyon sistemindeki nisin üretimi, hücre gelişimi ve fruktoz kullanımı. Veriler 3 tekrarın ortalamasıdır. Standart sapma %5'in altındadır



Şekil 4.13 *L. lactis* LAC340 suşunun pH kontrollü kesikli fermentasyon sistemindeki nisin üretimi, hücre gelişimi ve fruktoz kullanımı. Veriler 3 tekrarın ortalamasıdır. Standart sapma %5'in altındadır

Çizelge 4.4 *L. lactis* LL27 doğal suşu ve rekombinantlarının (LAC338, LAC339, LAC340) pH kontrollü kesikli fermentasyon sisteminde spesifik nisin üretim ve hücre gelişim kinetikleri

Suş İsmi	X_{max} (mg mL ⁻¹)	X_{final} (mg mL ⁻¹)	μ_{max} (h ⁻¹)	Maksimum Nisin (IU mL ⁻¹)	Final Nisin (IU mL ⁻¹)	$Y_{nisin/x}$ (IU mg ⁻¹ _{HKA})	$Y_{x/x}$ (mg _{HKA} g _{fruc} ⁻¹)	q_{nisin} (IU mg _{HKA} ⁻¹ h ⁻¹ ml ⁻¹)
LL27	2.49	2.10	0.49	2200	950	452	0.21	15.06
LAC338	2.15	2.11	0.42	2330	1290	611	0.21	20.34
LAC339	2.47	1.99	0.50	2730	1070	539	0.20	17.95
LAC340	2.43	1.94	0.48	2780	1800	930	0.19	30.97

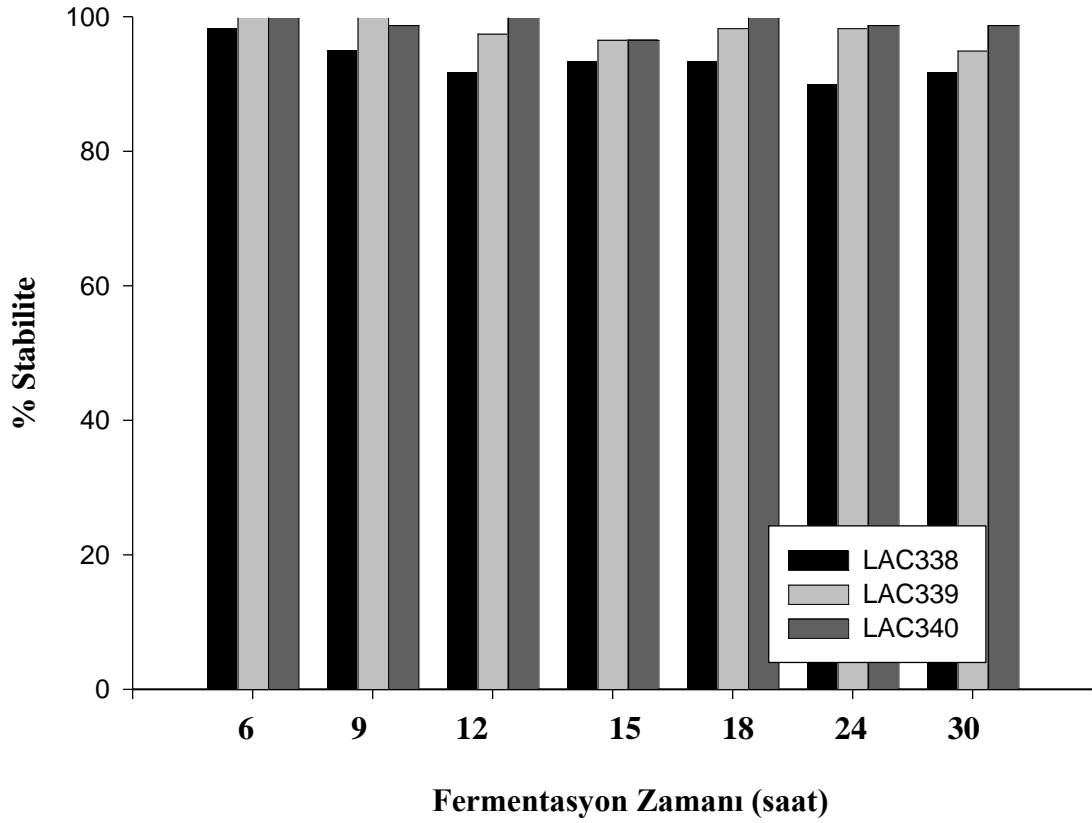
X_{max} : Maksimum biyokütle, X_{final} : Fermentasyon sonunda ölçülen biyokütle, μ_{max} : fermentasyonun üssel fazındaki gelişme hızı, **Final Nisin**: Fermentasyon sonunda ölçülen nisin aktivitesi, $Y_{nisin/x}$: Oluşan mg biyokütlede üretilen nisin üretim verimi, $Y_{x/x}$: Kullanılan gram fruktoz miktarı başına oluşan biyokütle verimi, q_{nisin} : *L. lactis* hücrelerin özgül nisin üretimi. **HKA**: Hücre kuru ağırlığı

pH kontrollü ve kontrolsüz olarak gerçekleştirilen kesikli fermentasyon çalışmalarında nisin üretimi, hücre gelişimi ile bağlantılı olarak artmıştır. Ayrıca bu çalışmalarda kesikli fermentasyonda üretici suşun nisin üretim kapasitesi, fermentasyon ortamının karbon, azot gibi bileşenlerine ve diğer fermentasyon parametrelerine bağlı olarak 500 ile 2500 IU mL⁻¹ arasında değiştiği rapor edilmiştir (de Vuyst and Vandamme 1992, de Vuyst and Vandamme 1993, Hull and Gibbons 1997, Kim *et al.* 1997b, Shimizu *et al.* 1999, Penna and Moraes 2002, Yu *et al.* 2002, Guerra and Pastrana 2003, Lv *et al.* 2004a, Lv *et al.* 2004b, Tolonen *et al.* 2004, Liu *et al.* 2005, Pontharangkul and Demirci 2006, Jozala *et al.* 2007). Türkiye kökenli nisin üreticisi LL27 suşunun nisin üretim miktarı da bu çalışmalarda belirlenen nisin üretim seviyeleri arasındadır. Dirençlilik ve regülasyon genlerinin kopya sayılarının üretici hücrede artırılması ile ulaşılan nisin üretim miktarları ise literatürde rapor edilen miktarların üzerinde bulunmuştur. Ancak yapılan çalışmalarda (de Vuyst and Vandamme 1992, Hull and Gibbons 1997, Penna and Moraes 2002, Guerra and Pastrana 2003, Jozala *et al.* 2007) çok farklı besiyeri kompozisyonların denenmesi, verilerin karşılaştırmasını zorlaştırmaktadır.

Kesikli fermentasyon sistemlerinde gerçekleştirilen nisin üretimindeki temel sorunlardan biri fermentasyonun geç evrelerinde nisin üretiminin durması ve ölçülen nisin aktivitesinin hızla azalmasıdır. Bilindiği gibi kesikli fermentasyon sistemleri hücrelerin doğal gelişim eğrilerini gösterdikleri ortamlardır. Bu nedenle fermentasyon ortamında tükenen besin elementleri ve oluşturulan metabolitler, üretici hücre üzerinde oldukça etkilidir. Bu etkinin en önemli sonuçlarından biri hücrelerin ortamda lize olması ve proteazların serbest kalmasıdır. Tüm nisin üreticilerinin nisine karşı bir dirençlilik seviyesi bulunmasına rağmen (Takala *et al.* 2004, Koponen *et al.* 2004) yüksek konsantrasyondaki nisin, üretici hücreler üzerinde inhibe edici rol oynayabilmektedir. Fermentasyonun geç evresinde nisin üretim miktarının hızla azalması, ortamda biriken yüksek konsantrasyondaki nisinin hücreleri inhibe ettiği ve ortama salınan proteazların da nisin peptidini parçaladığı varsayımı ile açıklanmaktadır (de Vuyst and Vandamme 1992, Matsusaki *et al.* 1996, Hull and Gibbons 1997, Kim *et al.* 1997b). Bu çalışmada dirençlilik genlerinin kopya sayılarının artırıldığı LAC340 ve LAC338 suşlarında, fermentasyonun geç evresinde nisin üretim kaybının doğal suşa kıyasla kısmen önlenebilmesi, dirençlilik genlerinin bu evrede fonksiyonel olduğunu göstermektedir. Bu nedenle nisin veriminin artırılmasına yönelik klonlama çalışmalarında, rekombinantlarda regülasyon genleriyle birlikte, dirençlilik genlerinin de bulunması önem taşımaktadır. Araştırmamızda geliştirilen regülasyon ve

dirençlilik genlerinin birlikte klonlandığı LAC340 rekombinantı, bu özelliği ile kesikli fermentasyon sistemlerinde yüksek nisin üretimi için önemli bir suş olarak öne çıkmaktadır.

LAC338, LAC339 ve LAC340 suşlarının içerdiği rekombinant plazmidlerin (pLEB672 pLEB673 ve pLEB674) stabiliteleeri; kesikli fermentasyonun 6. 9. 12. 18., 24. ve 30. saatlerinin tümünde % 90'nın üzerinde bulundu (Şekil 4.14). Ancak pLEB674 rekombinant plazmidinin, pLEB673 ve pLEB672 plazmidlerine göre daha yüksek stabiliteye sahip olduğu tespit edildi. Bu sonuçlar fermentasyon sürecinde bu plazmidleri içeren suşların kontrol suş LL27'ye göre daha yüksek nisin üretim yeteneği içermesi ile paralellik gösterdi. Nisin biyosentezinin regülasyonunda, nisin molekülü NisK proteini ile interaksiyona girmekte ve NisR aktive edilmektedir. Aktive edilen NisR ise *nisA* ve *nisF* genlerinin önünde bulunan promotorları uyararak nisin biyosentezi gerçekleştirilmektedir (Kuipers *et al.* 1993, Engelke *et al.* 1994). Diğer taraftan ortamda bulunan nisin hücre duvar yapısı içerisinde bulunan lipit II moleküllerine bağlanmakta ve nisin dirençlilik sistemini indüklemektedir (Koponen *et al.* 2004). Dolayısıyla rekombinant plazmidlerde yüksek stabilite oranlarının bulunması, bu plazmidlerin regülasyon ve dirençlilikten sorumlu genleri bulundurması ve fermentasyon ortamında biriken nisinin seçici bir ortam oluşturması ile açıklanabilir.



Şekil 4.14 *L. lactis* LAC338, LAC339 ve LAC340 suşlarının içerdiği rekombinant plazmidlerin (pLEB672, pLEB673, pLEB674) pH kontrollü kesikli fermentasyonun farklı zamanlarındaki stabilitesi

4.4 Sürekli Nisin Üretimi

Sürekli sistemde nisin üretimini hedef alan çalışmaların birçoğunda, dilüsyon oranı ve karbon kaynağı nisin üretimini etkileyen en önemli iki faktör olarak tanımlanmış ve bu bulgular istatistiki modeller ile desteklenmiştir (Amiali *et al.* 1998, Desjardins *et al.* 2001, Li *et al.* 2002, Liu *et al.* 2005). Bu tez çalışmasında da söz konusu faktörlerin sürekli sistemlerdeki etkinliği araştırıldı. Sürekli nisin üretimi için LL27 doğal suşu ve rekombinantları önce kesikli sistemde üssel fazın ortasına kadar (7 saat) geliştirildi ve ardından fermentörün besleme ve tahliye pompaları açılarak sürekli sisteme geçildi. Denenen suşların sürekli sistemde nisin üretim ve hücresel gelişim davranışlarının belirlenebilmesi için, farklı dilüsyon oranları (0.1, 0.2, 0.3, 0.4 ve 0.5) ve fruktoz konsantrasyonları (7.5, 12.5, 15.0, 17.5 ve 20.0 g L⁻¹) ile çalışıldı.

4.4.1 Sürekli sistemde farklı dilüsyon oranlarının nisin üretimi üzerine etkisi

LL27 doğal suşu ve rekombinantları (LAC338, LAC339, LAC340) kullanılarak gerçekleştirilen sürekli fermentasyon sisteminde, aynı dilüsyon oranlarında her bir suş için benzer biyokütle oluşumları tespit edildi. Tüm suşlarda en yüksek biyokütle oluşumu 0.2 dilüsyon oranında meydana gelirken, dilüsyon oranının artırılmasıyla biyokütle oluşumunda düşüş saptandı (Çizelge 4.5, 4.6, 4.7 ve 4.8). LL27, LAC338, LAC339 ve LAC340 suşlarının biyokütle oluşumu; 0.1 dilüsyon oranında 2.14-2.31 mg mL⁻¹, 0.2 dilüsyon oranında 2.56-2.79 mg mL⁻¹, 0.3 dilüsyon oranında 2.48-2.55 mg mL⁻¹, 0.4 dilüsyon oranında 1.98-2.22 mg mL⁻¹, 0.5 dilüsyon oranında 1.67-1.92 mg mL⁻¹ arasında belirlendi. 0.1 ve 0.2 dilüsyon oranlarında ortamda bulunan 10 g L⁻¹ fruktozun tamamı suşlar tarafından tüketildi. Ancak dilüsyon oranının artışı ile ters orantılı olarak şeker tüketim miktarında düşüş meydana geldiği belirlendi (Çizelge 4.5, 4.6, 4.7 ve 4.8). Tüketilen mg fruktoz başına oluşan biyokütle verimi ($Y_{biyokütle/fruktoz}$) en fazla 0.2 dilüsyon oranında tespit edilirken, en düşük $Y_{biyokütle/fruktoz}$ 0.1 dilüsyon oranında belirlendi. Diğer dilüsyon oranlarında ise 0.24 ile 0.26 arasında değişen benzer verimler elde edildi. Bu sonuç, kullanılan şeker konsantrasyonunda en yüksek biyokütle miktarına ulaşabilmek için 0.2-0.3 arasındaki dilüsyon oranlarının optimum olduğuna işaret etti.

Farklı dilüsyon oranlarının kullanılmasıyla doğal (LL27) ve rekombinant suşlarda (LAC338, LAC339, LAC340) benzer nisin üretim eğilimi belirlendi (Çizelge 4.5, 4.6, 4.7

ve 4.8). Dilüsyon oranının 0.1'den 0.2'ye yükseltilmesi sonucu suşlarda nisin üretimi maksimum seviyesine ulaşırken, 0.2 dilüsyon oranından sonra nisin üretim miktarlarında hızlı düşüşler meydana geldi. 0.2 dilüsyon oranında en yüksek nisin üretimi (2150 IU mL⁻¹) LAC339 suşunda meydana gelirken, bu suşu LAC340 (1940 IU mL⁻¹), LAC338 (1730 IU mL⁻¹) ve LL27 (1720 IU mL⁻¹) suşları takip etti. Ayrıca birim fruktoz ve biyokütle başına suşların nisin üretim verimleri ($Y_{nisin/fruktoz}$, $Y_{nisin/biyokütle}$) de en yüksek 0.2 dilüsyon oranında tespit edildi. Ancak 0.3 dilüsyon oranında üretilen hacimsel nisin miktarı 0.2 dilüsyon oranındaki nisin miktarından düşük olmasına rağmen, 0.3 dilüsyon oranı, bir saatteki nisin üretim miktarı bakımından tüm suşlarda daha yüksek bulundu (Çizelge 4.5, 4.6, 4.7 ve 4.8). Bu sonuç, 0.3 dilüsyon oranında fermentasyon ortamında biriken metabolitlerin yıkama etkisiyle daha fazla uzaklaştırıldığına ve suşların aktif nisin üretim fazında kaldığına işaret etmektedir. Her ne kadar 0.3 dilüsyon oranı saatte nisin üretim miktarı bakımından yüksek bir verim gösterse de, hacimsel olarak ve diğer verimler bakımından 0.2 dilüsyon oranında daha yüksek değerlere ulaşılması, 0.2 dilüsyon oranının yüksek nisin üretimi açısından daha verimli olduğuna işaret etmektedir.

Nisin regülasyon ve dirençlilik genleri kopya sayılarının artırıldığı rekombinant suşların nisin üretim seviyeleri, farklı akım hızları kullanılarak gerçekleştirilen sürekli fermentasyonda kontrol suş LL27 ile karşılaştırıldığında; rekombinant suşların, düşük dilüsyon oranlarında daha yüksek hacimsel nisin üretebildikleri tespit edildi (Şekil 4.15). Benzer davranış, suşların bir saatteki nisin üretim miktarları için de geçerli bulundu (Şekil 4.16). Özellikle regülasyon genlerini içeren LAC339 ve LAC340 suşlarının; 0.1, 0.2 ve 0.3 dilüsyon oranlarında, LL27 suşundan sırasıyla %59, %25, %18 ve %64, %13, %15 daha fazla nisin üretebildikleri tespit edildi. Dilüsyon oranlarının 0.4 ve 0.5'e çıkarılması sonucu ise bu farklanma ortadan kalkmıştır. Bu bulgular regülasyon ve dirençlilikten sorumlu genlerin nisin üretici hücrede kopya sayılarının artırılmasının, düşük dilüsyon oranları için daha fazla fonksiyonel olduğunu göstermektedir. Ayrıca LL27 doğal suşunun özgül nisin üretim oranını 0.4 dilüsyon oranına kadar artış gösterirken rekombinant suşlarda artış 0.3 dilüsyon oranına kadar gerçekleşmiştir. Bu durum da yukarıdaki öngörüğü desteklemektedir (Çizelge 4.5, 4.6, 4.7 ve 4.8).

Çizelge 4.5 Sürekli fermentasyon sisteminde denenen farklı dilüsyon oranlarında *L. lactis* LL27 suşunun gelişim ve nisin üretim düzeyleri

	Dilüsyon Oranı (h⁻¹)				
	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
Nisin üretimi (IU mL ⁻¹)	1020	1720	1230	750	260
Biyokütle oluşumu (mg mL ⁻¹)	2.29	2.79	2.55	1.98	1.67
Fruktoz kullanımı (mg mL ⁻¹)	9.98	9.99	9.85	8.04	6.96
$Y_{biyokütle/fruktoz}$ (mg biyokütle mg fruktoz ⁻¹)	0.23	0.28	0.26	0.25	0.24
$Y_{nisin/fruktoz}$ (IU mg fruktoz ⁻¹)	102.20	172.17	124.87	93.28	37.35
$Y_{nisin/biyokütle}$ (IU mg biyokütle ⁻¹)	445.41	616.48	482.35	378.78	155.68
Nisin üretim verimi (IU mL ⁻¹ h ⁻¹)	102	344	369	300	130
Özgül nisin üretimi (IU mg ⁻¹ h ⁻¹)	44.54	123.29	144.70	151.51	77.84

Çizelge 4.6 Sürekli fermentasyon sisteminde denenen farklı dilüsyon oranlarında *L. lactis* LAC338 suşunun gelişim ve nisin üretim düzeyleri

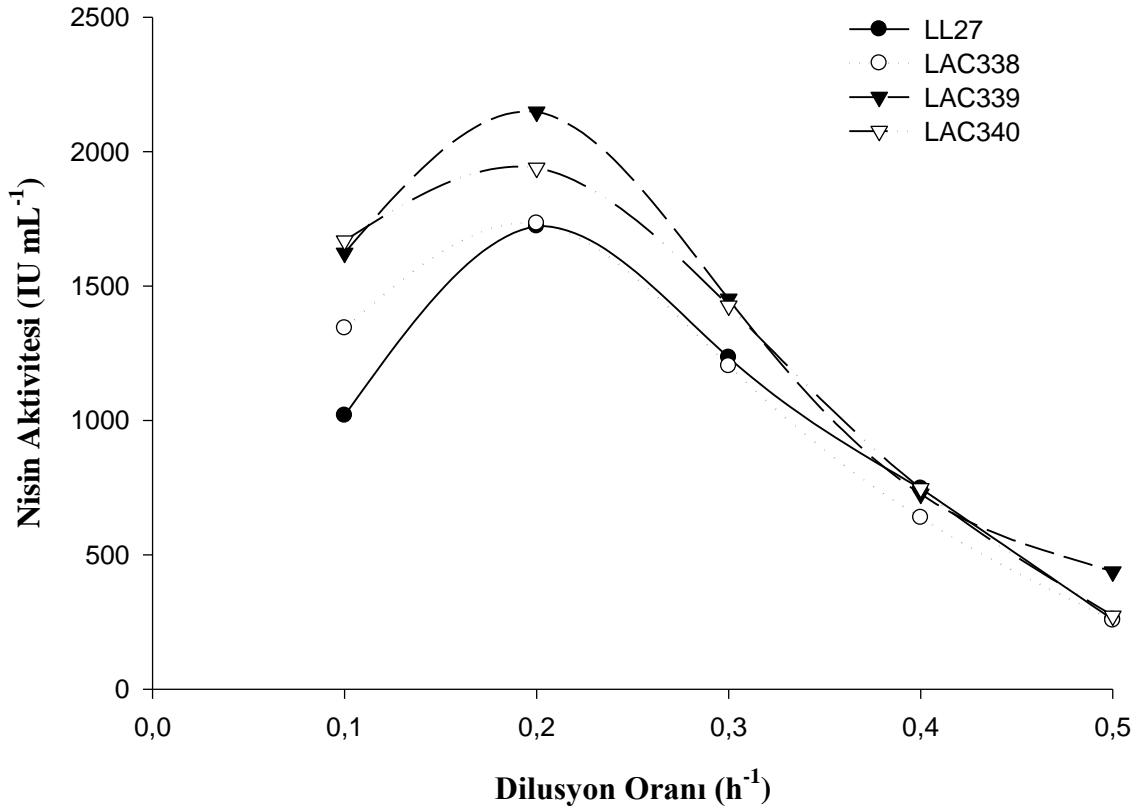
	Dilüsyon Oranı (h ⁻¹)				
	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
Nisin üretimi (IU mL ⁻¹)	1340	1730	1200	640	260
Biyokütle oluşumu (mg mL ⁻¹)	2.14	2.56	2.48	2.09	1,92
Fruktoz kullanımı (mg mL ⁻¹)	9.99	9.99	9.75	8.24	7.02
$Y_{biyokütle/fruktoz}$ (mg biyokütle mg fruktoz ⁻¹)	0.21	0.26	0.25	0.25	0.26
$Y_{nisin/fruktoz}$ (IU mg fruktoz ⁻¹)	134.13	173.17	123.07	77.66	37.03
$Y_{nisin/biyokütle}$ (IU mg biyokütle ⁻¹)	626.16	675.78	483.87	306.22	135.41
Nisin üretim verimi (IU mL ⁻¹ h ⁻¹)	134	346	360	256	130
Özgül nisin üretimi (IU mg ⁻¹ h ⁻¹)	62.61	135.16	145.16	122.48	67.70
Plazmid stabilitesi (%)	98.61	94.66	96.00	86.56	74.84

Çizelge 4.7 Sürekli fermentasyon sisteminde denenen farklı dilüsyon oranlarında *L. lactis* LAC339 suşunun gelişim ve nisin üretim düzeyleri

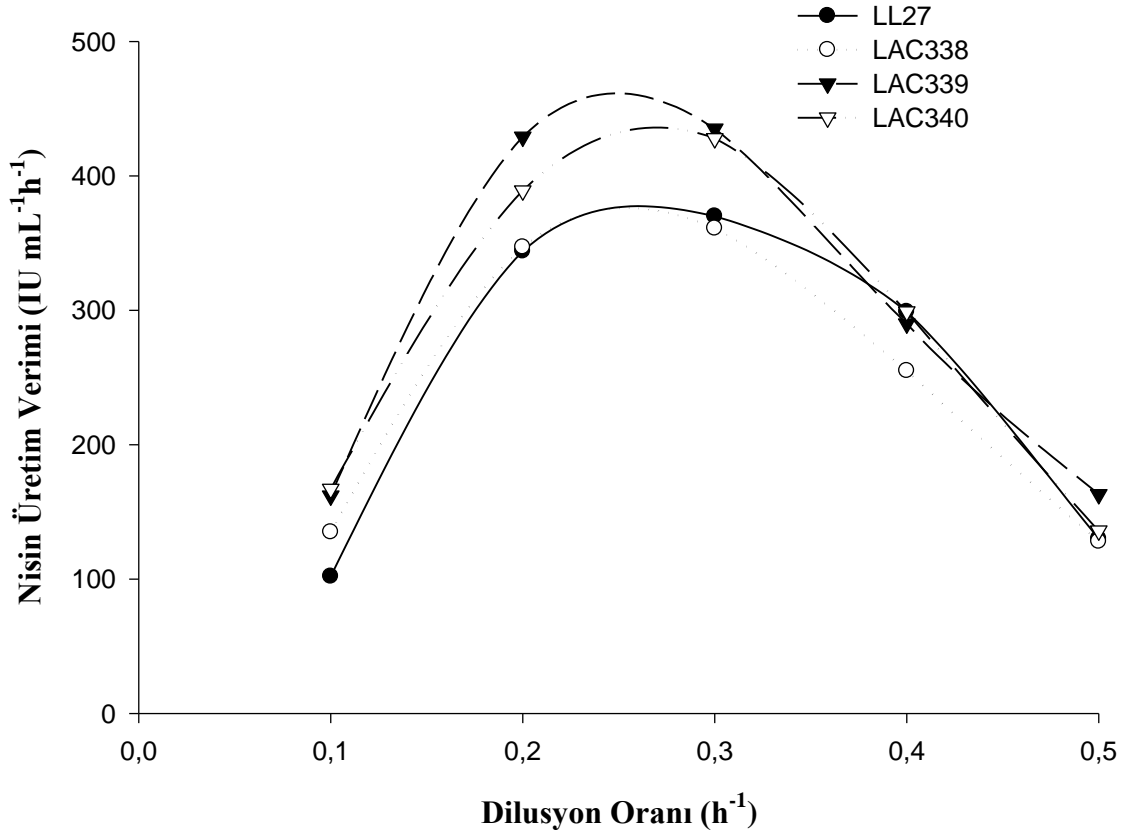
	Dilüsyon Oranı (h ⁻¹)				
	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
Nisin üretimi (IU mL ⁻¹)	1620	2150	1450	730	330
Biyokütle oluşumu (mg mL ⁻¹)	2.27	2.79	2.54	2.06	1.92
Fruktoz kullanımı (mg mL ⁻¹)	9.99	9.99	9.78	8.65	7.95
$Y_{biyokütle/fruktoz}$ (mg biyokütle mg fruktoz ⁻¹)	0.23	0.28	0.26	0.24	0.24
$Y_{nisin/fruktoz}$ (IU mg fruktoz ⁻¹)	162.16	215.21	148.26	84.39	41.50
$Y_{nisin/biyokütle}$ (IU mg biyokütle ⁻¹)	713.65	770.60	570.86	354.36	171.87
Nisin üretim verimi (IU mL ⁻¹ h ⁻¹)	162	430	435	292	165
Özgül nisin üretimi (IU mg ⁻¹ h ⁻¹)	71.36	154.12	171.25	141.74	85.93
Plazmid stabilitesi (%)	98.13	98.66	83.66	78.86	55.33

Çizelge 4.8 Sürekli fermentasyon sisteminde denenen farklı dilüsyon oranlarında *L. lactis* LAC340 suşunun gelişim ve nisin üretim düzeyleri

	Dilüsyon Oranı (h⁻¹)				
	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
Nisin üretimi (IU mL ⁻¹)	1670	1940	1430	750	270
Biyokütle oluşumu (mg mL ⁻¹)	2.31	2.78	2.49	2.22	1.62
Fruktoz kullanımı (mg mL ⁻¹)	9.99	9.99	9.68	8.61	6.95
$Y_{biyokütle/fruktoz}$ (mg biyokütle mg fruktoz ⁻¹)	0.23	0.28	0.26	0.25	0.23
$Y_{nisin/fruktoz}$ (IU mg ⁻¹)	167.16	194.19	147.72	87.10	38.84
$Y_{nisin/biyokütle}$ (IU mg ⁻¹)	722.94	697.84	574.29	337.83	166.66
Nisin üretim verimi (IU mL ⁻¹ h ⁻¹)	167	388	429	300	135
Özgül nisin üretimi (IU mg ⁻¹ h ⁻¹)	72.29	139.56	172.28	135.13	83.33
Plazmid stabilitesi (%)	93.33	85.33	82.66	89.33	92.00



Şekil 4.15 Sürekli fermentasyon sisteminde denenen farklı dilüsyon oranlarında *L. lactis* LL27 doğal suşu ve rekombinantlarının (LAC338, LAC339, LAC340) nisin üretim karakteristikleri



Şekil 4.16 Sürekli fermentasyon sisteminde denenilen farklı dilüsyon oranlarında *L. lactis* LL27 doğal suşu ve rekombinantlarının (LAC338, LAC339, LAC340) saat başına nisin üretim karakteristikleri

4.4.2 Sürekli sistemde farklı fruktoz konsantrasyonlarının nisin üretimi üzerine etkisi

Farklı fruktoz konsantrasyonlarının (7.5 g L^{-1} , 10.0 g L^{-1} , 12.5 g L^{-1} , 15.0 g L^{-1} , 17.5 g L^{-1} ve 20 g L^{-1}) sürekli fermentasyonda doğal ve rekombinant suşların nisin üretimi üzerine etkisinin ve optimum fruktoz konsantrasyonunun belirlenmesinde, en yüksek hacimsel nisin üretim veriminin alındığı 0.2 dilüsyon oranı kullanıldı. Tüm suşların biyokütle oluşumu, denenilen fruktoz konsantrasyonlarında benzer bulundu. Fruktoz konsantrasyonunun 7.5 g L^{-1} den 12.5 g L^{-1} 'ye çıkarılması ile tüm suşlarda biyokütle oluşumu artarken, konsantrasyonun 15 g L^{-1} , 17.5 g L^{-1} ve 20 g L^{-1} 'ye çıkarılması durumunda hücrelerin biyokütle oluşumunda düşüşler meydana geldi. En yüksek biyokütle oluşumu ise 12.5 g L^{-1} fruktoz konsantrasyonunda tespit edildi. 7.5 g L^{-1} , 10.0 g L^{-1} , 12.5 g L^{-1} , 15.0 g L^{-1} , 17.5 g L^{-1} ve 20 g L^{-1} fruktoz konsantrasyonlarının kullanılmasıyla; LL27, LAC338, LAC339 ve LAC340 suşlarında sırasıyla $1.92\text{-}2.81 \text{ mg mL}^{-1}$, $2.02\text{-}2.81 \text{ mg mL}^{-1}$, $2.07\text{-}2.83 \text{ mg mL}^{-1}$ ve $2.01\text{-}2.83 \text{ mg mL}^{-1}$ değerleri arasında biyokütle oluşumu belirlendi (Çizelge 4.9, 4.10, 4.11, 4.12). 7.5 g L^{-1} ve 10.0 g L^{-1} olarak ilave edilen fruktoz suşlar tarafından tamamen tüketilirken, bu konsantrasyonun artırılmasıyla birlikte tüketim oranı azaldı. Suşların fruktoz başına biyokütle oluşum verimi ($Y_{\text{biyokütle/fruktoz}}$) incelendiğinde; düşük fruktoz konsantrasyonlarında alınan yüksek verimin, yüksek fruktoz konsantrasyonlarında düşmesi, belirli oranın üzerindeki fruktozun hücre gelişimini inhibe edici rolüne işaret etmiştir.

LL27 doğal suşu ve rekombinantları denenilen tüm fruktoz konsantrasyonlarında benzer nisin üretim eğrisi gösterdi. Fruktoz konsantrasyonunun 7.5 g L^{-1} 'den 12.5 g L^{-1} 'ye artırılması sonucu tüm suşlarda nisin üretim seviyesi artarken, konsantrasyonun 15.0 g L^{-1} , 17.5 g L^{-1} ve 20.0 g L^{-1} 'ye çıkarılması halinde nisin üretim seviyesinde düşüşler tespit edildi. Tüm suşlarda en yüksek nisin üretim miktarı 12.5 g L^{-1} fruktoz oranında belirlendi. Bu konsantrasyon oranında LL27, LAC338, LAC339 ve LAC340 suşlarında nisin aktivitesi; sırasıyla 1890 IU mL^{-1} , 1950 IU mL^{-1} , 2250 IU mL^{-1} ve 2130 IU mL^{-1} olarak ölçüldü. Ayrıca oluşan birim biyokütle başına üretilen nisin veriminin ($Y_{\text{nisin/biyokütle}}$), nisin üretim veriminin ve de özgül nisin üretim oranının da bu konsantrasyonda yüksek bulunması, 12.5 g L^{-1} konsantrasyonunun optimum değer olduğuna işaret etti.

Rekombinant suşların, sürekli sistemde farklı fruktoz konsantrasyonlarının kullanılması durumunda hacimsel ve saatteki nisin üretim miktarlarının karşılaştırılması Şekil 4.17 ve

Şekil 4.18’de verilmiştir. Buna göre dirençlilik ve regülasyon genlerinin kopya sayılarının artırıldığı rekombinant suşların tüm şeker konsantrasyonlarında doğal suş LL27’ye göre daha fazla nisin ürettiği belirlendi. LAC339 suşu 15.0 g L^{-1} haricindeki diğer konsantrasyonlarda daha yüksek nisin üretim yeteneği gösterdi. Ayrıca tüm suşlarda, 12.5 g L^{-1} fruktoz konsantrasyonundan sonra nisin üretim miktarında düşüşler tespit edildi. Ancak 15 g L^{-1} fruktoz konsantrasyonunda LAC340, diğer suşlara göre daha fazla nisin üretmiştir (Şekil 4.17 ve Şekil 4.18). Bu durum LAC340 rekombinantında regülasyon genleriyle birlikte dirençlilik genlerinin de bulunmasının, suşu ortamda biriken yüksek nisin miktarından kısmen koruduğuna işaret etmektedir. Rekombinantlar arasında LAC340’ın bu konsantrasyonda en yüksek özgül nisin üretim değerine ulaşması da bu varsayımı desteklemektedir.

Genel sonuç olarak, sürekli fermentasyon sisteminde farklı akım hızları ve şeker konsantrasyonlarının denenmesi neticesinde, 0.2 akım hızı ve 12.5 g L^{-1} fruktoz konsantrasyonu kombinasyonunun kullanılması durumunda en yüksek nisin üretimine ulaşılabileceği belirlendi. Diğer taraftan regülasyon ve dirençlilik gen kopya sayılarının artırıldığı rekombinant suşlarda düşük akım hızlarında nisin üretim oranının kontrol suşa göre daha fazla olduğu tespit edildi. Benzer şekilde rekombinant suşların düşük şeker konsantrasyonlarında daha verimli olduğu da saptandı. LL27 doğal suşunun ve rekombinantlarının kesikli ve sürekli sistemde elde edilen özgül nisin üretim oranları kıyaslandığında, sürekli fermentasyon sisteminde kesikli fermentasyon sistemine göre LL27 doğal suşunun ve rekombinantlarının (LAC338, LAC339 ve LAC340) özgül nisin oranları sırasıyla 9, 7, 9 ve 5 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir. Bu sonuç özellikle sürekli fermentasyon sisteminin ve ayrıca bu sistemde regülasyon gen kopya sayıları artırılmış suşun (LAC339) kullanımının daha verimli olduğuna işaret etmiştir.

Çizelge 4.9 Sürekli fermentasyon sisteminde denenen farklı fruktoz konsantrasyonlarında *L. lactis* LL27 suşunun gelişim ve nisin üretim düzeyleri

	Fruktoz Konsantrasyonu (g L⁻¹)					
	7.5	10.0	12.5	15.0	17.5	20.0
Nisin üretimi (IU mL ⁻¹)	910	1720	1890	1400	1070	1070
Biyokütle oluşumu (mg mL ⁻¹)	2.16	2.73	2.81	2.76	1.93	1.92
Fruktoz kullanımı (mg mL ⁻¹)	7.47	9.99	10.89	9.86	8.07	8.03
$Y_{biyokütle/fruktoz}$ (mg biyokütle mg fruktoz ⁻¹)	0.29	0.27	0.26	0.26	0.24	0.24
$Y_{nisin/fruktoz}$ (IU mg ⁻¹)	121.82	172.17	173.55	141.98	132.58	133.25
$Y_{nisin/biyokütle}$ (IU mg ⁻¹)	421.29	630.03	672.59	507.24	554.40	557.29
Nisin üretim verimi (IU mL ⁻¹ h ⁻¹)	182	344	378	280	214	214
Özgül nisin üretimi (IU mg ⁻¹ h ⁻¹)	84.25	126.00	134.51	101.45	110.88	111.46

Çizelge 4.10 Sürekli fermentasyon sisteminde denenen farklı fruktoz konsantrasyonlarında *L. lactis* LAC338 suşunun gelişim ve nisin üretim düzeyleri

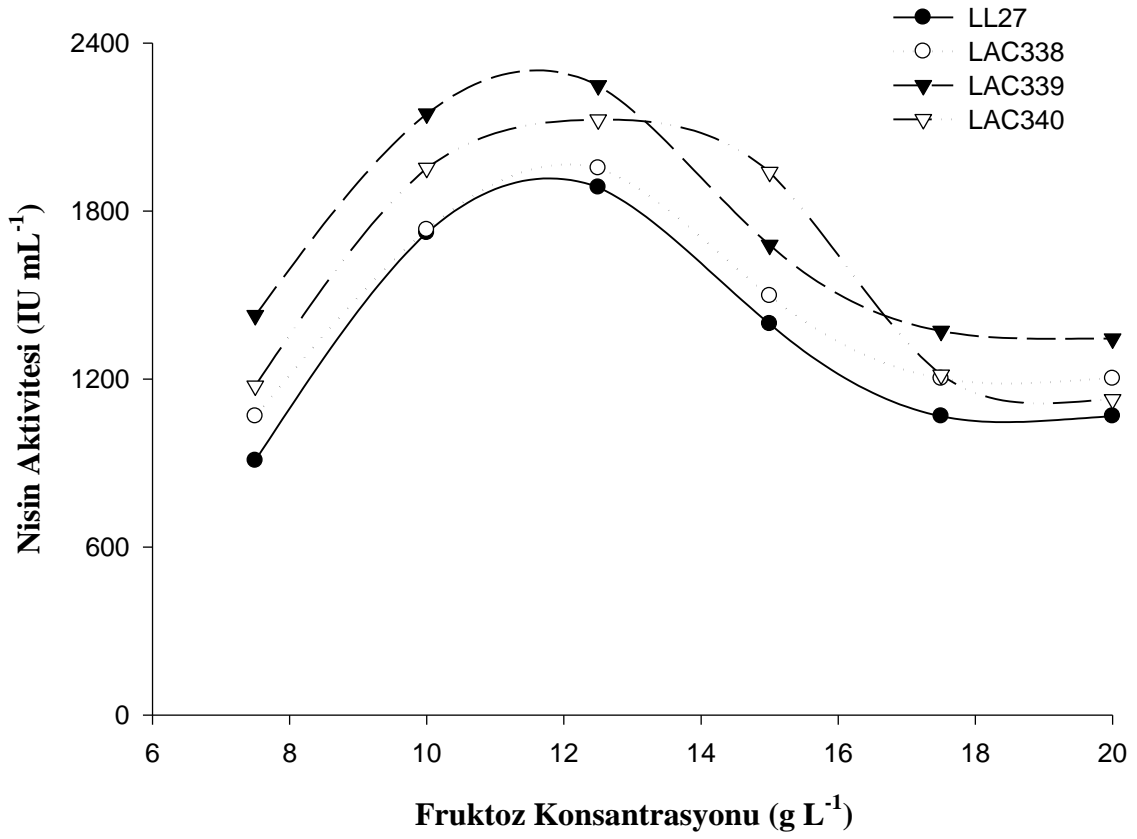
	Fruktoz Konsantrasyonu (g L⁻¹)					
	7.5	10.0	12.5	15.0	17.5	20.0
Nisin üretimi (IU mL ⁻¹)	1070	1730	1950	1500	1200	1200
Biyokütle oluşumu (mg mL ⁻¹)	2.11	2.63	2.81	2.56	2.03	2.02
Fruktoz kullanımı (mg mL ⁻¹)	7.47	9.99	11.15	10.13	8.23	8.48
$Y_{biyokütle/fruktoz}$ (mg biyokütle mg fruktoz ⁻¹)	0.28	0.26	0.25	0.25	0.24	0.24
$Y_{nisin/fruktoz}$ (IU mg ⁻¹)	143.23	173.17	174.88	148.07	145.81	141.50
$Y_{nisin/biyokütle}$ (IU mg ⁻¹)	507.11	657.79	693.95	585.94	591.13	594.06
Nisin üretim verimi (IU mL ⁻¹ h ⁻¹)	214	346	390	300	240	240
Özgül nisin üretimi (IU mg ⁻¹ h ⁻¹)	101.42	131.56	138.79	117.18	118.22	118.81
Plazmid stabilitesi (%)	92.28	96.81	93.63	95.00	90.46	93.63

Çizelge 4.11 Sürekli fermentasyon sisteminde denenen farklı fruktoz konsantrasyonlarında *L. lactis* LAC339 suşunun gelişim ve nisin üretim düzeyleri

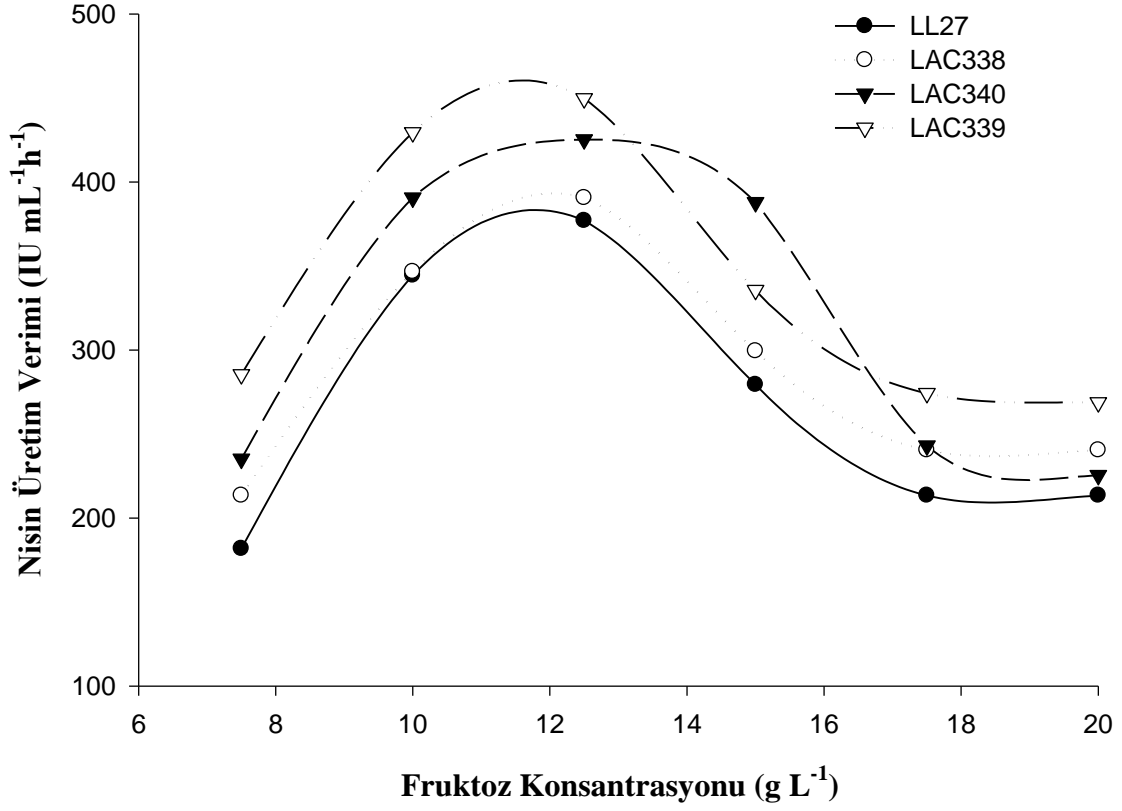
	Fruktoz Konsantrasyonu (g L ⁻¹)					
	7.5	10.0	12.5	15.0	17.5	20.0
Nisin üretimi (IU mL ⁻¹)	1430	2150	2250	1680	1370	1340
Biyokütle oluşumu (mg mL ⁻¹)	2.18	2.73	2.83	2.75	2.11	2.07
Fruktoz kullanımı (mg mL ⁻¹)	7.49	9.99	11.40	10.65	9.06	8.58
$Y_{biyokütle/fruktoz}$ (mg biyokütle mg fruktoz ⁻¹)	0.29	0.27	0.25	0.26	0.23	0.24
$Y_{nisin/fruktoz}$ (IU mg ⁻¹)	190.92	215.21	197.36	157.74	151.21	156.17
$Y_{nisin/biyokütle}$ (IU mg ⁻¹)	655.96	787.55	795.05	610.90	649.28	647.34
Nisin üretim verimi (IU mL ⁻¹ h ⁻¹)	286	430	450	336	274	268
Özgül nisin üretimi (IU mg ⁻¹ h ⁻¹)	131.19	157.51	159.01	122.18	129.85	129.47
Plazmid stabilitesi (%)	95.45	96.81	95.00	93.63	90.46	90.21

Çizelge 4.12 Sürekli fermentasyon sisteminde denenen farklı fruktoz konsantrasyonlarında *L. lactis* LAC340 suşunun gelişim ve nisin üretim düzeyleri

	Fruktoz Konsantrasyonu (g L ⁻¹)					
	7.5	10.0	12.5	15.0	17.5	20.0
Nisin üretimi (IU mL ⁻¹)	1180	1950	2130	1940	1220	1130
Biyokütle oluşumu (mg mL ⁻¹)	2.12	2.63	2.83	2.75	2.11	2.01
Fruktoz kullanımı (mg mL ⁻¹)	7.47	9.97	11.03	10.07	8.57	8.76
$Y_{\text{biyokütle/fruktoz}}$ (mg biyokütle mg fruktoz ⁻¹)	0.28	0.27	0.27	0.27	0.25	0.24
$Y_{\text{nisin/fruktoz}}$ (IU mg ⁻¹)	157.96	195.58	193.11	192.65	142.35	128.99
$Y_{\text{nisin/biyokütle}}$ (IU mg ⁻¹)	556.60	741.44	752.65	705.45	578.19	562.19
Nisin üretim verimi (IU mL ⁻¹ h ⁻¹)	236	390	426	388	244	226
Özgül nisin üretimi (IU mg ⁻¹ h ⁻¹)	111.32	148.28	150.53	141.09	115.63	112.43
Plazmid stabilitesi (%)	92.28	93.82	89.58	92.39	92.55	89.28



Şekil 4.17 Sürekli fermentasyon sisteminde denenilen farklı fruktoz konsantrasyonlarında *L. lactis* LL27 doğal suşu ve rekombinantlarının (LAC338, LAC339, LAC340) nisin üretim karakteristikleri



Şekil 4.18 Sürekli fermentasyonda denenilen farklı fruktoz konsantrasyonlarında *L. lactis* LL27 doğal suşu ve rekombinantlarının (LAC338, LAC339, LAC340) saat başına nisin üretim karakteristikleri

4.4.3 Sürekli nisin üretiminin cevap yüzey yöntemi ile optimizasyonu

Sürekli fermentasyon sisteminde LL27 doğal suş ve rekombinantların farklı dilüsyon oranlarında ve fruktoz konsantrasyonlarındaki nisin üretim düzeylerinin belirlenmesiyle elde edilen veriler, cevap yüzey yöntemi kullanılarak modellendi. Model analizinde bağımsız değişkenler olarak, dilüsyon oranı (X_1) ve fruktoz konsantrasyonu (X_2) kullanıldı. Ayrıca yüzey merkezli tasarım için 0.1-0.4 h⁻¹ dilüsyon oranlarında ve 7.5-15.0 g L⁻¹ fruktoz konsantrasyonlarındaki nisin üretim verimlilik değerleri analize dahil edildi. Dolayısıyla 10 noktada (8 farklı kombinasyon ve merkezde 2 tekrar) analiz gerçekleştirildi.

Varyans analizi neticesinde LL27 doğal suşunda R^2 değeri 0.985, LAC338, LAC339, ve LAC340 rekombinantlarında ise sırasıyla 0.986, 0.987 ve 0.998 olarak tespit edildi. Bu sonuç, cevap yüzey modelinin sürekli fermentasyon sisteminde alınan nisin üretim verimi miktarları için uyumlu olduğunu gösterdi. F -testinin, regresyon için % 5 düzeyinde ($p < 0.05$) anlamlı bulunması, değişkenlerin nisin üretim verimi üzerindeki etkilerinin bu model ile açıklanabileceğini gösterdi. Ayrıca tüm suşlardaki nisin üretim verimi ve model arasındaki uyum eksikliğinin % 5 önem derecesinde önemsiz olduğu ($p > 0.05$) bulundu. Bu durum deneysel verilerin model ile oluşturduğu uyumu destekledi.

LL27 doğal suş ve rekombinant LAC338, LAC339 ve LAC340 suşlarının farklı dilüsyon oranları ve fruktoz konsantrasyonlarındaki nisin üretim verimi değerleri kullanılarak yapılan çok yönlü regresyon analizleri neticesinde, nisin üretim verimini ifade eden aşağıdaki ikinci derece polinom eşitlikler elde edildi:

$$Y_{LL27} = -1636.34 + 4731.38X_1 + 233.14X_2 - 8261.25X_1^2 - 9.75X_2^2 \quad (1)$$

$$Y_{LAC338} = -1394.35 + 4543.82X_1 + 199.40X_2 - 8368.30X_1^2 - 8.30X_2^2 \quad (2)$$

$$Y_{LAC339} = -1611.53 + 5750.20X_1 + 231.53X_2 - 10757.40X_1^2 - 10.01X_2^2 \quad (3)$$

$$Y_{LAC340} = -1397.19 + 4785.74X_1 + 195.39X_2 - 8696.82X_1^2 - 7.81X_2^2 \quad (4)$$

Bu eşitliklerde X_1 dilüsyon oranını X_2 ise fruktoz konsantrasyonunu ifade etmektedir.

Çizelge 4.13'te görüldüğü gibi, LL27 doğal suşu ve rekombinantlarında nisin üretimi üzerine, dilüsyon oranı ve fruktoz konsantrasyonunun lineer bir etkisi bulunmaktadır ($p < 0.05$). Bu iki bağımsız değişkenden dilüsyon oranının yüksek regresyon katsayısına sahip olması, söz konusu faktörün fermentasyon sisteminde daha etkili olduğuna işaret etmektedir. Ayrıca bu faktörlerin model sistemde kuadratik etkisinin negatif yönlü olduğu belirlendi. Bu sonuç nisin üretim veriminin, bu iki değişkenin artışı ile bir seviyeye kadar yükseldiği ve daha yüksek dilüsyon oranı ve konsantrasyonlarda azaldığına işaret etti. Diğer taraftan bu iki bağımsız değişkenin birlikte etkisi anlamsız bulundu ($p > 0.05$). Bu nedenle eşitliklerde bu iki faktörün birlikte etkisi göz ardı edildi.

LL27 doğal suş ve rekombinantlarının nisin üretiminde optimum parametrelerin hesaplanması amacıyla yüzey merkezli tasarıma ait regresyon katsayıları kullanılarak 2 değişken için (dilüsyon oranı ve fruktoz konsantrasyonu) matris çözümlemesi yapıldı. Yapılan çözümleme sonucunda, optimum nisin üretim veriminin; LL27 doğal suşu için 0.29 h^{-1} dilüsyon oranı ve 11.95 g L^{-1} fruktoz konsantrasyonunda, LAC338, LAC339 ve LAC340 rekombinant suşları için ise sırasıyla 0.27 h^{-1} , 0.26 h^{-1} 0.27 h^{-1} dilüsyon oranlarında ve 12.01 g L^{-1} , 11.63 g L^{-1} ve 12.50 g L^{-1} fruktoz konsantrasyonlarında elde edilebileceği belirlendi. Bu optimum koşullarda LL27, LAC338, LAC339 ve LAC340 suşlarının model tarafından öngörülen nisin üretim verimi oranları, sırasıyla $434 \text{ IU mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$, $440 \text{ IU mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$, $496 \text{ IU mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ve $483 \text{ IU mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$ olarak hesaplandı. Elde edilen model verileri sürekli fermentasyon sisteminde farklı dilüsyon oranları ve fruktoz konsantrasyonundaki nisin üretim verimi değerlerini destekledi. Ayrıca bu sonuçlar, regülasyon ve dirençlilik genlerinin kopya sayılarının artırılması durumunda daha düşük dilüsyon oranında optimuma ulaşıldığını gösterdi. Bu durum özellikle nisinin kendi biyosentezinin regülasyonunda görev alması nedeniyle, ilave genlerin düşük dilüsyon oranlarında daha etkili olduğu hipotezini doğruladı.

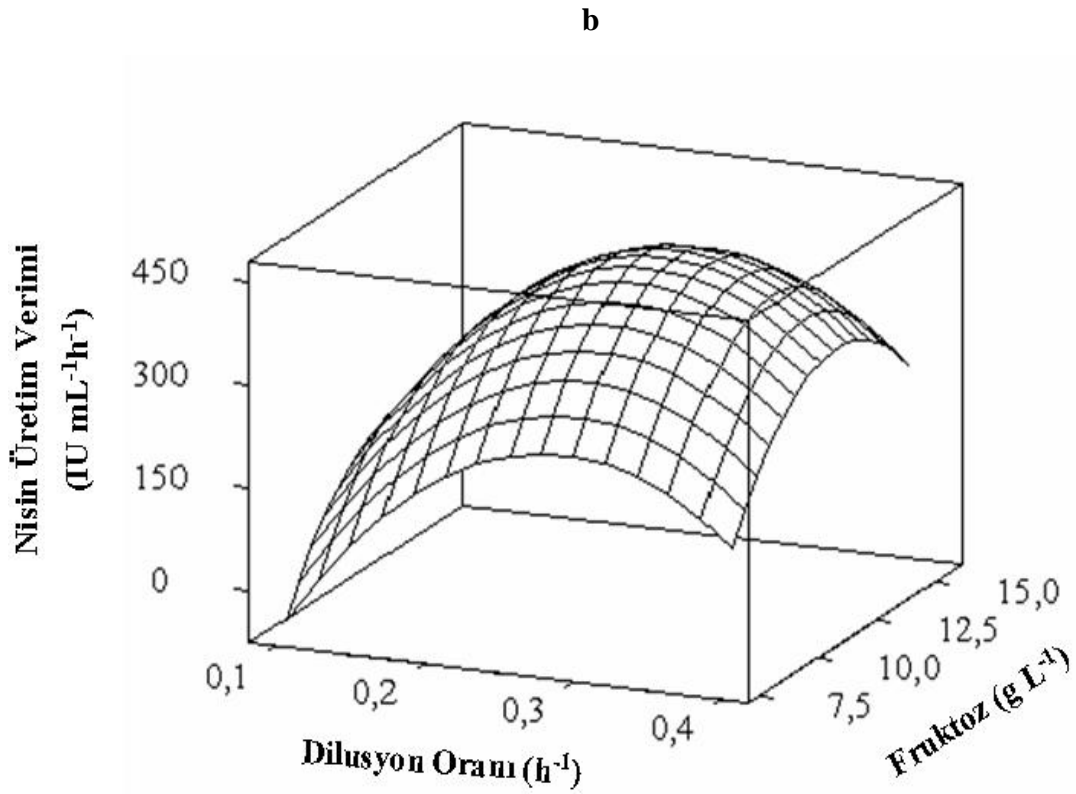
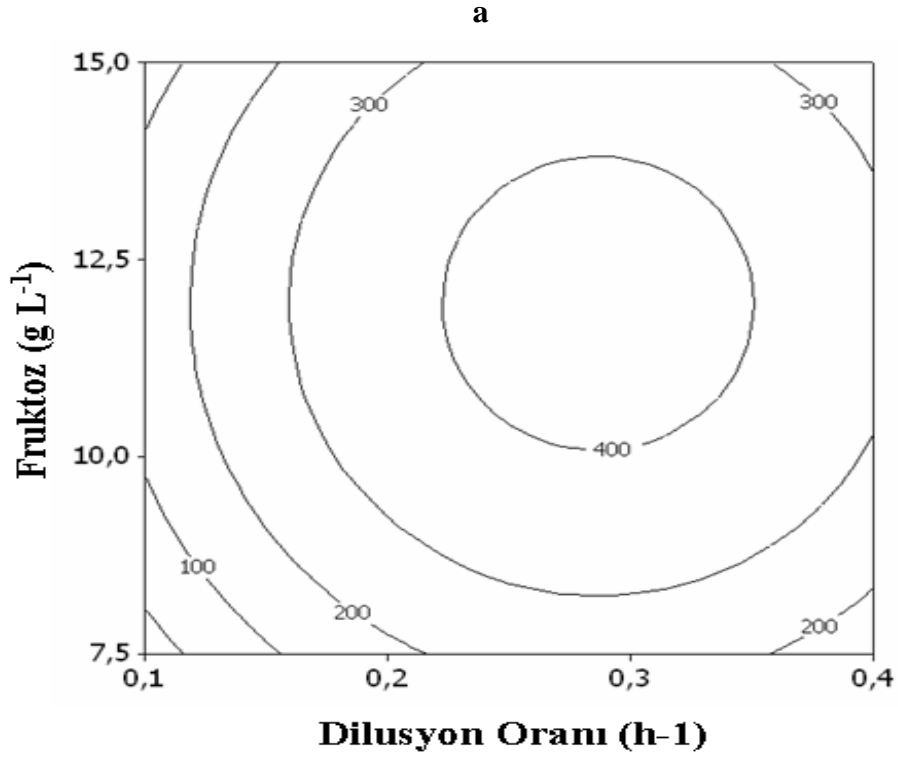
Çizelge 4.13 LL27 doğal suşu ve rekombinantlarının nisin üretim verimleri için istatistiksel regresyon ve ANOVA analiz sonuçları

Değişkenler	LL27			LAC338			LAC339			LAC340		
	Katsayı	<i>T</i>	<i>P</i>	Katsayı	<i>T</i>	<i>P</i>	Katsayı	<i>T</i>	<i>P</i>	Katsayı	<i>T</i>	<i>P</i>
Sabit	418.46	34.72	0.000	411.95	40.05	0.000	481.71	41.53	0.000	464.98	106.41	0.000
Dilüsyon	90.11	7.49	0.005	53.95	5.26	0.013	55.73	4.72	0.018	65.60	15.04	0.001
Fruktoz	51.26	4.26	0.024	47.85	4.66	0.019	23.79	2.01	0.038	73.48	16.85	0.000
Dilüsyon x Dilüsyon	-185.88	-10.24	0.002	-188.29	-12.15	0.001	-242.04	-13.58	0.001	-195.68	-29.74	0.000
Fruktoz x Fruktoz	-137.17	-7.56	0.005	-116.64	-7.53	0.005	-140.74	-7.89	0.004	-109.87	-16.70	0.000
	$R^2= 0.985, F= 49.14$			$R^2= 0.986, F= 53.08$			$R^2= 0.987, F= 55.72$			$R^2= 0.998, F=365.20$		

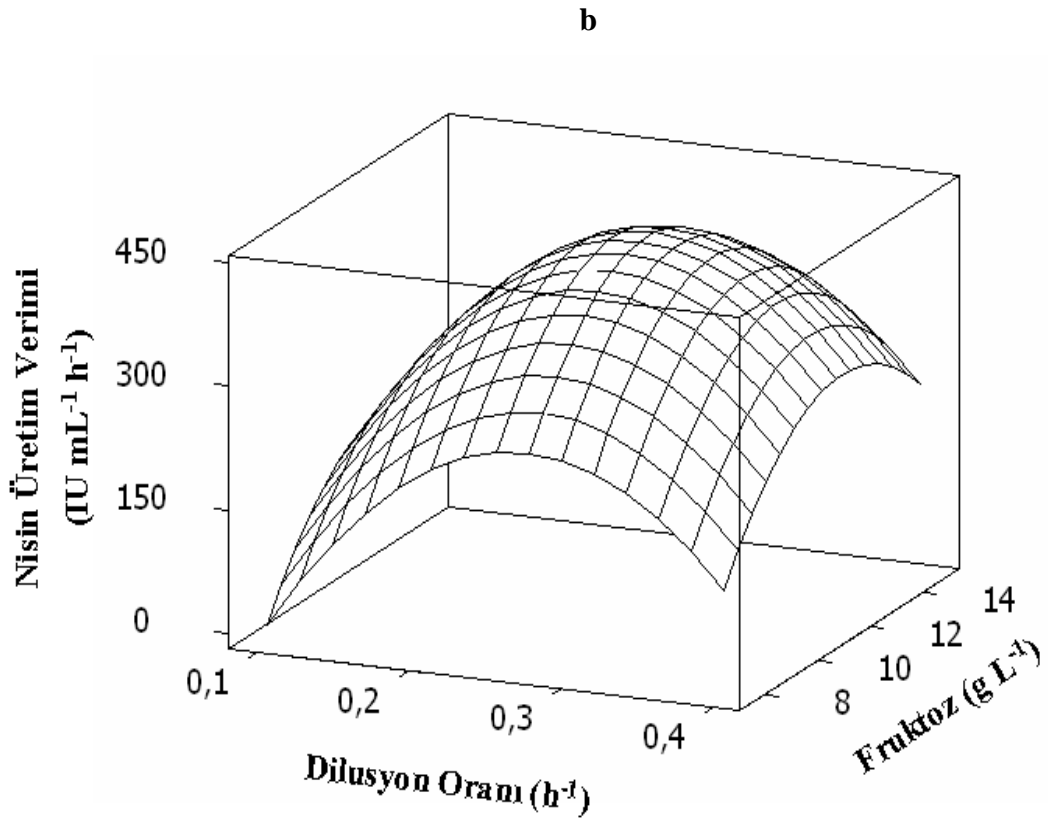
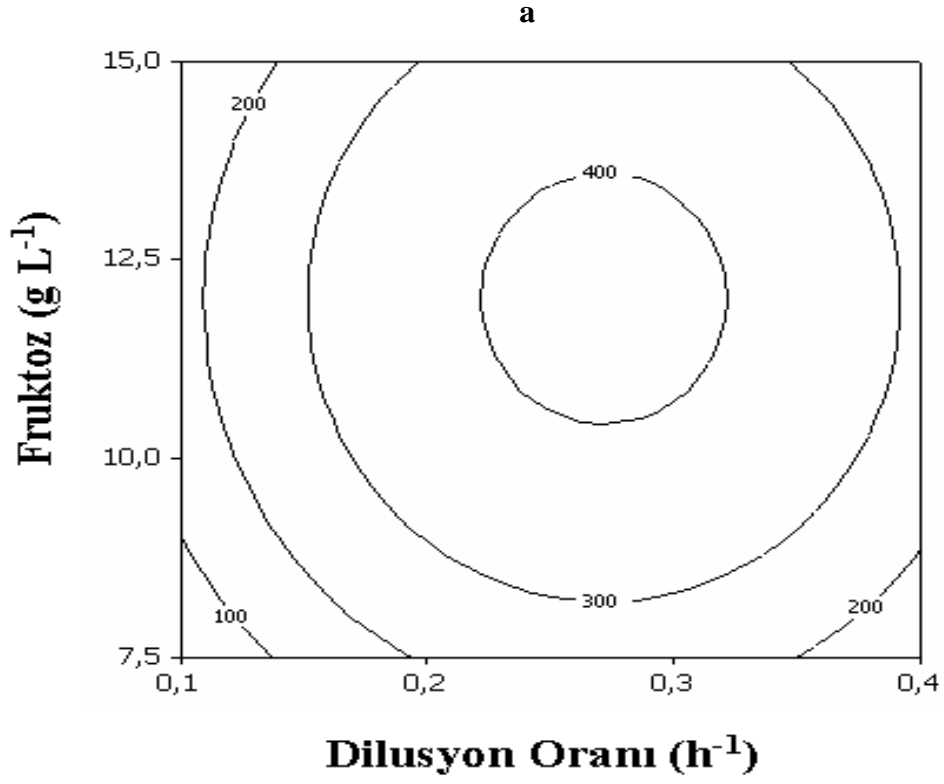
Suşların nisin üretim verimi değerleri ile oluşturulan model denklemlerine ait eşdeğer eğrileri ve yüzey grafikleri incelendiğinde; 400 IU mL⁻¹'den yüksek çalışma araklıklarının LL27 ve LAC338 suşlarında benzer büyüklükte olduğu (Şekil 4.19, Şekil 4.20), ancak LAC339 ve LAC340 suşlarında aynı verimin daha geniş dilüsyon oranı ve Şeker konsantrasyonlarında sağlanabildiği görülmektedir (Şekil 4.21, Şekil 4.22). Oluşan bu farklılık LAC339 ve LAC340 suşlarında bulunan ilave regüstasyon genlerinin fonksiyonun bir sonucudur. Bu analizler ayrıca, rekombinantların nisin verimliliği dikkate alındığında, regüstasyondan sorumlu genlerin, dirençlilikten sorumlu genlerden daha etkin olduğu sonucunu desteklemektedir.

Günümüzde gıda sistemlerinde koruyucu olarak nisinin kullanımını kısıtlayan en temel sorun nisin üretim maliyetinin çok yüksek olmasıdır (Takala and Saris 2007). Endüstriyel nisin üretiminde üretim ekonomisini olumsuz yönde etkileyen ana unsurlar, doğal suşların düşük düzeyde nisin üretmesi ve karbon kaynağının maliyetinin yüksek olmasıdır (Delves-Broughton *et al.* 1996, Cheigh and Pyun 2005, Takala and Saris 2007). Bu açıdan bakıldığında, regüstasyondan sorumlu genlerin kopya sayılarının artırıldığı LAC339 suşunun yüksek nisin üretim verimine (496 IU mL⁻¹) kontrol suş LL27'ye göre daha düşük dilüsyon oranı (0.26 h⁻¹) ve fruktoz konsantrasyonunda (11.63 g L⁻¹) ulaşması, bu suşu üretim ekonomisi bakımından oldukça önemli kılmaktadır. Nitekim söz konusu koşullarda sürekli üretim gerçekleştirildiğinde, LAC339 suşunun kontrol suş LL27'ye göre % 3 besiyeri tasarrufu sağlayarak % 14 daha fazla nisin üretim verimine ulaşılacağı tahmin edilmektedir.

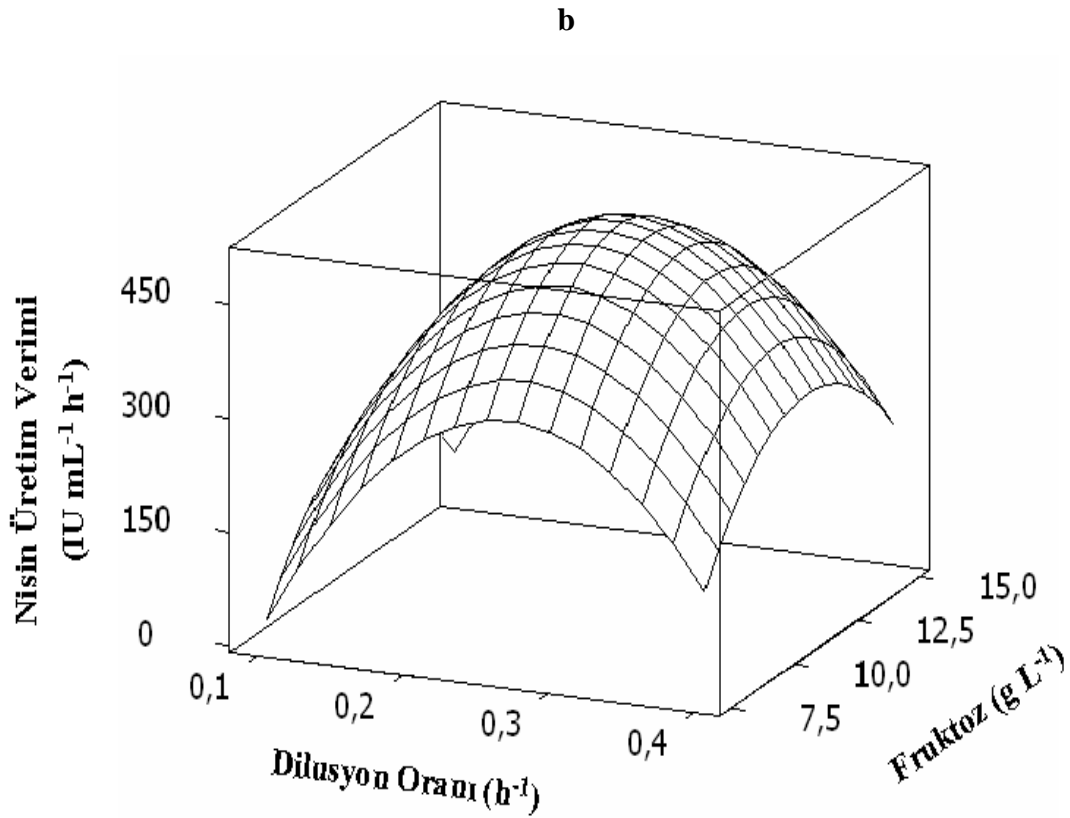
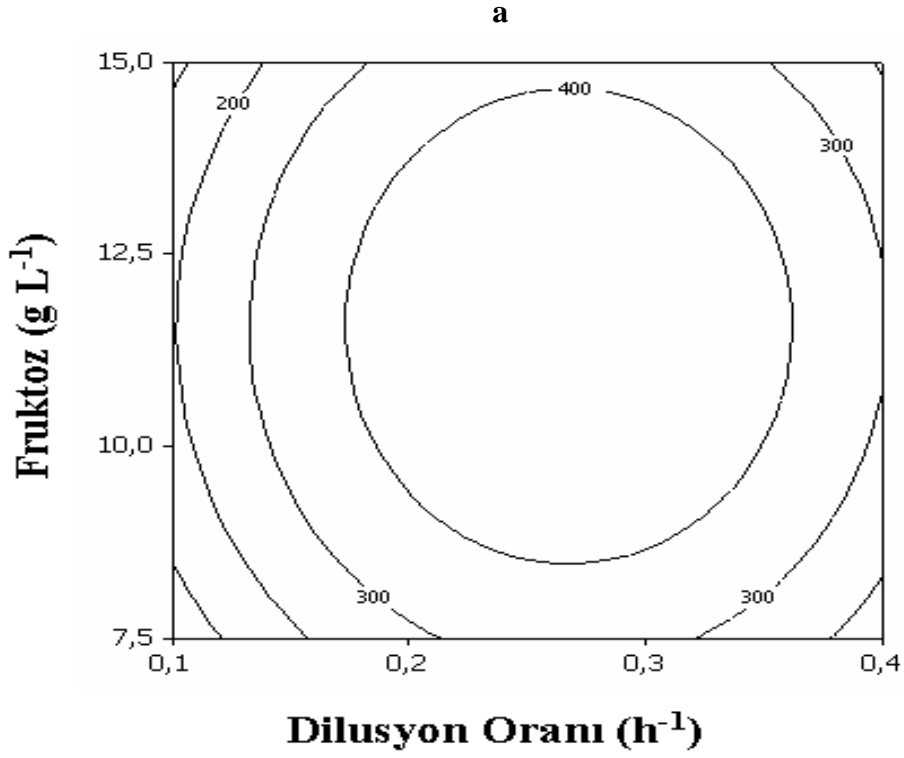
Cevap yüzey yöntemi, proseslerin geliştirilmesi ve optimizasyonu için gerekli istatistiksel ve matematiksel tekniklerin bir arada kullanıldığı bir yöntemdir. Bu yöntem ile belirli parametrelerin prosese olan etkileri incelenebilmekte ve parametrelerin optimum seviyeleri tespit edilebilmektedir (Myers and Montgomery 1995). Bugüne kadar yapılan çalışmalarda cevap yüzey yöntemi kullanılarak kesikli ve yarı kesikli fermentasyon sistemlerinde besiyeri kompozisyonun optimizasyonu çalışmaları gerçekleştirilmiştir (Li *et al.* 2002). Ancak nisin üretiminin sürekli fermentasyonda cevap yüzey yöntemi ile optimizasyonu çalışması mevcut değildir. Tez kapsamında sürekli fermentasyonda dilüsyon oranının ve fruktoz konsantrasyonunun cevap yüzey yönteminde yüksek uyumluluk değerlerinde optimize edilmesi, endüstriyel açıdan büyük önem taşımaktadır.



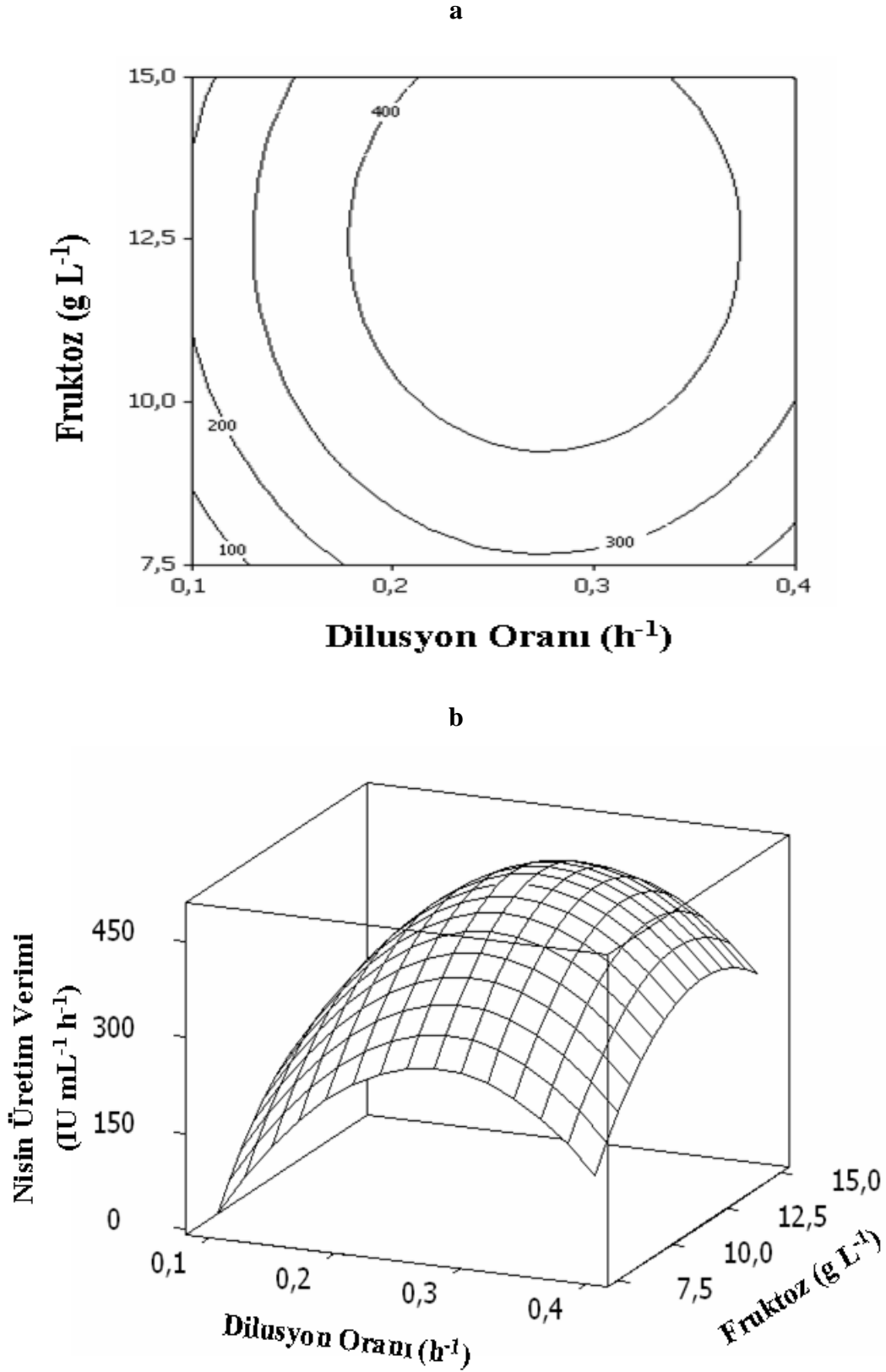
Şekil 4.19 *L. lactis* LL27 doğal süşunun farklı dilüsyon oranı ve fruktoz konsantrasyonlarındaki nisin üretim verimi değerleri kullanılarak oluşturulan model denkleminde ait eşdeğer eğrisi (a) ve yüzey grafiği (b)



Şekil 4.20 *L. lactis* LAC338 suşunun farklı dilüsyon oranı ve fruktoz konsantrasyonlarındaki nisin üretim verimi değerleri kullanılarak oluşturulan model denkleminin eşdeğer eğrisi (a) ve yüzey grafiği (b)



Şekil 4.21 *L. lactis* LAC339 suşunun farklı dilüsyon oranı ve fruktoz konsantrasyonlarındaki nisin üretim verimi değerleri kullanılarak oluşturulan model denkleminin eşdeğer eğrisi (a) ve yüzey grafiği (b)



Şekil 4.22 *L. lactis* LAC340 suşunun farklı dilüsyon oranı ve fruktoz konsantrasyonlarındaki nisin üretim verimi değerleri kullanılarak oluşturulan model denkleminin eşdeğer eğrisi (a) ve yüzey grafiği (b)

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında; nisin üreticisi doğal suşlarda bu özelliğin geliştirilmesine yönelik genel bir rekombinant DNA stratejisi tanımlanmıştır. Bu strateji, nisin regülasyon ve dirençlilik genlerinin ayrı ayrı ya da birlikte pLEB124 vektörü üzerinde bulunan ve regülatör proteinlerinden bağımsız bir şekilde sürekli çalışan P45 promotörü altında klonlanması ve doğal nisin üreticisi suşa aktararak ifade edilmesini esas almaktadır. Tez çalışması kapsamında ayrıca, yukarıda tanımlanan strateji kullanılarak geliştirilen rekombinantların kesikli ve sürekli fermentasyon sistemlerindeki davranışları incelenmiş ve nisin üretimi açısından optimum koşullar belirlenmiştir. Nisin dirençlilik (*nisFEG*), nisin regülasyon (*nisRK*) ve nisin dirençlilik/regülasyon (*nisRKFEG*) genlerinin klonlandığı ve ifade edildiği LL27 rekombinantların tümünde nisin üretim yeteneğinde artış saptanmıştır. Bu durum, rekombinantların oluşturulmasında kullanılan her üç vektörün de (pLEB672, pLEB673 ve pLEB674) tür içi nisin üretici suşların geliştirilmesi çalışmalarına ivme kazandıracak genetik materyaller olduğuna işaret etmektedir.

L. lactis subsp. *lactis* LL27 doğal suşu ve rekombinantlarında nisin verimi açısından en etkin karbon kaynağı, literatür verilerinden farklı bir şekilde (Guerra and Pastrana 2002, Vazquez *et al.* 2004, Jozala *et al.* 2007), fruktoz olarak tespit edilmiştir. Söz konusu farklılık, bu bakterilerin endüstriyel nisin üretimi amacı ile kullanımında, meyve ve sebze işlem atıklarının besiyeri bileşiminin ana materyali olarak değerlendirilme olasılığını doğurmaktadır. Ülkemizde yaygın bir şekilde üretilen konsantre elma suyu atığı olan fruktozca zengin materyalin bu amaç doğrultusunda kullanım olanağının belirlenmesi, ürün ekonomisi açısından büyük bir önem taşımaktadır.

Nisin üretimi optimizasyonu çalışmalarından elde edilen bir diğer önemli bulgu ise, rekombinantların farklı doğasının, sürekli ve kesikli fermentasyon sistemlerinin verimliliği üzerinde farklı etkilere yol açmasıdır. Kesikli fermentasyon sistemlerinde geç evrede meydana gelen nisin aktivite kaybı, endüstride karşılaşılan en önemli sorunlardan biridir. Kesikli nisin üretimi çalışmalarında, özellikle nisin regülasyon ve dirençlilik genlerinin birlikte klonlandığı LAC340 rekombinant suşunda, yukarıda söz edilen aktivite kayıplarının meydana gelmemesi, bu suşun endüstriyel kesikli fermentasyon sistemlerinde kullanımını ön plana çıkarmaktadır. Sürekli üretimde en kritik değişken olan dilüsyon

oranı esas alındığında ise, nisin regülasyon genlerinin ilave kopyasını içeren LAC339 en etkin rekombinant olarak tanımlanmıştır. Bu veriler esas alınarak; doğal ve değişik rekombinant suşların sürekli ve kesikli sistemlerde beraber kullanımının nisin üretimi üzerindeki sinerjetik etkilerinin belirlenmesi, üretim ekonomisine önemli katkılar sağlayacaktır.

Cevap yüzey yönteminin sürekli fermentasyon sistemlerinde nisin üretiminin optimizasyonu için kullanılabilceğinin çalışma kapsamında tanımlanması, endüstriyel açıdan kritik bir bulgudur. Bu çalışmalardan elde edilen veriler ışığında ölçek büyütme çalışmaları yapılarak, optimize edilen koşulların endüstriyel süreçlere uygunluğu tanımlanmalıdır.

KAYNAKLAR

- Abee, T., Rombouts, F. M., Hugenholtz, J., Guihard, G. and Letellier, L. 1994. Mode of action of nisin Z against *Listeria monocytogenes* Scott A grown at high and low temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60; 1962-1968.
- Akçelik, O., Tukul, Ç., Özcengiz, G. and Akçelik, M. 2006. Characterization of bacteriocins from two *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolates. *Mol. Nutr. Food Res.*, 50; 306-13.
- Amiali, M. N., Lacroix, C. and Simard, R.E. 1998. High nisin Z production by *Lactococcus lactis* UL719 in whey permeate with aeration. *World J. Microbiol. and Biotechnol.*, 14; 887-894.
- Barber, M., Eliot, G. J., Bordoli, R. S., Green, B. N. and Bycroft, B. W. 1988. Confirmation of the structure of nisin and its major degradation product by FAM-MS and FAM-MS/MS. *Experientia*, 44; 266-270.
- Bauer, R. and Dicks, L. M. T. 2005. Mode of action of lipid II-targeting lantibiotics. *Int. J. Food Microbiol.*, 101; 201-216.
- Beasley, S. S. and Saris, P. E. J. 2004. Nisin-producing *Lactococcus lactis* isolated from human milk. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70; 5051-5053.
- Bertrand, N., Fliss, I. and Lacroix, C. 2001. High nisin-Z production during repeated-cycle batch cultures in supplemented whey permeate using immobilized *Lactococcus lactis* UL719. *Inter. Dairy J.*, 11; 953-960.
- Bonev, B. B., Breukink, E., Swiezewska, E., De Kruijff, B. and Watts, A. 2004. Targeting extracellular pyrophosphates underpins the high selectivity of nisin. *FASEB J.*, 18; 1862-1969.
- Breukink, E., van Kraaij, C., van Dalen, A., Demel, R. A., Siezen, R. J., de Kruijff, B. and Kuipers, O. P. 1998. The orientation of nisin in membranes. *Biochemistry*, 37, 8153-8162.
- Breukink, E., Wiedemann, I., van Kraaij, C., Kuipers, O. P., Sahl, H-G. and de Kruijff, B. 1999. Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. *Science*, 286; 2361-2364.
- Breukink, E., van Heusden, H. E., Vollmerhaus, P. J., Swiezewska, E., Brunner, L., Walker, S., Heck, A. J. R. and de Kruijff, B. 2003. Lipid II is an intrinsic component of the pore induced by nisin in bacterial membranes. *J. Biol. Chem.*, 278; 19898-19903.
- Brötz, H., Josten, M., Wiedemann, I., Shneider, U., Götz, F., Bierbaum, G. and Sahl, H-G. 1998. Role of lipid-bound peptidoglycan precursors in the formation of pores by nisin, epidermin and other lantibiotics. *Mol. Microbiol.*, 30; 317-327.

- Buchman, G. W., Banerjee, S. and Hansen, J. N. 1988. Structure, expression, and evolution of a gene encoding the precursor of nisin, a small protein peptide. *J. Biol. Chem.*, 263; 16260-16266.
- Chan, W. C., Lian, L.-Y., Bycroft, B. W. and Roberts, G. C. K. 1989. Confirmation of the structure of nisin by complete ¹H NMR resonance assignment in aqueous and dimethyl sulfoxide solution. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 1; 2359-2367.
- Chan, W. C., Dodd, H. M., Horn, N., Maclean, K., Lian, L.-Y., Bycroft, B. W., Gasson, M. J. and Roberts, G. C. K. 1996. Structure-activity relationships in the peptide antibiotic nisin: role of dehydroalanine 5. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62; 2966-2969.
- Chandrapati, S. and O'Sullivan, D. J. 1999. Nisin independent induction of the nisA promoter in *Lactococcus lactis* during growth in lactose or galactose. *FEMS Microbiol. Lett.*, 170; 191-198.
- Chandrapati, S. and O'Sullivan, D. J. 2002. Characterization of promoter regions involved in galactose and nisin mediated induction of the nisA gene *Lactococcus lactis* ATCC 11454. *Molecular Microbiol.*, 2; 467-477.
- Chatterjee, C., Paul, M., Xie, L. and van der Donk, W. A. 2005. Biosynthesis and mode of action of lantibiotics. *Chem. Rev.*, 105; 633-683.
- Cheigh, C. I., Choi, H. J., Park, H., Kim, S., Kook, M., Kim, T., Hwang, J. and Pyun, Y. 2002. Influence of growth conditions on the production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 isolated from Kimchi. *J. Biotechnol.*, 95; 225-235.
- Cheigh, C.I. and Pyun, Y. 2005. Nisin biosynthesis and its properties. *Biotechnol. Lett.*, 27; 1641-1648.
- Cheigh, C. I., Park, H., Choi, H. J. and Pyun, Y. R. 2005. Enhanced nisin production by increasing genes involved in nisin Z biosynthesis in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164. *Biotechnol. Lett.*, 27; 155-160.
- Cotter, D.P., Draper, L.A., Lawton, E.M., McAuliffe, A., Hill, C., Ross, R.P., 2006. Overproduction of wild type bioengineered derivatives of the lantibiotic lactacin 3147. *Appl. Environ. Microbiol.* 72; 4492-4496.
- Davies, E. A., Bevis, H. E., Potter, R., Haris, J., Williams, G. C. and Delves-Broughton, J. 1998. The effect of pH on the stability of the nisin solution during autoclaving. *Letts. Appl. Microbiol.*, 27; 186-187.
- de Ruyter, P. G. G. A., Kuipers, O. P., Beerthuyzen, M. M., van Alen-Boerrigter, I. and de Vos, W. M. 1996. Functional analysis of promoters in the nisin gene cluster of *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.*, 178; 3434-3439.

- de Vuyst, L. and Vandamme, E. J. 1992. Influence of the carbon source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* batch fermentations. J. General Microbiol., 138; 571-578.
- de Vuyst, L. and Vandamme, E. J. 1993. Influence of the phosphorus and nitrogen source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* batch fermentations using a complex medium. Appl. Microbiol. Biotechnol., 40; 17-22.
- de Vuyst, L. and Vandamme, E.J. 1994. Nisin, a lantibiotic produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* properties, biosynthesis, fermentation and applications. In Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. L. de Vuyst and E. J. Vandamme (London: Chapman and Hall), pp. 165-167.
- de Vuyst, L. 1995. Nutritional factors affecting nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NIZO 22186 in a synthetic medium. J. Appl. Bacteriol., 78; 28-33.
- Delves-Broughton, J., Blackburn, P., Evans, R. J. and Hugenholtz, J. 1996. Applications of the bacteriocin nisin. Antonie van Leeuwenhoek, 69; 193-202.
- Demel, R. A., Peelen, T., Siezen, R. J., de Kruijff, B. and Kuipers, O. P. 1996. Nisin Z, mutant nisin Z and lacticin 481 interactions with anionic lipids correlate with antimicrobial activity. A monolayer study. Eur. J. Biochem., 235; 267-274.
- Desjardins, P., Meghrou, J. and Lacroix, C. 2001. Effect of aeration and dilution rate on Nisin Z production during continuous fermentation with free and immobilized *Lactococcus lactis* UL719 in supplemented whey permeate. Inter. Dairy J., 11; 943-951.
- Dodd, H. M., Horn, N. and Gasson, M. J. 1990. Analysis of the genetic determinant for production of the peptide antibiotic nisin. J. Gen. Microbiol., 136; 555-566.
- Driessen, A.J.M., van den Hooven, H.W., Kuiper, W., van de Kemp, M., Sahl, H-G., Konings, R.N.H. and Konings, W.N. 1995. Mechanistics of lantibiotic-induced permeabilization of phospholipid vesicles. Biochemistry, 34; 1606-1614.
- Engelke, G., Gutowski-Eckel, Z., Hammelmann, M. and Entian, K-D. 1992. Biosynthesis of the lantibiotic nisin: genomic organization and membrane localization of the nisB protein. Appl. Environ. Microbiol., 58; 3730-3743.
- Engelke, G., Gutowski-Eckel, Z., Kiesau, P., Siegers, K., Hammelman, M. and Entian, K-D. 1994. Regulation of nisin biosynthesis and immunity in *Lactococcus lactis* 6F3. Appl. Environ. Microbiol., 60; 814-825.
- Even, S., Lindley, N.D., Loublere, P., Coccain-Bousquet, M. 2002. Dynamic response of catabolic pathways to autoacidification in *Lactococcus lactis*: transcript profiling and stability in relation to metabolic and energetic constraints. Mol. Microbiol., 45; 1143-1152.

- Gao, F. H., Abee, T. and Konings, W. N. 1991. Mechanism of action of the peptide antibiotic nisin in liposomes and cytochrome c oxidase-containing proteoliposomes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57; 2164-2170.
- Garcia, M. J., Elferink, M. G. L., Driessen, A. J. M. and Konings, W. N. 1993. In vitro pore forming activity of the lantibiotic nisin. *Eur. J. Biochem.*, 212; 417-422.
- Gasson, M. J. 1984. Transfer of sucrose fermenting ability, nisin resistance and nisin production into *Streptococcus lactis* 712. *FEMS Microbiol. Lett.*, 21; 7-10.
- Gasson, M. J. 1990. In vivo genetic systems in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Reviews*, 87; 43-60.
- Gonzales, C. F. and Kunka, B. S. 1985. Transfer of sucrose-fermenting ability and nisin production phenotype among lactic streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49; 627-633.
- Graeffe, T., Rintala, H., Paulin, L. and Saris, P. 1991. A natural nisin variant. In *Nisin and Novel Lantibiotics*. G. Jung and H. -G. Sahl, ed. (Leiden: ESCOM Science Publishers B.V.), pp. 260-268.
- Gross, E. and Morell, J. L. 1971. The structure of nisin. *J. Am. Chem. Soc.*, 93; 4634-4635.
- Guerra, N. P. and Pastrana, L. 2001. Enhanced nisin and pediocin production on whey supplemented with different nitrogen sources. *Biotechnol. Lett.*, 23; 609-612.
- Guerra, N. P. and Pastrana, L. 2002. Modelling the influence of pH on the kinetics of both Nisin and Pediocin production and characterization of their functional properties. *Process Biochemistry*, 37; 1005-1015.
- Guerra, N.P. and Pastrana, L.C. 2003. Influence of pH Drop on both nisin and pediocin production by *Lactococcus lactis* and *Pediococcus acidilactici*. *Letters Appl. Microbiol.*, 37; 51-55.
- Harris, L. J., Flemming, H. P. and Klaenhammer, T. R. 1992. Characterization of two nisin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strains isolated from a commercial sauerkraut fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58; 1477-1483.
- Hasper, H. E., Kramer, N. E., Smith, J. L., Hillman, J. D., Zachariah, C., Kuipers, O. P., de Kruijff, B. and Breukink, E. 2006. An alternative bactericidal mechanism of action for lantibiotic peptides that target lipid II. *Science*, 313; 1636-1637.
- Heinzmann, S., Entian, K-D. and Stein, T. 2006. Engineering *Bacillus subtilis* ATCC6633 for improved production of the lantibiotic subtilin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69; 532-536.
- Hirsch, A. and Wheeler, D.M. 1951. The production of antibiotics by streptococci. *J. Dairy Res.*, 18; 193-197.

- Holo, H. and Nes, I. F. 1989. High-frequency transformation by electroporation, of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* grown with glycine in osmotically stabilized media. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55; 3119-3123.
- Horn, N., Swindell, S., Dodd, H. and Gasson, M.J. 1991. Nisin biosynthesis genes are encoded by a novel conjugative transposon. *Mol.Gen. Genet.*, 228; 129-135.
- Hsu, S-T., Breukink, E., de Kruijff, B., Kaptein, R., Bonvin, A. M. J. J. and van Nuland, N. A. J. 2002. Mapping the targeted membrane pore formation mechanism by solution NMR: the nisin Z and lipid II interaction in SDS micelles. *Biochemistry*, 41; 7670-7878.
- Hull, J.S.V. and Gibbons, W. R. 1997. Neutralization/recovery of lactic acid from *Lactococcus lactis*: effects on biomass, lactic acid and nisin production. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 13; 527-532.
- Hurst, A. 1981. Nisin. *Adv. Appl. Microbiol.*, 27; 85-123.
- Immonen, T. and Saris, P. E. J. 1998. Characterization of the nisFEG operon of the nisin Z producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* N8 strain. *DNA Seq.*, 9; 263-274.
- Ingram, L. 1970. A ribosomal mechanism for synthesis of peptides related to nisin. *Biochem. Biophys. Acta*, 224; 263-265.
- Jozala, A. F., de Andrade, M. S., de Arauz, L. J. Pessoa, A. and Penna, T. C. V. 2007. Nisin production utilizing skimmed milk aiming to reduce process cost. *Appl. Biochem. Biotech.*, 136; 515-527.
- Jung, G. 1991. Lantibiotics: a survey. In: Nisin and novel lantibiotics. Editors: Jung, G. and Sahl, H-G. Pages 1-34. ESCOM Science Publishers, Leiden, the Netherlands.
- Kaletta, C. and Entian, K-D. 1989. Nisin, a peptide antibiotic: cloning and sequencing of the *nisA* gene and post-translational processing of its peptide product. *J. Bacteriol.*, 171; 1597-1601.
- Karakas, S. A., Narbad, A., Horn, N., Dodd, H. M., Parr, A. J., Golquhoun, I. and Gasson, M. J. 1999. Post-translational modification of nisin: the involvement of nisB in the dehydration process. *Eur. J. Biochem.* 261; 524-532.
- Kim, W. S. 1997. Nisin production by *Lactococcus lactis* using two-phase batch culture. *Letters Appl. Microbiol.*, 25; 169-171.
- Kim W. S., Hall R. J. and Dunn N.W. 1997a. Host specificity of nisin production by *Lactococcus lactis*. *Biotechnol. Lett.*, 19; 1235-1238.
- Kim, W.S., Hall, R.J. and Dunn, N.W. 1997b. The effect of nisin concentration and nutrient depletion on nisin production of *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 48; 449-453.

- Kim, W. S., Hall, R. J. and Dunn, N. W. 1998. Improving nisin production by increasing immunity/resistance genes in the producer organism *Lactococcus lactis*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 50; 429-433.
- Kim, M-H., Kong, Y-K., Baek, H., Hyun, H-H. 2006. Optimization of culture conditions and medium composition for the production of micrococcin G05 by *Micrococcus* sp. G05. J. Biotechnol., 121; 54-61.
- Klein, C., Kaletta, C., Schnell, N. and Entian, K-D. 1992. Analysis of genes involved in biosynthesis of the lantibiotic subtilin. Appl. Environ. Microbiol., 58; 132-142.
- Koponen, O., Tolonen, M., Qiao, M., Wahlström, G., Helin, J. and Saris, P. E. J. 2002. NisB is required for the dehydration and NisC for the lanthionine formation in the post translational modification of nisin. Microbiology, 148; 3561-3568.
- Koponen, O., Takala, T. M., Saarela, U., Qiao, M. and Saris, P. E. J. 2004. Distribution of the NisI immunity protein and enhancement of nisin activity by the lipid-free NisI. FEMS Microbiol. Lett., 231; 85-90.
- Kordel, M. and Sahl, H-G. 1986. Susceptibility of bacterial, eukaryotic and artificial membranes to the disruptive action of the cationic peptides Pep5 and nisin. FEMS Microbiol. Lett., 34; 139-144.
- Kozak, W., Rajchert-Trzpił, M., Dorzanski, W. T. 1974. The effects of proflavin, ethidium bromide and an elevated temperature on the appearance of nisin-negative clones in nisin producing strains of *Streptococcus lactis*. J. Gen. Microbiol., 83; 295-302.
- Kuipers, O. P., Beerthuyzen, M. M., Siezen, R. J. and de Vos W. M. 1993. Characterization of the nisin gene cluster *nisABTCIPR* of *Lactococcus lactis*. Requirement of expression of the *nisA* and *nisI* genes for development of immunity. Eur. J. Biochem., 216; 281-291.
- Kuipers, O. P., Beerthuyzen, M. M., de Ruyter, P. C. M., Luesink, E. J. and de Vos, W. M. 1995. Autoregulation of nisin biosynthesis in *Lactococcus lactis* by signal transduction. J. Biol. Chem., 270; 27299-27304.
- Kuipers, A., Wierenga, J., Rink, R., Kluskens, L. D., Driessen, A. J., Kuipers, O. P. and Moll, G. N. 2006. Sec-mediated transport of postrationally dehydrated peptides in *Lactococcus lactis*. Appl. Environ. Microbiol., 72; 7626-7633.
- Kwaadsteniet, M., Doeschate, K. and Dicks, L. M. T. 2008. Characterization of the Structural Gene Encoding Nisin F, a New Lantibiotic Produced by a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Isolate from Freshwater Catfish (*Clarias gariepinus*). Appl. Environ. Microbiol., 74; 547-549.
- Leblanc, D. J., Crow, V. L. and Lee, L. N. 1980. Plasmid mediated carbohydrate catabolic enzymes among strains of *Streptococcus lactis*. In: Stuttard, C. and Roze, K. R. (ed.), Plasmids and transposons: environmental effects and maintenance mechanisms. Academic Press, Inc., pp. 31-41, New York.

- Li, B., Yu, J. P. J., Brunzelle, J. S., Moll, G. N., van der Donk, W. A. and Nair, S. K. 2006. Structure and mechanism of the lantibiotic cyclase involved in nisin biosynthesis. *Science*, 311; 1464-1467.
- Li, C., Bai, J., Cai, Z. and Ouyang, F. 2002. Optimization of a cultural medium for bacteriocin production by *Lactococcus lactis* using response surface methodology. *J. Biotechnol.*, 93; 27-34.
- Li, H. and O'Sullivan, D. J. 2006. Identification of a *nisI* promoter within the *nisABCTIP* operon that may enable establishment of nisin immunity prior to induction of the operon via signal transduction. *J. Bacteriol.*, 188; 8496-8503.
- Liu, C., Liu, Y., Liao, W., Wen, Z. and Chen, S. 2003. Application of statistically-based experimental designs for the optimization of nisin production from Whey. *Biotechnol. Lett.*, 25; 877-882.
- Liu, W. and Hansen, J. N. 1990. Some chemical and physical properties of nisin, a small protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56; 2551-2558.
- Liu, X., Chung, Y-K, Yang S.T. and Yousef, A. E. 2005. Continuous Nisin production in laboratory media and whey permeate by immobilized *Lactococcus lactis*. *Process Biochem.*, 40; 13-24.
- Lubelski, J., Rink, R., Khusainov, R., Moll, G. N. and Kuipers, O. P. 2008. Biosynthesis, immunity, regulation, mode of action and engineering of the model lantibiotic nisin. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65; 455-476.
- Lv, W., Cong W. and Cai, Z. 2004a. Nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* under nutritional limitation in fed-batch culture. *Biotechnol. Lett.*, 26; 235-238.
- Lv, W., Cong, W. and Cai, Z. 2004b. Improvement of nisin production in pH feed-back controlled, fed-batch culture by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Biotechnol. Lett.*, 26; 1713-1716.
- Lv, W., Cong, W. and Cai, Z. 2005. Effect of sucrose on nisin production in batch and fed-batch culture by *Lactococcus lactis*. *J. Chemical Technology and Biotechnol.*, 80; 511-514.
- Martin, I., Ruyschaert, J-M., Sanders, D. and Giffard, C. J. 1996. Interaction of the lantibiotic nisin with membranes revealed by fluorescence quenching of an introduced tryptophan. *Eur. J. Biochem.*, 239; 156-164.
- Matsusaki, H., Endo, N., Sonomoto, K. and Ishizaki, A. 1996. Lantibiotic nisin Z fermentative production by *Lactococcus lactis* IO-1: Relationship between production of the lantibiotic and lactate and cell growth. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 45; 36-40.
- Mattick, A.T.R. and Hirsch, A. 1944. A powerful inhibitory substance produced by group N streptococci. *Nature*, 154; 551-552.

- McAuliffe, O., Ross, R. P. and Hill, C. 2001. Lantibiotics: biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol. Rev.*, 25; 285-308.
- Morris, S., Walsh, R. C. and Hansen, J. N. 1984. Identification and characterization of some bacterial membrane sulfhydryl groups which are targets of bacteriostatic and antibiotic action. *J. Biol. Chem.*, 259; 13590-13594.
- Motlagh, A. M., Johnson, M. C. and Ray, B. 1991. Viability loss of food-borne pathogens by starter culture metabolites. *J. Food Prot.*, 54; 873-878.
- Mulders, J. W. M., Boerrigter, I. J., Rollema, H. S., Siezen, R. J. and de Vos, W.M. 1991. Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a natural nisin variant. *Eur. J. Biochem.*, 201; 581-584.
- Myers, R. H. and Montgomery, D. C. 1995. Response surface methodology: Process and product optimization using designed experiments. John Wiley and Sons, Inc, New York.
- Nielsen, P. and Roepstorff, P. 1988. Sample preparation dependent fragmentation in 252-Cf plasma desorption mass spectrometry of the polycyclic antibiotic nisin. *Bio. Environ. Mass Spectrom.*, 17; 137-141.
- Noonpakdee, W., Santivarangkna, C., Jumriangrit, P., Sonomoto, K. and Panyim, S. 2003. Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* WNC20 strains from *nham*, a traditional Thai fermented sausage. *Int. J. Food Microbiol.*, 81; 137-145.
- O'Sullivan, D. J. and Klaenhammer, T. R. 1993. Rapid mini-prep isolation of high-quality plasmid DNA from *Lactococcus* and *Lactobacillus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59; 2730-2733.
- Okeley, N. M., Moushumi, P., Strasser, J. P., Blackburn, N. and van der Donk, W. A. 2003. SpaC and NisC, the cyclases involved in subtilin and nisin biosynthesis, are zinc proteins. *Biochemistry*, 42, 13613-13624.
- Papagianni, M., Avramidis, G. and Filiou, G. 2007. Investigating the relationship between the specific glucose uptake rate and nisin production in aerobic batch and fed-batch glucostat cultures of *Lactococcus lactis*. *Enzyme and Microbiol. Tech.*, 40; 1557-1563.
- Parante, E. and Ricciardi, A. 1999. Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 52; 628-638.
- Palmer, D. E., Mierke, D. F., Pattaroni, C., Goodman, M., Wakamiya, T., Fukase, K., Kitazawa, M., Fujita, H. and Shiba, T. 1989. Interactive NMR and computer simulation studies of lanthionine ring structures. *Biopolymers*, 28; 397-408.
- Penna, V. C. T and Moraes, D. A. 2002. Optimization of nisin production by *Lactococcus lactis*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 98; 775-789.

- Piard, J. C., Delorme, F., Giraffa, G., Commisaire, J. and Desmazeaud, M. 1990. Evidence for a bacteriocin produced by *L. lactis* CNRZ 481. *Neth. Milk Dairy J.*, 44; 143-158.
- Pongtharangkul, T. and Demirci, A. 2006. Evaluation of culture medium for nisin production in a repeated-batch biofilm reactor. *Biotechnol. Prog.*, 22; 217-224.
- Qiao, M., Immonen, T., Koponen, O. and Saris, P. E. J. 1995. The cellular location and effect on nisin immunity of the NisI protein from *Lactococcus lactis* N8 expressed in *Escherichia coli* and *L. lactis*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 131; 75-80.
- Qiao, M. and Saris, P. E. J. 1996. Evidence for the role of NisT in transport of the lantibiotic nisin produced by *Lactococcus lactis* N8. *FEMS Microbiol. Lett.*, 144; 69-93.
- Qiao, M., Ye, S., Koponen, O., Ra, R., Usabiaga, M., Immonen, T. and Saris, P. E. J. 1996. Regulation of the nisin operons in *Lactococcus lactis* N8. *J. Appl. Bacteriol.*, 80; 626-634.
- Qiao, M., Omaetxebarria, M. J., Ra, R., Oruetxebarria, I. and Saris, P.E.J. 1997. Isolation of a *Lactococcus lactis* strain with high resistance to nisin and increased nisin production. *Biotechnol. Lett.*, 19; 199-202.
- Ra, R. and Saris, P. E. J. 1995. Characterization of procaryotic mRNAs by RT/PCR. *BioTechniques*, 18; 792-795.
- Ra, R., Qiao, M., Immonen, T., Pujana, I. and Saris, P. E. J. 1996. Genes responsible for nisin synthesis, regulation and immunity form a regulon of two operons and are induced by nisin in *Lactococcus lactis* N8. *Microbiology*, 142; 1281-1288.
- Ra, R., Beerthuyzen, M. M., de Vos, W. M., Saris, P. E. and Kuipers, O. P. 1999. Effects of gene disruptions in the nisin gene clusters of *Lactococcus lactis* on nisin production and producer immunity. *Microbiology*, 145; 1227-1233.
- Rauch, P. J. G., Beerthuyzen, M. M. and de Vos, W. M. 1991. Molecular analysis and evolution of conjugative transposons encoding nisin production and sucrose fermentation in *Lactococcus lactis*. In *Nisin and Novel Lantibiotics*, G. Jung and H-G. Sahl, ed. (Leiden: ESCOM Science Publishers B.V.), pp. 243-249.
- Rauch, P. J. G. and de Vos, W. M. 1992. Characterization of the novel nisin-sucrose conjugative transposon Tn5276 and its insertion in *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.*, 174; 1280-1287.
- Rauch, P. J. G., Beerthuyzen, M. M. and de Vos W. M. 1994. Distribution and evolution of nisin-sucrose elements in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60; 1798-1804.
- Rogers, L.A. 1928. The inhibiting effect of *Streptococcus lactis* on lactic fermentation. *J. Bacteriol.*, 16; 321-325.

- Rogers, L.A. and Whittier, E.O. 1928. Limiting factors in the lactic fermentation. *J. Bacteriol.*, 16; 211-229.
- Ruhr, E. and Sahl, H-G. 1985. Mode of action of the peptide antibiotic nisin and influence on the membrane potential of whole cells and on cytoplasmic and artificial membrane vesicles. *J. Bacteriol.*, 162; 833-836.
- Sambrook, J., Fritschi, E. F. and Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Scannell, A.G.M., Hill, C., Ross, R.P., Marx, S., Hartmeier, W. and Arendt, E.K. 2000. Continuous production of lactacin 3147 and nisin using cells immobilized in calcium alginate. *J. Appl. Microbiol.*, 89; 573-579.
- Schnell, N., Entian, K. -D., Schneider, U., Götz, F., Zahner, H., Kellner and Jung, G. 1988. Prepeptide sequence of epidermin, a ribosomally synthesized antibiotic with four sulphide rings. *Nature*, 333; 276-278.
- Schnell, N., Engelke, G., Augustin, J., Rosentein, R., Ungermann, V., Gotz, F. and Jung, G. 1992. Analysis of genes involved in the biosynthesis of lantibiotic epidermin. *Eur. J. Biochem.*, 204; 57-68.
- Shimizu, H., Mizuguchi, T., Tanaka, E. and Shioya, S. 1999. Nisin production by a mixed -culture system consisting of *Lactococcus lactis* and *Kluyveromyces marxianus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65; 3134-3141.
- Siegers, K. and Entian, K-D. 1995. Genes involved in immunity to the lantibiotic nisin produced by *Lactococcus lactis* 6F3. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61; 1082-1089.
- Siegers, K., Heinzmann, S. and Entian, K-D. 1996. Biosynthesis of lantibiotic nisin. Posttranslational modifications of its prepeptide occurs at a multimeric membrane associated lanthionine synthetase complex. *J. Biol. Chem.* 271, 12294-12301.
- Siegumfeldt, H., Rechinger, K.B. and Jakobsen M. 2000. Dynamic changes of intracellular pH in individual lactic acid bacterium cells response to a rapid drop in extracellular pH. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66; 2330-2335.
- Siezen, R. J. 1999. Multi-domain, cell-envelope proteinases of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76; 139-155.
- Slijper, M., Hilbers, C. W., Konings, R. N. H. and van de Ven, F. J. M. 1989. NMR studies of lantibiotics. Assignment of the ¹H-NMR spectrum of nisin and identification of interresidual contacts. *FEBS Lett.*, 252; 22-28.
- Sonomoto, K., Chinachoti, N., Endo, N. and Ishizaki, A. 2000. Biosynthetic production of nisin Z by immobilized *Lactococcus lactis* IO-1. *J. Molecular Cat. B: Enzymatic*, 10; 325-334.

- Steele, J.L. and McKay, L.L. 1986. Partial characterization of the genetic basis for sucrose metabolism and nisin production in *Streptococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64; 57-64.
- Steen, M. T., Chung, Y. J. and Hansen, N. 1991. Characterization of the nisin gene as a part of a polycistronic operon in the chromosome of *Lactococcus lactis* ATCC11454. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57; 1181-1188.
- Stein, T., Heinzmann, S., Solovieva, I. and Entian, K-D. 2003. Function of *Lactococcus lactis* nisin immunity genes *nisI* and *nisFEG* after coordinated expression in the surrogate host *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.*, 278; 89-94.
- Şimşek, Ö., Buzrul, S., Akkoç, N., Alpas, H. and Akçelik, M. 2008. Stress response kinetics of two nisin producer strains of *Lactococcus lactis* spp. *lactis*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, DOI. 10.1007/s12010-008-8350-9.
- Takala, T. M., Koponen, O., Qiao, M. and Saris, P. E. J. 2004. Lipid-free NisI:Interaction with nisin and contribution to nisin immunity via secretion. *FEMS Microbiol. Lett.*, 237; 171-177.
- Takala, T. M. and Saris, P. E. J. 2007. Nisin: Past, present and future. In *Research and Applications of Bacteriocins*, M. A. Riley, and O. Gillor, ed. Horizon Bioscience pp. 181-213.
- Thompson, J., Nguyen, N. Y., Sackett, D. L. and Donkersloot, J. A. 1991. Transposon-encoded sucrose metabolism in *Lactococcus lactis*. Purification of sucrose-6-phosphate hydrolase and genetic linkage to N⁵-(L-1-carboxyethyl)-L-ornithine synthase in strain K1. *J. Biol. Chem.* 266; 14573-14579.
- Tolonen, M., Saris, P.E.J. and Siika-aho, M. 2004. Production of nisin with continuous adsorption to amberlite XAD-4 resin using *Lactococcus lactis* N8 and *L. lactis* LAC48. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 63; 659-665.
- Tramer, J. and Fowler, G. G. 1964. Estimation of nisin in foods. *J. Sci. Food Agri.*, 15; 522-528.
- Tsai, H. J. and Sandine, W. E. 1987. Conjugal transfer of nisin plasmid genes from *Streptococcus lactis* 7962 to *Leuconostoc dextranicum* 181. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53; 352-357.
- van de Ven, F. J. M., van den Hooven, H. W., Konings, R. N. H. and Hilbers, C. W. 1991. NMR studies of lantibiotics. *Eur. J. Biochem.*, 202; 1181-1188.
- van den Hooven, H. W., Fogolari, F., Rollema, H. S., Konings, R. N. H., Hilbers, C. W. and van de Ven, F. J. M. 1993. NMR and circular dichroism studies of the lantibiotic nisin in non-aqueous environments. *FEMS Lett.*, 319; 189-194.

- van den Hooven, H. W., Doeland, C. C. M., Van de Kamp, M., Konings, R. N. H., Hilbers, C. W. and Van de Ven, F. J. M. 1996. Three-dimensional structure of the lantibiotic nisin in the presence of membrane-mimetic micelles of dodecylphosphocholine and sodium dodecylsulphate. *Eur. J. Biochem.*, 235; 382-393.
- van der Meer, J. R., Polman, J., Beerhuyzen, M. M., Siezen, R. J., Kuipers, O. P. and de Vos W. M. 1993. Characterization of the *Lactococcus lactis* Nisin A operon genes *nisP*, encoding a subtilisin-like serine protease involved in precursor processing and *nisR*, encoding a regulatory protein involved in nisin biosynthesis. *J. Bacteriol.*, 175; 2578-2588.
- Vazquez, J.A. Cabo, M. L., Gonzalez, M. P. and Murado, M. A. 2004. The role of amino acids in nisin and pediocin production by two lactic acid bacteria a factorial study. *Enzyme and Microbiol. Technol.*, 34; 319-325.
- Wan, J., Hickey, W. and Coventry, M. J. 1995. Continuous production of bacteriocins, brevicin, nisin and pediocin, using calcium alginate-immobilized bacteria. *J. Appl. Bacteriol.*, 79; 671-676.
- Wardani, A. H., Egawa, S., Nagahisa, K., Shimizu, H. And Shioya, S. 2006. Computational prediction of impact of rerouting the carbon flux in metabolic pathway on cell growth and nisin production by *Lactococcus lactis*. *Biochemical Engineering J.*, 28; 220-230.
- Whitehead, H.R. 1933. A substance inhibiting bacterila growth, prodeded by certain strains of lactic streptococci. *Biochem. J.*, 27; 1793-1800.
- Wiedemann, I., Breukink, E., van Kraaij, C., Kuipers, O. P., Bierbaun, G., de Kruijff, B. and Sahl, H-G. 2001. Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipit II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. *J. Biol. Chem.*, 276; 1722-1779.
- Wirawan, R.E., Klesse, N.A., Jack, R. W. and Tagg, J. R. 2006. Molecular and genetic characterisation of a novel nisin variant produced by *Streptococcus uberis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72; 1148-1156.
- Wu, Z., Wang, L., Jing, Y., Li, X. and Zhao, Y. 2008. Variable volume fed-batch fermentation for nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* W28. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, DOI 10.1007/s112010-008-8335-8.
- Yang, R., Johnson, M. C. and Ray, B. 1992. Novel method to extract amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58; 3355-3359.
- Yu, P. L., Dunn, N. W. and Kim, W. S. 2002. Lactate removal by anionic-exchange resin improves nisin production by *Lactococcus lactis*. *Biotechnol. Lett.*, 24; 59-64.
- Zendo, T., Fukao, M., Ueda, K., Higuchi, T., Nakayama, J. and Sonomoto, K. 2003. Identification of the lantibiotic nisinQ, a new natural nisin variant produced by *Lactococcus lactis* 61-14 isolated from a river in Japan. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67; 1616-1619.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ömer ŞİMŞEK
Doğum Yeri : Ludwigsburg-ALMANYA
Doğum Tarihi : 07.08.1976
Medeni Hali : Evli
Yabancı Dili : İngilizce
Eğitim Durumu
Lisans : Pamukkale Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği
Yüksek Lisans : Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı
Çalıştığı Kurumlar ve Yılı : Pamukkale Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Araştırma Görevlisi, 2000-2004
Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Araştırma Görevlisi, 2004-

Yayımları (SCI ve diğer) :

- Çelik İ., Işık F., Şimşek Ö., Gürsoy O. 2005. The effects of addition baker's yeast on the functional properties and quality of tarhana; a traditional fermented food. Czech. J. Food Sci. 23; 190-195.
- Şimşek Ö., Çon A. H., Tulumoğlu Ş. 2006. Isolating lactic starter cultures with antimicrobial activity for sourdough processes. Food Control. 17; 263-270.
- Tukel Ç., Avşaroğlu M.D., Şimşek Ö., Akçelik M. 2007. Isolation and partial characterization of a novel bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* spp. *lactis* MC38. Food Safety. 27; 17-29.
- Tükel Ç., Akçelik M., de Jong M. F., Şimşek Ö., Tsolis M. R., Baumler A. J. 2007. MarT activates expression of the MisL autotransporter protein of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. J. Bacteriol. 189; 3922-3926.
- Şimşek Ö., Buzrul S., Akkoç N., Alpas H., Akçelik M. 2008. Stress response kinetics of two nisin producer strains of *Lactococcus lactis* spp. *lactis*. Appl. Biochem. Biotech. (Basımda)
- Akkoç N., Şimşek Ö., Akçelik M. 2008. Determination of metabolic plasmids and their effects on the growth of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MN24. International Dairy Technol. (Basımda).
- Şimşek Ö., Çon A. H., Akkoç N., Saris P. E: J., Akçelik M. 2008. Influence of growth conditions on the nisin production of bioengineered strains. J. Ind. Microbiol. Biotech. (Basımda)

- Şimşek Ö.**, Saris P. E. J. 2008. Cycle changing the medium results in increased nisin productivity per cell in *Lactococcus lactis*. Biotechnol. Letters. (Basımda).
- Özden B., Şanlıbaba P., **Şimşek Ö.**, Avşaroğlu M. D. Akçelik M. 2007. Natural phage resistance systems in lactococci. In Metabolism and Applications of Lactic Acid Bacteria, Ed: Barbaros Özer. Research signpost Kerala-India.
- Şimşek Ö.**, Çon A. H. 2003. Ekşi hamur laktik asit bakterileri ve ekmeğin teknolojik özellikleri üzerine etkisi. Unlu Mamüller Teknolojisi, 58; 44-56.
- Şimşek Ö.**, Çon A. H., Akçelik M. 2007. Endüstriyel nisin üretiminde etkili faktörler ve model sistemler. Pamukkale Üniversitesi, Mühendislik Bilimleri Dergisi, 13; 57-67.
- Şimşek Ö.**, Saris P. E. J. 2006. Nisin production without feedback inhibition, 8 th Symposium on Lactic Acid Bacteria, August 28-31. Egmond aan Zee, The Netherlands.
- Şimşek Ö.**, Çon A. H., Çelik İ., Akçelik M. 2006. Evaluation of bacteriocin producing strain *Lactobacillus salivarius* H862 for sourdough starter culture. 3rd International Symposium on Sourdough. October, 25-28. Bari-Italy.
- Şimşek Ö.**, Akkoç N., Çon A. H., Saris P. E. J. Akçelik M. 2008. Nisin production of bioengineered strains. 9 th Symposium on Lactic Acid Bacteria, August 31-September 4. Egmond aan Zee, The Netherlands.
- Şimşek Ö.**, Çon A. H. 2003. Laktik asit bakterilerinde ekzopolisakkarit üretimi ve süt ürünlerindeki fanksiyonları. Süt Endüstrisinde Yeni Eğilimler Sempozyumu. 22-23 Mayıs. İzmir.
- Şimşek Ö.**, Çon A. H. 2003. Ekşi hamurdan antimikrobiyal aktiviteye sahip laktik asit bakterilerin izolasyonu ve tanımlanması. XIII. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi. 25-29 Ağustos. Çanakkale.
- Anayol E., **Şimşek Ö.**, Özden B., Avşaroğlu, M.D., Akçelik M. (2006) *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* EYL38 suşunda nisin üretiminin genetik analizi ve konjugal aktarımı, 18. ulusal biyoloji kongresi, Kuşadası/Aydın
- Şimşek Ö.**, Avşaroğlu M. D., Şanlıbaba P., Özden B., Tuncer Y., Akçelik M. 2007. Farklı biosit ve sıcaklık uygulamaların laktokok fajların inaktivasyonu üzerine etkilerinin karşılaştırılması. XV. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi. 28-31 Ekim. Antalya.
- Şimşek Ö.**, Uymaz B., Akkoç N., Yıldırım K., Akçelik M. 2007. *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 suşunda nisin üretiminin artırılmasına yönelik bir genetik yaklaşım. XV. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi. 28-31 Ekim. Antalya.