

***Lactococcus lactis*'e Kitine Tutunma Yeteneği  
Kazandırılarak İmmobilize Sistemde Sürekli Nisin Üretimi**

**Proje No: 109O589**

Yrd.Doç.Dr. Ömer ŞİMŞEK  
Nihat KARASU  
Seba SABANOğLU  
Burcu KÖRDİKANLIOğLU

ARALIK 2012

DENİZLİ

## ÖNSÖZ

Gıdalarımızı zararlı mikroorganizmalardan arındırmak en temel vazifemizdir. Gıda üretiminde antimikrobiyel karakterli ajanların kullanımı gerek mikrobiyel yükün azaltılması gerekse raf ömrünün uzatılması bakımından önemli araçlardandır. Söz konusu ajanlar özelliklerine bağlı olarak mikrobiyel bozulma veya hastalık oluşturma riskini önleyebilmekte ve tüketicilere daha güvenli gıdaların sağlanmasına yardımcı olmaktadır. 20. yy başlarında keşfedilen nisin *Lactococcus lactis*'in bazı üyeleri tarafından sentezlenen antimikrobiyel aktiviteye sahip bir bakteriyosindir. Günümüzde nisin FDA tarafından GRAS (insan ve hayvan tüketiminde güvenilir) seviyesinde kullanımına izin verilmiş ilk bakteriyosin olup, 50'den fazla ülkede gıdaların üretiminde koruyucu olarak kullanılmaktadır.

Nisinin gıda üretiminde kullanımı kısıtlayan ana unsur maliyetinin yüksek olmasıdır. Bu sorunun en temel nedeni ise, nisinin üretici suşlar tarafından düşük düzeyde üretilmesidir. Yapılan çalışmalar nisin üretim miktarının hücre yoğunluğu ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Dolayısıyla fermentasyon sisteminde yüksek oranda aktif hücre yoğunluğu sağlanarak nisin üretiminin artırılması, maliyetin düşürülmesi açısından kritik önem taşımaktadır. Bu çalışmada, nisin üretici suşların kitin yüzeyine bağlanma yeteneği kazandırılarak, sürekli çalışan immobilize fermentasyon sistemi kurulmuş ve yüksek hücre yoğunluğu ile birlikte nisin üretimi artırılmıştır. Ulaşılan bu gelişmenin endüstriyel ölçekte nisin üretim maliyetlerinin düşürülmesini ve yeni teknolojinin kazandırılmasını sağlayacağı ve dolayısıyla gıda sistemlerinde nisin kullanımının yaygınlaşmasına ve daha güvenli gıdaların üretilmesine katkıda bulunacağı ümit edilmektedir.

Bu proje, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından desteklenmiştir. Öncelikle çalışmamıza değer verip desteklenmesine karar veren TÜBİTAK başkanlığı nezdinde TOVAG'a; çalışmaların yürütülmesinde tecrübe ve bilgi birikimlerinden faydalandığım değerli hocalarım Prof. Dr. Per E. J. SARIS'e, Prof. Dr. Ahmet Hilmi ÇON'a ve Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK'e; deneysel çalışmaların yapılabilmesine imkân veren Pamukkale Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölüm Başkanlığına; birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum bölüm personeline; sabırla ve koşulsuz beni destekleyen eşim ve aileme ve bu projenin gerçekleşmesinde emekleri olan herkese sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

**Ömer ŞİMŞEK, Aralık 2012**

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	2
İÇİNDEKİLER.....	3
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	5
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	6
ÖZET.....	7
ABSTRACT.....	8
1. GİRİŞ .....	9
2. KURAMSAL TEMELLER.....	11
2.1 Nisin .....	11
2.1.1 Nisinin yapısal özellikleri.....	12
2.1.2 Nisinin fiziksel ve kimyasal özellikleri .....	16
2.1.3 Nisinin antimikrobiyel etki mekanizması .....	16
2.1.4 <i>L. lactis</i> 'te nisin üretiminden sorumlu gen kümesinin organizasyonu.....	20
2.1.5 <i>L. lactis</i> 'te nisinin biyosentezi.....	22
2.1.6 <i>L. lactis</i> 'te nisin üretimini etkileyen faktörler.....	24
2.1.7 Fermentasyon sistemlerinde nisin üretimi.....	27
2.1.7.1 Kesikli ve yarı kesikli fermentasyon sistemlerde nisin üretimi .....	28
2.1.7.2 Sürekli fermentasyon sistemlerde nisin üretimi .....	30
2.1.8 <i>L. lactis</i> 'te nisin üretiminin geliştirilmesi .....	32
2.2 Kitin, Kitinaz ve Kitin Bağlanma Domaini.....	34
2.3 <i>L. lactis</i> 'te Hücre Yüzey İfade Sistemi.....	35
3. MATERYAL VE YÖNTEM .....	38
3.1 Materyal .....	38
3.2 Rekombinant Hücrelerin Oluşturulması.....	39
3.2.1 Fragmentlerin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılması .....	40
3.2.2 Restriksiyon endonükleaz, fosfataz ve ligaz uygulamaları .....	40
3.2.3 Kompetan <i>E. coli</i> hücrelerin hazırlanması .....	41
3.2.4 Rekombinant plazmidlerin <i>E. coli</i> hücrelerine elektroporasyonu .....	41
3.2.5 Kompetan <i>L. lactis</i> hücrelerin hazırlanması.....	42
3.2.6 Rekombinant plazmidlerin <i>L. lactis</i> hücrelerine elektroporasyonu .....	43
3.2.7 <i>E. coli</i> ve <i>L. lactis</i> suşlarından plazmid DNA izolasyonu.....	43
3.3 Rekombinant Hücrelerde Füzyon Proteininin İfadesinin Belirlenmesi .....	44
3.3.1 Western-Blot analizi.....	44
3.3.2 ELISA.....	45
3.4 Nisin üreticisi <i>L. lactis</i> ve Rekombinant Suşların Kitine Bağlanması ve Bağlanma Oranlarının Tespiti .....	45
3.5 Vakum Taramalı Elektron Mikroskobu Analizi.....	46
3.6 Kitine Bağlanmış Hücrelerin Nisin Üretim Oranlarının Belirlenmesi.....	46
3.7 Nisin Üreticisi <i>L. lactis</i> ve Rekombinant Suşlarının Kitine bağlanması Üzerine Çevresel Faktörlerin Etkisinin Belirlenmesi .....	47
3.8 <i>L. lactis</i> Suşlarının Kitin İçeren Sürekli Nisin Fermentasyon Sisteminde (KİSNİFER) Nisin Üretimi ve Miktarının Belirlenmesi .....	47
3.8.1 Nisin üretim miktarının tespiti .....	48
3.8.2 Biyokütle miktarının tespiti.....	48
3.8.3 Glikoz tüketim miktarının tespiti .....	48
4. BULGULAR ve TARTIŞMA .....	49

4.1 KBD'inin Nisin Üreticisi <i>L. lactis</i> Suşlarına Klonlanması .....	49
4.2 Nisin Üreticisi <i>L. lactis</i> Suşlarında Füzyon Proteinlerinin İfadesi ve Bu Hücrelerin Kitine Bağlanmadaki Özgüllüğü .....	55
4.3 Nisin Üreticisi <i>L. lactis</i> ve Rekombinant Suşlarının Kitine Bağlanma Yoğunluğu ve Oranı .....	59
4.4 Kitine Bağlanmış Nisin Üreticisi <i>L. lactis</i> ve Rekombinant Suşlarının Nisin Üretimi.....	63
4.5 Nisin üreticisi <i>L. lactis</i> ve Rekombinant Suşlarının Kitine Bağlanması Üzerine Çevresel Faktörlerin Etkisi .....	65
4.6 Kitin İçeren Sürekli Nisin Fermentasyonu (KİSNİFER) Sisteminde Nisin Üretimi ve Optimizasyonu .....	69
5. GENEL DEĞERLENDİRME ve ÖNERİLER .....	75
6. KAYNAKLAR.....	78

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Doğada nadir bulunan dehidroalanin, dehidrobütirin, lantiyonin, ve $\beta$ -metil lantiyonin aminoasitlerin sentez mekanizması.....	13
Şekil 2.2 Nisin A, Z, Q ve U'nun yapısı.....	14
Şekil 2.3 Nisin tarafından indüklenen membran por modelleri.....	19
Şekil 2.4 Nisin üretimi, regülasyonu ve dirençliliğinde görev alan genlerin organizasyonu. .	21
Şekil 2.5 Translasyon sonrası nisin biyosentez aşamaları.....	23
Şekil 2.6 <i>L. lactis</i> 'de nisin biyosentezi, regülasyonu ve dirençliliğinin hücresel modeli.....	24
Şekil 2.7 Kitinin kimyasal formülü.....	35
Şekil 2.8 <i>L. lactis</i> hücrelerine ait PrtP proteaz enziminin ve duvar proteini AcmA'nın şematik gösterimi.....	37
Şekil 4.1 KBD'inin hücre yüzeyindeki yerleşiminin kuramsal modeli.....	49
Şekil 4.2 KBD'inin klonlanması ve yeni oluşturulmuş rekombinant plazmidlerin organizasyonu.....	51
Şekil 4.3 Rekombinant plazmidlerin agaroz jel üzerindeki görüntüsü.....	52
Şekil 4.4 pBL01, pBL02 ve pBL03 plazmidlerinin <i>XhoI</i> ve <i>ApaI</i> kesimi.....	52
Şekil 4.5 <i>L. lactis</i> N8 ve rekombinant suşlarının plazmid profilleri.....	53
Şekil 4.6 <i>L. lactis</i> LL27 ve rekombinant suşlarının plazmid profilleri.....	54
Şekil 4.7 pBL04 plazmidinin <i>NheI</i> ve <i>XhoI</i> ile kesimi.....	54
Şekil 4.8 Kontrol ve rekombinant <i>L. lactis</i> hücrelerinden elde edilen hücresel proteinlerin Western-Blot analizi.....	55
Şekil 4.9 Kontrol ve rekombinant nisin üreticisi <i>L. lactis</i> suşlarının farklı derişimlerinin ELISA görüntüsü.....	56
Şekil 4.10 Kitin taneciklerine bağlanmış nisin üreticisi <i>L. lactis</i> ve rekombinant hücrelerinin taramalı elektron mikroskobu görüntüleri.....	58
Şekil 4.11 1 g kitin kütlesine nisin üreticisi <i>L. lactis</i> ve rekombinant suşlarının bağlanma özgülüğü. Hücre yoğunluğu spektrofotometre'de 600 nm'de ölçülmüştür.....	60
Şekil 4.12 Nisin üreticisi <i>L. lactis</i> ve rekombinant hücrelerinin kitine bağlanma ve yıkama kaybı oranları.....	62
Şekil 4.13 Kitine bağlanmış nisin üreticisi <i>L. lactis</i> ve rekombinant suşlarının nisin üretim miktarı.....	64
Şekil 4.14 KİSNİFER sisteminin görüntüsü.....	69

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 2.1</b> Farklı model sistemlerde nisin üretim miktarlarının karşılaştırılması .....	32
<b>Çizelge 3.1</b> Çalışmada kullanılan bakteri suşları, plazmidler ve primerler. ....	38
<b>Çizelge 4.1</b> Nisin üreticisi <i>L. lactis</i> N8 ve rekombinant suşlarının kitine bağlanması üzerine çevresel faktörlerin etkisi. Veriler iki tekrarın ortalamasıdır. ....	67
<b>Çizelge 4.2</b> Nisin üreticisi <i>L. lactis</i> LL27 ve rekombinant suşlarının kitine bağlanması üzerine çevresel faktörlerin etkisi. Veriler iki tekrarın ortalamasıdır. ....	68
<b>Çizelge 4.3</b> KİSNİFER sisteminde <i>L. lactis</i> N8, PLAC2 ve PLAC7 suşlarının nisin üretim üzerine dilüsyon hızının etkisi .....	72
<b>Çizelge 4.4</b> KİSNİFER sisteminde <i>L. lactis</i> N8, PLAC2 ve PLAC7 suşlarının nisin üretim üzerine glikoz derişiminin etkisi .....	73

## ÖZET

*Lactococcus lactis* tarafından üretilen nisinin gıda üretiminde koruyucu olarak kullanımını kısıtlayan en temel sorun, üretici suşlar tarafından düşük düzeyde üretiliyor olmasıdır. Bu çalışmada sürekli fermentasyon sistemlerinde üretici hücrelerin yoğunluğunun artırılması amacıyla, nisin üreticisi *L. lactis* hücrelerine kitinin yüzeyine bağlanma yeteneği kazandırılmıştır. Çalışmada *Bacillus circulans*'a ait kitinaz A1 enziminin Kitin Bağlanma Domaini (KBD); *L. lactis*'in farklı uzunluktaki PrtP (153, 344 ve 800 aa) ve AcmA (242 aa) kol ve çapalarına eklenerek, nisin üreticisi *L. lactis* hücrelerin duvarında ifade edilmiştir. ELISA sonuçları söz konusu hücrelerin duvarında füzyon proteinlerin başarıyla ifade edilebildiğini göstermiştir. Taramalı elektron mikroskopik görüntüleri, KBD'inin uzun PrtP kol ve çapası ile ifade edildiği *L. lactis* hücrelerin, diğerlerine kıyasla kitine daha fazla tutunduğunu desteklemiştir. Ortam optimizasyonu ile en yüksek bağlanma %91 ve 94 oranında sırasıyla *L. lactis* PLAC7 ve PLAC8 suşlarında meydana gelmiştir. Nisin üreticisi hücrelere kazandırılan kitine bağlanma yeteneği, fermentasyon esnasındaki besiyeri değişikliğinde hücrelerin ortamda kalmasını sağlayarak ileri fermentasyon çevrimlerinde hücrelerin yüksek nisin üretimini devam ettirmesini sağlamıştır. Nitekim çalışmada *L. lactis* PLAC7 suşunun, Kitin İçeren Sürekli Nisin Fermentasyonu sisteminde (KİSNİFER) kullanılması ile yüksek dilüsyon hızında ( $0,9 \text{ h}^{-1}$ ) ve yüksek şeker derişiminde ( $40 \text{ g L}^{-1}$ )  $10500 \text{ IU mL}^{-1}$  rekor hacimsel nisin üretimine ulaşılmıştır. Sonuç olarak, çalışma kapsamında oluşturulan nisin üreticisi *L. lactis* suşları ve kurulan sürekli fermentasyon sistemi endüstriyel ölçekte nisin üretiminin geliştirilmesinde oldukça önemli katkı sağlayacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** *L. lactis*, Nisin, Kitin Bağlanma Domaini, PrtP çapası, Sürekli fermentasyon

## ABSTRACT

The bottleneck of nisin usage at food production systems as an antimicrobial agent is relevantly its low production rate by *Lactococcus lactis* strains. In this study, binding ability to chitin surfaces was gained to nisin producer strains to increase the density of cells in the continuous fermentation system. Chitin Binding Domain (ChBD) of chitinase A1 enzyme from *Bacillus circulans* was fused with different length of PrtP (153, 344 and 800 aa) or AcmA (242 aa) anchors derived from *L. lactis*. According to the whole cell ELISA analysis, ChBD was successfully expressed on the surface of *L. lactis* cells. Scanning electron microscope observations supported the conclusion of the expressing analysis that *L. lactis* cells having the ChBD with long PrtP anchor did bind to chitin surfaces more efficiently than cells with the other ChBD-anchors. The attained binding affinity of nisin producers for chitin flakes retained them in the fermentation during medium changes and maintained high nisin production rates. Thus, a very high volumetric nisin production ( $10500 \text{ IU mL}^{-1}$ ) was reached in the chitin including continuous nisin fermentation system which was carried out at high dilution rate ( $0,9 \text{ h}^{-1}$ ) and glucose concentration with using *L. lactis* PLAC7. As a conclusion these constructed nisin producer *L. lactis* cells and chitin including continuous nisin fermentation system may contribute for new generation industrial nisin production.

**Keywords:** Nisin, *L.lactis*, Chitin Binding Domain, PrtP anchor, Continuous fermentation



## 1. GİRİŞ

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

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

Nisinin, antimikrobiyel ajan olarak yaygın kullanımını kısıtlayan ana nedenler üretim tekniği ve dolayısı ile ürün maliyetinden kaynaklanmaktadır. Zira üretici suşlarda nisin üretim verimi düşük olmakta ve halen endüstriyel süreçlerde kesikli fermentasyon sistemlerinden yararlanılmaktadır. Nisinin endüstriyel olarak üretimi, üretici suşların kesikli ve sürekli fermentasyon sistemlerinde geliştirilmesi ve takiben hücre tarafından sentezlenen nisinin ortamdan saflaştırılması ile gerçekleştirilmektedir. Halen, ticari boyutta kesikli fermentasyon

sisteminde üretimi yapılan nisin için maliyetin düşürülmesi amacıyla üretici hücrelerin immobilize edildiği sürekli fermentasyon sistemleri önerilmektedir. Lakin bu sistemlerde, nisin üreticisi *L. lactis* hücrelerinin destek materyallerin yüzeyine tutunma yeteneklerinin çok düşük olması nedeniyle farklı immobilizasyon yöntemleri denenmektedir. Ancak, tutuklanmış hücrelerde substratın hücreye yeterince ulaşamaması ve üretilen nisin hızla ortama salınmaması gibi bir takım olumsuzluklar nedeniyle, bu sistemlerde hedeflenen nisin üretim verimine ulaşılamamaktadır.

Bu proje kapsamında, üretici suşların tutunma yeteneklerinin geliştirilmesi amacıyla, doğada yaygın bulunan ve yapı materyali olan kitine spesifik affinite gösteren, kitinaz A1 enzimine ait kitin bağlanma domainin (KBD) DNA bölgesi klonlanmış, nisin üreticisi suşlarda ifadesi sağlanmıştır. KBD'nin DNA bölgesi nisin üreticisi *L. lactis* suşlarına, *prtP* geninin 153, 344 ve 800 aminoasit ve *acmA* geninin 244 aminoasit uzunluktaki N-terminal peptidini kodlayan bölgeleri, *usp45* sinyal serileri ile birlikte p45 promotörü altında klonlanmıştır. Dolayısıyla söz konusu bu çalışmada, önce KBD'nin nisin üreticisi *L. lactis* suşlarının hücre duvarında fonksiyonel üretimi için farklı genetik düzenlemeler yapılmış, takiben tutunma başarısı en yüksek suşlar reaktör ortamında kullanılarak, yapılan düzenlemelerin *in vivo* etkisi araştırılmıştır. Çalışmada nisin üreticisi hücrelerin duvarında KBD'nin ifadesi ve bunların da kitin moleküllerine tutundurulmuş reaktör ortamında kullanılması sonucunda sürekli fermentasyon sisteminde birim zamandaki nisin üretiminde önemli artış sağlanmıştır.

## 2. KURAMSAL TEMELLER

### 2.1 Nisin

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

İlk nisin üreticisi *L. lactis* suşu çiğ süttten izole edilmiştir (ROGERS 1928, WHITEHEAD, 1933, MATTICK ve HIRSCH, 1944). Daha sonra farklı nisin üreticilerinin peynir mikro florasında da bulunduğu tespit edilmiştir (HIRSCH ve WHEATER, 1951). Ancak bu organizmaların sadece süt ve süt ürünlerinde bulunmadığı; Alman tipi lahanaya turşusu (HARRİS vd., 1992), fermente sucuk (NOONPAKDEE vd., 2003), nehir suyu (ZENDO vd., 2003), insan sütü (BEASLEY ve SARİS 2004) gibi çeşitli kaynaklardan da izole edilebildiği tespit edilmiştir. Diğer yandan WIRAWAN vd., (2006) nisinin laktokoklar dışında *Streptococcus uberis* tarafından da üretilendiğini belirlemiştir.

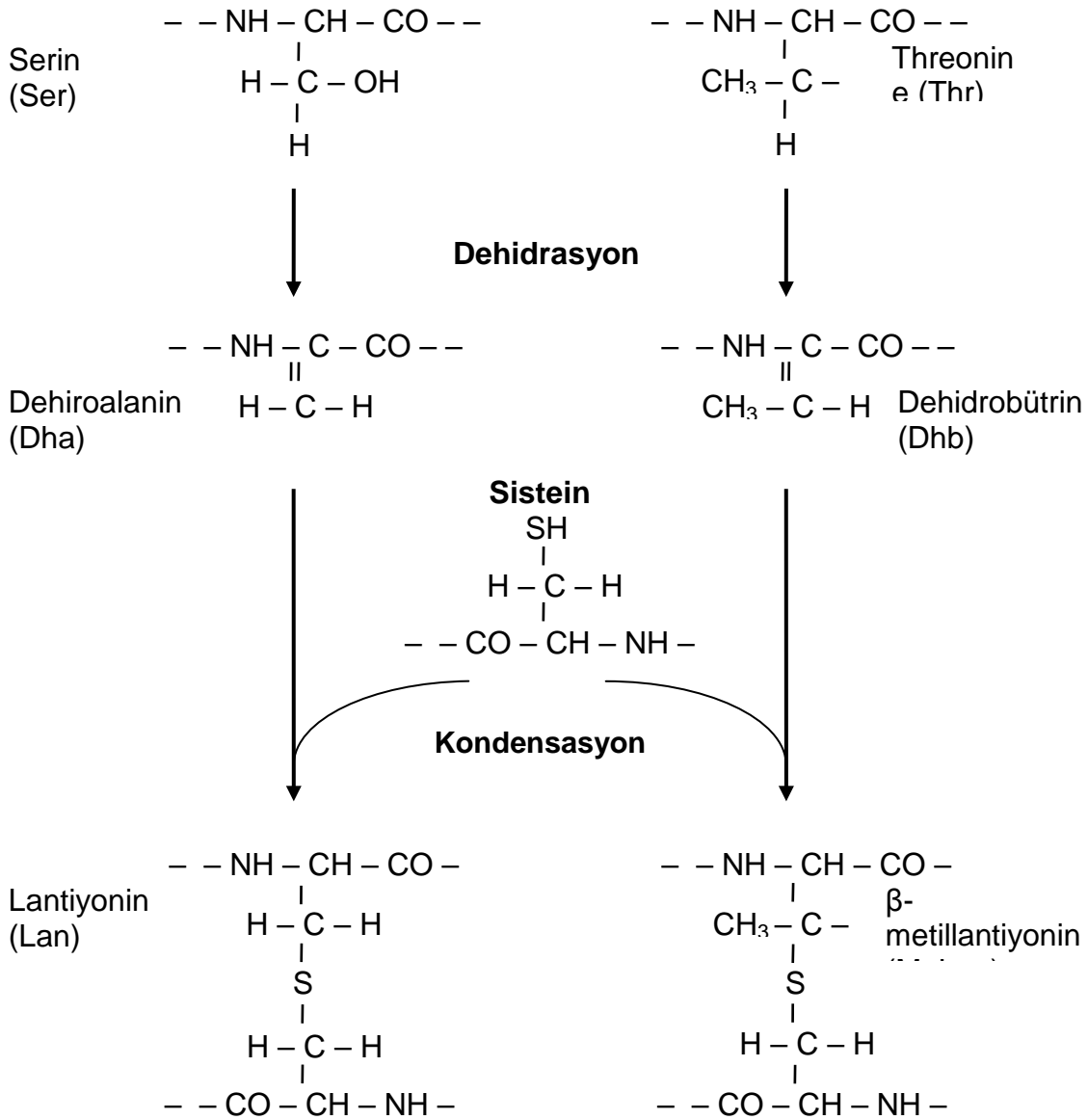
Nisin, ticari önemi nedeni ile en yoğun araştırılan lantibiyotik olmuştur. Yapılan çalışmalarda nisinin toksik etkisinin sofraya tuzu ile eşdeğer düzeyde ( $LD_{50}$  7 g  $kg^{-1}$  vücut ağırlığı) olduğu tanımlanmıştır (HURST, 1981). Gerek geniş antimikrobiyel kapasitesi ve gerekse insan ve hayvan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

Birçok gram pozitif bakteri nisine karşı duyarlıdır. Ancak nisin gram negatif bakteriler üzerinde de çok düşük antimikrobiyel etkisi bulunmaktadır (de VUYST ve VANDAMME 1994). Nisin gram pozitif bakterilerin vejetatif formları yanında, *Clostridium* ve *Bacillus* sporlarına karşı da etkili olduğu saptanmıştır. Bu karakteristikleri nedeniyle nisin yüksek sıcaklıktan etkilenen ya da ısı işlem uygulanmayan asidik gıdalarda patojen ya da gıda bozulması etmeni birçok bakterinin vejetatif (*Listeria* ve laktik asit bakterilerinin kontamine üyeleri gibi) ve spor formlarının (*Clostridium* ve *Bacillus* sporları gibi) inhibisyonu amacı ile kullanılmaktadır (HURST, 1981, ABEE vd., 1994, DELVES-BROUGHTON vd., 1996).

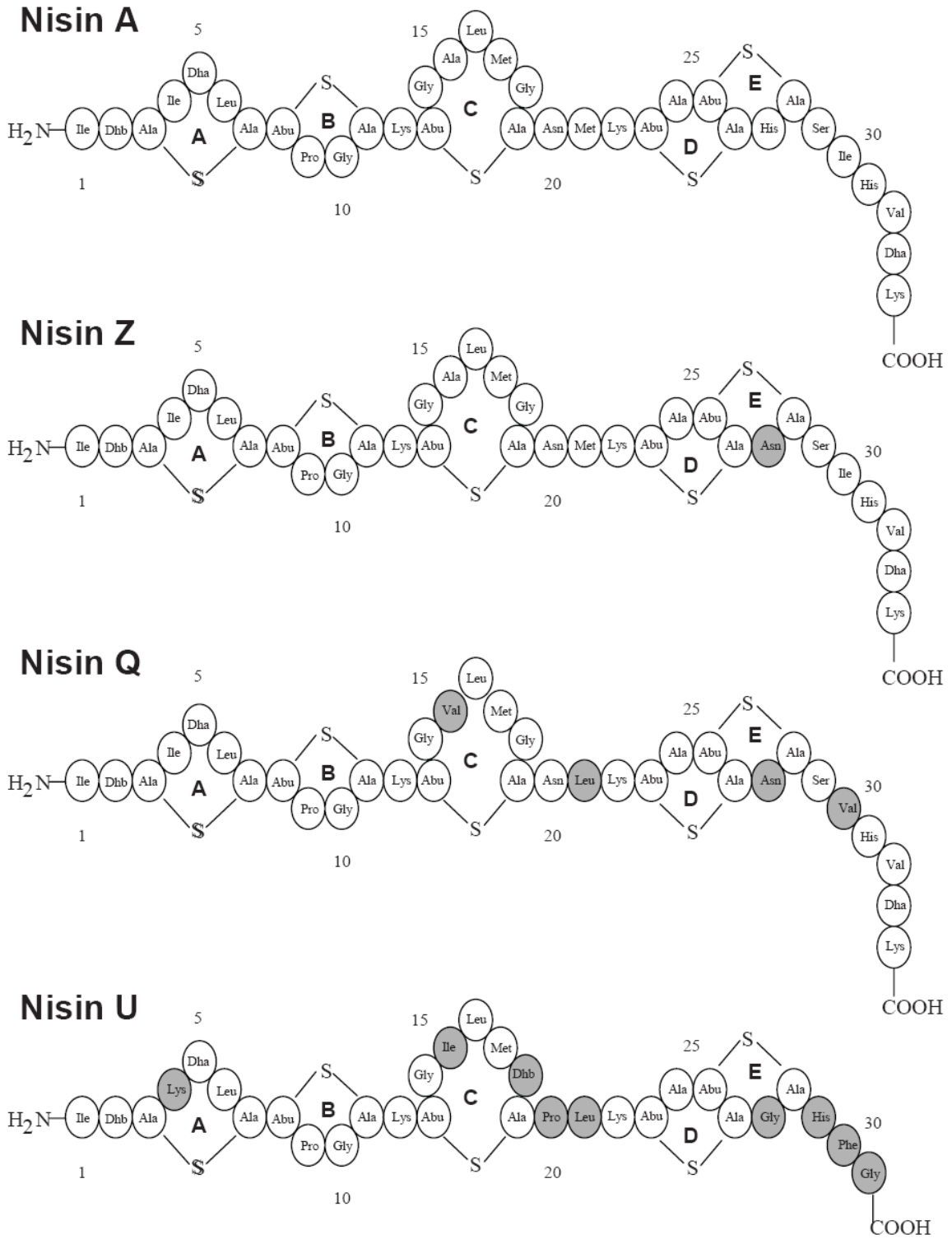
### 2.1.1 Nisinin yapısal özellikleri

Nisinin primer yapısı 1971 yılında GROSS ve MORELL tarafından yürütülen çalışmalar neticesinde aydınlatılmıştır. Bu yapının doğruluğu daha sonra, kütle ve NMR spektroskopi çalışmaları ile desteklenmiştir (BARBER vd., 1988, NIELSEN ve ROEPSTORFF, 1988, VAN de VEN vd., 1991, VAN den HOOVEN vd., 1993). Nisinin moleküler ağırlığı yaklaşık 3350 alton olup, yapısında 34 aminoasit bulunmaktadır. Bu yapıtaşlarının bazıları; antimonin, metillantiyonin (Met Lan), 2-3 dehidroksialanin (Dha) ve 2-3 dehidroksibutirin (Dhb) gibi doğada ender rastlanan aminoasitlerdir. Nisinin yapısındaki bu lantiyoninler 5 adet halka yapısı oluşturmaktadır (Bu halkalar A, B, C, D ve E olarak isimlendirilmiştir) (Şekil 2.1 ve 2.2). İçerdiği lantiyonin köprülerinden dolayı, nisin lantibiyotikler sınıfına dâhil edilmiştir (SCHNELL vd., 1988).

Bugüne kadar nisin A (GROSS ve MORELL, 1971), nisin Z (GRAEFFE vd., 1991; MULDER vd., 1991), nisin Q (ZENDO vd., 2003), nisin U (WIRAWAN vd., 2006) ve nisin F (KWAADSTENIET vd., 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 vd., 1991, MULDER vd., 1991), nisin Q üreticisi nehir suyundan (ZENDO vd., 2003), nisin F üreticisi (KWAADSTENIET vd., 2008) ise yayın balığından izole edilmiştir. Bu varyantlardan yalnız nisin U, *L. lactis* suşları dışında bir bakteri tarafından (*Streptococcus uberis*) üretilmektedir.



**Şekil 2.1** Doğada nadir bulunan dehidroalanin, dehidrobütirin, lantionin, ve  $\beta$ -metil lantionin aminoasitlerin sentez mekanizması (INGRAM, 1970)



**Şekil 2.2** Nisin A, Z, Q ve U'nun yapısı. Lantiyonin köprüleri A-E olarak gösterilmiştir. Dha= Dehidroalanin, Dhb= Dehidrobütrin; Ala-S-Ala, lantiyonin; Abu-S-Ala,  $\beta$ -metil lantiyonin. Varyantlarda Nisin A'dan farklı olan aminoasitler gri tonla işaretlenmiştir (GROSS ve MORELL, 1971, CHATTERJEE vd., 2005, WIRAWAN vd., 2006)

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

Üç farklı grup tarafından yürütülen NMR çalışmaları neticesinde nisin molekülünün oldukça esnek bir yapıda olduğu saptanmıştır (SLIJPER vd., 1989, CHAN vd., 1989, PALMER vd., 1989). Nisin yapısındaki B, D ve E halkalarında yer alan 1. ve 4. aminoasitlerin tiyoeter bağı ile bağlanması sonucu,  $\beta$  dönüş pozisyonları oluşmaktadır. A ve C halkaları ise, değişken yapılar göstermesi nedeniyle net olarak tanımlanamamıştır.

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

van den HOOVEN vd., (1996) nisin moleküllerini sodyum dodesil sulfat (SDS) ve dodesil fosfokolin (DPC) misellerine tutundurarak, molekülün bağlanma özelliklerini araştırmıştır. Molekülün misellere bağlanması, nisin molekülünün antimikrobiyel etkisinde ilk basamak olan sitoplazmik membrana bağlanmasının modelini oluşturmuştur. Araştırma sonuçları, nisinin misellere bağlandığında amfipatik özelliğinin devam ettiğini ve bu tutunmanın A halkası üzerinde konformasyonel bir değişikliği tetiklediğini göstermiştir.

### **2.1.2 Nisinin fiziksel ve kimyasal özellikleri**

Nisin molekülü katyonik özellikte olup, nisin A'nın pozitif net yükü 5, diğer varyantların ise 4'tür. Bu moleküllerin tümü alkali ortamda izoelektrik noktaya sahiptir (JUNG, 1991). Nisin molekülü, yapısında aromatik aminoasitlerin bulunmaması nedeniyle 260 nm ve 280 nm dalga boyunda ışık absorpsiyonu göstermez. Nisin molekülünün stabilitesi, çözünürlüğü ve biyolojik aktivitesi, pH değerinin artışıyla birlikte azalmaktadır. Özellikle alkali ortamlarda çözünürlüğü tamamen düşmektedir. Örneğin, ticari kullanımı bulunan nisin A'nın çözünürlüğü pH 2'de 57 mg mL<sup>-1</sup> iken, pH 6'da 1,5 mg mL<sup>-1</sup>'ye düşmektedir. pH 8,5'in üzerinde ise bu değer 0,25 mg mL<sup>-1</sup> civarındadır (HURST, 1981, LIU ve HANSEN, 1990). Alkali ortamlarda, molekül içi veya moleküller arası kimyasal modifikasyonlar nedeniyle, nisin molekülünde geri dönüşümsüz inaktivasyon meydana gelmektedir. Özellikle hidroksil (OH<sup>-</sup>) iyonlarının etkisiyle dehidro aminoasitler modifiye olabilmektedir (LIU ve HANSEN, 1990). Nisin Z ve nisin Q, nisin A'ya göre daha fazla çözünebilme yeteneğindedir. Bu durum asparajin aminoasitinin histidine göre daha fazla hidrofilik özellikte olmasından kaynaklanmaktadır (DAVIES vd., 1998). Nisin pH 2'de aktivite kaybı olmadan sterilize edilebilir. Ancak pH 5'de % 90'dan fazla aktivite kaybı meydana gelir. Ayrıca nisin molekülü  $\alpha$ -kimotripsin ve proteinaz K uygulamasına karşı duyarlıdır (DE VUYST ve VANDAMME, 1994, MOTLAGH vd., 1991).

### **2.1.3 Nisinin antimikrobiyel etki mekanizması**

Nisinin antimikrobiyel aktivitesi, hedef hücre sitoplazmik membranında por oluşumunu teşvik etmek ve murein sentezini engellemek suretiyle ortaya çıkmaktadır (RUHR ve SAHL, 1985, KORDEL ve SAHL, 1986). Ortama nisin ilavesi durumunda hassas hücrelerde membran potansiyeli düşmekte ve bu durum proton motivasyon gücünün kaybı ile sonuçlanmaktadır (GAO vd., 1991, GARCÍA vd., 1993). Nisin varlığında porların oluşmasıyla hücreler için



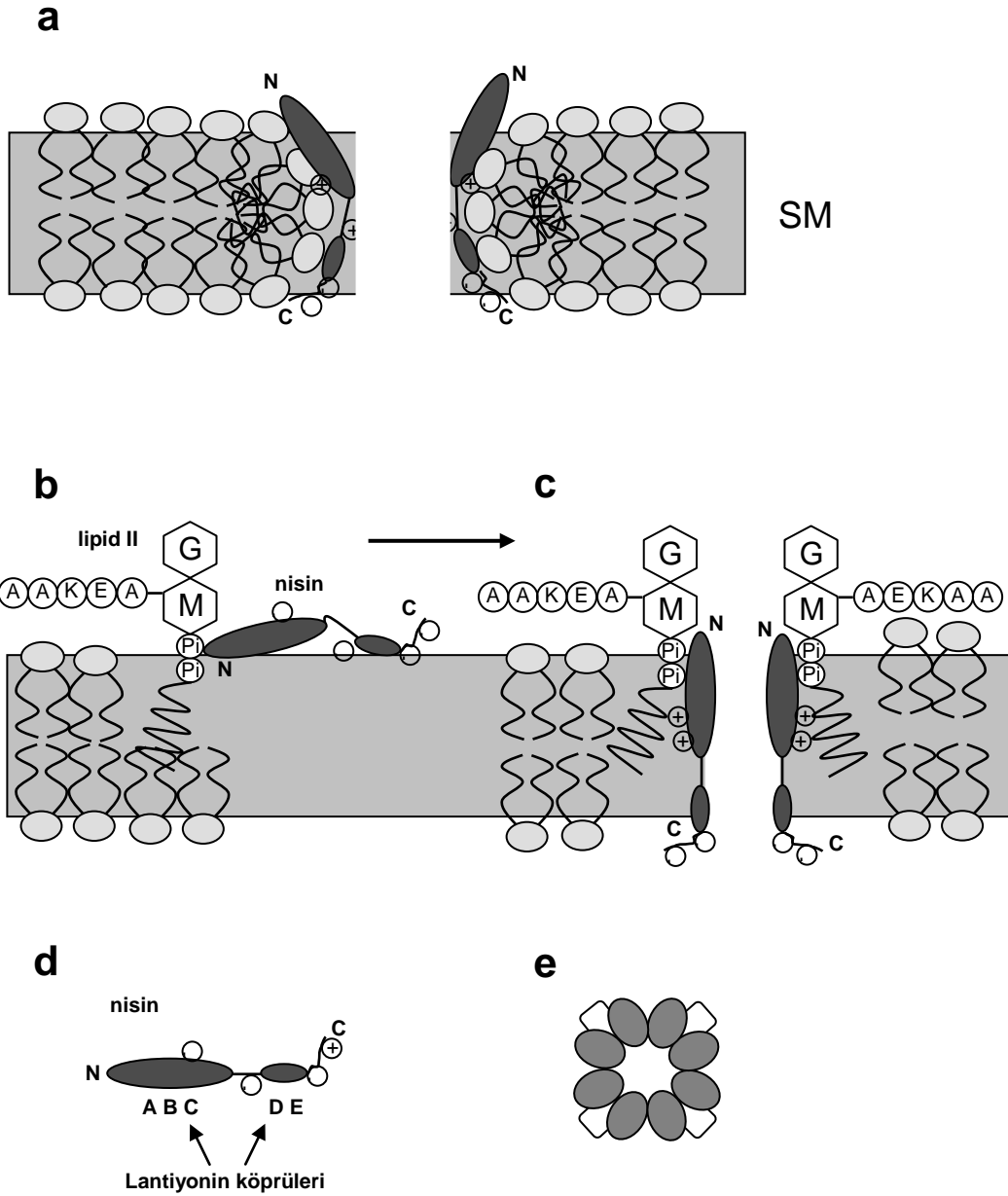
gerekli olan aminoasitlerin, ATP ve monovalent katyonların kaybı meydana gelmektedir (RUHR ve SAHL, 1985). Sonuç olarak hassas hücredeki tüm biyokimyasal reaksiyonlar durmaktadır.

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

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

aşamada membrana tutunduğu belirlenmiştir (WIEDEMANN vd., 2001, HSU vd., 2002, BONEV vd., 2004, BAUER ve DICKS, 2005) (Şekil 2.3 b ve c). Bu bulgulara ilave olarak, nisin tutunması için lipit II üzerinde bir başka ikincil yapının olduğu da öne sürülmüştür (BONEV vd., 2004). Tüm bu bulgular nisin sitoplazmik membran yüzeyinde por oluşumuna yol açabilmek için lipit II'ye gereksinim duyduğuna işaret etmektedir. Nisin lipit II ile etkileşimde bulunarak gösterdiği antimikrobiyel aktivite sistemi, fiçı-delme modeli olarak adlandırılmaktadır. Bu model sisteminde 8 adet nisin molekülünün ve 4 adet lipit II'nin etkinlik gösterdiği saptanmıştır (WIEDEMANN vd., 2001, HASPER vd., 2006) (Şekil 2.3e).

Nisin vejetatif bakteri formlarının yanı sıra spor gelişimini de engellemektedir. Nisin sporlar üzerindeki inhibisyon etkisinin, didehidro aminoasitlerin membranda bulunan sülfidril grupları ile reaksiyona girmesinden kaynaklandığı görüşü giderek yaygınlık kazanmaktadır (MORRIS vd., 1984, BUCHMAN vd., 1988). Bu görüşü destekleyen en önemli kanıt, yapısında dehidroalanin yerine, alanin aminoasidi bulunan mutant nisin, *Bacillus* sporlarına karşı daha düşük inhibisyon etkinliği gösterdiğinin tespitidir (CHAN vd., 1996).



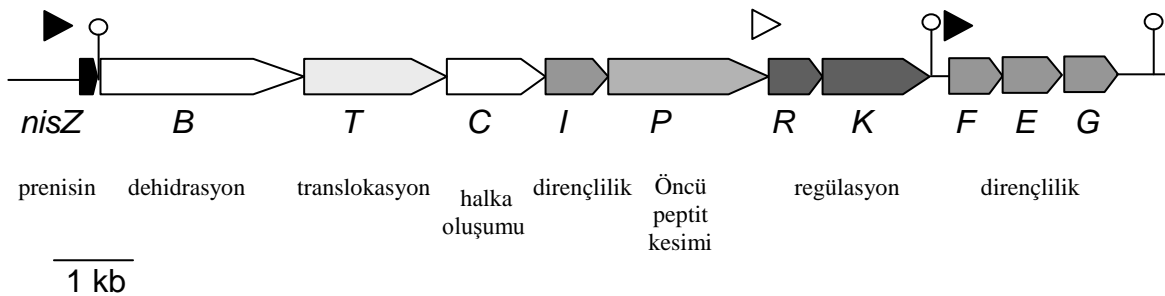
**Şekil 2.3** Nisin tarafından indüklenen membran por modelleri a) Sıkıştırma modeli; hedef bağımsız por. Mikromolar derişimlerde nisin fosfolipitlerin hidrofilik kısımları ile etkileşimde bulunmakta ve membran bütünlüğünün bozulmasına neden olmaktadır. b) Nisin N- ucu aracılığıyla fosfatların lipid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

#### 2.1.4 *L. lactis*'te nisin üretiminden sorumlu gen kümesinin organizasyonu

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

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

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

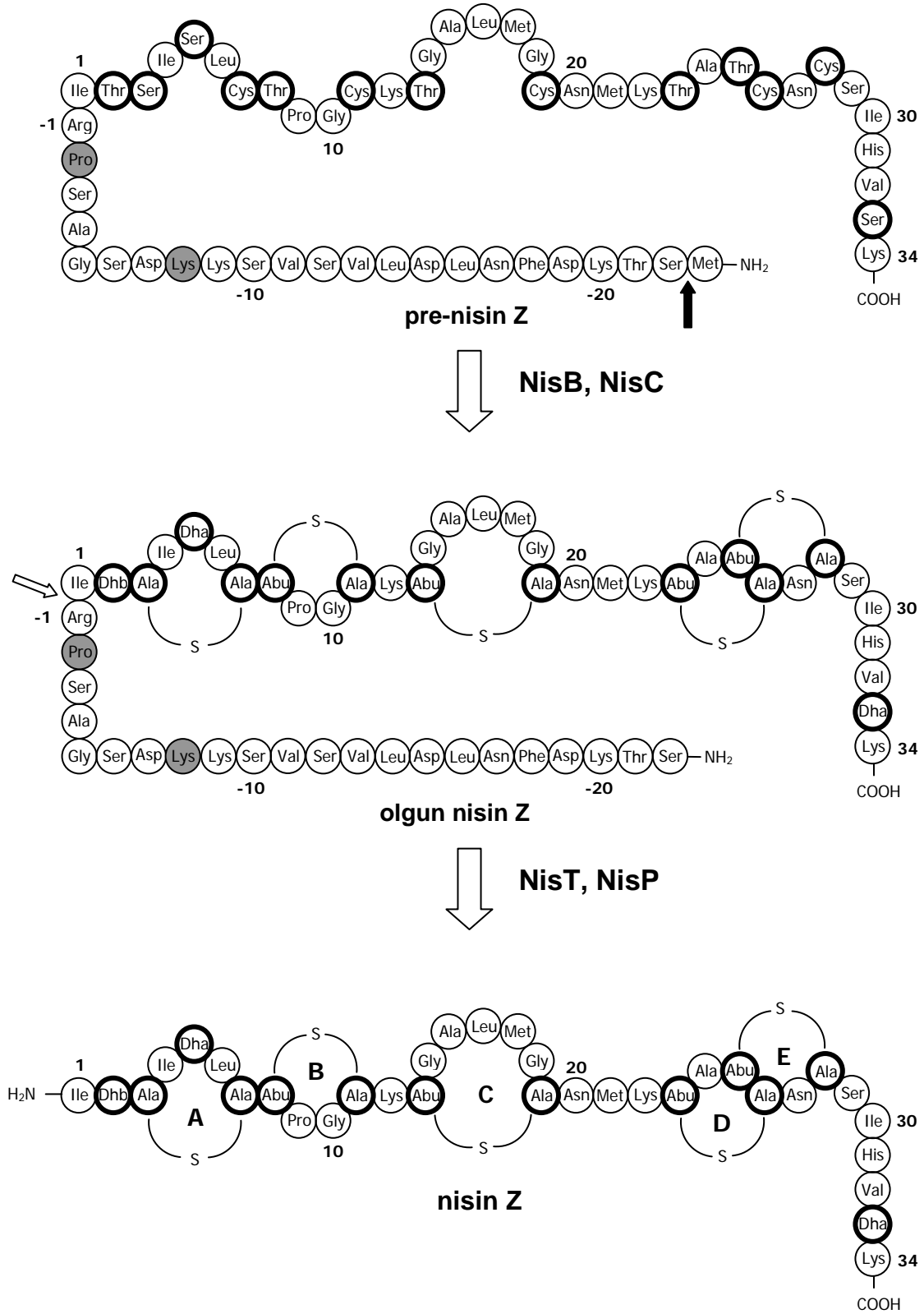


**Şekil 2.4** Nisin üretimi, regülasyonu ve dirençliliğinde görev alan genlerin organizasyonu. Açık ve koyu olarak işaretlenmiş üçgen şekiller, nisinle teşvik edilebilen ve sürekli çalışan promotorları tanımlamaktadır. Saç tokası şekiller transkripsiyon terminatörlerinin yerini ifade etmektedir (MCAULIFFE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

### 2.1.5 *L. lactis*'te nisinin biyosentezi

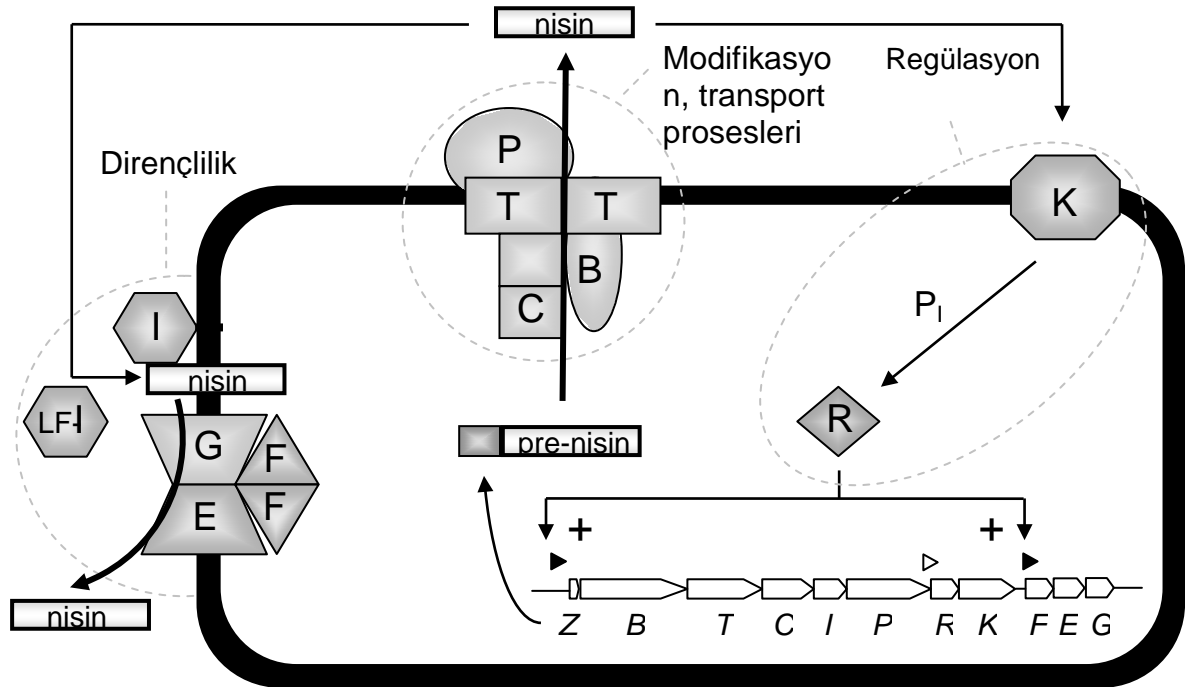
Nisin biyosentezi, ribozomal olarak sentezlenen öncü peptidin post-translasyonel modifikasyonları ile tamamlanmaktadır. Öncelikle ribozomal sentez sonucu yüksek moleküler ağırlığa sahip lineer ve biyolojik olarak inaktif öncü peptit sentezlenir. Daha sonra bu öncü peptit bir veya daha fazla enzimin katalizörlüğünde; biyolojik olarak aktif, beş halkalı, olgun peptite dönüştürülür. Öncü nisinde 57 aminoasit bulunmaktadır. Bu öncü peptitte yer alan lider peptit, modifikasyon ve hücre dışına taşınma süreçlerinde tanınma fonksiyonunu üstlenmektedir (KUIPERS vd., 1993, SIEGERS vd., 1996). Aktif nisin molekülünün oluşturulmasında ilk basamak; öncü molekülde yer alan serin ve treonin aminoasitlerinin, NisB dehidrataz enzimi ile dehidre edilmesidir (KOPONEN vd., 2002). Dehidre edilen aminoasitler, daha sonra siklaz enziminin (NisC) rol aldığı siklasyon reaksiyonlarına tabi tutulmaktadır (KOPONEN vd., 2002, Lİ vd., 2006). İki post-translasyonel enzimin etkisiyle modifiye edilen öncü peptit, ABC transfer fonksiyonu olan NisT proteini ile sitoplazma dışına taşınmaktadır (QIAO ve SARİS 1996, KUIPERS vd., 2006). Son aşamada lider peptit NisP proteazın etkisiyle modifiye öncü molekülden uzaklaştırılır (QIAO vd., 1996). Nisin biyosentezinde post-translasyonel aşamalar Şekil 2.5'te, bu sentezin hücrenel süreçleri ise Şekil 2.6'da verilmiştir.

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



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

Transkripsiyonel seviyede yapılan analizler sonucunda, nisın Z gen kümesinden; *nisZBTCIPRK* ve *nisFEG* olmak üzere, iki transkript üretildiği belirlenmiştir. Nisın A gen kümesinden ise; *nisABTCIP*, *nisRK* ve *nisFEG* olmak üzere üç adet transkripsiyon ünitesi üretilmektedir. Bu operonlardan genetik bilginin mRNA'ya işleme sırası *nisA/Z*, *nisBTCIPRK* ve *nisFEG* şeklinde olmaktadır. Yapısal gen *nisA/Z* ve *nisB* arasında “ters tekrar” serilerinin bulunması, genlerin ayrı promotorlar tarafından kontrol edildiğini akla getirmiştir. Ancak bu bölgelerde promotor serilerin tespit edilememesi, söz konusu dizilerin gen içi düzenleyici sinyaller olma olasılığını güçlendirmiştir (BUCHMAN vd., 1988, ENGELKE vd., 1992, RA vd., 1996, BREUKINK vd., 2003).



**Şekil 2.6** *L. lactis*'de nisın biyosentezi, regülasyonu ve dirençliliğinin hücresel modeli. (TAKALA ve SARIS 2007)

### 2.1.6 *L. lactis*'te nisın üretimini etkileyen faktörler

Öncü nisın molekülü, *L. lactis* hücrelerinin aktif büyüme fazının başında sentezlenmekte ve logaritmik üreme fazının sonunda en yüksek üretim düzeyine ulaşmaktadır (de VUYST ve VANDAMME, 1992, de VUYST ve VANDAMME, 1993). Bu durum nisının, primer metabolit kinetiğine sahip olduğunun kanıtıdır. Nisın üretimi, biyokütle oluşumu ile paralellik taşımaktadır. Bu nedenle; biyokütle oluşumu ile ilişkili pH, karbon, azot ve fosfat



kaynaklarının çeşit ve derişimi yanında, katyonlar ve sıcaklık değerleri ile ortamda oluşan nisin miktarının, nisin üretimi üzerindeki etkilerine yönelik çeşitli araştırmalar yapılmıştır (de VUYST ve VANDAMME, 1992, de VUYST ve VANDAMME, 1993, MATSUSAKİ vd., 1996, BERTRAND vd., 2001, LV vd., 2004a, LV vd., 2004b, PONGTHARANGKUL ve DEMİRCİ, 2006).

Karbon kaynağının seğimi, hücre gelişimini ve nisin biyosentezini doğrudan etkilemesinden dolayı, nisin üretiminde temel kontrol basamağı olarak ele alınmaktadır (de VUYST ve VANDAMME, 1992, LV vd., 2004a). Gelişme ortamında bulunan karbon kaynağı hücre gelişimini teşvik ettiği gibi, yüksek oranda bulunması halinde bakteriyel üreme ve nisin üretimi üzerinde baskılayıcı etki yapmaktadır. Bu nedenle farklı şeker türlerine ve bunların başlangıç derişimlerine bağlı olarak, nisin üretim miktarı değişebilmektedir (PONGTHARANGKUL ve DEMİRCİ, 2006). Birçok araştırmacı, sakkaroz ve laktoz başta olmak üzere; glikoz, galaktoz, ksiloz, maltoz şekerlerini içeren besiyeri ortamlarını kullanarak, nisin üretim düzeylerini ve nisin biyosentezinin moleküler detaylarını incelemiştir (de VUYST ve VANDAMME, 1992, AMİALİ vd., 1998, CHANDRAPATİ ve O’SULLİVAN, 1999, LV vd., 2004a, LİU vd., 2005, CHEİGH ve PYUN, 2005, PONGTHARANGKUL ve DEMİRCİ, 2006).

Nisin üretici *L. lactis* suşları, gelişebilmeleri ve nisin üretebilmeleri için, çok sayıda organik ve inorganik bileşiğe ihtiyaç duyar. Organik bileşikler içerisinde azot kaynakları, hücrelerin gelişebilmeleri için hayati rol oynamaktadır. Özellikle laktokok suşları; besin ortamında maya özütü, proteaz pepton, kazein pepton gibi kompleks azot kaynaklarının bulunması halinde iyi bir gelişme göstermektedir. Bakteriyel gelişimdeki önemleri nedeniyle çeşitli azot kaynaklarının, özellikle peptitlerin ve aminoasitlerin nisin üretimi üzerine etkileri, yoğun bir şekilde çalışılmıştır (de VUYST ve VANDAMME, 1993, de VUYST, 1995, KİM vd., 1997a, CHEİGH vd., 2002, Lİ vd., 2002, VAZQUEZ vd., 2004).

Nisin yanında diğer bakteriyosinlerin üretimi üzerine de etkili olduğu tespit edilmiş bir diğer azot kaynağı ise, maya özütüdür (de VUYST, 1995, KİM vd., 1997a). Maya özütünün M17 laktoz besiyerine %1 oranında ilave edilmesi durumunda, diğer azot kaynaklarına göre 2 kat daha fazla nisin üretiminin meydana geldiği belirlenmiştir. Ayrıca maya özütü oranının % 1’den % 3’e çıkarılması durumunda, nisin üretiminin ilave özüt oranı ile paralel bir şekilde

yükseldiği, ancak bu seviyeden sonra üretimin sabitlendiği tespit edilmiştir. Bu nedenle maya özütünün nisin üretimi için tek başına ideal azot kaynağı olabileceği ileri sürülmüştür (CHEİGH vd., 2002). Maya özütü; serbest aminoasitler ve kısa peptitlere ilave olarak, hücre gelişiminde önemli faktörleri de içerdiği için, nisin üretiminde diğer azot kaynaklarından daha etkin bulunmuştur (de VUYST, 1995, CHEİGH vd., 2002).

Nisin üretimi üzerine etkisi denenen ilk inorganik bileşik fosfat olmuştur. de VUYST ve VANDAMME, (1993) çalışmalarında, farklı fosfat kaynaklarının ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) kesikli sistemlerde nisin üretimi üzerindeki etkilerini araştırmıştır. Bu fosfat kaynakları içinde,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 'ün en etkili bileşik olduğu tespit edilmiştir.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 'ün başlangıç derişiminin %5 düzeyinde kullanımı ile nisin aktivitesinin  $3500 \text{ IU mL}^{-1}$  gibi yüksek bir değere ulaştığı saptanmıştır. Ancak bu seviyeden sonra, hem nisin miktarı ve hem de biyokütle oluşumu hızla azalmıştır. Yapılan başka bir çalışmada ise, aynı  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  derişimlerinin *L. lactis* IO-1 suşunda nisin Z üretimi üzerinde etkili olmadığı belirlenmiştir. Aynı çalışmada  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 'ün aksine, 0,1-0,2 M  $\text{CaCl}_2$  ilavesinin nisin Z üretiminde % 20 artışa neden olduğu saptanmıştır. Ayrıca % 0,1 (v/v) Tween 80'nin kullanılması sonucu nisin aktivitesinde % 30 artış tanımlanmıştır (MATSUSAKİ vd., 1996).

Nisin üretiminde de, diğer bakteriyosinler ile benzer şekilde, optimal pH aralığı 5,5-6,8 olarak saptanmıştır (de VUYST ve VANDAMME, 1992, MATSUSAKİ vd., 1996, CHEİGH vd., 2002, LİU vd., 2005, PONGTHARANGKUL ve DEMİRCİ, 2006). *L. lactis* IO-1 suşu için, ksiloz bulunan ortamda en verimli nisin üretimi pH 6,0'da gerçekleşirken, glikoz bulunan ortamda bu değere pH 5,5'te ulaşılmıştır (MATSUSAKİ vd., 1996). *L. lactis* A164 suşunun kullanıldığı bir diğer çalışmada ise, laktoz içeren ortamda en yüksek nisin üretimi pH 6,0'da gözlenmiştir (CHEİGH vd., 2002).

Nisin üretimi, ortamda yüksek derişimde nisin bulunması durumunda inhibe olmaktadır. Bu durum üretici suşlarda, maksimum dirençliliğin sağlanabildiği bir sınır değerinin bulunmasından kaynaklanmaktadır (KİM vd., 1997a, QİAO vd., 1997, KİM vd., 1998). Örneğin, *L. lactis* N8 ve LAC48 suşlarının dirençlilik gösterebildiği maksimum nisin değerleri, sırasıyla  $1000 \text{ IU mL}^{-1}$  ve  $5000 \text{ IU mL}^{-1}$  olarak ölçülmüştür (QİAO vd., 1997). Nisin miktarının etkisi en fazla kesikli ve yarı kesikli fermentasyonların son evresinde görülmektedir. Nitekim birçok

çalışmada nisin üretiminin ulaşılan maksimum değerden sonra düştüğü belirlenmiştir. Bu durumun en önemli nedenlerinden biri, durağan fazda bulunan hücrelerin yüksek nisin derişimlerinden etkilenmesidir (de VUYST ve VANDAMME, 1992, de VUYST ve VANDAMME, 1993, MATSUSAKİ vd., 1996, BERTRAND vd., 2001, LV vd., 2004a, LV vd., 2004b, PONGTHARANGKUL ve DEMİRCİ, 2006).

### **2.1.7 Fermentasyon sistemlerinde nisin üretimi**

Endüstriyel boyutta verimli nisin üretiminin sağlanması amacıyla yürütülen ilk araştırmalar, kesikli sistemlerle başlamıştır (de VUYST ve VANDAMME, 1992). Bu çalışmaları, verimin daha da artırılması amacıyla yarı-kesikli (HULL ve GİBBSON, 1997, AMİALİ vd., 1998, GUERRA ve PASTRANA, 2001) ve sürekli (SONOMOTO vd., 2000, SCANNELL vd., 2000, DESJARDİNS vd., 2001, TOLONEN vd., 2004, PONGTHARANGKUL ve DEMİRCİ, 2006) sistemler takip etmiştir. Üretim sistemleri, nisin biyosentezi üzerine etkili olan besiyeri kompozisyonu, pH, sıcaklık ve ortamda biriken nisin miktarı gibi faktörler dikkate alınarak geliştirilmiştir. Elde edilen bulgular ışığında nisin üretim sistemleri üzerinde söz konusu faktörlerin olumsuz etkilerini azaltacak yönde çeşitli düzenlemeler yapılarak geliştirilmiştir. Bu düzenlemeler çoğunlukla üretici suş için stres ortamı oluşturacak fermentasyon metabolitlerinin uzaklaştırılması, fermentasyon ortamının optimizasyonunun sağlanması ve üretici suşun canlılığının ve gelişiminin artırılması üzerine yoğunlaşmaktadır (HULL ve GİBBONS, 1997, KİM vd., 1997A, SHİMİZU vd., 1999, BERTRAND vd., 2001, YU vd., 2002, GUERRA ve PASTRANA, 2003, LV vd., 2004a, LV vd., 2004b, TOLONEN vd., 2004, LİU vd., 2005, PONTARANGKUL ve DEMİRCİ, 2006, PAPAGİANNİ vd., 2007, WU vd., 2008).

Nisin üretimi için kullanılan model sistemlerde, öncelikle tanımlı ya da yarı tanımlı besin ortamları denenmiş ve bu ortamlarında optimizasyonlar sağlanmıştır. Bu çalışmalarda M17 ve MRS besiyerleri, yüksek biyokütle oluşturmaları nedeniyle ön plana çıkmıştır (CHEİGH vd., 2002, LİU vd., 2005). Üretilen nisin kompleks besin ortamlarından geri kazanımının güç olması nedeniyle, uygun minimal besiyerlerinin oluşturulması hedef alınmıştır. Bu doğrultuda endüstriyel üretimler için; peyniraltı suyu başta olmak üzere, çeşitli gıda atıkları, uygun azot ve karbon kaynakları ile takviye edilerek kullanılmaya başlanmıştır (AMİALİ vd., 1998, DESJARDİNS vd., 2001, GUERRA ve PASTRANA, 2001, VAZQUEZ vd., 2004, PORTHARANGKUL ve DEMİRCİ, 2006, JOZALA vd., 2007).

### 2.1.7.1 Kesikli ve yarı kesikli fermentasyon sistemlerde nisin üretimi

Kesikli sistemlerde nisin üretimi ilk kez HİRSCHE ve WHEATER tarafından, 1951'de çalışılmıştır. Bu sistemlerde nisin üretimi, hücre gelişimi ile bağlantılı olarak artmaktadır. de VUYST ve VANDAMME (1992) tarafından, başlangıç şeker derişiminin  $10 \text{ g L}^{-1}$  sakkaroz olarak alındığı kesikli fermentasyonda *L. lactis* subsp. *lactis* NIZO 22186 suşunun üstel fazda (4-8. saatler arası)  $0,66 \text{ h}^{-1}$  oranında hızlı bir hücre gelişimi gösterdiği ve buna bağlı olarak nisin üretiminin de yükselerek  $1400 \text{ IU mL}^{-1}$  değerine ulaştığı belirlenmiştir. Ancak aynı fermentasyonun 8. saatinden sonra hücre gelişiminin durduğu ve nisin üretiminin de azalmaya başladığı tespit edilmiştir. Kesikli sistemler, hücrelerin doğal gelişim eğrilerini gösterdikleri ortamlardır. Bu nedenle fermentasyon ortamında tükenen besin elementleri ve oluşturulan metabolitler, üretici hücre üzerinde oldukça etkilidir. Başlangıç sakkaroz derişiminin  $40 \text{ g L}^{-1}$ 'ye yükseltildiği diğer uygulamalarda biyokütle gelişimi  $2,1 \text{ g kuru ağırlık L}^{-1}$ 'den,  $4,1 \text{ g kuru ağırlık L}^{-1}$ 'ye kadar yükselmiş ve  $2371 \text{ IU mL}^{-1}$  nisin aktivitesine ulaşılmıştır (LV vd., 2004b). Ancak karbon kaynağının artırılması bile, üremenin durma fazında meydana gelen nisin üretimindeki düşüşü engelleyememektedir. pH kontrollü kesikli sistemlerde sakkarozun karbon kaynağı olarak kullanılmasıyla  $2,34 \text{ g kuru ağırlık L}^{-1}$  hücre yoğunluğu elde edilirken, nisin aktivitesi  $1793 \text{ IU mL}^{-1}$  olarak ölçülmüştür. Üremenin durma fazının sonunda görülen büyük azalma ise kısmen engellenmiştir (de VUYST ve VANDAMME 1992). Benzer koşullarda *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 suşunun kullanılması durumunda, üretilen nisin miktarı  $2658 \text{ IU mL}^{-1}$  olmuştur (LV vd., 2005).

Spesifik nisin üretimin artırılması ve üretici suşların aktif fazının uzatılabilmesi amacıyla yarı-kesikli fermentasyon sistemleri devreye sokulmuştur (KİM vd., 1997b, AMİALİ vd., 1998, GUERRA ve PASTRANA, 2003, LV vd., 2004, PAPAGİANNİ vd., 2007). Bu sistemlerde; diğer üretim teknolojileri için başlangıçta olması gereken yüksek besin derişimi ve fermentasyon süresince oluşan laktik asit miktarının üretici suş üzerindeki olumsuz etkisinin azaltılması hedeflenmiştir (LV vd., 2004). Daha önce de ifade edildiği gibi karbon kaynağının regülasyonu, hücre gelişimini ve nisin biyosentezini doğrudan etkilemektedir (de VUYST ve VANDAMME, 1992). Bu yaklaşımla yürütülen bir çalışmada besleme çözeltisi,  $300 \text{ g L}^{-1}$  ve  $135 \text{ g L}^{-1}$  sakkaroz ve NaOH ilavesi ile hazırlanmıştır. Fermentasyon süresince son sakkaroz derişimi  $40 \text{ g L}^{-1}$  olacak şekilde, bu çözeltilerden besleme yapılmıştır. Çalışmada en yüksek biyokütle oranı  $4,2 \text{ g kuru ağırlık L}^{-1}$  olarak elde edilirken,  $5010 \text{ IU mL}^{-1}$  gibi oldukça yüksek

nisin aktivitesine ulaşılmıştır. Karbon kaynağının kontrollü olarak beslendiği glukostat bir çalışmada; ortamda,  $10 \text{ g L}^{-1}$  glikozun bulunması halinde  $6100 \text{ IU mL}^{-1}$  gibi yüksek nisin üretim verimine ulaşıldığı,  $25 \text{ g L}^{-1}$  glikoz oranının aşılması durumunda ise verimin hızla düştüğü rapor edilmiştir (PAPAGIANNI vd., 2007). Yarı kesikli fermentasyonda karbon kaynağı besleme hızının belirlenmesini hedefleyen bir diğer çalışmada,  $190 \text{ g L}^{-1}$  sakkaroz içeren solüsyondan fermentör ortamına saatte 10 ml beslendiğinde, nisin üretim oranının kesikli üretime göre % 51 artış gösterdiği belirlenmiştir (WU vd., 2008). Fakat kesikli sistemlerde görülen maksimum verimden sonraki düşüş, bu sistemde de meydana gelmiştir (LV vd., 2004). Nisin üretim miktarında meydana gelen düşmenin temel kaynağı, nötralizasyondan dolayı oluşan laktatın ve ortamda biriken nisinin üretici hücre üzerinde oluşturduğu olumsuz etkidir (HULL ve GIBBONS, 1997, SHİMIZU vd., 1999, TOLONEN vd., 2004). %1 glikoz içeren minimal besiyeri ortamında, *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 suşu kullanılarak yürütölen yarı-kesikli nisin üretim sisteminde; NaOH yerine, 6 M  $\text{NH}_4\text{OH}$  kullanılması sonucu, nisin üretim miktarı  $1080 \text{ IU mL}^{-1}$ 'den  $1260 \text{ IU mL}^{-1}$ 'ye yükselmiştir (HULL ve GIBBONS, 1997). Fermentasyon esnasında üretici suş tarafından oluşturulan laktik asidin üretici hücreler üzerindeki inhibisyon rolünün minimize edilmesine yönelik olarak tasarlanan bir çalışmada ise, kefirde izole edilen *Kluyveromyces marxianus* mayasının kullanımı önerilmiştir. Uygulama neticesinde saf költürün kullanıldığı kontrol grubunda  $2320 \text{ IU mL}^{-1}$  nisin aktivitesi elde edilirken, mayanın kullanıldığı kesikli fermentasyon sisteminde  $3920 \text{ IU mL}^{-1}$  nisin aktivitesine ulaşılmıştır (SHİMIZU vd., 1999).

Kesikli ve yarı kesikli fermentasyon sistemlerinde ortamda oluşan olumsuz faktörlerin (laktat ve nisin) etkilerinin azaltılması amacı ile yararlanılan bir diğer strateji, yüzey aktif ajanların kullanımınıdır. YU vd., (2002) sakkarozun karbon kaynağı olarak kullanıldığı fermentasyon ortamına, amberlit IRA-67 yüzey aktif bileşiğinin ilave edilmesiyle nisin üretim miktarının normal alkali nötralizasyonla yapılan kontrol grubuna göre 2 kat arttığı saptanmıştır. Diğer yandan bu koşullarda sakkaroz yerine galaktoz ve glikozun kullanımı ile sırasıyla 1,5 ve 0,3 kat artış sağlanmıştır. Nisinin, amberlit XAD-4 kullanılarak uzaklaştırılması esasına göre tasarlanan yarı-kesikli fermentasyon sisteminde; kullanılan *L. lactis* N8 ve LAC48 hücrelerinin, durma fazında da nisin üretimine devam ettiği tespit edilmiştir. Bu nedenle amberlit XAD-4'ün, nisinin yüzeyde tutulması için uygun bir materyal olduğu ileri sürölmüştür (TOLONEN vd., 2004). Nisinin üretici organizma üzerindeki etkisinin azaltılmasını hedefleyen bir başka çalışmada; ortamda biriken nisin, bir çözücü (fenil-metil

silika yağı) aracılığı ile ekstrakte edilmiştir. Çalışmada çözücünün üretici hücre üzerine inhibisyon etkisinin olmadığı, hatta hücre gelişimini % 21 oranında artırdığı belirlenmiştir. Ayrıca çözücünün nisini alarak üst faza ayrılması, nisinin üretici hücrelere karşı etkisini azaltmış, dolayısıyla nisin üretiminde % 24 artış kaydedilmiştir (KİM, 1997).

### 2.1.7.2 Sürekli fermentasyon sistemlerde nisin üretimi

Biyokütle miktarının artışı ile birlikte hacimsel nisin üretim miktarının da yükselmesi, endüstriyel nisin üretiminde immobilize hücre teknolojisi (İHT) kullanılarak üretim sürekliliğinin uzatılması düşüncesini doğurmuştur. Bu amaçla nisin üretici suşlar kademeli bir şekilde çoğaltılarak, çeşitli destek materyallerine immobilize edilmiş ve değişik özellikte biyokatalistler oluşturulmuştur. Ayrıca sürekli besleme ve ürün çıkışı sağlanarak, sürekli nisin üretim denemeleri gerçekleştirilmiştir (WAN vd., 1995, SCANNELL vd., 2000, SONOMOTO vd., 2000, DESJARDİNS vd., 2001, BERTRAND vd., 2001).

İmmobilizasyon tekniği kullanılarak nisin üretiminin yapıldığı ilk çalışmada, destek materyali olarak doğal kalsiyum alginat kullanılmıştır. Ancak çalışma sonucunda, amaçlanan yüksek nisin üretimine ve uzun süreli üretim stabilitesine ulaşamamıştır (WAN vd., 1995). Devam eden çalışmalarda; hücre immobilizasyonunun etkin olarak yapılabileceği, besin akışının hızlı olduğu ve yüksek stabiliteye sahip destek materyallerinin kullanıldığı sistemlerin geliştirilmesi üzerinde durulmuştur. SONOMOTO vd., (2000) nisin Z üreticisi olan *L. lactis* IO-1 suşunu; kalsiyum alginat, K-karegenan, agar ve agaroz, üretan prepolimer, foto-çapraz bağlanabilir rezin prepolimeri gibi materyallere tutuklayarak, ya da kitosan ve foto çapraz bağlı resin jel tanelerine tutundurarak, hücrelerdeki nisin üretim düzeylerini ve söz konusu materyallerin kullanılabilirliklerini araştırmıştır. Tüm tutuklanmış materyallerde besin elementlerinin difüzyonunun kısıtlanması nedeniyle düşük gelişme hızı ve nisin üretimi saptanmıştır. Ayrıca foto-çapraz bağlı resin materyallerinde tutuklama işlemi esnasında kullanılan kısa dalga boyuna sahip ultraviyole ışığın hücrelerin gelişimi üzerindeki inhibisyon etkisinden dolayı, üreme oranını önemli ölçüde düşürdüğü belirlenmiştir. *L. lactis* DPC496 hücrelerinin kalsiyum alginata immobilize edildiği iki farklı çalışmada ise, birbirine zıt sonuçlar elde edilmiştir. SCANNELL vd., (2000) MRS broth besin ortamında  $0,3 \text{ h}^{-1}$  dilüsyon oranında (D)  $5120 \text{ AU ml}^{-1}$  nisin aktivitesine ulaşırken, SONOMOTO vd., (2000) aynı koşullarda bu verimi  $1700 \text{ AU ml}^{-1}$  olarak saptamıştır. Kullanılan bir diğer immobilizasyon materyali ise K-karegenan/baklagiller gamı'dır. Araştırmacılar bu materyale *L. lactis* UL719 suşunu immobilize

ettikten sonra, fermentör hacmine göre 3,5 hacim dk<sup>-1</sup> havalandırma ve 0,15 h<sup>-1</sup> dilüsyon oranı kullanarak 2048 IU mL<sup>-1</sup> nisin verimi elde etmiştir (DESJARDİNS vd., 2001).

İmmobilize hücre tekniğinin (İHT) nisin üretiminde uygulanması; hücrelerin immobilize edildiği materyalin kolon şeklinde bir kaba doldurulması ve burada stabilitenin sağlanması amacıyla 0,3 M KCl ve 0,03 M CaCl çözeltilerin kullanılması suretiyle yapılmaktadır. Sistemde pH'nın ayarlandığı ve taze hazırlanan besiyerinin bulunduğu ayrı bir karıştırıcı hazne bulunmaktadır. Bir pompa aracılığı ile karıştırıcı bölmede pH'sı 6'ya ayarlanan besin ortamı, hücrelerin bulunduğu immobilizasyon materyalinden geçirilmekte ve üretilen nisin bulunduğu ortam tekrar karıştırıcı bölümde toplanmaktadır (SONOMOTO vd., 2000, SCANNELL vd., 2000, LIU vd., 2005). İmmobilize sistemde oluşan metabolitler, belli bir seviyeden sonra üretici hücre üzerine zararlı etki yapmaktadır. Bu etkinin giderilmesi amacıyla BERTRAND vd., (2001) pH kontrollü besiyeri değişimini önermiştir. κ-karegenan/baklagiller gamına 10<sup>11</sup> CFU mL<sup>-1</sup> düzeyinde immobilize edilen *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* hücreleri, bir saatlik zaman aralıklarıyla yeni besi ortamına alınarak süreklilik sağlanmıştır. Bu çalışmada 8200 IU mL<sup>-1</sup> toplam ve 5730 IU mL<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> hacimsel nisin aktivitesine ulaşılmıştır.

Fermentasyonda oluşan metabolitlerin geri yönlü inhibisyonunun engellenmesi amacıyla yapılan diğer bir çalışmada, fermentasyon ortamında yüksek biyokütle oranına kadar geliştirilen *L. lactis* hücreleri çöktürüldükten sonra bir saatlik aralıklarla taze besiyeri ilave edilerek sürekli fermentasyon denemeleri yapılmıştır (ŞİMŞEK ve SARİS, 2009). Bu çalışmada bir saatlik besiyeri değişimleri sonucunda maksimum 1080 IU mL<sup>-1</sup> hacimsel üretime ulaşılmış ve *L. lactis* hücrelerin spesifik üretiminin oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir.

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

**Çizelge 2.1** Farklı model sistemlerde nisin üretim miktarlarının karşılaştırılması

Fermentasyon Tipi	Kültür <sup>b</sup>	Canlılık (CFU ml <sup>-1</sup> )	Hacimsel Üretim (IU ml <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup>	Hücresele Üretim (IU ml <sup>-1</sup> h hücre <sup>-1</sup> ) <sup>d</sup>	Kaynaklar
Değişimli	İK	2,50 x 10 <sup>9</sup>	1080	430x 10 <sup>-9</sup>	Şimşek and Saris 2009
RCB	İK	1.00 x 10 <sup>11</sup>	5720	57,2x 10 <sup>-9</sup>	Bertrand <i>et al.</i> 2001
Kesikli	SK	2,80 x 10 <sup>10</sup>	529	18.9x 10 <sup>-9</sup>	Amiali <i>et al.</i> 1998
Kesikli	SK	6,70 x 10 <sup>9</sup>	854	127x 10 <sup>-9</sup>	Amiali <i>et al.</i> 1998
Sürekli	SK	2,75 x 10 <sup>9</sup>	460	167x 10 <sup>-9</sup>	Desjardins <i>et al.</i> 2001
Sürekli	İK	1,07 x 10 <sup>11</sup>	1760	16,4 x 10 <sup>-9</sup>	Desjardins <i>et al.</i> 2001
Sürekli <sup>a</sup>	İK	1,37 x 10 <sup>10</sup>	216	15,8x 10 <sup>-9</sup>	Sonomoto <i>et al.</i> 2000
Yarı-Kesikli	SK	1,20 x 10 <sup>9</sup>	84	61,3x 10 <sup>-9</sup>	Hull and Gibbons 1997
Yarı-Kesikli <sup>a</sup>	SK	2,07 x 10 <sup>9</sup>	626	302x 10 <sup>-9</sup>	Lv <i>et al.</i> 2004a
Kesikli <sup>a</sup>	SK	3,69 x 10 <sup>9</sup>	400-450	122x 10 <sup>-9</sup>	De Vuyst and Vandamme 1994 Parente and Ricciardi 1999

<sup>a</sup> :Hücre kuru ağırlığı (HKA) verileri Canlılık (CFU mL<sup>-1</sup>) = HKA= 2.02x10<sup>-9</sup> CFU + 0,012 denklemi kullanılarak CFU mL<sup>-1</sup>'ye dönüştürülmüştür (Shimizu *et al.* 1999).

<sup>b</sup> : SK: Serbest-hücre kültürü; İK: İmmobilize hücre kültürü.

<sup>c</sup> : Toplam fermentasyon süresi sonundaki ortalama.

<sup>d</sup> : Hücresele üretim (IU mL<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> hücre)= Hacimsel üretim (IU mL<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>)/Canlılık (CFU mL<sup>-1</sup>)

### 2.1.8 *L. lactis*'te nisin üretiminin geliştirilmesi

Nisin üretim seviyesi ve miktarı; besin kompozisyonu, pH, sıcaklık gibi faktörlere bağlı olduğu kadar, üretici hücrenin doğası ile de ilişkilidir. Nitekim farklı üretici suşlarda, farklı sınır üretim oranları tespit edilmiştir (KİM vd., 1997, QİAO vd., 1997, KİM vd., 1998). Bu nedenle yüksek nisin üretme yeteneğine sahip suş taramaları uzun süreden beri uygulanmakta ve günümüzde de devam etmektedir (BEASLEY ve SARİS, 2004, AKÇELİK vd., 2006). Çevresel faktörlerin optimizasyonu ve çeşitli model sistemlerin geliştirilmesi suretiyle artırılmaya çalışılan nisin üretimi, aynı zamanda moleküler boyutta yapılan çalışmalarla da



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

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

Dirençlilikten sorumlu *nisI* geninin kullanılması, operonda yer alan fonksiyonel genlerle yapılan çalışmalara ışık tutmuştur. *L. lactis* subsp. *lactis* 164 suşunda nisin Z üretimi; *nisZ*, *nisR*, *nisK* ve *nisF*, *nisE*, *nisG* genlerinin çoklu kopyaları klonlanarak, artırılmaya çalışılmıştır. Kontrol suşta 16000 AU mL<sup>-1</sup> olan nisin aktivitesi; *nisR* ve *nisK* ve *nisF*, *nisE*, *nisG* genlerinin klonlanmasıyla 25000 AU mL<sup>-1</sup> değerine ulaşmıştır. *nisR*, *nisK* genlerinin yüksek düzeyde ifadelerinin sağlanması durumunda, *nisZ* geninin transkripsiyonunun da teşvik edildiği belirlenmiştir (CHEİGH vd., 2005). Ayrıca ŞİMŞEK vd., (2009) tarafından yapılan bir diğer çalışmada, nisin regülasyon ve dirençlilik genlerinin birlikte kopya sayılarının artırılması sonucunda kontrol suşa kıyasla yeni düzenlenmiş *L. lactis* suşunun nisin üretiminde %45 oranında artış sağlanmıştır.

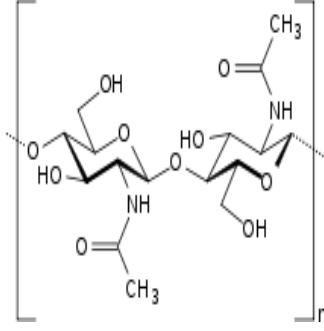
*L. lactis* suşlarında nisin üretimi ve hücre gelişimi üzerine düşük pH'nın olumsuz etkisi, oldukça iyi bilinen bir konudur. Bu inhibisyon etkisinin engellenmesi amacıyla; hücrede karbonhidrat katabolizması, laktik asit yerine, hücre için inhibisyon etkisi olmayan etanol ve alanine dönüştürülmüştür. Bu dönüşümler; etanol için *Zymomonas mobilis* hücrelerinden pürivat dekarboksilaz (PDC) ve alkol dehidrogenaz (ADH), alanin için alanin dehidrogenaz (AlaDH) genlerinin *L. lactis* hücrelerinde yüksek düzeyde ifade edilmesi sonucu başarılmıştır. Metabolik yolun alanine dönüştürüldüğü hücrelerde nisin üretimi 1,7 kat artmıştır (WARDANİ vd., 2006).

Fermentasyon ortamına hemin ilavesi ve oksijen verilmesi durumunda *L. lactis* hücrelerin biyokütlesinin önemli oranda arttığı birçok çalışmada gösterilmiştir. Çünkü hemin varlığında laktik asit bakterilerine ait sitokrom oksidaz sistemlerinin eksik olan kofaktör ihtiyacı karşılanmakta, oksijen varlığında aseton, asetik asit ve diasetil gibi metabolitler üretilmektedir. Ayrıca hücrelerde NADH'a bağlı elektron transfer sistemi (ETS) aktifleştirilerek daha yüksek enerji üretimi de sağlanabilmektedir. Dolayısıyla hemin içeren aerobik sistemde *L. lactis* hücrelerin yoğunluğu ve enerjetik seviyesi artmaktadır (DUWAT vd., 2001, GAUDU vd., 2002, LAN vd., 2006, NAGAYASU vd., 2007, KOEBMANN vd., 2008, RAZVÍ vd., 2008, BROOIJMANS vd., 2009, LECHARDEUR vd., 2011). Bu bilgidен hareketle yapılan ilginç bir çalışmada nisin üreticisi *L. lactis* ATTC11454 suşuna, *Aspergillus niger*'e ait mitokondrial alternatif oksidaz geni (*aox1*) klonlanmış ve söz konusu suş oksidatif strese dirençli hale getirilmiştir. Bu şekilde düzenlenmiş organizmanın yarı kesikli aerobik koşullarda nisin üretim miktarının 8000 IU mL<sup>-1</sup>'ye ulaştığı rapor edilmiştir.

Nisin üreticisi *L. lactis* ATCC11454 suşunda aerobik koşullarında hücresel glikoz miktarının artırılması amacıyla, fosfofruktokinaz (*pfk13*), cAMP bağımlı protein kinaz (*pkaC*) ve mitokondrial alternatif oksidaz (*aox1*) genleri klonlanmıştır. Elde edilen rekombinant suşların model sistemde kullanılması durumunda 7,5 g L<sup>-1</sup> biyokütle ağırlığına ve 14000 IU mL<sup>-1</sup> nisin aktivitesine ulaştığı tespit edilmiştir (PAPAGIANNÍ ve AVRAMÍDÍ, 2012).

## **2.2 Kitin, Kitinaz ve Kitin Bağlanma Domaini**

Kitin selülozdan sonra doğada en fazla bulunan polimerlerden birisidir. Kitin yapısında poli ( $\beta$  1-4)-2 asetamid-2 deoksi- $\beta$ -D-glukopiranoz monomerlerini içermektedir (Şekil 2.7). Genel olarak kitin yengeç, ıstakoz ve karides gibi deniz hayvanlarının kabuk kısmında yoğun bir şekilde % 20-30 oranında bulunmaktadır. Kitinin özelliklerini belirleyen faktörlerden birisi deasetilasyon oranıdır. Buna göre kitinin asit ve bazla muamelesi sonucunda asetil **grubu** uzaklaştırılarak deasetilasyon derecesi artırılabilir (WANG ve CHAO, 2006). Kitinin detasetil derecesi çözünürlük ve reaksiyona girme açısından önem taşımaktadır.



**Şekil 2.7** Kitinin kimyasal formülü

Bazı mikroorganizmalar kitini parçalayan kitinaz (EC 3.2.1.14) enzimi sentezlemektedir. Örneğin, *Bacillus circulans* WL-12 ortamda kitinin bulunması durumunda 10 farklı kitinaz enzimi sentezlediği rapor edilmiştir. Bu enzimler *chiA*, *chiC* ve *chiD* gibi üç farklı genin ürünü olup, söz konusu bu genlerden üretilen başlıca enzimler kitinaz A1, C1 ve D1'dir. Tüm bu enzimler çoklu birime sahiptir. Yapılan çalışmalarda kitinaz enziminin katalitik bölgesinin yanı sıra iki fibronektin III benzeri bölge ile C-terminal kitin bağlanma bölgesini içerdiği gösterilmiştir. Mutasyon denemeleri C-terminal bölgenin kitinaz enziminin, kitine tutunmadaki önemli bir bölgesi olduğunu ispatlamıştır (HASHİMOTO vd., 2000; WANG ve CHAO, 2006).

Kitinaz enziminin spesifik bir bölgesi olan KBD'inin 45 aminoasidi içeren bir peptit olduğu ve sıkıca paketlenmiş olup tam bir bütünlük içerisinde bulunduğu rapor edilmiştir. Ayrıca KBD'inin peptidi çözünmeyen kitin tanelerine hidrofobik etkileşimle bağlanmaktadır (HASHİMOTO vd., 2000; WANG ve CHAO, 2006). Kitin bağlanma bölgesinin *E. coli* suşuna klonlanması WANG ve CHAO (2006) tarafından ilk defa başarılmıştır. Bu çalışmada söz konusu aktif bölgeyi kodlayan peptidin hücre duvarında sentezlenmesi için Lpp-OmpA proteini ile birleştirilerek klonlanmıştır. *Bacillus circulans* WL-12 suşuna ait kitinaz enziminin KBD'inin oldukça geniş pH aralığında, özellikle pI yakınlarında ve bunun dışında NaCl varlığında yüksek affiniteye sahip bulunması KBD'inin kitinle hidrofobik etkileşimde bulunduğunu göstermiştir (HASHİMOTO vd., 2000).

### 2.3 *L. lactis*'te Hücre Yüzey İfade Sistemi

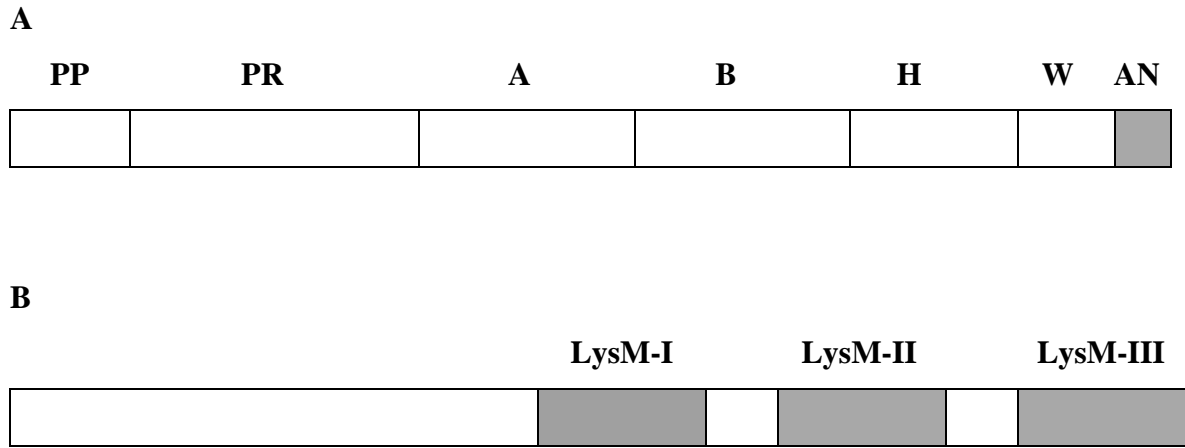
Bilindiği üzere *L. lactis* GRAS olarak kabul edilmiş bir organizmadır. Bugüne kadar yapılan çalışmalar neticesinde genomdan fenotipe kadar birçok özelliklerinin bilinmesi bu türün model organizma olmasını sağlamıştır. Nitekim bugüne kadar, *L. lactis* suşlarının hücre

yüzeyinde birçok antijeni, tutunma reseptörleri veya diğer fonksiyonel proteinlerin ifadesi gerçekleştirilmiştir (MORELLO vd., 2008). *L. lactis* hücrelerin yüzeyinde heterolog bir proteinin ifadesi için mutlaka çapa sisteminin kullanılması zorunludur. Bugüne kadar *L. lactis* ve diğer laktik suşlar için çeşitli çapalama sistemleri rapor edilmiştir. LEENHOUTS vd., (1999) bu sistemleri 5 grupta toplamıştır. Sırasıyla bunlar; transmembran, lipoprotein, LPXTG tip hücre duvarı, AcmA ve S-tabaka çapalardır. Heterolog yüzey ifadesinde LPXTG tip çapaların kullanımı daha fazla yaygındır.

Laktokoklarda heterolog proteinlerin hücre duvarına çapalanması sıklıkla ucunda yüklü ve LPXTG motifi içeren transmembran sinyal serilerinin kullanılması ile mümkün olmaktadır. Hücre duvarına tutundurulması düşünülen proteinin C-terminal ucuna bu transmembran serilerin takılması gerekir. Örneğin LPXTG tip çapalamada, membran ile ilişkili sortaz enziminin aktivitesine bağlıdır. Söz konusu bu enzim hedef proteinin LPXTG tekrar serisinden kesim yaparak, LPXTG ile peptidoglikan arasında peptid kovalent bağı kurarak, hedef proteinin duvara yerleştirilmesini sağlar (MAZMANIAN vd., 1999). Laktik asit bakterilerinde hücre yüzeyinde hedef proteinlerin çapalanması amacıyla en çok kullanılan LPXTG tip proteinler *Staphylococcus pyogenes*'e ait M6, *Staphylococcus aureus*'a ait Protein A ve *L. lactis*'e ait PrtP'dir (WELLS ve MERCENIER 2008). Örneğin Şekil 2.8'de gösterildiği gibi Laktokoklarda sıklıkla bulunan PrtP proteazı 7 kısımdan oluşmaktadır. Bu proteazın C-terminal ucunda söz konusu proteazın hücre membranına tutundurulmasını sağlayan LPXTG tipte bir çapa motifi bulunur. Bunun dışındaki H, B, A ve PR kısımları N-terminal uca bulunan proteazın (PP) hücre dışına kadar uzatılmasını sağlar (SIEZEN, 1999).

BUIST vd., (1995) tarafından *L. lactis* peptidoglikan hidrolazının (AcmA) klonlanmasından sonra, bu proteinin C-terminal ucundaki tekrar eden serileri, çeşitli proteinlerin kovalent olmayan bir bağlanma ile *L. lactis*'in hücre yüzeyine yerleştirilmesi amacıyla sıklıkla kullanılmıştır (OKANO vd., 2008, KYLA-NİKKİLA vd., 2010). Öncü çalışmalarda benzer tekrar serileri bakteriyofajların liziz proteinlerinde de tespit edilmiş, PONTING vd., (1999) bu serileri LysM olarak isimlendirmiştir. *L. lactis*'e ait AcmA proteinlerinde C-terminal uca üç farklı LysM tekrarları bulunmaktadır. LysM tekrarların hücre duvarına proteinlerin tutundurulmasındaki en önemli olumsuzluklardan birisi, bu çapanın hücre duvarına zayıf bağlanmasıdır. Çünkü bu çapa sistemlerin kullanılması durumunda hücre kültürünün üst sıvısında serbest proteinlerin bulunması söz konusudur (BOSMA vd., 2006). Nitekim *L.*

*Lactis*'in AcmA çapalarının hücre dışına çıkarıldığında diğer hücrelerin peptidoglikan tabakasına bağlandığı da rapor edilmiştir (STEEN vd., 2003). Bu gözlemler, LysM domainlerini içeren proteinlerin bağlanmasını engelleyen başka hücre duvarı bileşenlerin bulunduğuna işaret etmiştir. Dolayısıyla heterolog proteinlerin AcmA ile çapalanması ancak hücre yüzeyinde özel bölgelerde gerçekleşmektedir. Şekil 2.8'de AcmA proteini ve kısımları şematize edilmiştir.



**Şekil 2.8** *L. lactis* hücrelerine ait PrtP proteaz enziminin ve duvar proteini AcmA'nın şematik gösterimi. Koyu olan bölgeler söz konusu proteinlerin hücre duvarına tutunma bölgeleridir. Bu bölgeler PrtP için LPXTG, AcmA için LysM ifade etmektedir.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1 Materyal

Bu çalışmada Çizelge 3.1’de gösterilen bakteri suşları, plazmidler ve primerler kullanılmıştır. *L. lactis* suşları %0,5 glikoz içeren M17 (Merck) ortamında 30°C’de, *E. coli* suşları ise LB (Fluka) ortamında 37°C’de 250 g çalkalamalı koşullarda geliştirilmiştir. Gerekli görüldüğünde *L. lactis* suşları için 5 µg mL<sup>-1</sup>, *E. coli* suşları için 200 µg mL<sup>-1</sup> eritromisin ve 100 µg mL<sup>-1</sup> ampisillin gelişme ortamlarına ilave edilmiştir.

**Çizelge 3.1** Çalışmada kullanılan bakteri suşları, plazmidler ve primerler.

Bakteri Suşları	Özellikleri
<i>E. coli</i> TG1	Ara konakçı suş
<i>E. coli</i> ECO123	pLEB124 plazmidi taşıyıcısı, eritromisin dirençlidir.
<i>E. coli</i> SAA154	pCYB3 plazmidi taşıyıcısı, ampisilin dirençlidir.
<i>L. lactis</i> GRS5	Ara konakçı suş
<i>L. lactis</i> LAC317	pLEB660 plazmidi taşıyıcısı, eritromisin dirençlidir
<i>L. lactis</i> N8	Nisin Z üreticisi
<i>L. lactis</i> LL27	Nisin A üreticisi
<i>L. lactis</i> LAC248	<i>L. lactis</i> MG1363, pLEB596 plazmidi taşıyıcısı, eritromisin dirençli
<i>L. lactis</i> LAC247	<i>L. lactis</i> MG1363, pLEB597 plazmidi taşıyıcısı, eritromisin dirençli
<i>L. lactis</i> LAC242	<i>L. lactis</i> MG1363, pLEB606 plazmidi taşıyıcısı, eritromisin dirençli
<i>L. lactis</i> LAC317	<i>L. lactis</i> MG1363, pLEB660 plazmidi taşıyıcısı, eritromisin dirençli
<i>L. lactis</i> PLAC1	pBL01 plazmidi taşıyıcısı, eritromisin dirençli'dir. Nisin Z üreticisidir.
<i>L. lactis</i> PLAC2	pBL02 plazmidi taşıyıcısı, eritromisin dirençli'dir. Nisin Z üreticisidir.
<i>L. lactis</i> PLAC3	pBL03 plazmidi taşıyıcısı, eritromisin dirençli'dir. Nisin Z üreticisidir.
<i>L. lactis</i> PLAC7	pBL04 plazmidi taşıyıcısı, eritromisin dirençli'dir. Nisin Z üreticisidir.
<i>L. lactis</i> PLAC4	pBL01 plazmidi taşıyıcısı, eritromisin dirençli'dir. Nisin A üreticisidir.
<i>L. lactis</i> PLAC5	pBL02 plazmidi taşıyıcısı, eritromisin dirençli'dir. Nisin A üreticisidir.
<i>L. lactis</i> PLAC6	pBL03 plazmidi taşıyıcısı, eritromisin dirençli'dir. Nisin A üreticisidir.
<i>L. lactis</i> PLAC8	pBL04 plazmidi taşıyıcısı, eritromisin dirençli'dir. Nisin A üreticisidir.

Çizelge 3.1'in devamı

<b>Plazmidler</b>	
pLEB124	<i>E. coli</i> ve <i>L. lactis</i> için ifade vektörü. p45 promotorunu içermektedir.
pCYB3	Kitin Bağlanma Domaini taşıyıcısı plazmid
pLEB596	Selüloz Bağlanma Domaini ile birlikte <i>prtP</i> <sub>153 aa</sub> dizilerini içerir.
pLEB597	Selüloz Bağlanma Domaini ile birlikte <i>prtP</i> <sub>344 aa</sub> dizilerini içerir
pLEB606	Selüloz Bağlanma Domaini ile birlikte <i>acmA</i> <sub>242 aa</sub> dizilerini içerir.
pLEB685	p45 promotorunu ve <i>prtP</i> <sub>800 aa</sub> dizisini içerir.
pLEB686	Negatif kontrol, <i>ss<sub>usp45</sub>-prtP<sub>153aa</sub></i> dizilerini içerir.
pLEB687	Negatif kontrol, <i>ss<sub>usp45</sub>-prtP<sub>344aa</sub></i> dizilerini içerir.
pLEB660	Negatif kontrol, <i>ss<sub>usp45</sub>-acmA<sub>242aa</sub></i> dizilerini içerir.
pBL01	p45 promotoru altında SSusp45, KBD, <i>prtP</i> <sub>153</sub> füzyon proteini ifade edilmektedir.
pBL02	p45 promotoru altında SSusp45, KBD, <i>prtP</i> <sub>344</sub> füzyon proteini ifade edilmektedir.
pBL03	p45 promotoru altında SSusp45, KBD, <i>acmA</i> füzyon proteini ifade edilmektedir.
pBL04	p45 promotoru altında SSusp45, KBD, <i>prtP</i> <sub>800</sub> füzyon proteini ifade edilmektedir.
<b>Primerler</b>	
ChBD-F	<u>GACTCGAGATCTCATCAACATGTGATGCTACGACAAATCCTGGTG</u> TA
ChBD-R	AATCGTCACATATTGAATTGGATCCTGGACCTTGAAGCTGCCACA
Usp45-R	<u>CACTCGAGAGCGTAAACACCTGA</u>
PrtP800-F	<u>TGGCGGATCCAAGTCGACTGATTTATACGG</u>

**ChBD:** Kitin Bağlanma Domaini

### 3.2 Rekombinant Hücrelerin Oluşturulması

Çalışmada rekombinant plazmidlerin hazırlanması amacıyla KYLA-NİKKİLA vd., (2010) tarafından *L. lactis* MG1363 hücrelerinde Selüloz Bağlanma Domainin ifadesi için hazırlanan plazmidler (pLEB596, pLEB597, pLEB606) ile ifade vektörü olarak hazırlanmış promotor ve uzun PrtP800 kodlayan bölgeyi içeren pLEB660 plazmidleri kullanılmıştır. Söz konusu bu plazmidlerden ters primerler çiftleri kullanılarak Selüloz Bağlanma Domaini dışındaki tüm bölgeler PZR ile çoğaltılmış ve takiben ayrı bir yerde yine PZR ile çoğaltılan KBD fragmanı ile birleştirilerek yeni plazmidler elde edilmiştir.

### 3.2.1 Fragmentlerin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılması

Polimeraz zincir reaksiyonları (PZR), sıcaklık döngüsü uygulanan cihazda (Techne, UK) gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın amacı doğrultusunda çoğaltılacak fragmentler için kullanılan primerler (Metabion, Germany) Çizelge 3.1’de verilmiştir. PZR uygulamalarında, yüksek duyarlılıkta çalışan DNA polimeraz (Füzyon Hi-Fi HotStart, New England, Biolabs) kullanılmıştır. Promotor, sinyal serisi ve çapa proteinlerine ait DNA fragmentinin plazmidlerden çoğaltılması için kullanılan reaksiyonun bir çevrimi 98°C’de 10 saniye, 60°C’de 30 saniye ve 72°C’de 2,5 dk ile tanımlanan, toplam 30 çevrimlik protokol uygulanmıştır. KBD’inine ait DNA fragmenti ise pCYB3 plazmidi kullanılarak, 98°C’de 10 saniye, 65°C’de 30 saniye ve 72°C’de 1 dk’lık protokol ile çoğaltılmıştır.

### 3.2.2 Restriksiyon endonükleaz, fosfataz ve ligaz uygulamaları

Restriksiyon endonükleaz ve DNA’yı modifiye eden diğer enzimler üretici firmalar (Fermentas) tarafından belirtilen koşullar dikkate alınarak kullanılmıştır. Restriksiyon enzim reaksiyonları 100 µL toplam hacimde gerçekleştirilmiştir. İlk enzim reaksiyonundan sonra DNA; PZR saflaştırma kiti (Fermentas) ile temizlenmiştir. Bu DNA örneklerine ikinci enzim kesimi uygulanmıştır. *XhoI* (Fermentas) enzimi için 37°C, *NheI* enzimi için 30°C inkübasyon sıcaklıklarında 2 saat süreyle kesim işlemi gerçekleştirilmiştir.

Fosfataz enzim uygulaması için, karides alkali fosfatazı (Fermentas) kullanılmıştır. Defosforilasyon işlemi, restriksiyon endonükleaz enzim tamponunda gerçekleştirilmiştir. Buna göre vektörün (promotor, sinyal serisi ve çapa dizilerini içeren fragment) son enzim ile muamelesinden sonra, her bir µg DNA için 1 µL (1 Ünite µL<sup>-1</sup>) karides alkali fosfataz (SAP) ilave edilerek, ortam 37°C’de 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda fosfataz enziminin tamamen inaktivasyonu için 65°C’de 15 dakika ısı uygulaması yapılmıştır. Enzim reaksiyonlarından sonra DNA örnekleri %1 agaroz içeren jelde yürütülerek görüntülenmiştir (SAMBROOK vd., 1989). Ayrıca DNA örneklerinin derişimi ve saflık oranları spektrofotometre (PG Instruments, UK) kullanılarak 260 nm UV dalga boyunda tespit edilmiştir. Ligasyon, T4 DNA ligaz (Fermentas) enzimi kullanılarak 50 µL reaksiyon hacminde gerçekleştirilmiştir. Klonlanacak DNA örnekleri ve vektör, molar derişimlerine göre 2:1, 5:1 oranlarında kullanılmıştır. DNA-Vektör molar oranlarının hesaplanmasında aşağıda verilen denklemden faydalanılmıştır.



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

Buradan saptanan oranlar kullanılarak hazırlanan ligasyon ortamı, oda sıcaklığında bir gece inkübe edilmiştir. Ligasyonda kontrol olarak insert DNA ilave edilmeyen vektör DNA kullanılmıştır. İnkübasyon sonunda T4 DNA ligaz enziminin inaktivasyonu için 65°C'de 15 dk ısı uygulaması yapılmıştır.

### 3.2.3 Kompetan *E. coli* hücrelerin hazırlanması

Elektrokompetan *E. coli* hücrelerin hazırlanması, SAMBROOK vd., (1989) tarafından tanımlanan yöntem kullanılarak yapılmıştır. Öncelikle -20°C'de muhafaza edilen *E. coli* TG1 suşu, LB ortamında 37°C'de ve 250 g karıştırma hızında 1 gece üretilmiştir. Bu hücreler LB agar içeren petri plaklarına tek koloni düşürülecek şekilde öze aracılığı ile aktarılmış ve 37°C'de 1 gece inkübe edilmiştir. Agar ortamlarında üreyen tipik koloniler 5 mL LB ortamı içeren tüplere aktarılmıştır. Hücreler 250 g çalkalama hızında ve 37°C'de 1 gece geliştirildikten sonra, sıcaklığı 37°C'ye getirilmiş LB besiyeri ortamına aktarılmıştır (1/100) ve yukarıda belirtilen koşullarda inkübe edilmiştir. İki saat inkübasyon sonrasında her 15 dk da bir üreme ortamlarının yoğunlukları belirlenmiştir. Optik yoğunluk 0,4-0,6 (OD<sub>600</sub>) aralığına ulaşıldıktan sonra, inkübasyon sonlandırılarak, ortam sıcaklığı 4°C'nin altına düşürülmüştür. Soğutulan hücre çözeltileri eşit miktarlarda santrifüj tüplerine dağıtılarak, santrifüj işlemine (10000 g'de, 20 dk., 4°C) tabi tutulmuştur. Üst sıvı uzaklaştırıldıktan sonra, hücre çökeltileri önceden hazırlanarak ve 4°C'ye soğutulmuş, %10 gliserin içeren steril de iyonize su içerisinde çözülmüştür. 4°C'de muhafaza edilen hücre çözeltileri 10000 g'de 20 dakika santrifüj edilerek hücre çökeltisi elde edilmiştir. %10 gliserin içeren de iyonize su ile yapılan yıkama işlemi, 2 kez daha tekrar edilmiştir. Son aşamada hücre çökeltisi başlangıç hücresel hacmin 1/100 oranında %10 gliserollü deiyonize su ile çözülerek, önceden buz üzerinde soğutulmuş mikrosantrifüj tüplerine 40 µl olacak şekilde dağıtılmıştır. Bu kompetan hücreler -70°C'de muhafaza edilmiştir.

### 3.2.4 Rekombinant plazmidlerin *E. coli* hücrelerine elektroporasyonu

Oluşturulan rekombinant plazmidler, elektroporatör cihazı (GenePulser, Eppendorf) kullanılarak kompetan hücre *E. coli* TG1'e aktarılmıştır. İlk aşamada, -70°C'de saklanan

kompetan hücreler ve 2 mm aralığa sahip elektroporasyon küvetleri (Eppendorf) kullanımdan önce buz üzerine alınmıştır. -20°C'de muhafaza edilen ligasyon karışımı da buz üzerinde çözündürüldükten sonra 5 µL alınarak, kompetan hücreler ile (40 µL) karıştırılmıştır. Bu karışım 10 dk buz üzerinde inkübe edilmiş ve pipet yardımıyla elektroporasyon küveti içerisine hava kabarcığı kalmayacak şekilde aktarılmıştır. *E. coli* hücreleri için 2.5 kV, 200Ω ve 25 µF değerleri cihaza girilerek yaklaşık 3-4 saniyeye tekabül eden elektrik uygulaması yapılmıştır. Elektroporasyon uygulanmış hücrelerin üzerine 1 mL canlandırma ortamı (SOC ve glikoz) ilave edilmiş ve 2 saat bu ortamda inkübe edildikten sonra, 200 µg mL<sup>-1</sup> eritromisin içeren LB agar plaklarına yayılmıştır. LB agar ortamları 37°C'de 48 saat inkübe edilmiştir (SAMBROOK vd., 1989).

#### SOC Ortamı

Tripton	2 g
NaCl	0,5 g
KCl (1M)	0,25 mL
MgSO <sub>4</sub> (1M)	2 mL
dH <sub>2</sub> O	97 mL.

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

#### **3.2.5 Kompetan *L. lactis* hücrelerin hazırlanması**

-20°C'de muhafaza edilen *L. lactis* suşları GM17 ortamında 30°C'de 12 saat süreyle üretilmiştir. Daha sonra hücreler GM17 agar üzerine tek koloni düşürülecek şekilde ekim yapılmıştır. Gelişen kolonilerden birisi alınarak, %1 glisin içeren M17-sakkaroz (0,5 M) ortamına aktarılmış (1/100) ve hücre yoğunluğunun 0,2-0,4 (OD<sub>600</sub>) aralığına gelinceye kadar inkübe edilmiştir. Hedeflenen yoğunluğa erişildikten sonra ortam buz üzerinde soğutulmuş ve 8000 g'de, (4°C'de, 20 dakika) santrifüj edilerek hücreler toplanmıştır. Üst sıvı uzaklaştırıldıktan sonra hücreler 4°C'ye soğutulmuş, %10 gliserol ve 0,5 M sakkaroz içeren yıkama çözeltisi içerisinde çözülmüştür. Bu ortam tekrar 8000 g'de (4°C'de 20 dk) santrifüj edilmiştir (Yıkama ve santrifüj işlemi 3 kez yapıldı). Son basamakta hücreler başlangıç kültür hacmin 1/100'ü oranındaki yıkama çözeltisi içerisinde çözümlenerek, önceden soğutulmuş mikrosantrifüj tüplerine (40 µL) dağıtılmış ve -70°C'de saklanmıştır (HOLO ve NES, 1989).

### 3.2.6 Rekombinant plazmidlerin *L. lactis* hücrelerine elektroporasyonu

*L. lactis* hücrelerine uygulanan elektroporasyon işleminde; *E. coli* hücreleri için takip edilen basamaklar aynen izlenmiştir. Ancak bu hücreler için elektrik akım uygulaması 200  $\Omega$  yerine, 400  $\Omega$  değerinde gerçekleştirilmiştir. Ayrıca elektrik akımı uygulandıktan sonra hücreler ifade ortamına alınarak ve 2 saat inkübasyona tabi tutulmuştur. Daha sonra hücre seyreltelerinden 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  eritromisin içeren M17 glikoz (% 0,5) sakkaroz (0,5 M) agar ortamına yayma ekim yapılmış ve 30°C'de inkübasyona bırakılmıştır (HOLO ve NES, 1988).

#### İfade Ortamı

2XM17	5 mL
1M Sakkaroz	5 mL
%20 Glikoz	250 $\mu\text{L}$
1M $\text{MgCl}_2$	200 $\mu\text{L}$
1M $\text{CaCl}_2$	20 $\mu\text{L}$

### 3.2.7 *E. coli* ve *L. lactis* suşlarından plazmid DNA izolasyonu

*E. coli* suşlarından plazmid DNA izolasyonu için plazmid saflaştırma kiti (Fermentas) kullanılmıştır. Kit kullanım protokolünde belirtildiği gibi koloniler 5 mL LB ortamına inoküle edilmiştir. Daha sonra hücreler 37°C'de ve 250 g'de 12 saat süresince çoğaltılmıştır. İnkübasyon sonrasında santrifüj işlemi uygulanarak toplanan hücreler, DNA denatürasyon çözeltileri ile muamele edilmiş ve plazmid DNA kolonlarına (HiBind) tutundurulmuştur. Son basamakta ise 50  $\mu\text{L}$  geri kazanma tamponu ile plazmidler kolondan alınmıştır. İzole edilen plazmid DNA derişimi ve saflığı spektrofotometrik olarak ölçülmüştür (PG Instruments, UK).

*L. lactis* suşlarından plazmid DNA izolasyonu plazmid saflaştırma kiti (Fermentas) protokolü modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir. M17G ortamında 1 gece geliştirilen suşlar, %10'luk ikinci bir inokülasyonla 3 saat geliştirilerek toplanmıştır. Daha sonra PBS tamponunda iyice yıkanan hücreler 30  $\text{mg mL}^{-1}$  lizozim içeren ortamda 37°C'de inkübe edilerek kit protokolü takip edilmiştir. Son aşamada plazmidler %0,8 agaroz içeren jelde yürütülerek görüntülenmiştir.

### 3.3 Rekombinant Hücrelerde Füzyon Proteininin İfadesinin Belirlenmesi

#### 3.3.1 Western-Blot analizi

Western-Blot analizi SAMBROOK vd., (1989) ve WANG ve CHAO, (2006) tarafından önerilen yöntemler kombine edilerek kullanılmıştır. Bu yöntemlere göre kontrol ve rekombinant nisin üreticisi *L. lactis* hücreleri 30 °C'de 1 gece geliştirilmiş, takiben taze M17G besiyerine %10 inoküle edilerek 4 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda hücreler santrifüjle (6000 g, 15 dk) toplanarak PBS tamponunda iki kez yıkanmış ve her bir hücrenin yoğunluğu 1 (OD<sub>600</sub>) olacak şekilde hücre çözeltileri hazırlanmıştır. Daha sonra hücreler PBS tamponu içerisinde ve buz havuzunda %50 güç ile 10 dk sonikasyona tabi tutulmuştur. Sonikasyon işlemine hücre yoğunluğunun yarısına düşünceye kadar devam edilmiştir. Bu aşamadan sonra hücre lizatı santrifüj edilerek (12000 g, 15 dk) üst faz dökülmüş ve lizatlar 200 µL örnek tamponunda (0,5 M Tris-HCl pH 6,8, %10 SDS, %10 Gliserol, %0,5 Brom-fenol mavisi) çözülmüştür.

Hazırlanan örnekler, yığma için %4, ayırma için %15 akrilamid/bis-akrilamid derişiminde hazırlanan poliakrilamid jelle yüklenerek önce 50 V'da 1 saat, takiben 100 V'da 3 saat yürütülmüştür. Daha sonra jeller hemen transfer tamponuna (1,92 M Glisin, 0,25 M Tris) aktarılmış ve dengeleninceye kadar tutulmuştur. Takiben jeller yarı-kuru Western-Blot sistemine (Bio-rad) yerleştirilmiştir. Poliakrilamid üzerinde bulunan proteinler PVDF (Milipore) membranına 15 V aktarım yapılmıştır. Aktarım izlenebilir proteinin markerin (Fermentas) geçişi tamamlandığında durdurulmuştur. Yarı-kuru Western-Blot sisteminden PVDF membran dikkatle alınarak PBST tamponunda %5 süt tozu içeren solüsyonda 1 saat tutulmuştur.

Yukarıda sıralanan aşamalardan sonra, membran üzerinde füzyon proteinin varlığının araştırılması işlemlerine geçilmiştir. Öncelikle membran 2 kez PBST tamponunda iyice yıkanmıştır. Takiben membran PBST tamponuyla 1/5000 oranında seyretme edilmiş tavşan spesifik ChBD-antikoru (New England, Biolabs) içeren solüsyonuna alınmış ve 1 gece 4°C'de 100 rpm'de çalkalanmıştır. Bir gece sonunda spesifik olmayan bağlantıların uzaklaştırılması için membran TBST tamponu ile 3 kez yıkanmıştır. Daha sonra membran yine TBST tamponu ile 1/10000 oranında seyretilmiş antijeni (Anti-rabbit-IgG AP-konjuge, Promega) içeren solüsyona alınmış ve 1 saat 100 devirde çalkanarak inkübe edilmiştir. Takiben II.

antikorun uzaklaştırılması amacıyla membran tekrar 3 kez yıkanmış ve son aşamada membranın üzerine 10 ml substrat (Western-Blue, Promega) konularak renk değişimi ile füzyon proteinlerin membran üzerindeki yeri tespit edilmiştir.

### 3.3.2 ELISA

Çalışmada, ChBD/PrtP ve ChBD/AcmA füzyon proteinlerinin rekombinant hücrelerin yüzeyindeki ifadesi AVAL-JAASKELAİNEN vd., (2002) tarafından belirtilen hücre yüzeyi-ELISA tekniği ile araştırılmıştır. Yöntemde ilgili plazmidleri içeren rekombinant ve kontrol suşları %0,5 glikoz içeren M17 ortamlarında 30°C'de 12 saat geliştirilmiştir. Takiben elde edilen kültürden aynı besiyerlerine %2 aşıl原因arak, 30°C'de OD<sub>600</sub> 0,9-1,0 olana kadar tekrar çoğaltılmış ve takiben 1 ml hacimdeki hücreler 15000 g değerinde 10 dakika santrifügasyon ile toplanmıştır. Elde edilen pellet PBS (pH 7,4) ile 3 kez yıkanmıştır. Yıkanan hücreler 1/5000 oranında seyretme edilmiş tavşan spesifik ChBD-antikoru (New England Biolabs) ile muamele edilmiştir. Antikor uygulamasından sonra hücreler PBS tamponunda 3 kez yıkanmıştır. Takiben hücrelerin üzerine 1/10000 oranında seyretme edilmiş antijen (anti-rabbit-IgG AP-konjugant, Promega) ilave edilerek birinci antikor ile etkileşim sağlanmıştır. Bu aşamadan sonra hücreler 3 kez tekrar yıkanmıştır. Son aşamada hücreler ikinin katı düzeninde seyretme edilerek substrat (Western Blue, (Promega) ile karşılaştırılmıştır. Hücreler 37°C'de 1 gece bekletilerek, renk değişimine göre değerlendirilmiştir.

### 3.4 Nisin üreticisi *L. lactis* ve Rekombinant Suşların Kitine Bağlanması ve Bağlanma Oranlarının Tespiti

Kontrol ve rekombinant suşların kitin taneciklerine bağlanma oranlarının tespiti için WANG ve CHAO, (2006) tarafından belirtilen yöntem kullanıldı. Buna göre söz konusu suşlar %0,5 glikoz içeren M17 ortamında 1 gece geliştirildikten sonra, taze besiyerine %10 inoküle edilerek 4 saat ikinci bir inkübasyon yapıldı. Daha sonra hücreler 5000 g'de santrifüjlenerek toplandı ve üst faz tamamen uzaklaştırıldı. Takiben pelletler bağlama tamponu (20 mM sodyum fosfat, pH 7,0) ile iki kez yıkandı. Yıkanan hücreler farklı yoğunlukta (OD<sub>600</sub> 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8) olacak şekilde sodyum fosfat tamponuyla ayarlandı. 10 ml olarak hazırlanan bu hücre çözeltileri takiben 1 g kitin parçacıkları ile karıştırıldı. Bu karışım daha sonra 200 devirde çalkalanarak 4°C'de 24 saat tutuldu. Süre sonunda kitin parçacıklarının çökmesi beklendikten (10 dk) sonra, tampon içerisindeki hücre yoğunluğu

spektrofotometrede 600 nm'de tespit edildi. Bağlanan hücre yoğunluğu aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı.

$$\% \text{ Bağlanma Değeri} = \frac{\text{İlk okunan OD}_{600} - \text{Son okunan OD}_{600}}{\text{Son okunan OD}_{600}} \times 100$$

### **3.5 Vakum Taramalı Elektron Mikroskobu Analizi**

Rekombinant hücrelerinin kitin yüzeyine olan spesifik bağlanmasının ve bağlanma yoğunluğunun gösterilmesi amacıyla kitine tutundurulmuş hücreler, WANG ve CHAO, (2006) tarafından uygulanan yöntem esas alınarak, vakum taramalı elektron mikroskobu ile incelenmiştir. Bunun için rekombinant ve kontrol suşları Kısım 3.4'de olduğu gibi kitine bağlanmış, takiben spesifik bağlanmayan hücrelerin uzaklaştırılması amacıyla 3 kez iyice yıkanmıştır. Bu aşamadan sonra kitin tanecikleri liyofilize edilerek (Thermo, Modulyo) tamamen kurutulmuştur. Elektron mikroskobu ile görüntülemeye 15 kV vakum uygulanmış ve x200 ve x5000 olmak üzere iki farklı büyütme kullanılmıştır.

### **3.6 Kitine Bağlanmış Hücrelerin Nisin Üretim Oranlarının Belirlenmesi**

Nisin üretim çalışmalarında, kitine optimum koşullarda bağlanmış rekombinant hücrelerle birlikte kitine spesifik bağlanmayan kontrol suşları da kullanılmıştır. Rekombinant ve kontrol suşlarla bağlanmış 1 g kitin tanecikleri 10 ml M17G sıvı besiyerine konulmuş ve 8 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kitin tanecikleri toplanmış ve yeniden taze M17G sıvı besiyeri ilave edilmiştir. Her bir hücre için bu şekilde 3 pasaj gerçekleştirilmiştir. 8 saatlik inkübasyon sonunda alınan örneklerde hücreler santrifügasyonla çöktürülmüş, üst sıvı 80 °C'de 15 dk sıcaklıkla muamele edilmiştir.

İnkübasyondan sonra elde edilen üst sıvıdaki nisin miktarının belirlenmesi için TOLONEN vd., (2004) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. Buna göre öncelikle her bir hücreye ait kültür üst sıvı 2<sup>10</sup> kat seyretme edilmiştir. Daha sonra her bir dilüsyondan, daha önce *Micrococcus luteus* NCBI ile inoküle edilmiş agar yüzeyine 5 µL damlatılmıştır. Hazırlanan petri plakları 37°C'de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda damlatma yapılan alanlarda oluşan zon çapları ölçülerek kaydedilmiştir. Diğer taraftan eşzamanlı olarak farklı derişimdeki nisin standartlarından (1, 2, 4, 50 IU) da aynı agar üzerine damlatılmış ve

ayrı ayrı zon çapları ölçülmüştür. Örneklerdeki nisin derişimi; standart nisin solüsyonlarının agar üzerinde verdiği zon çaplarının derişime karşı çizilen eğri üzerinden hesaplanmıştır.

### **3.7 Nisin Üreticisi *L. lactis* ve Rekombinant Suşlarının Kitine bağlanması Üzerine Çevresel Faktörlerin Etkisinin Belirlenmesi**

Çevresel faktörlerin bağlanma üzerine etkisini belirlemek için test edilen mikroorganizmaların kitine bağlanması işleminde 4-40°C ile 3-8 pH arası değerler ve Tween 20, Triton X-100 gibi yüzey aktif madde ile 5-100 mM sodyum fosfat derişim değerleri kullanılmıştır.

Hücrelerde ifade edilen KBD'lerin kitine bağlanma üzerine sıcaklığın etkisi için, Kısım 3.4'de anlatıldığı şekilde hazırlanan hücreler ayrı ayrı 4, 22 ve 40°C'lerde 1 gece bekletilmiştir. Ayrıca pH'nın etkisinin araştırılması için ise sodyum fosfat tamponunun pH'sı 3, 5, 7 ve 8 değerlerine ayarlanmış ve hücreler 4°C'de 1 gece tutulmuştur. Sodyum fosfat derişiminin etkisi için ise 5, 20, 50 ve 100 mM sodyum fosfat derişimlerinde tamponlar hazırlanmıştır. Sodyum fosfatın etkisinin araştırılması amacıyla kontrol olarak su kullanılmıştır. Bağlanma üzerine yüzey aktif maddelerin etkisi için tampon ortamına %0,1 oranında Tween 80 ve Triton X-100 ilavesi edilmiştir. Her bir uygulamadan sonra hücre yoğunlukları ölçülerek Kısım 3.4'de verilen formül esasınca hesaplamalar yapılmıştır.

### **3.8 *L. lactis* Suşlarının Kitin İçeren Sürekli Nisin Fermentasyon Sisteminde (KİSNİFER) Nisin Üretimi ve Miktarının Belirlenmesi**

*L. lactis* N8 ve *L. lactis* PLAC2 ve PLAC7 suşlarının sürekli nisin üretimi; pH (WTW), sıcaklık ve havalandırma (WTW) kontrollü, besleme ve çıkışı bulunan fermentör sisteminde (Minifors, İsviçre) yürütüldü. Fermentasyona başlamadan önce rekombinant ve kontrol suşların kitine bağlanması gerçekleştirildi. Bunun için fermentör sisteminin tüm aparatları takılarak, iyice yıkanmış kitinin suyu süzöldükten sonra 200 gr tartılmış ve fermentöre konuldu. Daha sonra tüm sistem otoklavda steril edildi. Diğer taraftan kullanılacak *L. lactis* hücreleri de iki kez M17G ortamında pasajlandıktan sonra 200 ml taze besiyerine %10 aşlanarak 4 saat geliştirildi ve santrifüjasyonla hücre pelleti elde edildi. 2 L sodyum fosfat tamponunun hücre yoğunluğu 0,5'e (OD<sub>600</sub>) ayarlanarak fermentör sistemine daha önceden konulan kitinin üzerine alındı. Takiben, fermentörün soğutma sistemi açılarak, 200 devir karıştırma hızında 1 gece hücrelerin bağlanması gerçekleştirildi. Bu aşamadan sonra fermentörün çıkış pompası yardımıyla tampon uzaklaştırıldı ve üç fermentör hacmi (5 L)

sodyum fosfat tamponu geçirilerek kitin iyice yıkandı. Yıkama işlemine takiben %1 glikoz içeren 2 L M17 besleme pompası ile sisteme alınarak, 30°C'de sabit fermentasyon aşaması başlatıldı. Bu şekilde 3 saat tutulduktan sonra sistemin besleme ve çıkış pompaları açılarak sırasıyla 0,1, 0,3, 0,5, 0,7, 0,9 dilüsyon ( $h^{-1}$ ) hızlarında, 10-60  $g L^{-1}$  glikoz kullanılarak sistem çalıştırıldı. Her bir çalışma parametresinde üç fermentasyon hacminin (5 L) geçmesi sağlandıktan sonra fermentör çıkışından biyokütle ve nisin üretimi miktarlarını ölçmek için 1 saatlik arayla 50 mL 3 adet örnek alımı yapıldı.

### **3.8.1 Nisin üretim miktarının tespiti**

Nisin üretim miktarının tespiti için TRAMER ve FOWLER, (1964) tarafından önerilen yöntem kullanıldı. Fermentörden alınan örnekler 8000 g'de 5 dk santrifüj edilerek hücre çökeltisi ayrıldı. Üst sıvı yeni bir tüpe alınarak 80 °C'de 15 dk ısı uygulaması yapıldı ve pH'sı 2,5 olan ve % 0,1 oranında tween 80 içeren çözeltilerde  $2^{-10}$  oranına kadar seyreltildi. Nisin aktivitesinin belirlenmesi için aktif *M. luteus* hücreleri 5 mL LB yumuşak agar ortamına inoküle edildi ve LB agar alt tabaka yüzeyine yayıldı. Üzerine her bir örnek dilüsyonundan 5  $\mu L$  (2 paralel) damlatıldı. Aktivite tayininde nisaplin (Sigma) kullanılarak 1-50 IU  $mL^{-1}$  derişimde şahit çözeltiler hazırlandı. 37 °C'de 1 gece inkübasyon sonucunda standart nisin eğrisi kullanılarak kültür üst sıvısındaki nisin miktarı hesaplandı.

### **3.8.2 Biyokütle miktarının tespiti**

Fermentasyonun belirli zaman aralıklarında, fermentörden alınan örneklerin hücre yoğunluğu aynı besiyeri kullanılarak seyreltme yapıldıktan sonra, spektrofotometrede (PC Instruments) 600 nm dalga boyunda tespit edildi. Optik yoğunluk ve biyokütle eşitliğinin belirlenmesi için, farklı optik yoğunluğa sahip hücre kültürleri 10000 g'de santrifüj edildi ve 2 kez PBS tamponunda yıkandı. Elde edilen hücre çökeltileri 70 °C sıcaklıkta, hücre kuru ağırlıkları sabit bir değere ulaşincaya kadar kurutuldu. Optik yoğunluk ve hücre kuru ağırlığı eşitliği için standart eğri oluşturuldu ve eğrinin denklemi elde edildi. Bu denklem kullanılarak, optik yoğunluk değerlerinden örneklerin hücre kuru ağırlığı hesaplandı.

### **3.8.3 Glikoz tüketim miktarının tespiti**

Sürekli sistemde rekombinant hücreler tarafından kullanılan glikoz miktarının tespiti glikoz ölçüm kiti (Biovision, USA) kullanılarak belirlenmiştir. Buna göre örnekler kit solüsyonu ile

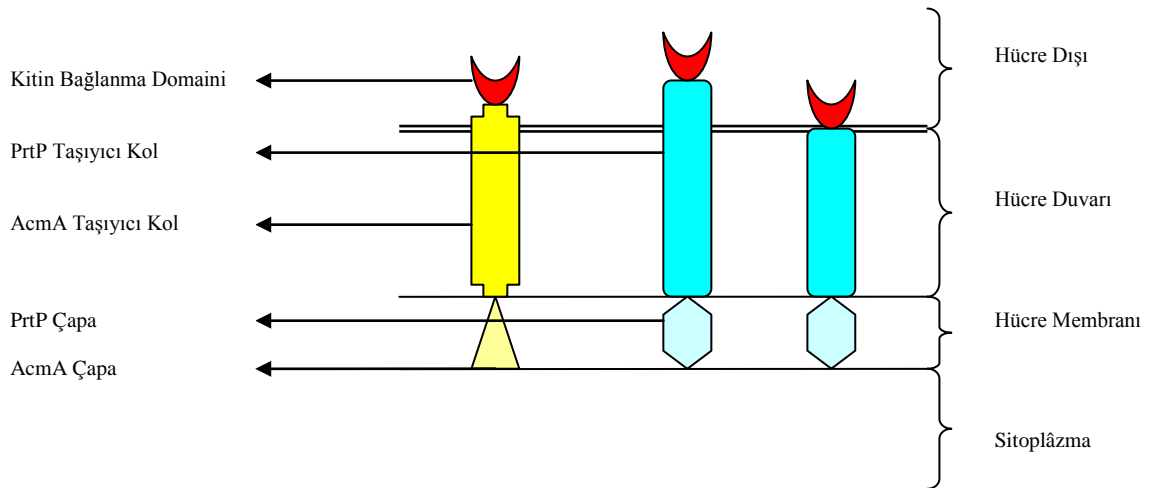


seyreltikten sonra, kit protokolü uygulanarak ATP ölçüm esasına göre spektrofotometre'de belirlenmiştir.

#### 4. BULGULAR ve TARTIŞMA

##### 4.1 KBD'inin Nisin Üreticisi *L. lactis* Suşlarına Klonlanması

Projede nisin üreticisi suşların destek materyallerine tutunma yeteneklerinin geliştirilmesi için doğada yaygın bulunan ve yapı materyali olan kitine spesifik affinite gösteren kitinaz A1 enzimine ait KBD'inin DNA bölgesi klonlanmış, nisin üreticisi suşlarda ifadesi sağlanmıştır. Birçok çalışmada uygulanan (AVAL-JAASKELAİNEN vd., 2002, AVAL-JAASKELAİNEN vd., 2003, BOSNA vd., 2006; WANG vd., 2006) gibi farklı türlere ait proteinlerin *L. lactis* hücrelerinin yüzeyinde başarılı bir şekilde ifade edildiği “Yüzey İfade Sistemi”, KBD'inin bu suşlara klonlanmasında temel strateji olarak seçilmiştir. Söz konusu sistemlerde olduğu gibi KBD'inin *L. lactis* hücrelerin yüzeyine yerleştirmek için füzyon proteini oluşturulmuştur. Bu füzyon proteinin N-terminal ucunda bir sinyal peptidi ve KBD'i, C-terminalinde ise füzyon proteinin üzerine yerleştirildiği bir taşıyıcı kol peptidi ve KBD'inin taşıyıcı kol peptidi aracılığıyla membrana tutundurulduğu çapa peptidleri yer almıştır (Şekil 4.1). Böylece nisin üreticisi hücrelerinin kitin yüzeyine en optimum etkinlikte bağlanması sağlanmıştır.

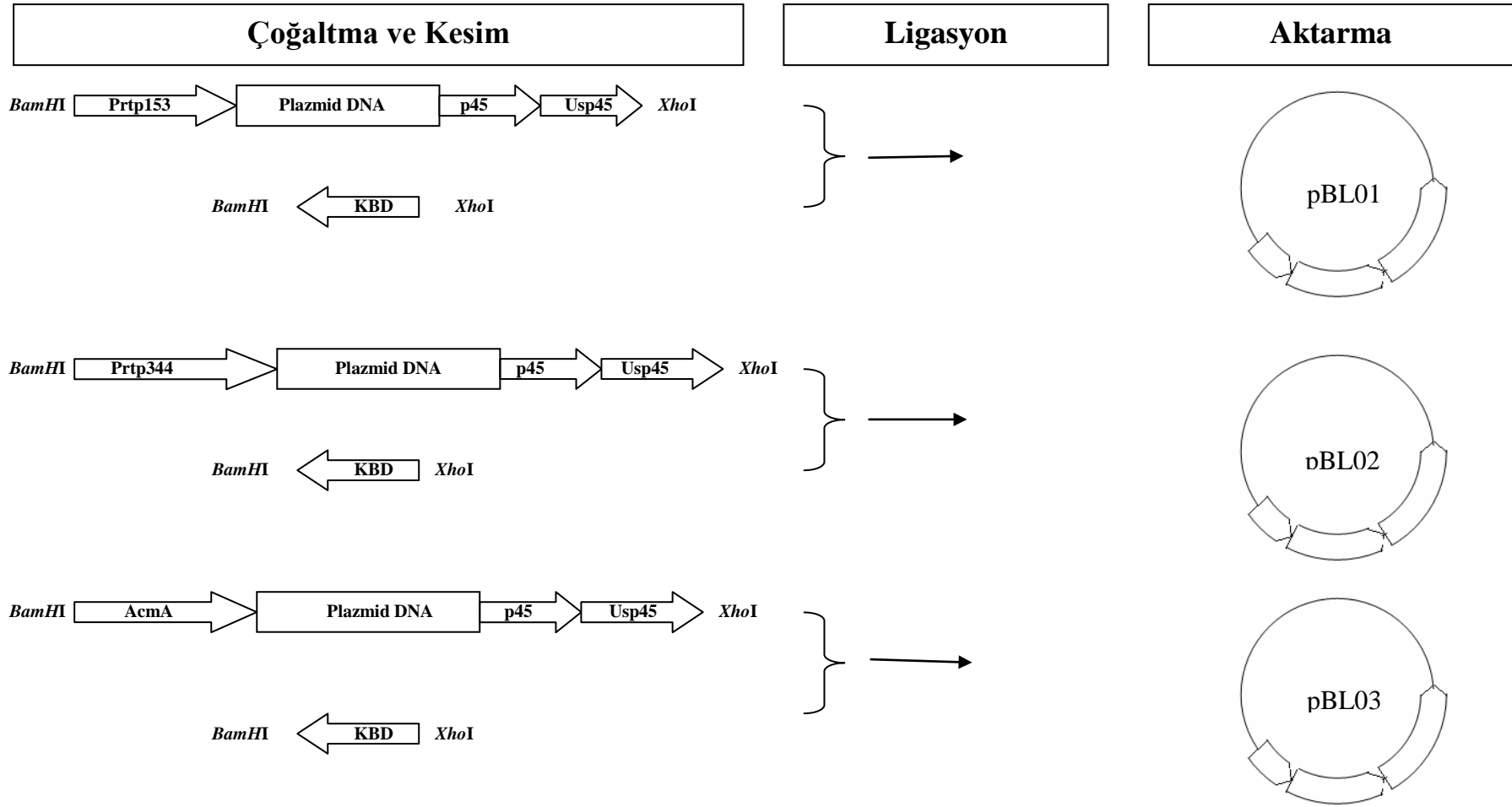


Şekil 4.1 KBD'inin hücre yüzeyindeki yerleşiminin kuramsal modeli

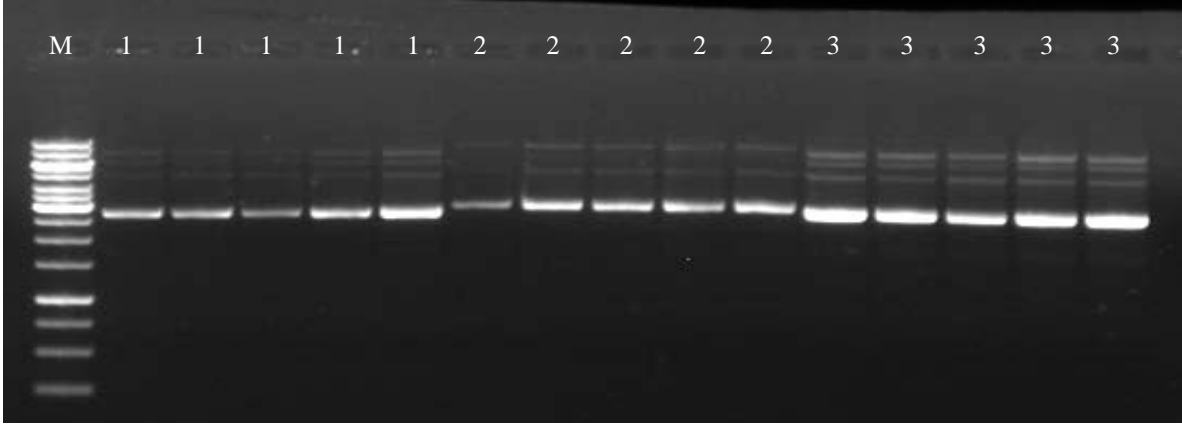
Şekil 4.1’de verilen kuramsal model düzeninde KBD’inin hücre yüzeyinde yer alabilmesi, söz konusu parçaların DNA dizilerinin belirli okuma çerçevesi düzeninde bulunması ile mümkün olmuştur. Bu okuma çerçevesi içerisinde sırasıyla; p45 promotorunun kodlama serisi, Usp45, Ribozom Bağlanma Bölgesi (RBS) ve sinyal serisinin “Başla” kodunu, 9 aminoasit LEISSTCDA peptidini kodlayan DNA dizisi, Kitin bağlanma Domaini, PrtP veya AcmA DNA serileri yer almıştır.

KYLA-NİKKİLA vd., (2010) tarafından *L. lactis* MG1363 suşunun suşlarının selüloza tutunması sağlanması için Selüloz Bağlanma Domainini içeren 3 farklı plazmid oluşturulmuştur. Bu plazmidlerin iki adedinin organizasyonunda p45 promotrunun alt akış yönünde ve okuma çerçevesi düzeninde *usp45* sinyal serisi, Selüloz Bağlanma Domaini ve iki farklı uzunlukta PrtP taşıyıcı kol ve çapası yer almaktadır. Üçüncü plazmid ise diğerlerinden farklı olarak sadece PrtP yerine AcmA kol ve çapasını içermektedir. Dolayısıyla yukarıda sözü edilen KBD’inin, *L. lactis* hücrelerin yüzeyinde ifade edebilmek için bu araştırmacının ürettiği plasmidler önemli genetik vektör olarak kullanılmıştır. Buna göre, çalışmada kısaca Selüloz Bağlanma Domaini çıkarılıp yerine KBD’i yerleştirilmiştir.

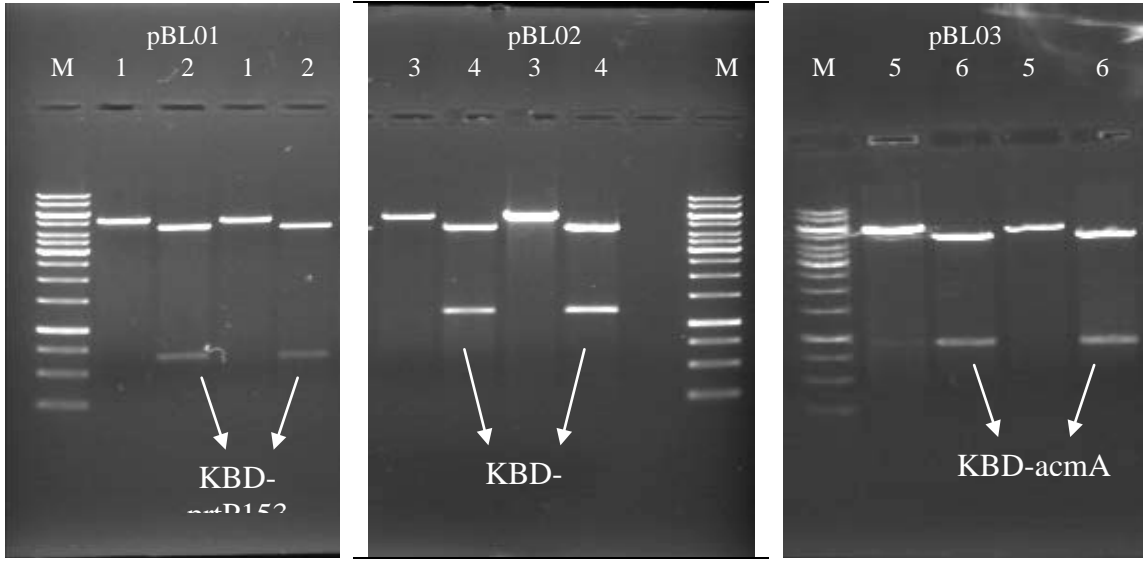
Bu strateji paralelinde, çalışmada PZR reaksiyonu yardımıyla ters yönlü Pusp45-R ve Pprtp344-F veya Pprtp153-F primer çiftleri ile çoğaltılan düzlemsel plazmid fragmentlerine, pCYB3 plazmidinden çoğaltılan KBD’inin fragmenti, *XhoI-BamHI* enzim kesim noktaları kullanılarak birleştirilmiş ve sonuç olarak sırasıyla pBL01, pBL02 ve pBL03 rekombinant plazmidleri oluşturulmuştur. Şekil 4.2’de gösterildiği gibi pBL01; *usp45-KBD-PrtP153*, pBL02; *usp45-KBD-PrtP344* ve pBL03; ise *usp45-KBD-Acma* düzenlemelerine sahiptir. Yeni oluşturulmuş plazmidlerin agaroz jel üzerindeki görüntüleri Şekil 4.3’te gösterilmiştir. Ayrıca çalışmada söz konusu bu düzenlemeler *XhoI* ve *ApaI* restriksiyon enzimleri kullanılarak yapılan kesim ile doğrulanmıştır. Şekil 4.3’te görülebildiği gibi rekombinant plazmidlerden 710 bç, 1280 bç, ve 1050 bç uzunluklarında sırasıyla KBD-prtP153, KBD-prtP344 ve KBD-acmA fragmentlerine tekabül eden üç farklı fragmentler meydana gelmiştir. Bu sonuç rekombinant plazmidlerin hedef fragmentleri içerdiğini ve doğru düzende olduklarını göstermiştir. Diğer taraftan bu çalışmayla hücreye ilave edilen yeni DNA dizisinde herhangi bir mutasyonun oluşmadığı da kısmen izlenmiştir.



Şekil 4.2 KBD'inin klonlanması ve yeni oluşturulmuş rekombinant plazmidlerin organizasyonu

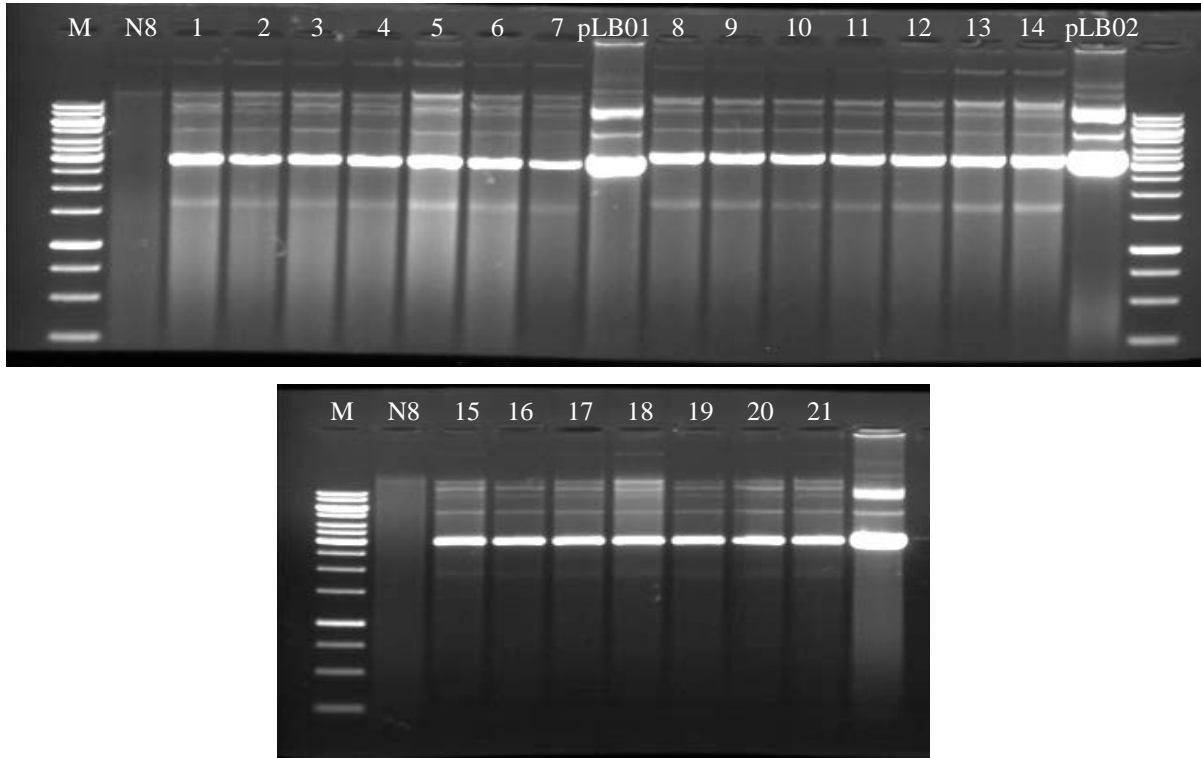


**Şekil 4.3** Rekombinant plazmidlerin agaroz jel üzerindeki görüntüsü. 1) pLB01, 2) pLB02, 3) pLB03.

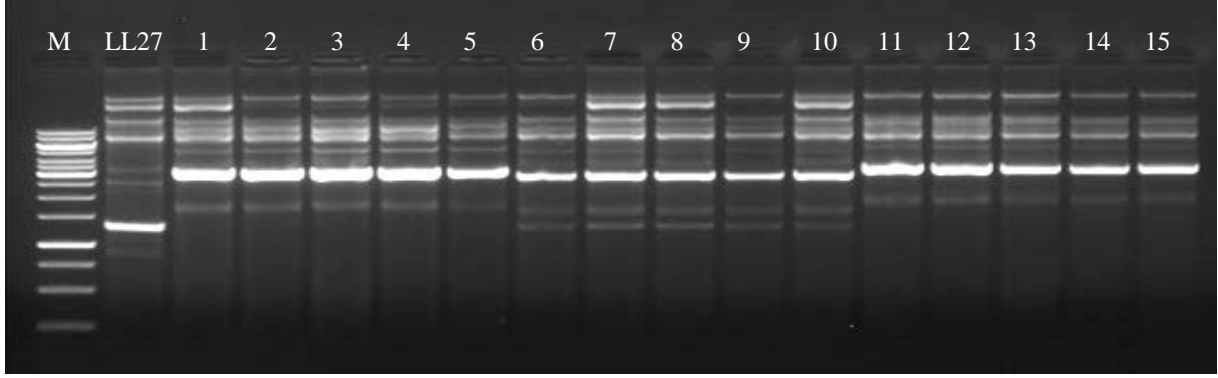


**Şekil 4.4** pBL01, pBL02 ve pBL03 plazmidlerinin *XhoI* ve *ApaI* kesimi. 1, 3, 5: *XhoI* kesimi, 2,4,6: *XhoI-ApaI* kesimi

Çalışmada üretilen rekombinant plazmidlerin doğru düzenlemeye sahip oldukları anlaşıldıktan sonra, söz konusu plazmidler nisin üreticisi *L. lactis* N8 ve LL27 suşlarına elektroporasyonla aktarılmıştır. *L. lactis* N8 suşuna pBL01, pBL02 ve pBL03 plazmidleri aktarılarak üretilen rekombinant suşlar sırasıyla *L. lactis* PLAC1, PLAC2, PLAC3, *L. lactis* LL27 suşuna yapılan aktarımdan sonra elde edilen suşlar ise *L. lactis* PLAC4, PLAC5, PLAC6 olarak isimlendirilmiştir. Şekil 4.5 ve 4.6'da sırasıyla *L. lactis* N8 ve LL27 suşlarının plazmid profili izlenmektedir. Yapılan incelemelerde nisin üreticisi N8 suşunun plazmid içermediği, aktarılan suşlarda ise her birinin referans plazmidini içerdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.5). Diğer taraftan LL27 suşunun farklı boyutlarda 7 adet plazmidini olduğu tespit edilirken, rekombinant suşlarının pBL01, pBL02 ve pBL03 plazmidlerine eş boyutta ilave plazmidleri içerdikleri belirlenmiştir. Bu sonuçlar nisin üreticisi suşlara KBD'yi taşıyan plazmidlerin başarıyla aktarıldığını ve söz konusu plazmidlerin kullanılan nisin üreticisi suşlarda replike olabildiğini göstermiştir.

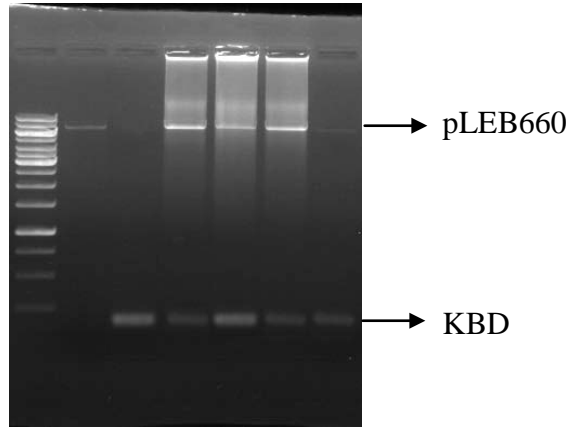


**Şekil 4.5** *L. lactis* N8 ve rekombinant suşlarının plazmid profilleri. 1-7: *L. lactis* PLAC1, 8-14: *L. lactis* PLAC2, 15-21: *L. lactis* PLAC3.



**Şekil 4.6** *L. lactis* LL27 ve rekombinant suşlarının plazmid profilleri. 1-5: *L. lactis* PLAC4, 6-10: *L. lactis* PLAC5, 11-15: *L. lactis* PLAC6, M: 1kb marker (Fermentas)

Diğer taraftan, çalışmada KBD'inin 800 aa uzunluğundaki PrtP kol ve çapası üzerine yerleştirilmesi de gerçekleştirilmiştir. Bunun için diğer çalışmalardan farklı olarak pLEB660 plazmidinden yararlanılmıştır. Çünkü söz konusu bu plazmidin organizasyonunda p45 promotörü altında *usp45* sinyal serisi ve takiben 800 aa uzunluğundaki PrtP kolu kodlayan DNA serisi bulunmaktadır. Ayrıca bu plazmidin, *usp45* sinyal ve *prtP* serilerinin arasında ve okuma çerçevesi düzeninde *NdeI* ve *XhoI* enzimlerinin kesim serileri bulunmaktadır. Dolayısıyla çalışmada KBD'i PZR yardımıyla pCYB3 plazmidinden çoğaltılmış ve takiben yukarıda ifade edilen enzim kesim noktalarından birleştirilmiştir. Böylece çalışmanın dördüncü plazmidini olan pBL04 elde edilmiştir. Oluşturulan bu plazmitte KBD'inin yerleşiminin doğrulunun belirlenmesi amacıyla *NheI* ve *XhoI* enzimiyle kesilmiştir. Şekil 4.7'den de izlendiği gibi kesim sonucunda KBD'inine karşılık gelen 200 bç uzunluğunda fragmentin varlığı tespit edilmiştir. Bu aşamadan sonra pBL04 plazmidini de hedef organizma olan *L. lactis* N8 ve *L. lactis* LL27 suşlarına daha önce ifade edildiği şekilde aktararak son rekombinant suşlar (*L. lactis* PLAC7 ve PLAC8) üretilmiştir.

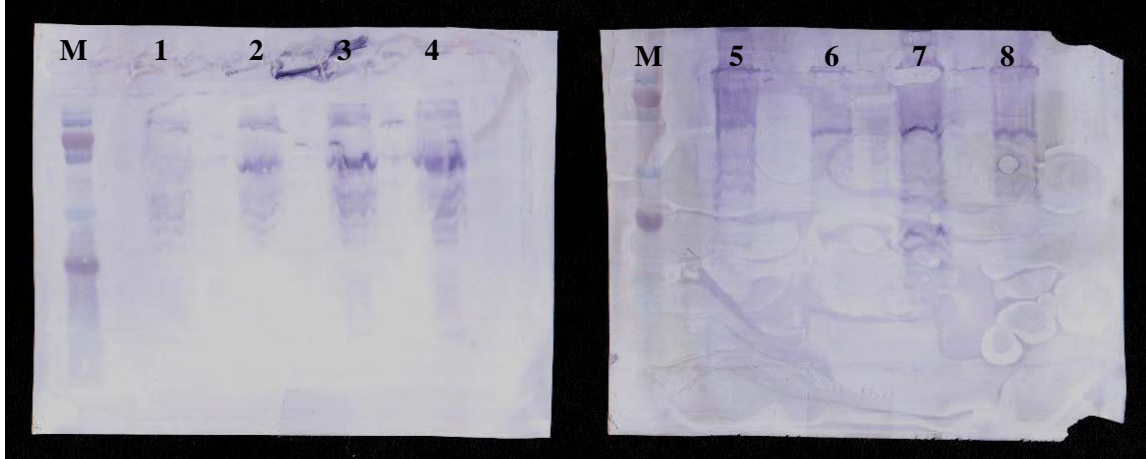


**Şekil 4.7** pBL04 plazmidinin *NheI* ve *XhoI* ile kesimi. M) 1 kb marker, 1) pLEB660, 2) KBD, 3-6) İzole edilmiş rekombinant plazmidler.

#### 4.2 Nisin Üreticisi *L. lactis* Suşlarında Füzyon Proteinlerinin İfadesi ve Bu Hücrelerin Kitine Bağlanmadaki Özgüllüğü

*L. lactis* PLAC1, PLAC2, PLAC3, PLAC4, PLAC5 ve PLAC6 suşlarının içerdiği pBL01, pBL02, pBL03 ve pBL04 plazmidleri üzerinde kodlanan KBD-prtP ve KBD-acmA füzyon proteinlerinin ifadesi araştırılmıştır. Buna göre yapılan çalışmada kontrol suşlar olan *L. lactis* N8 ve LL27'ye kıyasla tüm rekombinant suşların hücre lizatlarının kullanılması durumunda membran üzerinde 30 kda'luk bölgede sinyal verdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.8).

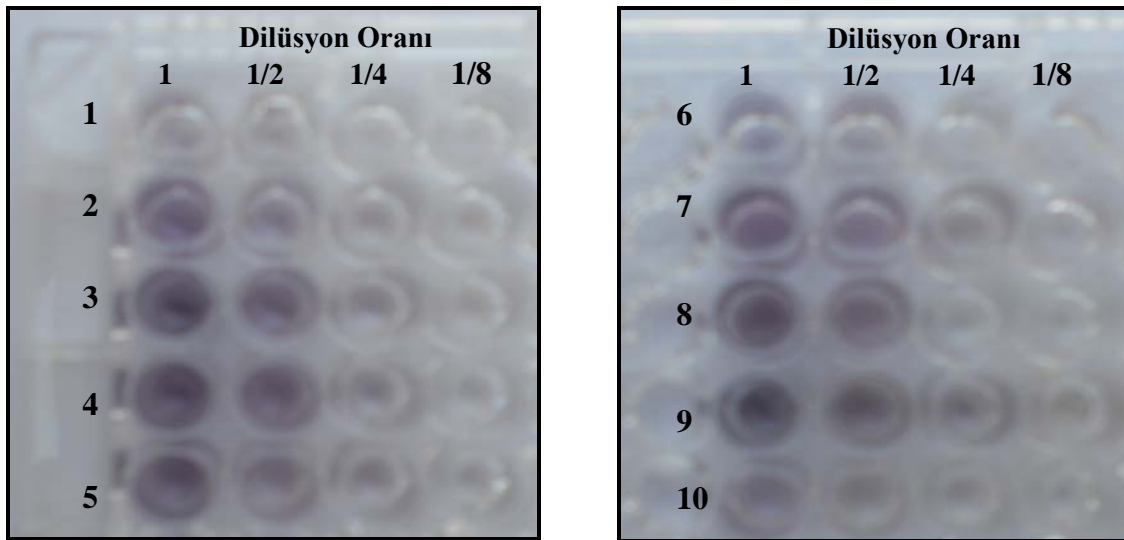
Bu sonuç pBL01, pBL02 ve pBL03 plazmidleri tarafından kodlanan, KBD-prtP153, KBD-prtP344 ve KBD-acmA füzyon proteinlerinin nisin üreticisi rekombinant suşlarda (*L. lactis* PLAC1, PLAC2, PLAC3, PLAC4, PLAC5 ve PLAC6) üretildiğini göstermiştir. Ancak çalışmada KBD'ine farklı uzunlukta PrtP (153 ve 344 aa) ve AcmA (244 aa) kolları eklenerek farklı uzunluğa sahip füzyon proteinleri elde edilmeye çalışmasına rağmen, Western-Blot analizinde alınan sinyalin eşit büyüklükteki proteine işaret etmiştir. Bu durum hücre lizatlarının elde edilmesi esnasında açığa çıkan enzimlerin (özellikle proteazların) füzyon proteinlerinin parçalamasının bir sonucu olabileceği tahmin edilmektedir.



**Şekil 4.8** Kontrol ve rekombinant *L. lactis* hücrelerinden elde edilen hücresel proteinlerin Western-Blot analizi. M) Protein marker (Prestained, Fermentas), 1) *L. lactis* N8, 2) *L. lactis* PLAC1, 3) *L. lactis* PLAC2, 4) *L. lactis* PLAC3, 5) *L. lactis* LL27, 6) *L. lactis* PLAC4, 7) *L. lactis* PLAC5, 8) *L. lactis* PLAC6

Yapılan western-blot analizi ile rekombinant hücreler tarafından üretilen füzyon proteinlerin ifadesinin net anlaşılabilmesi, çalışmada yeni bir yöntemin kullanılmasını gerektirmiştir. Bu nedenle söz konusu proteinlerin hücre üzerinde izlenmesine olanak sağlayan ELISA yöntemi kullanılmıştır. Özellikle çalışmada KBD'ini taşıyan füzyon proteinlerinin nisin üreticisi hücrelerin duvarına yerleştirilmesi, bu yöntemin kullanılmasını ön plana çıkartmıştır.

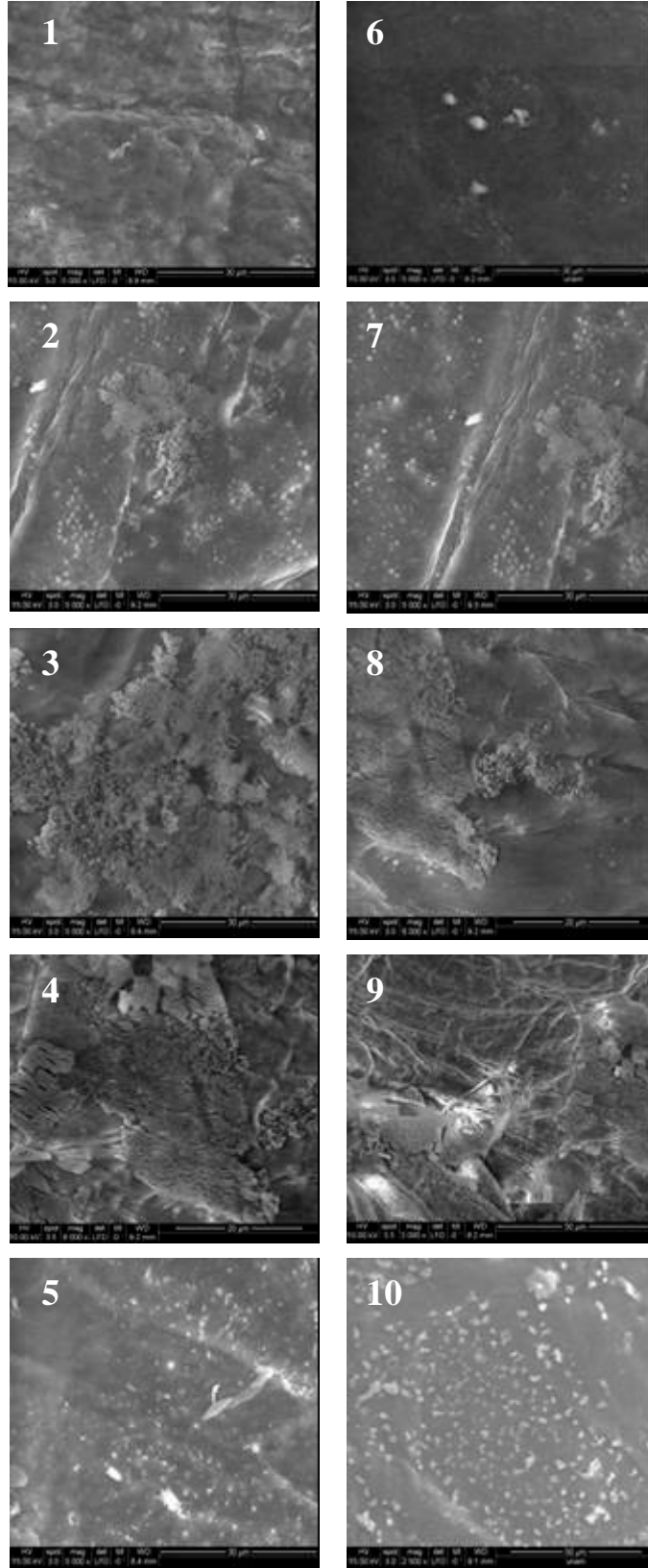
KBD'inin antikoru ile muamelesi ile elde edilen rekombinant ve kontrol suşlarının ELISA görüntüleri Şekil 4.9'da gösterilmiştir. Çalışma sonuçlarına göre, KBD'i 344 ve 800 aa uzunluğundaki PrtP kol ve çapaları ile ifade eden rekombinant nisin üreticisi *L. lactis* hücreleri (*L. lactis* PLAC2, PLAC7, PLAC5 ve PLAC8) 2<sup>2</sup> kat seyretme edilmesine rağmen, kontrol (*L. lactis* N8 ve LL27) ve diğer rekombinant suşlara (*L. lactis* PLAC1, PLAC3, PLAC4 ve PLAC6) kıyasla daha yoğun renk derişimi vermiştir. Ayrıca KBD'inin 800 aa uzunluğundaki PrtP kol ile ifade edilen nisin üreticileri de 344 aa uzunluğunda PrtP kol içeren diğer hücelere kıyasla daha yoğun renk derişimine sahip bulunmuştur. Bu ELISA sonuçları, füzyon proteinlerinin rekombinant hücelerde ifade edilebildiğini başarılı bir şekilde göstermiştir. Diğer taraftan, PrtP kol uzunluğunun artışı ile hücre yüzeyinde KBD'inin daha fazla yer alabildiği de açıkça görülmüştür.



**Şekil 4.9** Kontrol ve rekombinant nisin üreticisi *L. lactis* suşlarının farklı derişimlerinin ELISA görüntüsü. 1) *L. lactis* N8, 2) *L. lactis* PLAC1, 3) *L. lactis* PLAC2, 4) *L. lactis* PLAC7, 5) *L. lactis* PLAC3, 6) *L. lactis* LL27, 7) *L. lactis* PLAC4, 8) *L. lactis* PLAC5, 9) *L. lactis* PLAC8 10) *L. lactis* PLAC6



Çalışmada rekombinant suşlarda füzyon proteinlerinin ifadesi gösterildikten sonra, bu hücrelerin kitin taneciklerine bağlanmalarının özgülüğü taramalı elektron mikroskobu ile izlenmiştir. Şekil 4.10'da kitin tanecikleri üzerinde kontrol ve rekombinant hücrelerin yoğunluğu görülmektedir. Söz konusu resimlerden anlaşıldığı gibi, *L. lactis* PLAC7 ve PLAC8 hücrelerinin kontrol ve diğer rekombinant suşlara kıyasla daha fazla bağlandığı anlaşılmaktadır. Bu durum özellikle 800 aa uzunluğunda PrtP kol ile ifade edilen KBD'inin kitin üzerine bağlanmada daha etkili pozisyonda olduğu sonucunu ortaya çıkarmıştır. Ayrıca hücre yüzeyinde KBD'inin ifade edilmesinde hücre duvarını kat eden kolun uzunluğunun önemli olduğu anlaşılmıştır. Çünkü PrtP kol uzunluğunun artışı ile birlikte bağlanmadaki etkinlik artış göstermiştir. Çeşitli literatür verilerine göre de *L. lactis* suşlarında heterolog bir proteinin hücre yüzeyinde ifadesinde kullanılan çapa önemli bulunmuştur. Örneğin yapılan bir çalışmada hücre sitoplazmik membranından, hücre duvarının dışına kadar minimum uzunluğun en az 90-100 aa olması gerektiği ifade edilmiştir (FİSCHETTI vd., 1990; STRAUSS ve GÖTZ, 1996). Başka bir çalışmada ise laktik asit bakterilerinde hücre yüzeyinde antikor veya antijenlerin bulundurulması için en az 117 aa ihtiyaç olduğu belirlenmiştir (MAASSEN vd., 1999; KRÜGER vd., 2002). Ancak bu uzunluğun 244 aa çıkarılması durumunda etkinliğin daha izlenebilir duruma geldiği görülmüştür. LİNDHOLM vd., (2004) ise *L. lactis* hücre yüzeyinde *E. coli*'ye ait fimbria proteininin ifadesinde en iyi sonucun 516 aa uzunluğundaki PrtP kolun kullanılması durumunda ulaşılmıştır. Benzer şekilde KYLA-NİKKİLA vd., (2010) yaptıkları çalışmada *L. lactis* MG1363 hücrelerin yüzeyinde ifade edilen Selüloz Bağlanma Domainin PrtP kol uzunluğunun artışı ile (153 aa'ten 344 aa'e) birlikte bağlanmadaki etkinliğinin geliştiğini rapor etmiştir. Proje kapsamında alınan sonuçlar ile literatür verileri değerlendirildiğinde; proteinlerin hücre yüzeyinde ifade edilmesinde yeterli uzunlukta kol kullanılması gerektiği açıktır. Bizim çalışmamızda ise nisin üreticisi *L. lactis* suşlarında 344 aminoasit uzunluğunda PrtP kolun yeterli olduğu görülmüştür. Lakin elektron mikroskobu görüntüleri dikkatle incelendiğinde KBD'ini uzun kol ile birlikte ifade eden *L. lactis* hücrelerin yığınlar halinde bağlanma yaptıkları izlenmektedir. Dolayısıyla bu sonuç muhtemelen uzun PrtP kol ile birlikte birim alandaki *L. lactis* hücre sayısında artış ile sağlamıştır.

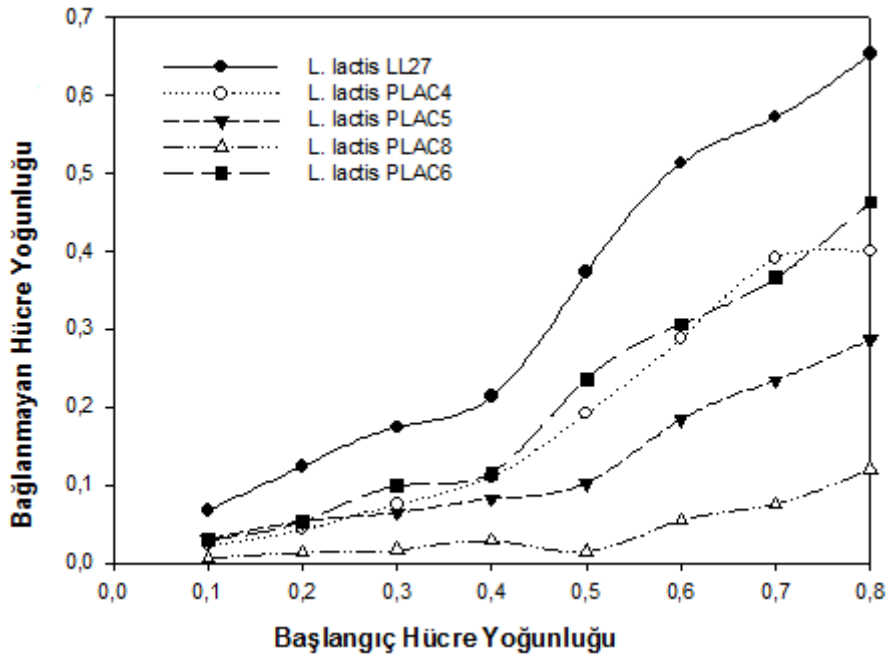
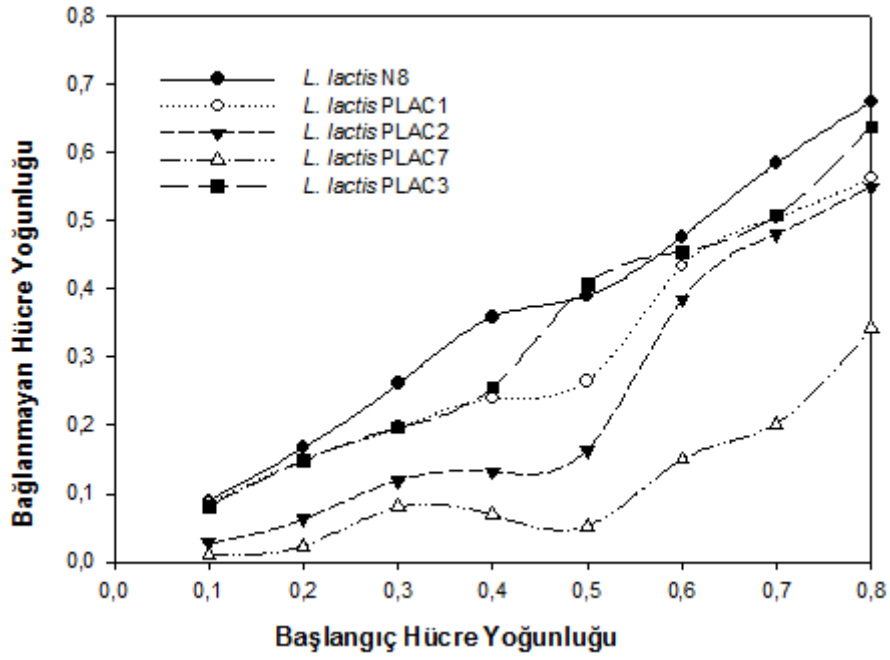


**Şekil 4.10** Kitin taneciklerine bağlanmış nisin üreticisi *L. lactis* ve rekombinant hücrelerinin taramalı elektron mikroskobu görüntüleri. 1) *L. lactis* N8, 2) *L. lactis* PLAC1, 3) *L. lactis* PLAC2, 4) *L. lactis* PLAC7, 5) *L. lactis* PLAC3, 6) *L. lactis* LL27, 7) *L. lactis* PLAC4, 8) *L. lactis* PLAC5, 9) *L. lactis* PLAC8 10) *L. lactis* PLAC6

### 4.3 Nisin Üreticisi *L. lactis* ve Rekombinant Suşlarının Kitine Bağlanma Yoğunluğu ve Oranı

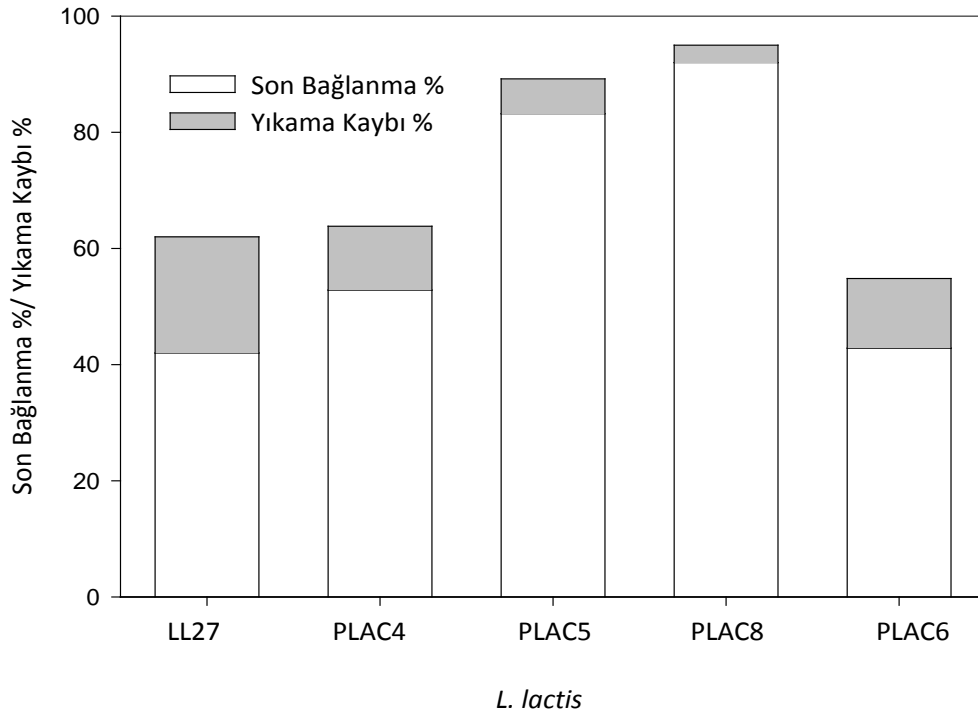
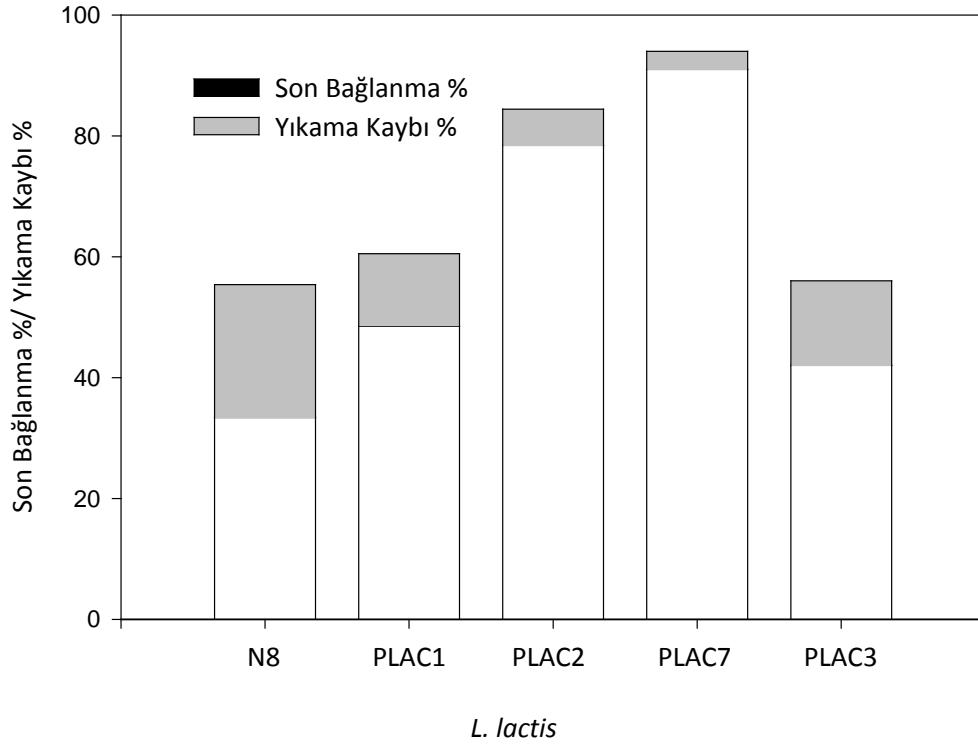
Çalışmanın bu kısmında, birim kitin kütlesine bağlanabilen nisin üreticisi *L. lactis* ve rekombinant suşlarının yoğunluğu tespit edilmiştir. Bu doğrultuda 1 g kitin yüzeyi farklı yoğunluktaki kontrol ve rekombinant hücrelerle karşılaştırılmıştır. Böylece gram kitin yüzeyine bağlanabilen hücre yoğunluğu belirlenmiştir. Bunun için, bağlama işleminden sonra elde edilen hücre yoğunluğu, başlangıç hücre yoğunluğuna oranlanmıştır. Bu şekilde kitin yüzeyinde oluşan doyma noktası tespit edilmiştir.

Yapılan çalışmada nisin üreticisi *L. lactis* N8 ve LL27 suşların kullanılan başlangıç hücre yoğunluğunun artışına paralel olarak, 1 g'lık kitin yüzeyine bağlanmayan hücre yoğunluğunun da doğrusal artış gösterdiği belirlenmiştir. Rekombinant hücreler arasında, KBD'inin 153 aa uzunluğundaki PrtP ve AcmA kolları üzerinde ifade edildiği hücrelerde de bağlanmayan hücre yoğunluğunun kısmen doğrusal artış içinde olduğu saptanmıştır. Ancak bu suşların aksine KBD'inin 344 ve 800 aa uzunluğundaki üzerinde PrtP kolu üzerinde ifade edilen rekombinant hücrelerde bağlanmayan hücre yoğunluğunun düşük oranda ve yatay bir seyirde devam etmiş, 0,5'den sonra bağlanmayan hücre yoğunluğunun artış gösterdiği gözlenmiştir (Şekil 4.11). Bu sonuçlar, 1 g kitin kütlesi için kullanılacak optimum hücre yoğunluğunun 0,5 olduğuna işaret etmiştir. Ayrıca KBD'inin 800 aa uzunluğundaki PrtP kolu üzerinde ifade eden hücreler (*L. lactis* PLAC7 ve *L. lactis* PLAC8) bağlanma açısından daha verimli bulunmuştur. Bu durum KBD'inin uzun kol ile hücre duvarından daha fazla uzanarak kitine bağlanmada etkili olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.11 1 g kitin kütlesine nisin üreticisi *L. lactis* ve rekombinant suşlarının bağlanma özgülüğü. Hücre yoğunluğu spektrofotometre’de 600 nm’de ölçülmüştür.

Şekil 4.12'de nisin üreticisi *L. lactis* ve rekombinant hücrelerinin kitine bağlanma oranları gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre, suşlar arasında en yüksek bağlanma *L. lactis* PLAC7 ve PLAC8 suşları tarafından gerçekleştirilmiştir (sırasıyla %91 ve 94). Bunları ise *L. lactis* PLAC2 ve PLAC5 suşları takip etmiştir (sırasıyla %78 ve 83). *L. lactis* PLAC7 ve PLAC8 suşlarında KBD'inin 800 aa PrtP kol ile ifade edilmesi, söz konusu hücrelerin duvarında ifade edilen KBD'inin kitinle daha fazla etkileşimde bulunmasına olanak sağlamaktadır. KBD'inin kitine olan bağlanma eğiliminin moleküler temeli hidrofobik etkileşime dayanmaktadır. KBD'inin doğrusal bölgesinde bulunan aromatik aminoasitlerin bu etkileşimde rolü büyüktür. Özellikle yapıda bulunan His<sup>681</sup>, Thr<sup>682</sup>, Trp<sup>687</sup>, Pro<sup>689</sup> ve Pro<sup>693</sup> aminoasitlerin KBD'inin kitine bağlanmasında etkili olduğu öne sürülmektedir (IKEGAMİ vd., 2000). Bu bilgiler dikkate alınarak bir değerlendirme yapıldığında hücre duvarından uzanmış KBD'inin kitinle etkileşme oranının arttığı şeklinde yorumlanabilir. Hücreler kitine tutundurulduktan sonra, ardışık 3 kez yıkanmış ve uzaklaşan hücre miktarları hesaplanmıştır. Yıkamayla uzaklaşan hücre miktarı yıkama kaybı olarak tanımlanmıştır. En düşük yıkama kayıpları bağlanmanın en fazla olduğu hücrelerde meydana gelmiştir. Dolayısıyla bu sonuç hücrelerin kitine bağlanmasının tamamen özgül bir bağlanma olduğunu, KBD içermeyen kontrol suşlarda olduğu gibi özgül olmayan bağlanma olmadığını açıkça göstermiştir.



**Şekil 4.12** Nisin üreticisi *L. lactis* ve rekombinant hücrelerinin kitine bağlanma ve yıkama kaybı oranları.

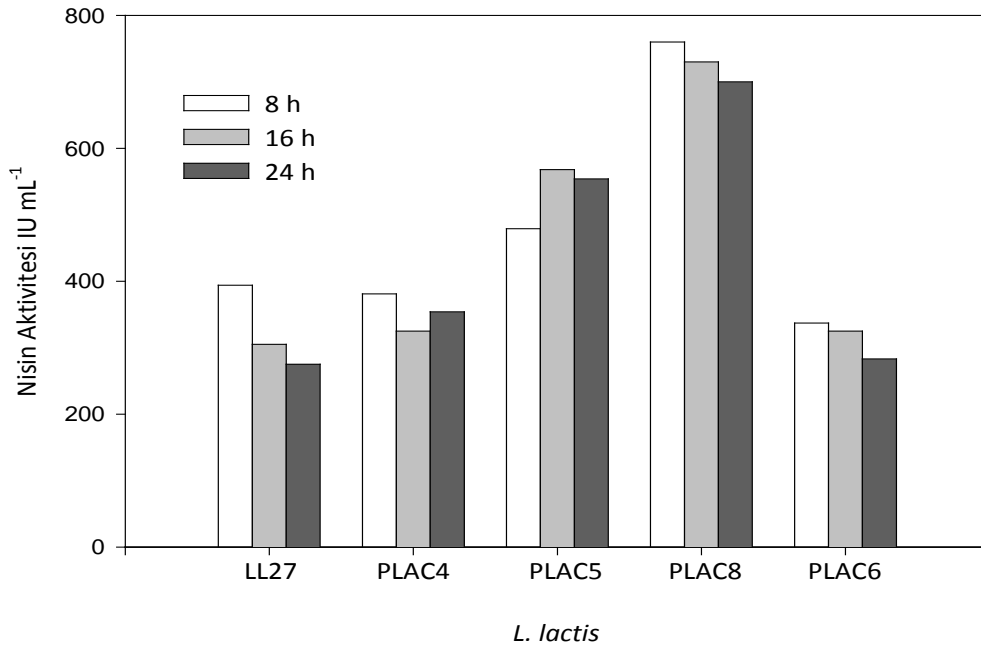
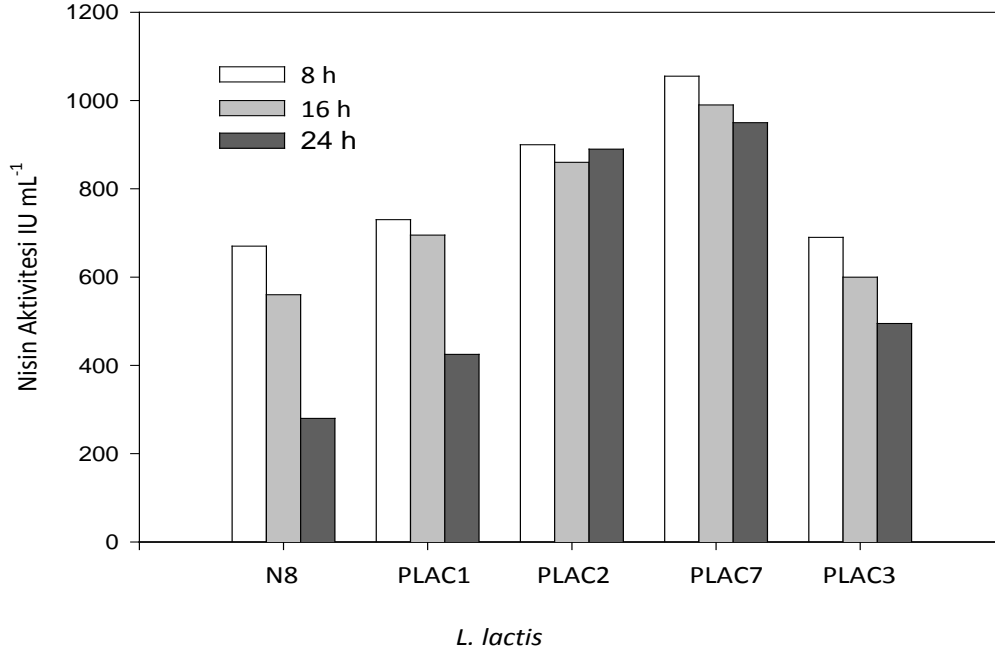
#### 4.4 Kitine Bağlanmış Nisin Üreticisi *L. lactis* ve Rekombinant Suşlarının Nisin Üretimi

Kitine bağlanmış nisin üreticisi *L. lactis* N8, LL27 ve rekombinant suşlarının nisin üretim miktarları Şekil 4.13'de gösterilmiştir. Söz konusu hücreler kitine bağlandıktan sonra, kitinle birlikte sıvı besiyeri ortamına (%0,5 glikoz içeren M17) alınmış ve 8 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kitin ortamdan uzaklaştırılarak yıkanmış ve yeni sıvı besiyerine alınarak inkübasyona devam edilmiştir. Bu şekilde üç ayrı 8 saatlik inkübasyon çevrimi uygulanmıştır. Her bir inkübasyon çevrimi sonunda üretilen nisin miktarının tespit edilmesi için örnek alınmıştır.

Her bir inkübasyon çevrimi sonunda en yüksek nisin üretimi, *L. lactis* PLAC7 ve PLAC8 suşlarının bağlandığı kitinin kullanılmasıyla elde edilmiştir. Bunları ise *L. lactis* PLAC2 ve PLAC5 suşları takip etmiştir. *L. lactis* PLAC1, PLAC3, PLAC4 ve PLAC6 suşlarının bağlandığı kitinlerin kullanılması durumunda, nisin üretiminin kontrol suşlarından farklı olmadığı belirlenmiştir. Ayrıca *L. lactis* PLAC7, PLAC8, PLAC2 ve PLAC5 suşlarının bağlandığı kitinlerin kullanıldığı her bir inkübasyon çevriminde nisin üretiminin hemen hemen eşit seviyede kaldığı, fakat kontrol (*L. lactis* N8 ve LL27) ve diğer rekombinant suşlarda (*L. lactis* PLAC1, PLAC3, PLAC4, PLAC6) üretimin giderek azaldığı belirlenmiştir. Bu durum *L. lactis* PLAC7, PLAC8, PLAC2 ve PLAC5 suşlarının kazandıkları kitine yüksek bağlanma yeteneklerinden dolayı fermentasyon sisteminde tutuklandığı, bunun sonucu olarak da yüksek nisin üretiminin devam ettiğini göstermektedir. Diğer yandan *L. lactis* N8 ve LL27 kontrol suşları ile *L. lactis* PLAC1, PLAC3, PLAC2 ve PLAC5 rekombinant suşlarında ilerleyen inkübasyon çevrimlerinde nisin aktivitesindeki belirgin düşüş, inkübasyon geçişlerinde ve de besiyeri ile yıkama sonucunda hücrelerin kaybedilmesinden kaynaklanmaktadır.

Elde edilen bu sonuçlar, KBD'inin özellikle uzun PrtP kol ve çapası üzerinde nisin üreticilerin duvarında ifade edilmesi durumunda fermentasyon sistemlerinde kullanılabilirlik açısından ciddi bir potansiyel taşımaktadır. Özellikle oldukça yüksek nisin üretim verimine ulaşılan çevrimsel fermentasyonların uygulanmasında (ŞİMŞEK ve SARİS, 2009), oluşturulan yeni suşların (*L. lactis* PLAC7 ve PLAC8) kolaylık sağlayacağı açıktır. Çünkü bu sistemlerin her bir çevriminde uygulanan hücrelerin toplanması gibi hem büyük ölçekte uygulaması

ekonomik olmayan hem de hücrelerin iyi nisin üretim fazına zarar veren işlemler için alternatif bir çözümdür.



**Şekil 4.13** Kitine bağlanmış nisin üreticisi *L. lactis* ve rekombinant suşlarının nisin üretim miktarı.



#### 4.5 Nisin üreticisi *L. lactis* ve Rekombinant Suşlarının Kitine Bağlanması Üzerine Çevresel Faktörlerin Etkisi

Nisin üreticisi *L. lactis* N8, LL27 ile rekombinant suşlarının kitinin yüzeyine bağlanması üzerine, farklı pH, sıcaklık, tampon derişimi ve yüzey aktif maddelerin etkisi araştırılmıştır. Bu kapsamda 3, 5, 7 ve 8 pH ile 4, 22 ve 40°C sıcaklıkta hücrelerin kitine bağlanma oranları belirlenmiştir. Ayrıca %0,1 oranında triton X-100 ve tween 20 ilavesinin ve bağlanma tamponundaki sodyum fosfat derişiminin (5, 20, 50 ve 100 mM) bağlanma üzerine etkisi araştırılmıştır. Nisin üreticisi *L. lactis* N8 ve rekombinant suşlarının kitin taneciklerine farklı koşullardaki bağlanma oranları Çizelge 4.1’de, *L. lactis* LL27 ve rekombinant suşlarınınki ise Çizelge 4.2’de gösterilmiştir.

Nisin üreticisi rekombinant suşlarının kitine bağlanma oranı pH artışına bağlı olarak yükselmiştir. Bu denemelerde, KBD’inin uzun PrtP kolun üzerinde ifade edilen rekombinant suşlarında (*L. lactis* PLAC2, PLAC7 ve PLAC5, PLAC8) en yüksek bağlanma gerçekteşmiş, diğer taraftan bu suşlarda KBD’inin pH değişimi ile bağlanma ilişkisi daha fazla anlaşılmıştır. Nitekim ortam pH’sının 3’ten 8’e çıkarılması durumunda *L. lactis* PLAC2 ve PLAC5 suşlarında sırasıyla %37,4 ve 27,4; *L. lactis* PLAC7 ve PLAC8 suşlarında ise %53,5 ve 43,5 bağlanma oranında artış gerçekteşmiştir. Fakat pH’nın 7’den 8’e yükselmesi durumunda suşların bağlanma oranlarında anlamlı bir farklılık oluşmamıştır. Bu sonuçlar KBD’inin nötr ve hafif alkali ortamlarda kitine bağlanma açısından daha etkili olduklarını göstermiştir. Çünkü *Bacillus circulans* WL-12 tarafından sentezlenen kitinaz A1 üzerinde gerçekteştirilen NMR çalışmalarında KBD’inin izoelektrik noktasının (pI) 9 olmasından dolayı bu değerlere yakın pH’larda bağlanma oranı artmaktadır (IKEGAMI vd., 2000).

Ortam sıcaklığının değiştirilmesi durumunda nisin üreticisi rekombinant suşların kitine bağlanma oranlarında büyük değişimler gözlenmemiştir (Çizelge 4.1 ve 4.2). Ancak kitine yüksek bağlanmanın gerçekteştiği hücreler (*L. lactis* PLAC2, PLAC7 ve PLAC5, PLAC8) dikkate alındığında 4°C’nin daha fazla olumlu sonuçlar verdiği saptanmıştır. Özellikle ortam sıcaklığının 40°C’ye çıkarılması durumunda, *L. lactis* PLAC2 ve PLAC7 suşlarının bağlanma oranlarında sırasıyla %7,2 ve 1,9, *L. lactis* PLAC5 ve PLAC8 suşlarında %7,2 ve 5,1 oranında düşüşler kaydedilmiştir.

Hücrelerin çözüldüğü tamponun sodyum fosfat derişimi rekombinant hücrelerdeki KBD'inin bağlanması üzerinde etkili olduğu görülmüştür. Nitekim çalışmada kontrol olarak saf suyun kullanılması durumunda KBD'inin ifade edilmediği kontrol suşlar *L. lactis* N8 ve LL27 ile rekombinant suşların bağlanma oranları eşit bulunmuştur. Ancak tampondaki sodyum fosfat derişimin artışına bağlı olarak özellikle *L. lactis* PLAC2, PLAC7 ve PLAC5, PLAC8 suşlarında önemli oranda artış meydana gelmiştir. Tampon derişiminin 100 mM'a çıkarılması durumunda, bu suşlarda bağlanma oranı yaklaşık 2 kat artmıştır. Bu sonuç sodyum fosfat derişiminin rekombinant hücrelerin kitin üzerine bağlanmasında etkili olduğuna işaret etmiştir. IKEGAMI vd., (2000) tarafından belirtilen fonksiyonel bölgenin aminoasit kompozisyonundan dolayı ortamda artan tuz derişimi ile KBD'inin bağlanmasının artış göstermesi bu sonucu desteklemiştir. Ayrıca ortamda tamponlayıcı bileşiklerin bulunması muhtemelen hücrelerin ozmotik dengesinin sağlanmasına katkıda bulunarak canlılığın ve dolayısıyla bağlanmanın stabilitesini artırmaktadır (WANG ve CHAO, 2006).

Rekombinant hücrelerin kitinin yüzeyine bağlanmasında yüzey geriliminin düşürülmesi amacıyla tween 20 ve triton X-100, %0,1 oranında ortama ilave edilmiştir. Her iki yüzey aktif maddenin kullanılması durumunda rekombinant suşların kitine bağlanma oranlarında önemli artış sağlanmıştır. *L. lactis* PLAC2 ve PLAC7 suşlarında triton X-100 uygulamasıyla sırasıyla %90,1 ve %96,3, tween 20 uygulamasıyla sırasıyla % 92,7 ve %97,7 bağlanma oranına ulaşılmıştır. Aynı şekilde *L. lactis* PLAC5 ve PLAC8 suşlarında ise triton X-100 uygulamasıyla %90,1 ve %97,4, tween 20 uygulamasıyla sırasıyla %92,7 ve %97,7 oranında bağlanma gerçekleşmiştir. Ancak kontrol (*L. lactis* N8 ve LL27) ve rekombinant *L. lactis* PLAC1, PLAC3, PLAC4 ve PLAC6 suşlarında önemli artış tespit edilememiştir. Kullanılan yüzey aktif maddelerin rekombinant *L. lactis* hücrelerinin kitine bağlanmadaki olumlu etkisinin nedeni hakkında yeterince bilgi bulunmamasına rağmen, bunların yüzey gerilimini azaltarak bağlamada fonksiyonel bölgelerin karşılaşmasında etkili olabileceği varsayımı öne sürülebilir.

**Çizelge 4.1** Nisin üreticisi *L. lactis* N8 ve rekombinant suşlarının kitine bağlanması üzerine çevresel faktörlerin etkisi. Veriler iki tekrarın ortalamasıdır.

Çevresel Faktörler		<i>L. lactis</i> (% Bağlanma)				
		N8	PLAC1	PLAC2	PLAC3	PLAC7
<b>pH</b>	3	29,1	37,8	40,1	31,2	41,8
	5	48,2	55,7	63,9	46,9	72,7
	7	33,2	54,3	75,6	43,1	96,2
	8	34,1	43,5	77,5	39,4	95,3
<b>Sıcaklık</b>	4 °C	22,1	30,5	84,0	29,5	94,5
	22 °C	19,4	28,4	78,6	34,7	91,3
	40 °C	28,7	40,7	76,8	38,2	92,6
<b>Tampon (mM)</b>	0	21,2	34,0	39,2	38,7	37,3
	5	43,9	50,3	67,9	48,1	72,6
	50	46,7	61,6	82,6	56,3	90,5
	100	34,4	55,8	89,8	46,4	95,7
<b>Yüzey aktif madde</b>	Triton X-100	38,9	50,1	90,1	51,3	96,3
	Tween 20	35,1	45,7	92,7	55,6	97,7

**Çizelge 4.2** Nisin üreticisi *L. lactis* LL27 ve rekombinant suşlarının kitine bağlanması üzerine çevresel faktörlerin etkisi. Veriler iki tekrarın ortalamasıdır.

Çevresel Faktörler		<i>L. lactis</i> (% Bağlanma)				
		LL27	PLAC4	PLAC5	PLAC6	PLAC8
<b>pH</b>	3	38,2	55,5	60,1	38,5	52,9
	5	48,3	63,5	73,9	49,6	72,5
	7	33,1	66,7	85,6	41,3	93,1
	8	34,5	66,8	87,5	34,9	96,4
<b>Sıcaklık</b>	4 °C	35,4	65,3	84,0	39,4	95,7
	22 °C	29,5	48,4	78,6	34,9	89,9
	40 °C	27,7	40,7	76,8	38,1	90,6
<b>Tampon (mM)</b>	0	31,7	35,7	36,4	35,9	36,8
	5	35,6	52,1	57,3	38,6	75,7
	50	36,1	62,9	72,1	43,2	92,5
	100	34,6	65,4	79,5	46,5	96,1
<b>Yüzey aktif madde</b>	Triton X-100	33,5	68,5	90,1	51,3	97,4
	Tween 20	34,9	71,7	93,9	54,6	9,77

#### 4.6 Kitin İçeren Sürekli Nisin Fermentasyonu (KİSNİFER) Sisteminde Nisin retimi ve Optimizasyonu

Çalışmada, yüksek nisin üretimine sahip *L. lactis* N8 suşu ile kitine yüksek bağlanma yeteneğine sahip *L. lactis* PLAC2 ve PLAC7 suşları KİSNİFER sisteminde nisin üretimi için denenmiştir. Söz konusu suşlar kitin materyaline Kısım 3.4’de anlatıldığı şekilde bağlandıktan sonra, 200 gr kitin fermentasyon haznesine alınmış ve 2 L’lik sodyum fosfat tamponuyla 3 kez yıkanmıştır. Son aşamada zerine 2 L %1 glikoz içeren M17 alınmış, önce farklı dilüsyon hızlarında (0,1-0,9 h<sup>-1</sup>) daha sonra da 0,9 h<sup>-1</sup> dilüsyon hızında farklı glikoz derişimleri (20-60 g L<sup>-1</sup>) kullanılarak nisin üretim miktarları tespit edilmiştir (şekil 4.14). *L. lactis* PLAC2 ve PLAC7 suşlarında ifade edilen KBD’inin KİSNİFER sisteminde etkisini gözlemleyebilmek için, *L. lactis* N8 doğal suşu kitinle ve kitinsiz olarak birlikte denenmiştir. Söz konusu suşun kitine bağlanmadan yapılan sürekli fermentasyon denemesinde, başlangıçta ortama 0,5 yoğunlukta hücre inokülasyonu yapılmıştır. Diğer yandan tüm fermentasyon denemelerinde, hücrelerin stabilitesinin artırılması ve oluşabilecek laktatın geri inhibisyon etkisini düşürmek amacıyla ortam %2 znmş oksijende sabit tutulmuş ve mikroaerofilik ortam sağlanmıştır.



şekil 4.14 KİSNİFER sisteminin görüntüsü.

*L. lactis* N8, PLAC2 ve PLAC7 suşlarının farklı dilüsyon hızlarındaki nisin üretim miktarları bununla ilişkili biyokütle ve glikoz tüketim oranları izelge 4.3’de gösterilmiştir. Çalışmada

elde edilen biyokütle miktarları incelendiğinde kontrol gruplarında (*L. lactis* N8 kitinli ve kitinsiz) dilüsyon hızının  $0,2 \text{ h}^{-1}$  ulaşması ile artış gösterdiği ancak ilerleyen dilüsyon hızlarında azaldığı görülmektedir. Buna karşın, *L. lactis* PLAC2 ve PLAC7 suşlarını içeren deneme gruplarında ise kontrol gruplarına göre daha yüksek biyokütle oranına ulaşılmakla birlikte, düşmenin daha ılımlı olduğu izlenmiştir. Aslında KİSNİFER sisteminde biyokütle miktarının izlenmesi sistemin analizi açısından doğru bir yaklaşım değildir. Çünkü *L. lactis* PLAC2 ve PLAC7 suşlarının kitin yüzeyine bağlanma yeteneklerinin bulunması nedeniyle sistem içerisinde daha fazla hücre yoğunluğu bulunmaktadır. Ölçülen biyokütle miktarları muhtemelen bağlanan hücrelerin bölünmesi neticesinde oluşan serbest hücre kütlelerini temsil etmektedir.

*L. lactis* N8 suşunun kitinli ve kitinsiz denemelerinde glikoz derişiminin tamamen tüketilemediği ayrıca yüksek dilüsyon hızlarında çok düşük tüketimin olduğu belirlenmiştir. *L. lactis* PLAC2 suşunun kullanıldığı denemede ise  $0,7 \text{ h}^{-1}$  dilüsyon hızına kadar glikoz tamamen tüketilmiş,  $0,9 \text{ h}^{-1}$  hızında glikoz tüketimi düşmüştür. *L. lactis* PLAC7 suşunun bağlandığı kitinlerin kullanılması durumunda; denenen tüm fermentasyon hızlarında glikozun tamamen tüketildiği izlenmiştir. Bu sonuçlar *L. lactis* PLAC2 ve *L. lactis* PLAC7 suşlarına kazandırılmış bağlanma yeteneği ile glikoz tüketimi arasında bir ilişkinin varlığına işaret etmiştir. Nitekim artan dilüsyon hızlarında söz konusu bu hücrelerin sistemde kalması ile yüksek glikoz tüketimi devam etmiştir.

*L. lactis* N8 suşunun kitin içeren veya içermeyen sürekli nisin üretimlerinde en yüksek nisin miktarına (sırasıyla  $2220$  ve  $2210 \text{ IU mL}^{-1}$ )  $0,3 \text{ h}^{-1}$  dilüsyon hızında ulaşılmıştır. Bu suşta yüksek fermentasyon hızlarında nisin üretim miktarının hızla düştüğü izlenmiştir. Benzer şekilde her iki denemede bir saatte en yüksek nisin üretimine (sırasıyla  $666$  ve  $636 \text{ IU mL}^{-1}$ ) yine  $0,3 \text{ h}^{-1}$  dilüsyon hızında ulaşılmıştır. Kitine bağlanma yeteneği olan *L. lactis* PLAC2 ve PLAC7 suşlarında ise en yüksek nisin miktarı (sırasıyla  $4920$  ve  $5520 \text{ IU mL}^{-1}$ )  $0,3 \text{ h}^{-1}$  dilüsyon hızında üretilmesine karşın, bir saatte en yüksek nisin üretimi (sırasıyla  $2709$  ve  $4581 \text{ IU mL}^{-1}$ )  $0,9 \text{ h}^{-1}$  dilüsyon hızında gerçekleşmiştir. Bu sonuç yüksek dilüsyon hızlarında *L. lactis* N8'in yıkama etkisiyle fermentasyon ortamından uzaklaştığı ancak *L. lactis* PLAC2 ve PLAC7 suşlarının kitine bağlanma yeteneği dolayısıyla fermentasyonda tutuklanmasının sonucu olarak, yüksek nisin üretiminin devam ettiğini kanıtlamıştır. Böylece *L. lactis* PLAC2 ve PLAC7 suşlarının kullanılmasıyla, *L. lactis* N8 suşuna kıyasla sırasıyla yaklaşık 4 ve 7 kat

bir saatte daha fazla nisin üretim miktarına ulaşılmıştır. *L. lactis* PLAC2 ve PLAC7 suşlarının arasındaki fark ise PLAC7 suşunun daha yüksek bağlanma yeteneğidir. Dolayısıyla her kitin parçasının yüzeyinde daha fazla nisin üreticisi *L. lactis* PLAC7 bulunmaktadır.

KİSNİFER sisteminde, *L. lactis* PLAC7 suşu tarafından  $0,9 \text{ h}^{-1}$  dilüsyon hızında var olan glikozun tamamının kullanılması nedeniyle, yüksek glikoz derişimlerinin ilgili suşların nisin üretimi üzerine etkisi araştırılmıştır. Daha önce tanımlandığı şekilde fermentasyon sistemi hazırlandıktan sonra, ortama 20, 30, 40, 50, 60  $\text{g L}^{-1}$  glikoz içeren besiyerinin ilavesi yapılmış ve sistem  $0,9 \text{ h}^{-1}$  dilüsyon hızında çalıştırılmıştır. Buna göre farklı glikoz derişiminde suşlar tarafından üretilen nisin miktarı ile glikoz tüketimi ve biyokütle miktarları Çizelge 4.4'de gösterilmiştir. Biyokütle oluşumu kullanılan tüm glikoz derişimlerinde hemen hemen benzer iken, yüksek glikoz derişimlerde ( $>40 \text{ g L}^{-1}$ ) kısmen düşmüştür. Buna ilaveten, *L. lactis* PLAC7 dışındaki tüm hücrelerin glikoz tüketim miktarı kullanılan  $40 \text{ g L}^{-1}$  oranına kadar benzer iken, bu derişimden sonra tüketim hızla azalmıştır. *L. lactis* PLAC7 suşunun glikoz tüketim oranı ise  $50 \text{ g L}^{-1}$ 'ye artmıştır. Bu sonuçlar yüksek glikoz derişimlerinin hücrelerin gelişimini ve stabilitesini olumsuz etkilediğine işaret etmektedir.

KİSNİFER sisteminde,  $0,9 \text{ h}^{-1}$  dilüsyon hızı ve farklı derişimde glikoz kullanımının nisin üretimine etkisi Çizelge 4.4'de gösterilmiştir. Beklenildiği gibi yüksek dilüsyon hızı kullanılmasından dolayı *L. lactis* N8 hücrelerinin hem kitinli hem de kitinsiz denemelerinde oldukça düşük nisin miktarı tespit edilmiştir. *L. lactis* PLAC2 ve PLAC7 suşlarını taşıyan kitinlerin kullanıldığı fermentasyonlarda 20 ile  $50 \text{ g L}^{-1}$  glikoz derişimi aralığında benzer yüksek nisin miktarları tespit edilirken, yüksek derişimlerde nisin miktarında önemli düşüşler meydana gelmiştir. En yüksek nisin ( $10500 \text{ IU mL}^{-1}$ ),  $40 \text{ g L}^{-1}$  glikozun kullanılması durumunda, *L. lactis* PLAC7 suşu tarafından üretilmiştir. Aynı suşun bir saatteki nisin üretimi  $9450 \text{ IU mL}^{-1}$  gibi oldukça yüksek değere ulaşmıştır. Ancak bu suşta birim glikoz başına nisin üretim verimi hesaplandığında, nisin üretiminin en yüksek olduğu koşullarda düşük verimler alınmıştır. Bu durumun temel nedeni nisinin çözünebilirlik özelliği ile ilişkilidir. Çünkü nisinin nötr koşullarda çözünebilirliği oldukça düşüktür (DELVES-BROUGHTON vd., 1996). Bu sonuçlar ortamda biriken nisin miktarının daha yüksek olduğuna işaret etmektedir.

**Çizelge 4.3** KİSNİFER sisteminde *L. lactis* N8, PLAC2 ve PLAC7 suşlarının nisin üretim üzerine dilüsyon hızının etkisi

<i>L. lactis</i>	Dilüsyon Hızı (h <sup>-1</sup> )				
	0,1	0,3	0,5	0,7	0,9
<b>N8 (Kitinsiz)</b>					
Biyokütle (g L <sup>-1</sup> )	2,80	3,40	1,60	1,40	1,20
Glikoz Tüketimi (g L <sup>-1</sup> )	5,87	5,44	3,88	2,19	2,10
Nisin Üretimi (IU mL <sup>-1</sup> )	1150	2120	650	340	150
Nisin Üretimi (IU mL <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	115	636	325	238	135
Y <sub>N/G</sub> (IU mg <sup>-1</sup> )	195,91	389,70	167,52	155,25	71,43
<b>N8</b>					
Biyokütle (g L <sup>-1</sup> )	3,20	3,10	2,00	1,70	1,40
Glikoz Tüketimi (g L <sup>-1</sup> )	6,19	6,37	4,37	3,66	3,42
Nisin Üretimi (IU mL <sup>-1</sup> )	1250	2220	1250	650	340
Nisin Üretim (IU mL <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	125	666	625	455	306
Y <sub>N/G</sub> (IU g <sup>-1</sup> )	201,93	348,51	286,04	124,32	89,47
<b>PLAC2</b>					
Biyokütle (g L <sup>-1</sup> )	4,70	4,40	4,20	3,50	3,10
Glikoz Tüketimi (g L <sup>-1</sup> )	9,51	9,45	9,27	8,57	6,43
Nisin Üretimi (IU mL <sup>-1</sup> )	2530	4920	4480	3530	3010
Nisin Üretim (IU mL <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	253	1476	2240	2471	2709
Y <sub>N/G</sub> (IU g <sup>-1</sup> )	266,03	520,63	483,28	411,90	468,11
<b>PLAC7</b>					
Biyokütle (g L <sup>-1</sup> )	3,10	3,50	4,10	3,90	3,50
Glikoz Tüketimi (g L <sup>-1</sup> )	9,89	9,63	9,57	9,44	9,53
Nisin Üretimi (IU mL <sup>-1</sup> )	2530	5520	4750	5090	5090
Nisin Üretim (IU mL <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	253	1656	2375	3563	4581
Y <sub>N/G</sub> (IU g <sup>-1</sup> )	255,81	573,21	496,34	539,19	534,10



**Çizelge 4.4** KİSNİFER sisteminde *L. lactis* N8, PLAC2 ve PLAC7 suşlarının nisin üretim üzerine glikoz derişiminin etkisi

<i>L. lactis</i>	Glikoz Derişimi (g L <sup>-1</sup> )				
	20	30	40	50	60
<b>N8 (Kitinsiz)</b>					
Biyokütle (g L <sup>-1</sup> )	1,50	1,50	1,60	1,10	0,90
Glikoz Tüketimi (g L <sup>-1</sup> )	2,77	2,54	2,38	1,39	1,21
Nisin Üretimi (IU mL <sup>-1</sup> )	150	120	150	80	70
Nisin Üretimi (IU mL <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	135	108	135	72	63
Y <sub>N/G</sub> (IU mg <sup>-1</sup> )	54,15	42,52	56,72	57,55	57,85
<b>N8</b>					
Biyokütle (g L <sup>-1</sup> )	3,20	3,10	2,00	1,70	1,40
Glikoz Tüketimi (g L <sup>-1</sup> )	4,19	4,27	4,37	3,66	3,42
Nisin Üretimi (IU mL <sup>-1</sup> )	350	350	250	190	190
Nisin Üretim Verimi (IU mL <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	315	315	225	171	171
Y <sub>N/G</sub> (IU g <sup>-1</sup> )	83,53	81,97	57,21	51,91	55,55
<b>PLAC2</b>					
Biyokütle (g L <sup>-1</sup> )	4,70	4,40	4,20	3,50	3,10
Glikoz Tüketimi (g L <sup>-1</sup> )	7,55	7,45	7,20	7,50	6,40
Nisin Üretimi (IU mL <sup>-1</sup> )	3550	3900	3400	3550	3010
Nisin Üretim (IU mL <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	3195	3510	3060	3195	2709
Y <sub>N/G</sub> (IU g <sup>-1</sup> )	470,20	523,49	472,22	473,33	470,31
<b>PLAC7</b>					
Biyokütle (g L <sup>-1</sup> )	5,90	6,20	5,80	5,50	4,70
Glikoz Tüketimi (g L <sup>-1</sup> )	19,89	28,53	35,77	39,48	30,23
Nisin Üretimi (IU mL <sup>-1</sup> )	9980	10100	10500	10100	7610
Nisin Üretim (IU mL <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	8982	9090	9450	9090	6849
Y <sub>N/G</sub> (IU g <sup>-1</sup> )	501,75	354,01	293,54	255,82	251,74

KİSNİFER sisteminde yapılan denemelerin sonuçları değerlendirildiğinde; nisin üreticisi *L. lactis* suşlarında KBD'inin ifade edilmesi ve bu hücrelerin kitine tutundurulduktan sonra fermentasyon ortamında kullanılması, sürekli fermentasyonlarda doğal suşlarla çıkılamayan yüksek dilüsyon hızlarında çalışmaya imkân tanımaktadır. Yani *L. lactis* hücrelerin kitine tutundurulması sürekli sistemde hücrelerin fermentasyon ortamında kalmasını sağlamaktadır. Bu da oldukça yüksek nisin derişimine ulaşılmasını mümkün kılmaktadır. Çalışmada elde edilen bilgiler doğrultusunda yüksek nisin üretimi için KİSNİFER sisteminde *L. lactis* PLAC7 suşu ile  $0,9 \text{ h}^{-1}$  dilüsyon hızının ve  $40 \text{ g L}^{-1}$  glikoz derişiminin optimum değer olduğu ortaya çıkmıştır.

Bugüne kadar önerilen sürekli nisin üretim sistemlerinde en yüksek miktar  $8200 \text{ IU mL}^{-1}$  hacimsel,  $5730 \text{ IU mL}^{-1}$  saatte nisin üretimi olarak rapor edilmiştir (BETRAN vd., 2001). Her ne kadar nisin üretimi için kullanılan sistemlerinin, suşlarının, nisin belirleme yöntemlerinin ve de besiyeri ortamlarının farklı olması nedeniyle sağlıklı karşılaştırma yapılması doğru olmasa da, bu çalışmada önerilen sistem ile bugüne kadar rapor edilen en yüksek nisin üretim miktarına ( $10500 \text{ IU mL}^{-1}$ ,  $9450 \text{ IU mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) ulaşılmıştır.

## 5. GENEL DEĞERLENDİRME ve ÖNERİLER

Projenin en önemli hedeflerinden birisi birim zamanda yüksek nisin üretim miktarına ulaşılması ile nisin üretim maliyetinin düşürülmesidir. Çünkü maliyetin düşürülmesi nisinin kullanımını yaygınlaştıracak ve daha güvenli gıdaların üretilmesine imkân tanıyacaktır. Böylece günümüzde tüketicilerin yöneldiği doğal gıda tüketim talebinin karşılanması adına önemli bir adım atılmış olacaktır. Bu doğrultuda planlanan çalışmada KBD'inin nisin üreticisi hücrelerin yüzeyinde ifadesi sağlanarak, sürekli fermentasyonlarda hücre kaybının engellenmesi veya tutuklama yöntemlerinin olumsuzluklarının önüne geçilmesi amaçlanmıştır.

Yapılan çalışmada, KBD nisin üreticisi *L. lactis* suşlarının duvarında başarılı bir şekilde ifade edilmiştir. Çalışmada laktokoklarda heterolog proteinlerin ifadesi için tercih edilen yüzey ifade sistemi kullanılmış ve PrtP çapasının (LPXTG), Acma'ninkine (LysM) kıyasla kitine tutunma başarısı açısından daha verimli sonuçlara ulaşılmıştır. Özellikle PrtP kolun uzatılması nisin üreticilerinin kitine bağlanma başarısında doğrudan etkili olmuştur. 800 aa uzunluğunda PrtP kol ve çapası üzerinde KBD'inin ifadesi için düzenlenen pBL04 plazmidi aktarılarak elde edilen nisin üreticisi *L. lactis* PLAC7 suşu, kitine %90'ın üzerinde bağlanma yeteneği kazanmıştır. Dolayısıyla çalışmanın birinci hedefi olan kitine yüksek oranda bağlanabilen nisin üreticisi suşlar elde edilmiştir. Ayrıca KBD'inin laktokoklarda ilk defa klonlanması ve ifadesi bu çalışma ile başarılmıştır. Söz konusu bu nisin üreticisi endüstriyel uygulamalar için önemli bir potansiyele sahiptir.

Nisin üreticisi *L. lactis* PLAC2, PLAC5, PLAC7 ve PLAC8 suşları kullanılarak yapılan çevrimli inkübasyon model fermentasyon sisteminde, kontrol ve diğer rekombinant suşlardan farklı olarak, her bir çevrimde nisinin yüksek miktarlarda üretilebildiği tespit edilmiştir. Yani inkübasyon çevrimlerinde yapılan yıkama ve besiyeri değişikliklerinde hücrelerin kaybedilmesi engellenmiştir. Dolayısıyla hücrelerin fermentasyon ortamında kitin yardımı ile tutuklanması ile hücrelerin nisin üretimine devam etmesi sağlanmıştır. Bu sonuç proje hipotezini doğrulamıştır.

Çalışmada KBD'i ifade eden hücrelerin kitin yüzeyine bağlanmalarının optimizasyonu yapılmıştır. Böylece hücrelerde ifade edilen KBD'inin 7 ve 8 pH değerlerinde, 100 mM

sodyum fosfat derişiminde, 4°C’de ve yüzey aktif maddelerin bulunmasıyla yüksek bağlanma eğilimi gösterdikleri belirlenmiştir. Bu çalışmalarla, fermentör ölçeğinde hücrelerin kitine tutundurulması ve hücrelerin kullanımı hususunda önemli bilgiler edinilmiştir.

Çalışmanın ilk kısımlarında alınan sonuçlar ışığında, üretilen yeni rekombinant hücreler kullanılarak sürekli nisin üretimi denemeleri yapılmıştır. Bunun için hücreler kitin parçacıklarına bağlandıktan sonra fermentasyon sistemine alınmış ve Kitin İçeren Sürekli Nisin Fermentasyonu Sistemi (KİSNİFER) kurulmuştur. Bu sistemde çalışmada üretilen *L. lactis* PLAC2 ve PLAC7 suşlarının bağlandığı kitin parçacıklarının kullanılması ile 0,9 h<sup>-1</sup> gibi oldukça yüksek dilüsyon hızlarında çalışma imkânı ortaya çıkmıştır. Ayrıca *L. lactis* PLAC7 suşunda hacimsel 10500 IU mL<sup>-1</sup> ve bir saatte 9450 IU mL<sup>-1</sup> nisin üretimine erişilmiştir. Söz konusu bu yüksek üretim miktarları bugüne kadar rapor edilmiş en yüksek orandır. Dolayısıyla projenin ana hedefi olan birim zamandaki yüksek nisin miktarına ulaşılmıştır. Diğer taraftan, çalışmada oluşturulan sistemin özellikle nisin üretiminde kesikli fermentasyondan sürekli fermentasyona bir geçiş sağlayabilecektir.

Sonuç olarak çalışmada proje önerisinin hipotezi çerçevesinde belirtilen hedefler büyük oranda tutturulmuştur. Çalışmanın yürütülmesi esnasında kazanılan bilgi ve tecrübeler ışığında aşağıdaki öneriler ortaya çıkmıştır;

- Çalışmada, KBD’inin nisin üreticisi hücrelerin duvarına yerleştirilmesinde PrtP çapasının verimli çalıştığı gösterilmiştir. Ancak akla gelen ilk soru bu domainin hücrenin tüm yüzeyinde mi yoksa hücrenin belli bir bölgesinde mi ifade edilmesi, sistemin çalışması açısından daha verimli olur? Diğer bir soru ise KBD’inin *L. lactis* hücrelerin duvarında ifade oranı ne olmalıdır? Dolayısıyla bu soruların cevaplanabilmesi için laktokoklara özgü yeni çapa sistemlerinin veya promotor ve sinyal serisi kombinasyonlarının araştırılması yararlı olacaktır.
- Çalışmada nisin üreticisi hücreler KBD ile kitin yüzeyine bağlanmış ve kitin parçacıkları fermentasyon sistemlerinde kullanılmıştır. Endüstriyel ölçekte düşünüldüğünde hücrelerin uzun proseslerdeki stabilitesinin ve canlılığının belirlenmesi ve buna göre optimize edilmesi sistemin uygulanabilirliği açısından verimli olacaktır.

- Çalışmamızla birlikte KBD'inin PrtP kol ve çapası üzerinde füzyon proteinini kodlayan plazmid (pBL04) oluşturulmuştur. Yine çalışmamız kapsamında bu plazmidin patenti alınmıştır. Ancak çalışmamızda bu plazmid sadece nisin üreticisi laktokok suşlarının kitin yüzeyine bağlamak amacıyla kullanılmıştır. Dolayısıyla bu plazmidin endüstriyel açıdan önemli diğer suşlarda da kullanılması önerilmektedir.
- Çalışmada kurulan KİSNİFER sisteminde *L. lactis* PLAC7 suşu tarafından oldukça yüksek nisin üretim miktarına ulaşılmıştır. Bu kadar yüksek nisin derişimi özellikle derin fermentasyon sistemlerinde geri inhibisyon etkisi yapabileceği kuvvetli bir ihtimaldir. Zaten nisin derişiminin çok yükselmesi durumunda çözünme probleminden dolayı da ciddi kayıplar oluşmaktadır. Bu olumsuzluklar dikkate alındığında nisin üreticilerin bağlandığı kitin parçacıkları doldurularak hazırlanacak katı faz fermentasyon sistemlerle daha yüksek nisin oranlarına çıkılması da mümkündür. Diğer taraftan böyle bir sistemin kurulması hücrelerin geri yönlü inhibisyon etkilerinden koruyacağından, hücre stabilitesi ve canlılığın korunmasına da ciddi katkıda bulunabilecektir.

## 6. KAYNAKLAR

- ABEE T., Rombouts F. M., Hugenholtz J., Guihard G. and Letellier L., Mode of action of nisin Z against *Listeria monocytogenes* Scott A grown at high and low temperatures. Appl. Environ. Microbiol., 60; 1962-1968, (1994).
- AKÇELİK O., Tükel Ç., Özcengiz G. and Akçelik M.. Characterization of bacteriocins from two *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolates. Mol. Nutr. Food Res., 50; 306-13, (2006).
- AMİALİ M. N., Lacroix C. and Simard R.E, High nisin Z production by *Lactococcus lactis* UL719 in whey permeate with aeration. World J. Microbiol. and Biotechnol., 14; 887-894, (1998).
- AVALL-JAASKELAINEN, S., Kyla-Nikkila, K., Kahala, M., Miikkulainen-Lahti, T. and Palva, A. Surface display of foreign epitopes on the *Lactobacillus brevis* S-Layer. Appl Environ Microbiol 68, 5943–5951, (2002).
- AVALL-JAASKELAINEN, S., Lindholm, A. and Palva, A. Surface display of the receptor-binding region of the *Lactobacillus brevis* S-layer protein in *Lactococcus lactis* provides nonadhesive lactococci with the ability to adhere to intestinal epithelial cells. Appl Environ Microbiol 69, 2230–2236, (2003).
- BARBER M., Eliot G. J., Bordoli R. S., Green B. N. and Bycroft B. W., Confirmation of the structure of nisin and its major degradation product by FAM-MS and FAM-MS/MS. Experientia, 44; 266-270, (1988).
- BAUER R. and Dicks L. M. T., Mode of action of lipid II-targeting lantibiotics. Int. J. Food Microbiol., 101; 201-216, (2005).
- BEASLEY S. S. and Saris P. E. J., Nisin-producing *Lactococcus lactis* isolated from human milk. Appl. Environ. Microbiol., 70; 5051-5053, (2004).
- BERTRAND N., Fliss I. and Lacroix C., High nisin-Z production during repeated-cycle batch cultures in supplemented whey permeate using immobilized *Lactococcus lactis* UL719. Inter. Dairy J., 11; 953-960, (2001).
- BONEV B. B., Breukink E., Swiezewska E., De Kruijff B. and Watts A., Targeting extracellular pyrophosphates underpins the high selectivity of nisin. FASEB J., 18; 1862-1969, (2004).
- BOSMA T., Kanninga R., Neef J., Audouy S.A.L. and van Roosmalen M.L., Novel surface display system for proteins on non-genetically modified Gram-positive bacteria. Appl Environ Microbiol 72; 880–889, (2006).
- BREUKINK E., van Heusden H. E., Vollmerhaus P. J., Swiezewska E., Brunner L., Walker S., Heck A. J. R. and de Kruijff B., Lipid II is an intrinsic component of the pore induced by nisin in bacterial membranes. J. Biol. Chem. 278; 19898-19903, (2003).
- BREUKINK E., van Kraaij C., van Dalen A., Demel R. A., Siezen R. J., de Kruijff B. and Kuipers O. P., The orientation of nisin in membranes. Biochemistry, 37, 8153-8162, (1998).
- BREUKINK E., Wiedemann I., van Kraaij C., Kuipers O. P., Sahl H-G. and de Kruijff B., Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. Science, 286; 2361-2364, (1999).
- BROOIJMANS R., Smit B., Santos F., Riel J., Vos W., Hugenholtz J., Heme and Menaquinone Induced Electron Transport in Lactic Acid Bacteria, Microbial Cell Factories, 8:28, (2009).

- BRÖTZ H., Josten M., Wiedemann I., Shneider U., Götz F., Bierbaum G. and Sahl H-G., Role of lipid-bound peptidoglycan precursors in the formation of pores by nisin, epidermin and other lantibiotics. *Mol. Microbiol.*, 30; 317-327, (1998).
- BUCHMAN G. W., Banerjee S. and Hansen J. N., Structure, expression, and evolution of a gene encoding the precursor of nisin, a small protein peptide. *J. Biol. Chem.*, 263; 16260-16266, (1988).
- CHAN W. C., Dodd H. M., Horn N., Maclean K., Lian L.-Y., Bycroft B. W., Gasson M. J. and Roberts G. C. K., Structure-activity relationships in the peptide antibiotic nisin: role of dehydroalanine 5. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62; 2966-2969, (1996).
- CHAN W. C., Lian L.-Y., Bycroft B. W. and Roberts G. C. K., Confirmation of the structure of nisin by complete <sup>1</sup>H NMR resonance assignment in aqueous and dimethyl sulfoxide solution. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 1; 2359-2367, (1989).
- CHANDRAPATI S. and O'Sullivan D. J., Characterization of promoter regions involved in galactose and nisin mediated induction of the nisA gene *Lactococcus lactis* ATCC 11454. *Molecular Microbiol.*, 2; 467-477, (2002).
- CHANDRAPATI S. and O'Sullivan D. J., Nisin independent induction of the nisA promoter in *Lactococcus lactis* during growth in lactose or galactose. *FEMS Microbiol. Lett.*, 170; 191-198, (1999).
- CHATTERJEE C., Paul M., Xie L. and van der Donk W. A., Biosynthesis and mode of action of lantibiotics. *Chem. Rev.*, 105; 633-683, (2005).
- CHEIGH C. I., Park H., Choi H. J. and Pyun Y. R., Enhanced nisin production by increasing genes involved in nisin Z biosynthesis in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164. *Biotechnol. Lett.*, 27; 155-160, (2005).
- CHEIGH C. I., Choi H. J., Park H., Kim S., Kook M., Kim T., Hwang J. and Pyun Y., Influence of growth conditions on the production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 isolated from Kimchi. *J. Biotechnol.*, 95; 225-235, (2002).
- CHEIGH C.I. and Pyun Y., Nisin biosynthesis and its properties. *Biotechnol. Lett.*, 27; 1641-1648, (2005).
- DAVIES E. A., Bevis H. E., Potter R., Haris J., Williams G. C. and Delves-Broughton J., The effect of pH on the stability of the nisin solution during autoclaving. *Lett. Appl. Microbiol.*, 27; 186-187, (1998).
- de RUYTER P. G. G. A., Kuipers O. P., Beerthuyzen M. M., van Alen-Boerrigter I. and de Vos W. M., Functional analysis of promoters in the nisin gene cluster of *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.*, 178; 3434-3439, (1996).
- de VUSYT L. and Vandamme E. J., Influence of the phosphorus and nitrogen source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* batch fermentations using a complex medium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 40; 17-22, (1993).
- de VUYST L. and Vandamme E. J., Influence of the carbon source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* batch fermentations. *J. General Microbiol.*, 138; 571-578, (1992).
- de VUYST L. and Vandamme E.J., Nisin, a lantibiotic produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* properties, biosynthesis, fermentation and applications. In *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*. L. de Vuyst and E. J. Vandamme (London: Chapman and Hall), pp. 165-167, (1994).
- de VUYST L., Nutritional factors affecting nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NIZO 22186 in a synthetic medium. *J. Appl. Bacteriol.*, 78; 28-33, (1995).
- DELVES-BROUGHTON J., Blackburn P., Evans R. J. and Hugenholtz J., Applications of the bacteriocin nisin. *Antonie van Leeuwenhoek*, 69; 193-202, (1996).

- DEMEL R. A., Peelen T., Siezen R. J., de Kruijff B. and Kuipers O. P., Nisin Z, mutant nisin Z and lacticin 481 interactions with anionic lipids correlate with antimicrobial activity. A monolayer study. *Eur. J. Biochem.*, 235; 267-274, (1996).
- DESJARDINS, P, Meghrous J. and 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 permeate. *Inter. Dairy J.*, 11; 943-951, (2001).
- DODD H. M, Horn N. and Gasson M. J., Analysis of the genetic determinant for production of the peptide antibiotic nisin. *J. Gen. Microbiol.*, 136; 555-566, (1990).
- DRIESSEN A.J.M., van den Hooven H.W., Kuiper W., van de Kemp M., Sahl H-G., Konings R.N.H. and Konings W.N., Mechanistics of lantibiotic-induced permeabilization of phospholipid vesicles. *Biochemistry*, 34; 1606-1614, (1995).
- DUWAT P., Sourice S., Cesselin B., Lamberet G., Vido K., Gaudu P., Loir Y., Violet F., Loubere P., Gruss A., Respiration Capacity of the Fermenting Bacterium *Lactococcus lactis* and Its Positive Effects on Growth and Survival, *Journal of Bacteriology*, 183:5:4509-4516, (2001).
- ENGELKE G., Gutowski-Eckel Z., Hammelmann M. and Entian K-D., Biosynthesis of the lantibiotic nisin: genomic organization and membrane localization of the nisB protein. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58; 3730-3743, (1992).
- EVEN S., Lindley N.D., Loublere P., Cocaign-Bousquet M., Dynamic response of catabolic pathways to autoacidification in *Lactococcus lactis*: transcript profiling and stability in relation to metabolic and energetic constraints. *Mol. Microbiol.*, 45; 1143-1152, (2002).
- FISCHETTI VA, Pancholi V, Schneewind O, Conservation of a hexapeptide sequence in the anchor region of surface proteins from Gram-positive cocci. *Mol Microbiol* 4:1603-1605, (1990).
- GAO F. H., Abee T. and Konings W. N., Mechanism of action of the peptide antibiotic nisin in liposomes and cytochrome c oxidase-containing proteoliposomes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57; 2164-2170, (1991).
- GARCÍA M. J., Elferink M. G. L., Driessen A. J. M. and Konings W. N. In vitro pore forming activity of the lantibiotic nisin. *Eur. J. Biochem.*, 212; 417-422, (1993).
- GASSON M. J., Transfer of sucrose fermenting ability, nisin resistance and nisin production into *Streptococcus lactis* 712. *FEMS Microbiol. Lett.*, 21; 7-10, (1984).
- GAUDU P., Lamberet G., Poncet S., Gruss A., CcpA regulation of aerobic and respiration growth in *Lactococcus lactis*, *Molecular Microbiology*, 1: 183–192, (2003).
- GONZALES C. F. and Kunka B. S., Transfer of sucrose-fermenting ability and nisin production phenotype among lactic streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49; 627-633, (1985).
- GRAEFFE T., Rintala H., Paulin L. and Saris P. A natural nisin variant. In *Nisin and Novel Lantibiotics*. G. Jung and H. –G. Sahl, ed. (Leiden: ESCOM Science Publishers B.V.), pp. 260-268, (1991).
- GROSS E. and Morell J. L., The structure of nisin. *J. Am. Chem. Soc.*, 93; 4634-4635, (1971).
- GUERRA N. P. and Pastrana L., Enhanced nisin and pediocin production on whey supplemented with different nitrogen sources. *Biotechnol. Lett.*, 23; 609-612, (2001).
- GUERRA N.P. and Pastrana L.C., Influence of pH Drop on both nisin and pediocin production by *Lactococcus lactis* and *Pediococcus acidilactici*. *Letters Appl. Microbiol.*, 37; 51-55, (2003).
- HARRIS L. J., Flemming H. P. and Klaenhammer T. R., Characterization of two nisin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strains isolated from a commercial sauerkraut fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58; 1477-1483, (1992).



- HASHIMOTO M, Ikegami T, Seino S, Obuchi N, Fukada H, Sugiyama J, Shirakawa M, Watanabe T, Expression and characterization of the chitin-binding domain of chitinase A1 from *Bacillus circulans* WL-12. *J Bacteriol* 182:3045-3054, (2000).
- HASPER H. E., Kramer N. E., Smith J. L., Hillman J. D., Zachariah C., Kuipers O. P., de Kruijff B. and Breukink E., An alternative bactericidal mechanism of action for lantibiotic peptides that target lipid II. *Science*, 313; 1636-1637, (2006).
- HIRSCH A. and Wheater D.M., The production of antibiotics by streptococci. *J. Dairy Res.*, 18; 193-197, (1951).
- HOLO H. and Nes I. F., High-frequency transformation by electroporation, of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* grown with glycine in osmotically stabilized media. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55; 3119-3123, (1989).
- HORN N., Swindell S., Dodd H. and Gasson M.J., Nisin biosynthesis genes are encoded by a novel conjugative transposon. *Mol.Gen. Genet.*, 228; 129-135, (1991).
- HSU S-T., Breukink E., de Kruijff B., Kaptein R., Bonvin A. M. J. J. and van Nuland N. A. J., Mapping the targeted membrane pore formation mechanism by solution NMR: the nisin Z and lipid II interaction in SDS micelles. *Biochemistry*, 41; 7670-7878, (2002).
- HULL J.S.V. and Gibbons W. R., Neutralization/recovery of lactic acid from *Lactococcus lactis*: effects on biomass, lactic acid and nisin production. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 13; 527-532, (1997).
- HURST, A. Nisin. *Adv. Appl. Microbiol.*, 27; 85-123, (1981).
- IKEGAMI T., Okada T., Hashimoto, M., Seino S., Watanabe T., Shirakawa W., Solution structure of the chitin binding domain of bacillus circulans WL-12 chitinase A1. *J Biol. Chem.* 275; 13654-13661, 2000.
- IMMONEN T. and Saris P. E. J., Characterization of the nisFEG operon of the nisin Z producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* N8 strain. *DNA Seq.*, 9; 263-274, (1998).
- INGRAM L., A ribosomal mechanism for synthesis of peptides related to nisin. *Biochem. Biophys. Acta*, 224; 263-265, (1970).
- JOZALA A. F., de Andrade M. S., de Arauz L. J. Pessoa A. and Penna T. C. V., Nisin production utilizing skimmed milk aiming to reduce process cost. *Appl. Biochem. Biotech.*, 136; 515-527, (2007).
- JUNG G., Lantibiotics: a survey. In: *Nisin and novel lantibiotics*. Editors: Jung, G. and Sahl, H-G. Pages 1-34. ESCOM Science Publishers, Leiden, the Netherlands, (1991).
- KALETTA C. and Entian K-D., Nisin, a peptide antibiotic: cloning and sequencing of the *nisA* gene and post-translational processing of its peptide product. *J. Bacteriol.*, 171; 1597-1601, (1989).
- KIM W. S., Hall R. J. and Dunn N. W., Improving nisin production by increasing immunity/resistance genes in the producer organism *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 50; 429-433, (1998).
- KIM W. S., Hall R. J. and Dunn N.W., Host specificity of nisin production by *Lactococcus lactis*. *Biotechnol. Lett.*, 19; 1235-1238, (1997a).
- KIM W. S., Nisin production by *Lactococcus lactis* using two-phase batch culture. *Letters Appl. Microbiol.*, 25; 169-171, (1997).
- KIM W.S., Hall R.J. and Dunn N.W., The effect of nisin concentration and nutrient depletion on nisin production of *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 48; 449-453, (1997b).
- KOEBMANN B., Blank M.L., Solem C., Petranovic D., Nielsen K., Jensen R.P., Increased biomass yield of *Lactococcus lactis* during energetically limited growth and respiratory conditions. *Biotechnol Appl. Biochem.* 50. 25-33, (2008).

- KOPONEN O., Tolonen M., Qiao M., Wahlström G., Helin J. and Saris P. E. J., NisB is required for the dehydration and NisC for the lanthionine formation in the post translational modification of nisin. *Microbiology*, 148; 3561-3568, (2002).
- KORDEL M. and Sahl H-G., Susceptibility of bacterial, eukaryotic and artificial membranes to the disruptive action of the cationic peptides Pep5 and nisin. *FEMS Microbiol. Lett.*, 34; 139-144, (1986).
- KOZAK, W., Rajchert-Trzypil M., Dorzanski W. T., The effects of proflavin, ethidium bromide and an elevated temperature on the appearance of nisin-negative clones in nisin producing strains of *Streptococcus lactis*. *J. Gen. Microbiol.*, 83; 295-302, (1974).
- KRÜGER C, Hu Y, Pan Q, Marcotte H, Hultberg A, Delwar D, van Dalen PJ, Pouwels PH, Leer RJ, Kelly CG, van Dollenweerd C, Ma JK, Hammarström L, In situ delivery of passive immunity by lactobacilli producing single-chain antibodies. *Nat Biotechnol* 20:702-706, (2002).
- KUIPERS A., Wierenga J., Rink R., Kluskens L. D., Driessen A. J., Kuipers O. P. and Moll G. N., Sec-mediated transport of posttranslationally dehydrated peptides in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72; 7626-7633, (2006).
- KUIPERS O. P., Beerthuyzen M. M., de Ruyter P. C. M., Luesink E. J. and de Vos W. M., Autoregulation of nisin biosynthesis in *Lactococcus lactis* by signal transduction. *J. Biol. Chem.*, 270; 27299-27304, (1995).
- KUIPERS O. P., Beerthuyzen M. M., Siezen R. J. and de Vos, W. M., Characterization of the nisin gene cluster *nisABTCIPR* of *Lactococcus lactis*. Requirement of expression of the *nisA* and *nisI* genes for development of immunity. *Eur. J. Biochem.*, 216; 281-291, (1993).
- KWAADSTENIET M., Doeschate K. and 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*). *Appl. Environ. Microbiol.*, 74; 547-549, (2008).
- KYLÄ-NIKKILÄ K, Alakuijala U, Saris, PEJ, Immobilization of *Lactococcus lactis* to cellulosic material by cellulose-binding domain of *Cellvibrio japonicus*. *J Appl Microbiol* 109:1274-1283, (2010).
- LEBLANC D. J., Crow V. L. and Lee L. N., Plasmid mediated carbohydrate catabolic enzymes among strains of *Streptococcus lactis*. In: Stuttard, C. and Roze, K. R. (ed.), *Plasmids and transposons: environmental effects and maintenance mechanisms*. Academic Press, Inc., pp. 31-41, (1980) New York.
- LECHARDEUR D., Cesselin B., Fernandez A., Lamberet G., Garrigues C., Pedersen M., Gaudu P. and Gruss A., Using Heme As An Energy Boost For Lactic Acid Bacteria, *Current Opinion in Biotechnology* 22:143-149, (2011).
- LEENHOUTS K., Buist G. and Kok J. Anchoring of proteins to lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 76, 367-376, (1999).
- LINDHOLM A, Smeds A, Palva A, Receptor binding domain of *Escherichia coli* F18 fimbrial adhesion FedF can be both efficiently secreted and surface displayed in a functional form in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* 70:2061-2071, (2004).
- LÍ B., Yu J. P. J., Brunzelle J. S., Moll G. N., van der Donk W. A. and Nair S. K., Structure and mechanism of the lantibiotic cyclase involved in nisin biosynthesis. *Science*, 311; 1464-1467, (2006).
- LÍ C., Bai J., Cai Z. and Ouyang F., Optimization of a cultural medium for bacteriocin production by *Lactococcus lactis* using response surface methodology. *J. Biotechnol.*, 93; 27-34, (2002).

- LÍ H. and O'Sullivan D. J., Identification of a *nisI* promoter within the *nisABCTIP* operon that may enable establishment of nisin immunity prior to induction of the operon via signal transduction. *J. Bacteriol.*, 188; 8496-8503, (2006).
- LÍU W. and Hansen J. N., Some chemical and physical properties of nisin, a small protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56; 2551-2558, (1990).
- LÍU X., Chung Y-K. Yang S.T. and Yousef A. E., Continuous Nisin production in laboratory media and whey permeate by immobilized *Lactococcus lactis*. *Process Biochem.*, 40; 13-24, (2005).
- LV W., Cong W. and Cai Z., Effect of sucrose on nisin production in batch and fed-batch culture by *Lactococcus lactis*. *J. Chemical Technology and Biotechnol.*, 80; 511-514, (2005).
- LV W., Cong W. and Cai Z., Improvement of nisin production in pH feed-back controlled, fed-batch culture by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Biotechnol. Lett.*, 26; 1713-1716, (2004b).
- LV W., Cong W. and Cai Z., Nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* under nutritional limitation in fed-batch culture. *Biotechnol. Lett.*, 26; 235-238, (2004a).
- MAASSEN CBM, Laman JD, Heijne den Bak-Glashouwer MJ, Tielen FL., van Holten-Neelen JCPA, Hoogteij-ling L, Antonissen C, Leer RJ, Pouwels PH, Boersma WJA, Shaw DM, Instruments for oral disease-intervention strategies recombinant *Lactobacillus casei* expressing tetanus toxin fragment C for vaccination or myelin proteins for oral tolerance induction in multiple sclerosis. *Vaccine* 17:2117-2128, (1999).
- MARTÍN I., Ruyschaert J-M., Sanders D. and Giffard C. J., Interaction of the lantibiotic nisin with membranes revealed by fluorescence quenching of an introduced tryptophan. *Eur. J. Biochem.*, 239; 156-164, (1996).
- MATSUSAKI H., Endo N., Sonomoto K. and Ishizaki A., Lantibiotic nisin Z fermentative production by *Lactococcus lactis* IO-1: Relationship between production of the lantibiotic and lactate and cell growth. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 45; 36-40, (1996).
- MATTICK A.T.R. and Hirsch A., A powerful inhibitory substance produced by group N streptococci. *Nature*, 154; 551-552, (1944).
- MAZMANIAN S.K., Liu G., Ton-That H. and Schneewind O., Staphylococcus aureus sortase, an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall. *Science* 285, 760-763, (1999).
- MCAULIFFE O., Ross R. P. and Hill C., Lantibiotics: biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol. Rev.*, 25; 285-308, (2001).
- MORRIS S., Walsh R. C. and Hansen J. N., Identification and characterization of some bacterial membrane sulfhydryl groups which are targets of bacteriostatic and antibiotic action. *J. Biol. Chem.*, 259; 13590-13594, (1984).
- MOTLAGH, A. M., Johnson, M. C. and Ray, B., Viability loss of food-borne pathogens by starter culture metabolites. *J. Food Prot.*, 54; 873-878., (1991).
- MULDERS J. W. M, Boerrigter I. J., Rollema H. S., Siezen R. J. and de Vos W. M., Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a natural nisin variant. *Eur. J. Biochem.*, 201; 581-584, (1991).
- NAGAYASU M., Wardani K.A., Nagasiha K., Shimuzu H., Shioya S., Analysis of hemin effect on lactate reduction in *Lactococcus lactis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* Vol 103, No.6, 529-534, (2007).
- NIELSEN P. and Roepstorff P., Sample preparation dependent fragmentation in 252-Cf plasma desorption mass spectrometry of the polycyclic antibiotic nisin. *Bio. Environ. Mass Spectrom.*, 17; 137-141, (1988).

- NOONPAKDEE W., Santivarangkna C., Jumriangrit P., Sonomoto K. and Panyim S., Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* WNC20 strains from *nham*, a traditional Thai fermented sausage. *Int. J. Food Microbiol.*, 81; 137-145, (2003).
- OKANO K., Zhang Q., Kimura S., Narita J., Tanaka T., Fukuda H. and Kondo A. System using tandem repeats of the cA peptidoglycan-binding domain from *Lactococcus lactis* for display of both N- and C-terminal fusions on cell surfaces of lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol* 74, 1117–1123 (2008).
- PALMER D. E., Mierke D. F., Pattaroni C., Goodman M., Wakamiya T., Fukase K., Kitazawa M., Fujita H. and Shiba T., Interactive NMR and computer simulation studies of lanthionine ring structures. *Biopolymers*, 28; 397-408, (1989).
- PAPAGIANNI M., Avramidis G. and 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*. *Enzyme and Microbiol. Tech.*, 40; 1557-1563, (2007).
- PAPAGIANNI M. and Avramidis N., Cloning and functional expression of the mitochondrial alternative oxidase gene (*aox1*) of *Aspegillus niger* in *Lactococcus lactis* and its induction by oxidizing conditions. *Enzyme Microbiol. Technol.* 50; 17-21, (2012).
- PARANTE E. and Ricciardi A., Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 52; 628-638, (1999).
- PONGTHARANGKUL T. and Demirci A., Evaluation of culture medium for nisin production in a repeated-batch biofilm reactor. *Biotechnol. Prog.*, 22; 217-224, (2006).
- PONTING C.P., Aravind L., Schultz J., Bork P. and Koonin E.V. Eukaryotic signalling domain homologues in archaea and bacteria. Ancient ancestry and horizontal gene transfer. *J Mol Biol* 289, 729–745, (1999).
- QIAO M. and Saris P. E. J., Evidence for the role of NisT in transport of the lantibiotic nisin produced by *Lactococcus lactis* N8. *FEMS Microbiol. Lett.*, 144; 69-93, (1996).
- QIAO M., Omaetxebarria M. J., Ra R., Oruetxebarria I. and Saris P.E.J., Isolation of a *Lactococcus lactis* strain with high resistance to nisin and increased nisin production. *Biotechnol. Lett.*, 19; 199-202, (1997).
- QIAO M., Ye S., Koponen O., Ra R., Usabiaga M., Immonen T. and Saris P. E. J., Regulation of the nisin operons in *Lactococcus lactis* N8. *J. Appl. Bacteriol.*, 80; 626-634, (1996).
- RA R., Qiao M., Immonen T., Pujana I. and Saris P. E. J., Genes responsible for nisin synthesis, regulation and immunity form a regulon of two operons and are induced by nisin in *Lactococcus lactis* N8. *Microbiology*, 142; 1281-1288, (1996).
- RAUCH P. J. G. and de Vos W. M., Characterization of the novel nisin-sucrose conjugative transposon Tn5276 and its insertion in *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.*, 174; 1280-1287, (1992).
- RAUCH P. J. G., Beerthuyzen M. M. and de Vos W. M., Distribution and evolution of nisin-sucrose elements in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60; 1798-1804, (1994).
- RAUCH P. J. G., Beerthuyzen M. M. and de Vos W. M., Molecular analysis and evolution of conjugative transposons encoding nisin production and sucrose fermentation in *Lactococcus lactis*. In *Nisin and Novel Lantibiotics*, G. Jung and H-G. Sahl, ed. (Leiden: ESCOM Science Publishers B.V.), pp. 243-249, (1991).
- RAZVI A., Zhang Z., Lan C., Effects of glucose and nitrogen source concentration on batch fermentation kinetics of *Lactococcus lactis* under hemin-stimulated respirative condition. *Biotechnol. Prog.* 24, 582-858, (2008).
- ROGERS L.A. and Whittier E.O., Limiting factors in the lactic fermentation. *J. Bacteriol.*, 16; 211-229, (1928).

- ROGERS L.A., The inhibiting effect of *Streptococcus lactis* on lactic fermentation. J. Bacteriol., 16; 321-325, (1928).
- RUHR E. and Sahl H-G., Mode of action of the peptide antibiotic nisin and influence on the membrane potential of whole cells and on cytoplasmic and artificial membrane vesicles. J. Bacteriol., 162; 833-836, (1985).
- SAMBROOK J., Fritsch E. F. and Maniatis T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. (1989).
- SCANNELL A.G.M., Hill C., Ross R.P., Marx S., Hartmeier W. and Arendt E.K., Continuous production of lactacin 3147 and nisin using cells immobilized in calcium alginate. J. Appl. Microbiol., 89; 573-579, (2000).
- SCHNELL N., Entian K.-D., Schneider U., Götz F., Zahner H., Kellner and Jung G., Prepeptide sequence of epidermin, a ribosomally synthesized antibiotic with four sulphide rings. Nature, 333; 276-278, (1988).
- SHIMIZU H., Mizuguchi T., Tanaka E. and Shioya S., Nisin production by a mixed-culture system consisting of *Lactococcus lactis* and *Kluyveromyces marxianus*. Appl. Environ. Microbiol., 65; 3134-3141, (1999).
- SIEGERS K. and Entian K-D., Genes involved in immunity to the lantibiotic nisin produced by *Lactococcus lactis* 6F3. Appl. Environ. Microbiol., 61; 1082-1089, (1995).
- SIEGERS K., Heinzmann S. and Entian K-D., Biosynthesis of lantibiotic nisin. Posttranslational modifications of its prepeptide occurs at a multimeric membrane associated lanthionine synthetase complex. J. Biol. Chem. 271, 12294-12301, (1996).
- SIEZEN R. J., Multi-domain, cell-envelope proteinases of lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek, 76; 139-155, (1999).
- SLIJPER M., Hilbers C. W., Konings R. N. H. and van de Ven F. J. M., NMR studies of lantibiotics. Assignment of the <sup>1</sup>H-NMR spectrum of nisin and identification of interresidual contacts. FEBS Lett., 252; 22-28, (1989).
- SONOMOTO K., Chinachoti N., Endo N. and Ishizaki A., Biosynthetic production of nisin Z by immobilized *Lactococcus lactis* IO-1. J. Molecular Cat. B: Enzymatic, 10; 325-334, (2000).
- STEEN A., Buist G., Leenhouts K.J., El Khattabi M., Grijpstra F., Zomer A.L., Venema G., Kuipers O.P., Cell Wall attachment of a widely distributed peptidoglycan binding domain is hindered by cell wall constituents. J Biol Chem 278, 23874–23881, (2003).
- STRAUSS A. and Götz F., In vivo immobilization of enzymatically active polypeptides on the cell surface of *Staphylococcus carnosus*. Mol Microbiol 21:491-500, (1996).
- ŞİMŞEK Ö, Çon AH, Akkoç N, Saris PEJ, Akçelik M, Influence of growth conditions on the nisin production of bioengineered strains. J Ind Microbiol Biotech 36: 481-490, (2009).
- ŞİMŞEK Ö, Saris PEJ, Cycle changing the medium results in increased nisin productivity per cell in *Lactococcus lactis*. Biotechnol Lett 31:415-421, (2008).
- ŞİMŞEK Ö., Buzrul S., Akkoç N., Alpas H. and Akçelik M., Stress response kinetics of two nisin producer strains of *Lactococcus lactis* spp. *lactis*. Appl. Biochem. Biotechnol., (2009).
- TAKALA T. M. and Saris P. E. J., Nisin: Past, present and future. In Research and Applications of Bacteriocins, M. A. Riley, and O. Gillor, ed. Horizon Bioscience pp. 181-213, (2007).
- THOMPSON J., Nguyen N. Y., Sackett D. L. and Donkersloot J. A., Transposon-encoded sucrose metabolism in *Lactococcus lactis*. Purification of sucrose-6-phosphate hydrolase and genetic linkage to N<sup>5</sup>-(L-1-carboxyethyl)-L-ornithine synthase in strain K1. J. Biol. Chem. 266; 14573-14579, (1991).

- TOLONEN M., Saris P.E.J. and Siika-aho M., Production of nisin with continuous adsorption to ambelite XAD-4 resin using *Lactococcus lactis* N8 and *L. lactis* LAC48. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 63; 659-665, (2004).
- TRAMER J. and Fowler G. G., Estimation of nisin in foods. *J. Sci. Food Agri.*, 15; 522-528, (1964).
- TSAI H. J. and Sandine W. E., Conjugal transfer of nisin plasmid genes from *Streptococcus lactis* 7962 to *Leuconostoc dextranicum* 181. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53; 352-357, (1987).
- van de VEN F. J. M., van den Hooven H. W., Konings R. N. H. and Hilbers C. W., NMR studies of lantibiotics. *Eur. J. Biochem.*, 202; 1181-1188, (1991).
- van den HOOVEN H. W., Doeland C. C. M., Van de Kamp M., Konings R. N. H., Hilbers C. W. and Van de Ven F. J. M., Three-dimensional structure of the lantibiotic nisin in the presence of membrane-mimetic micelles of dodecylphosphocholine and sodium dodecylsulphate. *Eur. J. Biochem.*, 235; 382-393, (1996).
- van den HOOVEN H. W., Fogolari F., Rollema H. S., Konings R. N. H., Hilbers C. W. and van de Ven F. J. M., NMR and circular dichroism studies of the lantibiotic nisin in non-aqueous environments. *FEMS Lett.*, 319; 189-194, (1993).
- VAZQUEZ J.A. Cabo M. L., Gonzalez M. P. and Murado M. A., The role of amino acids in nisin and pediocin production by two lactic acid bacteria a factorial study. *Enzyme and Microbiol. Technol.*, 34; 319-325, (2004).
- WAN J., Hickey W. and Coventry M. J., Continuous production of bacteriocins, brevicin, nisin and pediocin, using calcium alginate-immobilized bacteria. *J. Appl. Bacteriol.*, 79; 671-676, (1995).
- WANG J-Y, Chao Y-P, Immobilization of cells with surface-displayed chitin binding domain. *Appl Environ Microbiol* 72:927-931, (2006).
- WARDANI A. H., Egawa S., Nagahisa K., Shimizu H. and Shioya S., Computational prediction of impact of rerouting the carbon flux in metabolic pathway on cell growth and nisin production by *Lactococcus lactis*. *Biochemical Engineering J.*, 28; 220-230, (2006).
- WELLS J.M. and Mercenier A., Mucosal delivery of therapeutic and prophylactic molecules using lactic acid bacteria. *Nat Rev Microbiol* 6, 349-362, (2008).
- WHITEHEAD H.R, A substance inhibiting bacterial growth, produced by certain strains of lactic streptococci. *Biochem. J.*, 27; 1793-1800, (1933).
- WIEDEMANN I., Breukink E., van Kraaij C., Kuipers O. P., Bierbaun G., de Kruijff B. and Sahl H-G, Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. *J. Biol. Chem.*, 276; 1722-1779, (2001).
- WIRAWAN R.E., Klesse N.A., Jack R. W. and Tagg J. R., Molecular and genetic characterisation of a novel nisin variant produced by *Streptococcus uberis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72; 1148-1156 (2006).
- WU Z., Wang L., Jing Y., Li X. and Zhao Y., Variable volume fed-batch fermentation for nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* W28. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, DOI 10.1007/s112010-008-8335-8. (2008).
- YU P. L., Dunn N. W. and Kim W. S., Lactate removal by anionic-exchange resin improves nisin production by *Lactococcus lactis*. *Biotechnol. Lett.*, 24; 59-64, (2002).
- ZENDO T., Fukao M., Ueda K., Higuchi T., Nakayama J. and Sonomoto K., Identification of the lantibiotic nisinQ, a new natural nisin variant produced by *Lactococcus lactis* 61-14 isolated from a river in Japan. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67; 1616-1619, (2003).

**TÜBİTAK  
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

Proje Yürütücüsü:	Yrd. Doç. Dr. ÖMER ŞİMŞEK
Proje No:	109O589
Proje Başlığı:	Lactococcus lactis'e Kitine Tutunma Yeteneği Kazandırılarak İmmobilize Sistemde Sürekli Nisin Üretimi
Proje Türü:	Araştırma
Proje Süresi:	30
Araştırmacılar:	NİHAT KARASU
Danışmanlar:	PER E. J. SARIS
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	PAMUKKALE Ü. MÜHENDİSLİK F. GIDA MÜHENDİSLİĞİ B.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/04/2010 - 01/10/2012
Onaylanan Bütçe:	162900.0
Harcanan Bütçe:	140716.06
Öz:	<p>Lactococcus lactis tarafından üretilen nisin gıda üretiminde koruyucu olarak kullanımını kısıtlayan en temel sorun, üretici suşlar tarafından düşük düzeyde üretiliyor olmasıdır. Bu çalışmada sürekli fermentasyon sistemlerinde üretici hücrelerin yoğunluğunun artırılması amacıyla, nisin üreticisi L. lactis hücrelerine kitinin yüzeyine bağlanma yeteneği kazandırılmıştır. Çalışmada Bacillus circulans'a ait kitinaz A1 enziminin Kitin Bağlanma Domaini (KBD); L. lactis'in farklı uzunluktaki PttP (153, 344 ve 800 aa) ve AcmA (242 aa) kol ve çapalarına füze edilerek, nisin üreticisi L. lactis hücrelerin duvarında ifade edilmiştir. ELISA sonuçları söz konusu hücrelerin duvarında füzyon proteinlerin başarıyla ifade edilebildiğini göstermiştir. Taramalı elektron mikroskopi görüntüleri, KBD'inin uzun PrtP kol ve çapası ile ifade edildiği L. lactis hücrelerin diğerlerine kıyasla kitine daha fazla tutunduğunu desteklemiştir. Ortam optimizasyonu ile en yüksek bağlanma %91 ve 94 oranında sırasıyla L. lactis PLAC7 ve PLAC8 suşlarında meydana gelmiştir. Nisin üreticisi hücrelere kazandırılan kitine bağlanma yeteneği, fermentasyon esnasındaki besiyeri değişikliğinde hücrelerin ortamda kalmasını sağlayarak ileri fermentasyon çevrimlerinde hücrelerin yüksek nisin üretimini devam ettirmesini sağlamıştır. Nitekim çalışmada L. lactis PLAC7 suşunun, Kitin İçeren Sürekli Nisin Fermentasyonu sisteminde (KİSNİFER) kullanılması ile yüksek dilüsyon hızında (0.9 h<sup>-1</sup>) ve yüksek şeker konsantrasyonunda (40 g L<sup>-1</sup>) 10500 IU mL<sup>-1</sup> rekor hacimsel nisin üretimine ulaşılmıştır. Sonuç olarak, çalışma kapsamında oluşturulan nisin üreticisi L. lactis suşları ve kurulan sürekli fermentasyon sistemi endüstriyel ölçekte nisin üretiminin geliştirilmesinde oldukça önemli katkı sağlayacaktır.</p>
Anahtar Kelimeler:	L. lactis, Nisin, Kitin Bağlanma Domaini, PrtP çapası, Sürekli fermentasyon
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Evet
Projeden Yapılan Yayınlar:	1- Immobilization of Nisin-producing Lactococcus lactis strains with surface displayed chitin binding domain (Bildiri)