



***Lactococcus lactis* ile solunum hemin ile stimüle edildi i
yari-kesikli fermentasyon sisteminde nisin üretiminin
optimizasyonu**

Proje No: 112O497

Yrd.Doç.Dr. Ömer M EK

Burcu KÖRD KANLIO LU

OCAK, 2014

DEN ZL

ÖNSÖZ

Gıdaların zararlı mikroorganizmalardan arındırılması en temel vazifemizdir. Gıda üretiminde antimikrobiyel karakterli ajanların kullanılması 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. yüzyılda keşfedilen nisın *Lactococcus lactis*ın bazı üyeleri tarafından sentezlenen antimikrobiyel aktiviteye sahip bir bakteriyosindir. Günümüzde nisın FDA tarafından GRAS (insan ve hayvan tüketiminde güvenilir) seviyesinde kullanılmaya izin verilmiş ilk bakteriyosin olup, 50'den fazla ülkede gıdaların üretiminde koruyucu olarak kullanılmaktadır.

Nisının gıda üretiminde kullanılması kısıtlayan ana unsur maliyetinin yüksek olmasıdır. Bu sorunun en temel nedeni ise, nisının üretici sular tarafından düşük düzeyde üretilmesidir. Yapılan çalışmalar nisın üretim miktarının hücre yoğunluğu ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Dolayısıyla fermentasyon sisteminde yüksek oranda aktif hücre yoğunluğu sağlanarak nisın üretiminin artırılması, maliyetin düşürülmesi açısından kritik önem taşımaktadır. Bu çalışmada yarı-kesikli fermentasyon ortamında hemin ilave edilerek aerobik solunuma tercih edilen nisın üreticisinde laktat üretimini baskılanarak ve ayrıca enerji kazanılması artırılarak yüksek nisın üretimi başarılmıştır. Ulaşılan bu gelişmenin endüstriyel ölçekte nisın üretim maliyetlerinin düşürülmesini ve dolayısıyla gıda sistemlerinde nisın 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 başkanlığına; TOVAG'a; deneysel çalışmaların yapılabilmesine imkân veren Pamukkale Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü Başkanlığına; birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğumuz Gıda Mühendisi sevgili Burcu KÖRDANLI'ya ve BIOLAB ekibine ve bu projenin gerçekleştirilmesinde emekleri olan herkese sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ömer M EK, Ocak 2014

Ç NDEK LER

Sayfa

ÖNSÖZ	ii
Ç NDEK LER.....	iii
TABLO L STES	v
EK L L STES	vi
ÖZET	viii
SUMMARY	ix
1. G R	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	3
2.1 Nisin	3
2.2. Nisinin Yap,sal Özellikleri	3
2.3 Nisinin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	7
2.4 Nisin Üretimini Etkileyen Faktörler	7
2.4.1 Karbon Kayna ,	7
2.4.2 Azot Kayna ,	9
2.4.3 norganik bile ikler	10
2.4.4 pH.....	11
2.4.5 Nisin miktar,	11
2.4.7 Oksijen.....	12
2.5 Nisin Üretim Yöntemleri.....	12
2.5.1 Kesikli sistemler.....	13
2.5.2 Yar,-kesikli sistemler	13
2.2.3 Sürekli sistemler.....	14
2.6 Nisin Üretiminde Yenilikçi Yakla ,mlar.....	14
2.6.1 Rekombinant nisin üreticileri	15
2.6.2 nkübasyon ortam,n,n de i tirilmesi.....	17
2.6.3 Metabolik yolun düzenlenmesi.....	17
2.7.Laktik Asit Bakterilerinde Solunum	19
2.7.1. Hemin	23
2.7.2. Heminin <i>L. lactis</i> solunumundaki rolü	23
2.7.3. Metabolik yolun oksijenli solunuma yönlendirilmesi.....	24
3. MATERYAL ve METOT.....	27
3.1. Bakteri Su lar, ve Kültür Ortamlar,	27
3.2. Ba ,ms,z De i kenlerin Çal, ma Aral,klar,n,n Belirlenmesi	27
3.3 Ba ,ms,z De i kenlerin Cevap Yüzey Yöntemi le Modellenmesi	29
3.4 Solunumun Hemin ile Te vik Edildi i Yar,-kesikli Fermentasyon Sisteminde Optimum Parametreler Kullan,larak <i>L. lactis</i> N8 Su unda Nisin Üretimi.....	30
3.5 Analitik Yöntemler	31
3.5.1 Nisin üretim miktar,n,n tespiti.....	31
3.5.2 Biyokütle miktar,n,n hesaplanmas,.....	31
3.5.3 Rezidü glukoz miktar,n,n tespiti.....	32
3.5.4 Laktik ve asetik asit miktar,n,n tayini	33
4. SONUÇLAR ve TARTI MA	35
4.1 Yar,-kesikli Fermentasyon Sisteminde <i>L. lactis</i> N8 Su unun Biyokütle Olu umu ve Nisin Üretimine Hemin Konsantrasyonunun Etkisi.....	35
4.2 Yar,-kesikli Fermentasyon Sisteminde <i>L. lactis</i> N8 Su unun Biyokütle Olu umu ve Nisin Üretimine Glukoz Konsantrasyonunun Etkisi.....	38

4.3 Yar,-kesikli Fermentasyon Sisteminde <i>L. lactis</i> N8 Su unun Biyokütle Olu umu ve Nisin Üretimine Çözümü Oksijen Konsantrasyonun Etkisi.....	41
4.4 Yar,-kesikli Fermentasyon Sisteminde Hemin ile Solunumun Te vik Edildi i <i>L. lactis</i> N8 Su unda Nisin Üretiminin Cevap Yüzey Yöntemi ile Optimizasyonu.....	44
5. GENEL SONUÇ VE ÖNER LER	63
6. KAYNAKLAR.....	64

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 Laktik asit bakterilerinin solunum yeteneklerine göre sınıflandırılması,	21
Tablo 3.1 Yarık kesikli fermentasyon sisteminde denenen bağımsız değişkenler ve çalınma aralıkları,	29
Tablo 4.1. Araştırılan parametreler ve deneysel aralıklar,	44
Tablo 4.2 Yarık kesikli fermentasyon sisteminde glukoz, hemin ve çözünmüş oksijen konsantrasyonlarının optimizasyonu için oluşturulan yüzey merkezli kompozit deneme deseni.	45
Tablo 4.3 Yarık kesikli fermentasyon sisteminde glukoz, hemin ve çözünmüş oksijen konsantrasyonlarının optimizasyonu için oluşturulan yüzey merkezli kompozit deneme deseninin varyans analizi.	46
Tablo 4.4 Yarık kesikli fermentasyon sisteminde glukoz, hemin ve çözünmüş oksijen konsantrasyonlarının optimizasyonu için oluşturulan yüzey merkezli kompozit deneme desenine ilave edilen denemeler.	50
Tablo 4.5 Yarık kesikli fermentasyon sisteminde glukoz, hemin ve çözünmüş oksijen konsantrasyonlarının optimizasyonu için oluşturulan yüzey merkezli kompozit geniletilmiş deneme deseninin varyans analizi.	51
Tablo 4.6 Yarık kesikli fermentasyon sisteminde glukoz, hemin ve çözünmüş oksijen konsantrasyonlarının optimizasyonu için tahmin edilen regresyon katsayıları,	52

EK L L STES

ekil 2.1 Do ada nadir bulunan dehidroalanin, dehidrobütirin, lantiyonin, ve -metil lantiyonin amino asitlerin sentez mekanizmas,.....	4
ekil 2.2 Nisin A, Z, Q ve U'nun yap,s,. Lantiyonin köprüleri A-E olarak gösterilmi tir.	5
ekil 2.3 <i>L.lactis</i> -de homofermantatif, heterofermantatif döngü ve solunum ko ullar,nda laktoz ve glukoz katabolizmas,	18
ekil 2.4 Solunum yetene ine sahip laktik asit bakterilerinde elektron ta ,ma sisteminin ematik gösterimi.....	22
ekil 2.5 Sitokrom cöye kovalent olarak ba l, hem grubunun yap,s,.....	23
ekil 3.1 Fermentasyon denemelerinin yap,lmas, için kurulan sistem	28
ekil 3.2. Standart nisin inhibisyon e risi	31
ekil 3.3 Standart hücre kuru a ,rl, , e risi	32
ekil 3.4 Standart glukoz konsantrasyonu e risi	33
ekil 3.5 Standart asetik asit konsantrasyonu e risi.....	34
ekil 3.6 Standart laktik asit konsantrasyonu e risi.....	34
ekil 4.1 Farkl, hemin konsantrasyonlar, kullan,larak yürütülen yar,-kesikli fermentasyonda hemin ile solunumu te vik edilmi <i>L. lactis</i> N8 su unun hücre kuru a ,rl, , (mg mL ⁻¹) (A) ve nisin üretimi (IU mL ⁻¹) (B).....	37
ekil 4.2 Farkl, glukoz konsantrasyonlar, kullan,larak yürütülen yar,-kesikli fermentasyonda hemin ile solunumu te vik edilmi <i>L. lactis</i> N8 su unun hücre kuru a ,rl, , (mg mL ⁻¹) (A) ve nisin üretimi (IU mL ⁻¹) (B).....	40
ekil 4.3 Farkl, çözünmü oksijen konsantrasyonlar, kullan,larak yürütülen yar,-kesikli fermentasyonda hemin ile solunumu te vik edilmi <i>L. lactis</i> N8 su unun hücre kuru a ,rl, , (mg mL ⁻¹) (A) ve nisin üretimi (IU mL ⁻¹) (B).....	43
ekil 4.4 Yar,-kesikli fermentasyon sisteminde glukoz ve hemin konsantrasyonlar,n,n birim biyokütlerde üretilen nisin miktar,na etkisini gösteren A) izohips e ri ve B) yüzey grafi i.	47
ekil 4.5 Yar,-kesikli fermentasyon sisteminde glukoz ve çözünmü oksijen konsantrasyonlar,n,n birim biyokütlerde üretilen nisin miktar,na etkisini gösteren A) izohips e ri ve B) yüzey grafi i.	48
ekil 4.6 Yar,-kesikli fermentasyon sisteminde hemin ve çözünmü oksijen konsantrasyonlar,n,n birim biyokütlerde üretilen nisin miktar,na etkisini gösteren A) izohips e ri ve B) yüzey grafi i.	49
ekil 4.7 Yar,-kesikli fermentasyon sisteminde glukoz ve hemin konsantrasyonlar,nn birim biyokütlerde üretilen nisin miktar,na etkisini gösteren düzeltilmi A) izohips e ri ve B) yüzey grafi i.	53
ekil 4.8 Yar,-kesikli fermentasyon sisteminde glukoz ve çözünmü oksijen konsantrasyonlar,n,n birim biyokütlerde üretilen nisin miktar,na etkisini gösteren düzeltilmi A) izohips e ri ve B) yüzey grafi i.	54
ekil 4.9 Yar,-kesikli fermentasyon sisteminde hemin ve çözünmü oksijen konsantrasyonlar,nn birim biyokütlerde üretilen nisin miktar,na etkisini gösteren düzeltilmi A) izohips e ri ve B) yüzey grafi i.	55
ekil 4.10 Heminli ve heminsiz yar, kesikli fermentasyonda olu an hücre kuru a ,rl, , (A) ve üretilen nisin miktar, (B).....	58

ekil 4.11 Heminli ve heminsiz yar,-kesikli fermentasyonda ortamdaki rezidü glukoz miktar,	60
ekil 4.12 Heminli ve heminsiz yar, kesikli fermentasyonda <i>L. lactis</i> N8 su u taraf,ndan üretilen laktik asit (A) ve asetik asit (B) miktar,.. ..	62

ÖZET

Bu çalışmada, *L. lactis* N8 su unda solunumun hemin ilavesiyle tevik edilen yarık kesikli fermentasyon sisteminde hemin, glukoz ve çözünmü oksijen konsantrasyonları bağımsız deneme desenleri dikkate alınarak nisin üretimi modellenmiştir. Bunun için öncelikle bağımsız deneme desenleri kullanılarak parametreler tespit edilmiştir daha sonra cevap yüzey yönteminin önerdiği deneme deseni uygulanmıştır. Sonuçta amada ise model e itli inden üretilen optimum hemin, glukoz ve çözünmü oksijen konsantrasyonları kullanılarak yarık kesikli fermentasyon sisteminde nisin üretimi gerçekleştirilmiştir.

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

Anahtar Kelimeler: *L. lactis*, Nisin, Hemin, Yarık kesikli, Solunum.

SUMMARY

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

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

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

1. G R

Bakterilerde hızla artan antibiyotik direnç yeteneği, yeni antimikrobiyel bileşiklerin araştırılması ve geliştirilmesini gerekli kılmaktadır. Ayrıca gıdaların korunması amacıyla kullanılan koruyuculara karşı oluşan tüketici tepkisi ve bunların çeşitli alerjik reaksiyonlara neden olması ile insan sağlığına tehdit edici boyutlarının bulunması, tüketici tercihlerini daha güvenli ve doğal antimikrobiyel ajanların kullanılması yönünde değiştirmektedir. Bu doğrultuda laktik asit bakterileri gibi insan tüketimi açısından güvenli bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinler, mikroorganizmalarla mücadelede yeni nesil antimikrobiyel ajanlar olarak önem taşımaktadır.

Bakteriyosin olan nisin de, tip I antibiyotik grubu içerisinde sınıflandırılmakta ve bir laktik asit bakterisi üyesi olan *Lactococcus lactis* tarafından üretilmektedir. Bu bakteriyosin oldukça geniş bir etki spektrumuna sahip olması nedeniyle gıda endüstrisinde koruyucu, medikal alanda ise terapötik ajan olarak kullanılmaktadır. Nisin FDA tarafından GRAS (insan ve hayvan tüketiminde güvenilir) ajan olarak tanımlanmış ve belgelendirilerek (E234) gıda üretiminde kullanıma izin verilmiştir. Bu bakteriyosin günümüzde süt ve süt ürünleri, konserve ürünler ve hazır çorbalar gibi gıdaların korunmasında ayrıca diyet macunu ve sargı bezlerini içeren çeşitli sağlık ürünlerinde kullanılmaktadır. Ancak nisin antimikrobiyel ajan olarak kullanılmaya halen sınırlı düzeydedir. Bu sorunun en temel nedeni ise nisin üretim maliyetinin yüksek olmasıdır. Çünkü nisin üretici hücreler tarafından düşük oranda üretilmekte, diğer yandan fermentasyon ortamına bağlı faktörler nedeniyle de üretim azalmaktadır.

Nisin endüstriyel olarak üretimi kısaca, üretici hücrelerin kesikli veya yarı-kesikli fermentasyon sistemlerinde geliştirilmesi ve takiben hücre tarafından sentezlenen nisin ortamdan saf olarak ayrılması ile gerçekleştirilmektedir. Fermentasyon sisteminde zamanla biriken metabolitler dolayısıyla üretici hücreler olumsuz etkilenmektedir. Buna ilaveten gelişen ortam şartlarının bozulması da hücrelerin yüksek sayılara ulaşmasını engellemektedir. Örneğin, *L. lactis* hücreleri tarafından üretilen laktik asit, hücreler üzerinde geri yönlü inhibisyon etkisi meydana getirmektedir. Ortamdaki laktat konsantrasyonunun aşırı yükselmesi hücrelerde protein denatürasyonunu hızlandırmakta, ayrıca *L. lactis* hücrelerinin bu olumsuz fermentasyon koşullarını tolere edebilmek için yüksek enerji sarfiyatında bulunmasına neden olmaktadır. Söz konusu bu olumsuzluklar, *L. lactis* hücrelerinde aktif nisin üretim hızının bozulmasına ve hatta hücre gelişiminin yavaşlayarak durmasına sebep olmaktadır. Bu bilgiler ışığında nisin kullanımının yaygınlaştırılması için yollarından birisi ya üretici hücrelerde daha yüksek nisin üretim verimine ulaşmak veya fermentasyon ortamında yüksek sayıda üretici hücre birikimi sağlamak olacaktır.

L. lactis hücreleri iki yönlü metabolik faaliyette bulunabilir. Bu bakteriler gelişme ortamına hemin ilavesi yapıldığında fermentasyondan aerobik solunuma geçi yapabilirler. Çünkü *L. lactis* hücrelerinin membran yapısında aerobik solunum zinciri için gerekli üç bileşen bulunmaktadır. Lakin bu bileşenlerden birisi olan sitrokrom oksidaz enziminin kofaktörü hemin molekülü *L. lactis* tarafından sentezlenememektedir. Dolayısıyla hemin ilavesi yapılarak *L. lactis* hücrelerinin aerobik solunuma yönlendirilmesi durumunda hücrelerin sayısal artışı, oksijen toleransı ve yüksek hücre stabilitesi sağlanabilmektedir. Bu çalışmanın hipotezini oluşturan bu temel kapsamında, nisin üreticilerin aerobik solunuma teşvik edilmesi, fermentasyon ortamında hem yüksek laktat birikimini engelleyerek hem de hücre sayı ve canlılık artırarak daha yüksek nisin üretimine ulaşmayı mümkün kılacaktır.

Bu çalışmanın temel amacı; fermentasyon ortamına hemin ve oksijen beslemesi yapılarak *L. lactis* hücrelerinde aerobik solunum yolunun teşvik edilmesi ile geri yönlü inhibisyon engellenerek yüksek nisin üretimine ulaşmaktır. Ayrıca çalışmada hemin içeren aerobik koşullara sahip yarı-kesikli fermentasyon sisteminde *L. lactis* hücreleri tarafından yüksek nisin üretimi sağlamak için gerekli olan hemin, oksijen ve glukoz konsantrasyonlarına cevap yüzey yöntemi kullanılarak optimize etmektir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 Nisin

Nisin, ilk kez ngiltere'de yapılan çalılmalarda laktokokların di er laktik asit bakterilerinin geli imlerini inhibe etti inin belirlenmesi sonucu saptanmıtır (Rogers 1928; Rogers ve Whittier 1928). Bu çalılmalarda tanımlanan antimikrobiyel bile i in 2s2 stabil, çözünebilen ve difüze olabilen bir yapıda oldu u belirlenmi tir. Daha sonra Whitehead (1933) bu bile i i izole etmi ve protein yapısında oldu unu kanıtlamıtır. Mastitis ile mücadele ve II. Dünya sava 2 sırasında ortaya çıkan penisilin kılıtı 2, bu bile ik üzerinde ara tırmaların yo unla masına yol açmıtır. İlk kez Mattick ve Hirsch (1944) bu bile i i konsantre etmeyi ba armıtır ve birçok bakteri üzerinde antimikrobiyel etkinli e sahip oldu unu saptamıtır.

Nisin, ticari önemi nedeni ile en yo un ara tırılan lantibiyotik olmu tur. Yapılan çalılmalarda nisinin toksik etkisinin sofratuzu ile e de er düzeyde (LD50 7 g kg⁻¹ vücut a 2rıtı 2) oldu u tanımlanmıtır (Hurst 1981). Gerek geni antimikrobiyel kapasitesi ve gerekse insan ve hayvan sa lıtına kar 2 olumsuz etki içermemesi bu lantibiyoti i endüstriyel uygulamalarda ön plana çıkartmıtır. Nisin FAO/WHO tarafından 1969 yılında güvenli bir do al gıda katkı2s2 olarak kabul edilmi tir. 1983te nisin EEC gıda katkı2 maddeleri listesine dahil edilmi ve E234 kod numarası verilmi tir. Nisin 1996dan itibaren Avrupa ülkeleri, Çin ve Amerika ba ta olmak üzere 50den fazla ülkede yaygın olarak kullanılmaktadır (Delves-Broughton vd. 1996).

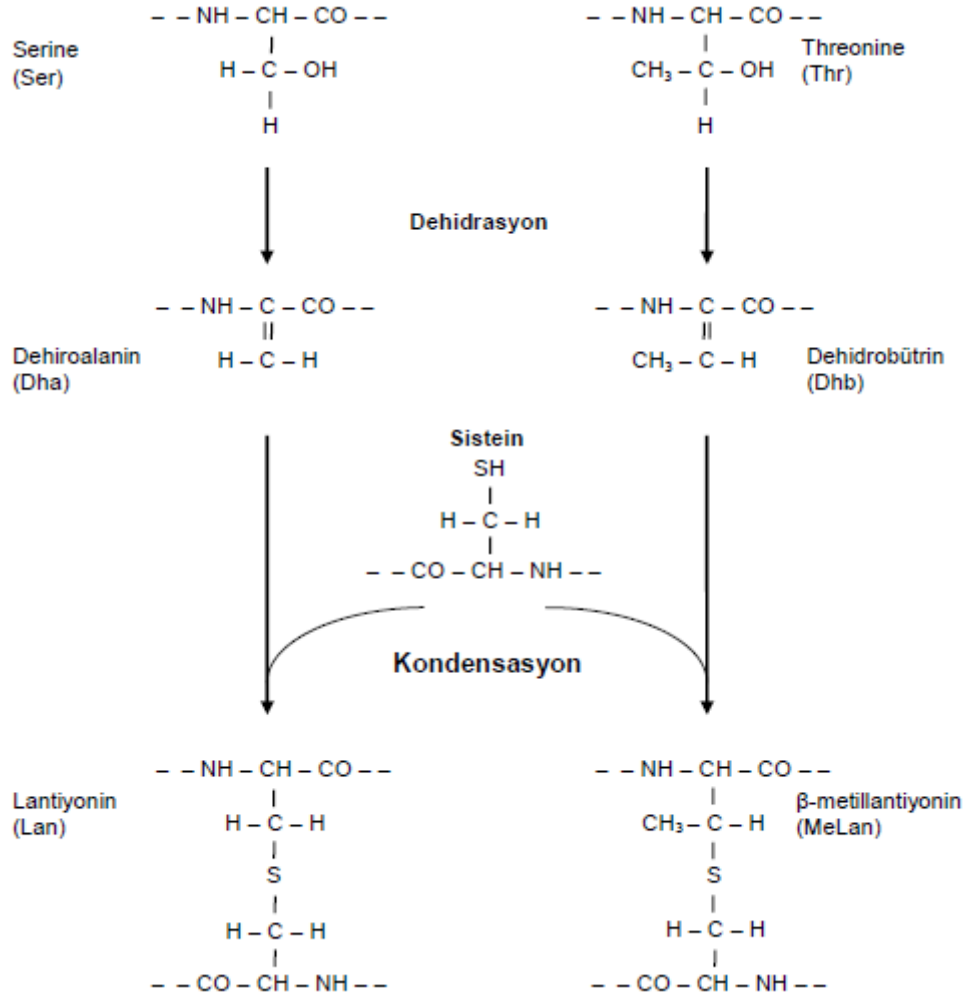
Birçok gram pozitif bakteri nisine kar 2 duyarlıdır. Ancak nisinin gram negatif bakteriler üzerinde de çok dü ük antimikrobiyel etkisi bulunmaktadır (de Vuyst ve Vandamme 1994). Nisinin gram pozitif bakterilerin vejetatif formları 2 yanında, *Clostridium* ve *Bacillus* sporlarına kar 2 da etkili oldu u saptanmıtır. Bu karakteristikleri nedeniyle nisin yüksek sıcaklıktan etkilenen ya da 2s2 i lem uygulanmayan asidik gıdalarda patojen ya da gıda bozulması 2 etmeni birçok bakterinin vejetatif (*Listeria* ve laktik asit bakterilerinin kontamine üyeleri gibi) ve spor formlarının (*Clostridium* ve *Bacillus* sporları 2 gibi) inhibisyonu amacı ile kullanılmaktadır (Hurst 1981, Abee vd. 1994, Delves-Broughton vd. 1996).

2.2. Nisinin Yapısal Özellikleri

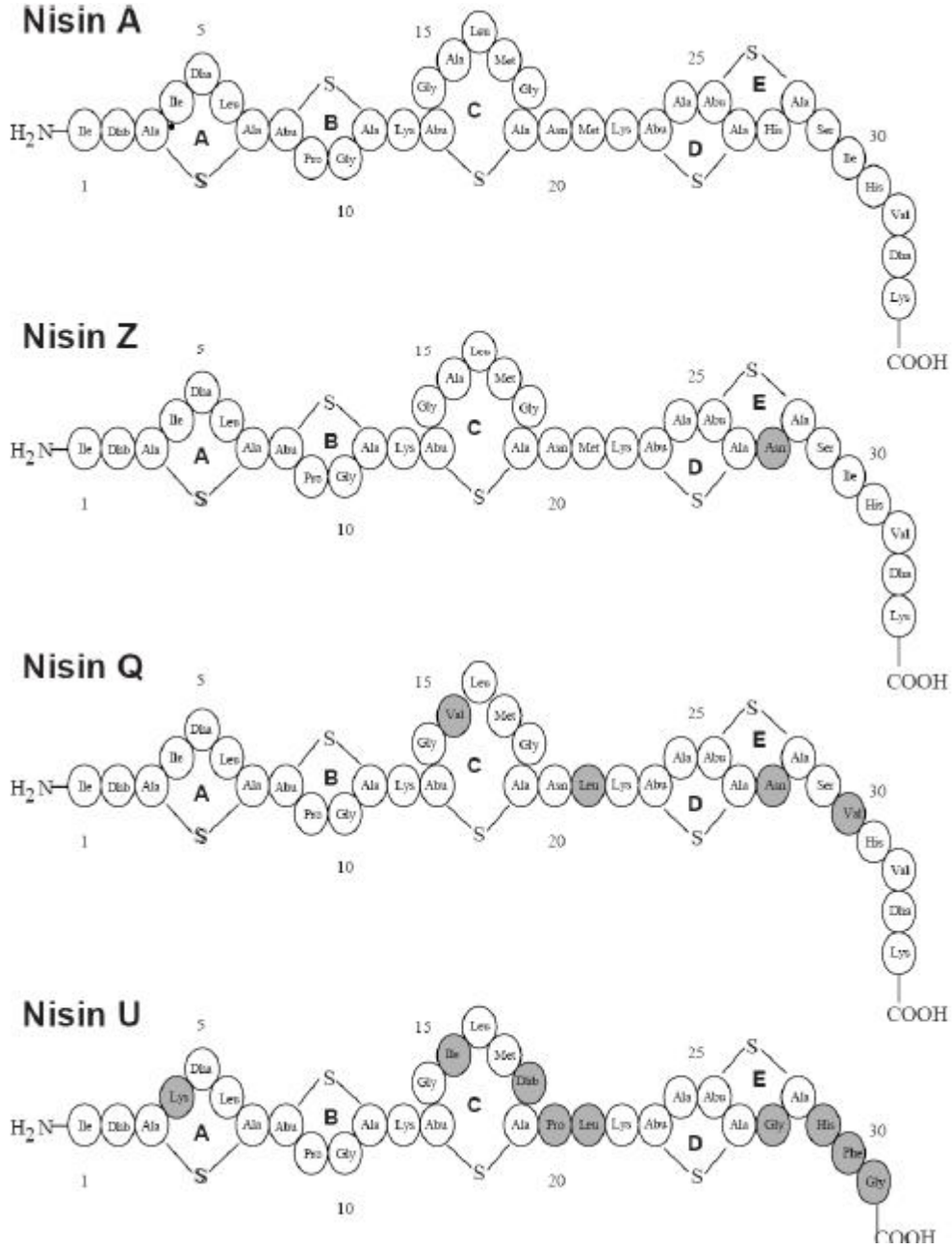
Nisinin primer yapısı 1971 yılında Gross and Morell tarafından yürütölen çalılmalarda neticesinde aydınlatılmıtır. Bu yapının do rulu u daha sonra, kütle ve NMR spektroskopisi çalılmalarda ile desteklenmi tir (Barber vd. 1988, Nielsen ve Roepstorff 1988, van de Ven vd. 1991, van den Hooven vd. 1993). Nisinin moleküler a 2rıtı 2 yakla ık 3350 dalton olup, yapısında 34 amino asit bulunmaktadır. Bu yapıta larının bazıları 2; lantiyonin, metillantiyonin (Met Lan), 2-3 dehidroksialanin (Dha) ve 2-3 dehidroksibutirin (Dhb) gibi do ada ender rastlanan amino asitlerdir. Nisinin yapısındaki bu lantiyoninler 5 adet halka yapısı 2

olu turmaktadır (Bu halkalar A, B, C, D ve E olarak isimlendirilmiştir) (ekil 2.1 ve 2.2).
 çerdi i lantiyonin köprülerinden dolayı, nisin lantibiyotikler sınıfına dahil edilmiştir (Schnell
 vd. 1988).

Bugüne kadar nisin A (Gross ve Morell 1971), nisin Z (Graeffe vd. 1991; Mulders 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 (ekil 2.2). Bu varyantlardan nisin A,
 Z, U üreticileri süt ve süt ürünlerinden (Gross ve Morell 1971, Graeffe vd. 1991, Mulders vd.
 1991), nisin Q üreticisi nehir suyundan (Zendo vd. 2003), nisin F üreticisi (Kwaadsteniet vd.
 2008) ise yaygın balıktan izole edilmiştir. Bu varyantlardan yalnızca nisin U, *L. lactis* suşlarında
 bir bakteri tarafından (*Streptococcus uberis*) üretilmektedir.



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



ekil 2.2 Nisin A, Z, Q ve U'nun yapıs². Lantiyonin köprüleri A-E olarak gösterilmi tir. Dha= Dehidroalanin, Dhb= Dehidrobütrin; Ala-S-Ala, lantiyonin; Abu-S-Ala, -metil lantiyonin. Varyantlarda Nisin A'dan farklı olan amino asitler gri tonla i aretlenmi tir (Gross ve Morell 1971; Chatterjee vd. 2005; Wirawan vd. 2006).

Nisin varyantları arasındaki temel farklılık, primer yapıda bazı pozisyonlarında görülen amino asit değişimleridir. Nisin Z, nisin A'ın farklı olarak 27. pozisyonda histidin yerine asparajin aminoasitini içermektedir (Graeffe vd. 1991, Mulders vd. 1991). Nisin Q'nun nisin Z'ye göre üç amino asit (Val 15, Leu 21, Val 30) bakımından farklı bulunmuştur. Bugüne kadar bu varyant üreticisi olan sadece bir su tanımlanmıştır (Zendo vd. 2003). *Streptococcus uberis* tarafından üretilen nisin U; yaygın rastlanılan nisin A ve nisin Z'ye göre 9 amino asit (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 amino asit içermektedir. Bununla birlikte bu varyantta da modifiye amino asitlerin ve lantiyonin köprülerinin yerleşimi, diğer varyantlarla benzerdir. Son olarak yaygın olarak izole edilen *L. lactis* tarafından üretilen nisin F, nisin A ve nisin Z'nin sadece 30. pozisyondaki aminoasitin valin olmasıyla farklıdır. Ancak bu varyanta ait lantiyonin köprülerinin yerleşimi henüz aydınlatılmamıştır (Gross ve Morell 1971, Graeffe vd. 1991, Mulders 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. amino asitlerin tiyoeter bağları ile bağlanması sonucu, dönme pozisyonları olmaktadır. A ve C halkaları ise, dehidrogen yapılar göstermesi nedeniyle net olarak tanımlanamamıştır.

Nisin molekülü oldukça esnek olmasına rağmen, sulu ortamda amfipatik yapıda iki farklı bölge içermektedir. Birinci bölge A, B, C lantiyonin halkalarını içeren Ala 3-Ala 19 amino asitlerinden oluşur ve birbirine sarılmıştır. D ve E lantiyonin halkalarını içeren Ala 23-Ala 28 amino asitlerinden meydana gelir. N- ve C- uçları ayrıca %ABC+ ve %DE+ bölgelerini birleştirir ve Met 21 pozisyonunda bulunan esnek bir %ante e+ yapısına sahiptir. Nisin molekülünde hidrofilik ve yüklü amino asitler çoğunlukla C- ucağa yer alırken, N- uçtaki aminoasitlerin önemli bir kısmı hidrofobik yapıdadır. Burada sadece, Lys 12 yüklü bir amino asittir. Bu nedenle nisin molekülünün amfipatik özelliğinden söz etmek mümkündür (Palmer vd. 1989).

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

2.3 Nisinin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Nisin molekülü katyonik özellikte olup, nisin A'nın pozitif net yükü 5, diğer varyantların ise 4'dür. Bu moleküllerin tümü alkali ortamda izoelektrik noktaya sahiptir (Jung, 1991). Nisin molekülü, yapısında aromatik amino asitlerin bulunmaması nedeniyle 260 nm ve 280 nm dalga boyunda %20 absorpsiyonu göstermez. Nisin molekülünün stabilitesi, çözünürlüğü ve biyolojik aktivitesi, pH değerinin artmasıyla birlikte azalmaktadır. Özellikle alkali ortamlarda çözünürlüğü tamamen düşmektedir. Örneğin, ticari kullanımda bulunan nisin A'nın çözünürlüğü pH 2'de 57 mg mL⁻¹ iken, pH 6'da 1.5 mg mL⁻¹'e düşmektedir. pH 8.5'in üzerinde ise bu değer 0.25 mg mL⁻¹ civarındadır (Hurst 1981, Liu ve Hansen 1990). Alkali ortamlarda, molekül içi veya moleküller arasında kimyasal modifikasyonlar nedeniyle, nisin molekülünde geri dönüşümsüz inaktivasyon meydana gelmektedir. Özellikle hidroksil (OH⁻) iyonlarının etkisiyle dehidro amino asitler modifiye olabilmektedir (Liu ve Hansen 1990). Nisin Z ve nisin Q, nisin A'ya göre daha fazla çözünebilirliğe sahiptir. Bu durum asparajin amino asitinin 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 -kimotripsin ve proteinaz K uygulamalarına karşı duyarlıdır (de Vuyst ve Vandamme 1994, Motlagh vd. 1991).

2.4 Nisin Üretimini Etkileyen Faktörler

Öncü nisin molekülü, *L. lactis* hücreleri tarafından aktif büyüme fazının başında sentezlenmekte ve logaritmik üreme fazının sonunda üretim düzeyi en yüksek seviyelere çıkmaktadır (de Vuyst ve Vandamme 1992, de Vuyst ve Vandamme 1993). Bu durum nisin molekülünün ikincil metabolit davranış göstermesine rağmen aslında primer metabolit kinetiğine sahip olduğunu ispatlamaktadır. Nisin üretim miktarı olan biyokütle miktarı ile doğrudan orantılıdır. Bu nedenle; biyokütle olumunda önemli olan tüm faktörler (pH, karbon, azot ve fosfat kaynakları, katyonlar ve sıcaklık değerleri ile ortamda bulunan nisin miktarı vb.) nisin üretimi üzerinde de etkilidir. (de Vuyst ve Vandamme 1992, de Vuyst ve Vandamme 1993, Matsusaki vd. 1996, Bertrand vd. 2001, Lv vd. 2004a, Lv vd. 2004b, Pongtharangkul ve Demirci 2006, Gonzales vd. 2010, Fan vd. 2012).

2.4.1 Karbon Kaynağı

Fermentasyon ortamlarında seçilen karbon kaynağının türü, doğrudan hücre gelişimini etkilemesi ve buna bağlı olarak da nisin üretimini etkilemesi yönünden önemli bulunmuştur ve bu konu ile ilgili literatürde birçok çalışmaya yapılmıştır (de Vuyst ve Vandamme 1992, Lv vd. 2004a). Karbon kaynağının gelişme ortamında yüksek oranda bulunması, mikrobiyal gelişme ve nisin üretimi üzerinde baskılayıcı etki yapmaktadır. Bu nedenle farklı türlerine ve bunların başlangıç konsantrasyonlarına bağlı olarak, nisin üretim miktarı da değişmektedir.

(Pongtharangkul ve Demirci 2006). Birçok ara tırmac², sakkaroz ve laktoz ba ta olmak üzere; glukoz, galaktoz, ksiloz, maltoz ekerlerini içeren besiyeri ortamlar² kullanarak, nisin üretim düzeylerini ve nisin biyosentezinin moleküler detaylar² incelemi tir (de Vuyst ve Vandamme 1992, Amiali vd. 1998, Chandrapati ve O'Connell 1999, Lv vd. 2004a, Liu vd. 2005, Cheigh ve Pyun 2005, Pongtharangkul ve Demirci 2006).

Nisin üretimi ile sakkaroz fermentasyonu arasındaki ili ki, ilk olarak 1951'de Hirsch and Wheeler tarafından tanımlan² tır (de Vuyst ve Vandamme 1992, Lv vd. 2004a, Lv vd. 2004b, Cheigh vd. 2002). de Vuyst and Vandamme (1993) tarafından yürütülen bir çal² mada, 27 farklı *L. lactis* subsp. *lactis* su unda nisin üretim kapasiteleri incelenmi ve sakkaroz fermentasyon yetene inin, nisin üretimi ile ba lantı² oldu u gösterilmi tir. pH kontrollü ko ullarda sakkaroz konsantrasyonu 10 g L⁻¹ den 40 g L⁻¹ ye ç² karı² d² ında en yüksek nisin miktar² 3267 IU mL⁻¹ olarak hesaplan² tır. 40 g L⁻¹ in üzerindeki konsantrasyonlarda sakkarozun nisin üretimi üzerinde baskılayıcı² etki olu turdu u sonucuna ula m² lardır.

Lv vd. (2005) kesikli ve yar² kesikli fermentasyon sistemlerinde sakkarozun nisin üretimi ve hücre geli imi üzerine etkisini ara tırdıkları² çal² mada; kesikli sistemde ba langıç sakkaroz konsantrasyonunun 30 g L⁻¹ yi a mas² durumunda, nisin aktivitesinin hızlı² bir dü ü gösterdi ini, ancak biyokütle miktar² n etkilenmedi ini saptam² tır. Temel besiyerine % 0.5 sakkaroz ilavesini esas alan bir di er denemede ise, kontrolsüz ko ullarda 2048 IU mL⁻¹ nisin miktarına ula şım² tır (Cheigh vd. 2002).

Nisin üretiminde yaygın olarak kullanılan di er bir karbon kayna ı ise laktozdur. Nisin üretici *L. lactis* su ların² do al habitatın² süt olmas², laktozu di er karbon kaynaklar²ndan daha avantajlı² kılmaktadır. Ayrıca süt ve süt ürünlerinin i lenmesinden aç² a ç² kan peyniraltı² suyunun nisin üretiminde kullanı² m olanaklar² birçok ara tır² c² tarafından çal² şım² ve nisin biyosentezinin bu ortamdaki davranı² şı belirlenmi tir. (Bertrand vd. 2001, Cheigh vd. 2002, Liu vd. 2003). Nisin üretimi üzerine farklı ekerlerin etkisinin kıyaslan² d² bir çal² mada, en yüksek verimin laktoz varlı² ında meydana geldi i saptanm² tır. Bu çal² mada, temel besiyerine % 0.5 oranında laktoz ilave edilmesi sonucu 16384 AU mL⁻¹ nisin verimi sa lanm² tır. Aynı denemenin sakkaroz, glukoz ve galaktoz varlı² ında yürütülmesi halinde ise, 8 kat daha dü ük de erler elde edilmi tir (Cheigh vd. 2002). Benzer ekilde, laktoz içeren peynir altı² suyunun kullanı² ldı² kesikli ve sürekli fermentasyon sistemlerinde nisin üretimindeki verimin 460. 20500 IU mL⁻¹ aras²nda gerçekleşti i tespit edilmi tir (Amiali vd. 1998, Desjardins vd. 2001, Bertrand vd. 2001, Liu vd. 2005).

Mitra ve arkadaş lar² (2010) yaptıkları² bir çal² mada soya kesi i suyunun nisin üretiminde alternatif karbon kayna ı olarak kullanılabirli ini ara tırm² lar, kontrol grubu olarak Man-

Rogosa-Sharpe (MRS) hazır sıvı besiyerini kullanarak fermentasyon gerçekleştirildi. Çalınan gruplar arasında elde edilen biyokütle ve nisin verimleri kıyaslandığında, soya keşisi suyu hücre kuru ağırlığı ve nisin üretimi sırasıyla $2,18 \text{ g L}^{-1}$, $619,2 \text{ mg L}^{-1}$ (24767 IU mL^{-1}) iken, MRS broth ortamında bu değerler 2.17 g L^{-1} ve 672 mg L^{-1} olarak bulunmuştur. Sonuç olarak alternatif substrat kaynağı olabilmesi açısından daha önce denemeleri yapılmış olan peyniraltı suyu ($92,9 \text{ mg L}^{-1}$), cull patates ($88,7 \text{ mg L}^{-1}$), arpa özütü (1233 IU/ml) ve hidrolize niasta (1600 IU/ml) dan daha fazla nisin üretim verimine ulaşımıştır.

2.4.2 Azot Kaynağı

Nisin üretici *L. lactis* suşları, gelişebilmeleri ve nisin üretebilmeleri için, çok sayıda organik ve inorganik bileşene ihtiyaç duyar. Organik bileşikler içerisinde azot kaynakları, hücrelerin gelişebilmeleri için hayati rol oynamaktadır. Özellikle laktokok suşları, besin ortamında maya özütü, proteaz pepton, kazein pepton gibi kompleks azot kaynaklarının bulunması halinde iyi bir gelişme göstermektedir. Bakteriyel gelişimdeki önemleri nedeniyle çeşitli azot kaynaklarının, özellikle peptitlerin ve amino asitlerin nisin üretimi üzerine etkileri, yoğun bir şekilde çalışılmıştır (de Vuyst ve Vandamme 1993, de Vuyst 1995, Kim vd. 1997a, Cheigh vd. 2002, Li vd. 2002, Vazquez vd. 2004). Bu yönde yapılan ilk çalışma, de Vuyst and Vandamme (1993) farklı azot kaynaklarının % 2 sakkaroz bulunan besiyerinde, % 1 oranında kullanılmasıdır. Çalışma maya özütü, pepton, et özütü, kan, balık ve soya unlarının kullanılmaması durumunda, yüksek nisin üretimi ve biyokütle oluşumunun gerçekleştirildiği belirlenmiştir. En yüksek nisin üretimi % 3 pamuk çiğirtili ve % 4 soya ununun kullanılmasıyla elde edilmiştir (2500 IU mL^{-1}). Bu çalışma kazein hidrolizatı, mısır unu ve malt özütü ise nisin üretimi için uygun azot kaynakları olarak tanımlanmamıştır.

Nisin yanlarında diğer bakteriyosinlerin üretimi üzerine de etkili olduğu tespit edilmiştir. Diğer azot kaynağı ise, maya özütüdür (de Vuyst 1995, Kim vd. 1997a). Maya özütünün M17 laktöz besiyerine %1 oranında ilave edilmesi durumunda, diğer azot kaynaklarına göre 2 kat daha fazla nisin üretiminin meydana geldiği belirlenmiştir. Ayrıca maya özütü oranının % 1'den % 3'e çıkarılması durumunda, nisin üretiminin ilave özüt oranı ile paralel bir şekilde yükseldiği, ancak bu seviyeden sonra üretimin sabitlendiği tespit edilmiştir. Bu nedenle maya özütünün nisin üretimi için tek başına ideal azot kaynağı olabileceği ileri sürülmüştür (Cheigh vd. 2002). Maya özütü; serbest amino asitler ve kısa peptitlere ilave olarak, hücre gelişiminde önemli faktörleri de içerdiği için, nisin üretiminde diğer azot kaynaklarından daha etkin bulunmuştur (de Vuyst 1995, Cheigh vd. 2002).

Nisin üretimine farklı özellikteki aminoasitlerin de etkili olduğu belirlenmiştir (de Vuyst 1995, Vazquez vd. 2004). Öncü peptitte yer almayan amino asitlerin (aspartik asit, glisin, hidroksi-prolin, lizin, felinalanin, prolin, triptofan ve tirozin) sentetik besiyerinde % 0.1 oranında

kullanılması durumunda, hücre gelişiminin ve nisin üretiminin de in vivo tespit edilmiştir. Hatta prolin, hidroksprolin, aspartik asit ve lizin, nisin üretimini durdurdu ve saptanmıştır. Aynı zamanda öncül peptitte yer alan amino asitlerin (serin, treonin ve sistein) hücre yoğunluğu ve nisin üretim seviyesi üzerine etkili olduğu ve sentetik besiyerinde % 0.1 oranında kullanılmaları durumunda nisin üretim düzeyini % 50 oranında artırdıkları belirlenmiştir. Ancak aynı amino asitlerin başlangıç konsantrasyonlarının % 0.5'e geçmesi durumunda üretici hücrelerin gelişimi engellenmiştir (de Vuyst 1995). Klasik yöntemlerle sürekli nötrale edilen sistemlerde yürütülen nisin üretimlerinde, sistein ve triptofanın aktivatör, prolinin ise baskılayıcı rolünün olduğu saptanmıştır (Vazquez vd. 2004).

2.4.3 inorganik bileşikler

Nisin üretimi üzerine etkisi denenilen ilk inorganik bileşik fosfat olmuştur. de Vuyst and Vandamme (1993) çalışmalarında, farklı fosfat kaynaklarının kesikli sistemlerde nisin üretimi üzerindeki etkilerini araştırmıştır. Bu fosfat kaynakları içinde, KH_2PO_4 'ün en etkili bileşik olduğu tespit edilmiştir. KH_2PO_4 'ün başlangıç konsantrasyonunun % 5 düzeyinde kullanılması ile nisin aktivitesinin 3500 IU mL^{-1} gibi yüksek bir değere ulaşması saptanmıştır. Ancak bu seviyeden sonra, hem nisin miktarı ve hem de biyokütle yoğunluğuyla azalmıştır. Yapılan başka bir çalışmada ise, aynı KH_2PO_4 konsantrasyonlarının *L. lactis* IO-1 suşunda nisin Z üretimi üzerinde etkili olmadığı belirlenmiştir. Aynı zamanda KH_2PO_4 'ün aksine, 0.1-0.2 M CaCl_2 ilavesinin nisin Z üretiminde % 20 artışa neden olduğu saptanmıştır. Ayrıca % 0.1 (v/v) Tween 80'ün kullanılması sonucu nisin aktivitesinde % 30 artıştanın sağlandığı (Matsusaki vd. 1996).

Nisin üretiminde fosfatın temel rolü, ortamın tamponlanması ve hücre gelişim ajanı olarak in vivo görmesi ile açıklanmaktadır (de Vuyst ve Vandamme 1992, Li vd. 2002, Liu vd. 2003). Nitekim yüksek fosfat konsantrasyonu, ATP yoğunluğunu artırarak hücrelerin yüksek enerji seviyesinde bulunmasını sağlamaktadır. Ca^{2+} 'ın nisin üretimindeki etkisi ise, öncül nisin molekülünü modifiye eden enzimlerden NisP peptidazların aktivasyonuna yol açmasından kaynaklanmaktadır. Çünkü bu enzimler üzerinde, Ca^{2+} iyonlarının bağlanabileceği bölgeler bulunmaktadır. Diğer taraftan Ca^{2+} iyonları üretici suşlarda lipid membran bütünlüğünün korunmasında da rol almaktadır. Bilindiği gibi fosfolipit yapıları lantibiyotiklerin temel hedef bölgeleridir (Matsusaki vd. 1996). Tween 80, üretilen nisin ortamındaki çeperlere tutunmasını engelleyerek çözünürlüğünü artırmakta ve bu yolla nisin üretimini artırmaktadır (Liu vd. 2005).

2.4.4 pH

Nisin üretiminde de, di er bakteriyosinler ile benzer ekilde, optimal pH aralı 2 5.5-6.8 olarak saptanmıştır (de Vuyst ve Vandamme 1992, Matsusaki vd. 1996, Cheigh vd. 2002, Liu vd. 2005, Pongtharangkul ve Demirci 2006). *L. lactis* IO-1 su u için, ksiloz bulunan ortamda en verimli nisin üretimi pH 6.0'da gerçekleşirken, glukoz bulunan ortamda bu değere pH 5.5'de ulaşmıştır (Matsusaki vd. 1996). *L. lactis* A164 suunun kullanıldığı bir di er çalıda ise, laktoz içeren ortamda en yüksek nisin üretimi pH 6.0'da gözlenmiştir (Cheigh vd. 2002).

Bakteriler, gelişme ortamındaki yüksek pH değerlerine karşı canlılığını koruyabilse de, sitoplazmik pH'nın, birçok metabolik yol için optimal olan nötral değerlerden uzaklaşması olumsuz durum yaratmaktadır. Bu nedenle birçok asit toleransı laktik asit bakterisinde olduğu gibi *L. lactis* hücrelerinde de iç pH, dış pH'daki dü ü e başlı olarak 5. 15 dakika içinde ayarlanmakta ve böylece sabit bir pH gradienti sağlanmaktadır (Siegumfeldt vd. 2000). Ancak düşük pH seviyelerinde metabolizmaya ait bazı enzimler inhibe edilmektedir. Ayrıca hücre gelişimi, ekerlerin katabolizması sonucu oluşan enerjinin ATPaz tarafından sitoplazmik alkalizasyon için kullanılması nedeniyle, tamamen durmaktadır (Even vd. 2002). Nitekim Guerra ve Pastrana (2003) *L. lactis subsp. lactis* de ortam pH'nın 5'den altına düşmesi sonucunda, hem hücre gelişiminin hem de nisin üretiminin durdu unu saptamıştır.

Nisin üretimi ile ortam pH'sı arasındaki ilginç bir ilişki; ortam pH'nın nötral pH'ya yaklaşıldığında, üretilen nisin, üretici suun hücre membranına tutunmaktadır. pH'nın 6'ya ayarlanmasıyla nisin; üretici suun membran yapısının katyonik do asına başlı olarak, hücre duvarına tutundu u belirlenmiştir. Aynı ortamda pH'nın 5'den altına düşürülmesi durumunda da hücre duvarına tutunan nisin tekrar ortama salındığı saptanmıştır (Yang vd. 1992, Guerra ve Pastrana 2003).

2.4.5 Nisin miktarı

Nisin üretimi, ortamda yüksek konsantrasyonda nisin bulunması durumunda inhibe olmaktadır. Bu durum üretici sularda, maksimum dirençliliğin sağlanabilmesi için sınırlı olarak bulunmasından kaynaklanmaktadır (Kim vd. 1997a, Qiao vd. 1997, Kim vd. 1998). Örneğin, *L. lactis* N8 ve LAC48 sularının dirençlilik gösterebildiği maksimum nisin değerleri, sırasıyla 1000 IU mL⁻¹ ve 5000 IU mL⁻¹ olarak ölçülmüştür (Qiao vd. 1997). Nisin miktarının etkisi en fazla kesikli ve yarı kesikli fermentasyonların son evresinde görülmektedir. Nitekim birçok çalıda nisin üretiminin ulaşan maksimum değerden sonra dü tü ü belirlenmiştir. Bu durumun en önemli nedenlerinden biri, duran fazda bulunan hücrelerin yüksek nisin konsantrasyonlarından etkilenmesidir (de Vuyst ve Vandamme 1992, de Vuyst ve Vandamme 1993, Matsusaki vd. 1996, Bertrand vd. 2001, Lv vd. 2004a, Lv vd. 2004b, Pongtharangkul ve Demirci 2006).

2.4.7 Oksijen

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

Buna kar ın, *Lactobacillus amylovorus* tarafından üretilen amilovorin ve *L. lactis* tarafından üretilen nisin Z miktarlarında oksijenli ortamlarda artı gözlemlenmi tir (de Vuyst vd. 1996, Chinachoti vd. 1997). Sitrat pozitif olan *L. lactis*ın NADH oksidaz enzimini kullanarak NADH'ları NAD⁺ya okside edebilmesinin (Bassit vd. 1993) bakteriyosin üretimi üzerinde önemli etkisi vardır (de Vuyst vd. 1996, Amiali vd. 1998, Cabo vd. 2001, Jensen vd. 2001, Neves vd. 2002, Papagianni vd. 2012). Ayrıca nisin aerobik ko ullarda üretildi inde ortamdaki proteolitik enzimlerin zararlı etkilerinden daha fazla korunmakta, bu da oksijenli ortamda bu enzimlerin aktivitelerinde gerçekte en azalmalar ile sa lanmaktadır.

*L. lactis*ın kesikli fermentasyonu boyunca nisin üretim miktarındaki de i imin geli me ortamının çözünümlü oksijen yüzdesi ile ilgisinin ara tırıldında bir çalı mada, %60 çözünümlü oksijen içeren ortamda gerçekte tirilen kesikli fermentasyonda kontrol grubuna oranla 8 kat daha yüksek nisin verimi (40960 AU mL⁻¹) elde edilmi tir (Amiali vd. 1998). Ortamda biriken laktik asit konsantrasyonunda da kontrol ortamına kıyasla %33 azalma oldu u, di er yandan asetik asit, asetoin ve etanol konsantrasyonlarında ise artı lar oldu u gözlemlenmi tir.

2.5 Nisin Üretim Yöntemleri

Nisin üretimi ilk olarak kesikli sistemlerle çalı ılmı tır (de Vuyst ve Vandamme, 1992). Daha yüksek ürün verimi elde etmek amacıyla devam eden ara tırmalarda yarık-kesikli ve sürekli sistemler olu turulmu ve denenmi tir (Hull ve Gibbson 1997, Amiali vd. 1998, Guerra ve Pastrana 2001, Sonomoto vd. 2000, Scannell vd. 2000, Desjardins vd. 2001, Tolonen vd. 2004). Bu yeni sistemler olu turulurken, nisin üretimi üzerine etkili olan substrat kompozisyonu, sıcaklık, pH ve ortamda biriken nisin miktarı gibi faktörler göz önünde bulundurulmu tur. Bu faktörlerden nisin üretimi üzerinde olumsuz etki olu turabilecek stres ko ulları uygun modifikasyonlarla en aza indirgenmeye çalı ılmı tır. Üretici su un canlılığının ve gelişiminin arttırılması, fermentasyon ortamının kompozisyonundaki de i imler ve ortamda biriken metabolitlerin uzaklaştırılması gibi konular bu modifikasyonlardan bazılarıdır (Hull ve Gibbons 1997, Kim vd. 1997a, Shimizu vd. 1999, Bertrand vd. 2001, Yu vd. 2002, Guerra ve Pastrana 2003, Lv vd. 2004a, Lv vd. 2004b, Tolonen vd. 2004, Liu vd. 2005, Pontharangkul ve Demirci 2006, Papagianni vd. 2007, Wu vd. 2008).

2.5.1 Kesikli sistemler

Kesikli sistemlerde nisin üretimi ilk kez Hirsch and Wheater tarafından, 1951'de $4 \text{ m}^2 \text{ t}^{-1}$ tır. Bu sistemlerde nisin üretimi, hücre gelişimi ile bağlantılı olarak artmaktadır. de Vuyst and Vandamme (1992) tarafından, bağlantılı olarak konsantrasyonunun 10 g L^{-1} sakkaroz olarak alındığı kesikli fermentasyonda *L. lactis* subsp. *lactis* NIZO 22186 suyunun üssel fazda (4-8. saatler arası) 0.66 h^{-1} oranında hızlı bir hücre gelişimi gösterdi ve buna bağlı olarak nisin üretiminin de yükselerek 1400 IU mL^{-1} değerine ulaşmış olarak belirlenmiştir. Ancak aynı fermentasyonun 8. saatinden sonra hücre gelişiminin durdu ve nisin üretiminin de azalmaya başladığı tespit edilmiştir. Kesikli sistemler, hücrelerin doğal gelişim eğilimlerini gösterdikleri ortamlardır. Bu nedenle fermentasyon ortamında tükenen besin elementleri ve oluşturulan metabolitler, üretici hücre üzerinde oldukça etkilidir. Bağlantılı olarak sakkaroz konsantrasyonunun 40 g L^{-1} 'ye yükseltildiği diğer uygulamalarda biyokütle gelişimi $2.1 \text{ g kuru a} \text{ t}^{-1}$ olan, $4.1 \text{ g kuru a} \text{ t}^{-1}$ 'ye kadar yükseldi ve 2371 IU mL^{-1} nisin aktivitesine ulaşmış tır (Lv vd. 2004b). Ancak karbon kaynağının artmasıyla bile, üremenin durma fazında meydana gelen nisin üretimindeki düşüşü engelleyememektedir. pH kontrollü kesikli sistemlerde sakkarozun karbon kaynağı olarak kullanılmasıyla $2.34 \text{ g kuru a} \text{ t}^{-1}$ hücre yoğunluğunda elde edilirken, nisin aktivitesi 1793 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 suyunun kullanılması durumunda, üretilen nisin miktarı 2658 IU mL^{-1} olmuştur (Lv vd. 2005).

2.5.2 Yarı-kesikli sistemler

Spesifik nisin üretiminin artması ve üretici suyunun aktif fazının uzatılabilmesi amacıyla yarı-kesikli fermentasyon sistemleri devreye sokulmuştur (Kim vd. 1997b, Amiali vd.1998, Guerra ve Pastrana 2003, Lv vd. 2004a, Lv vd. 2004b, Papagianni vd. 2007). Bu sistemlerde; diğer üretim teknolojileri için bağlantıda olması gereken yüksek besin konsantrasyonu ve fermentasyon süresince oluşan laktik asit miktarının üretici su üzerindeki olumsuz etkisinin azaltılması hedeflenmiştir (Lv vd. 2004a, Lv vd. 2004b). 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 g L^{-1} ve 135 g L^{-1} sakkaroz ve NaOH ilavesi ile hazırlanmıştır. Fermentasyon süresince son sakkaroz konsantrasyonu 40 g L^{-1} olacak şekilde, bu çözeltiden besleme yapılmıştır. Çalışmada en yüksek biyokütle oranı $4.2 \text{ g kuru a} \text{ t}^{-1}$ olarak elde edilirken, 5010 IU mL^{-1} gibi oldukça yüksek nisin aktivitesine ulaşmış tır. Karbon kaynağının kontrollü olarak beslendiği glukostat bir çalışmada; ortamda, 10 g L^{-1} glukozun bulunması halinde 6100 IU mL^{-1} gibi yüksek nisin üretim verimine ulaşmış, 25 g L^{-1} glukoz oranının

a 2mas² durumunda ise verimin h2zla dü tü ü rapor edilmi tir (Papagianni vd. 2007). Yar² kesikli fermentasyonda karbon kayna² besleme h2z2n2n belirlenmesini hedefleyen bir di er 2al² mada, 190 g L⁻¹ sakkaroz içeren solusyondan fermentör ortam2na saatte 10 mL beslendi inde, nisin üretim oran2n2n kesikli üretime göre % 51 art² gösterdi i belirlenmi tir (Wu vd. 2008). Fakat kesikli sistemlerde görülen maksimum verimden sonraki dü ü , bu sistemde de meydana gelmi tir (Lv vd. 2004a). Nisin üretim miktar2nda meydana gelen dü menin temel kayna², nötralizasyondan dolayı² olu an laktat2n ve ortamda biriken nisinin üretici hücre üzerinde olu turdu u olumsuz etkidir (Hull ve Gibbons 1997, Shim2zu vd. 1999, Tolonen vd. 2004). % 1 glukoz içeren minimal besiyeri ortam2nda, *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 su u kullan2larak yürütölen yar²-kesikli nisin üretim sisteminde; NaOH yerine, 6 M NH₄OH kullan2lmas² sonucu, nisin üretim miktar² 1080 IU mL⁻¹den 1260 IU mL⁻¹ye yükselmi tir (Hull ve Gibbons 1997). Fermentasyon esnas2nda üretici su taraf2ndan olu turulan laktik asidin üretici hücreler üzerindeki inhibisyon rolünün minimizasyonuna yönelik olarak tasarlanan bir 2al² mada ise, kefirde izole edilen *Kluyveromyces marxianus* mayas2n2n kullan2m² önerilmi tir. Uygulama neticesinde saf kültürün kullan2ld² 2 kontrol grubunda 2320 IU mL⁻¹ nisin aktivitesi elde edilirken, mayan2n kullan2ld² 2 kesikli fermentasyon sisteminde 3920 IU mL⁻¹ nisin aktivitesine ula 2m² t2r (Shimizu vd. 1999).

2.2.3 Sürekli sistemler

Biyokütle miktar2n2n art² 2 ile hacimsel nisin üretim miktar2ndaki yükselmenin birbirine paralel olu u, sistemlerde üretim süreklili inin uzat2lmas² için immobilize hücre teknolojisi fikrini do urmu tur. Bu amaçla nisin üretici su lar kademeli bir ekilde 2o alt2larak, 2e itli destek materyallerine immobilize edilmi ve de i ik özellikte biyokatalistler olu turulmu tur. Ayr2ca sürekli besleme ve ürün 22k² 2 sa lanarak, sürekli nisin üretim denemeleri ger2ekle tirilmi tir (Wan vd. 1995, Scannell vd. 2000, Sonomoto vd. 2000, Desjardins vd. 2001, Bertrand vd. 2001). Bu denemelerde hücre immobilizasyonunun etkin olarak yap2abilece i, besin ak² 2n2n h2zli² oldu u ve yüksek stabiliteye sahip destek materyallerinin kullan2ld² 2 sistemlerin geli tirilmesi üzerinde durulmu tur. Bugüne kadar yap2lan 2al² malarda kullan2lan model sistemlerde elde edilen en yüksek hacimsel nisin üretimi, immobilize hücre teknolojisi kullan2lmas² ve hücrelerin saatte bir yeni ortama al2nmas² durumunda sa lanm² t2r (Bertrand vd. 2001, Amiali vd. 1998, Desjardins vd.. 2001, Sonomoto vd. 2000, Hull vd. 1997). Bu sonuçlar, fermentasyon ortam2n2n sürekli de i tirilmesinin; dü ük pH, laktat ve nisinin hücreler üzerindeki inhibisyon etkilerini ortadan kald2rd² 2n2 aç2k2a göstermektedir.

2.6 Nisin Üretiminde Yenilikçi Yakla 2imler

Nisin üretim miktar² ortamdaki biyokütle olu umu ile paralellik ta 2maktadır. Öte yandan nisin fermentasyonunda *L. lactis* hücreleri taraf2ndan üretilen laktik asit, hücreler üzerinde geri

yönlü inhibisyon etkisi meydana getirmektedir. Ortamdaki laktat konsantrasyonunun yükselmesi hücrelerde protein denatürasyonunu hızlandırmakta, ayrıca *L. lactis* hücrelerinin bu olumsuz fermentasyon koşullarını tolere edebilmek için yüksek enerji sarfiyatında bulunmasına neden olmaktadır. Söz konusu bu olumsuzluklar, *L. lactis* hücrelerinde aktif nisin üretim hızının bozulmasına ve hatta hücre yoğunluğunun azalmasına sebep olmaktadır. Nisin üretiminde geri yönlü inhibisyonun engellenmesi için izlenen yollardan birisi; *L. lactis* hücrelerinde metabolik yolun homofermantatıftan heterofermantatife dönüştürülmesidir.

Nisin biyosentezinden sorumlu genlerin belirlenmesi ve üretimin genetik mekanizmasının daha iyi anlaşılmasıyla üretici sularda moleküler çalılar hız kazanmaktadır. Ürün verimini arttırmaya yönelik bu çalılar ilk olarak konjugasyon uygulamalarıyla başlamıştır. Çünkü nisin üretiminden sorumlu genlerin transpozon üzerinde taşınması belirlenmesi, nisin üretiminin konjugasyon yolu ile aktarılabileceğini göstermiştir. Ancak bugüne kadar yapılan çalılarda, nisin üretim fenotipi kazandıran transkonjugantlarda elde edilen nisin üretim düzeyleri kontrol gruplarındaki üretim düzeyini geçememiştir. Ayrıca transkonjugantlarda nisin fenotipinin stabil olması da tespit edilmiştir.

2.6.1 Rekombinant nisin üreticileri

Nisin biyosentezinden sorumlu genlerin belirlenmesi ve üretimin genetik mekanizmasının daha iyi anlaşılmasıyla üretici sularda moleküler çalılar hız kazanmaktadır. Ürün verimini arttırmaya yönelik bu çalılar ilk olarak konjugasyon uygulamalarıyla başlamıştır. Ancak bugüne kadar yapılan çalılarda, transkonjugantlarda elde edilen nisin üretim düzeyleri kontrol gruplarındaki üretim düzeyini geçememiştir. Ayrıca transkonjugantlarda nisin fenotipinin stabil olması da tespit edilmiştir.

L. lactis hücreleri kendi nisin üretiminden geri yönlü olumsuz etkilenmektedir. Özellikle, gelişmiş ortamında yüksek miktarda nisin birikimi *L. lactis* su larını inhibe etmektedir. Yapılan çalılarda nisin üreticilerinin farklı seviyelerde nisine karşı hassasiyetlerinin olduğu belirlenmiştir. Örneğin, *L. lactis* Nisin üretiminde kullanılan hücrelerde, doğal nisin dirençlilik genlerinin (*nisI*, *nisF*, *nisE* ve *nisG*) yüksek düzeyde ifadesinin sağlanması, bu bakteriyosinin üretimi üzerine olumlu etki yapmaktadır. Çünkü daha önce de söz edildiği gibi, üretici hücrelerin dirençlilik gösterebildiği bir şekilde nisin deeri bulunmaktadır. Nitekim *nisI* genlerinin vektör bir plazmid aracılığıyla üretici doğal suya aktarılması ve bu genlerin ifadesinin sağlanması sonucunda, nisin üretim miktarında % 20'lik bir artış söz konusu olduğu belirlenmiştir (Kim vd. 1998).

Dirençlilikten sorumlu *nisI* geninin kullanılması, operonda yer alan fonksiyonel genlerle yapılan çalılara katkı tutmuştur. *L. lactis* subsp. *lactis* 164 su unda nisin Z üretimi; *nisZ*,

nisR, *nisK* ve *nisF*, *nisE*, *nisG* genlerinin çoklu kopyalarla klonlanarak, artırılmaya çalışılmıştır. Kontrol suya 16.000 AU mL⁻¹ olan nisin aktivitesi; *nisR* ve *nisK* ve *nisF*, *nisE*, *nisG* genlerinin klonlanmasıyla 25.000 AU mL⁻¹ de erine ulaşılmıştır. *nisR*, *nisK* genlerinin yüksek düzeyde ifadelerinin sağlanması durumunda, nisZ geninin transkripsiyonunun da tetkik edildiği belirlenmiştir (Cheigh vd. 2005).

Rekombinasyon çalışmalarıyla elde edilen yüksek nisin verimleri sonucunda bu rekombinant suyun immobilizasyonunu hedeflenen yapıları sürekli fermentasyonda daha fazla verime ulaşılabileceği fikriyle çeşitli çalışmalar yürütülmüştür. 2012 yılında im ek ve arkadaşları *L. lactis* N8 suyunu genetik yollarla kitin biyobiyoremediası için kullanılabilecek alanları kazandıran *L. lactis* PLAC2 ve PLAC7 suyunun turkmen ve destek materyali olarak kitin malzemesinin kullanıldığı yenilikçi nitelikte sürekli bir sistemde (CICON-FER, kitin içeren sürekli nisin fermentasyon sistemi) bu suyun en yüksek nisin üretebildiği fermentasyon koşullarının optimizasyonunu yapmışlardır. Yapılan *L. lactis* PLAC7 sürekli fermentasyonu çalışmasıyla farklı dilüsyon hızları (0.1 ila 0.9 h⁻¹) ve farklı glukoz konsantrasyonlarında (10 ila 60 g L⁻¹) elde edilen nisin üretimleri gözlemlenmiş ve optimum koşullar olarak 0.9 h⁻¹ dilüsyon hızı ve 40 g L⁻¹ başlangıç glukoz konsantrasyonu belirlenmiştir. Bu koşullarda en yüksek nisin verimi 10500 IU ml⁻¹ bulunmuştur. Çalışma sonucunda CICON-FER sisteminin yüksek hacimde nisin üretimine elverişli olduğu ve kitine tutundurulmuş hücrelerde yüksek dilüsyon hızlarında bile fermentasyon ortamından hücre kayıplarının çok az olduğu rapor edilmiştir (im ek, 2013).

Yüksek oksijen konsantrasyonu ihtiva eden ortamlarda mikroorganizmalarda alternatif oksidaz (*aox1*) enzim aktivitesi indüklenir ve böylece mikroorganizma olumsuz stres koşullarına tolere edebilir. Papagianni ve Avramidis 2012'de yaptıkları geri-beslemeli fermentasyon çalışmasıyla; *Aspergillus niger*'deki *aox1* genini *L. lactis* ATCC11454 suyunu klonlayarak oluşturdukları transformant suyunu kullanmışlardır. %90 çözünümlü oksijen yansıması ve 10 g L⁻¹ glukoz konsantrasyonu içeren bu fermentasyon sistemi ile kontrol suya 3,2 g L⁻¹ hücre biyokütle ağırlığına ve 5900 IU mL⁻¹ nisin üretimine ulaşırken, rekombinant suya 5.8 g L⁻¹ hücre biyokütlesi ve 7900 IU mL⁻¹ nisin verimine ulaşmıştır. *L. lactis*'in glikolitik döngüsünde önemli rolü olan fosforokinaz (*pfk*) enziminin aktivitesinin artırılması ile fermentasyon sonucu oluşacak biyokütle ve nisin miktarlarında da artış elde edilebileceği hipotez edilmiştir. Bu hipotezle 2012'de yapılan çalışmada; *A. niger*'deki *aox1* geni bu defa fosforokinaz ve AMP proteinkinaz enzimlerini kodlayan *pfk13* ve *pkaC* genleri ile birlikte *L. lactis* ATCC11454 suyunu klonlanarak, elde edilen *pfk13-pkaC-aox1* rekombinant suyunun hemin içeren aerobik ortamda yarı kesikli fermentasyonu yapılmıştır. Çalışma kapsamında fermentasyon ortamında 55, 138 ve 277 mM olmak üzere üç farklı glukoz konsantrasyonu

denenmi ve en yüksek biyokütle ($7,5 \text{ g L}^{-1}$) ve nisin miktarına ($14.000 \text{ IU ml}^{-1}$) 277 mM glukoz içeren fermentasyon ortamında ulaşılmıştır (Papagianni vd. 2012).

2.6.2 Nisibasyon ortamının de i tirilmesi

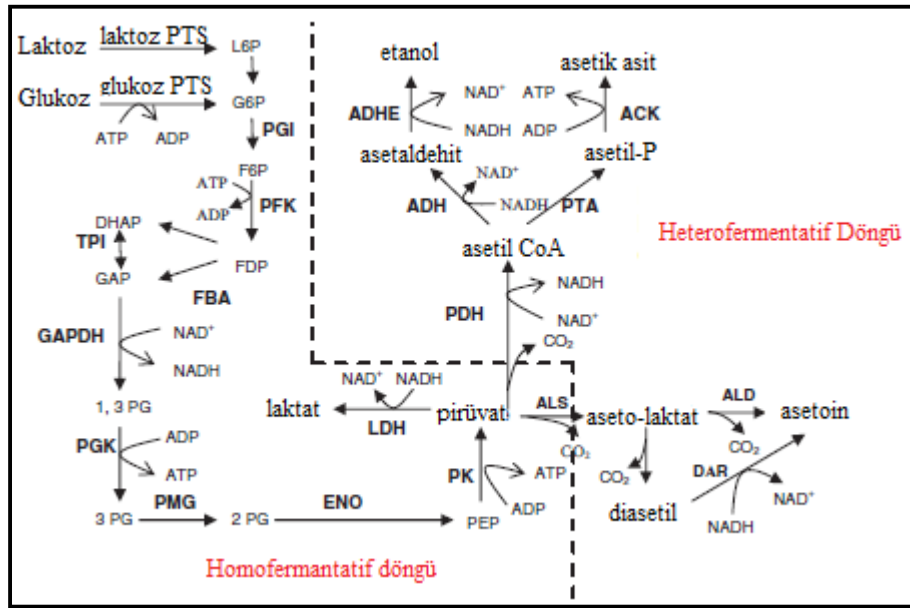
Fermentasyon ortamlarında karışık substrat inhibisyonu, üretici su ların olu turdu u metabolitlerinin belli bir seviyeden sonra üretici su üzerinde olu turdu u baskılayıcı etkisi, üretilen nisinün üretici hücrelere tutunarak üretimi engellemesi, fermentasyon sonucu olu an proteazlarca nisinün degradasyonu gibi birçok faktör nisin üretimini olumsuz etkilemekte ve elde edilecek verimi de sınırlamaktadır. Bu olumsuz koşulları engelleyebilmek ve maksimum nisin üretimine ulaşabilmek adına optimum proses koşulları olu turma temelli birçok çalışmaya yapılmıştır (de Vuyst, 1992; Yang vd. 1992; Pongtharangkul vd. 2006, Demirci vd. 2006, İm ek vd. 2009). Bu olumsuz etkilerinin giderilmesi amacıyla Bertrand vd. 2001 yılında yaptıkları bir çalışmada pH kontrollü besiyeri de i imini önermiştir. K-karegenan/baklagil gamına $10^{11} \text{ CFU mL}^{-1}$ 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^{-1} toplam ve $5730 \text{ IU ml}^{-1} \text{ h}^{-1}$ hacimsel nisin aktivitesine ulaşılmıştır.

Nisin üretimini hem hücre sel hem hacimsel bazda arttırmaya yönelik yapılan bir çalışmada ise *L. lactis* N8 ve LAC48 su ları kullanılarak yapılan kesikli fermentasyon ortamında olu an metabolitlerden kaynaklanarak meydana gelebilecek geri-yönlü inhibisyonun engellenebilmesi için 30, 60 ve 120 dakika aralıklarla besiyeri de i imleri yapılmıştır. Maksimum hacimsel nisin üretimi 60 dk aralıklarla yapılan besiyeri de i imleri ve toplam 18 saat süren N8 su unun fermentasyonu sonucunda $900 \pm 100 \text{ IU ml}^{-1}$, LAC48 su unun fermentasyonu sonucunda ise $1.080 \pm 100 \text{ IU ml}^{-1}$ nisin verimine ulaşılmıştır. Rapor edilen sonuçlara göre 30 dk aralıklarla yapılan besiyeri de i imlerinin 60 dk ya oranla önemli ölçüde avantaj sağladığı, 120 dk aralıklı yapılan de i im süresi ise biriken nisin ve laktat konsantrasyonlarının olu turdu u inhibitif etkinin önüne geçilebilmesinde çok uzun bir süre oldu u bulunmuştur (İm ek vd. 2009).

2.6.3 Metabolik yolun düzenlenmesi

Kesikli ve yarı-kesikli fermentasyonların ilerleyen zaman dilimlerinde laktat dehidrogenaz enzim aktivitesi ile *L. lactis* tarafından üretilerek ortamda biriken laktat, nisin üretici hücrelerin gelişimi üzerinde inhibitif etki göstererek hücre lizisine neden olur. Ayrıca artan laktat konsantrasyonu ile meydana gelen geri yönlü inhibisyonun yanı sıra artan pH ile birlikte bozulan elektrolitik denge nedeniyle de hücrelerde daha fazla enerji sarfiyatı meydana gelmektedir. Tüm bu olumsuzluklar yüksek laktik asit konsantrasyonunda gözlenen toksik

etki ile de birle ince hücrelerin kaybına veya daha az gelişmesine neden olmaktadır. Ortamdaki bu baskı ile üretici hücrelerde sayısal artışa ulaşamamakta ve buna paralel olarak da nisin üretimi arttıramamaktadır. Bu olumsuzlukları elemine edebilmek için planlanan en yenilikçi yaklaşımlardan birisi de gelişme ortamlarında *L. lactis* hücrelerinin metabolik yolunun homofermantatiften heterofermantatife dönüşürülmesi i lemidir. *L. lactis* hücreleri gelişimleri için gerekli enerjiyi üretmek için heterofermantatif döngüyü kullandıklarında metabolizmalarında elektron transfer sistemini (ETS) yapılandırarak bir aerobik solunum zinciri haline gelirler (Lechardeur vd. 2011, Brooijmans vd. 2009a, Pedersen vd. 2012) ve homolaktik döngüden çeşitlikler için olurduklar son ürünlerde bulunan laktat konsantrasyonunda önemli düşüş gözlenir. Zaten bu yeni metabolik yolun sonunda sadece laktik asit gibi ortam asitliğini arttıracak tek çeşitli son ürün yerine aseton, diasetil, etanol gibi yan ürünler de olurdu olarak, geri inhibisyonun önemli oranda minimize edilmesi sağlanır. Homofermantatif döngüde her bir NADH'nin oksidasyonu ile 1 mol ATP üretilirken, totalde elde edilen 2 mol ATP'ye nazaran heterofermantatif döngüde 36 mol ATP üretimi gerçekleşir. Hücrenin enerjetik seviyesindeki bu yükselmeye paralel olarak hücre biyokütlesinde de artış sağlanır (ekil 2.3).



ekil 2.3 *L.lactis*'de homofermantatif, heterofermantatif döngü ve solunum ko ullaarında laktöz ve glukoz katabolizması (Lan vd. 2006).

Solunum metabolizması; *Escherichia coli* ve *Bacillus subtilis* in de içinde bulundu u sayısız bakterinin enerji üretiminde en çok kullandıkları yoldur. Bu bakterilerde solunum mekanizması birden çok sayıda enzim, kofaktör varlığında kompleks bir düzen içerisinde gerçekleşmektedir. Buna karşın laktik asit bakterilerinde solunum metabolizmasının aktif veya inaktif olmasının sadece gelişme ortamının şartlarına bağlı olması ve bunun kontrol altında tutulabiliyor olması, bu familya üyelerini yeni model sistemler geliştirilirken kullanımlarında daha da değerli kılmaktadır (Richardson 2011, de Vos vd. 2004).

2.7.Laktik Asit Bakterilerinde Solunum

Fakültatif anaerobik karakterleriyle tanınan laktik asit bakterilerinin solunum yapabilme yetenekleri ilk kez 1970'lerin başlarında yapılan çalışmalarla ortaya atılmıştır. Sadece hemin veya hemin-menakinonun birlikte bulundurulduğu gelişme ortamlarında, bu familya üyelerinin hücrelerindeki sitokromlarının aktifleştirilmesi ve aerobik solunum yaptıkları bugüne kadar süregelen çalışmalarla da desteklenmiştir (Bryan-jones vd. 1969, Sijpestejn 1970, Whittenbury vd. 1978, Duwatt vd. 1999, 2001, Lechardeur vd. 2011, Brooijmans vd. 2009b, Pedersen vd. 2012).

Laktik asit bakterilerinin enerji üretim yolu olarak öncelikle homofermentatif yolu seçmelerinde birçok neden mevcuttur. Solunumda yer alan sitrik asit döngüsünden yoksun olduklarından enerji üretim metabolizmalarında glikoliz yoluyla elde ettikleri pirüvatı CO₂ kadar okside edemezler. Bunun yerine NADH'ı indirgeyerek pirüvattan aseton, asetat gibi organik bileşikler oluşturur ve turba yoluna giderler (Gaudu vd. 2002, Pedersen vd. 2012). Elektron transfer sisteminin olması önemli olan hemin terminal akseptör görevindeki sitokrom oksidazın da aktifleştirilmesi gerekir. Laktik asit bakterilerinin tümü hem biyosentezini gerçekleştirecek enzimlerden yoksun olduklarından, solunum yapabilmek için ortama hemin ilavesi yapmak zorunludur. Bazılarında ise menakinon biyosentezinden sorumlu *menFDXBEC* genleri bulunmadığından bu kofaktörü de ortama ilave etmek gerekir ki bu durumda aerobik solunum yapabilme kapasitesi ikiye çıkar (Lechardeur vd. 2011, Rezaiki vd. 2008, Yamamoto vd. 2005).

Oksidatif stres; hücrenin metabolik yolunda bozukluklara, gen bölgelerinde mutasyonlara ve genel olarak bakteriyostatik veya bakterisidal etkilerde bulunarak hücreye hasar veren birçok sebebe yol açar. Laktik asit bakterileri genel olarak oksijene hassasiyetleri olan fakültatif anaerobik mikroorganizmalar grubunda yer aldıklarından ortamdaki serbest oksijenin metabolik döngüye girmesiyle direnç mekanizmalarını aktifleştirirler. Bu direnç mekanizmalarının en önemlisi süperoksit dismutaz aktivitesi (SOD) ile süperoksit serbest radikalinin (O₂⁻) hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümü katalizlenmesidir. Anaerobik koşullarda süperoksit dismutaz aktivitesi (sod) düşük olan laktik asit

bakterilerinde aerobik ko ulla dayken bu sod aktivitesinde yükselme gözlenir (Duwat vd. 1995).

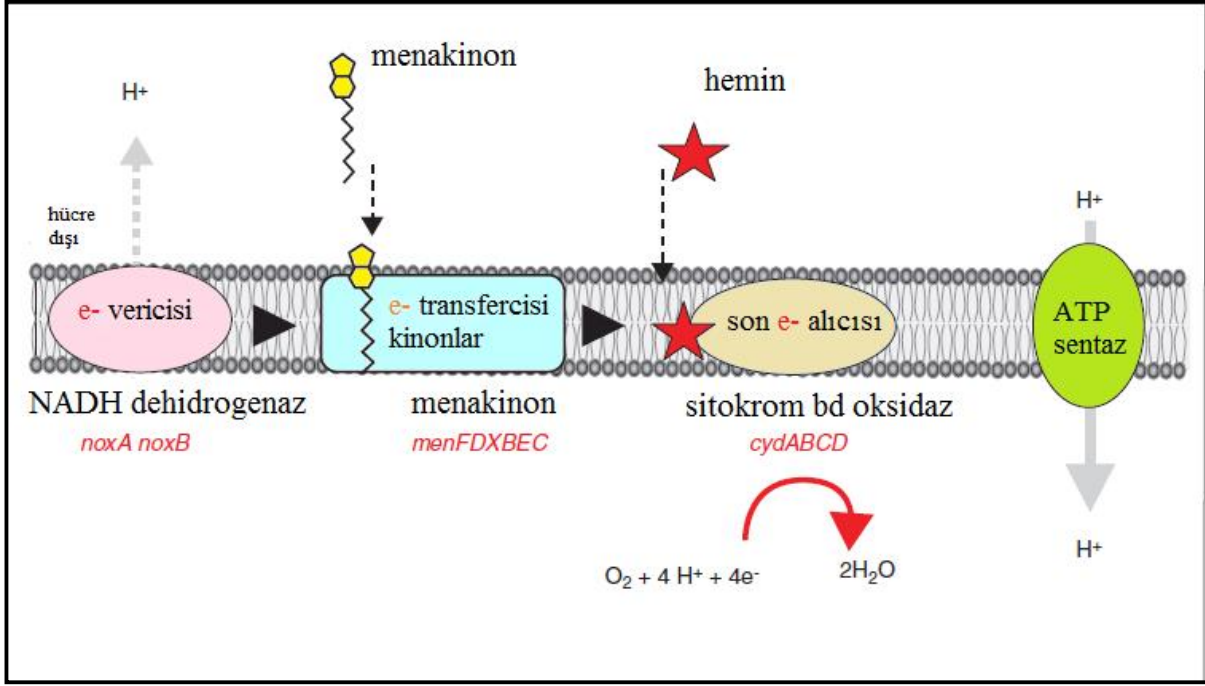
Tüm laktik asit bakterilerinde tek tip sitokrom oksidaz (quinol oksidaz) *CydAB* enzimi genetik olarak kodlanmı 2 bulunmaktadı 2r. Bu enzim kompleksi oksijenli ortamlarda çalı 2 abilmekte ve bakteri hücresinin oksijeni elemine etmesinde katkıda bulunmaktadı 2r (Rezaiki ve ark. 2004). Membranlarda terminal oksijen akseptörü olarak görev alarak proton motive edici gücün olu umunu sa layan bu sitokromlar, dü ük oksijen konsantrasyonları 2nda bile aktifle erek solunum yapılabilmesine olanak sa lar (Brooijmans vd. 2009b). Fermentatif metabolizmasıyla bilinen *L. lactis*, hemin bulunan aerobik ko ulla da sahip oldu u bu genin varlı 2 2 sayesinde solunum yapabilmektedir. 1999 yı 2nda Bolotin ve arkadaşları 2 *L. lactis* IL1403 su unun genomunda sitokrom d oksidaz tarafından kodlanan respirasyondan sorumlu *cydA* geninin bulundu unu rapor etmişlerdir. Respirasyon boyunca *cydA* geni, elektron transfer sisteminde aktif rol alı 2r ve son elektron alı 2c2s2n2n oksijen olmasın 2 sa layarak ATP üretimini sa lar.

Laktik asit bakterileri filogenetik karakterlerine göre solunum yapabilme kabiliyetleri açısın 2ndan sınıflandı 2dıkları 2nda solunum yapabilmek için hemine ihtiyaç duyanlar, hemin ve menakinona birlikte ihtiyaç duyanlar, solunum yetene i hiç bulunmayanlar olmak üzere üç sınıfta gruplandı 2rılar (Tablo 2.1). Solunum yetenekleri deneysel olarak elde edilen birçok veriyle desteklenmiş olanlar koyu renkle yazılmı 2 tır.

Tablo 2.1 Laktik asit bakterilerinin solunum yeteneklerine göre sınıflandırılması

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

Model bir bakteri hücrelerinde aerobik solunum zincirinin oluşabilmesi için elektron transfer sisteminin (ETS) yapılandırılması gerekmektedir. Bu nedenle oksijenli solunum yapabilen tüm hücrelerde bulunması gereken en temel bileşen solunum enzimleri yani ETS elemanlarıdır. ETS; prokaryotlarda hücre zarında, mezozomda veya sitoplazmada bulunan bir dizi molekülden oluşur (ekil 2.4).



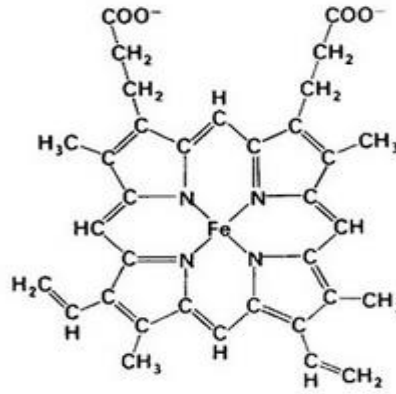
ekil 2.4 Solunum yeteneğine sahip laktik asit bakterilerinde elektron taşıma sistemininematik gösterimi

Bunlardan ilki elektron vericisi olarak görev yapan NADH dehidrogenazlar, ikincisi aktarılan elektronun transferinden sorumlu ve bu elektronu dehidrogenazlardan son elektron alıcısı olan oksijene taşımakla görevli olan kinonlardır. Gram pozitif bakterilerde bu görevi *men* ve *isp* genleri ile kodlanmış enzimler tarafından sentezlenen menakinonlar üstlenmiştir. Üçüncü ve sonuncu ETS elemanı ise prosetetik grubu olarak tanımlanan terminal elektron alıcısı olarak görev yapan sitokrom oksidazdır. Sitokrom oksidaz; substrat moleküllerinin dehidrojenazlarca oksidasyonu sonucu ortaya çıkan elektronları, son elektron alıcısı olan moleküler oksijene taşımaktan sorumludur (Pedersen vd. 2012). Yapılan çalışmalarında elde edilen verilere göre *L. lactis*, *E. faecalis* ve *L. mesenteroides* tüm bu menakinon ve genlerden oluşan solunum zincirine sahiptirler (Tablo 2.1). Gelişmiş ortamında aerobik solunum yapabilmek için ihtiyaç duydukları tek şey ise sadece hemindir (Duwat vd. 2001, Huycke vd. 2001, Winstedt vd. 2000). Ancak bu koşullar tüm laktik asit bakterisi grubundaki mikroorganizmalar için yeterli olmamaktadır. Menakinonları sentezleyemeyen bazı laktik asit

bakterisi gruplar², aerobik solunum yapabilmek için d² ar²dan menakinon takviyesine de ihtiyaç duyarlar. Geli me ortamına eklenen menakinonlar lipofilik yapıda olduklarından hücre duvarlarındaki membranlardan kolayca hücre içine geçebilirler.

2.7.1. Hemin

Sitokromlar sahip olduğu demir atomunu ferrik oksidasyon durumundan (Fe³⁺) ferrous oksidasyon durumuna (Fe²⁺) değiştiren bir hem grubu içerir. Hemin; 1853 yılında Teichmann tarafından hemoglobinin asit ile hidrolizi sonucunda kristal bir formda bulunmuştur (Heinrich, 2010). Bu hem grubu, bir karenin köşelerindeki dört azot atomu ile tutulan bir demir atomuna sahip porfirin halkasından oluşur (ekil 2.5). Heminin molekül ağırlığı 650 gr'dır. Hemoglobinde bu porfirin halkasına demirin, klorofilde ise magnezyumun bağlanması ile, sırasıyla kanın kırmızı rengi ve yaprakların yeşil rengi oluşturulur.



ekil 2.5 Sitokrom çözünebilir olarak bağlanmış hem grubunun yapısı.

2.7.2. Heminin *L. lactis* solunumundaki rolü

Hemin; aerobik solunum mekanizmasında redoks tepkimelerinin düzenlenmesinde majör göreve sahiptir (Mayfield vd. 2011). Heminin olmadığı oksijenli solunum ortamlarında, menakinonlar tarafından salınan elektronların hücre tarafından kullanılmasıyla Cu⁺² için Cu⁺¹'e yükseltgenmesi kolaylaşır ve bu elementlerin hücre içine girişi hızlanır. Benzer şekilde oksijenin (O₂)'nin O₂⁻(süperoksit)'e yükseltgenmesi ile de istenmeyen reaktif oksijen türleri oluşabilir. Bu noktada aerobik solunum zincirinde heminin ve menakinonların redoks aktivitesindeki önemi fark edilmekte ve hücre içerisinde riskli radikal grupların oluşumundaki engelleyici etkileri görülmektedir (Rezaiki vd. 2008).

Hemin; oksijenli ortamlarda ve sayısız enzimatik reaksiyonda elzem bir bileşen olsa da serbest formdayken hücreler için toksik özellik gösterir. Hücreler bu toksik etkilerden

korunabilmek için kendi metabolizmalarında hemin homeostasisini sağlayan sistemler olurlar. Laktik asit bakterilerinde bu homeostasi, hücre içerisinde heminin sitokrom b oksidazlara bağlanmasıyla gerçekleşir. Laktik asit bakterileri hemini sentezleyemese de, hücreleri içerisine alabilme mekanizmasına sahiptirler. Bu mekanizma *L. lactis*'de *fbuDBAR* operon bölgesinin varlığı ve operon proteinlerinin yardımıyla gerçekleşir. Normal fizyolojik koşullarda, bu proteinlerin görevi; proteinlerin çökmesini önlemek, yeni sentezlenen proteinlerin üçüncül yapılarının kazanmasını sağlamak, yanlış katlanmış ve çökmüş proteinleri birbirinden ayırmak ve doğru katlanmasını sağlamak, ribozomdan görev alacak yerlere taşımaktır. Stres koşullarında bu proteinlerin sentezi hızlanır. Aerobik koşullarda ortama olumsuz oksidatif strese tepki olarak; hücrenin hemini degrade etmek istenmesini engellenmesi için *AhpC* operon proteini hemine bağlanarak hemini yıklanmaktan korur. Bir başka operon proteini ise *CycCD* kompleksidir. Bu protein kompleksi; sitokrom oksidazın membranlarından (*CydAB*) geçerek, *CydAB*-hemin interaksyonları kolaylaştırır. Ayrıca elektron transfer sisteminde önem arz eden sistein ve glutatyon transferlerini de düzenler (Pedersen vd. 2012).

2.7.3. Metabolik yolun oksijenli solunuma yönlendirilmesi

Laktik asit bakterilerinde glikolitik döngünün regülasyonu ile enerji üretiminde izlenen metabolik yolun denetimi temelli birçok çalışmada ve araştırmaya yapılmıştır (Even vd. 2001, Papagianni vd. 2007, Papagianni 2012). Bu çalışmaların çoğunda esas olarak glikozun laktata indirgenmesinden sorumlu enzimlerin inaktivasyonları veya bu enzimleri kodlayan gen bölgelerinin susturulması baz alınmıştır. *L. lactis* genomunun *lac* operon bölgesinde kodlanmış glikolitik döngüde aktif rol alan *pfk* (fosfofruktokinaz), *pyk* (pirüvatkinaz), *ldh* (laktatdehidrogenaz) gen bölgeleri baskılanarak elde edilen mutant suyla yapılan bir fermentasyon çalışmasında üretici suya izlenen glikolitik ve laktat üretim döngüsünün kontrol grubuna oranla iki kat baskılanmış olduğu rapor edilmiştir (Andersen vd. 2001, Neves vd. 2002). *Aspergillus niger*'deki *pfkA* gen fragmentlerinin *L. lactis* suyunu klonlanmasıyla elde edilen rekombinant suya elde edilmesi beklenen yüksek glikolitik kapasitesine ulaşmıştır, ve artan bu kapasite sonucu kontrol ortamı ile fermentasyon ortamında üretilen laktat miktarları sırasıyla 15 ve 22,8 g (CDW)⁻¹h⁻¹ olarak tespit edilmiştir.

L. lactis'de izlenecek metabolik yolun homofermentatif veya heterofermentatif döngü olması etkileyen bir diğer önemli etkenin ise hücre içinde bulunan NADH:NAD⁺ oranı olduğu ile ilgili birçok çalışmada mevcuttur. Hücre içindeki serbest oksijenin suya indirgenmesinde görev alan NADH oksidaz enziminin aktivitesi aerobik koşullarda artarak göstererek glikolitik döngünün heterofermentatif yola çevrilmesini indükler. İndüklenen bu fermentasyon sonunda elde edilen son ürünler asetat, aseton, α -asetolaktat ve diasetil

olmakta böylece ortam asitli i yükselmekte geri inhibisyon engellenmi olmaktadır (Lopez vd. 1997, Hols vd. 1999, Lopez vd. 1998, Swindell vd. 1996, de Vos vd. 2004).

Arioli ve arkadaşları 2012'de yaptıkları kesikli fermentasyon çalışmasında, *L. lactis subsp. lactis* IL1403 suunu solunum için gerekli kofaktör olan $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ heminin bulunduğu ortamına, laktat dehidrogenaz (LDH) enzimini inhibe edici özellikte olan sodyum oksamat bileşeni ortama farklı konsantrasyonlarda (5, 10, 20 mM) katarak suyun aerobik solunum yapabilme kabiliyetini arttırmaya çalışmışlardır. Deney sonucu gözlenen ortamdaki laktat konsantrasyonları sırasıyla; heminsiz kontrol koşullarında $65,0 \pm 1,4 \text{ nM}$, heminli ortamda $51,0 \pm 1,5 \text{ nM}$ bulunurken, hemin ve sodyum oksamatın (20 mM) birlikte kullanıldığı ortamda ise $45,0 \pm 1,1 \text{ nM}$ kadar düşmüştür.

L. lactis suularında nisin üretimi ve hücre gelişimi üzerine düşük pH'nin neden olduğu inhibisyon etkisinin engellenmesi amacıyla; hücrede karbonhidrat katabolizmasının heterofermentatif yönde düzenlendiği bir besin maddesi ise, 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 sağlanmıştır ve Metabolik yolun alanine dönüşürdüğü hücrelerde nisin üretimi 1,7 kat artmıştır (Wardani vd. 2006).

Lan ve arkadaşları 2006 yılında yaptıkları bir çalışmada *L. lactis* LM0230 suunu anaerobik homolaktik fermentasyon, aerobik heterolaktik fermentasyon ve hemin ile desteklenmiş respirasyon koşullarında incelemiştir. Maksimum hücre biyokütlesini ($5,78 \text{ g L}^{-1}$) ve büyüme hızını ($0,60 \text{ g h}^{-1}$) hemin ile desteklenmiş aerobik koşullara sahip kesikli fermentasyon sisteminden elde etmiştir.

Nagayasu ve arkadaşları 2007 yılında yaptıkları çalışmada *L. lactis* ATCC11454 suunu heminli ve heminsiz ortamlarda kesikli kültür ortamında geliştirdiklerinde, ortamda ölçülen laktat konsantrasyonunun heminli koşullarda heminsiz koşullara göre 1,8 kat baskılandığını ifade etmiştir.

*L. lactis*ın hemin içeren ortamda hücre membranında oluşturduğu proton motive edici gücü ve ETS mekanizmasının araştırıldığı bir çalışmada, kontrol suuna kıyasla sitokrom bd oksidaz geni mutasyona uğratılmış suularında bir membran potansiyelinin oluşturulduğu bulunmuştur. Ortama eklenen NADH ise mutant suuna oranla kontrol suunda oksijen tüketimini arttırdığını tespit etmiştir. Hemin suplementasyonu yapılmış hücrelerde oksijen tüketimi; optik yoğunluğu 0,5 ile 0,58 aralığındaki hücrelerde (kuru ağırlık bazında) min mg^{-1} cinsinden $25,72 \pm 2,76 \text{ nmol}$ iken, aynı optik yoğunlukta sitokrom bd oksidaz mutantı

su larda bu tüketim de eri $13,51 \pm 0,02$ nmol bulunmu tur. Heminsiz yapılan kültür ortamında ise bu de erler; $13,02 \pm < 0,01$ nmoldür (Brooijmans vd. 2007).

H⁺ ATPaz (F₁F_o); hücrelerde serbest enerji transdüksiyonunda önemli rol oynayan bir enzimdir. *Bacillus subtilis* ve *Escherichia coli* gibi mikroorganizmalarda respirasyon yoluyla ATP sentezinde etkin olarak kullanılmaktadır. Aerobik solunum zincirinde esansiyel olan bu elektron alıcılarından yoksun olan mikroorganizmalarda bu enzim, hücre membranında proton gradiyentinin oluşmasını sağlar. Fakültatif anaerobik karakteriyle tanınan *L. lactis* de, F₁F_o ATPaz enzim kompleksine sahiptir. Blank ve arkadaşlarının 2001 yılında yaptıkları bir çalışmada, H⁺ ATPaz geni mutasyona uğratılan *L. lactis subsp. cremoris* MG1363 suyunu $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ hemin içeren ortamda aerobik koşullarda geli tirmişlerdir. Aerobik koşullarda geli en bu mutant su , aynı hemin konsantrasyonunda anaerobik ortamda geli me göstermemi tir. Bu veriler heminin, hücrede proton motive edici gücün oluşabilmesi için H⁺ ATPaz enzimi ile aynı seviyeye sahip olduğunu göstermiştir.

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Bakteri Su ları ve Kültür Ortamları

Çal² maya dahil edilen nisin Z üreticisi *L. lactis* N8 ile nisin üretim miktarı²ni tespitinde indikatör mikroorganizma olarak kullanılan *Micrococcus luteus* NCBI su lar² Pamukkale Üniversitesi, G²da Mühendisli i Bölümü, Kültür Koleksiyonundan (PUFECC) temin edilmi tir. Nisin üreticisi *L. lactis* N8 su u % 0.5 glukoz içeren M17 Broth (Merck, Almanya) besiyeri (M17G), 30°Cde, *M. luteus* NCBI ise Luria Bertani (FLUKA, Almanya) besiyeri (LB) ortamında 37°Cde 200 rpm hızda çalkalanarak geli tirilmi tir.

Fermentasyon ortamına ilave edilen hemin (Sigma-Alrich, USA) 5 mg ml⁻¹ stok çözeltisi hazırlanarak kullanılm² tır. Hemin 0,05 N NaOH içerisinde çözündürülmü ardından 0,45 µm membran filtreden geçirilmi tir. Hazırlanan hemin stoku, +4°Cde saklanm² tır.

3.2. Ba ğımsız De ği kenlerin Çalı ma Aralıklarının Belirlenmesi

Çal² mada nisin üretiminin optimizasyonu için, ilk olarak sistemin ba ğımsız de ği kenleri olan glukoz ve hemin konsantrasyonlar² ile çözünmü oksijen yüzdelerinin nisin üretim miktar² ve biyokütle üzerine etkisi yar²-kesikli fermentasyon denemeleri yapılarak belirlenmi ve bu de ği kenlere ait çalı ma aralıklar² tespit edilmi tir. Söz konusu çalı ma aralıklar²ni belirlenmesinde üç ba ğımsız de ği kenden ikisi sabit tutularak, üçüncü de ği kenin farklı de ğerleri kullanılarak çalı m² tır (Tablo 3.1).

L. lactis N8 su u kullanarak yar²-kesikli fermentasyon sisteminde nisin üretimi; pH, sıcaklık ve çözünmü oksijen konsantrasyonun anl²k ölçümünü yapabilen fermentör (Minifors, Bottmingen, sviçre) sisteminde gerçekleştirilmi tir (ekil 3.1). Fermentasyonda 2 L M17 besiyeri ortam² fermentör içerisine alınm² ve sistemin sterilizasyonu gerçekleştirilmi tir. Daha sonra oda sıcaklık ına so utulan fermentöre; 0,5 µg mL⁻¹ hemin ve % 0,5 glukoz içeren aerobik ko ullarda M17 sıvı besiyeri ortamında iki kez aktifle tirilmi olan nisin üreticisi *L. lactis* kültüründen % 1 oranında a ılama yapılm² tır. Bu a amadan sonra fermentör 200 rpm kar² tır²c hızında ve 30 °C inkübasyon sıcaklık ında, deneme deseninde çalı ılmas² önerilen çözünmü oksijen yüzdesinin fermentasyon ortamında sa lanarak 5 saat kesikli fermentasyon ko ulunda çalı tırılm² tır. Fermentasyon esnasında olu abilecek köpürmeyi engellemek için fermentör içerisine steril gliserol ilavesi yapılm² tır. Tüm fermentasyon boyunca 5 N NaOH çözeltisi kullanılarak fermentasyon ortamının pH² 6,0da tutulmu tur. Kesikli fermentasyonun sonunda besleme pompasının debisi 40 ml h⁻¹ olacak ekilde ayarlanm² ve fermentasyon ortamına deneme deseninde çalı ılmas² önerilen farklı hemin ve glukoz konsantrasyonlar² ile hazırlanm² heminli glukoz çözeltisi 5 saat boyunca beslenerek yar² kesikli fermentasyon gerçekleştirilmi tir. Her bir deneme deseninin fermentasyonu

sonunda CO_2 pompası kullanılarak biyokütle ve nisin üretimi miktarlarının ölçmek için örnekleme yapılmıştır.



ekil 3.1 Fermentasyon denemelerinin yapılması için kurulan sistem

Tablo 3.1 Yarımsız fermentasyon sisteminde denen başlangıç değerleri, hızları ve çözünümler, oranlar,

Deneme	Hemin ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Glukoz ($\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$)	Çözünümlü O_2 (%)
1	0	1	10
2	1	1	10
3	2	1	10
4	4	1	10
5	6	1	10
6	10	1	10
7	1	2	10
8	1	4	10
9	1	8	10
10	1	10	10
11	1	1	30
12	1	1	50
13	1	1	70
14	1	1	90

3.3 Başlangıç Değerleri Kenarların Cevap Yüzey Yöntemi ile Modellenmesi

L. lactis’te solunumun hemini ile test edildiği yarımsız fermentasyon sisteminde nispetin üretiminin cevap yüzey yöntemi ile optimizasyonu için, hemini, glukoz ve çözünümlü oksijen konsantrasyonları etkili olduğu için başlangıç oranları kullanılmaktadır. Bunun için her bir başlangıç değerleri için 0 merkez nokta olmak üzere, maksimum (+1) ve minimum (-1) değerler belirlenmiştir. Başlangıç olan her bir başlangıç değerleri kenarının gerçek değerleri aşağıda verilen denklem kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{Gerçek Değer} = \frac{(\text{Yüksek Değer} + \text{Düşük Değer})}{2} + \frac{(\text{Yüksek Değer} - \text{Düşük Değer})}{2} \cdot \text{Kod Değeri}$$

Başlangıç maddesi tespit edilen minimum ve maksimum değerler Minitab 14.0 (Minitab Inc., Minneapolis, MN, USA) istatistik programı kullanılarak, cevap yüzey yöntemi ile modellenmiş ve yüzey merkezli kompozit deneme deseni (merkezde 6 tekrarlı, toplam 20 adet deneme) oluşturulmuştur. Bu deneme deseni doğrultusunda önerilen hemini, glukoz ve çözünümlü

oksijen miktarlarının kombinasyonları yarık-kesikli fermentasyonda sisteminde K²s²m 3.2de anlatıldığı gibi ekilde uygulanmış, *L. lactis* N8 suunun nisin üretimi ve fermentasyon ortamında oluşan biyokütle miktarı tespit edilmiştir.

Yapılan tüm fermentasyon denemelerinin sonucunda, *L. lactis* N8 suunun biyokütle başına üretilen nisin miktarı (IU mg⁻¹) hesaplanarak, Minitab 14.0 (Minitab Inc., Minneapolis, MN, USA) programında varyans analizi (ANOVA) yapılmıştır. Bu yöntemle her bir faktörün lineer, kuadratik ve interaksiyon etkilerinin cevaplar üzerindeki istatistiksel önemlilikleri %95 güvenlik seviyesinde Fischer (F testi) uygulanarak belirlenmiştir. Böylece çalışmamızın kapsamında solunumun tevik edildiği yarık-kesikli fermentasyon sisteminde *L. lactis* N8 suunda nisin üretiminin optimizasyonu için kullanılan hemin, glukoz ve çözünmüş oksijen konsantrasyonu parametrelerinde modelin uyumu ve ilgili denklemin oluşturulması için R² değeri ve denklem sabitleri ile model uyumu eksikliği hesaplanmıştır. Varyans analizi sonucunda başlıca etkilerin fermentasyon sisteminde nisin üretimine etkisini tahminleyen ikinci dereceden polinomal denklem;

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

oluşturulmuştur.

Bu denkleimde, $\beta_0, \beta_1, \dots, \beta_{23}$ regresyon katsayıları, X_1, X_2, X_3 ise başlıca etkileri yani hemin, glukoz ve oksijen değerlerini ifade etmektedir. Y ise; beklenen cevapı temsil etmekte ve birim biyokütle başına nisin üretimi (IU mg⁻¹) hakkında fikir vermektedir.

3.4 Solunumun Hemin ile Tevik Edildiği Yarık-kesikli Fermentasyon Sisteminde Optimum Parametreler Kullanılarak *L. lactis* N8 Suunda Nisin Üretimi

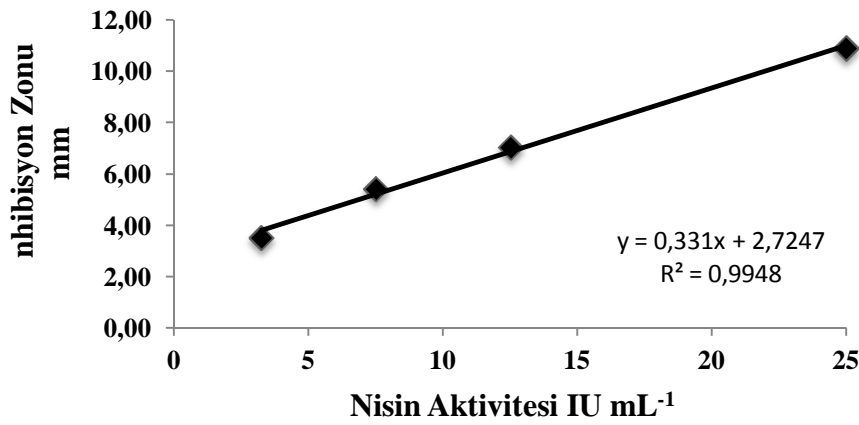
Çalışmamızın kapsamında denenen başlıca etkiler (hemin glukoz ve oksijen konsantrasyonu) için oluşturulan modelin önerdiği optimum parametreler kullanılarak yarık-kesikli fermentasyon sisteminde hemin ile solunumun tevik edildiği *L. lactis* N8 suunda nisin üretimi araştırılmıştır. Bunun için K²s²m 3.2 de anlatıldığı gibi *L. lactis* N8 suunu önce 5 saat kesikli fermentasyonla geliştirilmiştir ardından 3 µg mL⁻¹ hemin, 8 g L⁻¹ glukoz beslemesi yapılarak ve ortamdaki çözünmüş oksijen miktarı % 40'a ayarlanarak, 24 saat yarık-kesikli fermentasyon uygulanmıştır. Fermentasyon sürecinde 0, 1, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 13, 15 ve 24. saatlerde örnek alınmıştır, nisin üretim miktarı (IU mL⁻¹), biyokütle (mg mL⁻¹), rezidü glukoz miktarı (mM), laktik ve asetik asit miktarı (ppm) belirlenmiştir. Hemin ve oksijenin yarık-

kesikli fermentasyonda etkisini gözlemleyebilmek için hemin ve oksijen içermeyen yar2-kesikli fermentasyon kontrol olarak yürütölmü tür.

3.5 Analitik Yöntemler

3.5.1 Nisin üretim miktarının tespiti

Nisin üretim miktarının tespiti için Tramer and Fowler (1964) tarafından önerilen yöntem kullanılmı tür. Fermentörden alınan örnekler 6000 rpmde 10 dk santrifüj edilerek hücre çökeltisi ayrılmı , üst sıvı yeni bir tüpe alınarak 80 °Cde 15 dk sıvı uygulaması yapılmı tür. pHde 2.5 olan ve % 0.1 oranında tween 80 içeren çözeltide 2¹⁰ oranına kadar seyreltilmi tir. Nisin aktivitesinin belirlenmesi için aktif *M. luteus* hücreleri 7 mL LB yumu ak agar ortamına %1 oranında inoküle edilmi ve LB agar alt tabaka yüzeyine yayılmı tür. Üzerine her bir örnek dilüsyonundan 5 L (2 paralel) damlatılmı tür. Aktivite tayininde nisaplin (Sigma) kullanılarak 3, 6, 12.5 ve 25 IU mL⁻¹ konsantrasyonda ahit çözelliler hazırlanmı tür. 37 °Cde 1 gece inkübasyon sonucunda standart nisin e risi (ekil 3.2) kullanılarak kültür üst sıvısındaki nisin miktarı hesaplanmı tür.

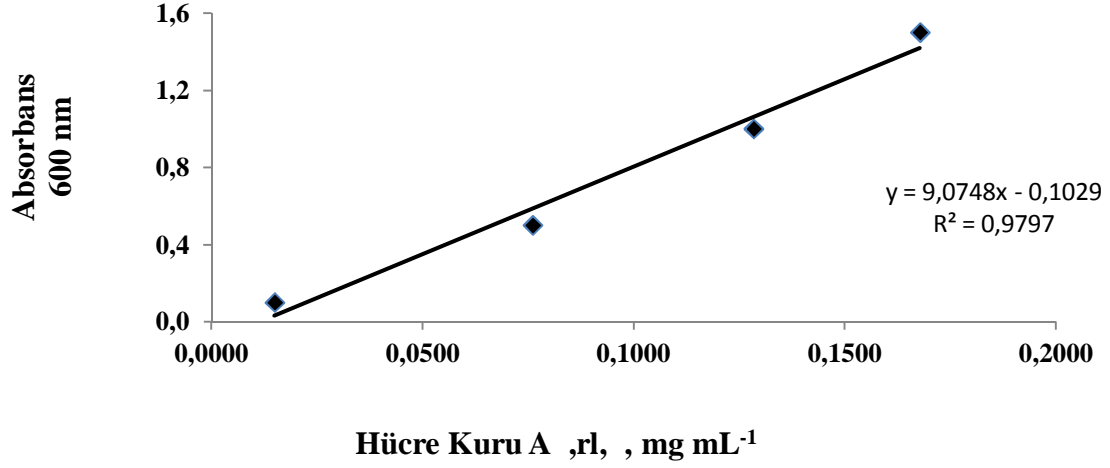


ekil 3.2. Standart nisin inhibisyon e risi

3.5.2 Biyokütle miktarının hesaplanması

Fermentasyon sürecinde toplanan örnekler, biyokütle miktarının belirlenmesi için, aynı besiyeri kullanılarak seyreltikten sonra, spektrofotometrede (PG Instruments) 600 nm dalga boyunda hücre yoğunlukları ölçölmü tür. Belirlenen hücre yoğunluğu, ekil 3.3de verilen e rinin denklemi kullanılarak hücre kuru a rı (mg mL⁻¹) dönü türölmü tür. Optik yoğunluk ve biyokütle e itli inin belirlenmesi için, farklı optik yoğunluğa sahip hücre kültürleri 6000 gde santrifüj edilmi ve 2 kez PBS tamponunda yıkanmı tür. Elde edilen hücre çökeltileri 70 °C sıcaklıkta, hücre kuru a rı sabit bir değere ulaşmaya kadar

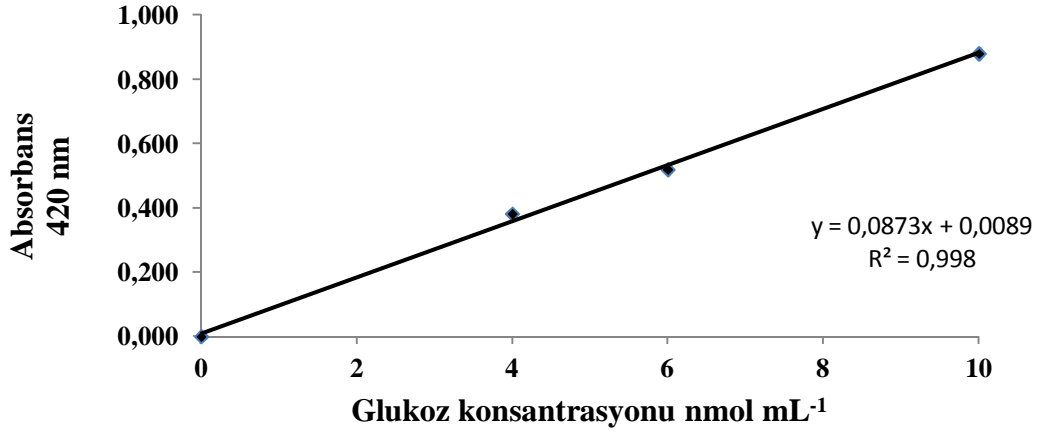
kurutulmu tur. Optik yo unluk ve hücre kuru a 2l2 2e itli i için standart e ri olu turulmu ve e rinin denklemleri elde edilmiştir.



ekil 3.3 Standart hücre kuru a 2l2 2e risi

3.5.3 Rezidü glukoz miktarının tespiti

Fermentasyonda toplanan örneklerdeki rezidü glukoz miktarının tespiti, kolorimetrik esasa dayanan glukoz ölçüm kiti (Glucose assay kit II, Biovision, USA) kullanılarak yapılmıştır. Bunun için fermentasyon denemelerinden toplanan örnekler 6000 g'de 10 dk santrifüj edilmiş, hücreler çöktürülmüştür. Daha sonra elde edilen supernatantlar kit solüsyonu ile seyreltikten sonra, kit protokolünün prosedürü yardımıyla önce standart glukoz konsantrasyonu e risi çizdirilmiştir (ekil 3.4) ve daha sonrasında kit protokolü uygulanarak ölçüm gerçekleştirilmiştir.



ekil 3.4 Standart glukoz konsantrasyonu e risi

3.5.4 Laktik ve asetik asit miktarının tayini

Fermentasyon denemelerinde toplanan örneklerin laktik ve asetik asit içeri i Shimadzu marka yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) kullanılarak belirlenmiştir. Söz konusu organik asitlerin ayrıştırılması için 7x7x300 mm Nucleogel ION 300 OA kolonda (Supelco, USA) gerçekleştirilmiştir ve UV detektör kullanılarak 210 nm dalga boyunda tespit edilmiştir. Sistemde 0,05 N H₂SO₄ mobil faz kullanılmıştır, akış hızı 0,3 ml min⁻¹ ve 35°C sıcaklık koşulları uygulanmıştır.

Laktik ve asetik asit içeriğinin belirlenmesi için örnekler önce 7000 rpm'de santrifüj edilerek bakteri hücreleri çöktürülmüştür. Ardından elde edilen supernatantın pH'si 3N HCl (Sigma, USA) kullanılarak 1,5'e ayarlanmıştır ve 10 000 rpm'de tekrar santrifüj edilerek proteinlerin de çöktürülmesi sağlanmıştır. Son olarak supernatant 0,45 µm (Sartorius) membran filtreden geçirilerek steril bir tüpe alınmıştır (Öz Cangaz, 2000).

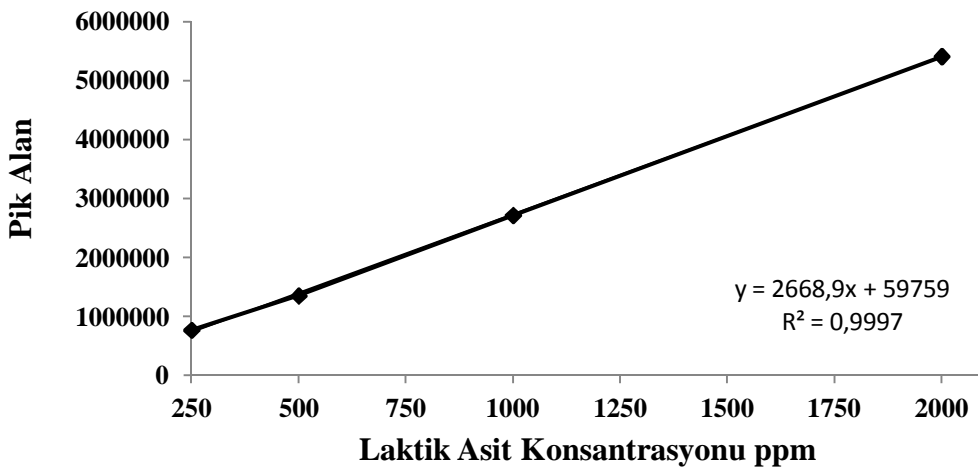
Örneklerin HPLC'ye enjeksiyonu yapılmadan önce numune hazırlanmıştır. Elde edilen filtrattan 2,5 ml, 0,05 N H₂SO₄ içinde 1 ml alınmıştır ve toplam hacim steril ultra saf su ile 25 ml'ye tamamlanmıştır. Daha sonra bu karışım 0,22 µm (Sartorius) filtreden geçirilmiştir. Son aşamada filtrattan 50 µl alınarak kolona enjekte edilmiştir.

Standartların hazırlanmasında HPLC saflıkta laktik asit (Merck 1.00366.0500) ve asetik asit (Merck 1.00058.1000) kullanılmıştır. Laktik asitten 250 ppm, 500 ppm, 1000 ppm, 2000 ppm, asetik asitten 100 ppm, 125 ppm, 250 ppm, 500 ppm konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlanmıştır ve cihaza enjekte edilerek, yukarıda sıralanan protokol dahilinde yürütülmüştür ve

standart e ri elde edilmi tir. Standart e rilere ait denklemler ve R^2 de erleri a a ²da ekil 3.5 ve ekil 3.6de gösterilmi tir.



ekil 3.5 Standart asetik asit konsantrasyonu e risi



ekil 3.6 Standart laktik asit konsantrasyonu e risi

4. SONUÇLAR ve TARTI MA

4.1 Yarı-kesikli Fermentasyon Sisteminde *L. lactis* N8 Su unun Biyokütle Olu umu ve Nisin Üretimine Hemin Konsantrasyonunun Etkisi

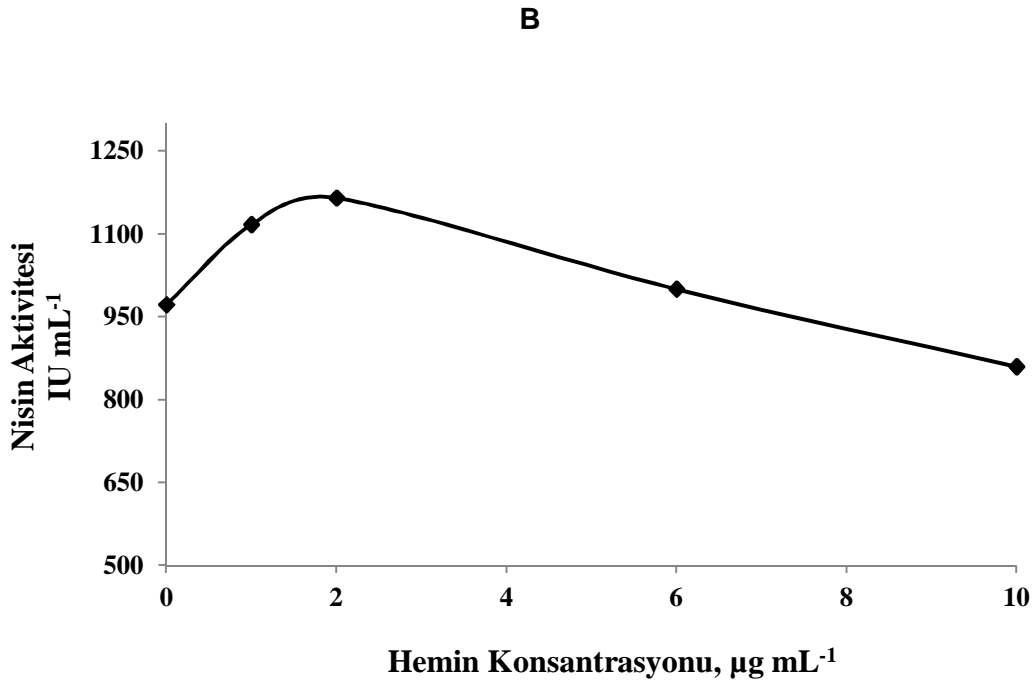
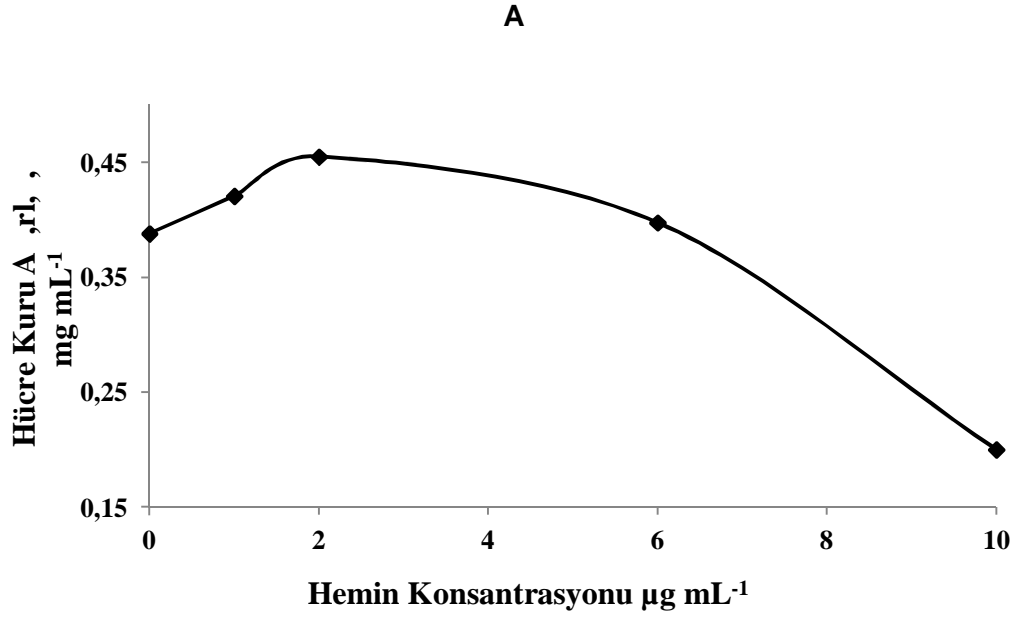
Yarı-kesikli fermentasyon ortamındaki hemin miktarının nisin üretimine olan etkisini belirlemek için; 0, 1, 2, 4, 6 ve 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyonlar kullanılmış, toplanan örneklerin içerdiği hücre kuru ağırlığı (mg mL^{-1}) ve nisin miktarı (IU mL^{-1}) tespit edilmiştir. Şekil 4.1A ve B'den görüldüğü gibi fermentasyon ortamına hemin ilavesi ile örneklerin biyokütle ve nisin üretim miktarı önce artmış, ardından azalmıştır. Ortama 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ hemin ilave edilmesi durumunda biyokütle oluşumu ve nisin üretim miktarları maksimum seviyeye ulaşmış bu seviyeden sonra her iki parametrede azalma gerçekleşmiştir. Buna göre yapılan çalışmada hemin ilavesi ile yapılarak yürütülen yarı-kesikli fermentasyonda en yüksek biyokütle miktarı 0.45 mg mL^{-1} ve nisin üretim oranı ise 1165 IU mL olarak saptanmıştır (Şekil 4.1A ve B). Fermentasyon ortamına 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ hemin ilave edilmesi durumunda biyokütle oluşumu ve nisin üretim miktarı düşmüştür. Nitekim bu konsantrasyonda biyokütle ve nisin üretim miktarı sırasıyla 0,20 mg mL^{-1} ve 860 IU mL^{-1} ölçülmüştür.

Ortamda heminin bulunması ile *L. lactis* hücrelerinin biyokütle miktarında artış sağlanmış bir çok çalışmada da gösterilmiştir (Duwat vd. 2001, Gaudu vd. 2002, Lan vd. 2006, Nagayasu vd. 2007, Koebman vd. 2008, Razvi vd. 2008, Broojmans vd. 2009, Lechardeur vd. 2011, Arioli vd. 2013). Bu çalışmaların her birinde hemin konsantrasyonu sabit ve tek bir değer ile çalışılmış, biyokütle miktarında yaklaşık 2 kat artış olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada da hemin ilavesi ile biyokütle miktarının artışına katkı edilmiş ancak literatür verilerine kıyasla daha düşük artış kaydedilmiştir. Buradaki temel farklılık çalışmamızda hemin başlangıç deşerinin nisin üretimi üzerindeki etkisinin izlenmesi için deşer başlangıç deşerinin (glikoz konsantrasyonu ve çözünmüş oksijen yüzdesi) düşük tutulmasından kaynaklanmaktadır.

Bugüne kadar farklı hemin konsantrasyonlarının nisin üreticisi *L. lactis* hücrelerinin gelişimi üzerine etkisi rapor edilen bir çalışmamız bulunmamaktadır. Dolayısıyla yaptığımız çalışmada izlendiği gibi hemin konsantrasyonu hücrelerinin gelişimini önce tetkiletileri konsantrasyonlarda hücre gelişimini baskılamıştır. Bilindiği gibi hemin *L. lactis* hücrelerinde homeostasis mekanizmaları ile hücre içerisine alınmakta ancak fazla miktardaki hemin konsantrasyonu hücre içerisinde toksik etkiye bulunabilmektedir (Mayfield vd. 2011, Pedersen vd. 2012).

Heminin hücre gelişimini tetkiletilmesi nisin üretimini de artırır. Bu durum beklendiği gibi hücre sayısıyla ilişkilidir. Birçok çalışmada nisin üretiminin hücre sayısı ile bağlantılı

oldu u rapor edilmi tir. im ek vd. 2009 yzında yaptklar2 çal2 mada belli periyotlarla besiyerinin de i tirilmesi durumunda *L. lactis* hücre yo unlu unun art2 2 ile birlikte nisin üretiminin önemli ölçüde artmas2n2n nisin üretiminin hücre yo unlu u ile ili kili oldu unu göstermi tir.



ekil 4.1 Farklı hemin konsantrasyonları kullanılarak yürütülen yarı-kesikli fermentasyonda hemin ile solunumu tevik edilmiş *L. lactis* N8 suşunun hücre kuru ağırlığı (mg mL^{-1}) (A) ve nisin üretimi (IU mL^{-1}) (B). Veriler 3 tekrarın ortalamasıdır. Standart sapma %50'nin altındadır.

4.2 Yarı-kesikli Fermentasyon Sisteminde *L. lactis* N8 Suunun Biyokütle Oluşumu ve Nisin Üretimine Glukoz Konsantrasyonunun Etkisi

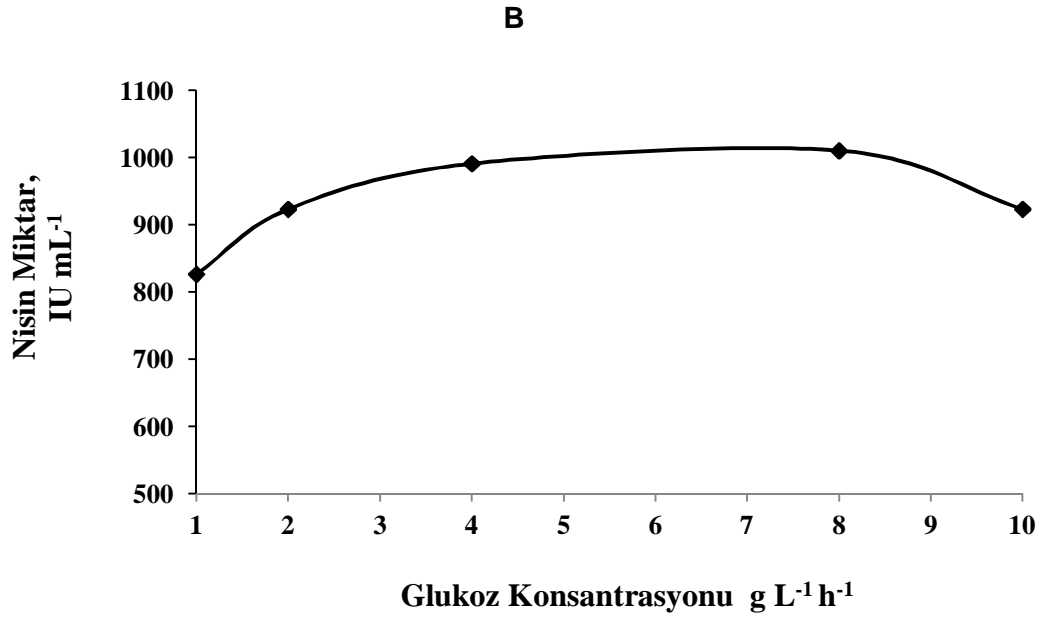
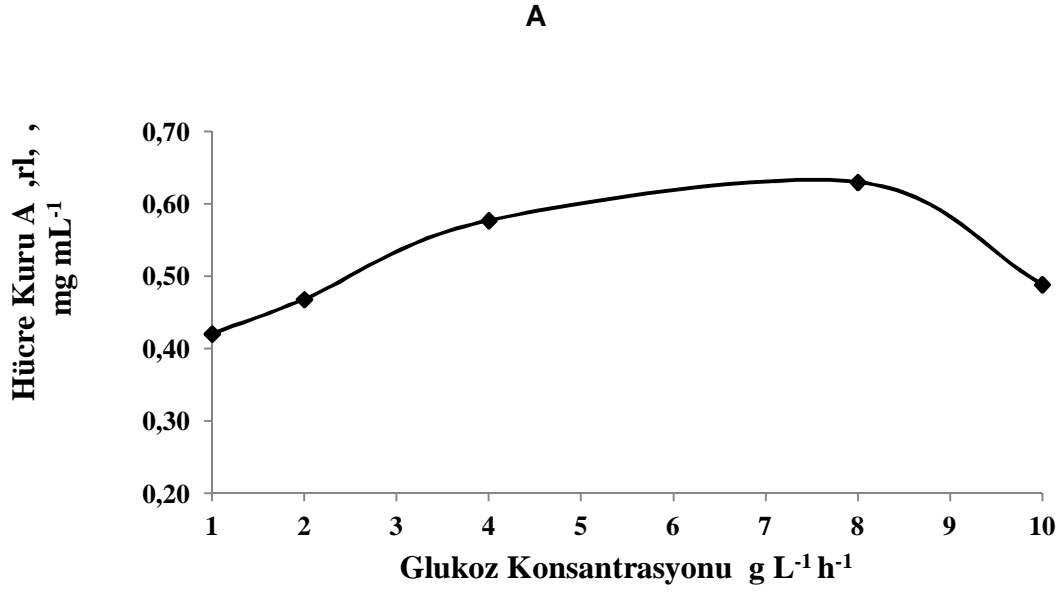
Yarı-kesikli fermentasyon ortamına beslenen glukoz konsantrasyonunun (1, 2, 4, 8 ve 10 g L⁻¹ h⁻¹) biyokütle ve nisin üretimine etkisini belirlemek için; yürütülen fermentasyonda alınan örneklerin hücre kuru ağırlığı (mg mL⁻¹) ve nisin üretim miktarı (IU mL⁻¹) ölçülmüştür. *L. lactis* N8 suunun biyokütle ve nisin üretim miktarı fermentasyon ortamına 8 g L⁻¹ h⁻¹ oranında glukoz beslemesine kadar artmıştır. Daha yüksek konsantrasyonda glukoz beslemesi durumunda söz konusu parametrelerde düelmeler tespit edilmiştir. Buna göre, en yüksek biyokütle ağırlığına (0,63 g L⁻¹) ve nisin üretimine (1010 IU mL⁻¹) 8 g L⁻¹ h⁻¹ oranında glukoz beslenerek ulaşılmıştır (ekil 4.2A ve B). 10 g L⁻¹ h⁻¹ oranında glukoz beslenerek yapılan yarı-kesikli fermentasyonda tespit edilen hücre biyokütle ağırlığı, 8 g L⁻¹ h⁻¹ oranında beslenerek yapılan fermentasyona kıyasla % 22 oranında azalmıştır ve 0,49 g L⁻¹ olarak ölçülmüştür. Bu duruma paralel olarak nisin üretimi de 923 IU mL⁻¹ olarak belirlenmiştir.

Papagianni ve ark. (2007a) fermentasyon ortamında sabit glukoz konsantrasyonun sağlandığı fermentasyon koşullarında *L. lactis* ssp. *lactis* ATCC 11454'de nisin üretimini araştırmıştır. Bu çalışmada 2.5 g L⁻¹ ile 75 g L⁻¹ arasında deiyen farklı glukoz konsantrasyonları denendiği yarı-kesikli fermentasyonlar gerçekleştirilmiştir. En yüksek nisin üretimine (6100 IU mL⁻¹) glukozun 10 g L⁻¹ konsantrasyonda sabit tutulan aerobik yarı-kesikli fermentasyon sonucunda ulaşılmıştır. Ortamdaki glukoz konsantrasyonunun 10 g L⁻¹'den daha fazla durumunda hücrelerin glukoz doygunluğuna ulaşması ve buna bağlı olarak da nisin üretiminin azaldığı belirlenmiştir.

Mikroaerobik koşullarda yürütülen diğer bir çalışmada farklı glukoz konsantrasyonları (2,475 g L⁻¹ ile 99,9 g L⁻¹) kullanılmış, yarı-kesikli fermentasyonda *L. lactis* ssp. *lactis* LM0230'da en yüksek biyokütle miktarına 9,9 g L⁻¹ h⁻¹ oranında glukoz beslemesi durumunda ulaşılmıştır. Bu glukoz deiyerlerinin üstündeki oranlarda, hücrelerin glikolitik döngülerinde inhibisyonların gerçekleştiği, bunun da fosfofruktokinaz enzim aktivitesinin azalmasından kaynaklandığına bağlı olarak (Papagianni vd. 2007b).

Bu çalışmada maya benzer şekilde fermentasyon ortamında heminin kullanıldığı bir çalışmada, *L. lactis* IL 1403 gelişiminin ortamdaki glukoz konsantrasyonu ile ilişkisini araştırmıştır. 60 g L⁻¹ ile 90 g L⁻¹ arasındaki farklı başlangıç glukoz konsantrasyonları denendiği bu çalışmada, denenen en yüksek glukoz konsantrasyonunda (90 g L⁻¹) bile, hücre gelişiminde herhangi bir baskılanma gözlenlenmemiştir. Hemin içermeyen ortamda geliştirilen *L. lactis* IL 1403 hücreleri 4,1 g L⁻¹ biyokütle ağırlığına kadar gelişirken, heminin ilavesi durumunda biyokütle söz konusu hücrenin biyokütle ağırlığı 6,6 g L⁻¹'ye ulaşmıştır. *L. lactis*'in yüksek glukoz konsantrasyonlarında gelişiminin baskılanması vurgulanan birçok

al² maya ra men bu al² mada herhangi bir bask²lanman²n olmamas², heminin mikroorganizman²n metabolik özellikleri üzerindeki olumlu etkilerinden kaynakland² 2 seklinde yorumlanm² t²r (Razvi vd. 2008).



ekil 4.2 Farklı glukoz konsantrasyonları kullanarak yürütülen yarı-kesikli fermentasyonda hem inulin ile solunumu test edilmiş *L. lactis* N8 suşunun hücre kuru ağırlığı (mg mL⁻¹) (A) ve nisin üretimi (IU mL⁻¹) (B). Veriler 3 tekrarın ortalamasıdır. Standart sapma %5'den altındadır.

4.3 Yarı-kesikli Fermentasyon Sisteminde *L. lactis* N8 Su unun Biyokütle Oluumu ve Nisin Üretimine Çözünümlü Oksijen Konsantrasyonunun Etkisi

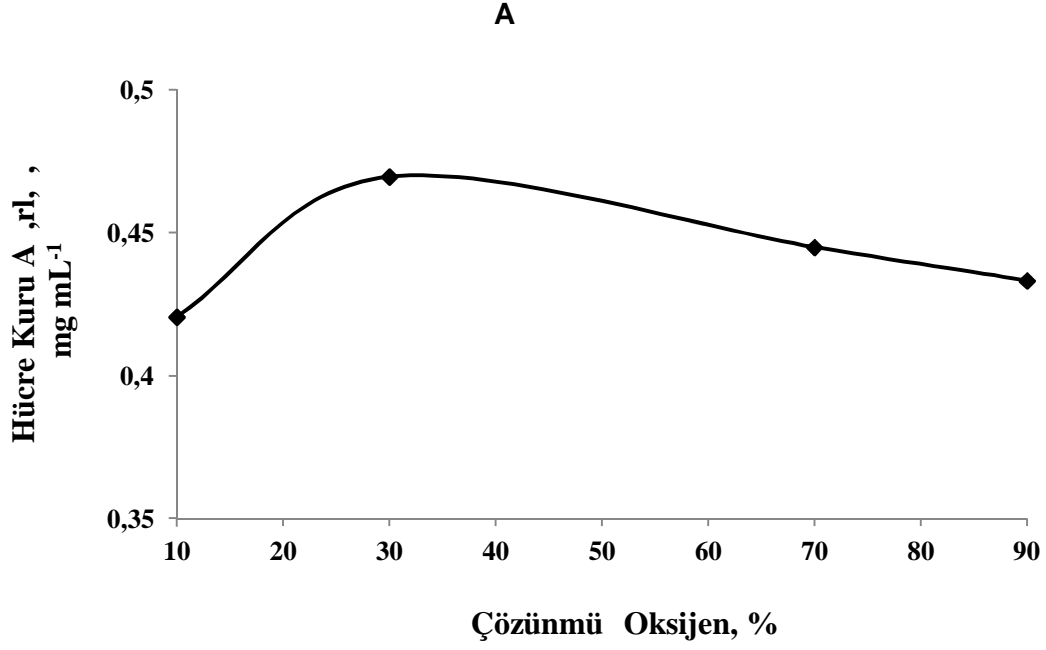
Yarı kesikli fermentasyon ortamında çözünümlü oksijen konsantrasyonunun nisin üretimine olan etkisini belirlemek için; %10, 30, 70, ve 90 oranında oksijen içeren ortam ile yarı-kesikli fermentasyon yürütülmü ve toplanan örneklerde hücre kuru ağırlığı (mg mL^{-1}) ve nisin üretim miktarı (IU mL^{-1}) ölçülmü tür. Ekil 4.3A ve B'de görüldü ü gibi % 30 çözünümlü oksijen miktarına sahip ortamda gerçekleşen yarı-kesikli fermentasyon sonunda, maksimum hücre biyokütle ağırlığı ve nisin üretim miktarına ulaşılmı , bu değerler sırasıyla 0.47 mg mL^{-1} , 1117 IU mL^{-1} olarak ölçülmü tür.

Ekil 4.3A incelendi inde, fermentasyon ortamında kullanılan yüksek çözünümlü oksijen miktarının (%70 ve 90) üretici hücre üzerinde artan stres ortamı olarak mikrobiyel gelişimi azalttığı görülmektedir. Dikkati çeken diğer nokta ise, yüksek oksijen miktarlarının (%70 ve 90) nisin üretimi ve aktivitesi üzerinde inhibisyona neden olmasıdır (ekil 4.3B). Nitekim %90 çözünümlü oksijen yüzdesi ile yapılan yarı-kesikli fermentasyonun sonunda ulaşılan hücre biyokütle ağırlığındaki düşüş ($0,433 \text{ mg mL}^{-1}$) aynı oksijen seviyesinde ölçülen nisin miktarındaki (317 IU mL^{-1}) düşüşten daha az olmasıdır. Bu durumun fermentasyon ortamında yüksek miktarda çözünümlü olarak bulunan oksijenin, üretilen nisinde antimikrobiyal aktivite kayıplarına neden olmasından ileri geldiği varsayılmaktadır. Nitekim nisin, yapısında bulunan lantionin köprülerinin sülfür atomları serbest oksijen ile doyurulması durumunda aktivitesini kaybetmektedir. Dolayısıyla fermentasyon ortamında bulunan yüksek miktarlardaki çözünümlü oksijen, nisin biyomolekülünün yapısını bozmak sureti ile antimikrobiyal aktivitelerinde kayıplara yol açmaktadır (Stanford vd. 2009).

L. lactis hemin bulunan aerobik koşullarda NADH'ın NAD⁺ okside edebilir. *L. lactis*'in sözcüğü solunum yapabilme yeteneğine dayanan çalınmaların çoğunda hücre biyokütle ağırlığında önemli artışlar elde edildiği vurgulanmıştır ve hemin ile tevik edilen solunum sonucu oluşan metabolitlerin çeşitliliğindeki artış ile ortamda biriken laktatın neden olduğu geri yönlü inhibisyonun büyük ölçüde engellendiği rapor edilmiştir (Duwatt vd. 2001, Rezaiki vd. 2004, Lan vd.2006, Koebmann vd. 2008, Brooijmans vd. 2009a). Ancak literatürde bu koşullarda gerçekleşen fermentasyonlarda kullanılan oksijen miktarının nisin üretimine üzerine etkisini inceleyen tek çalınma bulunmaktadır. Nagayasu vd. (2007) tarafından bu çalınmada kısaca $1,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ hemin ilavesi ile kesikli ve yarı-kesikli mikroaerofilik fermentasyon deneyleri yapılmıştır. Fermentasyonlar sonucunda *L. lactis* ATCC11454 su unda laktat üretiminin baskılandırılması ve sırasıyla kesikli ve yarı-kesikli fermentasyonlardaki hücre yoğunluğunun 1.8 ve 1.3 kat arttığı tespit edilmiştir. Lakin aynı koşullarda bu hücre

tarafından nisin üretiminde kesikli sistemde çok düşük miktarda artışı belirlenirken, yarı-kesikli sistemde artış olmadığı ifade edilmiştir.

Hemin içermeyen fermentasyon ortamlarında oksijen kullanımıyla *L. lactis*'de nisin üretimi üzerine etkisinin incelendiği çalışmada bulunmuştur. Bu çalışmalardan birisinde *L. lactis* subsp. *lactis* UL719 suyu kesikli fermentasyon ortamında farklı oksijen yüzdeleri kullanılarak çalışılmış, en yüksek nisin üretimi %60 çözünümlü oksijen miktarında ulaşılmıştır (Amiali vd. 1998). Diğer çalışmada ise Cabo vd. (2001) *L. lactis* subsp. *lactis* IIM suyu ile oksijenli ortamda yaptıkları fermentasyonda üretici suyun %100'e kadar artan çözünümlü oksijen miktarında bile nisin üretiminde lineer bir artış sağlandığı tespit edilmiştir. Söz konusu bu literatür verileri bu çalışmada ulaşılan optimum oksijen miktarından (%30) yüksektir. Bu farklı fermentasyon ortamında kullanılan üretici suyu çeşitliliğinden, kullanılan fermentasyon sistemi ve koşullarından ileri geldiği düşünülebilir.



ekil 4.3 Farklı çözümlü oksijen konsantrasyonları kullanılarak yürütülen yarı kesikli fermentasyonda hemin ile solunumu test edilmiş *L. lactis* N8 suyunun hücre kuru ağırlığı (mg mL⁻¹) (A) ve nisin üretimi (IU mL⁻¹) (B). Veriler 3 tekrarın ortalamasıdır. Standart sapma %5'den altındadır.

4.4 Yarı-kesikli Fermentasyon Sisteminde Hemin ile Solunumun Tevik Edildiği *L. lactis* N8 Su unda Nisin Üretimine Cevap Yüzey Yöntemi ile Optimizasyonu

Çalışma kapsamında yapılan öncü deneyler neticesinde; hemin, glukoz ve çözünümlü oksijen konsantrasyonunun, yarı-kesikli fermentasyon sisteminde *L. lactis* N8 suunun nisin üretimine etkili olduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla bu parametreler, aerobik yarı kesikli fermentasyon sisteminde *L. lactis* N8 suunun nisin üretiminin cevap yüzey yöntemi ile optimizasyonunda bağımsız değişkenler olarak belirlenmiştir. Söz konusu bağımsız değişkenlerin öncü çalışmalar ile tespit edilen deneysel aralıkları Tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1. Araştırılan parametreler ve deneysel aralıkları

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

Cevap yüzey yöntemi ile yapılan optimizasyonda yüzey merkezli tasarım kullanılarak 20 deneysel noktada (14 farklı kombinasyon, merkezde 6 tekrar) nisin üretimi gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan deneysel tasarım noktaları ve cevapları Tablo 4.2'de verilmiştir. Tasarım matrisi ve herbir terimin uyumu varyans analizi (ANOVA) ile incelenmiş ve sonuçlar Tablo 4.3'de gösterilmiştir. Çalışmada bağımsız değişkenlere ait deneysel aralıkları (Tablo 4.1) kullanılarak oluşturulan 20 farklı noktada nisin üretim sonuçlarının varyans analizi; modelin R² değerinin % 88.4 ve model uyum eksikliğinin ise anlamlı olduğu (P<0.001) göstermiştir. Bu sonuçlar ile elde edilen model denklemin nisin konsantrasyonu için incelenen bağımsız değişken aralığında yüksek doğrulukta uygulanamayacağı anlaşılmıştır.

Tablo 4.2 Yar2-kesikli fermentasyon sisteminde glukoz, hemin ve çözünmü oksijen konsantrasyonlar2n2n optimizasyonu için olu turulan yüzey merkezli kompozit deneme deseni.

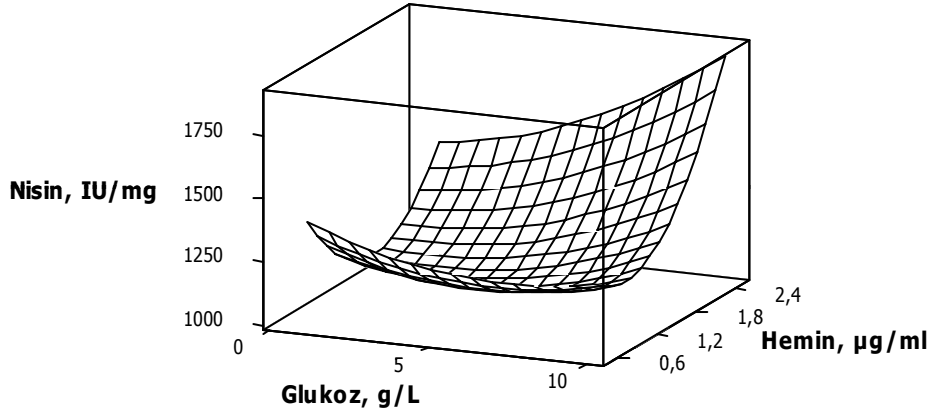
Deneme No	Glukoz, g L ⁻¹ h ⁻¹	Hemin, µg mL ⁻¹	Oksijen, %	Nisin, IU mg ⁻¹
1	10	1,5	50	1225,33
2	5,5	1,5	50	1153,64
3	1	2,5	20	1138,30
4	1	2,5	80	762,48
5	5,5	2,5	50	1662,53
6	5,5	1,5	50	1101,16
7	10	0,5	20	464,56
8	1	1,5	50	1268,76
9	5,5	1,5	80	314,63
10	10	2,5	80	1271,82
11	10	0,5	80	1346,87
12	1	0,5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

Tablo 4.3 Yar²-kesikli fermentasyon sisteminde glukoz, hemin ve çözünmüş oksijen konsantrasyonlarının optimizasyonu için oluşturulan yüzey merkezli kompozit deneme deseninin varyans analizi.

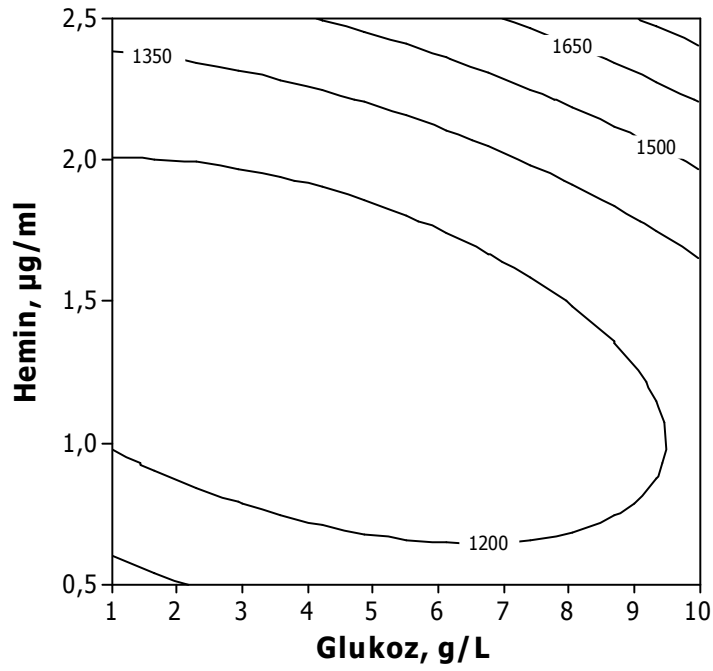
Kaynak	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Düzeltilmi Kareler Toplamı	Düzeltilmi Kareler Ortalaması	F	P
Regresyon	9	2377,18	2377,18	264,131	8,43	0,001
Lineer	3	1143,32	291,19	97,063	3,1	0,076
kinci Derece	3	917,99	917,99	305,997	9,77	0,003
Etkile im	3	315,86	315,86	105,287	3,36	0,063
Artık Hata	10	313,19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

Çalışma kapsamında belirlenen bağımsız değişkenlerin aralıkları kullanılarak yapılan optimizasyonda modelin uyumsuz çıkması, özellikle hemin ve glukoz aralıklarının yeterince geniş tutulması ile ilgilidir. Nitekim parametrelerin birisi merkezde sabit tutularak, diğer faktörlerin birim biyokütlede üretilen nisin miktarına ilişkin oluşturulan izohips eğrileri ve yüzey grafikleri incelendiğinde hemin ve glukoz optimumlarının kullanılan maksimum aralığa yakındır. Bu durum özellikle hemin ve glukoz konsantrasyonunun artması ile birlikte hücre büyümesinin artmasıyla ön görülen optimum noktanın kayması ile ilgilidir. Nitekim varyans analizinde (Tablo 4.3) etkileimin de anlamsız ($P=0,063$) çıkması bu görüşü doğrulamaktadır.

A

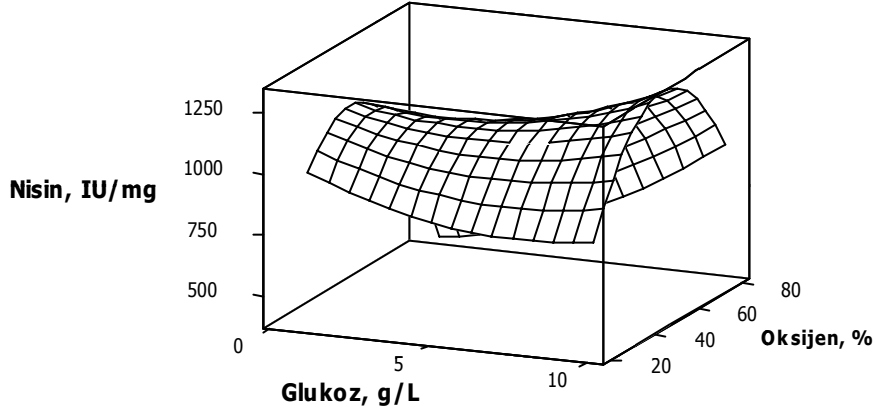


B

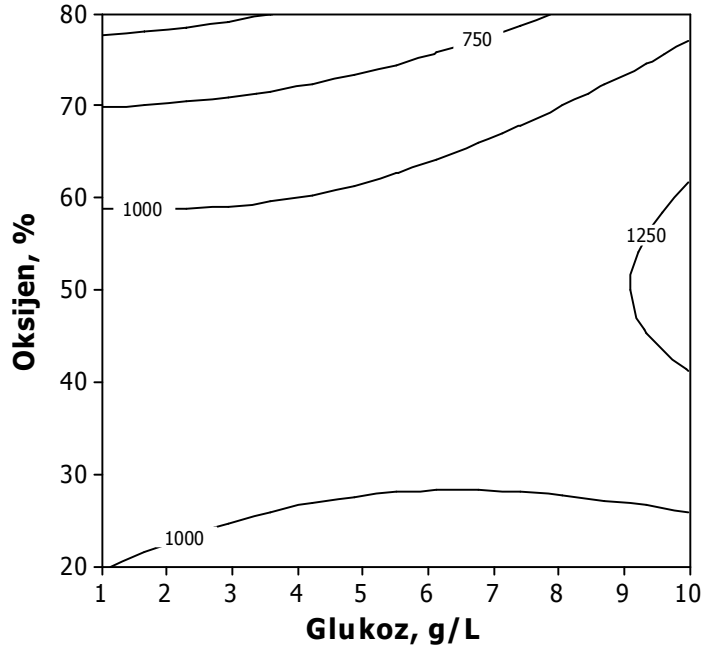


ekil 4.4 Yar2-kesikli fermentasyon sisteminde glukoz ve hemin konsantrasyonlar²in birim biyokütlerde üretilen nisin miktar²na etkisini gösteren A) izohips e ri ve B) yüzey grafi i.

A

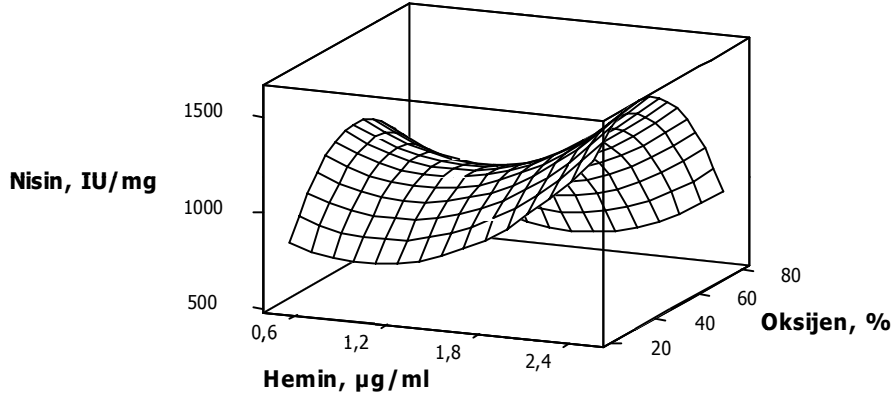


B

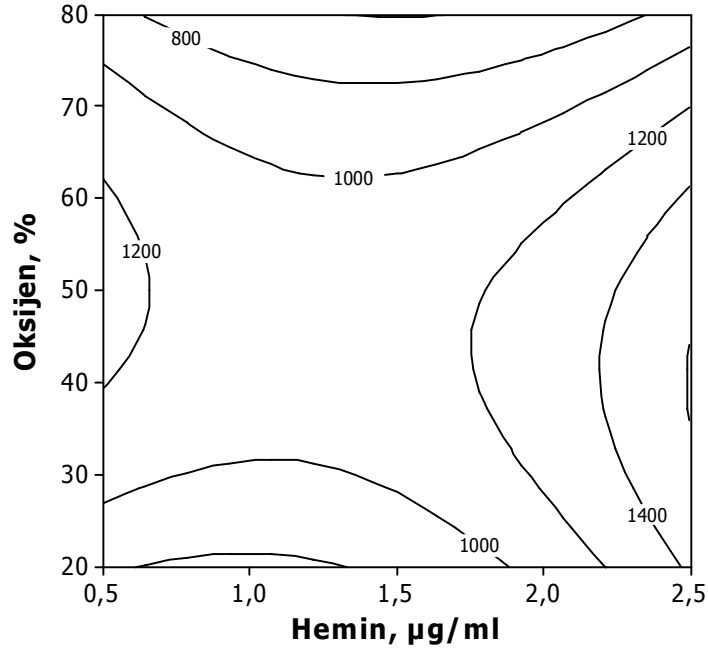


ekil 4.5 Yar²-kesikli fermentasyon sisteminde glukoz ve çözünmü oksijen konsantrasyonlar²ni birim biyoküttele üretilen nisin miktar²na etkisini gösteren A) izohips e ri ve B) yüzey grafi i.

A



B



ekil 4.6 Yar²-kesikli fermentasyon sisteminde hemin ve çözünmü oksijen konsantrasyonlar²ni birim biyokütüde üretilen nisin miktar²na etkisini gösteren A) izohips e ri ve B) yüzey grafi i.

Çal² mada kullan²an ba²ımsız de² i kenlerin ön görülen aralıklar²ın cevap yüzey modeli ile uyumsuz ç²ıkması, özellikle analiz sonuçları²ın optimum parametrelerin maksimum de²erleri üzerinde oldu²una i²aret etmesi dolayısıyla çal² maya ek denemeler ilave edilmiştir. Bunun için çal² mada hemin ve glukoz için sırasıyla 4,5 µg mL⁻¹ ve 15 g L⁻¹ h⁻¹ maksimum noktalar² ele alınmıştır. Dolayısıyla çal² mada Tablo 4.4 verilen 6 adet deneme ilave olarak yapılmıştır.

Tablo 4.4 Yar²-kesikli fermentasyon sisteminde glukoz, hemin ve çözünmü oksijen konsantrasyonları²ın optimizasyonu için oluşturulan yüzey merkezli kompozit deneme desenine ilave edilen denemeler.

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

ilave edilen denemeler sonunda ula²ılan birim biyokütlede nisin üretim sonuçları², daha önce modelin vermiş oldu²ğu deneme deseni sonuçları² ile birleştirilmiştir ve minitab istatistik programında cevap yüzey modeli kullanılarak yeniden analiz edilmiştir. Yapılan varyans analizine göre (Tablo 4.5) model uyumunu gösteren R² de²eri % 98.3 model uyum eksikliği ise anlamsız (P=0,165) olarak bulunmuştur. Tespit edilen bu sonuçlar hemin, glukoz ve çözünmü oksijen konsantrasyonu için yar²-kesikli fermentasyonda elde edilen model denklemin nisin konsantrasyonu için yüksek doğrulukta uygulanabileceğini açıklamaktadır.

Tablo 4.5 Yar2-kesikli fermentasyon sisteminde glukoz, hemin ve çözünmü oksijen konsantrasyonlar2n2n optimizasyonu için olu turulan yüzey merkezli kompozit geni letilmi deneme desenin varyans analizi.

Kaynak	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Dztilmi Kareler Toplamı	Dztilmi Kareler Ortalaması	F	P
Regresyon	9	5847169	5847169	649685	69,17	0,000
Lineer	3	1888522	2718153	906051	96,46	0,000
ikinci Derece	3	3471286	2927174	975725	103,88	0,000
Etkile im	3	487360	487360	162453	17,3	0,000
Art2k Hata	11	103322	103322	9393	-	-
Uyum Eksikli i	6	77585	77585	12931	2,51	0,165
Saf Hata	5	25737	25737	5147	-	-
Toplam	20	5950491	-	-	-	-

Tablo 4.5ten görüldü  gibi glukoz ve hemin deneme aral2klar2n geni letilmesi durumunda lineer, ikinci derece ve etkile imin anlamlı (P<0.001) oldu u bulunmu tur. Bu sonuç her bir parametrenin tek tek yar2-kesikli fermentasyon sisteminde solunumun te vik edildi i ko ulda *L. lactis* N8 su unun nisin üretimine etkili oldu unu göstermi tir. Hatta model e itlikteki katsay2lar2n regresyon analizi de sonular2 desteklemi tir. Buna göre deneysel veriler üzerine çoklu regresyon analizi uygulanarak ve elde edilen regresyon katsay2lar2 kullan2larak yüzey merkezli tasar2m için ikinci dereceden model e itlik olu turulmu ve a a 2da verilmi tir.

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

Tablo 4.6da glukoz, hemin ve çözünmü oksijen konsantrasyonlar2 ile nisin üretimi (cevap) aras2nda pozitif do rusal bir etki oldu u gözlenmektedir (P<0.001). Bu, artan ba 2ms2z de i ken de erlerinde nisin üretiminin artaca 2n2n göstergesidir.

P de erleri her bir katsay2n2n önemini kontrol etmek için bir araç olarak kullan2lmaktadı. P de erinin küçük olmas2, katsay2ya ili kin ba 2nt2n2n önem derecesinin daha fazla oldu unu göstermektedir. Modelde kullan2lan  ba 2ms2z de i ken içinde hemin, en yüksek lineer regresyon katsay2s2 ile (2944,32) nisin üretimi üzerine en büyük etkiye sahiptir. Hemini s2rayla glukoz konsantrasyonu (111,79) ve çözünmü oksijen konsantrasyonu (33,38) takip etmi tir.

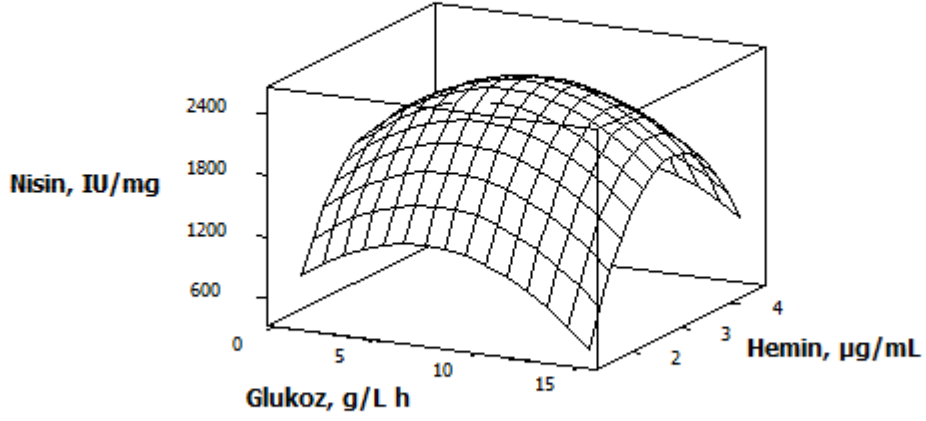
Ba 2ms2z de i kenlerin interaksiyon etkileri incelendi inde; glukoz-hemin aras2ndaki interaksiyonlar2n P>0.05 d2zeyinde 2nemli olduklar2 belirlenmi tir (Tablo 4.6). Bu de er 0.05den b2y2k oldu u i2in yar2-kesikli fermentasyon sisteminde aerobik solunuma te vik edilmi *L. lactis* N8 su unda nisin 2retiminin tahminlenmesi i2in olu turulan ikinci dereceden model e itlikte bu interaksiyon kullan2lmam2 t2r. Di er taraftan, Tablo 4.6 incelendi inde hemin, glukoz ve oksijen konsantrasyonunun nisin 2retimi 2zerinde negatif kuadratik etkisinin oldu u g2zlenmektedir (p<0.05). Bu sonu2ç artan ba 2ms2z de i ken seviyelerinin bir dereceye kadar nisin 2retiminin artmas2na neden olmas2 ancak belirli bir seviyenin 2zerine 22k2ld2 2nda nisin 2retiminin azalmas2n2n g2stergesidir.

Tablo 4.6 Yar2-kesikli fermentasyon sisteminde glukoz, hemin ve 22z2nm2 oksijen konsantrasyonlar2n2n optimizasyonu i2in tahmin edilen regresyon katsay2lar2

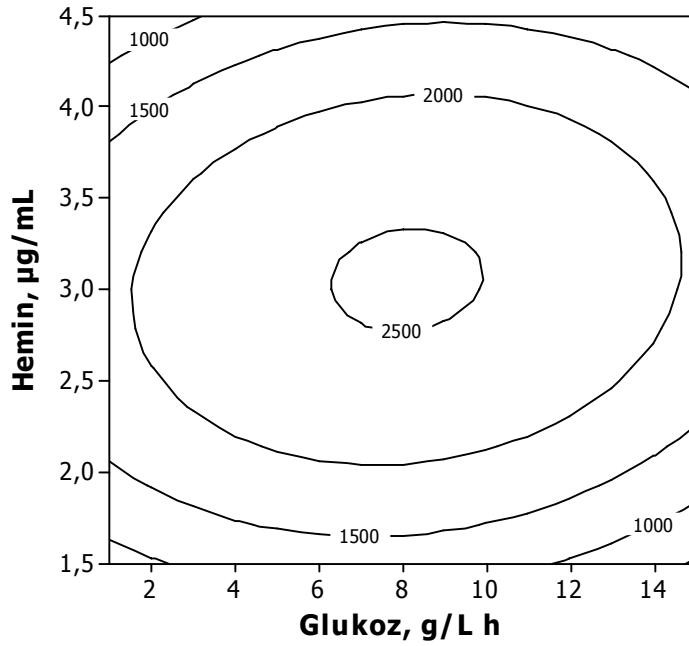
Terim	Katsayilar	SH katsayisi	T	P
Sabitler	-2968,09	360,588	-8,231	0,000
Glukoz, g L ⁻¹ h ⁻¹	111,79	23,254	4,807	0,001
Hemin, µg mL ⁻¹	2944,32	180,492	16,313	0,000
Oksijen, %	33,38	7,52	4,438	0,001
Glukoz, g L ⁻¹ h ⁻¹ * Glukoz, g L ⁻¹ h ⁻¹	-12,7	2,086	6,089	0,000
Hemin, µg mL ⁻¹ * Hemin, µg mL ⁻¹	-532,57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

ekil 4.7, ekil 4.8 ve ekil 4.92la parametrelerden bir tanesi merkezde sabit tutuldu unda, di er iki fakt2r seviyelerinin nisin 2retimine olan etkileri izohips e rileri ve y2zey grafikleri ile g2sterilmi tir. Maksimum nisin konsantrasyonu fakt2rlerin orta seviyelerinde elde edilmi tir ve daha y2ksek art2 lar nisin 2retiminde azalmaya neden olmu tur.

A

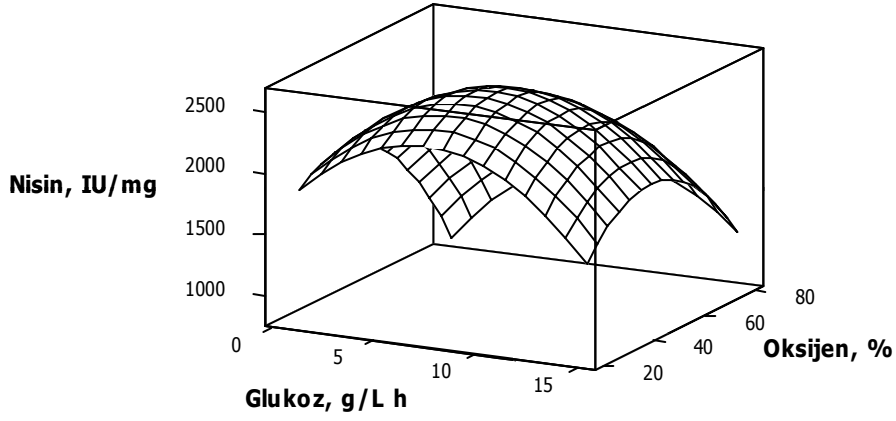


B

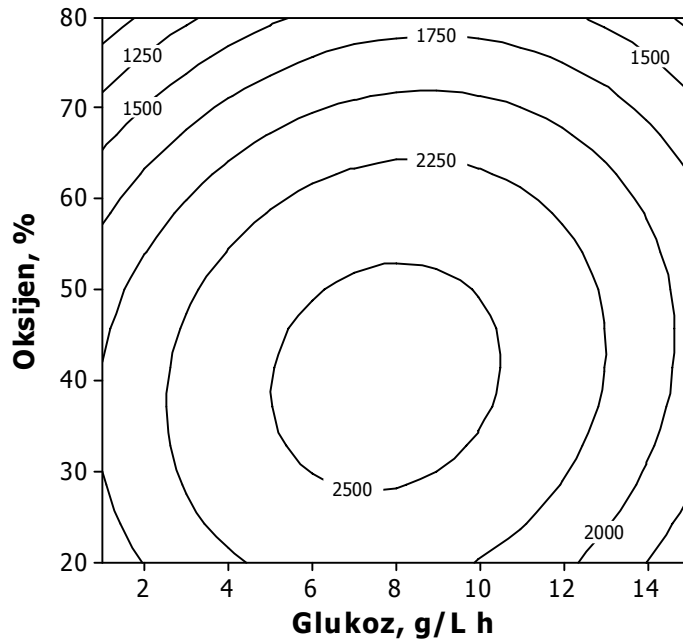


ekil 4.7 Yar²-kesikli fermentasyon sisteminde glukoz ve hemin konsantrasyonlar²nn birim biyoküttele üretilen nisin miktar²na etkisini gösteren düzeltilmi A) izohips e ri ve B) yüzey grafi i.

A

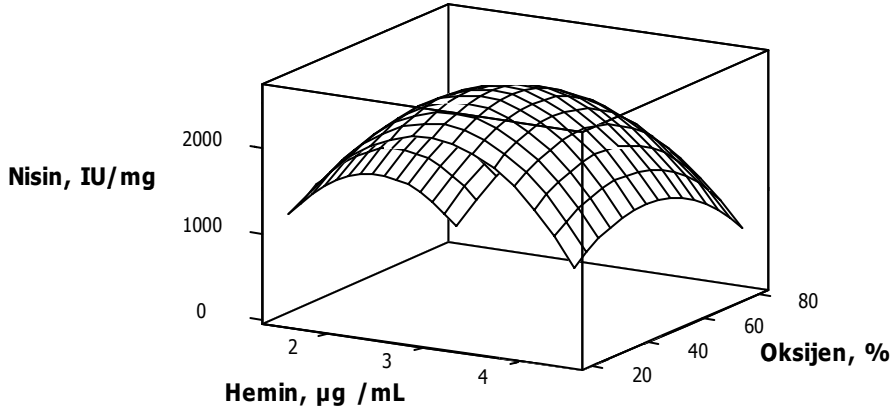


B

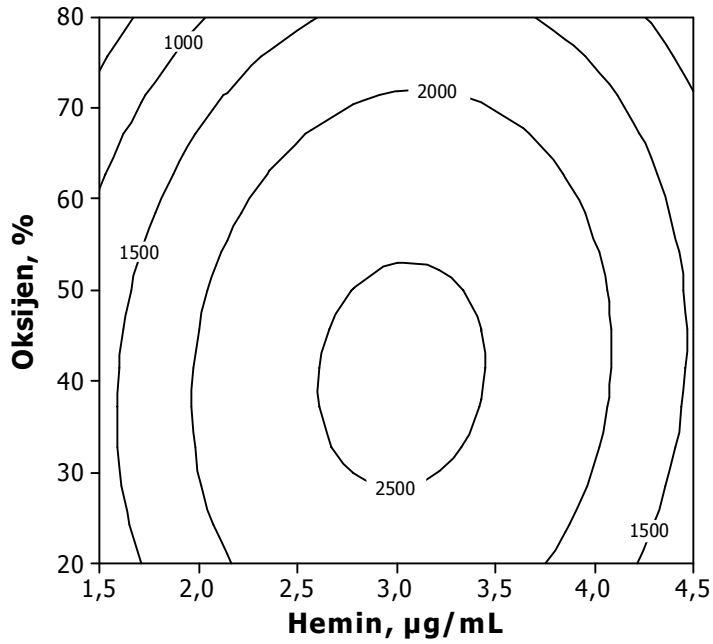


ekil 4.8 Yar²-kesikli fermentasyon sisteminde glukoz ve çözünmü oksijen konsantrasyonlar²ni birim biyokütlede üretilen nisin miktar²na etkisini gösteren düzeltilmi A) izohips e ri ve B) yüzey grafi i.

A



B



ekil 4.9 Yar²-kesikli fermentasyon sisteminde hemin ve çözünmü oksijen konsantrasyonlar²nn birim biyokütlede üretilen nisin miktar²na etkisini gösteren düzeltilmi A) izohips e ri ve B) yüzey grafi i.

4.4 Hemin ile Solunumun Te vik Edilen Yarı-kesikli Fermentasyon Sisteminde Optimum Parametreler Kullanılarak *L. lactis* N8 ile Nisin Üretimi

Yarı-kesikli fermentasyon sisteminde, aerobik solunuma te vik edilmi *L. lactis* N8 suunun nisin üretiminin optimizasyonu için olu turulan ikinci dereceden polimial e itlik yardmıyla en yüksek nisin üretiminin $3,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ hemin, $8 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ glukoz konsantrasyonlarının beslenmesi ve ortamda %40 çözünmü oksijen miktarının sa lanması ile elde edilece i belirlenmi tir. Aerobik solunuma te vik edilen yarı-kesikli fermentasyon (heminli yarı-kesikli) ile hemin ve oksijenin kullanılmadık kontrol fermentasyonda (heminsiz yarı-kesikli), Bölüm 3.2'de bahsedilen çal ma protokolü aynen takip edilmi , 24 saat fermentasyon gerçekte tirilmi tir. Kontrol (heminsiz yarı-kesikli) uygulamasında hemin ve oksijen içermeyen, sadece $8 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ glukoz beslemesi yapılan yarı-kesikli fermentasyon sistemi kullanılmı tır. Bu ekilde optimizasyonu yapılan hemin ve çözünmü oksijen miktarlarının biyokütle geli imi ve nisin üretimi üzerindeki etkileri ve farklıklar belirlenmi tir. Heminli ve heminsiz yarı-kesikli uygulamalarda gerçekte tirilen fermentasyonlar boyunca belli saatlerde (0, 1, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 13, 15, 24) fermentasyon ortamından örnekleme yapılmı ve her örne in hücre biyokütle a ırık (mg mL^{-1}) ve nisin üretim miktarı (IU mL^{-1}) ölçülmü tür. ekil 4.9A'da görüldü ü gibi, en yüksek hücre biyokütle a ırık na ($1,00 \text{ mg mL}^{-1}$) heminli yarı-kesikli fermentasyonun 11. saatinde ula ılmı tır. Heminsiz yarı-kesikli fermentasyonun aynı saatinde ise bu de er $0,55 \text{ mg mL}^{-1}$ olarak ölçülmü tür. Sonuç olarak hücre biyokütle a ırık ında heminli yarı-kesikli fermentasyonun, heminsiz yarı-kesikli fermentasyona kıyasla aynı fermentasyon saatinde yakla ık 1,8 kat artı sa lanmı tır.

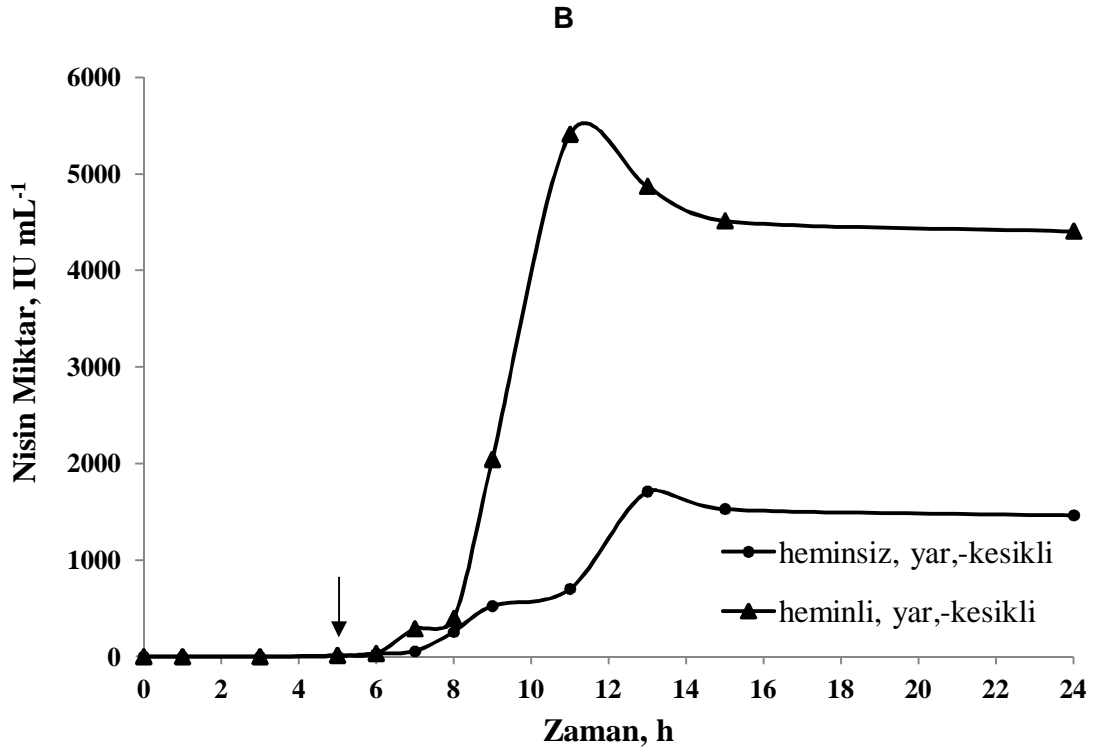
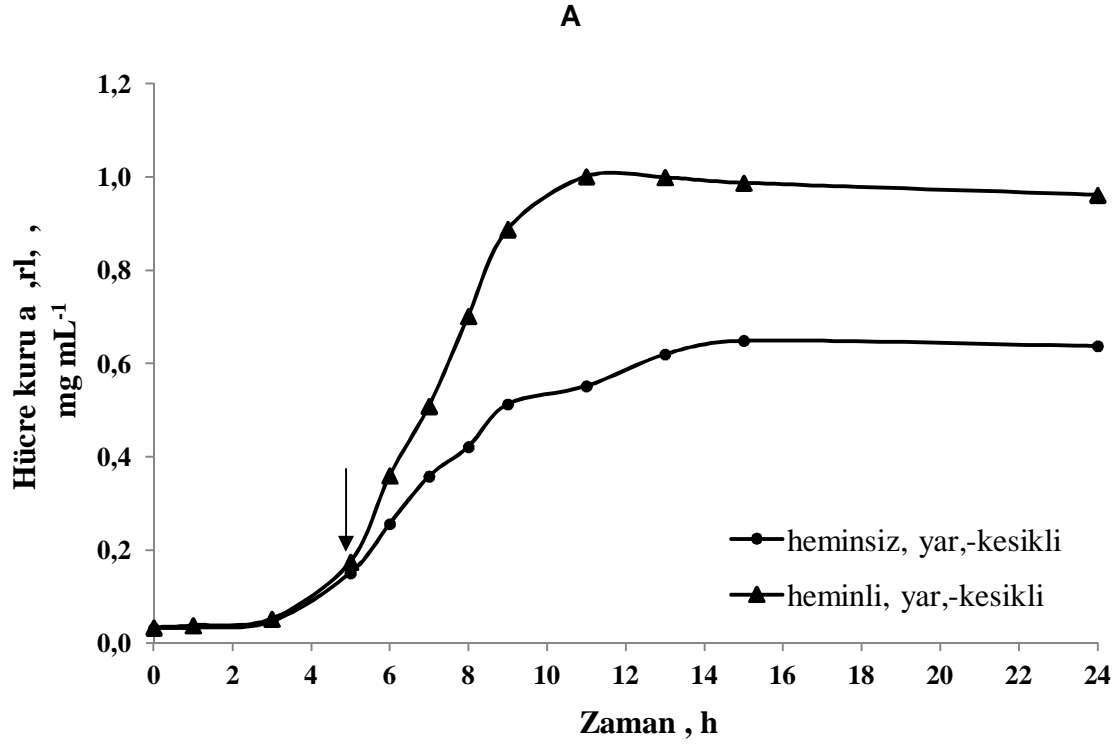
ekil 4.10A'da, iki fermentasyonda ula ılan maksimum biyokütle a ırık ının ölçüldü ü fermentasyon zamanları kıyaslandık ında, heminli yarı-kesikli fermentasyonda maksimum hücre biyokütle a ırık na ($1,00 \text{ mg mL}^{-1}$) 11. saatte, hemin içermeyen kontrol grubunda ise maksimum hücre biyokütle a ırık na ($0,65 \text{ mg mL}^{-1}$) 15. saatte ula ılmı tır Bu durum heminli yarı-kesikli fermentasyona ilave edilen heminin, *L. lactis* N8 suunda lag fazı için gerekli süreyi kısalttı ına, di er yandan logaritmik üreme hızının artırdık ına i aret etmektedir.

Lan vd. (2006) hemin içeren ve içermeyen aerobik ve anaerobik kesikli fermentasyon ortamlarında *L. lactis* LM0230 suunda ula ılan hücre biyokütle a ırıklar arasında farkı incelemi lerdir. Maksimum hücre biyokütle a ırık na ($5,78 \text{ g L}^{-1}$) heminli aerobik ko ulda gerçekte tirilen fermentasyon ortamında ula ılmı lardır. Hemin içeren kesikli fermentasyon ortamında yapılan bir ba ka çal ma mada ise; *L. lactis* MG1363 suunda $5,250$ (OD_{600}) hücre yo unlu una ula ılmı tır. Aynı çal ma mada heminsiz ortamda yapılan kesikli fermentasyonda absorbanı de eri $2,600$ (OD_{600}) olarak ölçülmü ve çal ma mada heminin hücre biyokütle yo unlu unu artırdık ı vurgulanmı tır (Brooijmans vd. 2007). Nagayasu vd. (2007) *L. lactis* ATCC 11454 suunu kullanarak hemin içeren ortamda yarı-kesikli fermentasyonunu

gerçekle tirmi ler ve bu fermentasyonun sonunda heminsiz yapıtlar² fermentasyon ortamında ula tıklar² hücre biyokütle a rlı² rna oranla 1.6 kat daha fazla hücre yo unlu una ula tıklar² rapor etmi lerdir. Bu literatür verileri ile sonuçlar kıyasland² rnda çal² mada ula rlan biyokütle art² rın paralel oldu u görülmektedir. Di er yandan ayn² literatürlerde de ifade edildi i gibi hemin ilavesi hücrelerin enerjetik seviyesini artırd² rndan, hücrelerin daha k²sa lag faz² ve h²zl² logaritmik faz geçirmelerini sa lamaktadır.

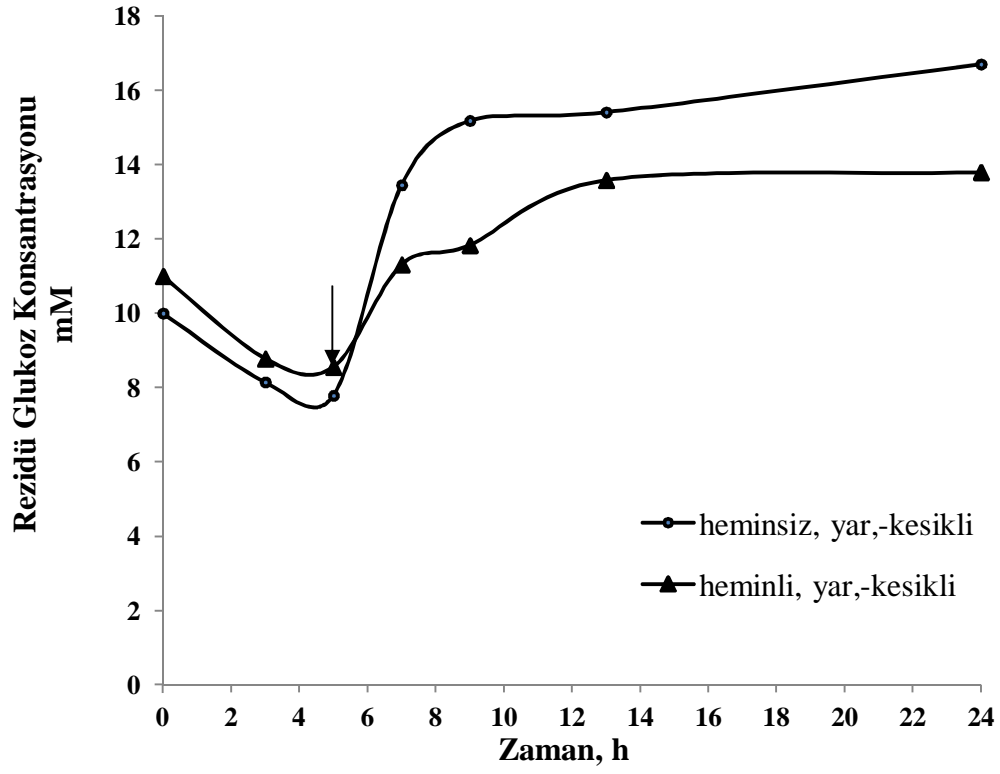
Heminli ve heminsiz yar²-kesikli ko ullarda gerçekle tirilen fermentasyonda nisin üretim miktarlar² ekil 4.10B ile gösterilmi tir. Her iki fermentasyonda hücre a rlı² rın art² rna paralel olarak nisin üretiminde art² tespit edilmi tir. Heminli yar²-kesikli fermentasyonda maksimum nisin üretime 11. saatte (5410 IU mL⁻¹), hemin içermeyen yar²-kesikli fermentasyonda ise 15. saatte (1711 IU mL⁻¹) ula rılm² tir. Heminsiz yar²-kesikli fermentasyonun 11. saatinde ölçülen nisin üretim miktar² ise 702 IU mL⁻¹ olarak belirlenmi tir. Her iki fermentasyon uygulamasında da maksimum nisin üretim miktarına ula rıldıktan sonra dü ü gözlenmi ve daha sonra heminli yar²-kesikli fermentasyonda 4404 IU mL⁻¹, heminsiz yar²-kesikli fermentasyonda ise 1403 IU mL⁻¹ ile fermentasyon tamamlanm² tir. Her iki uygulamanın maksimum nisin üretim miktarlar² dikkate alınd² rnda heminli yar² kesikli fermentasyonda 3,1 kat daha fazla nisin üretime ula rılm² tir.

Geli me ortam² içerisine hemin ilavesi yapılarak nisin üretiminin ara tırıld² 2 bir adet çal² ma bulunmaktadı. Nagayasu vd. (2007) tarafından bu çal² mada k²saca 1,25 µg ml⁻¹ hemin ilavesi ile kesikli ve yar²-kesikli mikroaerofilik fermentasyon denemeleri yapılm² tir. Fermentasyonlar sonucunda *L. lactis* ATCC11454 su unda laktat üretiminin baskıland² 2 ve s²rasıyla kesikli ve yar²-kesikli fermentasyonlardaki hücre yo unlu unun 1,8 ve 1,3 kat arttı² 2 tespit edilmi tir. Lakin ayn² ko ullarda bu hücre tarafından nisin üretiminde kesikli sistemde çok dü ük miktarda art² belirlenirken, yar²-kesikli sistemde art² olmad² 2 ifade edilmi tir. Çal² mada dikkati çeken önemli bir eksiklik yar²-kesikli sistemi temsil eden ve hemin kullanılmayan bir kontrol grubunun olmamas² ya da verilmemesidir. Bu nedenle bu yönde rapor edilen tek çal² ma olmas² itibari ile makalede ifade edilen hemin varlı² rnda nisin üretiminin artmad² 2 hatta hücre yo unlu u ile nisin üretiminin ili kili olmad² 2 yargı²s² üphe uyandırmaktadır.



ekil 4.10 Heminli ve heminsiz yar² kesikli fermentasyonda oluşan hücre kuru ağırlığı (A) ve üretilen nisin miktarı (B). Standart sapma %50'dir.

Heminli ve heminsiz yar2-kesikli y2r2t2len fermentasyonlarda ortamdaki rezid2 glukozun miktar2 ekil 4.11'de verilmi tir. Her iki uygulamada kesikli olarak y2r2t2len ilk 5 saat dilimde ortamda ki 2ker miktar2 azal2rken, $8 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ besleme yap2lmaya ba land2 2nda ortamdaki rezid2 glukoz miktar2 k2smen artm2 9. saatten sonra fermentasyon ortam2ndaki rezid2 glukoz miktar2 sabitlenmi tir. ekil 4.10'da g2r2ld2 ü gibi hemimli ve heminsiz yar2-kesikli fermentasyonlarda 9. saatten sonra rezid2 glukoz miktar2 s2ras2yla 13,80 mM ve 16,70 mM olarak 2l22lm2 t2r. Bu sonu2 her iki fermentasyonda olu an h2cre a 2r2klar2 dikkate al2narak de erlendirildi inde, hemimli yar2-kesikli fermentasyonda daha az rezid2 glukozun bulunmas2 bu fermentasyonlarda daha y2ksek oranda biyok2tle olu umu ile ili kilidir. Ayr2ca ortama hemin ilavesi glikolitik yolda kar2 2k asit fermentasyona te vik edilmesi dolay2s2yla h2crelerin y2ksek enerjetik seviyede olmas2ndan da ileri geldi i 2ne s2relebilir. Benzer 2kilde Duwatt vd. (2011) yapt2klar2 2al2 mada; *L. lactis* MG1363 su unu kullanarak ger2ekle tirdikleri kesikli fermentasyonlarda; hemin i2eren ortamda glukoz t2ketiminin artt2 2n2, bunun mikroorganizman2n say2sal art2 2 ve de i en metabolik yolundan ileri geldi ini rapor etmi lerdir. Ayr2ca 2al2 mada kullan2lan glukoz konsantrasyonunda yap2lan optimizasyonu sayesinde; ortama beslenen glukoz ile *L. lactis* N8 taraf2ndan t2ketilen glukoz miktar2 dengeye ula m2 t2r. Bu sayede ortamda artan bir rezid2 glukoz konsantrasyonu g2zlemlenmemi , fazla miktardaki substrat konsantrasyonunun neden olabilece i geri y2nl2 inhibisyonun da 2n2ne ge2ilmesi sa lanm2 t2r.

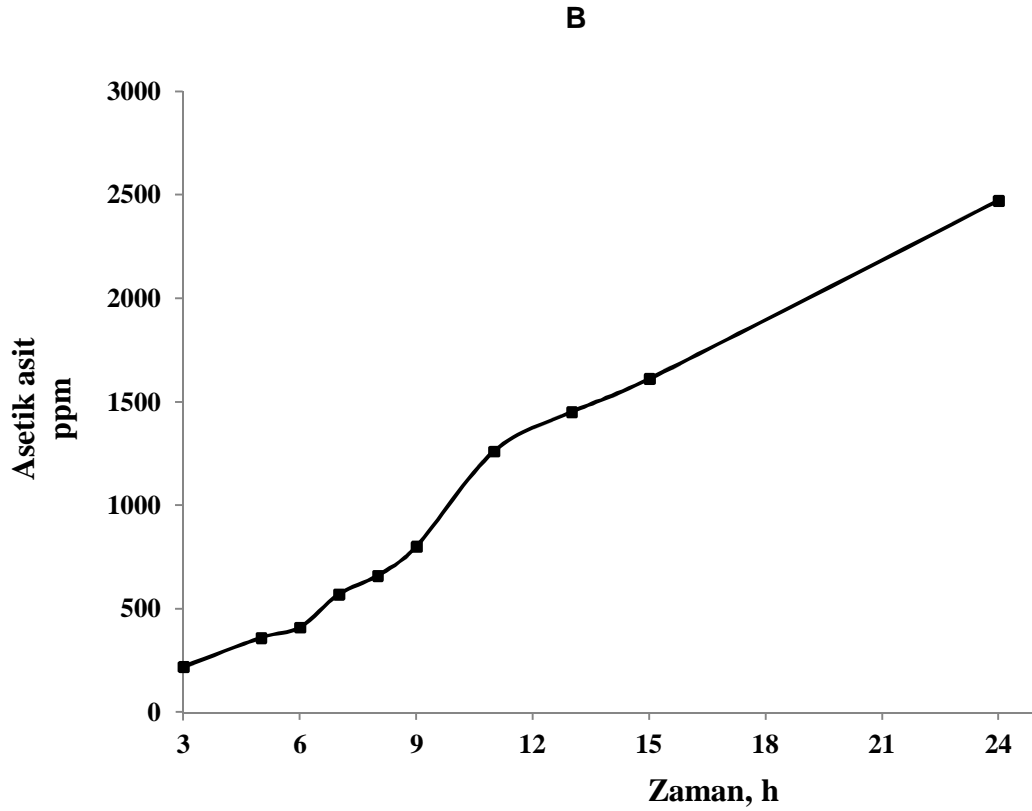
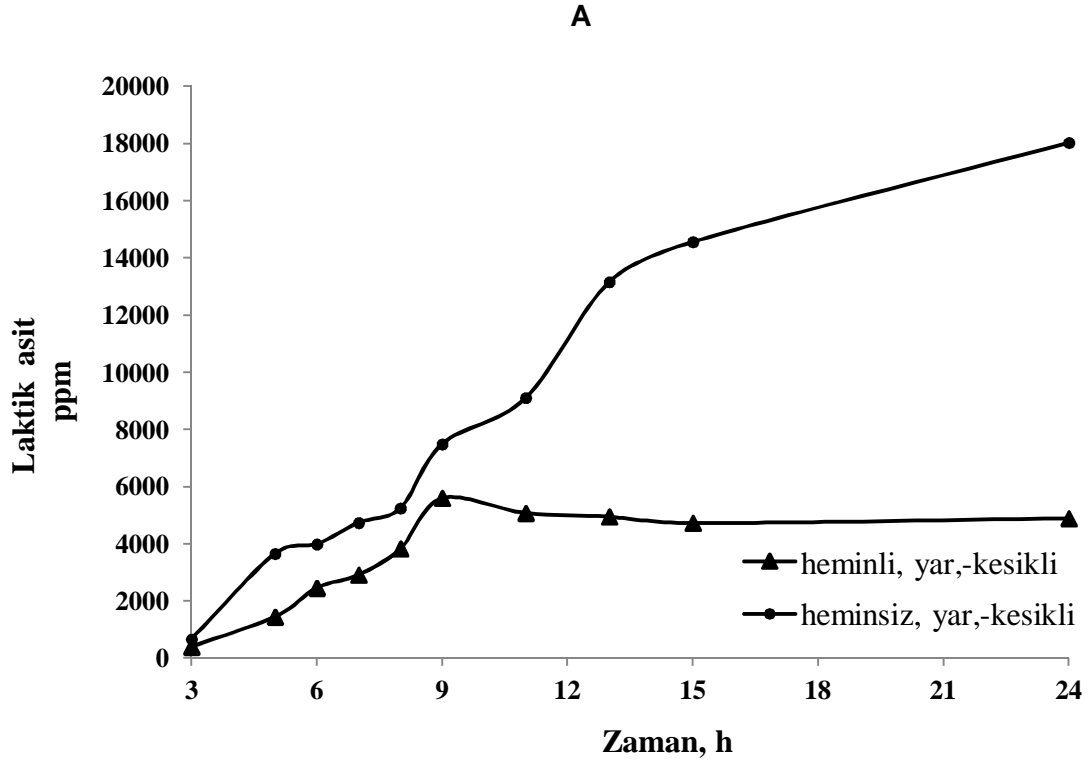


ekil 4.11 Heminli ve heminsiz yar²-kesikli fermentasyonda ortamdaki rezidü glukoz miktarı. Standart sapma %5 için altındadır.

Heminli ve heminsiz yar²-kesikli fermentasyon süresince toplanan örneklerde bulunan laktik ve asetik asit konsantrasyonlar² ölçülmü ekil 4.12A ve B'de gösterilmiştir. Heminli yar²-kesikli fermentasyonda fermentasyonun ilk 9 saatinde ortamdaki laktik asit miktar² artmış , daha sonraki sürede yatay bir seyir izlemiştir. Buna göre heminli yar²-kesikli fermentasyonda maksimum 5600 ppm laktik asit üretilmiştir , daha sonraki saatlerde 4950 ppm de erine düşerek sabit üretim gerçekleşmiştir. Heminsiz yar²-kesikli fermentasyonda ise 24 saat fermentasyon sürecinde laktik asit birikimi artmıştır. Fermentasyon sonunda ortamda biriken laktik asit konsantrasyonu 18030 ppm olarak ölçülmüştür. Heminli yar²-kesikli fermentasyonun sonunda toplam laktik asit konsantrasyonu, heminsiz yar²-kesikli fermentasyona oranla % 74 oranında düşüktür. Aynı şekilde tüm fermentasyon saatlerinde ise ortalama % 48 düşüktür. Bu durum hemini içeren yar²-kesikli fermentasyon ortamında *L. lactis* N8 su unda aerobik solunumla birlikte metabolik yolun kar²lık asit fermentasyonuna dönüşümünden kaynaklanmıştır. Dolayısıyla bu sonuç sistemin başarısız bir şekilde ortamda laktat birikimini engellediğini göstermiştir.

Diğer taraftan ekil 4.12B'de görüldüğü gibi heminli yar²-kesikli fermentasyonda fermentasyonun başından itibaren ortamda lineer asetik asit birikimi gözlenmiştir. Buna karşın heminsiz yar²-kesikli fermentasyonda ise tüm fermentasyon süresince asetik asit üretimi tespit edilmemiştir. Heminli yar²-kesikli fermentasyonda fermentasyon sonunda 2470 ppm asetik asit birikmiştir. Bu sonuç heminli yar²-kesikli fermentasyonda *L. lactis* N8 su unda laktik asit üretimi bakılarak, metabolik yolun kar²lık asit fermentasyona yönlendirildiğinin bir kanıtıdır.

Yar²-kesikli fermentasyonda solunumun hemini ile test edildiği *L. lactis* N8 su unda laktik ve asetik asit üretimi ve oranlar² literatür verileri ile paraleldir. Koebmann ve arkadaşları'nın (2008) yaptıkları çalışmada solunumun hemini ile test edildiği *L. lactis* MG1363 su unda kesikli fermentasyonunda laktik asit konsantrasyonu 1,43 mol glukoz mol⁻¹, heminsiz çalışılan fermentasyon ortamında ise 1,75 mol glukoz mol⁻¹ tespit edilmiştir. Diğer yandan hemini varlığında üretilen asetik asit konsantrasyonunun (1,75 mol glukoz mol⁻¹) da kontrole (0,97 mol glukoz mol⁻¹) oranla artmış elde edilmiştir. Papagianni ve arkadaşları'nın (2007) yaptıkları bir başka çalışmada ise; *L. lactis*'in hemini içeren kesikli ve yar² kesikli fermentasyonlarında anaerobik koşullarda üretilen laktat, asetat konsantrasyonlar² sırasıyla 92,3 ± 1,3 mol glukoz mol⁻¹, 1,5 ± 0,1 mol glukoz mol⁻¹ iken, aerobik koşullarda bu değerler 91,0 ± 1,5 mol glukoz mol⁻¹ ve 3,2 ± 0,5 mol glukoz mol⁻¹ olarak ölçülmüştür.



ekil 4.12 Heminli ve heminsiz yar² kesikli fermentasyonda *L. lactis* N8 su u taraf²ndan üretilen laktik asit (A) ve asetik asit (B) miktar². Standart sapma %5 için alt²ndadır.

5. GENEL SONUÇ VE ÖNER LER

Bu çalışmada, nisin üreticisi *L. lactis* N8 su unda yarık-kesikli fermentasyon ortamına hemin ve oksijen ilavesi yapılarak aerobik solunum tevik edilmiş, söz konusu sistemde glukoz, hemin ve çözünümü oksijen konsantrasyonu dikkate alınarak optimize edilmiştir.

Çalışma sonucunda hemin içeren yarık-kesikli fermentasyon sisteminde önemli biyokütle artışı sağlanmıştır. Bununla birlikte nisin üretimi hemin ilave edilmeyen fermentasyon sistemlerine kıyasla 3.1 kat artışı sağlanmıştır. Optimum değerlerde gerçekte tirilen yarık-kesikli fermentasyonda 5410 IU mL⁻¹ maksimum nisin üretimine ulaşırken, hemin içermeyen kontrol fermentasyonda ise 1711 IU mL⁻¹ nisin üretilmiştir. Bu sonuç nisin üretiminin maliyetinin düşürülmesi ağırsından önemli bir adımdır. Bugüne kadar sürdürülen çalışmalarda nisin üretiminin artışılması amacıyla rekombinant uygulamalar yapılmıştır. Söz konusu bu çalışmada herhangi bir rekombinasyon ileminin uygulanmaması, özellikle rekombinant uygulamalara ve bunların ürünlerine karşı olumsuz tepki dikkate alınması nda hemin içeren ortamda nisin üretim sistemi önemli bir alternatiftir. Ayrıca proje sonuçları rekombinant uygulamalar yapılmadan nisin üreticisi sularda nisin üretiminin artırılabilmesini, özellikle metabolik yol düzenlenmesi ile olumlu sonuçları alınabilmesini idare etmiştir. Bu nedenele nisin üretiminin geliştirilmesinde metabolik yolun düzenlenmesi ciddiye alınmalıdır.

Hemin ile aerobik solunum tevik edilmesi *L. lactis* sularında önemli oranda biyokütle artışı sağlanmaktadır. Çalışmada da gösterildi ği gibi biyokütle artışı ile nisin üretimi önemli ölçüde artmıştır. Dolayısıyla nisin üretiminin biyokütle miktarı ile ilişkili oldu ğu bir kez daha ortaya çıkmıştır. Bu çalışma ile nisin üretiminde yüksek hacimlere ulaşabilmenin biyokütle artışı ile sağlanabilece ği görülmüştür. Bu çalışmanın devamında planlanacak ileri projelerde bu husus dikkate alınmalıdır.

Hemin içeren yarık-kesikli fermentasyon ortamında nisin üretiminin optimizasyonu bu çalışma ile ilk defa başarılmıştır. Ayrıca *L. lactis* sularında heminin biyokütle artışı sağlanmasına ilişkin çeşitli çalışmalar mevcuttur. Lakin en yüksek biyokütle miktarına ulaşmak için gereken hemin konsantrasyonunun belirlenmesi ve optimizasyonuna yönelik çalışma mevcut değildir. Çalışmada en yüksek nisin üretimi ve biyokütle için kullanılacak hemin, glukoz ve çözünümü oksijen konsantrasyonları cevap yüzey yöntemi ile başarıyla modellenmiştir. Dolayısıyla söz konusu sistemde endüstriyel boyutta kullanılabilen matematiksel model elde edilmiştir. Diğer yandan, endüstriyel uygulamalarda kullanılacak substratları veya faktörlerin etkisinin belirlenmesinde cevap yüzey modelinin kullanılabilmesi bu çalışmanın sonuçları devamında önerilebilir.

6. KAYNAKLAR

- Abee, T., Rombouts, F. M., Hugenholtz, J., Guihard, G. ve Letellier, L. 1994. μ Mode of action of nisin Z against *Listeria monocytogenes* Scott A grown at high and low temperatures μ Appl. Environ. Microbiol., 60; 1962-1968.
- Amiali, M.N., Lacroix, C. ve Simard, R.E. 1998. μ High nisin Z production by *Lactococcus lactis* UL719 in whey permeate with aeration μ World J. Microbiol. and Biotechnol., 14: 887-894.
- Arioli, S., Zambelli, D., Guglielmetti, S., de Noni, I., Pedersen, M.B., Pedersen, D.P., dal Bello, F., Mora, D. 2013. μ Increasing the Heme-Dependent Respiratory Efficiency of *Lactococcus lactis* by Inhibition of Lactate Dehydrogenase μ Appl. Environ. Microbiol. 79(1):376.
- Barber, M., Eliot, G. J., Bordoli, R. S., Green, B. N. ve Bycroft, B.W. 1988. μ Confirmation of the structure of nisin and its major degradation product by FAM-MS and FAM-MS/MS μ Experientia, 44; 266-270.
- Bass², N., Boqu²en, C., P²cque, D., Corr²eu G. 1993. μ Effect of Initial Oxygen Concentration on Diacetyl and Acetoin Production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* μ Applied and Environmental Microbiology, p. 1893-1897.
- Bertrand, N., Fliss, I. and Lacroix, C. 2001. μ High nisin-Z production during repeated-cycle batch cultures in supplemented whey permeate using immobilized *Lactococcus lactis* UL719 μ Inter. Dairy J., 11, 953-960.
- Blank, M.L., Koebmann, J.B., Michelsen, O., Nielsen, K.L., Jensen, P.R. 2001. μ Hemin Reconstitutes Proton Extrusion in an H-ATPase-Negative Mutant of *Lactococcus lactis* μ Journal of Bacteriology, Kas²m 2001, p. 6707. 6709.
- Bolotin, A., Mauger, S., Malarme, K., Ehrlich, S.D., Sorokin, A. 1999. μ Low-redundancy sequencing of the entire *Lactococcus lactis* IL1403 genome μ Antonie Van Leeuwenhoek. Jul-Nov;76(1-4):27-76.
- Brooijmans, R., Poolman, B., Schuurman-Wolters, G.K., Vos, W.M., Hugenholtz, J. 2007. μ Generation of a membrane potential by *Lactococcus lactis* through aerobic electron transport μ Journal of Biotechnology, 5203-5209.

- Brooijmans, R., Smit, B., Santos, F., Riel, J.V., Vos, W., Hugenholtz J. 2009a. α Heme and menaquinone induced electron transport in lactic acid bacteria α Microbial Cell Factories. 8:28.
- Brooijmans, R.J., de Vos VM, Hugenholtz, J. 2009b. α Lactobacillus plantarum WCFS1 electron transport chains α Appl. Environ. Microbiol, 75:3580-3585.
- Bryan- Jones, DG., Whittenbury, R. 1969. α Haematin-dependent oxidative phosphorylation in *Streptococcus faecalis* α J. Gen Microbiol. 58:247-60.
- Cabo, M.L., Murado, M.A., Gonzalez, M.P., Vazquez, J.A., Pastoriza, L. 2001. α An empirical model for describing the effects of nitrogen sources on nisin production α Lett Appl Microbiol. 2001 Dec;33(6):425-9.
- Chan, W. C., Lian, L.-Y., Bycroft, B. W. ve Roberts, G. C. K. 1989. α Confirmation of the structure of nisin by complete ^1H NMR resonance assignment in aqueous and dimethyl sulfoxide solution α J. Chem. Soc. Perkin Trans., 1; 2359-2367.
- Chandrapati, S. and O'Sullivan, D. J. 2002. α Characterization of promoter regions involved in galactose and nisin mediated induction of the nisA gene *Lactococcus lactis* ATCC 11454 α Molecular Microbiol., 2; 467-477.
- Chatterjee, C., Paul, M., Xie, L. ve van der Donk, W. A. 2005. α Biosynthesis and mode of action of lantibiotics α Chem. Rev., 105, 633-683.
- Cheigh, C. I., Choi, H. J., Park, H., Kim, S., Kook, M., Kim, T., Hwang, J. and Pyun, Y. 2002. α Influence of growth conditions on the production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 isolated from Kimchi α J. Biotechnol., 95; 225-235.
- Cheigh, C.I. and Pyun, Y. 2005. α Nisin biosynthesis and its properties α Biotechnol. Lett., 27; 1641-1648.
- Chinachoti, N., Zaima, T., Matsusaki, H., Sonomoto, K., & Ishisaki, A. 1997. α Relationship between fermentative production and aeration condition using *Lactococcus lactis* IO-1 α Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University, 43, 421. 436.
- Davies, E. A., Bevis, H. E., Potter, R., Haris, J., Williams, G. C. and Delves-Broughton, J. 1998. α The effect of pH on the stability of the nisin solution during autoclaving α Lett. Appl. Microbiol., 27; 186-187.

Delves-Broughton, J., Blackburn, P., Evans, R. J. and Hugenholtz, J. 1996. Applications of the bacteriocin nisin. *Antonie van Leeuwenhoek*, 69; 193-202.

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

de Vuyst, L. and Vandamme, E. J. 1992. Influence of the carbon source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* batch fermentations. *J. General Microbiol.*, 138; 571-578.

de Vosyt, L. and Vandamme, E. J. 1993. Influence of the phosphorus and nitrogen source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* batch fermentations using a complex medium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 40; 17-22.

de Vuyst, L. and Vandamme, E.J. 1994. Nisin, a lantibiotic produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* properties, biosynthesis, fermentation and applications. In *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*, pp. 165-167.

de Vuyst, L. and Vandamme, E.J. 1994. Nisin, a lantibiotic produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* properties, biosynthesis, fermentation and applications. In *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*, pp. 165-167.

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

de Vos, W.M., Hugenholtz, J. 2004. Engineering metabolic highways in Lactococci and other lactic acid bacteria. *Trends Biotechnol.* Feb;22(2):72-9.

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

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

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

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

Gaudu P., Vido K., Cesselin B., Kulakauskas S., Tremblay J. 2002. Respiration capacity and consequences in *Lactococcus lactis*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 82:263-69.

Gonzales-Toledo, S.Y., Dominguez, J., Garcia-Almendarez, B.E., Prado-Barragan, L.A., Regalado-Gonzalez, C. Optimization of nisin production by *Lactococcus lactis* UQ2 using supplemented whey as alternative culture medium. *J Food Sci*. 2010 Aug 1;75(6):M347-53.

Graeffe, T., Rintala, H., Paulin, L. and Saris, P. 1991. A natural nisin variant. In *Nisin and Novel Lantibiotics*. Editor: G. Jung ve H. G. Sahl, Basel: ESCOM Science Publishers pp. 260-268.

Gross, E. and Morell, J. L. 1971. The structure of nisin. *J. Am. Chem. Soc*, 93; 4634-4635.

Guerra, N.P. and Pastrana, L.C. 2003. Influence of pH Drop on both nisin and pediocin production by *Lactococcus lactis* and *Pediococcus acidilactici*. *Letters Appl. Microbiol.*, 37; 51-55.

Heinrich W.O. :2010. The chemical constitution of respiration ferment. 468:2833-2839.

Hols, P. et al. (1999) Acetate utilization in *Lactococcus lactis* deficient in lactate dehydrogenase: a rescue pathway for maintaining redox balance. *J. Bacteriol*. 181, 5521. 5526.

Hull, J.S.V. and Gibbons, W. R. 1997. Neutralization/recovery of lactic acid from *Lactococcus lactis*: effects on biomass, lactic acid and nisin production. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 13; 527-532.

Hurst, A. 1981. Nisin. *Adv. Appl. Microbiol.*, 27; 85-123.

Huycke, M.M., Moore, D., Joyce, W., Wise, P., Shepard, L., Kotake, Y., Gilmore, M.S. 2001. Extracellular superoxide production by *Enterococcus faecalis* requires demethylmenaquinone and is attenuated by functional terminal quinol oxidases. *Mol Microbiol*. 2001 Nov;42(3):729-40.

Ingram, L. 1970. A ribosomal mechanism for synthesis of peptides related to nisin. *Biochem. Biophys. Acta*, 224; 263-265.

Jensen, N.B., Melchiorsen, C.R., Jokumsen, K.V., Villadsen, J. 2001. Metabolic behavior of *Lactococcus lactis* MG1363 in microaerobic continuous cultivation at a low dilution rate. *Appl Environ Microbiol.*, Jun;67(6):2677-82.

Jung, G. 1991. Sayfa 1-34. Lantibiotics: a survey. In: Nisin and novel lantibiotics. Editör: Jung, G. and Sahl, H-G. ESCOM Science Basmevi, Leiden, the Netherlands.

Kim, W.S., Hall R. J. and Dunn N.W. 1997a. Host specificity of nisin production by *Lactococcus lactis*. *Biotechnol. Lett.*, 19; 1235-1238.

Koebmann, B., Blank, L.M., Solem, C., Petranovic, D., Nielsen, L.K., Jensen, P.R. 2008. Increased biomass yield of *Lactococcus lactis* during energetically limited growth and respiratory conditions. *Biotechnol Appl Biochem.* 2008 May;50(Pt 1):25-33.

Kwaadsteniet, M., Doeschate, K. and Dicks, L. M. T. 2008. Characterization of the Structural Gene Encoding Nisin F, a New Lantibiotic Produced by a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Isolate from Freshwater Catfish (*Clarias gariepinus*). *Appl. Environ. Microbiol.*, 74; 547-549.

Lan, Q.C., Oddone, G., Mills, AD., Block, ED., 2006. Kinetics of *Lactococcus lactis* growth and metabolite formation under aerobic and anaerobic conditions in the presence or absence of hemin. *Wiley InterScience*. DOI: 10.1002/21070.

Lechardeur, D., Cesselin, B., Fernandez, A., Lamberet, G., Garrigues, C., Pedersen, M., Gaudu, P., Gruss, A. : 2011. Using heme as an energy boost for lactic acid bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, 22:143. 149.

Lopez de Felipe, F. et al. (1997) The role of NADH-oxidation in acetoin and diacetyl production from glucose in *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 156, 15. 19.

Lopez de Felipe, F. et al. (1998) Cofactor engineering: a novel approach to metabolic engineering in *Lactococcus lactis* by controlled over expression of NADH oxidase. *J. Bacteriol.* 180, 3804-3808.

Liu, W. ve Hansen, J. N. 1990. Some chemical and physical properties of nisin, a small protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56; 2551-2558.

- Lv, W., Cong, W. ve Cai, Z. 2004a. ~~+~~ Nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* under nutritional limitation in fed-batch culture ~~¶~~ Biotechnol. Lett., 26; 235-238.
- Lv, W., Cong, W. and Cai, Z. 2004b. ~~+~~ Improvement of nisin production in pH feed-back controlled, fed-batch culture by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ~~¶~~ Biotechnol. Lett., 26; 1713-1716.
- Lv, W., Cong, W. and Cai, Z. 2005. ~~+~~ Effect of sucrose on nisin production in batch and fed-batch culture by *Lactococcus lactis* ~~¶~~ J. Chemical Technology and Biotechnol., 80; 511-514.
- Matsusaki, H., Endo, N., Sonomoto, K. and Ishizaki, A. 1996. ~~+~~ Antibiotic nisin Z fermentative production by *Lactococcus lactis* IO-1: Relationship between production of the antibiotic and lactate and cell growth ~~¶~~ Appl. Microbiol. Biotechnol., 45; 36-40.
- Mattick, A.T.R. and Hirsch, A. 1944. ~~+~~ A powerful inhibitory substance produced by group N streptococci ~~¶~~ Nature, 154; 551-552.
- Mayfield, J., Carolyn, A., Dehner ve Jennifer L. Dubois : 2011. Recent advances in bacterial heme protein biochemistry. 15(2):260-266.
- Mitra, D., Pometto, A.L., Khanal, S.K., Karki, B., Brehm-Stecher, F.B., van Leeuwen, J.H. 2010. ~~+~~ Value-Added Production of Nisin from Soy Whey ~~¶~~ Applied Biochemistry & Biotechnology; 162 , 1819.
- Motlagh, A. M., Johnson, M. C. and Ray, B. 1991. ~~+~~ Viability loss of food-borne pathogens by starter culture metabolites ~~¶~~ J. Food Prot., 54; 873-878.
- Mortvedt-Abildgaa, C.I., Nissen-Meyer, J., Jelle, B., Grenov, B., Skaugen, M., Nes, I.F. 1995. ~~+~~ Production and pH-Dependent Bactericidal Activity of Lactocin S, a Antibiotic from *Lactobacillus sake* L45 ~~¶~~ Appl. Environ. Microbiol. 1995, 61(1):175.
- Mulders, J. W. M., Boerrigter, I. J., Rollema, H. S., Siezen, R. J. and de Vos, W.M. 1991. ~~+~~ Identification and characterization of the antibiotic nisin Z, a natural nisin variant ~~¶~~ Eur. J. Biochem., 201; 581-584.
- Nagayasu, M., Wardani, A.K., Nagahisa, K., Shimuzu, H., Shioya, S. 2007. ~~+~~ Analysis of heme effect on lactate reduction in *Lactococcus lactis* ~~¶~~ Journal Of Bioscience and Bioengineering. (6):529-53.

- Neves, A.R., Ramos, A., Costa, H., van Swam, II., Hugenholtz, J., Kleerebezem, M., de Vos, W., Santos, H. 2002. Effect of different NADH oxidase levels on glucose metabolism by *Lactococcus lactis*: kinetics of intracellular metabolite pools determined by in vivo nuclear magnetic resonance. *Appl Environ Microbiol.* Dec;68(12):6332-42.
- Nielsen, P. ve Roepstorff, P. 1988. Sample preparation dependent fragmentation in 252-Cf plasma desorption mass spectrometry of the polycyclic antibiotic nisin. *Bio. Environ. Mass Spectrom.*, 17; 137-141.
- Palmer, D. E., Mierke, D. F., Pattaroni, C., Goodman, M., Wakamiya, T., Fukase, K., Kitazawa, M., Fujita, H. and Shiba, T. 1989. Interactive NMR and computer simulation studies of lanthionine ring structures. *Biopolymers*, 28; 397-408.
- Papagianni, M., Avramidis, G. ve Filiouisis, G. 2007a. 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.
- Papagianni, M., Avramidis, N., Filiouisis, G. 2007b. Glycolysis and the regulation of glucose transport in *Lactococcus lactis* spp. *lactis* in batch and fed-batch culture. *Microb. Cell. Fact*, May 24;6:16.
- Papagianni M, Avramidis N. 2012. Engineering the central pathways in *Lactococcus lactis*: functional expression of the phosphofructokinase (*pfk*) and alternative oxidase (*aox1*) genes from *Aspergillus niger* in *Lactococcus lactis* facilitates improved carbon conversion rates under oxidizing conditions. *Enzyme Microb Technol* 51(3):125. 130.
- Pedersen M., Gaudu P., Lechardeur D., Petit M., Gruss A. 2012. Aerobic respiration metabolism in lactic acid bacteria and uses in biotechnology. *Annu. Rev. Food Science Technology*. 3:37-58.
- Pongtharangkul, T. and Demirci, A. 2006. Evaluation of culture medium for nisin production in a repeated-batch biofilm reactor. *Biotechnol. Prog.*, 22; 217-224.
- Razvi, A., Zhang, Z., Lan, C.Q. 2008. Effects of glucose and nitrogen source concentration on batch fermentation kinetics of *Lactococcus lactis* under hemin-stimulated respirative condition. *Biotechnol Prog.* 2008 Jul-Aug;24(4):852-8.
- Richardson, D.J. 2000. Bacterial respiration: a flexible process for a changing environment. *Microbiology* 146:551. 71.

Rogers, L.A. 1928. The inhibiting effect of *Streptococcus lactis* on lactic fermentation. J. Bacteriol., 16; 321-325.

Rogers, L.A. Whitter, E.O. 1928. Limiting factors in the lactic fermentation. J. Bacteriol. 1928 Ekim; 16(4): 211. 229.

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

Schnell, N., Entian, K. . D., Schneider, U., Götz, F., Zahner, H., Kellner and Jung, G. 1988. Peptide sequence of epidermin, a ribosomally synthesized antibiotic with four sulphide rings. Nature, 333; 276-278.

Shimizu, H., Mizuguchi, T., Tanaka, E. and Shōya, S. 1999. Nisin production by a mixed culture system consisting of *Lactococcus lactis* and *Kluyveromyces marxianus*. Appl. Environ. Microbiol., 65; 3134-3141.

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

Sijpestejn, A.K. 1970. Induction of cytochrome formation and stimulation of oxidative dissimilation by hemin in *Streptococcus lactis* and *Leuconostoc mesenteroides*. Antonie Van Leeuwenhoek. 36:335-48.

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

Sonomoto, K., Chinachoti, N., Endo, N. and Ishizaki, A. 2000. Biosynthetic production of nisin Z by immobilized *Lactococcus lactis* IO-1. J. Molecular Cat. B: Enzymatic, 10; 325-334.

Öktem, Ö., Saris, P.E. 2009. Cycle changing the medium results in increased nisin productivity per cell in *Lactococcus lactis*. Biotech Lett 31(3):415. 421.

Öktem, Ö. 2013. Nisin production in a chitin-including continuous fermentation system with *Lactococcus lactis* displaying a cell wall chitin-binding domain. J Ind Microbiol Biotechnol. DOI 10.1007/s10295-013-1388-x.

Tolonen, M., Saris, P.E.J. ve Siika-aho, M. 2004. H^+ Production of nisin with continuous adsorption to ambelite XAD-4 resin using *Lactococcus lactis* N8 and *L. lactis* LAC48 H^+ Appl. Microbiol. Biotechnol., 63; 659-665.

van de Ven, F. J. M., van den Hooven, H. W., Konings, R. N. H. and Hilbers, C. W. 1991. H^+ NMR studies of lantibiotics H^+ Eur. J. Biochem., 202; 1181-1188.

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

Whitehead, H.R. 1933. H^+ A substance inhibiting bacterila growth, prodeded by certain strains of lactic streptococci H^+ Biochem. J., 27; 1793-1800.

Whittenbury, R. 1978. H^+ Biochemical characteristics of *Streptococcus* species H^+ Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser. 7:51-69.

Wilson-Stanford, S., Kalli, A., Hakansson, K., Kastrantas, J., Oruqunty, R.S., Smith, L. 2009. H^+ Oxidation of lanthionines renders the lantibiotic nisin inactive H^+ Appl Environ Microbiol. 2009 Mar;75(5):1381-7.

Wirawan, R.E., Klesse, N.A., Jack, R. W. and Tagg, J. R. 2006. H^+ Molecular and genetic characterisation of a novel nisin variant produced by *Streptococcus uberis* H^+ Appl. Environ. Microbiol., 72; 1148-1156.

Vazquez, J.A. Cabo, M. L., Gonzalez, M. P. and Murado, M. A. 2004. H^+ The role of amino acids in nisin and pediocin production by two lactic acid bacteria a factorial study H^+ Enzyme and Microbiol. Technol., 34; 319-325.

Wu, Z., Wang, L., Jing, Y., Li, X. and Zhao, Y. 2008. H^+ Variable volume fed-batch fermentation for nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* W28 H^+ Appl. Biochem. Biotechnol., DOI 10.1007/s112010-008-8335-8.

Wan, J., Hickey, W. and Coventry, M. J. 1995. H^+ Continuous production of bacteriocins, brevicin, nisin and pediocin, using calcium alginate-immobilized bacteria H^+ J. Appl. Bacteriol., 79; 671-676.

Yang, R., Johnson, M. C. and Ray, B. 1992. H^+ Novel method to extract amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria H^+ Appl. Environ. Microbiol., 58; 3355-3359.

Yu, P. L., Dunn, N. W. and Kim, W. S. 2002. ~~L~~actate removal by anionic-exchange resin improves nisin production by *Lactococcus lactis*~~q~~ Biotechnol. Lett., 24; 59-64.

Zendo, T., Fukao, M., Ueda, K., Higuchi, T., Nakayama, J. and Sonomoto, K. 2003. ~~I~~dentification of the lantibiotic nisinQ, a new natural nisin variant produced by *Lactococcus lactis* 61-14 isolated from a river in Japan~~q~~ Biosci. Biotechnol. Biochem., 67; 1616-1619.