

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Lactococcus lactis ÇEŞİTLİ SOLUNUMUN HEMİNLEŞTİRİLMESİ VE KİMLİKLENMESİ İÇİN YARI-KESİKLİ FERMENTASYON SİSTEMİNDE NİSAN ÜRETİMİNİN OPTİMİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BURCU KÖRDANLI

DENİZLİ, AYRILIK - 2014

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI



Lactococcus lactis ÇEŞİTLİ SOLUNUMUN HEMİNLEŞTİRİLMESİ VE Kİ-
LEŞTİRİLMESİ İÇİN YARI-KESKİMLİ FERMENTASYON SİSTEMİNDE
İNŞAN ÜRETİMİNİN OPTİMİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BURCU KÖRDANLI

DENİZLİ, AĞUSTOS - 2014

KABUL VE ONAY SAYFASI

BURCU KÖRDİKANLIOĞLU tarafından hazırlanan **“LACTOCOCCUS LACTIS”TE SOLUNUMUNHEMİN İLE TEŞVİK EDİLDİĞİ YARI-KESİKLİ FERMENTASYON SİSTEMİNDE NİSİN ÜRETİMİNİN OPTİMİZASYONU**” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 12.08.2014 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği AnaBilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman
Yrd.Doç.Dr. Ömer ŞİMŞEK,
Pamukkale Üniversitesi



Üye
Prof.Dr. Mustafa AKÇELİK,
Ankara Üniversitesi



Üye
Doç.Dr. Sami Gökhan ÖZKAL,
Pamukkale Üniversitesi



Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun **13.08.2014** tarih ve **...33./04...** sayılı kararıyla onaylanmıştır..



Prof. Dr. Orhan KARABULUT

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez al, mas, TB TAK taraf,ndan 1120497 nolu proje ile desteklenmi tir.

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğine beyan ederim.

BURCU KÖRDİKANLIOĞLU

Burcu

ÖZET

***Lactococcus lactis* N8 SU UNDA SOLUNUMUN HEMİN İLAVESİ İLE TE VİK EDİLDİ İ YAR,-KESİKLİ FERMENTASYON SİSTEMİNDE HEMİN, GLUKOZ VE ÇÖZÜNMÜ OKSİJEN KONSANTRASYONLAR, BAŞLAMA VE SONA ERİME ZAMANLARININ BELİRLENMESİ İÇİN YAR,-KESİKLİ FERMENTASYON SİSTEMİNDE NİSİN ÜRETİMİNİ YÜKSEK DEREJELERDE İZLENİMİ YARANAN YAR,-KESİKLİ FERMENTASYON SİSTEMİNDE NİSİN ÜRETİMİNİ YÜKSEK DEREJELERDE İZLENİMİ YARANAN YAR,-KESİKLİ FERMENTASYON SİSTEMİNDE NİSİN ÜRETİMİNİ YÜKSEK DEREJELERDE İZLENİMİ YARANAN**

(TEZ DANIŞMANI: YRD. DOÇ. DR. ÖMER KARAYAKAR)

DENİZLİ İZMİR İZMİR - 2014

Bu çalışmada, *L. lactis* N8 su unda solunumun hemin ilavesi ile tevik edildiği yarık kesikli fermentasyon sisteminde hemin, glukoz ve çözünmüş oksijen konsantrasyonları, başlangıç ve sona erime zamanları, nisin üretimi modellenmiştir. Bunun için öncelikle başlangıç ve sona erime zamanları, nisin üretimi tespit edilmiş daha sonra cevap yüzey analizi yönteminin önerdiği deneysel desen uygulanmıştır. Sonuçta ise model etli üretilen optimum hemin, glukoz ve çözünmüş oksijen konsantrasyonları, kullanılarak yarık kesikli fermentasyon sisteminde nisin üretimi gerçekleştirilmiştir.

Yapılan çalışmada, yarık kesikli fermentasyon sisteminde *L. lactis* N8 su üzerinde farklı hemin, glukoz ve çözünmüş oksijen konsantrasyonları etkili olduğu belirlenmiştir. Cevap yüzey modelinin yarık kesikli fermentasyon sisteminde solunumun tevik edildiği *L. lactis* N8 su unda nisin üretimini yüksek derejelerde açıkladığı, R^2 değerinin 0.98 %, model uyumu eksikliklerinin ise anlamsız olduğu tespit edilmiştir. Oluşturulan model etli, en yüksek nisin üretimi için glukoz, hemin ve çözünmüş oksijen konsantrasyonları, sırasıyla 8 g L^{-1} , $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ ve %40 olarak önermiştir. Söz konusu bu optimum değerlerde gerçekleştirilen yarık kesikli fermentasyonda 5410 IU mL^{-1} maksimum nisin üretimine ulaşıırken, hemin içermeyen kontrol fermentasyonunda ise 1711 IU mL^{-1} nisin üretilmiştir. Yarık kesikli sistemde hemin kullanılması ile nisin üretiminde 3.1 kat artış sağlanmıştır. Sonuç olarak; *L. lactis* N8 suunun hemin ilave edilerek solunumun tevik edildiği yarık kesikli fermentasyon sisteminde, biyokütle artışı ile birlikte nisin üretimi önemli oranlarda geliştirilmiştir ve ilk kez büyük ölçekte uygulamalar için modellenmesi başarılmıştır.

ANAHTAR KELİMELER: *L. lactis*, Nisin, Hemin, Yarık kesikli, Solunum.

ABSTRACT

OPTIMIZATION OF NISIN PRODUCTION IN FED-BATCH FERMENTATION SYSTEM OF *Lactococcus lactis* UNDER HEMIN- STIMULATED RESPIRATIVE CONDITIONS

MSC THESIS

BURCU KÖRD KANLIO LU
PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE
FOOD ENGINEERING

(SUPERVISOR:ASSIST. PROF. DR. ÖMER M EK)

DEN ZL , AUGUST 2014

In this study, nisin production was modeled by taking account the independent variables of glucose, hemin and oxygen concentration by stimulating the respiration at fed-batch fermentation of *L. lactis* N8. In this respect, experimental parameters of independent variables were determined and experimental combinations proposed by the response surface analysis method was applied. Finally, nisin production was carried out at determined optimum hemin, glucose and dissolved oxygen concentrations in the fed-batch fermentation system.

In the study, different glucose, hemin and oxygen concentrations were found effective on the nisin production in relevant fed-batch fermentation. Response surface model was able to explain the nisin production at *L. lactis* N8 in fed-batch fermentation system with high fidelity where this model was given R^2 value above 98 % and insignificant lack of fit. Accordingly, the equation developed indicated the optimum parameters for glucose, hemin and dissolved oxygen were $8 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, $3 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ and 40%, respectively. While 1711 IU mL^{-1} nisin production was produced at *L. lactis* N8 in control fed-batch fermentation, 5410 IU mL^{-1} nisin production was achieved within the relevant optimum parameters where the respiration was stimulated with hemin. Accordingly nisin production was enhanced 3.1 fold in fed-batch fermentation with using hemin. As a conclusion the nisin production at *L. lactis* N8 was developed extensively, by stimulating the respiration with adding hemin in the fed-batch fermentation along with increasing the biomass. Also this is the first report modeling the nisin production in fed-batch fermentation system including hemin for applying large scale productions.

KEYWORDS: *L. lactis*, Nisin, Hemin, Fed-batch, Respiration.

Ç NDEK LER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
Ç NDEK LER.....	iii
EK L L STES	v
TABLO L STES	vii
SEMBOL L STES	viii
ÖNSÖZ.....	ix
1. G R	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	3
2.1 Nisin.....	3
2.2. Nisinin Yap,sal Özellikleri.....	4
2.3 Nisinin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	8
2.4 Nisin Üretimini Etkileyen Faktörler	8
2.4.1 Karbon kayna ,	9
2.4.2 Azot kayna ,	10
2.4.3 norganik bile ikler	12
2.4.4 pH.....	13
2.4.5 Nisin miktar,	13
2.4.6 Oksijen.....	14
2.5 Nisin Üretim Yöntemleri	15
2.5.1 Kesikli sistemler.....	15
2.5.2 Yar,-kesikli sistemler	16
2.2.3 Sürekli sistemler.....	17
2.6 Nisin Üretiminde Yenilikçi Yakla ,mlar	18
2.6.1 Rekombinant nisin üreticileri	18
2.6.2 nkübasyon ortam,n,n de i tirilmesi.....	20
2.6.3 Metabolik yolun düzenlenmesi	21
2.7 Laktik Asit Bakterilerinde Solunum.....	23
2.7.1. Hemin	26
2.7.2. Heminin <i>L. lactis</i> solunumundaki rolü	27
2.7.3. <i>L. lactis</i> te metabolik yolun oksijenli solunuma yönlendirilmesi....	28
3. MATERYAL ve METOT	30
3.1 Bakteri Su lar, ve Kültür Ortamlar,	30
3.2 Fermentasyon De i kenlerinin Çal, ma Aral,klar,n,n Belirlenmesi.....	30
3.3 Fermentasyon De i kenlerinin Cevap Yüzey Yöntemi le Modellenmesi.....	32
3.4 Solunumun Hemin ile Te vik Edildi i Yar,-kesikli Fermentasyon Sisteminde Optimum Parametreler Kullan,larak <i>L. lactis</i> N8 Su unda Nisin Üretimi	34
3.5 Analitik Yöntemler	34
3.5.1 Nisin üretim miktar,n,n tespiti.....	34
3.5.2 Biyokütle miktar,n,n hesaplanmas,.....	35

3.5.3 Kal,nt, glukoz miktar,n,n tespiti	36
3.5.4 Laktik ve asetik asit miktar,n,n tayini	36
4. SONUÇLAR ve TARTI MA.....	38
4.1 Yar,-kesikli Fermentasyon Sisteminde Hemin Konsantrasyonunun Nisin Üretimi ve Biyokütle Üzerine Etkisi.....	38
4.2 Yar,-kesikli Fermentasyon Sisteminde Glukoz Konsantrasyonunun Nisin Üretimi ve Biyokütle Üzerine Etkisi.....	41
4.3 Yar,-kesikli Fermentasyon Sisteminde Çözünmü Oksijen Konsantrasyonunun Nisin Üretimi ve Biyokütle Üzerine Etkisi	44
4.4 Yar,-kesikli Fermentasyon Sisteminde Hemin ile Solunumun Te vik Edildi i <i>L. lactis</i> N8 Su unda Nisin Üretimini Cevap Yüzey Yöntemi Modeli ve Optimizasyonu.....	47
5. GENEL SONUÇ VE ÖNER LER.....	67
6. KAYNAKLAR	69
7. ÖZGEÇM	79

EK L L STES

Sayfa

ekil 2.1 Do ada nadir bulunan dehidroalanin, dehidrobütirin, lantiyonin, ve -metil lantiyonin amino asitlerin sentez mekanizmas,	5
ekil 2.2 Nisin A, Z, Q ve U'nun yap,s,	6
ekil 2.3 <i>L.lactis</i> -de homofermantatif, heterofermantatif döngü ve solunum ko ulla,nda laktoz ve glukoz katabolizmas,	22
ekil 2.4 Solunum yetene ine sahip laktik asit bakterilerinde elektron ta ,ma sisteminin ematik gösterimi.....	26
ekil 2.5 Sitokrom cöye kovalent olarak ba l, hem grubunun yap,s,	26
ekil 3.1 Solunumun hemin ile te vik edildi i yar,-kesikli fermentasyon sistemi	31
ekil 3.2 Çal, mada kullan,lan nisin inhibisyon e risi.....	35
ekil 3.3 Çal, mada kullan,lan hücre kuru a ,rl, , standart e risi.....	35
ekil 3.4 Çal, mada kullan,lan glukoz standart e risi.....	36
ekil 3.5 Çal, mada kullan,lan asetik asit standart e risi	37
ekil 3.6 Çal, mada kullan,lan laktik asit standart e risií í í í í í í í ..	37
ekil 4.1 Farkl, hemin konsantrasyonlar, kullan,larak yürütülen yar,-kesikli fermentasyonda hemin ile solunumu te vik edilmi <i>L. lactis</i> N8 su unun hücre kuru a ,rl, , (mg mL ⁻¹)	40
ekil 4.2 Farkl, glukoz konsantrasyonlar, kullan,larak yürütülen yar,-kesikli fermentasyonda hemin ile solunumu te vik edilmi <i>L. lactis</i> N8 su unun hücre kuru a ,rl, , (mg mL ⁻¹)	43
ekil 4.3 Farkl, çözünmü oksijen konsantrasyonlar, kullan,larak yürütülen yar,-kesikli fermentasyonda hemin ile solunumu te vik edilmi <i>L. lactis</i> N8 su unun hücre kuru a ,rl, , (mg mL ⁻¹)	46
ekil 4.4 Yar,-kesikli fermentasyon sisteminde glukoz ve hemin konsantrasyonlar,n,n birim biyokütlede üretilen nisin miktar,na etkisini gösteren a) izohips e ri ve b) yüzey grafi i.....	50
ekil 4.5 Yar,-kesikli fermentasyon sisteminde glukoz ve çözünmü oksijen konsantrasyonlar,n,n birim biyokütlede üretilen nisin miktar,na etkisini gösteren a) izohips e ri ve b) yüzey grafi i.....	51
ekil 4.6 Yar,-kesikli fermentasyon sisteminde hemin ve çözünmü oksijen konsantrasyonlar,n,n birim biyokütlede üretilen nisin miktar,na etkisini gösteren a) izohips e ri ve b) yüzey grafi i	52
ekil 4.7 Yar,-kesikli fermentasyon sisteminde glukoz ve hemin konsantrasyonlar,nn birim biyokütlede üretilen nisin miktar,na etkisini gösteren düzeltilmi a) izohips e ri ve b) yüzey grafi i	57
ekil 4.8 Yar,-kesikli fermentasyon sisteminde glukoz ve çözünmü oksijen konsantrasyonlar,n,n birim biyokütlede üretilen nisin	

miktar,na etkisini gösteren düzeltilmi a) izohips e ri ve b) yüzey grafi i	58
ekil 4.9 Yar,-kesikli fermentasyon sisteminde hemin ve çözünmü oksijen konsantrasyonlar,nn birim biyokütlerde üretilen nisin miktar,na etkisini gösteren düzeltilmi a) izohips e ri ve b) yüzey grafi i	59
ekil 4.10 Heminli ve heminsiz yar, kesikli fermentasyonda olu an hücre kuru a rı, , (a) ve üretilen nisin miktar, (b)	63
ekil 4.11 Heminli ve heminsiz yar,-kesikli fermentasyonda ortamdaki kal,nt, glukoz miktar,	64
ekil 4.12 Heminli ve heminsiz yar, kesikli fermentasyonda <i>L. lactis</i> N8 su u taraf,ndan üretilen laktik asit (a) ve asetik asit (b) miktar,	66

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1 Laktik asit bakterilerinin solunum yeteneklerine göre s, n, f, l, d, r, l, m, a, s,25	25
Tablo 3.1 Yar, -kesikli fermentasyon sisteminde denenilen fermentasyon de i kenleri ve al, ma aral, klar,32	32
Tablo 4.1. Ara t, r, lan parametreler ve deneysel al, ma aral, klar,47	47
Tablo 4.2 Yar, -kesikli fermentasyon sisteminde glukoz, hemin ve çözünmü oksijen konsantrasyonlar, n, n optimizasyonu için olu turulan yüzey merkezli kompozit deneme deseni.48	48
Tablo 4.3 Yar, -kesikli fermentasyon sisteminde glukoz, hemin ve çözünmü oksijen konsantrasyonlar, n, n optimizasyonu için olu turulan yüzey merkezli kompozit deneme deseninin varyans analizi í í .49	49
Tablo 4.4 Yar, -kesikli fermentasyon sisteminde glukoz, hemin ve çözünmü oksijen konsantrasyonlar, n, n optimizasyonu için olu turulan yüzey merkezli kompozit deneme desenine ilave edilen denemeler.53	53
Tablo 4.5 Yar, -kesikli fermentasyon sisteminde glukoz, hemin ve çözünmü oksijen konsantrasyonlar, n, n optimizasyonu için olu turulan yüzey merkezli kompozit geni letilmi deneme deseninin varyans analizi. 54	54
Tablo 4.6 Yar, -kesikli fermentasyon sisteminde glukoz, hemin ve çözünmü oksijen konsantrasyonlar, n, n optimizasyonu için tahmin edilen regresyon katsay, lar,56	56

SEMBOL LİSTESİ

h	: Saat
min	: dakika
kg	: Kilogram
gr	: Gram
g	: Relatif santrifüj kuvveti
µg	: Mikrogram
mL	: Mililitre
Nmol	: Nanomol
ppm	: Milyonda bir
Nm	: Nanometre
N	: Normalite
mM	: Milimolar
OD	: Optik yoğunluk
Rpm	: Dakikadaki devir sayısı,
IU	: Uluslararası ünite
AU	: Arbitrary Ünite
CFU	: Koloni oluşturma birim
CDW	: Kuru hücre ağırlığı,
R²	: Determinasyon katsayısı,
HCl	: Hidroklorik asit
ATP	: Adenozintrifosfat
AMP	: Adenozinmonofosfat
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
GRAS	: Genel olarak güvenilir ve zararsız kabul edilen
FAO	: Gıda ve Tarım Örgütü
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
ETS	: Elektronik taşıma sistemi
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans

ÖNSÖZ

Gıdalarımız, zararlı mikroorganizmalardan arındırmak en temel vazifemizdir. Gıda üretiminde antimikrobiyel karakterli ajanların kullanılması, gerek mikrobiyel yükün azaltılması, gerekse raf ömrünün uzatılması, bakımından önemli araçlardandır. 20. yüzyıllarda keşfedilen nisin de *Lactococcus lactis*'in bazı üyeleri tarafından sentezlenen antimikrobiyeldir.

Nisinin gıda üretiminde kullanılması, kısıtlayan ana unsur; maliyetinin yüksek olmasıdır. Bu sorunun en temel nedeni nisinin üreticileri tarafından düşük düzeylerde üretilmesidir. Bu çalışmada; yarı-kesikli fermentasyon ortamında hemin ilave edilerek aerobik solunuma tevik edilen nisin üreticisinde laktat üretimi baskılanması ve ayrıca enerji kazanılması, artırılarak yüksek nisin üretimi başarılmıştır. Ulaşılan bu gelişmenin endüstriyel ölçekte nisin üretim maliyetlerini düşürecek ve buna bağlı olarak gıda sistemlerinde nisin kullanılması yaygınlaştırarak daha güvenli gıdaların üretilmesine katkıda bulunacağı ümit edilmektedir.

Bu tez çalışmasına değer verip desteklenmesine karar veren TÜBİTAK Başkanlığı, nezdinde TOVAG'a:

Deneyisel çalışmaların yapılabilmesine imkân veren Pamukkale Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü Başkanlığına:

Yüksek lisans eğitimim boyunca ilminden faydalandığımla birlikte çalışmaktan onur duyduğum ve ayrıca çalışmalarımın her anında göstermiş olduğu hoşgörüsü ve sabrından dolayı sevgili danışmanım sayın Yrd. Doç. Dr. Ömer M. EKÖ ve tüm değerli bölüm hocalarıma:

Tüm deneysel çalışmalarım boyunca günümün her anında maddi ve manevi kölsüz destekçilerim olan Arş. Gör. Halil İbrahim KAYA, Derya AKTA ve laboratuvarındaki tüm değerli arkadaşlarıma:

Bu günlere gelmemde büyük pay sahibi olan kocaman aileme ve canım dostum Gülsüm TERZÖLU'na:

te şükürlerimi sunarım.

Ağustos, 2014

Burcu KÖRD KANLIO LU

1. G R

Bakterilerde h,zla artan antibiyotik direnç yetene i, yeni antimikrobiyel bile iklerin ara t,r,lmas,n, ve geli tirilmesini gerekli k,lmaktad,r. Ayr,ca g,dalar,n korunmas, amac,yla kullan,lan koruyuculara kar , olu an tüketici tepkisi ve bunlar,n çe itli alerjik reaksiyonlara neden olmas, ile insan sa l, ,n, tehdit edici boyutlar,n,n bulunmas,, tüketici tercihlerini daha güvenli ve do al antimikrobiyel ajanlar,n kullan,lmaz, yönünde de i tirmektedir. Bu do rultuda laktik asit bakterileri gibi insan tüketimi aç,s,ndan güvenli oldu u bilinen bakteriler taraf,ndan üretilen bakteriyosinler, mikroorganizmalarla mücadelede yeni nesil antimikrobiyel ajanlar olarak önem ta ,maktad,r.

Bakteriyosin olan nisin, tip I lantibiyotik grubu içerisinde s,n,fland,r,lmakta ve bir laktik asit bakterisi üyesi olan *Lactococcus lactis* taraf,ndan üretilmektedir. Bu bakteriyosin oldukça geni bir etki spektrumuna sahip olmas, nedeniyle g,da endüstrisinde koruyucu, medikal alanda ise terapötik ajan olarak kullan,lmaktad,r. Nisin FDA taraf,ndan GRAS (nsan ve hayvan tüketiminde güvenilir) ajan olarak tan,mılanm, ve belgelendirilerek (E234) g,da üretiminde kullan,m,na izin verilmi tir. Bu bakteriyosin günümüzde süt ve süt ürünleri, konserve ürünler ve haz,r çorbalar gibi g,dalar,n korunmas,nda ayr,ca di macunu ve sarg, bezlerini içeren çe itli sa l,k ürünlerinde kullan,m, mevcuttur. Ancak nisinin antimikrobiyel ajan olarak kullan,m, halen s,n,rl, düzeydedir. Bu sorunun en temel nedeni ise nisinin üretim maliyetinin yüksek olmas,d,r. Çünkü nisin, üretici hücreler taraf,ndan hem dü ük oranda üretilmekte hem de fermentasyon ortam,na ba l, faktörler nedeniyle üretimi bask,lanmaktadır.

Nisinin endüstriyel olarak üretimi k,saca, üretici su lar,n kesikli veya yar,-kesikli fermentasyon sistemlerinde geli tirilmesi ve bunu takiben hücre taraf,ndan sentezlenen nisinin ortamdaki safla t,r,lmas, ile gerçekte tirilmektedir. Fermentasyon sisteminde zamanla biriken metabolitlerden üretici hücreler olumsuz etkilenmektedir. Ayr,ca geli me ortam, artlar,n,n bozulmas, da hücrelerin yüksek say,lara ula mas,n, engellemektedir. Örne in *L. lactis* hücreleri taraf,ndan üretilen laktik asit, hücreler üzerinde geri yönlü inhibisyon etkisi meydana getirmektedir. Ortamdaki laktat

konsantrasyonunun a ,r, yükselmesi hücrelerde protein denatürasyonunu h,zland,rmakta, ayr,ca *L. lactis* hücrelerinin bu olumsuz fermentasyon ko ulunu tolere edebilmek için yüksek enerji sarfiyat,nda bulunmas,na neden olmaktadır. Bu olumsuzluklar, *L. lactis* hücrelerinde aktif nisin üretim faz,n,n bozulmas,na ve hatta hücre geli iminin yava layarak durmas,na sebep olmaktadır. Bu bilgiler , , ,nda nisin kullan,m,n,n yayg,nla t,r,lmas,n,n yollar,ndan birisi de; daha yüksek nisin üretim verimine ula mak için fermentasyon ortam,nda yüksek say,da üretici hücre say,s,n, art,rmakt,r.

L. lactis hücreleri iki yönlü metabolik faaliyette bulunabilirler. Bu bakteriler geli me ortam,na hemin ilavesi yap,ld, ,nda fermentasyondan aerobik solunuma geçi yaparlar. Çünkü; *L. lactis* hücrelerinin membran yap,s,nda aerobik solunum zinciri için gerekli olan bile enlerin ço u bulunmaktadır. Lakin bu bile enlerden birisi olan sitokrom oksidaz enziminin kofaktörü hemin molekülü, *L. lactis* taraf,ndan sentezlenememektedir. Dolay,s,yla fermentasyon ortam,na hemin ilavesi yap,larak *L. lactis* hücrelerinin aerobik solunuma yönlendirilmesi durumunda, hücrelerin oksijen tolerans,nda, stabilitesinde ve hücre toplam say,s,nda art, sa lanabilmektedir. Bu çal, man,n hipotezini olu turan bu temel kapsam,nda, nisin üreticilerin aerobik solunuma te vik edilmesi ile fermentasyon ortam,nda hem yüksek laktat birikimi engellenecek hem de hücre sel say, ve stabilite art,r,larak daha yüksek nisin üretimine ula mak mümkün olabilecektir.

Bu çal, man,n temel amac,; fermentasyon ortam,na hemin ve oksijenin e zamanl, beslemesi ile *L. lactis* hücrelerinde aerobik solunum yolunu te vik etmek ve bu sayede olu abilecek geri yönlü inhibisyonu da engelleyerek yüksek nisin üretim de erlerine ula abilmektir. Çal, man,n di er bir amac, ise hemin içeren aerobik ko ula sahip yar,-kesikli fermentasyon sisteminde, *L. lactis* hücreleri taraf,ndan yüksek nisin üretimi sa lamak için gerekli olan hemin, oksijen ve glukoz konsantrasyonlar,n, cevap yüzey yöntemi kullanarak optimize etmektir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 Nisin

Nisin, ilk kez İngiltere'de yapılan çal, malarda laktokoklar, n di er laktik asit bakterilerinin geli imlerini inhibe etti inin belirlenmesi sonucu saptanm, t,r (Rogers 1928, Rogers ve Whittier 1928). Bu çal, malarda tan,mlanan antimikrobiyel bile i in ,s, stabil, çözünebilen ve difüze olabilen bir yap,da oldu u belirlenmi tir. Daha sonra Whitehead (1933) bu bile i i izole etmi ve protein yap,s,nda oldu unu kan,tlam, t,r. Mastitis ile mücadele ve II. Dünya sava , s,ras,nda ortaya ç,kan penisilin k,tl, ,, bu bile ik üzerinde ara t,rmalar,n yo unla mas,na yol açm, t,r. İlk kez Mattick ve Hirsch (1944) bu bile i i konsantre etmeyi ba arm, ve birçok bakteri üzerinde antimikrobiyel etkinli e sahip oldu unu saptam, t,r.

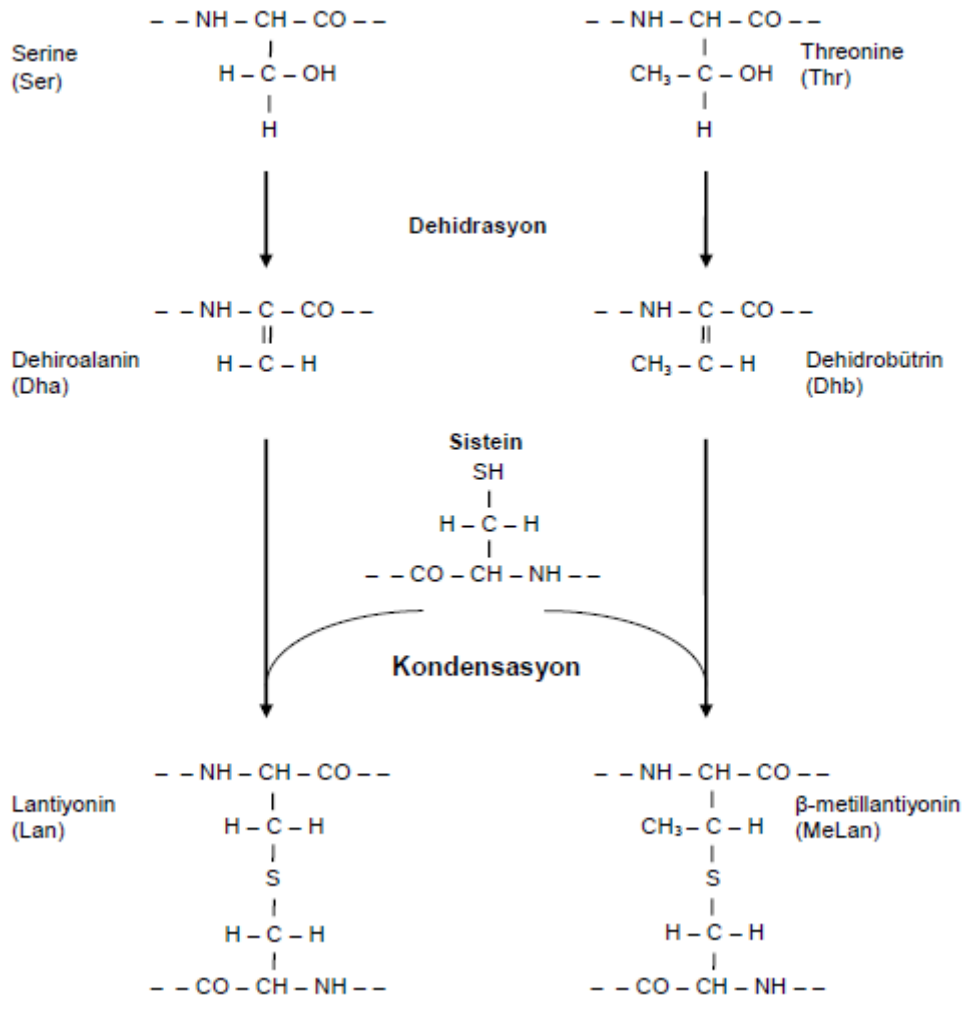
Nisin, ticari önemi nedeni ile en yo un ara t,r,lan lantibiyotik olmu tur. Yap,lan çal, malarda nisinin toksik etkisinin sofr tuzu ile e de er düzeyde (LD50 7 g kg⁻¹ vücut a ,rl,) oldu u tan,mlanm, t,r (Hurst 1981). Hem geni antimikrobiyel kapasitesi hem de insan ve hayvan sa l, ,na kar , olumsuz etki içermemesi bu lantibiyoti i endüstriyel uygulamalarda ön plana ç,kartm, t,r. Nisin FAO/WHO taraf,ndan 1969 y,l,nda güvenli bir do al g,da katk,s, olarak kabul edilmi tir. 1983'te nisin EEC g,da katk, maddeleri listesine dahil edilmi ve E234 kod numaras, verilmi tir. Nisin 1996'dan itibaren Avrupa ülkeleri, Çin ve Amerika ba ta olmak üzere 50'den fazla ülkede yayg,n olarak kullan,lmaktad,r (Delves-Broughton ve di . 1996).

Birçok gram pozitif bakteri nisine kar , duyarlı,d,r. Ancak nisinin gram negatif bakteriler üzerinde de çok dü ük antimikrobiyel etkisi bulunmaktad,r (de Vuyst ve Vandamme 1994). Nisinin gram pozitif bakterilerin vejetatif formlar, yan,nda, *Clostridium* ve *Bacillus* sporlar,na kar , da etkili oldu u saptanm, t,r. Bu karakteristikleri nedeniyle nisin yüksek s,caklıktan etkilenen ya da ,s,l i lem uygulanmayan asidik g,dalarda patojen ya da g,da bozulmas, etmeni birçok bakterinin vejetatif (*Listeria* ve laktik asit bakterilerinin kontamine üyeleri gibi) ve spor formlar,n,n (*Clostridium* ve *Bacillus* sporlar, gibi) inhibisyonu amac, ile kullan,lmaktad,r (Hurst 1981, Abee ve di . 1994, Delves-Broughton ve di . 1996).

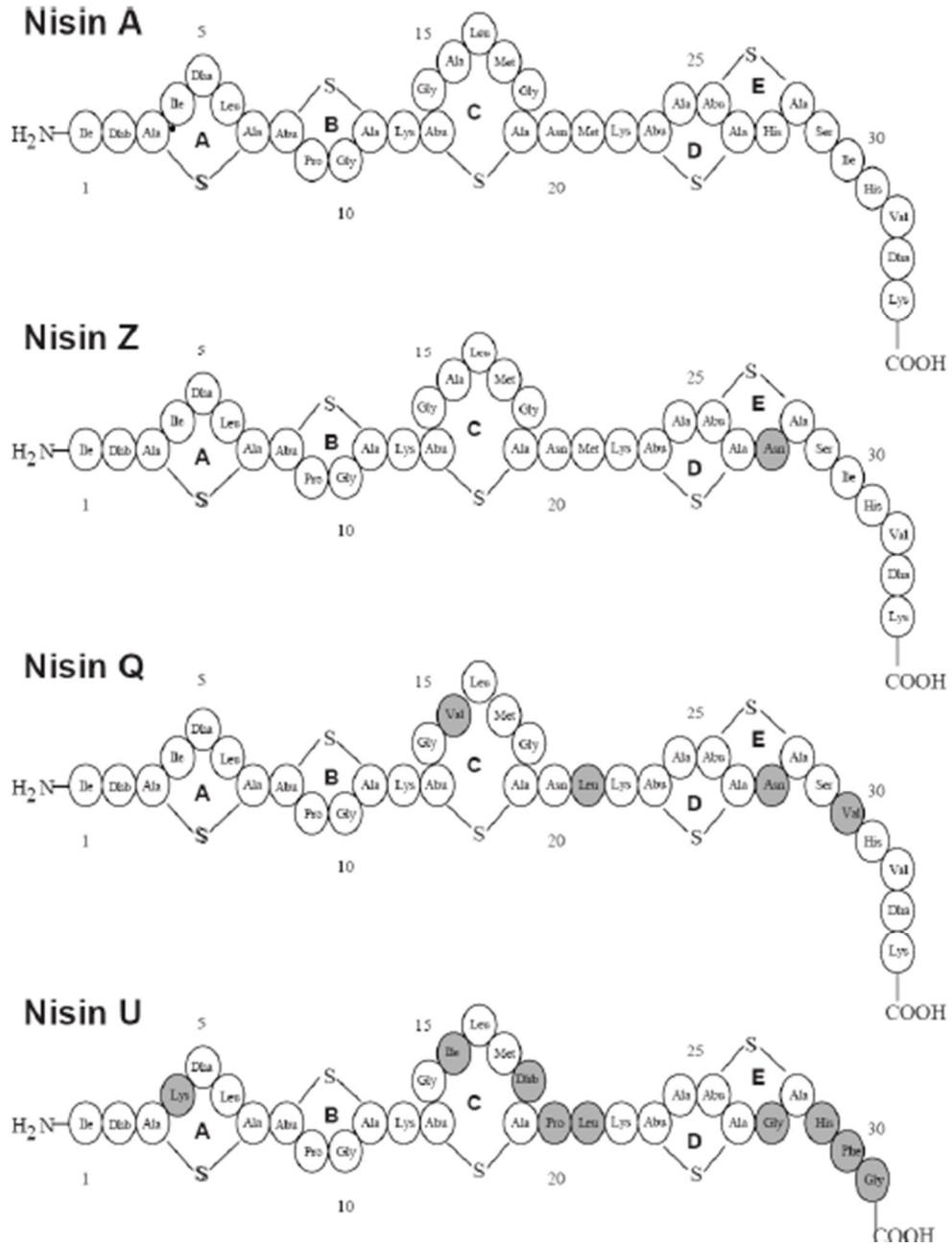
2.2. Nisinin Yapısal Özellikleri

Nisinin primer yapısı, 1971 yılında Gross and Morell tarafından yürütülen çalışmalar neticesinde aydınlatılmıştır. Bu yapı, daha sonra, kütle ve nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi ile desteklenmiştir (Barber ve diğ. 1988, Nielsen ve Roepstorff 1988, van de Ven ve diğ. 1991, van den Hooven ve diğ. 1993). Nisinin moleküler ağırlığı yaklaşık 3350 dalton olup, yapısında 34 amino asit bulunmaktadır. Bu yapıtaşları; lantionin, metillantionin (Met Lan), 2-3 dehidroksialanin (Dha) ve 2-3 dehidroksibutirin (Dhb) gibi nadir rastlanan amino asitlerdir. Nisinin yapısındaki bu lantioninler 5 adet halka yapısını oluşturmaktadır (Bu halkalar A, B, C, D ve E olarak isimlendirilmiştir) (Şekil 2.1 ve 2.2). İçerdiği lantionin köprülerinden dolayı, nisin lantibiyotikler sınıfına dahil edilmiştir (Schnell ve diğ. 1988).

Bugüne kadar nisin A (Gross ve Morell 1971), nisin Z (Graeffe ve diğ. 1991, Mulders ve diğ. 1991), nisin Q (Zendo ve diğ. 2003), nisin U (Wirawan ve diğ. 2006) ve nisin F (Kwaadsteniet ve diğ. 2008) olmak üzere 5 farklı nisin varyantı karakterize edilmiştir (Şekil 2.2). Bu varyantlardan nisin A, Z, U üreticileri süt ve süt ürünlerinden (Gross ve Morell 1971, Graeffe ve diğ. 1991, Mulders ve diğ. 1991), nisin Q üreticisi nehir suyundan (Zendo ve diğ. 2003), nisin F üreticisi (Kwaadsteniet ve diğ. 2008) ise yaygın balıktan izole edilmiştir. Bu varyantlardan yalnızca nisin U, *L. lactis* suşlarında bir bakteri tarafından (*Streptococcus uberis*) üretilmektedir.



ekil 2.1 Do ada nadir bulunan dehidroalanin, dehidrobütirin, lantiyonin, ve -metil lantiyonin amino asitlerin sentez mekanizmas, (Ingram 1970)



ekil 2.2 Nisin A, Z, Q ve U'nun yap,s,.Lantiyonin köprüleri A-E olarak gösterilmi tir. Dha= Dehidroalanin, Dhb= Dehidrobütirin; Ala-S-Ala, lantiyonin; Abu-S-Ala, -metil lantiyonin. Varyantlarda Nisin A'dan farklı olan amino asitler gri tonla işaretlenmiştir (Gross ve Morell 1971, Chatterjee ve di . 2005, Wirawan ve di . 2006).

Nisin varyantlar, aras,ndaki temel farkl,l,k, primer yap,da baz, pozisyonlar,nda görülen amino asit de i imleridir. Nisin Z, nisin A'dan farkl, olarak 27. pozisyonda histidin yerine asparajin aminoasitini içermektedir (Graeffe ve di . 1991, Mulders ve di . 1991). Nisin Q'da nisin Z'ye göre üç amino asit (Val 15, Leu 21, Val 30) bak,m,ndan farkl, bulunmu tur. Bugüne kadar bu varyant üreticisi olan sadece bir su tan,m,lanm, t,r (Zendo ve di . 2003). *Streptococcus uberis* taraf,ndan üretilen nisin U; yayg,n rastlan,lan 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) bak,m,ndan farkl,l,k göstermektedir. Ayr,ca di er varyantlardan farkl, olarak 34 aminoasit yerine 31 amino asit içermektedir. Bununla birlikte bu varyantta da modifiye amino asitlerin ve lantiyonin köprülerinin yerle imi, di er varyantlarla benzerdir. Son olarak yay,n bal, , izolat, olan *L. lactis* taraf,ndan üretilen nisin F, nisin A ve nisin Z'den sadece 30. pozisyondaki aminoasitin valin olmas,yla farkl,la m, t,r. Ancak bu varyanta ait lantiyonin köprülerinin yerle imi henüz ayd,nlat,lmam, t,r (Gross ve Morell 1971, Graeffe ve di . 1991, Mulders ve di . 1991, Zendo ve di . 2003, Wirawan ve di . 2006, Kwaadsteniet ve di . 2008).

Üç farkl, grup taraf,ndan yürütülen NMR çal, malar, neticesinde nisin molekülünün oldukça esnek bir yap,da oldu u saptanm, t,r (Slijper ve di . 1989, Chan ve di . 1989, Palmer ve di . 1989). Nisin yap,s,ndaki B, D ve E halkalar,nda yer alan 1. ve 4. amino asitlerin tiyoeter ba , ile ba lanmas, sonucu dönü pozisyonlar, olu maktad,r. A ve C halkalar, ise de i ken yap,lar göstermesi nedeniyle net olarak tan,m,lanamam, t,r.

Nisin molekülü oldukça esnek olmas,na ra men, sulu ortamda amfipatik yap,da iki farkl, bölge içermektedir. Birinci bölge A, B, C lantiyonin halkalar,n, içeren Ala 3-Ala 19 amino asitlerinden di eri ise birbirine sar,lm, D ve E lantiyonin halkalar,n, içeren Ala 23-Ala 28 amino asitlerinden meydana gelmi tir. N- ve C- uçlar, ayr,ca öABCö ve öDEö bölgelerini birle tiren ve Met 21 pozisyonunda bulunan esnek bir ömente eö yap,s,na sahiptir. Nisin molekülünde hidrofilik ve yüklü amino asitler ço unlukla C- uçta yer al,rken, N- uçtaki aminoasitlerin önemli bir k,sm, hidrofobik yap,dad,r. Burada sadece Lys 12 yüklü bir amino asittir. Bu nedenle nisin molekülünün amfipatik özelli inden söz etmek olas,d,r (Palmer ve di . 1989).

van den Hooven ve di erleri (1993) nisin moleküllerini sodyum dodesil sülfat (SDS) ve dodesil fosfokolin (DPC) misellerine tutundurarak, molekülün ba lanma

özelliklerini ara t,rm, t,r. Molekülün misellere ba lanmas,, nisin molekülünün antimikrobiyel etkisinde ilk basamak olan sitoplazmik membrana ba lanmas,,n,n modelini olu turmu tur. Ara t,rma sonuçlar,, nisinin misellere ba land, ,nda amfipatik özelli inin devam etti ini ve bu tutunman,, A halkas, üzerinde konformasyonel bir de i ikli i tetikledi ini göstermi tir.

2.3 Nisinin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Nisin molekülü katyonik özellikte olup, nisin A α ,n pozitif net yükü 5, di er varyantlar,,n,n ise 4 α tür. Bu moleküllerin tümü alkali ortamda izoelektrik noktaya sahiptir (Jung 1991). Nisin molekülü, yap,s,nda aromatik amino asitlerin bulunmamas, nedeniyle 260 nm ve 280 nm dalga boyunda , ,k absorpsiyonu göstermez. Nisin molekülünün stabilitesi, çözünürlü ü ve biyolojik aktivitesi, pH de erinin art, ,yla birlikte azalmaktad,r. Özellikle alkali ortamlarda çözünürlü ü tamamen dü mektedir. Örne in ticari kullan,m, bulunan nisin A α ,n çözünürlü ü pH 2 α de 57 mg mL⁻¹ iken, pH 6 α da 1.5 mg mL⁻¹öye dü mektedir. pH 8.5 α n üzerinde ise bu de er 0.25 mg mL⁻¹ civar,ndad,r (Hurst 1981, Liu ve Hansen 1990). Alkali ortamlarda, molekül içi veya moleküller aras, kimyasal modifikasyonlar nedeniyle, nisin molekülünde geri dönü ümsüz inaktivasyon meydana gelmektedir. Özellikle hidroksil (OH⁻) iyonlar,,n,n etkisiyle dehidro amino asitler modifiye olabilmektedir (Liu ve Hansen 1990). Nisin Z ve nisin Q, nisin A α ya göre daha fazla çözünebilme yetene indedir. Bu durum asparajin amino asitinin histidine göre daha fazla hidrofilitik özellikte olmas,ndan kaynaklanmaktad,r (Davies ve di . 1998). Nisin, pH 2 α de aktivite kayb, olmadan sterilize edilebilir. Ancak, pH 5 α de % 90 α dan fazla aktivite kayb, meydana gelir. Ayr,ca nisin molekülü -kimotripsin ve proteinaz K uygulamas,na kar , duyarlı,d,r (de Vuyst ve Vandamme 1994, Motlagh ve di . 1991).

2.4 Nisin Üretimini Etkileyen Faktörler

Öncü nisin molekülü, *L. lactis* hücreleri taraf,ndan aktif büyüme faz,,n,n ba ,nda sentezlenmekte ve logaritmik üreme faz,,n,n sonunda üretim düzeyi en yüksek seviyelere ç,kmaktad,r (de Vuyst ve Vandamme 1992, de Vuyst ve Vandamme 1993). Bu durum nisin molekülünün ikincil metabolit davran, göstermesine ra men asl,nda primer metabolit kineti ine sahip olu unu ispatlamaktad,r. Nisin üretim miktar, olu an biyokütle miktar, ile do ru orant,l,d,r. Bu nedenle; biyokütle olu umunda önemli olan tüm faktörler (pH, karbon, azot ve

fosfat kaynaklar,, katyonlar ve s,cakl,k de erleri ile ortamda olu an nisin miktar, vb.) nisin üretimi üzerinde de etkilidir. (de Vuyst ve Vandamme 1992, de Vuyst ve Vandamme 1993, Matsusaki ve di . 1996, Bertrand ve di . 2001, Lv ve di . 2004^a, Lv ve di . 2004^b, Pongtharangkul ve Demirci 2006, Gonzales ve di . 2010, Fan ve di . 2012).

2.4.1 Karbon kayna ,

Fermentasyon ortamlar,nda seçilen karbon kayna ,n,n türü, do rudan hücre geli imini te vik etmesi ve buna ba l, olarak da nisin üretimini etkilemesi yönünden önemli bulunmu ve bu konu ile ilgili literatürde birçok çal, ma yap,lm, t,r (de Vuyst ve Vandamme 1992, Lv ve di . 2004^a). Karbon kayna ,n,n geli me ortam,nda yüksek oranda bulunmas,, mikrobiyal geli me ve nisin üretimi üzerinde bask,lay,c, etki yapmaktad,r. Bu nedenle farklı eker türlerine ve bunlar,n ba lang,ç konsantrasyonlar,na ba l, olarak, nisin üretim miktar, de i ebilmektedir (Pongtharangkul ve Demirci 2006). Birçok ara t,rmac,, sakkaroz ve laktoz ba ta olmak üzere; glukoz, galaktoz, ksiloz, maltoz ekerlerini içeren farklı besiyeri ortamlar,n, kullanarak, nisin üretim düzeylerini ve nisin biyosentezinin moleküler detaylar,n, incelemi tir (de Vuyst ve Vandamme 1992, Amiali ve di . 1998, Chandrapati ve Oøullivan 2002, Lv ve di . 2004^a, Lv ve di . 2005, Cheigh ve Pyun 2005, Pongtharangkul ve Demirci 2006).

Nisin üretimi ile sakkaroz fermentasyonu aras,ndaki ili ki, ilk olarak 1951'de Hirsch and Wheater taraf,ndan tan,mılanm, t,r (de Vuyst ve Vandamme 1992, Lv ve di .2004^{a,b}, Cheigh ve di . 2002). de Vuyst ve Vandamme (1993) taraf,ndan yürütölen bir çal, mada 27 farklı *L. lactis* subsp. *lactis* su unda nisin üretim kapasiteleri incelenmi ve sakkaroz fermentasyon yetene inin nisin üretimi ile ba lant,lı oldu u gösterilmi tir. pH kontrollü ko ullarda sakkaroz konsantrasyonu 10 g L⁻¹ -den 40 g L⁻¹ -ye ç,kar,ld, ,nda en yüksek nisin miktar, 3267 IU mL⁻¹ olarak hesaplanm, t,r. 40 g L⁻¹ -nin üzerindeki konsantrasyonlarda ise sakkarozun nisin üretimi üzerinde bask,lay,c, etki olu turdu u sonucuna ula m, lard,r.

Lv ve di erleri (2005) kesikli ve yar, kesikli fermentasyon sistemlerinde sakkarozun nisin üretimi ve hücre geli imi üzerine etkisini ara t,rd,klar, bir çal, mada; kesikli sistemde ba lang,ç sakkaroz konsantrasyonunun 30 g L⁻¹ öyi a mas, durumunda, nisin aktivitesinin h,zlı, bir dü ü gösterdi ini, ancak biyokütle

miktar, bu durumdan etkilenmedi ini saptam, t.r. Temel besiyerine % 0.5 sakkaroz ilavesini esas alan bir di er çal, mada ise kontrolsüz ko ullarda 2048 IU mL⁻¹ nisin miktar,na ula ,lm, t,r (Cheigh ve di .2002).

Nisin üretiminde yaygın olarak kullanılan di er bir karbon kayna , ise laktozdur. Nisin üretici *L. lactis* su lar, do al habitat, süt olmas,, laktozu di er karbon kaynaklar,ndan daha avantajlı k,lmaktad,r. Ayr,ca süt ve süt ürünlerinin i lenmesinden aç, a ç,kan peyniralt, suyunun nisin üretiminde kullan,m olanaklar, birçok ara t,r,c, taraf,ndan çal, ,lm, ve nisin biyosentezinin bu ortamdaki davran, , belirlenmi tir. (Bertrand ve di . 2001, Cheigh ve di . 2002, Liu ve di . 2003). Nisin üretimi üzerine farklı ekerlerin etkisinin k,yasland, , bir çal, mada, en yüksek verimin laktoz varl, ,nda meydana geldi i saptanm, t,r. Bu çal, mada, temel besiyerine % 0.5 oran,nda laktoz ilave edilmesi sonucu 16384 AU mL⁻¹ nisin verimi sa lanm, t,r. Ayn, denemenin sakkaroz, glukoz ve galaktoz varl, ,nda yürütülmesi halinde ise 8 kat daha dü ük de erler elde edilmi tir (Cheigh ve di . 2002). Benzer ekilde, laktoz içeren peynir alt, suyunun kullan,ld, , kesikli ve sürekli fermentasyon sistemlerinde nisin üretimindeki verimin 460620500 IU mL⁻¹ aras,nda gerçekleşti i tespit edilmi tir (Amiali ve di . 1998, Desjardins ve di . 2001, Bertrand ve di . 2001, Liu ve di . 2005).

Mitra ve di erleri (2010) yapt,klar, bir çal, mada soya kesi i suyunun nisin üretiminde alternatif karbon kayna , olarak kullan,labilirli ini ara t,rm, lar, kontrol grubu olarak Man-Rogosa-Sharpe (MRS) haz,r s,v, besiyerini kullanarak fermentasyon gerçekle tirmi lerdir. Çal, ,lan gruplar aras,nda elde edilen biyokütle ve nisin verimleri k,yasland, ,nda, soya kesi i suyunda hücre kuru a ,rl, , ve nisin üretimi s,ras,yla 2,18 g L⁻¹, 619,2 mg L⁻¹ (24767 IU mL⁻¹) iken, MRS broth ortam,nda bu de erler 2.17 g L⁻¹ ve 672 mg L⁻¹ olarak bulunmu tur. Sonuç olarak alternatif substrat kayna , olabilmesi aç,s,ndan daha önce denemeleri yap,lm, olan peyniralt, suyu (92,9 mg L⁻¹), cull patates (88,7 mg L⁻¹), arpa özütü (1233 IU/ml) ve hidrolize ni asta (1600 IU/ml) dan daha fazla nisin üretim verimine ula ,lm, t,r.

2.4.2 Azot kayna ,

Nisin üreticisi *L. lactis* su lar,, geli ebilmeleri ve nisin üretebilmeleri için, çok say,da organik ve inorganik bile i e ihtiyaç duyarlar. Organik bile ikler içerisinde azot kaynaklar,, hücrelerin geli ebilmeleri için hayati rol oynamaktad,r.

Özellikle laktokok su lar,; besin ortam,nda maya özütü, proteaz pepton, kazein pepton gibi kompleks azot kaynaklar,n,n bulunmas, halinde iyi bir geli me göstermektedir. Bakteriyel geli imdeki önemleri nedeniyle çe itli azot kaynaklar,n,n, özellikle peptitlerin ve amino asitlerin nisin üretimi üzerine etkileri, yo un bir ekilde çal, ,lm, t,r (de Vuyst ve Vandamme 1993, de Vuyst 1995, Kim ve di . 1997, Cheigh ve di . 2002, Li ve di . 2002, Vazquez ve di . 2004). Bu yönde yap,lan ilk çal, mada, de Vuyst ve Vandamme (1993) farkl, azot kaynaklar,n, % 2 sakkaroz bulunan besiyerinde % 1 oran,nda kullanm, t,r. Çal, mada maya özütü, pepton, et özütü, kan, bal,k ve soya unlar,n,n kullan,lmas, durumunda, yüksek nisin üretimi ve biyokütle olu umunun gerçekleşti i belirlenmi tir. En yüksek nisin üretimi % 3 pamuk çi iti ve % 4 soya ununun kullan,lmas,yla elde edilmi tir (2500 IU mL⁻¹). Bu çal, mada kazein hidrolizat,, m,s,r unu ve malt özütü ise nisin üretimi için uygun azot kaynaklar, olarak tan,m lanmam, t,r.

Nisin yan,nda di er bakteriyosinlerin üretimi üzerine de etkili oldu u tespit edilmi bir di er azot kayna , ise maya özütüdür (de Vuyst 1995, Kim ve di . 1997). Maya özütünün M17 laktoz besiyerine %1 oran,nda ilave edilmesi durumunda, di er azot kaynaklar,na göre 2 kat daha fazla nisin üretiminin meydana geldi i belirlenmi tir. Ayr,ca maya özütü oran,n,n %1'den %3'e ç,kar,lmas, durumunda, nisin üretiminin ilave özüt oran, ile paralel bir ekilde yükseldi i, ancak bu seviyeden sonra üretimin sabitlendi i tespit edilmi tir. Bu nedenle maya özütünün nisin üretimi için tek ba ,na ideal azot kayna , olabilece i ileri sürülmü tür (Cheigh ve di . 2002). Maya özütü; serbest amino asitler ve k,sa peptitlere ilave olarak, hücre geli iminde önemli faktörleri de içerdi i için, nisin üretiminde di er azot kaynaklar,ndan daha etkin bulunmu tur (de Vuyst 1995, Cheigh ve di . 2002).

Nisin üretiminde farkl, özellikteki aminoasitlerin de etkili oldu u belirlenmi tir (de Vuyst 1995, Vazquez ve di . 2004). Öncü peptitte yer almayan amino asitlerin (aspartik asit, glisin, hidroksi-prolin, lisin, fenilalanin, prolin, triptofan ve tirozin) sentetik besiyerinde % 0.1 oran,nda kullan,lmas, durumunda, hücre geli iminin ve nisin üretiminin de i medi i tespit edilmi tir. Hatta prolin, hidroksiprolin, aspartik asit ve lisinin nisin üretimini durdurdu u saptanm, t,r. Ayn, çal, mada öncü peptitte yer alan amino asitlerin (serin, treonin ve sistein) hücre yo unlu u ve nisin üretim seviyesi üzerine etkili oldu u ve sentetik besiyerinde % 0.1 oran,nda kullan,lmalar, durumunda nisin üretim düzeyini % 50 oran,nda art,rd,klar,

belirlenmi tir. Ancak ayn, amino asitlerin ba lang,ç konsantrasyonlar,n,n % 0.5 α geçmesi durumunda üretici hücrelerin geli imi engellenmi tir (de Vuyst 1995). Klasik yöntemlerle sürekli nötralize edilen sistemlerde yürütülen nisin üretimlerinde, sistein ve triptofan,n aktivatör, prolinin ise bask,lay,c, rolünün oldu u saptanm, t,r (Vazquez ve di . 2004).

2.4.3 norganik bile ikler

Nisin üretimi üzerine etkisi denenen ilk inorganik bile ik fosfat olmu tur. de Vuyst ve Vandamme (1993) çal, malar,nda, farkl, fosfat kaynaklar,n,n kesikli sistemlerde nisin üretimi üzerindeki etkilerini ara t,rm, t,r. Bu fosfat kaynaklar, içinde KH_2PO_4 ın en etkili bile ik oldu u tespit edilmi tir. KH_2PO_4 ın ba lang,ç konsantrasyonunun % 5 düzeyinde kullan,m, ile nisin aktivitesinin 3500 IU mL^{-1} gibi yüksek bir de ere ula t, , saptanm, t,r. Ancak bu seviyeden sonra hem nisin miktar, hem de biyokütle olu umu h,zla azalm, t,r. Yap,lan ba ka bir çal, mada ise ayn, KH_2PO_4 konsantrasyonlar,n,n *L. lactis* IO-1 su unda nisin Z üretimi üzerinde etkili olmad, , belirlenmi tir. Ayn, çal, mada KH_2PO_4 ın aksine, 0.1-0.2 M CaCl_2 ilavesinin nisin Z üretiminde % 20 art, a neden oldu u saptanm, t,r. Ayr,ca % 0.1 (v/v) Tween 80ın kullan,lm,as, sonucu nisin aktivitesinde % 30 art, tan,m,lanm, t,r (Matsusaki ve di . 1996).

Nisin üretiminde fosfat,n temel rolü, ortam, tamponlam,as, ve hücre geli im ajan, olarak i lev görmesi ile aç,klanmaktad,r (de Vuyst ve Vandamme 1992, Li ve di . 2002, Liu ve di . 2003). Nitekim yüksek fosfat konsantrasyonu ATP olu umunu te vik ederek hücrelerin yüksek enerji seviyesinde bulunmas,n, sa lamaktad,r. Ca^{+2} ın nisin üretimindeki etkisi ise öncü nisin molekülünü modifiye eden enzimlerden NisP peptidazlar,n aktivasyonuna yol açmas,ndan kaynaklanmaktad,r. Çünkü bu enzimler üzerinde Ca^{+2} iyonlar,n,n ba lanabilece i bölgeler bulunmaktad,r. Di er taraftan Ca^{+2} iyonlar, üretici su larda lipit membran bütünlü ünün korunmas,nda da rol almaktad,r. Bilindi i gibi fosfolipit yap,lar lantibiyotiklerin temel hedef bölgeleridir (Matsusaki ve di . 1996). Tween 80, üretilen nisinin ortamdaki çeperele tutunmas,n, engelleyerek çözünürlü ünü art,r,makta ve bu yolla nisin üretimini te vik etmektedir (Liu ve di . 2005).

2.4.4 pH

Nisin üretiminde de, di er bakteriyosinler ile benzer ekilde, optimal pH aral, , 5.5-6.8 olarak saptanm, t,r (de Vuyst ve Vandamme 1992, Matsusaki ve di . 1996, Cheigh ve di . 2002, Liu ve di . 2005, Pongtharangkul ve Demirci 2006). *L. lactis* IO-1 su u için ksiloz bulunan ortamda en verimli nisin üretimi pH 6.0da gerçekte irken, glukoz bulunan ortamda bu de ere pH 5.5te ula ,lm, t,r (Matsusaki ve di . 1996). *L. lactis* A164 su unun kullan,ld, , bir di er çal, mada ise laktoz içeren ortamda en yüksek nisin üretimi pH 6.0da gözlenmi tir (Cheigh ve di . 2002).

Bakteriler geli me ortam,ndaki yüksek pH de i imlerinde canl,l, n, koruyabilse de, birçok metabolik yol için optimal olan sitoplazmik pHn,n nötral de erlerden uzakla mas, olumsuz durum yaratmaktad,r. Bu nedenle birçok asit toleransl, laktik asit bakterisinde oldu u gibi *L. lactis* hücrelerinde de iç pH, d, pHdaki dü ü e ba l, olarak 5615 dakika içinde ayarlanmakta ve böylece sabit bir pH gradiyenti sa lanmaktad,r (Siegumfeldt ve di . 2000). Ancak dü ük pH seviyelerinde metabolizmaya ait baz, enzimler inhibe edilmektedir. Ayr,ca hücre geli mi ekerlerin katabolizmas, sonucu olu an enerjinin ATPaz taraf,ndan sitoplazmik alkalizasyonda kullan,lm,as, nedeni ile tamamen durmaktad,r (Even ve di . 2002). Nitekim Guerra ve Pastrana (2003) *L. lactis subsp. lactis*te d, ortam pHn,n 5n alt,na dü mesi sonucunda hem hücre geli minin hem de nisin üretiminin durdu unu saptam, t,r.

Nisin üretimi ile ortam pHn, aras,ndaki ilginç bir di er ili ki; ortam pHn,n nötral pHya yakla mas, durumunda üretilmi olan nisinin üretici su un hücre membran,na tutunmas,d,r. pHn,n 6ya ayarlanmas, ile nisinin; üretici su un membran yap,s,n,n katyonik do as,na ba l, olarak, hücre duvar,na tutundu u belirlenmi tir. Ayn, ortamda pHn,n 5n alt,na dü ürülmesi durumunda ise hücre duvar,na tutunan nisinin tekrar ortama sal,nd, , saptanm, t,r (Yang ve di . 1992, Guerra ve Pastrana 2003).

2.4.5 Nisin miktar,

Nisin üretimi ortamda yüksek konsantrasyonda nisin bulunmas, durumunda inhibe olmaktad,r. Bu durum üretici su larda maksimum dirençlili in sa lanabildi i bir s,n,r de erin bulunmas,ndan kaynaklanmaktad,r (Kim ve di . 1997, Qiao ve di .

1997, Kim ve di . 1998). Örne in *L. lactis* N8 ve LAC48 su lar,n,n dirençlilik gösterebildi i maksimum nisin de erleri s,ras,yla 1000 IU mL⁻¹ ve 5000 IU mL⁻¹ olarak ölçülmü tür (Qiao ve di . 1997). Nisin miktar,n,n etkisi en fazla kesikli ve yar, kesikli fermentasyonlar,n son evresinde görülmektedir. Nitekim birçok çal, mada nisin üretiminin ula ,lan maksimum de erden sonra dü tü ü belirlenmi tir. Bu durumun en önemli nedenlerinden biri, dura an fazda bulunan hücrelerin yüksek nisin konsantrasyonlar,ndan etkilenmesidir (de Vuyst ve Vandamme 1992, de Vuyst ve Vandamme 1993, Matsusaki ve di . 1996, Bertrand ve di . 2001, Lv ve di . 2004^{a,b}, Pongtharangkul ve Demirci 2006).

2.4.6 Oksijen

Nisin üretimini etkileyen bir di er faktör ise üretici su un bulundu u fermentasyon ortam,n,n aerobik veya anaerobik ko ullara sahip olmas,d,r. Laktik asit bakterileri aerobik ortamlarda geli tiklerinde kar ,la t,klar, oksidatif stresi tolere edebilme kabiliyetlerine sahiptirler. Ancak ortamda var olan oksijenin nisin A (Hurst 1981) ve laktosin S₀inin (Mortvedt-Abildgaard ve di . 1995) de içinde bulundu u birçok bakteriyosinin üretiminde olumsuz etkilere neden oldu u da rapor edilmi tir.

Buna kar ,n, *Lactobacillus amylovorus* taraf,ndan üretilen amilovorin ve *L. lactis* taraf,ndan üretilen nisin Z miktarlar,nda oksijen içeren ortamlarda art, saptanm, t,r (de Vuyst ve di . 1996, Chinachoti ve di . 1997). Sitrat pozitif olan *L. lactis*ın NADH oksidaz enzimini kullanarak NADH₂ı, NAD⁺ya okside edebilmesinin (Bassit ve di . 1993) bakteriyosin üretimi üzerinde önemli etkisi bulunmaktadır (de Vuyst ve di . 1996, Amiali ve di . 1998, Cabo ve di . 2001, Jensen ve di . 2001, Neves ve di . 2002, Papagianni ve di . 2012). Ayr,ca; oksijen içeren ortamda proteolitik enzimlerin aktivitelerinde gerçekle en azalmalar sayesinde, aerobik ko ullarda üretilen nisinin bu enzimlerin zararlı etkilerinden daha fazla korunmas, sa lanmaktadır.

*L. lactis*ın kesikli fermentasyonu süresince nisin üretim miktar,ndaki de i imin geli me ortam,n,n çözünümü oksijen yüzdesi ile ilgisinin ara t,r,ld, , bir çal, mada, %60 çözünümü oksijen içeren ortamda gerçekle tirilen kesikli fermentasyonda kontrol grubuna oranla 8 kat daha yüksek nisin verimi (40960 AU mL⁻¹) elde edilmi tir (Amiali ve di . 1998). Ortamda biriken laktik asit konsantrasyonunda da kontrol ortam,na k,yasla %33 azalma oldu u, di er yandan

asetik asit, asetoin ve etanol konsantrasyonlarında ise art, lar oldu u gözlemlenmi tir.

2.5 Nisin Üretim Yöntemleri

Nisin üretimi ilk olarak kesikli sistemlerle çal, ,lm, t,r (de Vuyst ve Vandamme, 1992). Daha yüksek ürün verimi elde etmek amacıyla devam eden ara t,rmalarda yar,-kesikli ve sürekli sistemler olu turulmu ve denenmi tir (Hull ve Gibbson 1997, Amiali ve di . 1998, Guerra ve Pastrana 2001, Sonomoto ve di . 2000, Scannell ve di . 2000, Desjardins ve di . 2001, Tolonen ve di . 2004). Bu yeni sistemler olu turulurken nisin üretimi üzerine etkili olan substrat kompozisyonu, sıcaklık, pH ve ortamda biriken nisin miktar, gibi faktörler göz önünde bulundurulmu tur. Bu faktörlerden nisin üretimi üzerinde olumsuz etki olu turabilecek stres ko ullar, uygun modifikasyonlarla en aza indirgenmeye çal, ,lm, t,r. Üretici su un canlı, ,n,n ve gelişiminin art,r, lmas,, fermentasyon ortam,n,n kompozisyonundaki de i iklikler ve ortamda biriken metabolitlerin uzakla t,r, lmas, gibi konular bu modifikasyonlardan baz, lar, d,r (Hull ve Gibbons 1997, Kim ve di . 1997, Shimizu ve di . 1999, Bertrand ve di . 2001, Yu ve di . 2002, Guerra ve Pastrana 2003, Lv ve di . 2004^{ab}, Tolonen ve di . 2004, Liu ve di . 2005, Pontharangkul ve Demirci 2006, Papagianni ve di . 2007, Wu ve di . 2009).

2.5.1 Kesikli sistemler

Kesikli sistemlerde nisin üretimi ilk kez Hirsch ve Wheeler tarafından, 1951'de çal, ,lm, t,r. Bu sistemlerde nisin üretimi hücre üremesi ile ba lant, l, olarak artmaktad,r. de Vuyst ve Vandamme (1992) tarafından ba lang,ç eker konsantrasyonunun 10 g L⁻¹ sakkaroz olarak alınd, , kesikli fermentasyonda *L. lactis* subsp. *lactis* NIZO 22186 su unun üssel fazda (4-8. saatler aras,) 0.66 h⁻¹ oran,nda h,zl, bir hücre gelişimi gösterdi i ve buna ba l, olarak nisin üretiminin de yükselerek 1400 IU mL⁻¹ de erine ula t, , belirlenmi tir. Ancak aynı, fermentasyonun 8. saatinden sonra hücre üremesinin durdu u ve nisin üretiminin de azalmaya ba lad, , tespit edilmi tir. Kesikli sistemler hücrelerin do al gelişim e rilerini gösterdikleri ortamlard,r. Bu nedenle fermentasyon ortam,nda tükenen besin elementleri ve olu turulan metabolitler üretici hücre üzerinde oldukça etkilidir. Ba lang,ç sakkaroz konsantrasyonunun 40 g L⁻¹ öye yükseltildi i di er uygulamalarda biyokütle gelişimi 2.1 g kuru a ,rl,k L⁻¹ den 4.1 g kuru a ,rl,k L⁻¹ öye kadar yükselme ve 2371 IU mL⁻¹

nisin aktivitesine ula ,lm, t,r (Lv ve di . 2004^b). Ancak karbon kayna ,n,n art,r,lmas, bile üremenin durma faz,nda meydana gelen nisin üretimindeki dü ü ü engelleyememektedir. pH kontrollü kesikli sistemlerde sakkarozun karbon kayna , olarak kullan,lmas,yla 2.34 g kuru a ,rl,k L⁻¹ hücre yo unlu u elde edilirken, nisin aktivitesi 1793 IU mL⁻¹ olarak ölçülmü tür. Üremenin durma faz,n,n sonunda görülen büyük azalma ise k,smen engellenmi tir (de Vuyst ve Vandamme 1992). Benzer ko ullarda *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 su unun kullan,lmas, durumunda, üretilen nisin miktar, 2658 IU mL⁻¹ olmu tur (Lv ve di . 2005).

2.5.2 Yar,-kesikli sistemler

Spesifik nisin üretimin art,r,lmas, ve üretici su lar,n aktif faz,n,n uzat,labilmesi amac,yla yar,-kesikli fermentasyon sistemleri devreye sokulmu tur (Kim ve di . 1997, Amiali ve di . 1998, Guerra ve Pastrana 2003, Lv ve di . 2004^{a,b}, Papagianni ve di . 2007). Bu sistemlerde; di er üretim teknolojileri için ba lang,çta olmas, gereken yüksek besin konsantrasyonu ve fermentasyon süresince olu an laktik asit miktar,n,n üretici su üzerindeki olumsuz etkisinin azalt,lmas, hedeflenmi tir (Lv ve di . 2004^{a,b}). Daha önce de ifade edildi i gibi karbon kayna ,n,n regülasyonu, hücre geli imini ve nisin biyosentezini do rudan etkilemektedir (de Vuyst ve Vandamme 1992). Bu yakla ,mla yürütülen bir çal, mada besleme çözültisi, 300 g L⁻¹ ve 135 g L⁻¹ sakkaroz ve NaOH ilavesi ile haz,rılanm, t,r. Fermentasyon süresince son sakkaroz konsantrasyonu 40 g L⁻¹ olacak ekilde bu çözültiden besleme yap,lm, t,r. Çal, mada en yüksek biyokütle oran, 4.2 g kuru a ,rl,k L⁻¹ olarak elde edilirken, 5010 IU mL⁻¹ gibi oldukça yüksek nisin aktivitesine ula ,lm, t,r. Karbon kayna ,n,n kontrollü olarak beslendi i glukostat bir çal, mada; ortamda 10 g L⁻¹ glukozun bulunmas, halinde 6100 IU mL⁻¹ gibi yüksek nisin üretim verimine ula ,ld, ,, 25 g L⁻¹ glukoz oran,n a ,lmas, durumunda ise verimin h,zla dü tü ü rapor edilmi tir (Papagianni ve di . 2007). Yar, kesikli fermentasyonda karbon kayna , besleme h,z,n,n belirlenmesini hedefleyen bir di er çal, mada, 190 g L⁻¹ sakkaroz içeren çözültiden fermentör ortam,na saatte 10 mL beslendi inde, nisin üretim oran,n,n kesikli üretime göre % 51 art, gösterdi i belirlenmi tir (Wu ve di . 2008). Fakat kesikli sistemlerde görülen maksimum verimden sonraki dü ü bu sistemde de meydana gelmi tir (Lv ve di . 2004^a). Nisin üretim miktar,nda meydana gelen dü menin temel kayna ,, nötralizasyondan dolayı olu an laktat,n ve ortamda biriken nisinin üretici hücre üzerinde olu turdu u

olumsuz etkidir (Hull ve Gibbons 1997, Shimizu ve di . 1999, Tolonen ve di . 2004). % 1 glukoz içeren minimal besiyeri ortamında, *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 su u 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 ve Gibbons 1997). Fermentasyon esnasında üretici su tarafından oluşturulan laktik asidin üretici hücreler üzerindeki inhibisyon rolünün minimizasyonuna yönelik olarak tasarlanan bir çalışmada ise kefirden izole edilen *Kluyveromyces marxianus* mayasını kullanarak, önerilmiştir. Uygulama neticesinde saf kültürün kullanıldığı, kontrol grubunda 2320 IU mL⁻¹ nisin aktivitesi elde edilirken, mayasını kullandığı, kesikli fermentasyon sisteminde 3920 IU mL⁻¹ nisin aktivitesine ulaşılmıştır (Shimizu ve di . 1999).

2.2.3 Sürekli sistemler

Biyokütle miktarının artması ile hacimsel nisin üretim miktarındaki yükselmenin birbirine paralel olduğu, sistemlerde üretim sürekliliğinin uzatılması, için immobilize hücre teknolojisi fikrini doğurmuştur. Bu amaçla nisin üreticileri su lar kademeli bir şekilde çoğaltılarak çeşitli destek materyallerine immobilize edilmiş ve de iğ özellikte biyokatalistler oluşturulmuştur. Ayrıca sürekli besleme ve ürün çıkışı, sağlanarak sürekli nisin üretim denemeleri gerçekleştirilmiştir (Wan ve di . 1995, Scannell ve di . 2000, Sonomoto ve di . 2000, Desjardins ve di . 2001, Bertrand ve di . 2001). Bu denemelerde hücre immobilizasyonunun etkin olarak yapılabileceği, besin akışının hızı oldu u ve yüksek stabiliteye sahip destek materyallerinin kullanıldığı, sistemlerin geliştirilmesi üzerinde durulmuştur. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda kullanılan model sistemlerde elde edilen en yüksek hacimsel nisin üretimi, immobilize hücre teknolojisi kullanılması, ve hücrelerin saatte bir yeni ortama alınması, durumunda sağlanmıştır (Bertrand ve di . 2001, Amiali ve di . 1998, Desjardins ve di . 2001, Sonomoto ve di . 2000, Hull ve di . 1997). Bu sonuçlar, fermentasyon ortamının sürekli değiştirilmesinin; düşük pH, laktat ve nisin hücreler üzerindeki inhibisyon etkilerini ortadan kaldırdığını, açıkça göstermektedir.

2.6 Nisin Üretiminde Yenilikçi Yaklaşımlar

Nisin üretim miktarı, ortamdaki biyokütle miktarı ile orantılıdır. Öte yandan nisin fermentasyonunda *L. lactis* hücreleri tarafından üretilen laktik asit, hücreler üzerinde geri yönlü inhibisyon etkisi meydana getirir. Ortamdaki laktat konsantrasyonunun yükselmesi, hücrelerde protein denatürasyonunu hızlandırırken aynı zamanda bu olumsuz fermentasyon koşullarını tolere edilebilmesi için *L. lactis* hücrelerinin yüksek enerji sarfiyatında bulunması da neden olur. Söz konusu bu olumsuzluklar, *L. lactis* hücrelerinde aktif nisin üretim hızının bozulması ve hatta hücre yoğunluğunun azalması da sebep olmaktadır. Nisin üretimini etkileyen bu faktörlerin etkisinin azaltılması için üretici hücrelerde genetik düzenlemeler yapılarak verimli üreticilerin oluşturulması, bunun dışında üretici hücrelerde metabolik yolun düzenlenmesi veya özel fermentasyon koşullarının sağlanması gibi yenilikçi çalışmalar yürütülmektedir.

2.6.1 Rekombinant nisin üreticileri

Nisin üreticisi hücrelerde verimliliğin artırılması için yapılan ilk moleküler çalışmalar konjugasyon sistemlerinin kullanılması ile başlamıştır. Çünkü nisin üretiminden sorumlu genlerin transpozon üzerinde taşıyılması belirlenmesi, nisin üretiminin konjugasyon yolu ile aktarılabilmesini sağlar. Ancak bugüne kadar yapılan çalışmalarda, nisin üretim fenotipi kazandıran transkonjugantlarda elde edilen nisin üretim düzeyleri kontrol gruplarındaki üretim düzeyini geçememiştir. Ayrıca transkonjugantlarda nisin fenotipinin stabil olmaması da tespit edilmiştir (Akçelik 1999, Tükel ve diğ. 2005).

L. lactis hücreleri kendi nisin üretiminden geri yönlü olumsuz etkilenmektedir. Özellikle gelişme ortamında yüksek miktarda nisin birikimi *L. lactis* hücrelerini inhibe etmektedir. Yapılan çalışmalarda nisin üreticilerinin farklı seviyelerde nisine karşı hassasiyetlerinin olduğu belirlenmiştir. Örneğin *L. lactis* nisin üretiminde kullanılan hücrelerde 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 şekilde nisin de üretilmektedir. Nitekim *nisI* genlerinin vektör bir plazmid aracılığıyla üretici hücreye aktarılması ve bu

genlerin ifadesinin sağlanması, sonucunda nisin üretim miktarında % 20'den fazla bir artış, bu artışın söz konusu olduğu belirlenmiştir (Kim ve diğ. 1998).

Dirençlilikten sorumlu *nisI* geninin kullanılması, operonda yer alan diğer genlerin kopya sayısının üretici hücrelerde artırılması yoluyla sağlanmıştır. Bu yönde yapılan bir çalışmada, *L. lactis* subsp. *lactis* 164 suşunda nisin Z üretimi; temel gen (*nisZ*), regülasyon genleri (*nisR*, *nisK*) ve dirençlilik genleri (*nisF*, *nisE*, *nisG*) klonlanarak kopya sayısının artırılması amaçlanmıştır. Kontrol suşu 16.000 AU mL⁻¹ olan nisin aktivitesi; regülasyon genlerinin kopya sayısının artırılmasıyla 25.000 AU mL⁻¹ düzeyine ulaşmıştır. *nisR* ve *nisK* genlerinin yüksek düzeyde ifadelerinin sağlanması durumunda, *nisZ* geninin transkripsiyonunun da tetiklendiği belirlenmiştir (Cheigh ve diğ. 2005). Bu çalışmanın paralelinde Shim et al. (2009^a) ise *L. lactis* LL27 suşunda nisin regülasyon ve dirençlilik genlerinin (*nisRKFEG*) birlikte kopya sayısının artırılarak doal suşta göre %45 nisin üretim artışı sağlanmış, hatta bu suşun kullanıldığı sürekli fermentasyon sisteminde doal suşta göre daha yüksek dilüsyon hızlarında çalıştırılabilmiştir (Shim et al. 2009^b).

Rekombinasyon çalışmalarıyla elde edilen yüksek nisin verimleri sonucunda; bu rekombinant suşların immobilizasyonu ile yapılan sürekli fermentasyonda daha yüksek verime ulaşabilmek amacıyla çeşitli çalışmalar da yürütülmüştür. Shim et al. (2013) *Bacillus circulans* adlı kitinaz A1 enziminin Kitin Bağlanma Domainini (KBD); *L. lactis*'in farklı uzunluktaki PrtP (153, 344 ve 800 aa) ve AcmA (242 aa) kol ve çapaları ekleyerek, nisin üreticisi *L. lactis* hücrelerinin duvarında ifade etmiştir. Taramalı elektron mikroskopik görüntüleri de KBD'nin uzun PrtP kol ve çapası ile ifade edildiği *L. Lactis* hücrelerinin diğerlerine kıyasla kitine daha fazla tutunduğunu desteklemiştir. Ortam optimizasyonu ile en yüksek bağlanma %91 ve 94 oranında sağlanmış, *L. lactis* PLAC7 ve PLAC8 suşlarında meydana gelmiştir. Nisin üreticisi hücrelere kazandırılan kitine bağlanma yeteneği fermentasyon esnasındaki besiyeri değişimlerinde hücrelerin ortamda kalmasını sağlayarak ileri fermentasyon çevrimlerinde hücrelerin yüksek nisin üretimini devam ettirmesini sağlamıştır.

Kitine bağlanabilme yeteneği kazandırılmış *L. lactis* PLAC2 ve PLAC7 suşlarından nisinin sürekli üretimi için Kitin Çeren Sürekli Fermentasyon (CICON-FER) sistemi kurulmuş ve sistemde farklı dilüsyon hızları (0.1 ila 0.9 h⁻¹) ve glukoz konsantrasyon miktarları (10 ila 60 g L⁻¹) denenmiştir. CICON-FER sisteminde *L.*

Lactis PLAC7 su u için optimum ko ul olarak, 0.9 h⁻¹ dilüsyon h,z, ve 40 g L⁻¹ ba lang,ç glukoz konsantrasyonu kullan,lm, t,r. Kurulan bu sistemde *L. lactis* PLAC7 su u sistem içerisinde kullan,lan kitin taraf,ndan tutuldu undan oldukça yüksek nisin üretimine (10500 IU ml⁻¹) ula ,lm, t,r. Di er bir ifade ile kitin parçac,klar, üretici hücrelerin fermentasyon ortam,ndan kayb,n, engellemi tir (im ek 2014).

Yüksek oksidatif strese dayan,kl, nisin üretici hücre olu turmak üzere Papagianni ve Avramidis (2012) *Aspergillus niger* ait *aox1* genini *L. lactis* ATCC11454 su una klonlam, ve ba ar,yla ifade etmi tir. %90 çözünmü oksijen ve 10 g L⁻¹glukoz konsantrasyonu içeren fermentasyon sisteminde; kontrol su ile 3,2 g L⁻¹ biyokütle a ,rl, ,na ve 5900 IU mL⁻¹ nisin üretimine ula ,l,rken, *aox1* genini ifade eden rekombinant su ta 5.8 g L⁻¹ biyokütle ve 7900 IU mL⁻¹ nisine ula ,lm, t,r. Buna göre; *aox1* geni nisin üreticisi *L. lactis* su unda yüksek oksijen tolerans, özelli i kazand,rm, t,r.

L. lactis-in glikolitik döngüsünde kritik önemi olan fosfofruktokinaz (Pfk) enziminin aktivitesinin geli tirilmesi sonucunda, fermentasyonda yüksek biyokütle miktar,n,n art,r,lmas, ile nisin üretiminin artaca , yakla ,m,ndan hareketle, *aox1* geni ba ka bir çal, mada fosfofruktokinaz ve AMP proteinkinaz enzimlerini kodlayan *pfk13* ve *pkaC* genleri ile birlikte *L. lactis* ATCC11454 su una klonlanm, ve *pfk13-pkaC-aox1* genlerini ifade eden rekombinant *L. lactis* su u, hemin içeren aerobik yar,- kesikli fermentasyonda kullan,lm, t,r. Çal, ma kapsam,nda fermentasyon ortam,nda 55, 138 ve 277 mM olmak üzere üç farklı glukoz konsantrasyonu denenmi ve en yüksek biyokütle (7,5 g L⁻¹) ve nisin miktar,na (14.000 IU ml⁻¹) 277 mM glukoz içeren fermentasyon ortam,nda ula ,lm, t,r (Papagianni ve di . 2012).

2.6.2 nkübasyon ortam,n,n de i tirilmesi

Fermentasyon ortamlar,nda kar ,la ,lan substrat inhibisyonu, üretici su lar,n üretti i metabolitlerin belli bir seviyeden sonra olu turdu u bask,lay,c, etkisi, üretilen nisinin üretici hücrelere tutunarak hücre stabilizasyonuna zarar vermesi, fermentasyon sonucu sal,nan hücrel proteazlarca nisinin parçalanmas, gibi olumsuzluklar; nisin üretimini etkilemekte ve elde edilecek verimi dü ürmektedir. Bu olumsuz ko ullar, engellemek ve maksimum nisin üretimine ula mak için optimum proses ko ullar,n,n olu turulmas, temelli birçok çal, ma yürütülmü tür (de

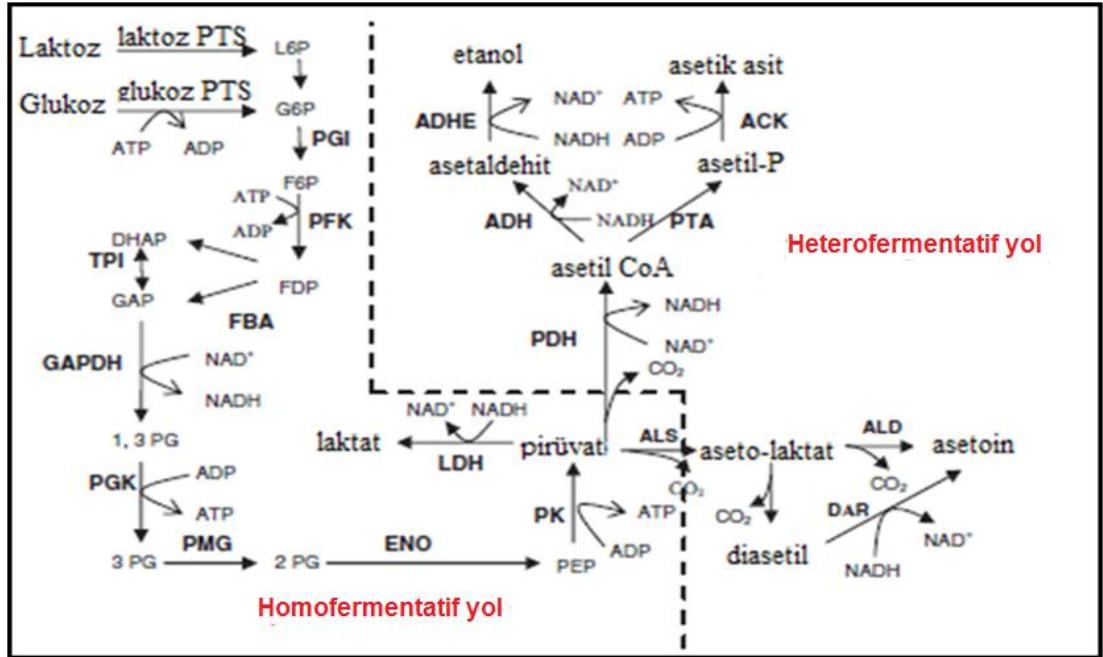
Vuyst 1992, Yang ve di . 1992, Pongtharangkul ve di . 2006, Demirci ve di . 2006, im ek ve di . 2009^{a,b}). Bu olumsuz etkilerin giderilmesi amacıyla Bertrand ve di erleri (2001), pH kontrollü besiyeri de i imini içeren fermentasyon sistemini önermiştir. Çal, mada k-karegenan/baklagil gam,na 10^{11} CFU mL⁻¹ düzeyinde immobilize edilen *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* hücreleri, bir saatlik zaman aral,klar, ile yeni besiyeri ortam,na al,narak üretimde süreklilik sa lanm, t,r. Bu çal, mada 8200 IU ml⁻¹ toplam ve 5730 IU ml⁻¹ h⁻¹ hacimsel nisin aktivitesine ula ,lm, t,r.

Nisin üretimini hem hücresele hem hacimsel olarak art,rmaya yönelik yap,lan bir ba ka çal, mada ise *L. lactis* N8 ve LAC48 su lar, kullan,larak yap,lan kesikli fermentasyon ortam,nda olu an metabolitlerden kaynaklanan geri-yönlü inhibisyonu engellemek için; 30, 60 ve 120 dk aral,klarla besiyeri de i imleri yap,lm, t,r. Maksimum hacimsel nisin üretimine 60 dk aral,klarla yap,lan besiyeri de i imlerinde ula ,lm, t,r. Toplam 18 saat süren N8 su unun fermentasyonu sonucunda 900 ± 100 IU ml⁻¹, LAC48 su unun fermentasyonu sonucunda ise 1.080 ± 100 IU ml⁻¹ nisin üretimine ula ,lm, t,r. Söz konusu bu çal, mada 30 dk aral,klarla yap,lan besiyeri de i imlerinin 60 dk aral,klara oranla önemli ölçüde avantaj sa lamad, ,, 120 dk aral,kla yap,lan de i im süresinin ise biriken nisin ve laktat konsantrasyonlar,n,n olu turdu u inhibitif etkinin önüne geçilebilmesinde çok uzun bir süre oldu u vurgulanm, t,r (im ek ve di . 2009^c).

2.6.3 Metabolik yolun düzenlenmesi

Kesikli ve yar,-kesikli fermentasyonlar,n ilerleyen zaman dilimlerinde laktat dehidrogenaz enzim aktivitesi ile *L. lactis* taraf,ndan laktat üretilir. Fermentasyon boyunca ortamda biriken laktat nisin üretici hücrelerin üremeleri üzerinde engelleyici etki göstererek hücre lizisine neden olur. Ayr,ca artan laktat konsantrasyonu ile meydana gelen geri yönlü inhibisyonun yan, s,ra artan pH ile birlikte bozulan elektrolitik denge nedeniyle de hücrelerde daha fazla enerji sarfiyat, meydana gelmektedir. Tüm bu olumsuzluklar yüksek laktik asit konsantrasyonunda gözlenen toksik etki ile de birle ince hücrelerin kayb,na veya daha az geli mesine neden olmaktadır. Ortamdaki bu bask, ile üretici hücrelerde say,sal art, sa lanamamakta ve buna paralel olarak da nisin üretimi art,r,lamamaktadır. Bu olumsuzluklar, yok edebilmek için planlanan en yeni yakla ,mlardan birisi de geli me ortamlar,nda *L. lactis* hücrelerinin metabolik yolunun homofermantatıftan heterofermantatife

dönü türülmesi i lemidir. *L. lactis* hücreleri geli imleri için gerekli enerjiyi heterofermantatif döngü ile ürettiklerinde metabolizmalar,nda elektron transfer sistemini (ETS) yap,land,rarak bir aerobik solunum zincir hatt, olu tururlar. Homofermantatif döngüde her bir NADHön oksidasyonuyla 1 mol ATP üretilirken toplamda elde edilen 2 mol ATPøye nazaran heterofermantatif döngüde daha fazla ATP üretimi gerçekleşir. Hücrenin enerjetik seviyesindeki bu yükselmeye paralel olarak hücre biyokütlesinde de art, sa lan,r (ekil 2.3) (Lechardeur ve di . 2011, Brooijmans ve di . 2009^a, Pedersen ve di . 2012). Homolaktik döngüden farklı olarak izlenen bu metabolik yolun sonunda, sadece laktik asit gibi ortam asitli ini art,racak tek çe it son ürün yerine; aseton, diasetil, etanol gibi yan ürünler de olu ur ve ortamdaki toplam laktat yüzdesinde önemli dü me elde edilir. Böylece laktat,n neden oldu u geri inhibisyonun da önemli oranda minimize edilmesi sa lanm, olunur.



ekil 2.3 *L. lactis*de homofermantatif, heterofermantatif yol ve solunum ko ullar,nda laktoz ve glukoz katabolizmas, (Lanve di . 2006).

L. lactis su lar,nda nisin üretimi ve hücre geli imi üzerine dü ük pHön,n neden oldu u inhibisyon etkisinin engellenmesi amac,yla; hücrede karbonhidrat katabolizmas,n,n heterofermantatif yönde düzenlendi i bir ba ka çal, mada ise etanol üretimini art,rmak için *Zymomonas mobilis* hücrelerinden pürivat dekarboksilaz (PDC) ve alkol dehidrogenaz (ADH), alanin üretimini art,rmak için

alanin dehidrogenaz (AlaDH) genlerinin *L. lactis* hücrelerinde yüksek düzeyde ifade edilmesi sa lanm, t,r. Çal, ma sonucunda metabolik yolun heterofermentatife dönü türüldü ü hücrelerde nisin üretimi 1,7 kat artm, t,r (Wardani ve di . 2006).

2.7.Laktik Asit Bakterilerinde Solunum

Fakültatif anaerobik karakterleriyle tan,nan laktik asit bakterilerinin solunum yapabilme yetenekleri ilk kez 1970øderin ba lar,nda yap,lan çal, malarla ortaya konulmu tur. Sadece hemin veya hemin-menakinonun birlikte bulunduruldu u geli me ortamlar,nda, bu familya üyelerinin hücrelerindeki sitokromlar,n,n aktifle ti i ve aerobik solunum yapt,klar, bugüne kadar süregelen çal, malarla da desteklenmi tir (Bryan-jones ve di . 1969, Sijpestejn 1970, Whittenbury ve di . 1978, Duwatt ve di . 1999, Lechardeur ve di . 2011, Brooijmans ve di . 2009^b, Pedersen ve di . 2012).

Laktik asit bakterileri enerji üretimi için öncelikle homofermentatif yolu tercih ederler. Çünkü solunumda yer alan sitrik asit döngüsünden yoksun olduklar,ndan enerji üretim metabolizmalar,nda glikoliz yoluyla elde ettikleri pirüvat, CO₂ø kadar okside edemezler. Bunun yerine NADHødar, NAD⁺øa indirgeyerek pirüvattan asetoin, asetat gibi organik bile ikler olu turma yoluna giderler (Gaudu ve di . 2002, Pedersen ve di . 2012). Di er taraftan, laktik asit bakterilerinin tümü hemin biyosentezini gerçekle tirecek enzimlerden yoksun oldu undan bu familya üyelerinin solunum yapabilmeleri için ortama hemin ilavesi yap,lmas, zorunludur. Bilindi i gibi hemin elektron transfer sisteminde son elektron al,c,s, görevi olan sitokrom oksidaz, aktifle tirir. Baz, su larda ise menakinon biyosentezinden sorumlu *menFDXBEC* genleride bulunmad, ,ndan bu kofaktörü de ortama ilave etmek gerekir (Lechardeur ve di . 2011, Rezaiki ve di . 2008).

Tüm laktik asit bakterilerinde tek tip sitokrom oksidaz (CydAB) enzimi bulunur. Bu enzim kompleksi oksijenli ortamlarda çal, abilmekte ve bakteri hücresinin oksijeni tolere etmesinde katk,da bulunmaktad,r (Rezaiki ve di . 2004). Membranlarda son elektron al,c,s, olarak görev alarak proton motivasyon gücün te vikini sa layan bu sitokromlar, dü ük oksijen konsantrasyonlar,nda bile hücrenin solunum yap,labilmesine olanak tan,rlar (Brooijmans ve di . 2009^b). Fermentatif metabolizmas,yla bilinen *L. lactis*, hemin bulunan aerobik ko ullarda sahip oldu u bu genin varl, , sayesinde solunum yapabilmektedir. Bolotin ve di erleri (1999) *L.*

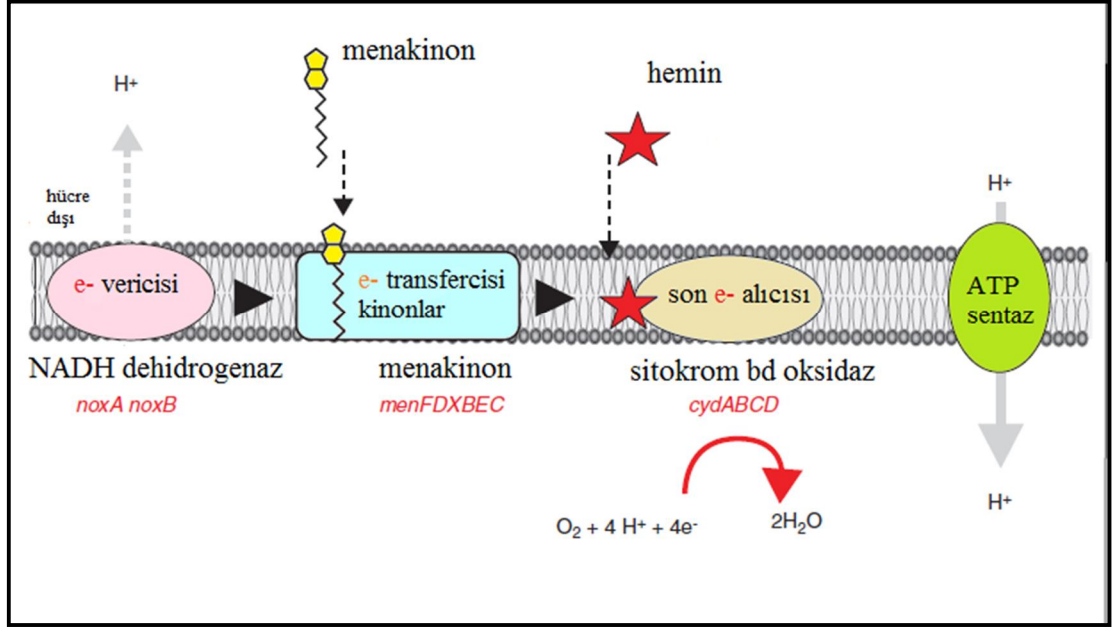
Lactis IL1403 suunun genomunda sitokrom bd oksidaz taraf,ndan kodlanan respirasyondan sorumlu *cydA* geninin bulundu unu rapor etmi tir. Respirasyon boyunca *cydA* geni, elektron transfer sisteminde aktif rol almakta ve son elektron al,c,s,n,n oksijen olmas,n, sa layarak ATP üretimini sa lamaktadır,r.

Laktik asit bakterileri filogenetik karakterlerine göre solunum yapabilme kabiliyetleri aç,s,ndan s,n,fland,r,ld,kklar,nda solunum yapabilmek için hemine ihtiyaç duyanlar, hemin ve menakinona birlikte ihtiyaç duyanlar, solunum yetene i hiç bulunmayanlar olmak üzere üç s,n,fta grupland,r,lmaktad,r (Tablo 2.1). Buna göre dikkat çeken laktobasillerin solunum için hemin ve menakinonlara birlikte ihtiyaç duydu udur. Ayr,ca nisin üreticisi olarak bilinen *L. lactis* su lar,n,n ise ortamda sadece hemin bulunmas, durumunda solunum yapabilmeleridir.

Bir bakteri hücresinde solunum zincirinin olu mas, için elektron transfer sisteminin (ETS) tam olmas, gerekmektedir. ETS; prokaryotlarda hücre zar,nda, mezozomda veya sitoplazmada bulunan moleküllerin birlikteli inden olu ur (ekil 2.4). Bunlardan ilki elektron vericisi olarak görev yapan NADH dehidrojenazlar, ikincisi aktar,lan elektronun transferinden sorumlu ve bu elektronu dehidrojenazlardan son elektron al,c,s, olan oksijene ta ,makla görevli olan kinonlard,r. Gram pozitif bakterilerde bu görevi *men* ve *isp* genleri ile kodlanm, enzimler taraf,ndan sentezlenen menakinonlar üstlenmi tir. Üçüncü ETS eleman, ise prostetik grubunda ~~hem~~ içeren, son elektron al,c,s, olarak görev yapan sitokrom oksidazd,r. Sitokrom oksidaz; substrat moleküllerinin dehidrojenazlarca oksidasyonu sonucu ortaya ç,kan elektronlar,n, son elektron al,c,s, olan moleküler oksijene ta ,madan sorumludur (Pedersen ve di . 2012). Yap,lan çal, malar , , ,nda elde edilen verilere göre *L. lactis*, *E. faecalis* ve *L. mesenteroides* hemin d, ,nda, solunum zincirinin tüm elemanlar,na sahiptir. Bu nedenle solunum yapabilmek için geli me ortamlar,nda sadece hemine gereksinim duymaktad,rlar (Duwat ve di . 2001, Huycke ve di . 2001). Ancak di er laktik asit bakterisi grubundaki mikroorganizmalar için sadece heminin ilavesi yeterli de ildir. Solunum yapabilmeleri için menakinonlar, sentezleme kabiliyetinden yoksun olan laktik asit bakterileri için d, ar,dan menakinon takviyesi gereklidir. Geli me ortam,na eklene menakinonlar lipofilik yap,da olduklar,ndan hücre duvarlar,ndaki membranlardan kolayca hücre içine geçer ve solunum zincirine dahil edilirler.

Tablo 2.1 Laktik asit bakterilerinin solunum yeteneklerine göre s,n,fland,r,lmas,

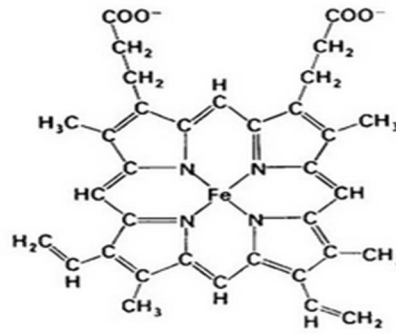
	Streptococcaceae	Lactobacillaceae
Solunum yapabilmek için sadece hemine ihtiyaç duyanlar	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	
	<i>Enterococcus faecalis</i>	
	<i>Enterococcus gallinarum</i>	
	<i>Enterococcus italicus</i>	
	<i>Lactococcus lactis</i>	
	<i>Lactococcus garvieae</i>	
	<i>Leuconostoc argentinum</i>	
	<i>Leuconostoc citreum</i>	
	<i>Leuconostoc fallax</i>	
	<i>Leuconostoc gasicomitatum</i>	
	<i>Leuconostoc kimchii</i>	
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	
	<i>Weissella cibaria</i>	
<i>Weissella paramesenteroides</i>		
Solunum yapabilmek için hemin ve menakinona birlikte ihtiyaç duyanlar	<i>Oenococcus oenii</i>	<i>Lactobacillus antri</i>
	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>
	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	<i>Lactobacillus buchneri</i>
	<i>Streptococcus parauberis</i>	<i>Lactobacillus casei</i>
	<i>Streptococcus pseudoporeinus</i>	<i>Lactobacillus coryniformis</i>
	<i>Streptococcus uberis</i>	<i>Lactobacillus crispatus</i>
		<i>Lactobacillus fermentum</i>
		<i>Lactobacillus gasseri</i>
		<i>Lactobacillus hilgardii</i>
		<i>Lactobacillus johnsonii</i>
		<i>Lactobacillus oris</i>
		<i>Lactobacillus paracasei</i>
		<i>Lactobacillus plantarum</i>
		<i>Lactobacillus reuteri</i>
		<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
		<i>Lactobacillus salivarius</i>
		<i>Lactobacillus ultunensis</i>
	<i>Lactobacillus vaginalis</i>	
Solunum yapabile yetene i olmayanlar	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
	<i>Streptococcus gallolyticus</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
	<i>Streptococcus gordonii</i>	<i>Lactobacillus iners</i>
	<i>Streptococcus infantis</i>	<i>Lactobacillus sakei</i>
	<i>Streptococcus mutans</i>	
	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	
<i>Streptococcus thermophilus</i>		



ekil 2.4 Solunum yeteneğine sahip laktik asit bakterilerinde elektron taşıma sistemininematik gösterimi

2.7.1. Hemin

Sitokromlar sahip olduğu demir atomunu ferrik oksidasyon durumundan (Fe^{+3}) ferrous oksidasyon durumuna (Fe^{+2}) değiştiren bir hem grubu içerir. Hemin; 1853 yılında Teichmann tarafından hemoglobinin asit ile hidrolizi sonucunda kristal bir formda bulunmuştur (Heinrich 2010). Bu hem grubu dört azot atomu ile tutturulmuş bir demir atomuna sahip porfirin halkasından oluşur (ekil 2.5).



ekil 2.5 Sitokrom çözünebilir olarak bağlı hem grubunun yapısı,

Heminin molekül ağırlığı, 650 gradır. Hemoglobinde bu porfirin halkasına demirin, klorofilde ise magnezyumun bağlanması ile sırasıyla kanın kırmızı rengi ve yaprakların yeşil rengi oluşur.

2.7.2. Heminin *L. lactis* solunumundaki rolü

Hemin; aerobik solunum mekanizmasında redoks tepkimelerinin düzenlenmesinde önemli göreve sahiptir (Mayfield ve diğ. 2011). Heminin olmadığı oksijenli solunum ortamlarında menakinonlar tarafından salınan elektronlar hücre tarafından kullanılarak, Cu^{+2} Cu^{+1} ye yükseltgenir ve böylece bu elementlerin hücre içerisine girişi hızlanır. Diğer yandan oksijen (O_2) desüperoksite (O_2^-) yükseltgenir ve istenmeyen reaktif oksijen türleri oluşur. Bu nedenlerden dolayı, aerobik solunum zincirinde heminin redoks aktivitesinde önemli rol aldığı ve hücre içerisinde riskli radikal grupların girişini ve oluşumunu engellediği görülmektedir (Rezaiki ve diğ. 2008).

Laktik asit bakterileri hemini sentezleyememeselerden dolayı, aradan hemini hücre içerisine alabilme mekanizmasına sahiptir. Bunun için laktik asit bakterileri hemini homeostasis sistemlerini kullanmaktadır. Söz konusu bu sistemde, hemini hücre içerisinde sitokrom *bd* oksidazlara bağlanır. Bu mekanizma *L. lactis*'te *fbuDBAR* operonunun kontrolünde ve operon proteinlerinin yardımıyla gerçekleşir. Normal fizyolojik koşullarda operon proteinlerinin görevi ortamdaki proteinlerin çökmesini önlemek, yeni sentezlenen proteinlerin üçüncül yapıların kazanmasını sağlamak, yanlı, katlanma ve çökmüş proteinleri birbirinden ayırmak ve doğru katlanmayı düzenlemek, proteinleri ribozomdan görev alacak yerlere taşımaktır. Stres koşullarında operon proteinlerinin sentezi artar. Özellikle aerobik koşullarda iken ortamda oluşan oksidatif strese tepki olarak *AhpC* operon proteini hemine bağlanarak hemini yıkılmaktan korur. Bir başka operon protein *CycCD* ise sitokrom oksidazın membranlarından (*CydAB*) geçerek, *CydAB*-hemin interaksiyonunu sağlar. Ayrıca operon proteinleri elektron transfer sisteminde önem arz eden sistein ve glutatyon transferlerini de düzenlerler (Pedersen ve diğ. 2012).

Heminin *L. lactis*'in hücre membranında olduğu proton motivasyon gücünün ve ETS mekanizmasının araştırıldığı, bir çalışmada, sitokrom *bd* oksidaz geni mutasyona uğratılmış sularda herhangi bir membran potansiyelinin olmadığı gözlemlenmiştir. Ortama eklenen $NADH$ ise mutant su oranla kontrol suunda

oksijen tüketimini artırdı, tespit edilmiştir. Hemin takviyesi yapılmış ortamlarda geliştirilen hücrelerde oksijen tüketimi; $25,72 \pm 2,76$ nmol iken, sitokrom b₅ oksidaz mutant sucularda bu tüketim değeri $13,51 \pm 0,02$ nmol bulunmuştur. Heminsiz yapılan kültür ortamında ise bu değerler; $13,02 \pm < 0,01$ nmol'dür (Brooijmans ve diğ. 2007).

H⁺ ATPaz (F₁F₀); hücrelerde serbest enerji transdüksiyonunda önemli rol oynayan bir enzimdir. *Bacillus subtilis* ve *Escherichia coli* gibi mikroorganizmalarda solunum yolu ile ATP sentezinde etkin kullanılmaktadır. Aerobik solunum zincirinde esansiyel olan bu elektron alıcılar, yoksun olan mikroorganizmalarda bu enzim, hücre membranında proton motivasyon gücünün oluşmasını sağlar. Bu bilgiler ışığında H⁺ ATPaz geni mutasyona uğratılmış, *L. lactis subsp. cremoris* MG1363 suculu $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ hemin içeren ortamda aerobik koşullarda geliştirilmiş ancak aynı hemin konsantrasyonunda anaerobik ortamda geliştirilememiştir. Bu veriler heminin hücrede proton motivasyon gücünün oluşabilmesi için H⁺ ATPaz enzimi ile aynı seviyeye sahip olduğunu göstermiştir (Blank ve diğ. 2001).

2.7.3. *L. lactis*'te metabolik yolun oksijenli solunuma yönlendirilmesi

Laktik asit bakterilerinde glikolitik döngünün yeniden düzenlenmesi ile enerji üretiminde izlenen metabolik yolun değiştirilmesi temeline dayanan birçok çalışmaya araştırmacılar yapılmıştır (Even ve diğ. 2002, Papagianni ve diğ. 2007, Papagianni 2012). Bu çalışmaların çoğunda esas olarak glukozun laktata indirgenmesinden sorumlu enzimlerin inaktivasyonları veya bu enzimleri kodlayan gen bölgelerinin susturulması gibi stratejiler kullanılmıştır. *L. lactis* genomu tarafından kodlanan fosfofruktokinaz, pirüvatkinaz ve laktatdehidrogenaz enzimlerinin genleri susturularak elde edilen mutant suculu bir fermentasyon çalışmasında, üretici suculu izlenen glikolitik ve laktat üretim döngüsünün kontrol grubuna oranla iki kat baskılandığı rapor edilmiştir (Andersen ve diğ. 2001, Neves ve diğ. 2002). *Aspergillus niger*'deki *pfkA* geninin *L. lactis* suculuna klonlanması ile elde edilen rekombinant suculu beklenen yüksek glikolitik kapasitesine ulaşmış ve artan bu kapasite sonucu kontrol ortamı ile fermentasyon ortamında üretilen laktat miktarları sırasıyla 15 ve $22,8 \text{ g (CDW)}^{-1}\text{h}^{-1}$ olarak tespit edilmiştir.

L. lactis'te metabolik yolun homofermentatif veya heterofermentatif olması belirleyen diğer önemli etken ise hücre içerisindeki NADH:NAD⁺ oranıdır. Hücre

içindeki serbest oksijenin su molekülüne indirgenmesinde görev alan NADH oksidaz enziminin aktivitesi, aerobik koşullarda art, göstererek glikolitik döngünün heterofermentatif yola çevrilmesini teşvik eder ve fermentasyon sonunda laktat yerine asetat, aseton, α -asetolaktat ve diasetil üretilerek yüksek asit birikimi ve dolayısıyla geri inhibisyon engellenir (Lopez ve di . 1997, Hols ve di . 1999, Lopez ve di . 1998, Swindell ve di . 1996, de Vos ve di . 2004).

Arioli ve di erleri (2012) yaptıkları, kesikli fermentasyon çalışmaları, mas,ında, geli me ortamına $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ hemin ile birlikte farklı konsantrasyonlarda (5, 10, 20 mM) sodyum oksamat ($\text{C}_2\text{H}_2\text{NNaO}_3$) ilave ederek *L. lactis subsp. lactis* IL1403 suyunun aerobik solunum yapabilme kabiliyetini daha da artırm, t,r. Sodyum oksamat laktat dehidrogenaz (LDH) enzimini inhibe etti inden, ortamdaki laktat konsantrasyonları, sırasıyla; heminsiz kontrol koşullarında $65,0 \pm 1,4 \text{ nM}$, heminli ortamda $51,0 \pm 1,5 \text{ nM}$ bulunmuştur, hemin ve sodyum oksamat, n (20 mM) birlikte kullanıldığında, geli me ortamında ise $45,0 \pm 1,1 \text{ nM}$ a kadar düşmüştür.

Başka bir çalışmada Lan ve di erleri (2006) *L. lactis* LM0230 suyunu; anaerobik fermentasyon, aerobik fermentasyon ve hemin ilave edilmi aerobik fermentasyon koşullarında kullanmışlardır. Bu üç fermentasyon koşulunda maksimum hücre biyokütlesine ($5,78 \text{ g L}^{-1}$) ve büyüme hızına ($0,60 \text{ g h}^{-1}$) hemin ilave edilmi aerobik fermentasyonda ulaşılm, t,r. Benzer şekilde, *L. lactis* ATCC11454 suyu hemin ilave edilen ve edilmeyen kesikli fermentasyon sisteminde geliştirildiğinde toplam laktat konsantrasyonu hemin ilave edilen ortamda 1,8 kat baskılandı, t,r (Nagayasu ve di . 2007).

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Bakteri Su lar, ve Kùltür Ortamlar,

Çal, maya dahil edilen nisin Z üreticisi *L. lactis* N8 ile nisin üretim miktar,n,n tespitinde indikatör mikroorganizma olarak kullan,lan *Micrococcus luteus* NCBI su lar, Pamukkale Üniversitesi, G,da Mühendisli i Bölümü, Kùltür Koleksiyonundan (PUFECC) temin edildi. Nisin üreticisi *L. lactis* N8 su u % 0.5 glukoz içeren M17 Broth (Merck, Almanya) besiyerinde (M17G), 30°Cøde, *M. luteus* NCBI ise Luria Bertani (FLUKA, Almanya) besiyeri (LB) ortam,nda 37°Cøde 200 rpm h,zda çalkalanarak geli tirildi.

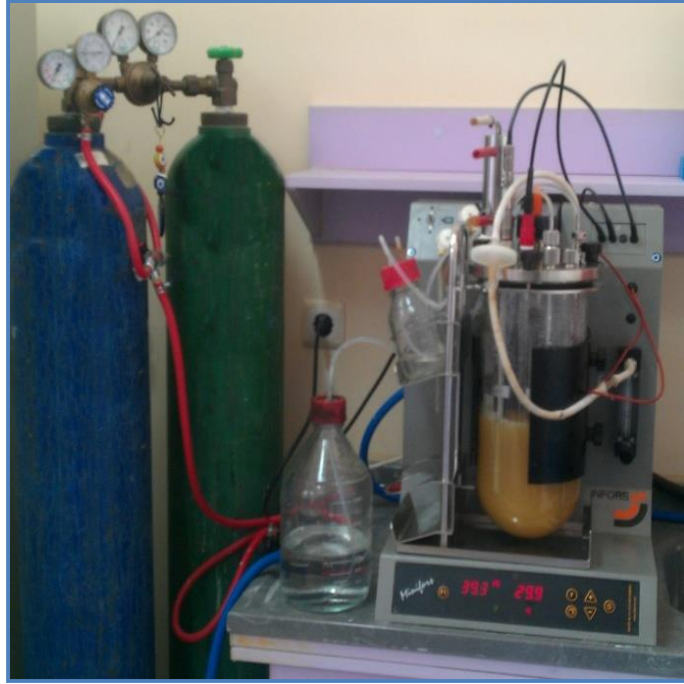
Fermentasyon ortam,na ilave edilen hemin (Sigma-Alrich, USA) 5 mg ml⁻¹ stok çözültisi haz,rılanarak kullan,ld,. Hemin 0,05 N NaOH içerisinde çözüldürüldü ve ard,ndan 0,45 µm membran filtreden geçirildi. Haz,rılanan hemin stoku +4°Cøde sakland,.

3.2. Fermentasyon De i kenlerinin Çal, ma Aral,klar,n,n Belirlenmesi

Çal, mada nisin üretiminin optimizasyonu için ilk olarak sistemin fermentasyon de i kenleri olan glukoz ve hemin konsantrasyonlar, ile çözünmü oksijen yüzdelerinin nisin üretim miktar, ve biyokùtle üzerine etkisi, yar,-kesikli fermentasyonla belirlendi ve bu de i kenlere ait çal, ma aral,klar, tespit edildi. Söz konusu çal, ma aral,klar, belirlenirken; üç fermentasyon de i keninden ikisi sabit tutuldu, üçüncüsü ise farklı, çal, ma aral,klar,nda denendi. Çal, mada fermentasyon de i kenlerinin etkisinin belirlendi i deneme deseni Tablo 3.1øde verildi.

L. lactis N8 su u kullan,larak yar,-kesikli fermentasyon sisteminde nisin üretimi; pH, s,cakl,k ve çözünmü oksijen konsantrasyonununun anl,k ölçümünü yapabilen fermentör (Minifors, Bottmingen, sviçre) sisteminde gerçekte tirildi (ekil 3.1). Fermentasyonda 2 L M17 besiyeri ortam, fermentör içerisine al,nd, ve sistem sterilize edildi. Daha sonra oda s,cakl, ,na kadar so utulan fermentöre aerobik ko ullarda, 0,5 µg mL⁻¹ hemin ve % 0,5 glukoz içeren M17 s,v, besiyeri ortam,nda iki kez aktifle tirilmi olan nisin üreticisi *L. lactis* kùltüründen % 1 oran,nda a ,lama yap,ld,. A ,lamadan sonra fermentör 200 rpm kar, t,r,c, h,z,na ve 30 °C inkübasyon s,cakl, ,na ayarland, ve deneme deseninde çal, ,lmas, önerilen

çözünmü oksijen yüzdesine fermentasyon ortam,nda ula ,ld,ktan sonra 5 saat kesikli fermentasyon yap,ld,. Fermentasyon esnas,nda köpürmeyi engellemek için fermentör içerisine aral,klarla steril gliserol ilave edildi. Tüm fermentasyon boyunca 5 N NaOH çözeltisi kullan,larak fermentasyon ortam,n,n pHø, 6,0da sabit tutuldu. Kesikli fermentasyonun sonunda besleme pompas,n,,n debisi 40 ml h⁻¹ olacak ekilde ayarland, ve fermentasyon ortam,na deneme deseninde çal, lmas, önerilen farklı hemin ve glukoz konsantrasyonlar, ile haz,rlanm, heminli glukoz çözeltisi 5 saat boyunca beslenerek yar, kesikli fermentasyon gerçekleştirildi. Her bir deneme deseninin fermentasyonu sonunda ç,k, pompas, kullan,larak biyokütle ve nisin üretimi miktarlar,n, ölçmek için örnekleme yap,ld,.



ekil 3.1 Solunumun hemin ile te vik edildi i yar,-kesikli fermentasyon sistemi

Tablo 3.1 Yar,-kesikli fermentasyon sisteminde denenen fermentasyon de i kenleri ve al, ma aral,klar,

Deneme	Hemin, $\mu\text{g mL}^{-1}$	Glukoz, $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$	özünmü O_2 , %
1	0	1	10
2	1	1	10
3	2	1	10
4	6	1	10
5	10	1	10
6	1	1	10
7	1	2	10
8	1	4	10
9	1	8	10
10	1	10	10
11	1	1	10
12	1	1	30
13	1	1	70
14	1	1	90

3.3. Fermentasyon De i kenlerinin Cevap Yüzey Yöntemi ile Modellenmesi

*L. lactis*te solunumun hemin ile te vik edildi i yar,-kesikli fermentasyon sisteminde nisin üretiminin cevap yüzey yöntemi ile optimizasyonu için hemin, glukoz ve çözünmü oksijen konsantrasyonlar,n,n etkili oldu u al, ma aral,klar, kullan,ld,. Her bir de i ken için 0 merkez nokta olmak üzere, maksimum (+1) ve minimum (-1) de erler belirlendi. al, ,lan her bir fermentasyon de i keninin gerçek de eri e itlik 1ødeki denklem kullan,larak hesapland,:

$$\text{Kod de eri} = \frac{\text{Gerçek De er} - (\text{Yüksek De er} + \text{Dü ük De er}) / 2}{(\text{Yüksek De er} - \text{Dü ük De er}) / 2} \quad (1)$$

Çal, mada tespit edilen minimum ve maksimum de erler Minitab 14.0 (Minitab Inc., Minneapolis, MN, USA) istatistik program, kullan,larak cevap yüzey yöntemi ile modellendi ve yüzey merkezli kompozit deneme deseni (merkezde 6 tekrarl,, toplam 20 adet deneme) olu turuldu. Bu deneme deseni do rultusunda önerilen hemin, glukoz ve çözünmü oksijen miktarlar,n,n kombinasyonlar, yar,-kesikli fermentasyon sisteminde k,s,m 3.2de anlat,ld, , ekilde uyguland, ve *L. lactis* N8 su unun nisin üretimi ve fermentasyon ortam,nda olu an biyokütle miktar, tespit edildi.

Yap,lan tüm fermentasyon denemelerinin sonucunda, *L. lactis* N8 su unun biyokütle ba ,na üretilen nisin miktar, (IU mg⁻¹) hesaplanarak Minitab 14.0 (Minitab Inc., Minneapolis, MN, USA) program,nda varyans analizi (ANOVA) yap,ld,. Bu yöntemle her bir faktörün lineer, kuadratik ve interaksiyon etkilerinin cevaplar üzerindeki istatistiksel önemlilikleri %95 güvenlik seviyesindeki Fischer (F testi) uygulanarak belirlendi. Böylece çal, ma kapsam,nda solunumun te vik edildi i *L. lactis* N8 su unun yar,-kesikli fermentasyon sisteminde nisin üretiminin optimizasyonu için kullan,lan hemin, glukoz ve çözünmü oksijen konsantrasyonu parametrelerinde modelin uyumu, ilgili denklemin olu turulmas, için R² de eri, denklem sabitleri ile model uyum eksikli i hesapland,. Varyans analizi sonucunda fermentasyon de i kenlerinin nisin üretimine etkisini tahminleyen ikinci dereceden polinomial denklem e itlik 2de verildi i ekilde olu turuldu.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 \quad (2)$$

Bu denklemde, $\beta_0, \beta_1, \dots, \beta_{23}$ regresyon katsay,lar,n,, X_1, X_2, X_3 ise fermentasyon de i kenlerini yani hemin, glukoz ve oksijen de erlerini ifade etmektedir. Y ise beklenen cevap, temsil etmekte ve birim biyokütle ba ,na nisin üretimi (IU mg⁻¹) hakk,nda fikir vermektedir.

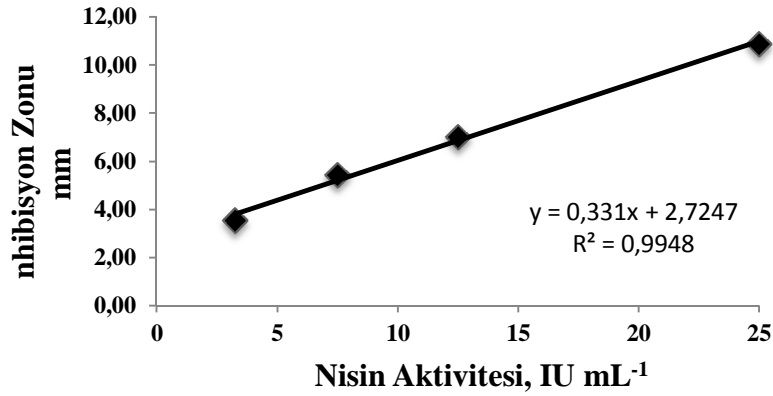
3.4 Solunumun Hemin ile Te vik Edildi i Yar,-kesikli Fermentasyon Sisteminde Optimum Parametreler Kullan,larak *L. lactis* N8 Su unda Nisin Üretimi

Çal, ma kapsam,nda denenen fermentasyon de i kenleri (hemin, glukoz ve oksijen konsantrasyonu) için olu turulan modelin önerdi i optimum parametreler kullan,larak yar,-kesikli fermentasyon sisteminde hemin ile solunumun te vik edildi i *L. lactis* N8 su unda nisin üretimi ara t,r,ld,. Bunun için K,s,m 3.2øde anlat,ld, , gibi *L. lactis* N8 su u önce 5 saat kesikli fermentasyonla geli tirildi. Ard,ndan 3 µg mL⁻¹ hemin, 8 g L h⁻¹ glukoz beslemesi yap,larak ve ortamdaki çözünmü oksijen miktar, % 40ø ayarlanarak, 24. saatin sonuna kadar yar,-kesikli fermentasyon uyguland,. Fermentasyon sürecinde 0, 1, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 13, 15 ve 24. saatlerde örnek al,m, yap,ld, ve nisin üretim miktar, (IU mL⁻¹), biyokütle (mg mL⁻¹), kal,nt, glukoz miktar, (mM), laktik ve asetik asit miktarlar, (ppm) hesapland,. Hemin ve oksijenin yar,-kesikli fermentasyonda etkisini gözlemleyebilmek için; hemin ve oksijen içermeyen yar,-kesikli fermentasyon çal, mas, kontrol grubu olarak yürütüldü.

3.5 Analitik Yöntemler

3.5.1 Nisin üretim miktar,n,n tespiti

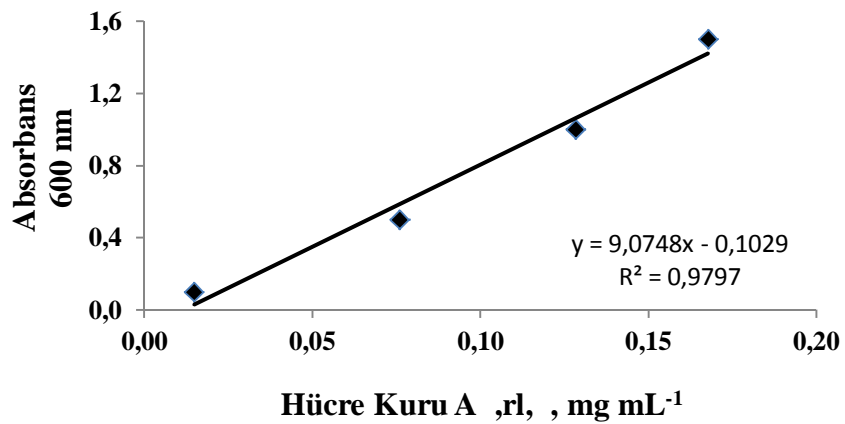
Nisin üretim miktar,n,n tespiti için Tramer ve Fowler (1964) taraf,ndan önerilen yöntem kullan,ld,. Fermentörden al,nan örnekler 6000 rpmøde 10 dk santrifüj edilerek hücre çökeltisi ayr,ld, ve üst s,v, yeni bir tüpe al,narak 80 °Cøde 15 dk ,s, uygulamas, yap,ld,. Daha sonra bu s,v, pHø, 2.5 olan ve % 0.1 oran,nda tween 80 içeren çözeltide 2¹⁰ oran,na kadar seyreltildi. Nisin aktivitesinin belirlenmesi için aktif *M. luteus* hücreleri 7 mL LB yumu ak agar ortam,na %1 oran,nda inoküle edildi ve LB agar alt tabaka yüzeyine yay,ld,. Üzerine her bir örnek dilüsyonundan 5 L (2 paralel) damlat,ld,. Aktivite tayininde nisaplin (Sigma) kullan,larak 3, 6, 12.5 ve 25 IU mL⁻¹ konsantrasyonlar,nda ahit çözeltiler haz,rland,. 37 °Cøde 1 gece inkübasyon sonucunda elde edilen standart nisin inhibisyon e risi (ekil 3.2) kullan,larak kültür üst s,v,s,ndaki nisin miktar, hesapland,.



ekil 3.2. Çal, mada kullan,lan standart nisin inhibisyon e risi

3.5.2 Biyokütle miktar,n,n hesaplanmas,

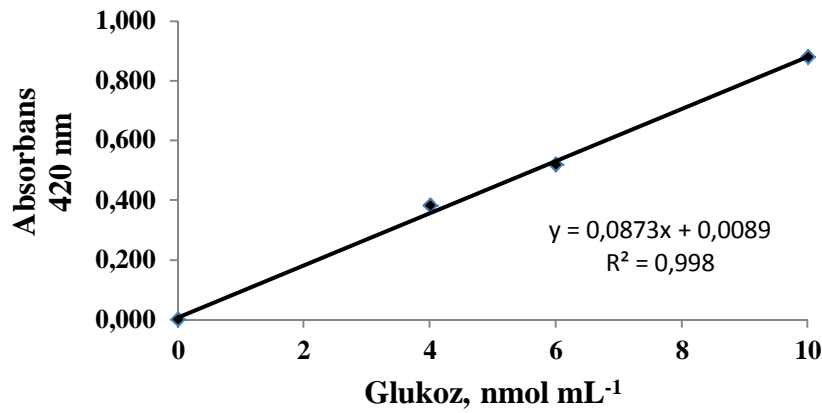
Fermentasyon sürecinde toplanan örnekler biyokütle miktar,n,n belirlenmesi için, ayn, besiyeri kullan,larak seyreltikten sonra, spektrofotometrede (PG Instruments) 600 nm dalga boyunda hücre yo unluklar, ölçüldü. Belirlenen hücre yo unlu u, ekil 3.3æte verilen e rinin denklemini kullan,larak hücre kuru a ,rl, ,na (mg mL⁻¹) dönü türüldü. Optik yo unluk ve biyokütle e itli inin belirlenmesinde farklı, optik yo unlu a sahip hücre kültürleri 6000 gæde santrifüj edildi ve 2 kez PBS tamponunda y,kand,. Elde edilen hücre çöktelleri 70 °C s,cakl,akta, hücre kuru a ,rl,klar, sabit bir de ere ula ,ncaya kadar kurutuldu. Optik yo unluk ve hücre kuru a ,rl, , e itli i için standart e ri olu turuldu ve e rinin denklemini elde edildi.



ekil 3.3 Çal, mada kullan,lan hücre kuru a ,rl, , standart e ri

3.5.3 Kal,nt, glukoz miktar,n,n tespiti

Fermentasyonda toplanan örneklerdeki kal,nt, glukoz miktar,n,n tespiti, kolorimetrik esasa dayanan glukoz ölçüm kiti (Glucose assay kit II, Biovision, USA) kullan,larak yap,ld,. Bunun için fermentasyon denemelerinden toplanan örnekler 6000 gøde 10 dk. santrifüj edilerek hücreler çöktürüldü. Daha sonra elde edilen kültür üst s,v,lar, kit çözeltisi ile seyreltikten sonra kit protokolünün prosedürü yard,m,yla önce standart glukoz konsantrasyonu e risi çizdirildi (ekil 3.4) ve sonras,nda ise kit protokolü uygulanarak ölçüm gerçekte tirildi.



ekil 3.4 Çal, mada kullan,lan glukoz standart e risi

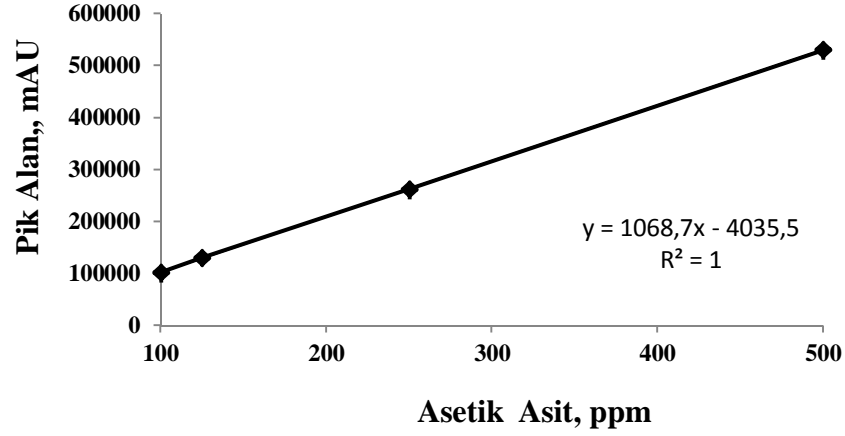
3.5.4 Laktik ve asetik asit miktar,n,n tayini

Fermentasyon denemelerinde toplanan örneklerin laktik ve asetik asit içeri i Shimadzu marka yüksek bas,nçl, s,v, kromatografisi (HPLC) kullan,larak belirlendi. Söz konusu organik asitlerin ay,r,m, 7x7x300 mm Nucleogel ION 300 OA kolonda (Supelco, USA) gerçekte tirildi ve UV detektör kullan,larak 210 nm dalga boyunda tespit edildi. Sistemde 0,05 N H₂SO₄ mobil faz kullan,larak, 0,3 ml min⁻¹ ak, h,z, ve 35°C s,cakl,k ko ullar, uyguland,.

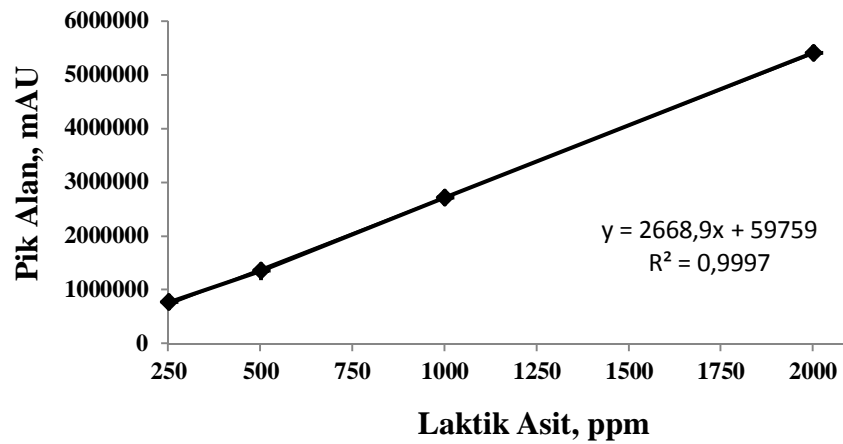
Laktik ve asetik asit içeri inin belirlenmesi için örnekler önce 7000 rpmøde santrifüj edilerek bakteri hücreleri çöktürüldü. Ard,ndan elde edilen supernatant,n pHø, 3N HCl (Sigma, USA) kullan,larak 1.5øe ayarland, ve 10 000 rpmøde tekrar santrifüj edilerek proteinlerin de çöktürülmesi sa land,. Son olarak kültür üst s,v,s, 0.45 m (Sartorius) membran filtreden geçirilerek steril bir tüpe al,nd, (Öz Cangaz, 2000).

Örneklerin HPLC'ye enjeksiyonu yapılmadan önce numuneler hazırlandı. Elde edilen filtrattan 2,5 ml, 0,05 N H₂SO₄'den 1 ml alınarak toplam hacim steril ultra saf su ile 25 ml'ye tamamlandı. Daha sonra bu karışım 0,22 µm (Sartorius) filtreden geçirildi. Son aşamada filtrattan 50 µl alınarak kolona enjekte edildi.

Standartların hazırlanmasında HPLC saflıkta laktik asit (Merck 1.00366.0500) ve asetik asit (Merck 1.00058.1000) kullanıldı. Laktik asitten 250 ppm, 500 ppm, 1000 ppm, 2000 ppm, asetik asitten 100 ppm, 125 ppm, 250 ppm, 500 ppm konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlandı. Örnekler cihaza enjekte edilerek, yukarıda sıralanan protokol dahilinde yürütüldü ve standart eğerleri elde edildi. Standart eğerlerine ait denklemler ve R² değerleri ekil 3.5 ve ekil 3.6'da gösterildi.



ekil 3.5 Çalınmada kullanılan asetik asit standart eğerleri



ekil 3.6 Çalınmada kullanılan laktik asit standart eğerleri

4. SONUÇLAR ve TARTI MA

4.1 Yar,-kesikli Fermentasyon Sisteminde Hemin Konsantrasyonunun Nisin Üretimi ve Biyokütle Üzerine Etkisi

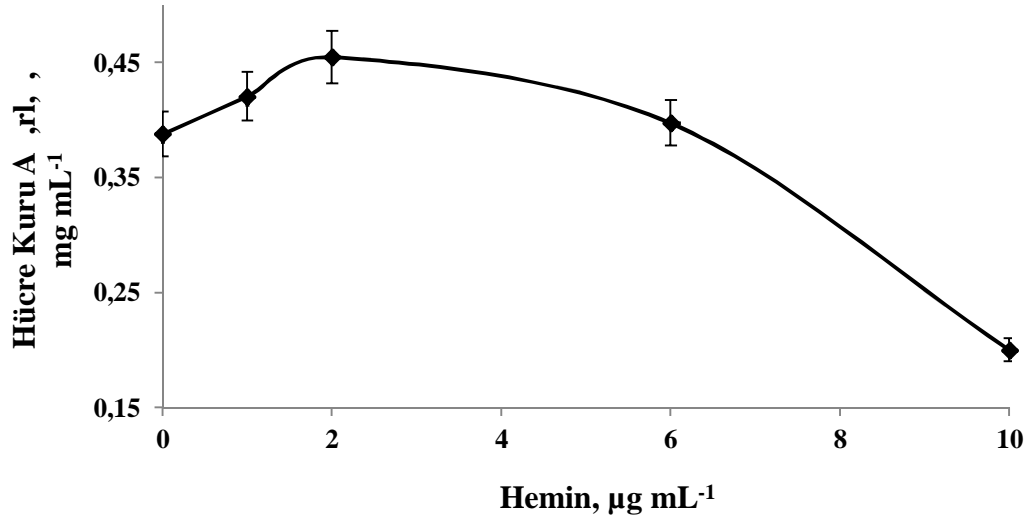
Yar,-kesikli fermentasyon ortam,ndaki hemin miktar,n,n nisin üretimine olan etkisini belirlemek için; 0, 1, 2, 6 ve 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyonlar, kullan,larak, toplanan örneklerdeki hücre kuru a ,rl, , (mg mL^{-1}) ve nisin miktar, (IU mL^{-1}) tespit edildi. ekil 4.1a ve b'den görüldü ü gibi fermentasyon ortam,na hemin ilavesi ile örneklerin biyokütle ve nisin üretim miktar, önce artt., ard,ndan azald,. Ortama 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ hemin ilave edilmesi durumunda biyokütle olu um ve nisin üretim miktarlar, maksimum seviyeye ula t,, bu seviyeden sonra her iki parametrede azalma gerçekleşti. Buna göre yap,lan çal, mada hemin ilavesi yap,larak yürütölen yar,-kesikli fermentasyonda en yüksek biyokütle miktar, 0.45 mg mL^{-1} ve nisin üretim oran, ise 1165 IU mL olarak saptand, (ekil 4.1 a ve b). Fermentasyon ortam,na 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ hemin ilave edilmesi durumunda ise biyokütle olu um ve nisin üretim miktarlar, dü tü. Nitekim bu konsantrasyonda biyokütle ve nisin üretim miktar, s,ras,yla 0,20 mg mL^{-1} ve 860 IU mL⁻¹olarak ölçüldü.

Ortamda heminin bulunmas, ile *L. lactis* hücrelerinin biyokütle miktar,nda art, sa land, , bir çok çal, mada da gösterilmi tir (Duwat ve di . 2001, Gaudu ve di . 2002, Lan ve di . 2006, Nagayasu ve di . 2007, Koebman ve di . 2008, Razvi ve di . 2008, Broojimans ve di . 2009, Lechardeur ve di . 2011, Arioli ve di . 2012). Bu çal, malar,n her birinde hemin konsantrasyonu sabit ve tek bir de er ile çal, ,lm, , biyokütle miktar,nda yakla ,k 2 kat art, oldu u tespit edilmi tir. Bu çal, mada da hemin ilavesi ile biyokütle miktar,n,n art, , te vik edildi ancak bu art, literatür verilerine k,yasla k,smen daha dü üktür. Buradaki temel farkl,l,k çal, mam,zda hemin ba ,ms,z de i keninin nisin üretimi üzerindeki etkisinin izlenmesi için di er ba ,ms,z de i kenlerin (glukoz konsantrasyonu ve çözünmü oksijen yüzdesi) dü ük tutulmas,ndan kaynaklanmaktad,r.

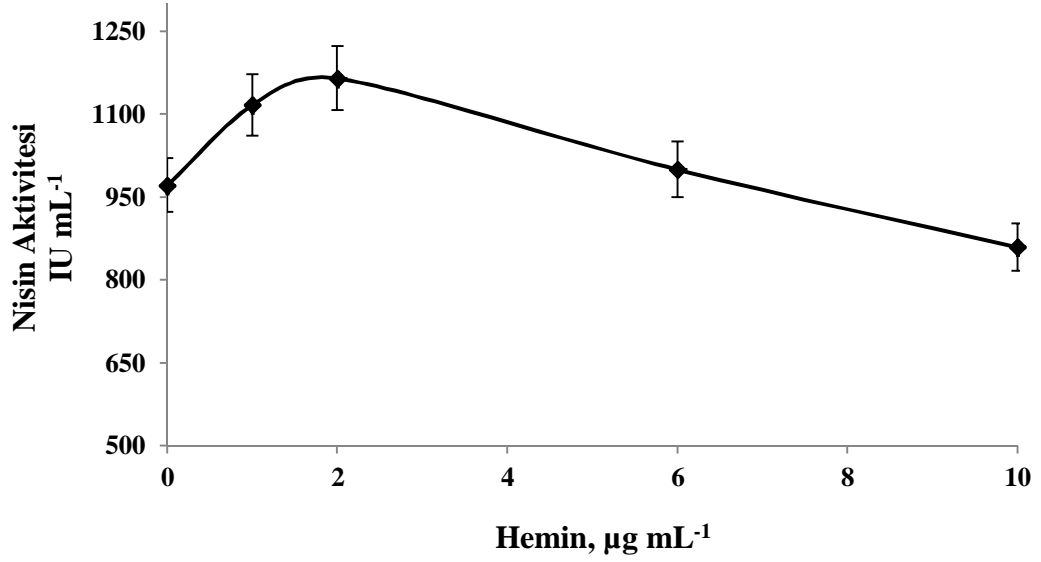
Bugüne kadar farkl, hemin konsantrasyonlar,n,n nisin üreticisi *L. lactis* hücrelerinin geli imi üzerine etkisi rapor edilen bir çal, ma bulunmamaktad,r.

Dolayısıyla yapılan bu çalışmalar, farklı hemin konsantrasyonları, hücre gelişimini önceleri tetikledi ancak ileri konsantrasyonlarda ise hücre gelişimini baskıladı, etkili yaptı. Bilindiği gibi hemin *L. lactis* hücrelerinde homeostasis mekanizmaları ile hücre içerisine alınmakta ancak fazla miktardaki hemin konsantrasyonu hücre içerisinde toksik etkiye bulunabilmektedir (Mayfield ve diğ. 2011, Pedersen ve diğ. 2012).

Heminin hücre gelişimini tetiklemesi nisin üretimini de artırır. Bu durum beklendiği gibi hücre sayısını artırır, bu ile ilişkilidir. Birçok çalışmada nisin üretiminin hücre sayısı ile bağlantılı olduğu rapor edilmiştir. Kim ve diğ. (2009) 60 dakikalık periyotlarla besiyerinin dekontaminasyonu durumunda *L. lactis* hücre yoğunluğunun artması ile birlikte nisin üretiminin önemli ölçüde artması nisin üretiminin hücre yoğunluğu ile ilişkili olduğunu göstermiştir.



(a)



(b)

ekil 4.1 Farklı hemin konsantrasyonları kullanılarak yürütülen yarı-kesikli fermentasyonda hemin ile solunuma tevik edilmiş *L. lactis* N8 suyunun hücre kuru ağırlığı (mg mL^{-1}) (a) ve nisin üretimi (IU mL^{-1}) (b).

4.2 Yar,-kesikli Fermentasyon Sisteminde Glukoz Konsantrasyonunun Nisin Üretimi ve Biyokütle Üzerine Etkisi

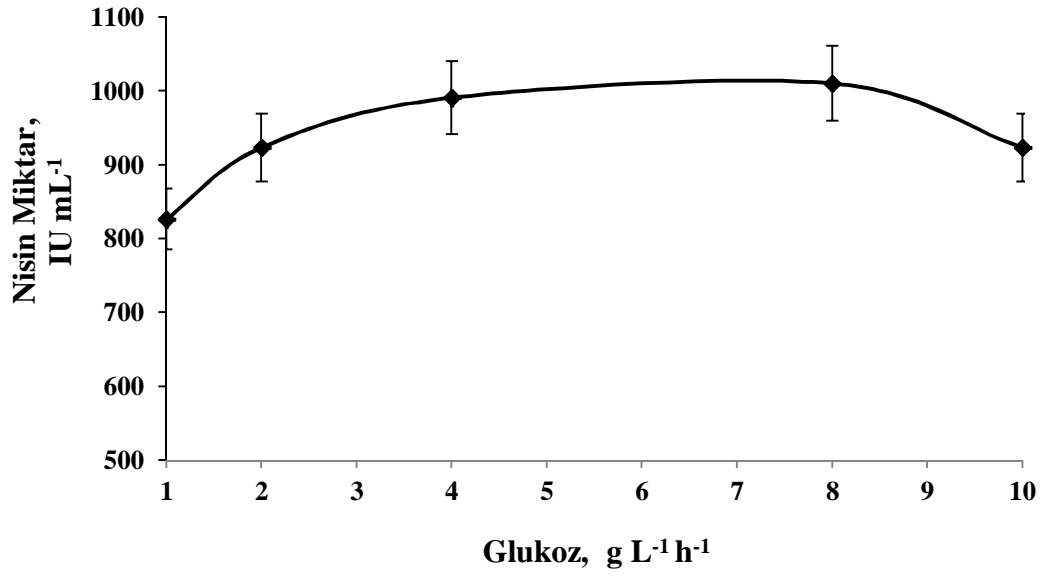
Yar,-kesikli fermentasyon ortam,na beslenen glukoz konsantrasyonunun (1, 2, 4, 8 ve 10 g L⁻¹ h⁻¹) biyokütle ve nisin üretimine etkisini belirlemek için yürütülen fermentasyonda alınan örneklerin hücre kuru a ,rl , , (mg mL⁻¹) ve nisin üretim miktar, (IU mL⁻¹) ölçüldü. *L. lactis* N8 su unun biyokütle ve nisin üretim miktar, fermentasyon ortam,na 8 g L⁻¹ h⁻¹ konsantrasyonunda glukoz beslemesine kadar artt,. Daha yüksek konsantrasyondaki glukoz beslemesinde ise söz konusu parametrelerde dü ü tespit edildi. Buna göre, en yüksek biyokütle oran,na (0,63 g L⁻¹) ve nisin üretimine (1010 IU mL⁻¹) 8 g L⁻¹ h⁻¹ oran,nda glukoz besleme h,z,nda ula ,ld, (ekil 4.2 a ve b). 10 g L⁻¹ h⁻¹ glukoz beslemesi ile yapılan yar,-kesikli fermentasyonda tespit edilen hücre biyokütle a ,rl , , 8 g L⁻¹ h⁻¹ oran,nda beslenerek yapılan fermentasyona k,yasla % 22 oran,nda azald, ve 0,49 g L⁻¹ olarak ölçüldü. Bu duruma paralel olarak nisin üretimi de 923 IU mL⁻¹ hesapland,.

Papagianni ve di erleri (2007^a) sabit glukoz konsantrasyonun sa land, , fermentasyon ko ullar,nda *L. lactis* ssp. *lactis* ATCC 11454'æte nisin üretimini ara t,rm, t,r. Bu çal, mada 2.5 g L⁻¹ ile 75 g L⁻¹ aras,nda de i en farklı glukoz konsantrasyonlar,n denendi i yar, kesikli fermentasyonlar gerçekte tirilmi tir. En yüksek nisin üretimine (6100 IU mL⁻¹) glukozun 10 g L⁻¹ konsantrasyonda sabit tutulan aerobik yar,-kesikli fermentasyon sonucunda ula ,lm, t,r. Ortamdaki glukoz konsantrasyonun 10 g L⁻¹ a mas, durumunda hücrelerin glukoz doygunlu una ula t, , ve buna ba l, olarak da nisin üretiminin azald, , belirlenmi tir.

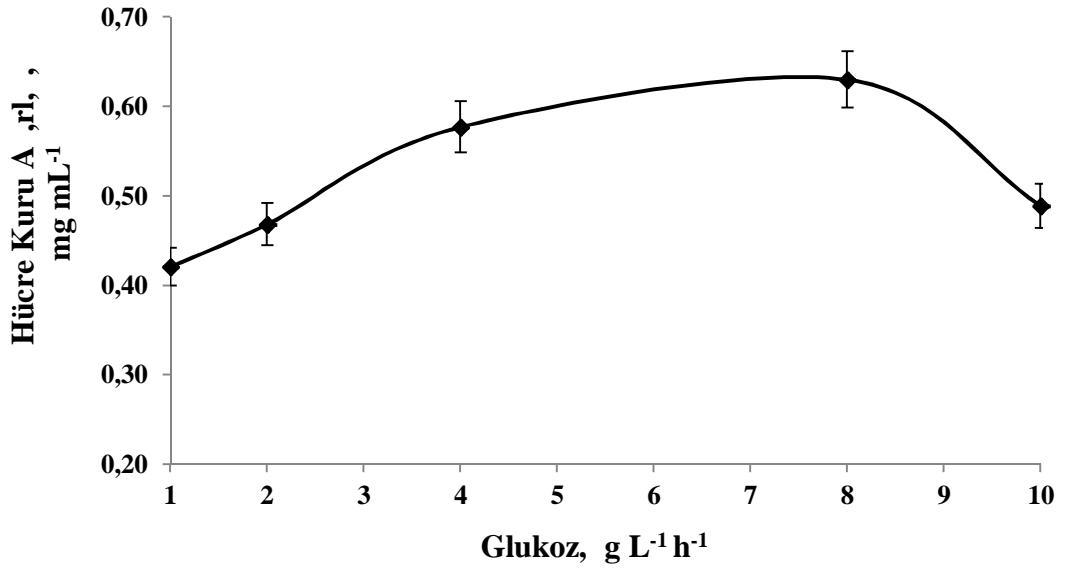
Mikroaerobik ko ullarda yürütülen di er bir çal, mada farklı glukoz konsantrasyonlar, (2,475 g L⁻¹ ile 99,9 g L⁻¹) kullan,lm, , yar,-kesikli fermentasyonda *L. lactis* ssp. *lactis* LM0230'æta en yüksek biyokütle miktar,na 9,9 g L⁻¹ h⁻¹ oran,nda glukoz beslemesi durumunda ula ,lm, t,r. Bu glukoz de erlerinin üstündeki oranlarda, hücrelerin glikolitik döngülerinde inhibisyonlar,n gerçekte ti i, bu durumun da fosfofruktokinaz enzim aktivitesinin azalmas,ndan kaynakland, , bildirilmi tir (Papagianni ve di . 2007^b).

Bu çal, maya benzer ekilde fermentasyon ortam,nda heminin kullan,ld, , ba ka bir çal, mada, *L. lactis* IL 1403 geli iminin ortamdaki glukoz konsantrasyonu ile ili kisi ara t,r,lm, t,r. 60 g L⁻¹ ile 90 g L⁻¹ aras,ndaki farklı ba lang,ç glukoz

konsantrasyonlar, n, n denendi i bu al, mada, denenen en yüksek glukoz konsantrasyonunda (90 g L^{-1}) bile, hücre geli iminde herhangi bir bask, lanma gzlenlenmemi tir. Hemin içermeyen ortamda geli tirilen *L. lactis* IL 1403 hücreleri $4,1 \text{ g L}^{-1}$ biyokütle a ,rl, ,na kadar geli irken, hemin ilavesi durumunda söz konusu hücrenin biyokütle a ,rl, , $6,6 \text{ g L}^{-1}$ ye ula m, t,r. *L. lactis*-in yüksek glukoz konsantrasyonlar,nda geli iminin bask, land, , vurgulanan birçok al, maya ra men bu al, mada herhangi bir bask, lanman, n olmamas,, heminin mikroorganizman, n metabolik özellikleri üzerindeki olumlu etkilerinden kaynakland, , ekinde yorumlanm, t,r (Razvi ve di . 2008).



(a)



(b)

ekil 4.2 Farklı glukoz konsantrasyonları kullanılarak yürütülen yarı-kesikli fermentasyonda heminin ile solunuma tevik edilmiş *L. lactis* N8 suyunun hücre kuru ağırlığı (mg mL⁻¹) (a) ve nisin üretimi (IU mL⁻¹) (b).

4.3 Yar,-kesikli Fermentasyon Sisteminde Çözünmü Oksijen Konsantrasyonunun Nisin Üretimi ve Biyokütle Üzerine Etkisi

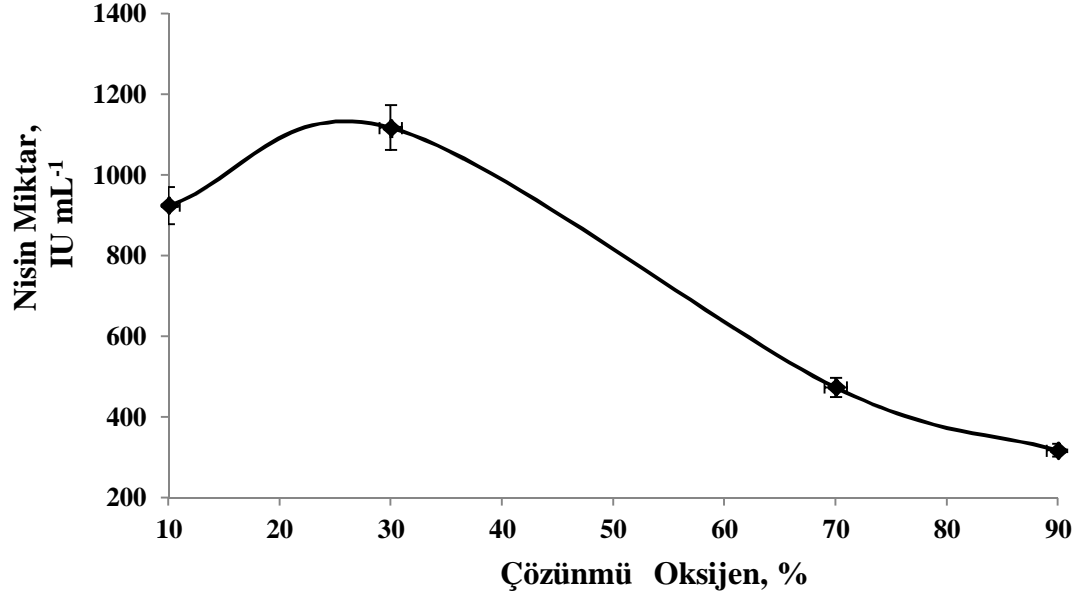
Yar, kesikli fermentasyon ortam,nda çözünmü oksijen konsantrasyonunun nisin üretimine olan etkisini belirlemek için; % 10, 30, 70, ve 90 oranlar,nda çözünmü oksijen içeren ortamlarda yar,-kesikli fermentasyonlar yürütüldü ve toplanan örneklerde hücre kuru a ,rl, , (mg mL⁻¹) ve nisin üretim miktar, (IU mL⁻¹) ölçüldü. ekil 4.3a ve b'de görüldü ü gibi % 30 çözünmü oksijen miktar,na sahip ortamda gerçekleştirilen yar,-kesikli fermentasyon sonunda maksimum hücre biyokütle a ,rl, , ve nisin üretim miktar,na ula ,ld, ve bu de erler s,ras, ile 0.47 mg mL⁻¹, 1117 IU mL⁻¹ olarak ölçüldü.

ekil 4.3a incelendi inde, fermentasyon ortam,nda kullan,lan yüksek çözünmü oksijen miktar,n,n (%70 ve 90) üretici hücre üzerinde artan stres ortam, olu turdu u, buna ba l, olarak da mikrobiyel üremenin azald, , tespit edildi. Dikkati çeken di er bir nokta ise yüksek oksijen miktarlar,n,n (%70 ve 90) nisin üretimi ve aktivitesi üzerinde inhibisyona neden olmas,d,r (ekil 4.3 b). Nitekim %90 çözünmü oksijen yüzdesi ile yap,lan yar,-kesikli fermentasyonun sonunda ula ,lan biyokütle a ,rl, ,ndaki dü ü (0,433 mg mL⁻¹) ayn, oksijen seviyesinde ölçülen nisin miktar,ndaki (317 IU mL⁻¹) dü ü ten daha ,l,ml,d,r. Bu durumun fermentasyon ortam,nda yüksek miktarda çözünmü olarak bulunan oksijenin, üretilen nisinde antimikrobiyal aktivite kay,plar,na neden olmas,ndan ileri geldi i varsay,lmaktad,r. Nitekim nisin, yap,s,nda bulunan lantiyonin köprülerindeki sülfür atomlar,n,n serbest oksijen ile doyurulmas, durumunda mevcut aktivitesini kaybetmektedir. Dolay,s,yla fermentasyon ortam,nda bulunan yüksek miktarlardaki çözünmü oksijen, nisin biyomolekülünün yap,s,n, bozmak sureti ile antimikrobiyal aktivitelerinde kay,plara yol açmaktad,r (Stanford ve di . 2009).

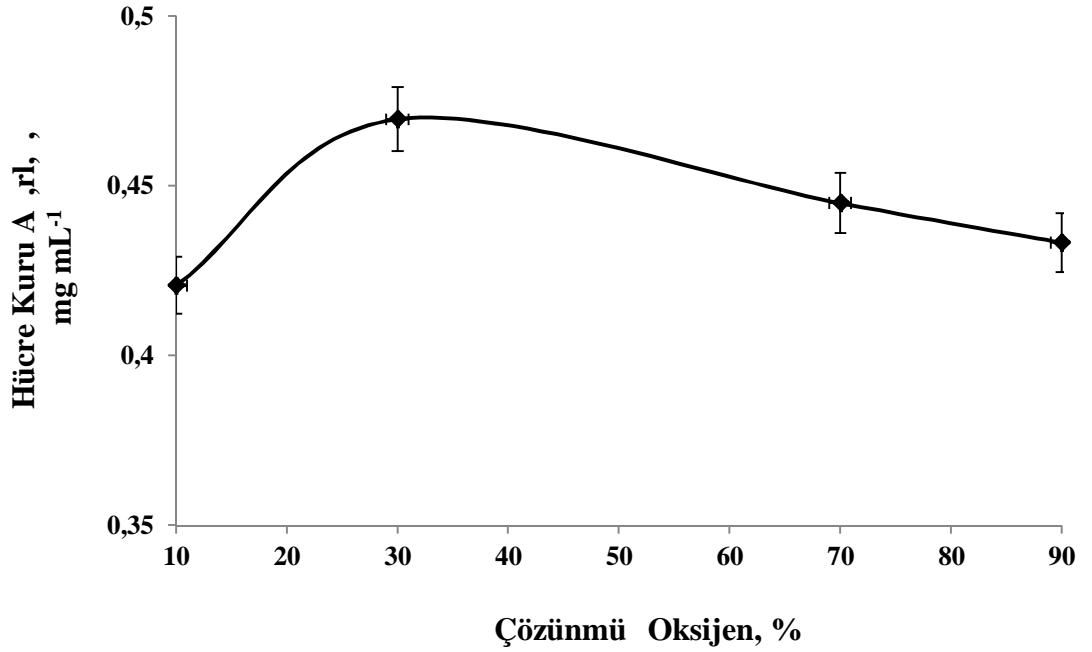
L. lactis, hemin bulunan aerobik ko ullaarda NADH₂ı, NAD⁺ı okside edebilir. *L. lactis*ın söz konusu solunum yapabilme yetene i esas,na dayanan çal, malar,n ço unda hücre biyokütle a ,rl, ,nda önemli art, lar elde edildi i vurgulanm, ve hemin ile te vik edilen solunum sonucu olu an metabolitlerin çe itlili indeki art, ile ortamda biriken laktat,n neden oldu u geri yönlü inhibisyonun büyük ölçüde engellendi i rapor edilmi tir (Duwatt ve di . 2001, Rezaiki ve di . 2004, Lan ve di . 2006, Koebmann ve di . 2008, Brooijmans ve di . 2009^a). Ancak literatürde bu ko ullaarda gerçekleştirilen fermentasyonlarda kullan,lan

oksijen miktarı, nisın üretimine üzerine etkisini inceleyen tek bir çalışma bulunmaktadış. Bu çalışmada 1,25 µg mL⁻¹ hemin ilavesi ile kesikli ve yarı-kesikli mikroaerofilik fermentasyon denemeleri yapılmıştır. Fermentasyonlar sonucunda *L. lactis* ATCC11454 su unda laktat üretiminin baskılandığı, kesikli ve yarı-kesikli fermentasyonlardaki hücre yoğunluğunun sırasıyla 1.8 ve 1.3 kat arttı, tespit edilmiştir. Lakin aynı koşullarda bu hücre tarafından nisın üretiminde kesikli sistemde çok düşük miktarda artış belirlenirken, yarı-kesikli sistemde ise artış olmadıkça ifade edilmiştir (Nagayasu ve diğeri . 2007).

Hemin içermeyen fermentasyon ortamında oksijen kullanımı *L. lactis* nisın üretimi üzerine etkisinin incelendiği çalışmada bulunmaktadış. Bu çalışmalardan birinde *L. lactis* subsp. *lactis* UL719 su u kesikli fermentasyon ortamında farklı oksijen yüzdeleri kullanılarak çoğaltılmış, en yüksek nisın üretimi %60 çözünümlü oksijen miktarında ulaşılmıştır (Amiali ve diğeri . 1998). Bir diğer çalışmada ise Cabo ve diğeri (2001) *L. lactis* subsp. *lactis* IIM su u ile oksijenli ortamda yaptıkları fermentasyonda üretici suyun %100'e kadar artan çözünümlü oksijen miktarında bile nisın üretiminde lineer bir artış sağlandı, tespit etmiştir. Söz konusu bu literatür verileri bu çalışmada ulaşılan optimum oksijen miktarından (%30) yüksektir. Bu farklılık fermentasyon ortamında kullanılan üretici su çeşitliliğinden, kullanılan fermentasyon sistemi ve koşullardan ileri geldiği öne sürülebilir.



(a)



(b)

ekil 4.3 Farklı, çözünmü oksijen konsantrasyonlar, kullanılarak yürütülen yarı kesikli fermentasyonda hemin ile solunuma tevik edilmiş *L. lactis* N8 suyunun hücre kuru ağırlığı (mg mL⁻¹) (a) ve nisin üretimi (IU mL⁻¹) (b).

4.4 Yar,-kesikli Fermentasyon Sisteminde Hemin ile Solunumun Te vik Edildi i *L. lactis* N8 Su unda Nisin Üretimine Cevap Yüzey Yöntemi Modeli ve Optimizasyonu

Çal, ma kapsam,nda yap,lan öncü denemeler neticesinde; hemin, glukoz ve çözünmü oksijen konsantrasyonlar,n,n yar,-kesikli fermentasyon sisteminde *L. lactis* N8 su unun nisin üretimine etkili oldu u tespit edildi. Dolay,s,yla bu parametreler aerobik yar, kesikli fermentasyon sisteminde *L. lactis* N8 su unun nisin üretiminin cevap yüzey yöntemi ile optimizasyonunda fermentasyon de i kenleri olarak belirlendi. Söz konusu bu fermentasyon de i kenlerinin öncü çal, malar ile tespit edilen deneysel aral,klar, Tablo 4.1øde verildi.

Tablo 4.1. Ara t,r,lan parametreler ve deneysel çal, ma aral,klar,

Faktör	De i ken	Seviye		
		-1	0	+1
X ₁	Hemin, µg mL ⁻¹	0,5	1,5	2,5
X ₂	Glukoz, g L ⁻¹ h ⁻¹	1	5,5	10
X ₃	Çözünmü O ₂ ,%	20	50	80

Cevap yüzey yöntemi ile yap,lan optimizasyonda yüzey merkezli tasar,m kullan,larak 20 deneysel noktada (merkezde 6 tekrarl,, 14 farklı kombinasyon) nisin üretimi gerçekleştirildi. Çal, mada kullan,lan deneysel tasar,m noktalar, ve cevaplar, Tablo 4.2øde verildi. Tasar,m matrisi ve her bir terimin uyumu varyans analizi (ANOVA) ile incelendi ve sonuçlar Tablo 4.3øte gösterildi. Çal, mada fermentasyon de i kenlerine ait deneysel aral,klar (Tablo 4.1) kullan,larak olu turulan 20 farklı noktada elde edilen nisin üretim sonuçlar,n,n varyans analizi, modelin R² de erinin % 88.4 ve model uyum eksikli inin ise anlaml, oldu unu (P<0.001) gösterdi. Bu sonuçlar ile elde edilen model denklemin nisin üretimi optimizasyonu için incelenen fermentasyon de i ken aral,klar,nda yüksek do rulukta uygulanamayaca , anla ,ld,.

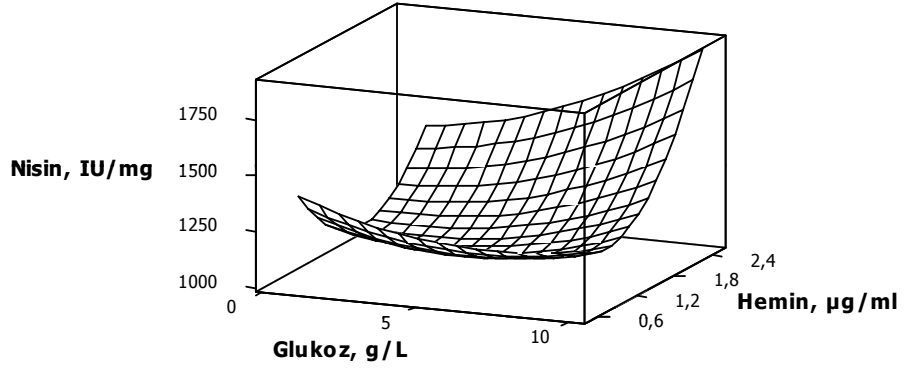
Tablo 4.2 Yar,-kesikli fermentasyon sisteminde glukoz, hemin ve çözünmüş oksijen konsantrasyonları, optimize edilmiş yüzey merkezli kompozit deneme deseni.

Deneme No	Glukoz, g L ⁻¹ h ⁻¹	Hemin, µg mL ⁻¹	Oksijen, %	Nisin, IU mg ⁻¹
1	10	1,5	50	1225,33
2	5,5	1,5	50	1153,64
3	1	2,5	20	1138,30
4	1	2,5	80	762,48
5	5,5	2,5	50	1662,53
6	5,5	1,5	50	1101,16
7	10	0,5	20	464,56
8	1	1,5	50	1268,76
9	5,5	1,5	80	314,63
10	10	2,5	80	1271,82
11	10	0,5	80	1346,87
12	1	0,5	20	1212,78
13	5,5	0,5	50	1231,74
14	5,5	1,5	50	1095,84
15	5,5	1,5	50	1073,39
16	5,5	1,5	50	1077,05
17	1	0,5	80	733,13
18	10	2,5	20	1670,88
19	5,5	1,5	20	1191,11
20	5,5	1,5	50	1118,07

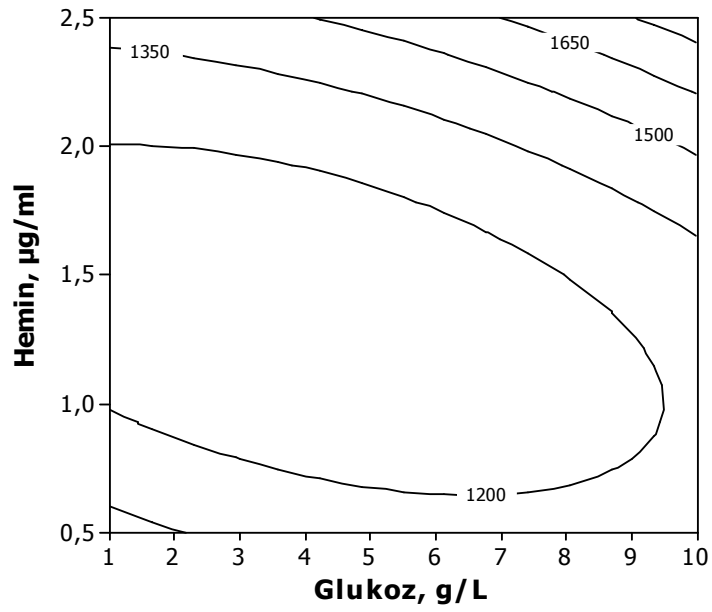
Tablo 4.3 Yar,-kesikli fermentasyon sisteminde glukoz, hemin ve çözünmü oksijen konsantrasyonlar,n,n optimizasyonu için olu turulan yüzey merkezli kompozit deneme desenin varyans analizi.

Kaynak	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplam,	Düzeltilmi Kareler Toplam,	Düzeltilmi Kareler Ortalamas,	F	P
Regresyon	9	2377,18	2377,18	264,131	8,43	0,001
Lineer	3	1143,32	291,19	97,063	3,1	0,076
kinci Derece	3	917,99	917,99	305,997	9,77	0,003
Etkile im	3	315,86	315,86	105,287	3,36	0,063
Art,k Hata	10	313,19	313,19	105,287	3,36	0,063
Uyum Eksikli i	5	302,38	302,38	60,476	27,99	0,001
Saf Hata	5	10,8	10,8	2,161	-	-
Toplam	19	2690,36	-	-	-	-

Çal, ma kapsam,nda belirlenen fermentasyon de i kenleri aral,klar, kullan,larak yap,lan optimizasyonda modelin uyumsuz ç,kmas,, özellikle hemin ve glukoz aral,klar,n,n yeterince geni tutulmamas, ile ili kilidir. Nitekim parametrelerin birisi merkezde sabit tutularak di er faktörlerin birim biyokütlede üretilen nisin miktar,na ili kin olu turulan izohips e rileri ve yüzey grafikleri (ekil 4.4, 4.5, 4.6) incelendi inde hemin ve glukoz optimumlar,n,n kullan,lan maksimum aral, a yak,n oldu u izlendi. Bu durum özellikle hemin ve glukoz konsantrasyonunun art, , ile birlikte hücre büyümesinin artmas, dolay,s,yla ön görülen optimum noktana kaymas, ile ili kilidir. Nitekim varyans analizinde (Tablo 4.3) etkile imin de anlams,z (P=0,063) ç,kmas, bu görü ü do rulamaktad,r.



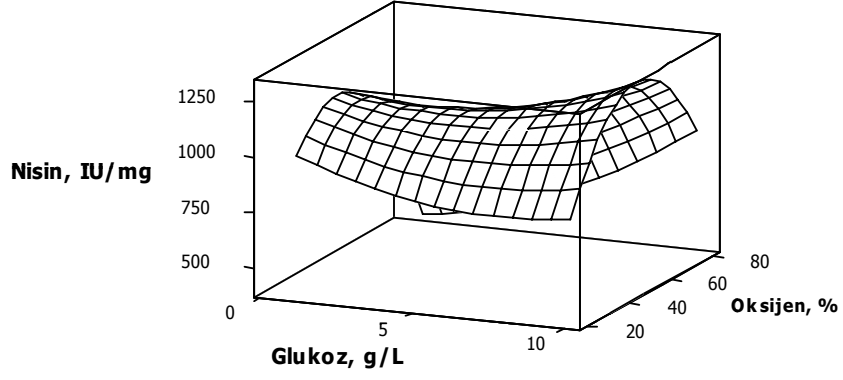
(a)



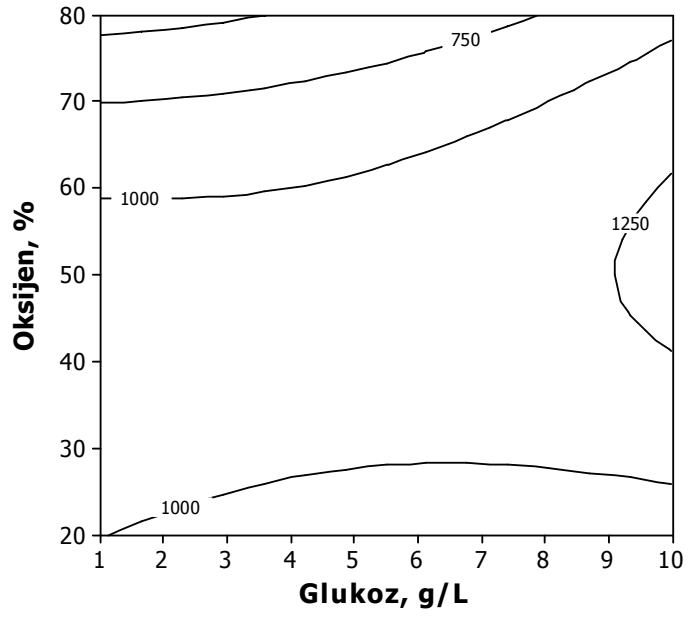
(b)

ekil 4.4 Yar,-kesikli fermentasyon sisteminde glukoz ve hemin konsantrasyonlar,n,n birim biyokütlerde üretilen nisin miktar,na etkisini gösteren

a) izohips e ri ve b) yüzey grafi i.



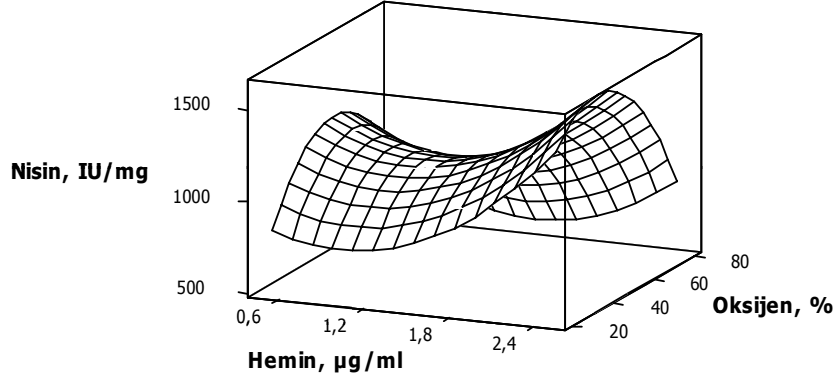
(a)



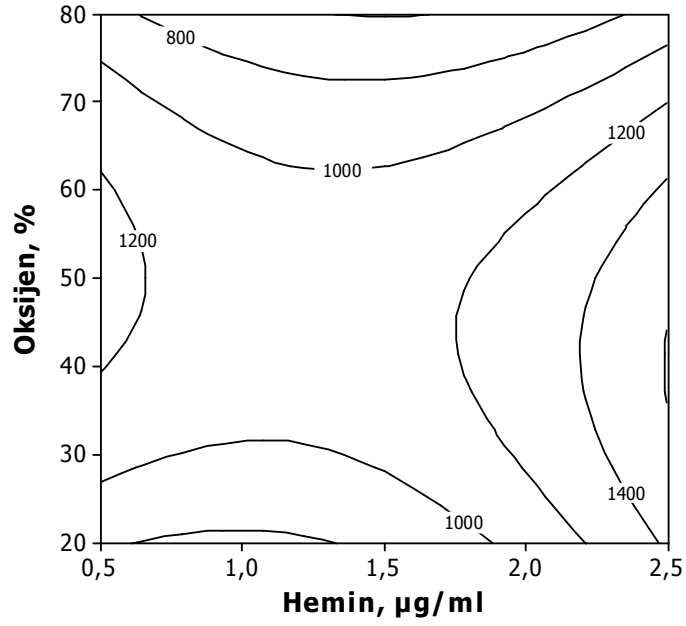
(b)

ekil 4.5 Yar,-kesikli fermentasyon sisteminde glukoz ve çözünmü oksijen konsantrasyonlar,n,n birim biyokütlerde üretilen nisin miktar,na etkisini gösteren

a) izohips e ri ve b) yüzey grafi i.



(a)



(b)

ekil 4.6 Yar,-kesikli fermentasyon sisteminde hemin ve çözünmüş oksijen konsantrasyonları, birim biyokütlede üretilen nisin miktarına etkisini gösteren

a) izohipsleri ve b) yüzey grafiği.

Çal, mada kullan,lan fermentasyon de i kenlerinin ön görülen aral,klar,n,n cevap yüzey modeli ile uyumsuz ç,kmas, özellikle analiz sonuçlar,n,n optimum parametrelerin maksimum de erlerin üzerinde oldu una i aret etmesi dolay,s,yla çal, maya ek denemeler ilave edildi. Bunun için çal, mada hemin ve glukoz için s,ras,yla 4,5 µg mL⁻¹ ve 15 g L⁻¹ h⁻¹ maksimum noktalar, ele al,nd,. Buna göre çal, mada Tablo 4.4 verilen 6 adet deneme ilave olarak yap,ld,.

Tablo 4.4 Yar,-kesikli fermentasyon sisteminde glukoz, hemin ve çözünmü oksijen konsantrasyonlar,n,n optimizasyonu için olu turulan yüzey merkezli kompozit deneme desenine ilave edilen denemeler.

Deneme No	Glukoz, g L ⁻¹ h ⁻¹	Hemin, µg mL ⁻¹	Oksijen, %	Nisin, IU mg ⁻¹
1	15	4,5	20	384,40
2	15	4,5	80	491,87
3	5	4,5	20	910,42
4	5	4,5	80	428,43
5	10	4,5	20	1168,44
6	10	4,5	80	680,00

Modelin önerdi i deneme deseninde elde edilen verilerin içerisinde merkezde tekrarlar sonucunda elde edilmi benzer olan alt, adet deneme seçilerek çal, ma deseninden ç,kar,ld,. Bu verilerin yerine yap,lan ek denemeler (Tablo 4.4) sonunda ula ,lan birim biyokütlede nisin üretim sonuçlar, eklendi ve Minitab istatistik program,nda cevap yüzey modeli kullan,larak yeniden analiz edildi. Yap,lan varyans analizine göre (Tablo 4.5) model uyumunu gösteren R² de eri % 98.3, model uyum eksikli i ise anlams,z (P=0,165) olarak bulundu. Tespit edilen bu sonuçlar hemin, glukoz ve çözünmü oksijen konsantrasyonu için yar,-kesikli fermentasyonda elde edilen model denklemin nisin konsantrasyonu için yüksek do rulukta uygulanabilece ine i aret etti.

Tablo 4.5 Yar,-kesikli fermentasyon sisteminde glukoz, hemin ve çözünmü oksijen konsantrasyonlar,n,n optimizasyonu için olu turulan yüzey merkezli kompozit geni letilmi deneme desenin varyans analizi.

Kaynak	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplam,	Düzeltilmi Kareler Toplam,	Düzeltilmi Kareler Ortalamas,	F	P
Regresyon	9	5847169	5847169	649685	69,17	0,000
Lineer	3	1888522	2718153	906051	96,46	0,000
ikinci Derece	3	3471286	2927174	975725	103,88	0,000
Etkile im	3	487360	487360	162453	17,3	0,000
Art,k Hata	11	103322	103322	9393	-	-
Uyum Eksikli i	6	77585	77585	12931	2,51	0,165
Saf Hata	5	25737	25737	5147	-	-
Toplam	20	5950491	-	-	-	-

Tablo 4.5'ten görüldü ü gibi glukoz ve hemin deneme aral,klar,n,n geni letilmesi durumunda lineer, ikinci derece ve etkile imi anlaml, (P<0.001) bulundu. Bu sonuçlar solunumun te vik edildi i *L. lactis* N8 su unun yar,-kesikli fermentasyon sisteminde nisin üretiminde her bir parametrenin tek tek etkili oldu unu gösterdi. Hatta model e itlikteki katsay,lar,n regresyon analizi de sonuçlar, destekledi. Buna göre deneysel veriler üzerine çoklu regresyon analizi uygulanarak ve elde edilen regresyon katsay,lar, kullan,larak yüzey merkezli tasar,m için ikinci dereceden model denklem e itlik 3øde gösterildi i ekilde olu turuldu.

$$Y = -2968,09 + 111,79X_1 + 2944,32X_2 + 33,38X_3 - 12,70X_1^2 + 532,57X_2^2 + 0,61X_3^2 + 0,78 X_1 X_3 + 3,31X_2 X_3 \quad (3)$$

Tablo 4.6'da glukoz, hemin ve çözünmüş oksijen konsantrasyonları ile nisin üretimi (cevap) arasında pozitif doğrusal bir etki olduğu gözlemlenmiştir ($P < 0.001$). Bu sonuç artan fermentasyon derinliklerinde nisin üretiminin de artacağını göstermektedir.

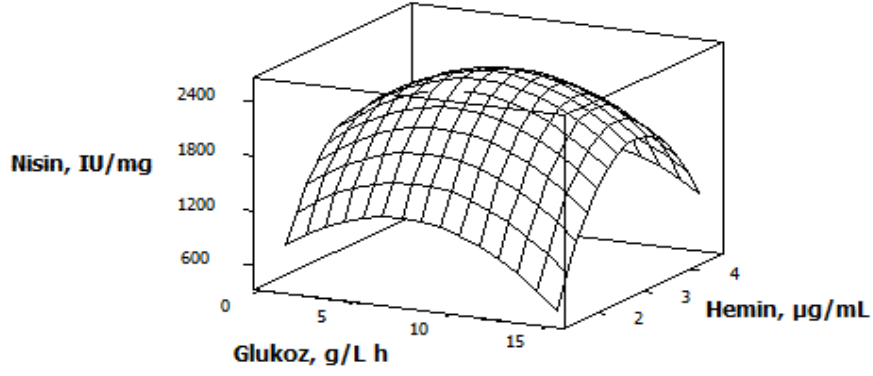
P değerleri her bir katsayının önemini kontrol etmek için bir araç olarak kullanılmaktadır. P değerinin küçük olması, katsayıya ilişkin bağımsız önem derecesinin daha fazla olduğunu göstermektedir. Modelde kullanılan üç fermentasyon derinliği içerisinde hemin, en yüksek lineer regresyon katsayısıyla (2944,32) nisin üretimi üzerine en büyük etkiye sahiptir. Heminin yanı sıra glukoz konsantrasyonu (111,79) ve çözünmüş oksijen konsantrasyonu (33,38) takip etti.

Bağımsız derinliklerin etkileri incelendiğinde; glukoz-hemin arasındaki etkileşimler $P > 0.05$ düzeyinde önemli olmadıkları belirlendi (Tablo 4.6). Bu değer 0.05'ten büyük olduğu için yarı-kesikli fermentasyon sisteminde aerobik solunuma tercih edilmiş *L. lactis* N8 suşunda nisin üretiminin tahminlenmesi için oluşturulan ikinci dereceden modelde bu etkileşim kullanılmadı. Diğer taraftan Tablo 4.6 incelendiğinde hemin, glukoz ve oksijen konsantrasyonunun nisin üretimi üzerinde negatif kuadratik etkisinin olduğu gözlemlendi ($p < 0.05$). Bu sonuç; artan fermentasyon derinlik seviyelerinin bir dereceye kadar nisin üretiminin arttırılmasına ancak belli bir seviyenin üzerine çıkıldığında nisin üretimini azalttığına işaret etmektedir.

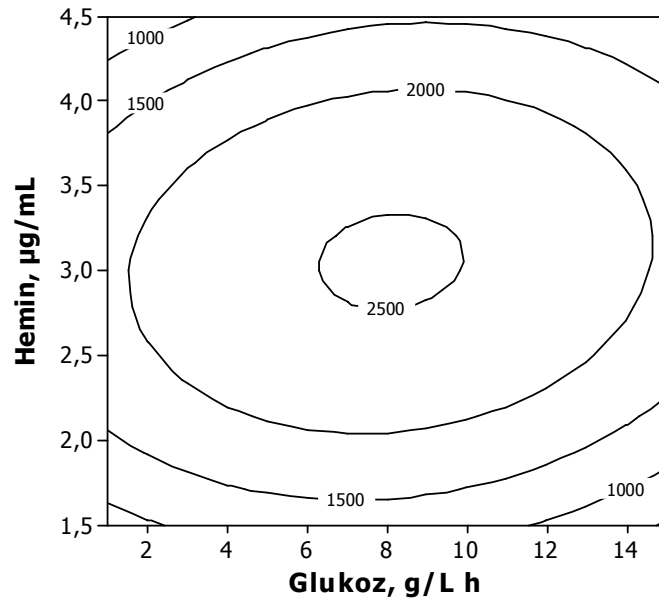
Tablo 4.6 Yar,-kesikli fermentasyon sisteminde glukoz, hemin ve çözünmüş oksijen konsantrasyonları için tahmin edilen regresyon katsayıları,

Terim	Katsayılar	SH katsayıları,	T	P
Sabit	-2968,09	360,588	-8,231	0,000
Glukoz, g L ⁻¹ h ⁻¹	111,79	23,254	4,807	0,001
Hemin, µg mL ⁻¹	2944,32	180,492	16,313	0,000
Oksijen, %	33,38	7,52	4,438	0,001
Glukoz, g L ⁻¹ h ⁻¹ * Glukoz, g L ⁻¹ h ⁻¹	-12,7	2,086	6,089	0,000
Hemin, µg mL ⁻¹ * Hemin, µg mL ⁻¹	-532,57	30,972	-17,195	0,000
Oksijen, % * Oksijen, %	-0,61	0,07	-8,711	0,000
Glukoz, g L ⁻¹ h ⁻¹ * Hemin, µg mL ⁻¹	18,12	9,127	3,271	0,073
Glukoz, g L ⁻¹ h ⁻¹ * Oksijen, %	0,78	0,237	3,271	0,007
Hemin, µg mL ⁻¹ * Oksijen, %	3,31	0,877	3,77	0,003

ekil 4.7, ekil 4.8 ve ekil 4.9'da parametrelerden bir tanesi merkezde sabit tutuldu unda, diğer iki faktör seviyelerinin nisın üretimine olan etkileri izohips e rileri ve yüzey grafikleri ile gösterilmiştir. Maksimum nisın konsantrasyonu faktörlerin orta seviyelerinde elde edilmiştir ve daha yüksek art, lar nisın üretiminde azalmaya neden olmuştur.

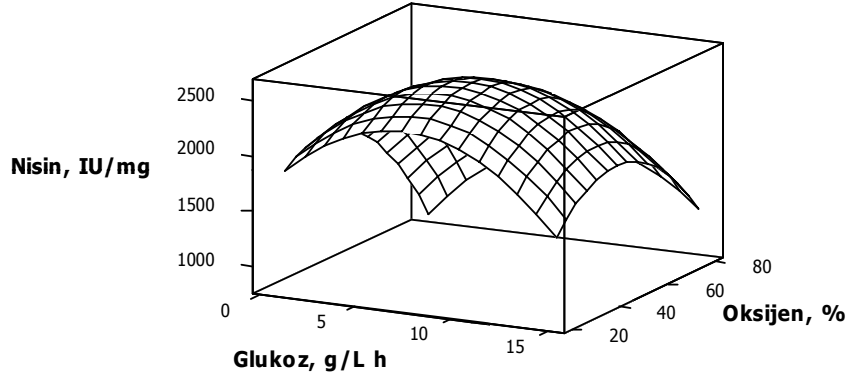


(a)

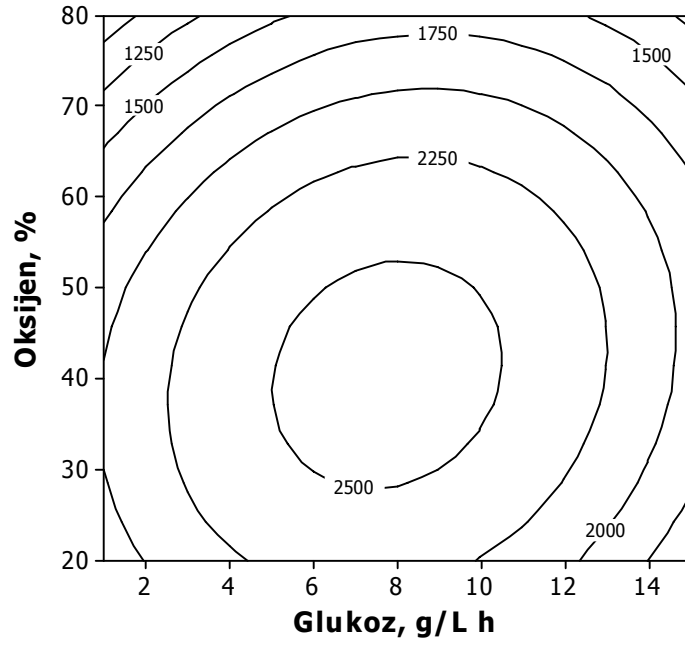


(b)

ekil 4.7 Yar,-kesikli fermentasyon sisteminde glukoz ve hemin konsantrasyonlar,n,n birim biyokütlerde üretilen nisin miktar,na etkisini gösteren düzeltilmi a) izohips e ri ve b) yüzey grafi i.

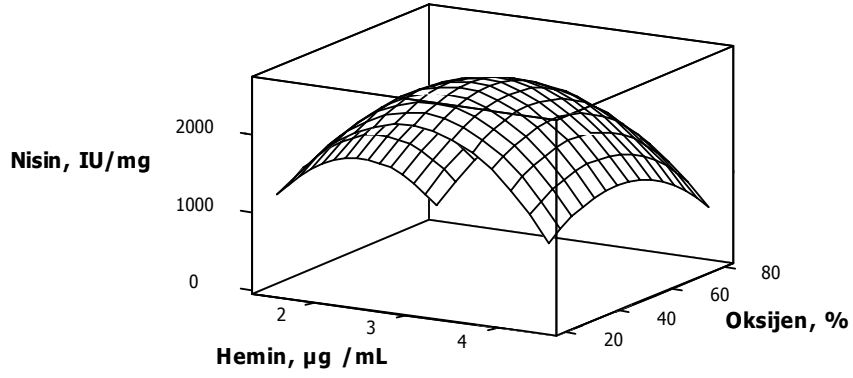


(a)

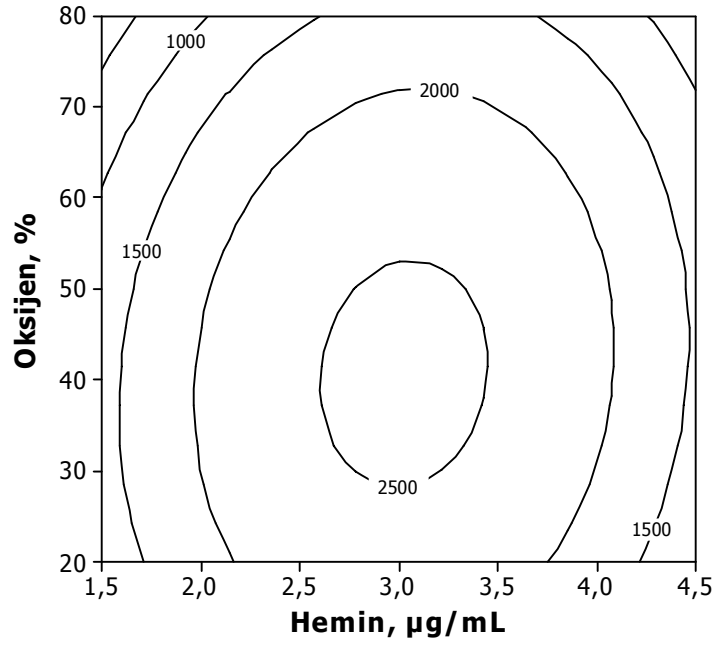


(b)

ekil 4.8 Yar,-kesikli fermentasyon sisteminde glukoz ve çözünmüş oksijen konsantrasyonları, n, n birim biyokütlede üretilen nisin miktarına etkisini gösteren düzeltilmiş a) izohipsleri ve b) yüzey grafiğidir.



(a)



(b)

ekil 4.9 Yar,-kesikli fermentasyon sisteminde hemin ve çözünmüş oksijen konsantrasyonları, birim biyokütlede üretilen nisin miktarına etkisini gösteren düzeltilmiş A) izohipsleri ve B) yüzey grafiği.

4.4 Hemin ile Solunumun Tevik Edildi i Yar,-kesikli Fermentasyon Sisteminde Optimum Parametreler Kullanılarak *L. lactis* N8'de Nisin Üretimi

Yar,-kesikli fermentasyon sisteminde aerobik solunuma tevik edilmi *L. lactis* N8 suunun nisin üretiminin optimizasyonu için oluşturulan ikinci dereceden polinomial eşitlik yardımıyla en yüksek nisin üretiminin $3,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ hemin, $8 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ glukoz konsantrasyonunun beslenmesi ve ortamda %40 çözünümlü oksijen miktarının sağlanması ile elde edileceği belirlendi. Aerobik solunuma tevik edilen yar,-kesikli fermentasyon (heminli, yar,-kesikli) ile hemin ve oksijenin kullanılmadığı kontrol fermentasyonda (heminsiz, yar,-kesikli) Kısım 3.2'de bahsedilen çalışma protokolü aynen takip edildi ve 24 saat fermentasyon gerçekleştirildi. Kontrol (heminsiz, yar,-kesikli) uygulamasında hemin ve oksijen içermeyen, sadece $8 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ glukoz beslemesi yapılan yar,-kesikli fermentasyon sistemi kullanıldı. Bu şekilde optimizasyonu yapılan hemin ve çözünümlü oksijen miktarları, hücre biyokütle gelişimi ve nisin üretimi üzerindeki etkileri ve farklılıkları araştırıldı. Heminli ve heminsiz yar,-kesikli uygulamalarda gerçekleştirilen fermentasyonlar boyunca 0, 1, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 13, 15, 24. saatlerde fermentasyon ortamından örnekleme yapıldı ve alınan her bir örneğin hücre biyokütle miktarı (mg mL^{-1}) ve nisin üretim miktarı (IU mL^{-1}) ölçüldü. Şekil 4.10 A'da görüldüğü gibi, en yüksek hücre biyokütle miktarına ($1,00 \text{ mg mL}^{-1}$) heminli, yar,-kesikli fermentasyonun 11. saatinde ulaşıldı. Heminsiz, yar,-kesikli fermentasyonun aynı saatinde ise bu değer $0,55 \text{ mg mL}^{-1}$ olarak ölçüldü. Sonuç olarak, hücre biyokütle miktarında heminli, yar,-kesikli fermentasyonun, heminsiz, yar,-kesikli fermentasyona kıyasla aynı fermentasyon saatinde yaklaşık 1,8 kat artış sağlandı.

Şekil 4.10 A'da, iki fermentasyonda da ulaşılan maksimum biyokütle miktarının ölçüldüğü fermentasyon zamanları, araştırıldı. Aynı zamanda, heminli, yar,-kesikli fermentasyonda maksimum hücre biyokütle miktarına ($1,00 \text{ mg mL}^{-1}$) 11. saatte, hemin içermeyen kontrol grubunda ise maksimum hücre biyokütle miktarına ($0,65 \text{ mg mL}^{-1}$) 15. saatte ulaşıldığı görülmektedir. Bu durum heminli, yar,-kesikli fermentasyona ilave edilen heminin *L. lactis* N8 suunda lag faz için gerekli süreyi kısalttığından, diğer yandan logaritmik üreme hızının ise arttırıldığına işaret etmektedir.

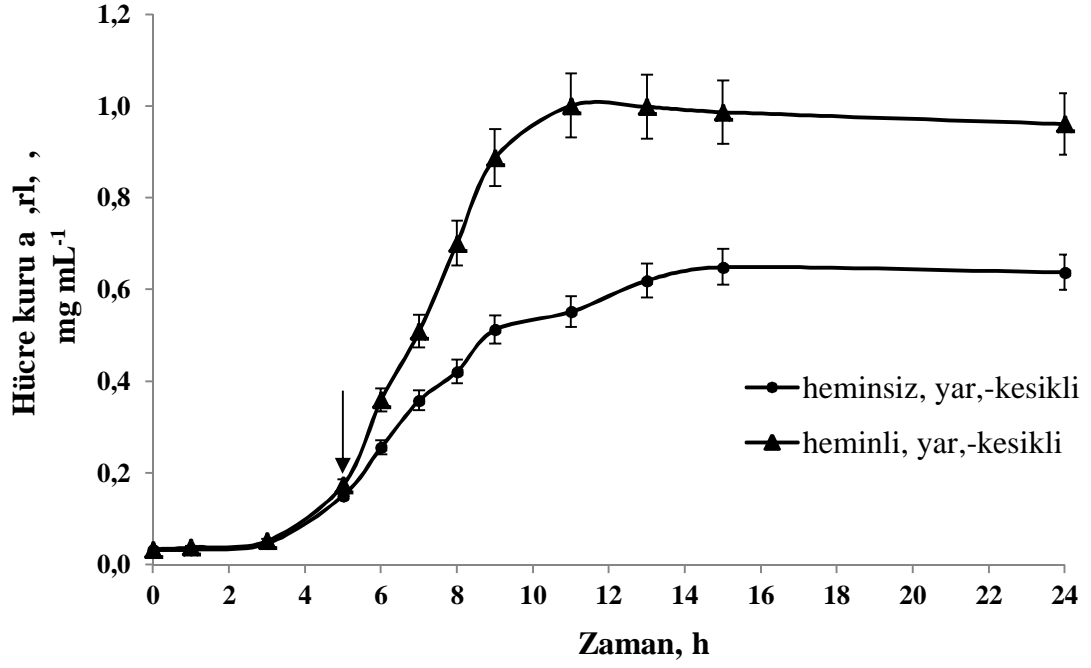
Lan ve diğerleri (2006) hemin içeren ve içermeyen aerobik ve anaerobik kesikli fermentasyon ortamlarında *L. lactis* LM0230 suunda ulaşılan hücre

biyokütle a ,rl,klar, aras,ndaki fark, incelemi lerdir. Maksimum hücre biyokütle a ,rl, ,na ($5,78 \text{ g L}^{-1}$) heminli aerobik ko ulda gerçekle tirilen fermentasyon ortam,nda ula m, lard,r. Hemin içeren kesikli fermentasyon ortam,nda yap,lan bir ba ka al, mada ise *L. lactis* MG1363 su unda $5,250$ (OD_{600}) hücre yo unlu una ula ,lm, t,r. Ayn, al, mada heminsiz ortamda yap,lan kesikli fermentasyonda absorbans de eri $2,600$ (OD_{600}) olarak ölçülmü ve al, mada heminin hücre biyokütle yo unlu unu önemli oranlarda art,rd, , vurgulanm, t,r (Brooijmans ve di . 2007). Nagayasu ve di erleri (2007) *L. lactis* ATCC 11454 su unu kullanarak hemin içeren ortamda yar,-kesikli fermentasyonda heminsiz yürütölen fermentasyon ortam,nda ula ,lan hücre biyokütle a ,rl, ,na oranla 1.6 kat daha fazla hücre yo unlu una ula t,klar,n, rapor etmi lerdir. Bir de erlendirme yap,ld, ,nda bu literatür verileri ile al, mada ula ,lan biyokütle art, ,n,n uyumlu oldu u görölmektedir. Di er yandan literatürlerde de ifade edildi i gibi hemin ilavesi hücrelerin enerjetik seviyesini art,rd, ,ndan, hücrelerin daha k,sa lag faz, ve daha uzun logaritmik faz geçirmelerini sa lamaktad,r.

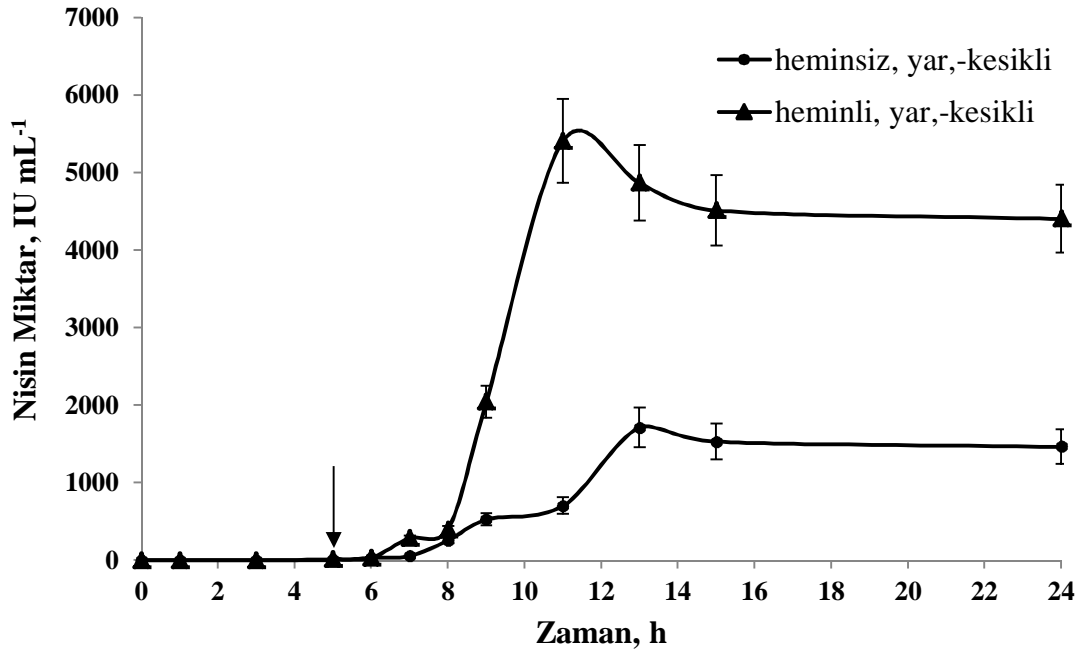
Heminli ve heminsiz, yar,-kesikli ko ullarda gerçekle tirilen fermentasyonlardaki nisin üretim miktarlar, ekil 4.10 Bøde gösterildi. Her iki fermentasyonda da hücre a ,rl, ,n,n art, ,na paralel olarak nisin üretiminde art, tespit edildi. Heminli, yar,-kesikli fermentasyonda maksimum nisin üretimine 11. saatte (5410 IU mL^{-1}), heminsiz, yar,-kesikli fermentasyonda ise 13. saatte (1711 IU mL^{-1}) ula ,ld,. Heminsiz yar,-kesikli fermentasyonun 11. saatinde ölçölen nisin üretim miktar, ise 702 IU mL^{-1} olarak belirlendi. Her iki fermentasyon uygulamas,nda da maksimum nisin üretim miktar,na ula ,ld,ktan sonra dü ü gözlendi ve daha sonra heminli, yar,-kesikli fermentasyonda 4404 IU mL^{-1} , heminsiz yar,-kesikli fermentasyonda ise 1403 IU mL^{-1} nisin üretimi ile fermentasyon tamamland,. Her iki uygulaman,n maksimum nisin üretim miktarlar, dikkate al,nd, ,nda heminli yar, kesikli fermentasyonda 3,1 kat daha fazla nisin üretimine ula ,ld,.

Literatürde geli me ortam, içerisine hemin ilavesi yap,larak nisin üretiminin ara t,r,ld, , yaln,zca bir adet al, ma bulunmaktad,r. Nagayasu ve di erleri (2007) taraf,ndan gerçekle tirilen al, mada k,saca $1,25 \mu\text{g ml}^{-1}$ hemin ilavesi ile kesikli ve yar,-kesikli mikroaerofilik fermentasyon denemeleri yap,lm, t,r. Fermentasyonlar sonucunda *L. lactis* ATCC11454 su unda laktat üretiminin bask,land, , kesikli ve

yar,-kesikli fermentasyonlardaki hücre yo unlu unun ise s,ras,yla 1,8 ve 1,3 kat arttı, , tespit edilmiştir. Nitekim aynı ko ullarda kesikli sistemde bu hücre tarafından nisin üretiminde çok düşük miktarda artış belirlenirken, yar,-kesikli sistemde ise hiç artış olmadı, , ifade edilmiştir. Çal, mada dikkati çeken önemli bir eksiklik yar,-kesikli sistemi temsil eden ve hemin kullanılmayan bir kontrol grubunun olmaması, ya da bununla ilgili herhangi bir bilgi verilmemesidir. Bu nedenle bu yönde rapor edilen tek çal, ma olması itibari ile makalede ifade edilen hemin varlığı, nda nisin üretiminin artmadığı, , hatta hücre yo unlu u ile nisin üretiminin ilikili olmadığı, , yargısı, üphe uyandırmaktadır.



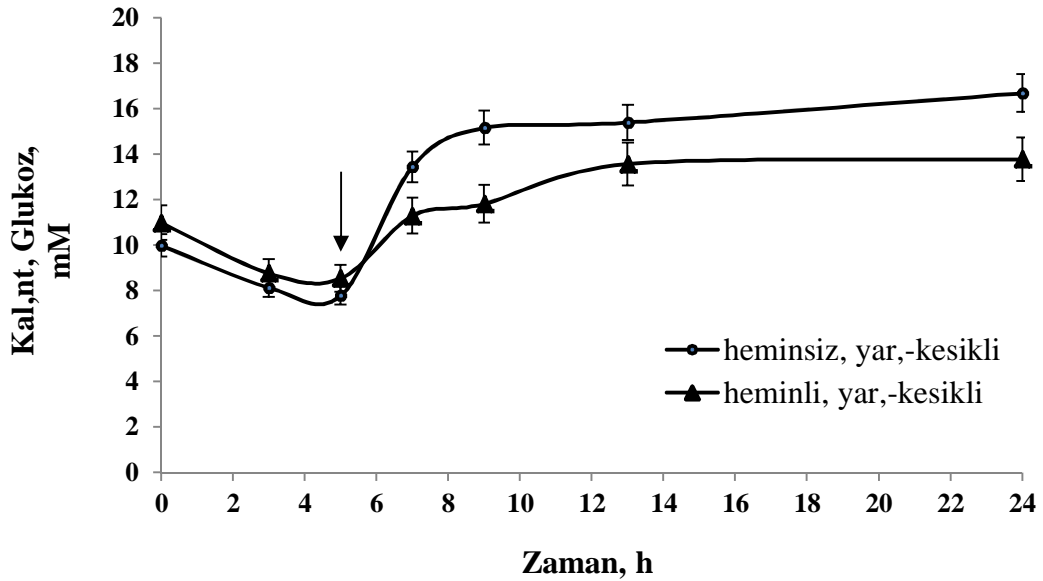
(a)



(b)

ekil 4.10 Heminli ve heminsiz yar, kesikli fermentasyonda oluşan hücre kuru ağırlığı, (a) ve üretilen nisin miktarı, (b)

Heminli ve heminsiz yürütülen yar,-kesikli fermentasyonlarda ortamdaki kal,nt, glukozun miktar, ekil 4.11de gösterildi. Her iki fermentasyonun kesikli olarak yürütülen ilk 5 saatlik dilimde ortamdaki eker miktar, azal,rken, $8 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ beslemesi yap,lmaya ba land, nda ortamdaki kal,nt, glukoz miktar, k,smen artt, ve 9. saatten sonra ise fermentasyon ortam,ndaki kal,nt, glukoz miktar, sabitlendi. ekil 4.11de görüldü ü gibi heminli ve heminsiz yar,-kesikli fermentasyonlarda 9. saatten sonra kal,nt, glukoz miktar, s,ras,yla $13,80 \text{ mM}$ ve $16,70 \text{ mM}$ olarak ölçüldü. Bu sonuçlar de erlendirildi inde, heminli, yar,-kesikli fermentasyonda daha az kal,nt, glukoz bulunmas,n,n bu ko ullarda daha yüksek oranda biyokütle olu mas, ile ili kili oldu u anla ,lmaktad,r. Ayr,ca bu durumun ortama yap,lan hemin ilavesi sonucunda hücrelerin yüksek enerjetik seviyeye ula mas,ndan da ileri geldi i öne sürülebilir. Benzer ekilde Duwatt ve di erleri (2011) *L. lactis* MG1363 su unu kullanarak gerçekle tirdikleri kesikli fermentasyonlarda; hemin içeren ortamda glukoz tüketiminin artt, n,, bunun mikroorganizman,n say,sal art, , ve de i en metabolik yolundan ileri geldi ini rapor etmi tir. Ayr,ca ayn, çal, mada kullan,lan glukoz konsantrasyonunda yap,lan optimizasyon sayesinde; ortama beslenen glukoz ile *L. lactis* N8 taraf,ndan tüketilen glukoz miktar, dengeye ula m, t,r. Bu sayede ortamda artan bir kal,nt, glukoz konsantrasyonu gözlenmemi , fazla miktardaki substrat konsantrasyonunun neden olabilece i geri yönlü inhibisyonun da önüne geçilmesi sa lanm, t,r.

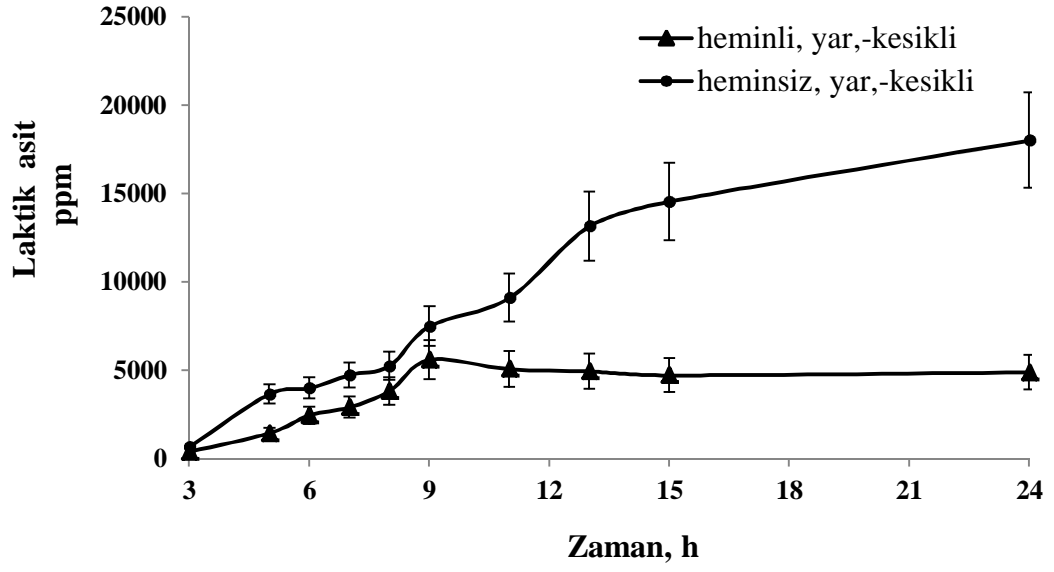


ekil 4.11 Heminli ve heminsiz yar,-kesikli fermentasyonda ortamdaki kal,nt, glukoz miktar,.

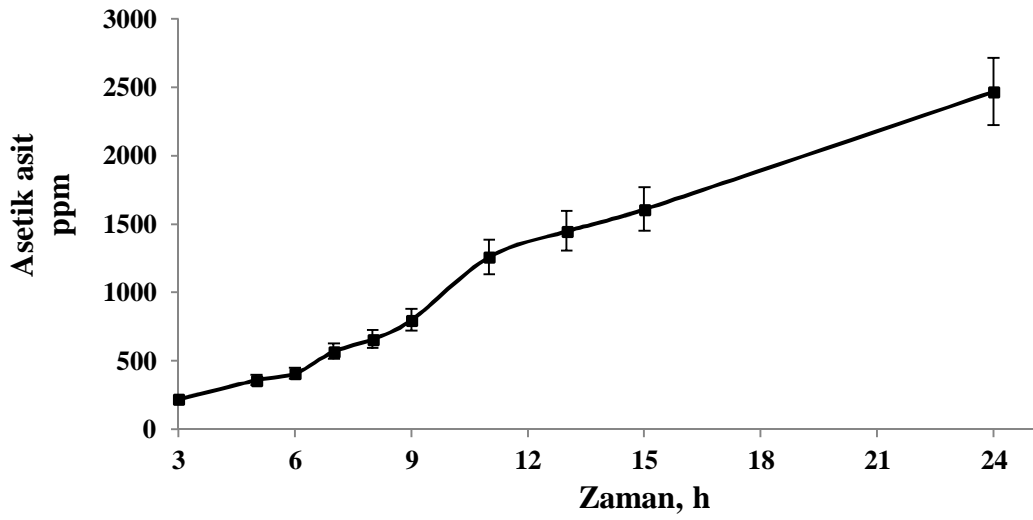
Heminli, yar,-kesikli fermentasyonda fermentasyonun ilk 9 saatinde ortamdaki laktik asit miktar, artt., daha sonraki sürelerde ise yatay bir seyir izledi. Buna göre; heminli, yar,-kesikli fermentasyonda maksimum 5600 ppm laktik asit üretildi, daha sonraki saatlerde 4950 ppm de erine dü erek sabit üretim gerçekleşti. Heminsiz, yar,-kesikli fermentasyonda ise 24 saat fermentasyon sürecinde laktik asit birikimi sürekli artt.. Fermentasyon sonunda ortamda biriken laktik asit konsantrasyonuna 18030 ppm olarak ölçüldü. Heminli, yar,-kesikli fermentasyonun sonunda toplam laktik asit konsantrasyonu heminsiz, yar,-kesikli fermentasyona oranla % 74 oran,nda dü ük bulundu. Aynı ekilde bu oran, tüm fermentasyon saatlerinde ise ortalama % 48 daha dü ük olduğu belirlendi. Bu durum hemin içeren yar,-kesikli fermentasyon ortam,nda *L. lactis* N8 su unda aerobik solunumla birlikte metabolik yolun kar, k asit fermentasyonuna dönüşümünden kaynaklandı.. Dolay,s,yla bu sonuçlar sistemin başar,ı, bir ekilde ortamda laktat birikimini engelledi ini gösterdi (ekil a ve b).

Di er taraftan ekil 4.12 bõde görüldü ü gibi heminli, yar,-kesikli fermentasyonda fermentasyonun baş,ndan itibaren ortamda lineer asetik asit birikimi gözlemlendi. Buna karş,ın heminsiz, yar,-kesikli fermentasyonda ise tüm fermentasyon süresince asetik asit üretimi tespit edilmedi. Heminli, yar,-kesikli fermentasyon sonunda toplam 2470 ppm asetik asit üretildi. Bu sonuç, heminli, yar,-kesikli fermentasyonda *L. lactis* N8 su unda laktik asit üretiminin bask,lanarak, metabolik yolun kar, k asit fermentasyona yönlendirildi inin önemli bir kan,t,d,r.

Yar,-kesikli fermentasyonda solunumun hemin ile te vik edildi i *L. lactis* N8 su unda ula ,ılan toplam laktik ve asetik asit üretim ve oranlar, literatür verileri ile paraleldir. Solunumun hemin ile te vik edildi i *L. lactis* MG1363 su unun kesikli fermentasyonunda laktik asit konsantrasyonu $1,43 \text{ mol glukoz mol}^{-1}$, heminsiz çal ,ılan fermentasyon ortam,nda ise $1,75 \text{ mol glukoz mol}^{-1}$ olarak tespit edilmiştir. Di er yandan hemin varl ,nda üretilen asetik asit konsantrasyonunda ($1,75 \text{ mol glukoz mol}^{-1}$) kontrole ($0,97 \text{ mol glukoz mol}^{-1}$) oranla art, oldu u gözlemlenmiştir (Koebsmann ve di . 2008). Bir başka çal ,mada ise *L. lactis*-in hemin içeren kesikli ve yar, kesikli fermentasyonlar,nda anaerobik ko ullarda üretilen laktat, asetat konsantrasyonlar, s,ras, ile $92,3 \pm 1,3 \text{ mol glukoz mol}^{-1}$, $1,5 \pm 0,1 \text{ mol glukoz mol}^{-1}$ iken, aerobik ko ullarda bu değerler $91,0 \pm 1,5 \text{ mol glukoz mol}^{-1}$ ve $3,2 \pm 0,5 \text{ mol glukoz mol}^{-1}$ olarak ölçülmü tür (Papagianni ve di . 2007).



(a)



(b)

ekil 4.12 Heminli ve heminsiz yar, kesikli fermentasyonda *L. lactis* N8 su u taraf,ndan üretilen laktik asit (a) ve asetik asit (b) miktar,.

6. KAYNAKLAR

- Abee, T., Rombouts, F.M., Hugenholtz, J., Guihard, G. ve Letellier, L., ÷Mode of action of nisin Z against *Listeria monocytogenes* Scott A grown at high and low temperaturesøø Appl. Environ. Microbiol., 60, 1962-1968, (1994).
- Akçelik, M., ÷The conjugal plasmid pLL10236 encodes lactose fermentation ability, restriction/modification activity, bacteriocin production and immunity in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LL102øø Food Microbiol., 16 (5),487-494, (1999).
- Amiali, M.N., Lacroix, C. ve Simard, R.E., ÷High nisin Z production by *Lactococcus lactis* UL719 in whey permeate with aerationøø World J. Microbiol. and Biotechnol., 14, 887-894, (1998).
- Andersen, W.H., Solem, C., Hammer, K., ve Jensen, P., ÷Twofold reduction of phosphofructokinase activity in *Lactococcus lactis* results in strong decreases in growth rate and in glycolytic fluxøø J. of Bacteriol., 183 (11), 3458-3467, (2001).
- Arioli, S., Zambelli, D., Guglielmetti, S., de Noni, I., Pedersen, M.B., Pedersen, D.P., dal Bello, F. ve Mora, D., ÷Increasing the heme-dependent respiratory efficiency of *Lactococcus lactis* by inhibition of lactate dehydrogenaseøø Appl. Environ. Microbiol., 79(1),376, (2012).
- Barber, M., Eliot, G.J., Bordoli, R.S., Green, B.N. ve Bycroft, B.W., ÷Confirmation of the structure of nisin and its major degradation product by FAM-MS and FAM-MS/MSøø Experientia, 44, 266-270, (1988).
- Bass,t, N., Boqu,en, C., P,cque, D. ve Corr,eu, G., ÷Effect of initial oxygen concentration on diacetyl and acetoin production by *Lactococcus lactis subsp. lactis biovar diacetylactis*øø Appl. Environ. Microbiol.,59 (6), 1893-1897, (1993).
- Bertrand, N.,Fliss, I. ve Lacroix, C., ÷High nisin-Z production during repeated-cycle batch cultures in supplemented whey permeate using immobilized *Lactococcus lactis* UL719øø Int. Dairy Jour., 11 (12), 953-960, (2001).
- Blank, M.L., Koebmann, J.B., Michelsen, O., Nielsen, K.L. ve Jensen, P.R., ÷Hemin reconstitutes proton extrusion in an H-ATPase-negative mutant of *Lactococcus lactis*øø J. of Bacteriol., 183 (22), 6707-6709, (2001).
- Bolotin, A., Mauger, S., Malarne, K., Ehrlich, S.D. ve Sorokin, A., ÷Low-redundancy sequencing of the entire *Lactococcus lactis* IL1403 genomeøø Ant. van Leeuwen.,76,27-76, (1999).

Brooijmans, R.J., de Vos, V.M. ve Hugenholtz, J., ÷*Lactobacillus plantarum* WCFS1 electron transport chainsøø Appl. Environ. Microbiol., 75, 3580-3585, (2009^b).

Brooijmans, R.J., Poolman, B., Schuurman-Wolters, G.K., Vos, W.M. ve Hugenholtz, J., ÷Generation of a membrane potential by *Lactococcus lactis* through aerobic electron transportøø J. of Bacteriol., 189 (14), 5203-5209, (2007).

Brooijmans, R.J., Smit, B., Santos, F., Riel, J.V., Vos, W. ve Hugenholtz, J., ÷Heme and menaquinone induced electron transport in lactic acid bacteriaøø Microb. Cell. Fact., 8 (28), 1475-1486, (2009^a).

Bryan-Jones, D.G., ve Whittenbury, R., ÷Haematin-dependent oxidative phosphorylation in *Streptococcus faecalis*øø J. Gen. Microbiol., 58, 247-60, (1969).

Cabo, M.L., Murado, M.A., Gonzalez, M.P., Vazquez, J.A. ve Pastoriza, L., ÷An empirical model for describing the effects of nitrogen sources on nisin productionøø Lett. Appl. Microbiol., 33 (6), 425-9, (2001).

Chan, W.C., Lian, L.Y., Bycroft, B.W. ve Roberts, G.C.K., ÷Confirmation of the structure of nisin by complete 1 H NMR resonance assignment in aqueous and dimethyl sulfoxide solutionøø J. Chem. Soc. Perkin. Trans., 1, 2359-2367, (1989).

Chandrapati, S. ve O'Sullivan, D.J., ÷Characterization of promoter regions involved in galactose and nisin mediated induction of the nisA gene *Lactococcus lactis* ATCC 11454øø Mol. Microbiol., 2, 467-477, (2002).

Chatterjee, C., Paul, M., Xie, L. ve van der Donk, W.A., ÷Biosynthesis and mode of action of lantibioticsøø Chem. Rev., 105, 633-683, (2005).

Cheigh, C.I., Choi, H.J., Park, H., Kim, S., Kook, M., Kim, T., Hwang, J. ve Pyun, Y., ÷Influence of growth conditions on the production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 isolated from kimchiøø J. Biotechnol., 95, 225-235, (2002).

Cheigh, C.I. ve Pyun, Y., ÷Nisin biosynthesis and its propertiesøø Biotechnol., 27, 1641-1648, (2005).

Chinachoti, N., Zaima, T., Matsusaki, H., Sonomoto, K. ve Ishisaki, A., ÷Relationship between fermentative production and aeration condition using *Lactococcus lactis* IO-1øø Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University, 43, 421-436, (1997).

Davies, E.A., Bevis, H.E., Potter, R., Haris, J., Williams, G.C. ve Delves-Broughton, J., ÷The effect of pH on the stability of the nisin solution during autoclavingøø Lett. Appl. Microbiol., 27, 186-187, (1998).

Delves-Broughton, J., Blackburn, P., Evans, R.J. ve Hugenholtz, J., ÷Applications of the bacteriocin nisinø Ant. van Leeuwen., 69, 193-202, (1996).

Desjardins, P., Meghrou, J. ve Lacroix, C., ÷Effect of aeration and dilution rate on Nisin Z production during continuous fermentation with free and immobilized *Lactococcus lactis* UL719 in supplemented whey permeateø Inter. Dairy J., 11, 943-951, (2001).

de Vos, W.M. ve Hugenholtz, J., ÷Engineering metabolic highways in lactococci and other lactic acid bacteriaø Trends Biotechnol., 22 (2), 72-9, (2004).

de Vuyst, L. ve Vandamme, E.J., ÷Influence of the carbon source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* batch fermentationsø J. Gen. Microbiol., 138, 571-578, (1992).

de Vusyt, L. ve Vandamme, E.J., ÷Influence of the phosphorus and nitrogen source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* batch fermentations using a complex mediumø Appl. Microbiol. Biotechnol., 40, 17-22, (1993).

de Vuyst, L. ve Vandamme, E.J., ÷Nisin, a lantibiotic produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* properties, biosynthesis, fermentation and applicationsø Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria, 165-167, (1994).

de Vuyst, L., ÷Nutritional factors affecting nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NIZO 22186 in a synthetic mediumø J. Appl. Bacteriol., 78, 28-33, (1995).

Duwatt, P., Ehrlich, D. ve Gruss, A., ÷Effects of metabolic flux on stress response pathways in *Lactococcus lactis*ø, Mol. Biology., 31(3), 845-848, (1999).

Duwatt, Sourice, S., Cesselin, B., Lamberet, G. ve Vido, K., ÷Respiration capacity of the fermenting bacterium *Lactococcus lactis* and positive its effects on growth and survivalø J. Bacteriol., 183, 4509-16, (2001).

Even, S., Lindley, N.D., Loublere, P. ve Cocaign-Bousquet, M., ÷Dynamic response of catabolic pathways to autoacidification in *Lactococcus lactis*: transcript profiling and stability in relation to metabolic and energetic constraintsø Mol. Microbiol., 45, 1143-1152, (2002).

Fan, M., Qiu, Y., Liu, C., Ji, Z., Ma, X., Yu, Y. ve Chen, S., ÷Effect of overexpressing nisin A structural gene *nisA* on nisin A productionø Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao., 28 (10), 1175-83, (2012).

Gaudu, P., Vido, K., Cesselin, B., Kulakauskas, S. ve Tremblay, J., ÷Respiration capacity and consequences in *Lactococcus lactis*ø Ant. van Leeuwen., 82, 263-69, (2002).

- Gonzales-Toledo, S.Y., Dominguez, J., Garcia-Almendarez, B.E., Prado-Barragan, L.A. ve Regalado-Gonzalez, C., ÷Optimization of nisin production by *Lactococcus lactis* UQ2 using supplemented whey as alternative culture mediumø J. Food Sci., 75 (6), 347-353, (2010).
- Graeffe, T., Rintala, H., Paulin, L. ve Saris, P., ÷A natural nisin variant. In nisin and novel lantibioticsø Sci. Publishers, 260-268, (1991).
- Gross, E. ve Morell, J.L., ÷The structure of nisinø J. Am. Chem. Soc., 93, 4634-4635, (1971).
- Guerra, N.P. ve Pastrana, L.C., ÷Influence of pH drop on both nisin and pediocin production by *Lactococcus lactis* and *Pediococcus acidilactici*ø, Lett. Appl. Microbiol., 37, 51-55, (2003).
- Heinrich W.O., ÷The chemical constitution of respiration fermentøø 468, 2833-2839, (2010).
- Hols, P., ÷Acetate utilization in *Lactococcus lactis* deficient in lactate dehydrogenase: a rescue pathway for maintaining redox balanceøø J. Bacteriol., 181, 5521-5526, (1999).
- Hull, J.S.V., ve Gibbons, W.R., ÷Neutralization/recovery of lactic acid from *Lactococcus lactis*: effects on biomass, lactic acid and nisin productionøø World J. Microbiol. Biotechnol., 13, 527-532, (1997).
- Hurst, A., ÷Nisinøø Adv. Appl. Microbiol., 27, 85-123, (1981).
- Huycke, M.M., Moore, D., Joyce, W., Wise, P., Shepard, L., Kotake, Y. ve Gilmore, M.S., ÷Extracellular superoxide production by *Enterococcus faecalis* requires demethylmenaquinone and is attenuated by functional terminal quinol oxidasesøø Mol Microbiol., 42 (3), 729-40, (2001).
- Ingram, L., ÷A ribosomal mechanism for synthesis of peptides related to nisinøø Biochem. Biophys. Acta., 224, 263-265, (1970).
- Jensen, N.B., Melchiorson, C.R., Jokumsen, K.V. ve Villadsen, J., ÷Metabolic behavior of *Lactococcus lactis* MG1363 in microaerobic continuous cultivation at a low dilution rateøø Appl. Environ. Microbiol., 67 (6), 2677-82, (2001).
- Jung, G., ÷Lantibiotics: a survey, Nisin and novel lantibioticsøø H-G. ESCOM Sci., Leiden, the Netherlands, 1-34, (1991).
- Kim, W.S., Hall, R.J., ve Dunn, N.W., ÷Host specificity of nisin production by *Lactococcus lactis*øø Biotechnol. Lett., 19, 1235-1238, (1997).

- Kim, W.S., Hall, R.J. ve Dunn, N.W., ÷Improving nisin production by increasing immunity/resistance genes in the producer organism *Lactococcus lactis*øø Appl. Microbiol. Biotechnol., 50, 429-433, (1998).
- Koebmann, B., Blank, L.M., Solem, C., Petranovic, D., Nielsen, L.K. ve Jensen, P.R., ÷Increased biomass yield of *Lactococcus lactis* during energetically limited growth and respiratory conditionsøø Biotechnol. Appl. Biochem., 50 (1), 25-33, (2008).
- Kwaadsteniet, M., Doeschate, K. ve Dicks, L.M.T., ÷Characterization of the structural gene encoding nisin F, a new lantibiotic produced by a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolate from freshwater catfish (*Clarias gariepinus*)øø Appl. Environ. Microbiol., 74, 547-549, (2008).
- Lan, Q.C., Oddone, G., Mills, AD. ve Block, E.D., ÷Kinetics of *Lactococcus lactis* growth and metabolite formation under aerobic and anaerobic conditions in the presence or absence of heminøø Wiley InterSci., 95 (6), 1070-1080, (2006).
- Lechardeur, D., Cesselin, B., Fernandez, A., Lamberet, G., Garrigues, C., Pedersen, M., Gaudu, P. ve Gruss, A., ÷Using heme as an energy boost for lactic acid bacteriaøø Curr. Op. in Biotechnol., 22, 143ó149, (2011).
- Li, C., Bai, J., Cai, Z. ve Ouyang, F., ÷Optimization of a cultural medium for bacteriocin production by *Lactococcus lactis* using response surface methodologyøø J. Biotechnol., 93, 27-34, (2002).
- Liu, C., Liu, Y., Liao, W., Wen, Z. ve Chen, S., ÷Application of statistically-based experimental designs for the optimization of nisin production from wheyøø Biotechnol. Lett., 25, 877-882, (2003).
- Liu, W. ve Hansen, J.N., ÷Some chemical and physical properties of nisin, a small protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*øø Appl. Environ. Microbiol., 56, 2551-2558, (1990).
- Lopez de Felipe, F. ve Marjo, J.C., ÷The role of NADH-oxidation in acetoin and diacetyl production from glucose in *Lactococcus lactis*øø FEMS Microbiol. Lett., 156 (1), 15ó19, (1997).
- Lopez de Felipe, F. ve Marjo, J.C., ÷Cofactor engineering: a novel approach to metabolic engineering in *Lactococcus lactis* by controlled over expression of NADH oxidaseøø J. Bacteriol., 180, 3804-3808, (1998).
- Liu, X., Chung, Y-K. Yang S.T. ve Yousef, A. E., ÷Continuous nisin production in laboratory media and whey permeate by immobilized *Lactococcus lactis*øø Process Biochem., 40, 13-24, (2005).

- Lv, W., Cong, W. ve Cai, Z., ÷Nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* under nutritional limitation in fed-batch cultureøø, *Biotechnol. Lett.*, 26, 235-238, (2004^a).
- Lv, W., Cong, W. ve Cai, Z., ÷Improvement of nisin production in pH feed-back controlled, fed-batch culture by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*øø, *Biotechnol. Lett.*, 26, 1713-1716, (2004^b).
- Lv, W., Cong, W. ve Cai, Z., ÷Effect of sucrose on nisin production in batch and fed-batch culture by *Lactococcus lactis*øø, *J. Chem. Techn. and Biotechnol.*, 80, 511-514, (2005).
- Matsusaki, H., Endo, N., Sonomoto, K. ve Ishizaki, A., ÷Lantibiotic nisin Z fermentative production by *Lactococcus lactis* IO-1: Relationship between production of the lantibiotic and lactate and cell growthøø, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 45, 36-40, (1996).
- Mattick, A.T.R. ve Hirsch, A., ÷A powerful inhibitory substance produced by group N streptococciøø, *Nature*, 154, 551-552, (1944).
- Mayfield, J., Carolyn, A., Dehner ve Dubois, J.L., ÷Recent advances in bacterial heme protein biochemistryøø, *Curr. Op. n Chemical Bio.*, 15 (2), 260-266, (2011).
- Mitra, D., Pometto, A.L., Khanal, S.K., Karki, B., Brehm-Stecher, F.B. ve van Leeuwen, J.H., ÷Value-added production of nisin from soy wheyøø, *Appl. Biochem. and Biotechnol.*, 162, 1819, (2010).
- Motlagh, A.M., Johnson, M.C. ve Ray, B., ÷Viability loss of food-borne pathogens by starter culture metabolitesøø, *J. Food Prot.*, 54, 873-878, (1991).
- Mulders, J.W.M., Boerrigter, I.J., Rollema, H.S., Siezen, R.J. ve de Vos, W.M., ÷Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a natural nisin variantøø, *Eur. J. Biochem.*, 201, 581-584, (1991).
- Nagayasu, M., Wardani, A.K., Nagahisa, K., Shimuzu, H. ve Shioya, S., ÷Analysis of hemin effect on lactate reduction in *Lactococcus lactis*øø, *J. of Biosci. and Bioengin.*, 6, 529-53, (2007).
- Neves, A.R., Ramos, A., Costa. H., van Swam, II., Hugenholtz, J., Kleerebezem, M., de Vos, W. ve Santos, H., ÷Effect of different NADH oxidase levels on glucose metabolism by *Lactococcus lactis*: kinetics of intracellular metabolite pools determined by in vivo nuclear magnetic resonanceøø, *Appl. Environ. Microbiol.*, 68 (12), 6332-6342, (2002).

- Nielsen, P. ve Roepstorff, P., ÷Sample preparation dependent fragmentation in 252-Cf plasma desorption mass spectrometry of the polycyclic antibiotic nisinøø Bio. Environ. Mass Spectrom., 17, 137-141, (1988).
- Palmer, D.E., Mierke, D.F., Pattaroni, C., Goodman, M., Wakamiya, T., Fukase, K., Kitazawa, M., Fujita, H. ve Shiba, T., ÷Interactive NMR and computer simulation studies of lanthionine ring structuresøø Biopolymers, 28, 397-408, (1989).
- Papagianni, M., Avramidis, G. ve Filiouis, G., ÷Investigating the relationship between the specific glucose uptake rate and nisin production in aerobic batch and fed-batch glucostat cultures of *Lactococcus lactis*øø Enzyme and Microbiol. Tech., 40, 1557-1563, (2007^a).
- Papagianni, M., Avramidis, N. ve Filiouis, G., ÷Glycolysis and the regulation of glucose transport in *Lactococcus lactis* spp. *lactis* in batch and fed-batch cultureøø Microb. Cell. Fact., (6) 16, (2007^b).
- Papagianni, M. ve Avramidis, N., ÷Engineering the central pathways in *Lactococcus lactis*: functional expression of the phosphofructokinase (*pfk*) and alternative oxidase (*aox1*) genes from *Aspergillus niger* in *Lactococcus lactis* facilitates improved carbon conversion rates under oxidizing conditionsøø Enzyme Microb. Technol., 51 (3), 1256-130, (2012).
- Pedersen, M., Gaudu, P., Lechardeur, D., Petit, M. ve Gruss, A., ÷Aerobic respiration metabolism in lactic acid bacteria and uses in biotechnologyøø Annu. Rev. Food Science Technology., 3, 37-58, (2012).
- Pongtharangkul, T. ve Demirci, A., ÷Evaluation of culture medium for nisin production in a repeated-batch biofilm reactorøø Biotechnol. Prog., 22, 217-224, (2006).
- Qiao, M., Omaetxebarria, M.J., Ra, R., Oruetxebarria, I. ve Saris, P.E.J., ÷Isolation of a *Lactococcus lactis* strain with high resistance to nisin and increased nisin productionøø Biotechnol. Lett., 19, 199-202, (1997).
- Razvi, A., Zhang, Z. ve Lan, C.Q., ÷Effects of glucose and nitrogen source concentration on batch fermentation kinetics of *Lactococcus lactis* under hemin-stimulated respirative conditionøø Biotechnol. Prog., 24 (4), 852-858, (2008).
- Rezaiki, L., Cesselin, B., Yamamoto, Y., Vido, K., van West, E., Gaudu, P. ve Gruss, A., ÷Respiration metabolism reduces oxidative and acid stress to improve long-term survival of *Lactococcus lactis*øø Mol. Biology, 53 (5), 1331-1342, (2004).
- Rezaiki, L., Lamberet, G., Derre, A., Gruss, A. ve Gaudu, P., ÷*Lactococcus lactis* produces short-chain quinones that cross-feed Group B Streptococcus to activate respiration growthøø Mol. Biology, 67 (5), 947-957, (2008).

Rogers, L.A., ÷The inhibiting effect of *Streptococcus lactis* on lactic fermentationøø J. Bacteriol., 16, 321-325, (1928).

Rogers, L.A. ve Whitter, E.O., ÷Limiting factors in the lactic fermentationøø J. Bacteriol., 16(4), 2116229, (1928).

Scannell, A.G.M., Hill, C., Ross, R.P., Marx, S., Hartmeier, W. ve Arendt, E.K., ÷Continuous production of lacticin 3147 and nisin using cells immobilized in calcium alginateøø J. Appl. Microbiol., 89, 573-579, (2000).

Schnell, N., Entian, K. óD., Schneider, U., Götz, F., Zahner, H., Kellner ve Jung, G., ÷Prepeptide sequence of epidermin, a ribosomally synthesized antibiotic with four sulphide ringsøø Nature, 333, 276-278, (1988).

Shimizu, H., Mizuguchi, T., Tanaka, E. ve Sh,oya, S., ÷Nisin production by a mixedó culture system consisting of *Lactococcus lactis* and *Kluyveromyces marxianus*øø, Appl. Environ. Microbiol., 65, 3134-3141, (1999).

Siegumfeldt, H., Rechinger, K.B. ve Jakobsen, M., ÷Dynamic changes of intracellular pH in individual lactic acid bacterium cells response to a rapid drop in extracellular pHøø Appl. Environ. Microbiol., 66, 2330-2335, (2000).

Sijpestejn, A.K., ÷Induction of cytochrome formation and stimulation of oxidative dissimilation by hemin in *Streptococcus lactis* and *Leuconostocmesenteroides*øø, Ant. van Leeuwen., 36, 335-48, (1970).

Slijper, M., Hilbers, C.W., Konings, R.N.H. ve van de Ven, F.J.M., ÷NMR studies of lantibiotics. Assignment of the 1H-NMR spectrum of nisin and identification of interresidual contactsøø FEBS Lett., 252, 22-28, (1989).

Sonomoto, K., Chinachoti, N., Endo, N. ve Ishizaki, A., ÷Biosynthetic production of nisin Z by immobilized *Lactococcus lactis* IO-1øø J. Mol. Cat. B. Enzymatic, 10, 325-334, (2000).

Swindell, S.R., Benson, K.H., Griffin, H.G., Renault, P., Ehrlich, S.D. ve Gasson, M.J., ÷Genetic manipulation of the pathway for diacetyl metabolism in *Lactococcus lactis*øø Appl. Environ. Microbiol., 62 (7), 2641-2643, (1996).

im ek, Ö., ÷Nisin production in a chitin-including continuous fermentation system with *Lactococcus lactis* displaying a cell wall chitin-binding domainøø J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 41, 535-543 (2014).

im ek, Ö., Akkoç, N., Çon, A.H., Özçelik, F., Saris, P.E.J. ve Akçelik, M., ÷Continuous nisin production with bioengineered *Lactococcus lactis* strainsøø J. of Ind. Microbiol. Biotechnol., 36 (6), 863-871, (2009^b).

im ek, Ö., Çon, A.H., Akkoç, N., Saris, P.E.J. ve Akçelik, M., ÷Influence of growth conditions on the nisin production of bioengineered *Lactococcus lactis* strainsøø J. of Ind. Microbiol. Biotechnol., 36, 481-490, (2009^a).

im ek, Ö., Sabano lu, S., Çon, A.H., Karasu, N., Akçelik, M. ve Saris, P.E.J., ÷Immobilization of nisin producer *Lactococcus lactis* strains to chitin with surface-displayed chitin-binding domainøø Appl. Microbiol. Biotechnol., 97 (10), 4577-4587, (2013).

im ek, Ö. ve Saris, P.E., ÷Cycle changing the medium results in increased nisin productivity per cell in *Lactococcus lactis*øø, Biotechnol. Lett. 31 (3), 415-421, (2009^c).

Tolonen, M., Saris, P.E.J. ve Siika-aho, M., ÷Production of nisin with continuous adsorption to ambelite XAD-4 resin using *Lactococcus lactis* N8 and *L. lactis* LAC48øø Appl. Microbiol. Biotechnol., 63, 659-665, (2004).

Tükel, C., Tuncer, Y. ve Akçelik, M. ÷Analysis of the high frequency conjugal transfer systems in lactococciö, Milchwissenschaft, 60, 262-265 (2005).

van den Hooven, H.W., Fogolari, F., Rollema, H.S., Konings, R.N.H., Hilbers, C.W. ve van de Ven, F.J.M., ÷NMR and circular dichroism studies of the lantibiotic nisin in non-aqueous environmentsøø FEMS Lett., 319, 189-194, (1993).

van de Ven, F.J.M., van den Hooven, H.W., Konings, R.N.H. ve Hilbers, C.W., ÷NMR studies of lantibioticsøø Eur. J. Biochem., 202, 1181-1188, (1991).

Vazquez, J.A., Cabo, M.L., Gonzalez, M.P. ve Murado, M.A., ÷The role of amino acids in nisin and pediocin production by two lactic acid bacteria a factorial studyøø Enzyme and Microbiol. Technol., 34, 319-325, (2004).

Whitehead, H.R., ÷A substance inhibiting bacteria growth, produced by certain strains of lactic streptococciøø Biochem. J., 27, 1793-1800, (1993).

Whittenbury, R., ÷Biochemical characteristics of *Streptococcus* speciesøø Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser., 7, 51-69, (1978).

Wilson-Stanford, S., Kalli, A., Hakansson, K., Kastrantas, J., Oruqnty, R.S. ve Smith, L., ÷Oxidation of lanthionines renders the lantibiotic nisin inactiveøø Appl. Environ. Microbiol., 75 (5), 1381-1387, (2009).

Wirawan, R.E., Klesse, N.A., Jack, R.W. ve Tagg, J.R., ÷Molecular and genetic characterisation of a novel nisin variant produced by *Streptococcus uberis*øø Appl. Environ. Microbiol., 72, 1148-1156, (2006).

Wan, J., Hickey, W. ve Coventry, M.J., ÷Continuous production of bacteriocins, brevicin, nisin and pediocin, using calcium alginate-immobilized bacteriaøø J. Appl. Bacteriol., 79, 671-676, (1995).

Wardani, A.H., Egawa, S., Nagahisa, K., Shimizu, H. ve Shioya, S., ÷Computational prediction of impact of rerouting the carbon flux in metabolic pathway on cell growth and nisin production by *Lactococcus lactis*øø Biochem. Engin. J., 28, 220-230, (2006).

Wu, Z., Wang, L., Jing, Y., Li, X. ve Zhao, Y., ÷Variable volume fed-batch fermentation for nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* W28øø Appl. Biochem. Biotechnol., 152, 372-382, (2009).

Yang, R., Johnson, M.C. ve Ray, B., ÷Novel method to extract amounts of bacteriocins from lactic acid bacteriaøø Appl. Environ. Microbiol., 58, 3355-3359, (1992).

Yu, P.L., Dunn, N.W. ve Kim, W.S., ÷Lactate removal by anionic-exchange resin improves nisin production by *Lactococcus lactis*øø Biotechnol. Lett., 24, 59-64, (2002).

Zendo, T., Fukao, M., Ueda, K., Higuchi, T., Nakayama, J. ve Sonomoto, K., ÷Identification of the lantibiotic nisin Q, a new natural nisin variant produced by *Lactococcus lactis* 61-14 isolated from a river in Japanøø Biosci. Biotechnol. Biochem., 67, 1616-1619, (2003).

7. ÖZGEÇM

Ad, Soyad, : Burcu KÖRD KANLIO LU
Do um Yeri ve Tarihi : stanbul 25.05.1989
Adres : Esatpa a Mahallesi Adnan Menderes
Caddesi No:71/1 Ata ehir/ STANBUL
Lisans Üniversite : Pamukkale Üniversitesi G,da
Mühendisli i
Elektronik Posta : bkordikanlioglu@gmail.com

Yay,n Listesi

Kördikanl,o lu,B., im ek, Ö. (2012) Continuous Nisin Production of *Lactococcus lactis* Immobilized with Surface Displayed Chitin Binding Domain On Chitin, Poster Sunum, 23-26 Eylül, stanbul.

Kaya, H. ., **Kördikanl,o lu, B.,** im ek, Ö., Çon, A.H. (2013) Use of Bacteriocin Producer Lactic Acid Bacteria At The Production Of Tarhana, Poster Sunum, 24-26 Ekim, Makedonya.

Kaya, H. ., **Kördikanl,o lu, B.,** im ek, Ö. (2014) U ak tarhanas,n,n fermentasyon özellikleriö4. Geleneksel G,dalar Sempozyumu, 17-19 Nisan, Adana.

Kaya, H. ., **Kördikanl,o lu, B.,** Çand,r, B., im ek Ö. (2013) Nisine dirençli laktik asit bakterilerinin beyaz peynirden izolasyonu ve tan,s,ö 8. G,da Mühendisli i Kongresi, 7-9 Kas,m, Ankara.