

# ENDÜSTRİYEL NİSİN ÜRETİMİNDE ETKİLİ FAKTÖRLER VE MODEL SİSTEMLER

Ömer ŞİMŞEK\*, Ahmet Hilmi ÇON\*, Mustafa AKÇELİK\*\*

\*Pamukkale Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, 20017/Denizli

\*\*Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Ankara

Geliş Tarihi : 24.08.2006

## ÖZET

Nisin tip I lantibiyotik grubuna dahil olan ve *Lactococcus lactis*'de tanımlanan ilk bakteriyosindir. Kültür ortamlarında yüksek miktarda nisin üretimi; fermentasyon ortamının kompozisyonu, pH, ortamda üretilen nisin konsantrasyonu ve en önemlisi hücrenin gelişimi ile ilişkilidir. Bu faktörler dikkate alınarak endüstriyel üretim amacıyla kesikli, yarı kesikli ve sürekli fermentasyon sistemleri geliştirilmiştir. Gıda koruyucusu olarak önemli potansiyele sahip olan nisinin daha verimli üretiminin sağlanması, hem endüstriyel açıdan ve hem de bu suşların starter kültür olarak kullanımı açısından önem taşımaktadır. Bu derlemede nisin üretimi üzerinde fermentasyon faktörlerinin etkileri belirtilerek kurulmuş model sistemler karşılaştırılmıştır.

**Anahtar Kelimeler** : Nisin üretimi, Model sistemler, Etkili faktörler.

## EFFECTIVE FACTORS AND MODEL SYSTEMS IN THE INDUSTRIAL PRODUCTION OF NISIN

### ABSTRACT

Nisin is the first bacteriocin identified in *Lactococcus lactis* and belongs to type 1 lanthibiotic group. High nisin production in cultured media is related with the composition of fermentation medium, pH, produced nisin concentration and most importantly growth amount of cell. For industrial purpose, batch, fed-batch and continue fermentation systems were developed by regarding these factors. Maintaining efficient production of nisin having important potential at preservation of foods is important for both industrial production and using as starter culture. In this review the fermentation factors at nisin production were outlined and constructed model systems were compared

**Key Words** : Nisin production, Model systems, Effective factors.

### 1. GİRİŞ

Bakteriyosinler ribozomal sentezli, Gram pozitif türlere karşı bakterisidal ya da bakterisit etki gösterebilen protein yapısında bileşiklerdir (Klaenhammer, 1993). Nisin, tip I lantibiyotik grubuna dahil olan ve *Lactococcus lactis* tarafından sentezlendiği tespit edilmiş ilk bakteriyosindir. Bu bakteriyosin oldukça geniş bir etki spektrumuna sahip olması nedeniyle, gıda endüstrisinde koruyucu olarak kullanılmaktadır. Nisin FDA tarafından

GRAS (İnsan ve hayvan tüketiminde güvenilir) ajan olarak tanımlanmış ve belgelendirilerek kullanımına izin verilmiştir. Bu bakteriyosin günümüzde 50'den fazla ülkede süt ve süt ürünleri, konserve ürünler ve hazır çorba gibi gıdaların korunmasında kullanılmaktadır (Broughton, 1990).

Gıdaların korunmasında bakteriyosinlerin kullanımını kısıtlayan temel sorun bu bileşiklerin üretici suşlar tarafından düşük verimde üretiliyor olmasıdır. Bu nedenle koruyucu olarak kullanılacak bakteriyosinlerin üretim ve saflaştırma maliyetleri

oldukça yüksek olmaktadır. Nisinin yüksek ticari potansiyeli, üretimin artırılması yönündeki çalışmalara hız kazandırmıştır (Hul and Gibbons, 1997; Kim et al., 1997; Shimizu et al., 1999; Bertrand et al., 2001; Yu et al., 2002; Guerra and Pastrana, 2003; Lv et al., 2004a; Lv et al., 2004b; Tolonen et al., 2004; Liu et al., 2005; Pongtharangkul and Demirci, 2006). Bu amaçla yapılan çalışmalar; üretici suşun (*L. lactis*) farklı fermentasyon koşullarındaki davranışları ve nisin üretimini kodlayan genetik özellikleri esas alınarak verimli fermentasyon sistemlerinin tasarlanması ve üretici suşlarının geliştirilmesini hedeflemektedir. Nitekim çok sayıda araştırmacı yüksek miktarda nisin üretiminin, üretici suşun genetik ve biyokimyasal karakteristiklerine bağlı olmakla birlikte; fermentasyon ortamının kompozisyonundan, pH değişimlerinden, ortamda üretilmiş olan nisin konsantrasyonundan ve en önemlisi hücrenin gelişiminden önemli ölçüde etkilendiğini saptamıştır (Kim et al., 1997; Desjardins et al., 2001; Bertrand et al., 2001; Lv et al., 2005). Diğer taraftan nisin gen bloku içerisinde yer alan, nisin dirençlilik ve ikili regülatör sistemlerden sorumlu proteinleri kodlayan nisI, nisF, nisE, nisG ve nisR, nisK genlerinin ifade düzeylerinin artırılması, hücre bazında nisin üretiminde artış sağlamıştır (Kim et al., 1998; Cheigh and Pyun, 2005). Tüm bu bilgilerin ışığında geliştirilen model sistemler neticesinde kesikli ve yarı kesikli sistemlerde 2500-4000 IU/ml (60-100µg/ml) nisin elde edilirken, sürekli fermentasyon sistemlerinde bu değer 10000 IU/ml seviyelerine ulaşmıştır (De Vuyst and Vandamme, 1992; De Vuyst and Vandamme, 1993; Matsusaki et al., 1996; Bertrand et al., 2001; Lv et al., 2004a; Lv et al., 2004b; Pongtharangkul and Demirci, 2006).

Nisin üretiminde halen kesikli sistemlerin kullanımı ve yüksek maliyet sorununun aşılması, sistem optimizasyonu çalışmalarını gündemde tutmaktadır. Bu çalışmalar üretim ekonomisi esaslı doğrultusunda yürütülmektedir. Diğer yandan nisin üretiminin biyolojik esasına yönelik çalışmalar, ideal model sistemlerin geliştirilmesine temel teşkil edeceğinden, giderek artan bir ilgi ile sürdürülmektedir.

## 2. NİSİN ÜRETİMİNE ETKİ EDEN FAKTÖRLER

Öncü nisin molekülü, *L. lactis* hücrelerinin aktif büyüme fazının başında sentezlenmekte ve logaritmik üreme fazının sonunda ise en yüksek nisin üretim hızına ulaşmaktadır (De Vuyst and Vandamme, 1992; De Vuyst and Vandamme, 1993). Bu durum, ikincil metabolit davranışı gösteren nisinin primer metabolit kinetiğine sahip olduğunun

kanıtıdır. Nisin üretimi biyokütle oluşumu ile paralellik taşımaktadır. Bu nedenle; pH, karbon, azot ve fosfor kaynaklarının çeşit ve konsantrasyonu yanında, kasyonlar ve sıcaklık değerleri ile ortamda oluşan nisin miktarının nisin üretimi üzerindeki etkilerine yönelik çeşitli araştırmalar yapılmıştır (De Vuyst and Vandamme, 1992; De Vuyst and Vandamme, 1993; Matsusaki et al., 1996; Bertrand et al., 2001; Lv et al., 2004a; Lv et al., 2004b; Pongtharangkul and Demirci, 2006). Üretici suşta nisin, öncelikle 57 aminoasitlik prenisin olarak sentezlenmektedir (Dodd et al., 1990; Qiao et al., 1997). Prenisin proteininden, post-translasyonel süreçte proteaz enziminin katalizlediği kesim reaksiyonu sonucu 34 aminoasitlik olgun nisin oluşturulmaktadır (Qiao et al., 1996). Ayrıca nisinin biyolojik aktivitesinden sorumlu lantionin halkalarının oluşumu için, yine bazı modifikatör enzimler özellikle serin ve threonin aminoasitlerini çift bağlı dehidro forma dönüştürerek, lantionin ve 3-metillantionin aminoasitlerini oluşturmaktadır (Cheigh and Pyun, 2005). Tüm bu biosentez olaylarının yüksek etkinlikte oluşabilmesi için optimal koşulların sağlanması gerekmektedir. Bu nedenle özellikle karbon kaynaklarının ve diğer organik ve inorganik bileşenlerin, nisin biosentezi üzerinde regülasyon ve baskılama etkileri yoğun bir şekilde araştırılmış ve etki mekanizmaları tanımlanmıştır (De Vuyst and Vandamme, 1992; Cheigh et al., 2002; Vazquez et al., 2004; Cheigh and Pyun, 2005).

### 2. 1. Karbon Kaynağının Etkisi

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

Nisin üretimi ile sakkorozun fermentasyonu arasındaki ilişki ilk olarak 1950'lerde Hirsch

tarafından tanımlanmıştır (De Vuyst and Vandamme 1992; Lv et al. 2004a; Lv et al. 2004b; Cheigh et al. 2002). De Vuyst and Vandamme (1993), tarafından yürütülen bir çalışmada, 27 farklı *L. lactis* subsp. *lactis* suşunda nisin üretim kapasiteleri incelenmiş ve sakkaroz fermentasyon yeteneğinin nisin üretimi ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir. Bir diğer çalışmada De Vuyst and Vandamme (1992) nisin üreticisi *L. lactis* subsp. *lactis* NIZO22186 suşunun; farklı sakkaroz konsantrasyonları içeren fermentasyon ortamlarında, pH kontrollü ve kontrolsüz koşullarda nisin üretim özelliklerini araştırmıştır. pH kontrolsüz fermentasyon denemesinin sonucunda en yüksek nisin miktarına (yaklaşık 1500 IU/ml) en yüksek biyokütlenin olduğu logaritmik fazın sonunda erişilmiştir. Aynı çalışmada yürütülen pH kontrollü fermentasyon denemesinde ise; oluşan laktik asidin sürekli nötralizasyonu, biyokütle verimini ve dolayısıyla nisin miktarını artırmış ve 1793 IU/ml nisin üretim oranına ulaşılmıştır. pH kontrollü koşullarda sakkaroz konsantrasyonu 10g/l'den 40g/l'ye çıkarıldığında ise, en yüksek nisin miktarı 3267 IU/ml olarak hesaplanmıştır. Araştırmacılar 40g/l'den sonra, ilave sakkarozun ortamda kaldığını ve nisin miktarının azaldığını tespit etmiştir.

Lv et al. (2005) kesikli ve yarı kesikli fermentasyon ortamlarında sakkarozun nisin üretimi ve hücre gelişimi üzerine etkisini araştırdıkları çalışmada kesikli sistemde, başlangıç sakkaroz konsantrasyonunun 30g/l'yi aşması durumunda nisin aktivitesinin hızlı bir düşüş gösterdiği, ancak biyokütle miktarının etkilenmediği belirlenmiştir. Temel besiyerine % 0.5 sakkaroz ilavesini esas alan bir diğer denemede ise, kontrolsüz koşullarda 2048 IU/ml nisin miktarına ulaşılmıştır (Cheigh et al., 2002).

Sakkarozun nisin üretimi üzerindeki ana etkisinin, hücre gelişiminin teşvik edilmesi yolu ile gerçekleştiği düşünülmektedir (De Vuyst and Vandamme 1992; Lv et al., 2004b). Nisin üreticisi *L. lactis* subsp. *lactis* suşlarının sakkarozu hızlı kullanabilme yeteneklerinin, iyi çalışan fosfoenolpirivat bağımlı fosfotransferaz sistemi aracılığıyla gerçekleştiği tespit edilmiştir (De Vuyst and Vandamme, 1992). Ayrıca nisin üretim yeteneği ve sakkaroz fermentasyon kapasitesi arasında genetik bir ilişki bulunmaktadır (Leblanc et al., 1980; Gasson, 1984; Gonzalez and Kunka; 1985; Steele and McKay, 1986). Birçok durumda nisin üretimini ve sakkaroz kullanımını kodlayan genlerin aynı plazmid üzerinde bulunduğu, klasik mutasyon ve konjugasyon çalışmaları ile tanımlanmış ve taşıyıcı plazmidler pSN olarak adlandırılmıştır. Diğer yandan nisin biyosentezi ve sakkaroz metabolizmasında görev alan genlerin aynı operonda

buldukları ve 70 kb'lık bir transpozonu oluşturdukları belirlenmiştir (Gasson, 1990; Steen et al., 1991). Bu bilgiler ışığında sakkaroz metabolizması ve nisin üretimi arasında ortak genetik regülasyon veya metabolik kontrol sistemlerinin bulunması güçlü bir olasılık olarak görülmektedir (De Vuyst and Vandamme, 1992).

Nisin üretiminde yaygın olarak kullanılan diğer bir karbon kaynağı ise laktozdur. Nisin üreticisi *L. lactis* suşlarının doğal habitatının süt olması, laktozu diğer karbon kaynaklarından daha avantajlı kılmaktadır. Ayrıca süt ve süt ürünlerinin işlenmesinden açığa çıkan peyniraltı suyunun nisin üretiminde kullanım olanakları birçok araştırmacı tarafından çalışılmış ve biyosentez yolunun bu ortamdaki davranışı belirlenmiştir. (Bertrand et al., 2001; Cheigh et al., 2002; Liu et al., 2003). Nisin üretimi üzerine farklı şekerlerin etkisinin kıyaslandığı bir çalışmada, en yüksek verimin laktoz varlığında meydana geldiği belirlenmiştir. Bu çalışmada temel besiyerine ilave edilen laktozun % 0.5 oranında kullanılması durumunda aktivitenin 16384 AU/ml olduğu saptanmıştır. Aynı denemenin sakkaroz, glukoz ve galaktoz varlığında yürütülmesi halinde ise 8 kat daha düşük değerler elde edilmiştir. Bu sonuçlar laktozun nisin üretimi üzerindeki teşvik edici rolünü açıkça göstermektedir (Cheigh et al., 2002). Benzer şekilde, laktoz içeren peynir altı suyunun kullanıldığı kesikli ve sürekli sistemlerde nisin üretimindeki verimin 460–20500 IU/ml oranları arasında gerçekleştiği tespit edilmiştir (Amiali et al., 1998; Desjardins et al., 2001; Bertrand et al., 2001; Liu et al., 2005). Nisin üretiminin genetik regülasyonu, nisin tarafından indüklenen nisR ve nisK genlerinin rol aldığı ikili regülasyon sistemleri ile sağlanmaktadır. Bu sistemlerde; ortamdaki nisine bağlı olarak nisR ve nisK genlerinin aktivasyonu sonucu oluşan histidin-kinaz proteinleri ile, nisin üretiminden sorumlu temel gen nisA'nın ve nisin dirençlilikten sorumlu gen nisF'nin önünde bulunan promotorlar uyarılmaktadır (Ra et al., 1996). Son çalışmalarda nisR ve nisK sinyal sisteminden yoksun plazmidsiz *L. lactis* LM0230 hücrelerinde, ortamda nisin bulunmaması durumunda bile, nisA promotorunun galaktoz ve laktoz tarafından indüklendiği saptanmıştır (Chandrapati and O'sullivan, 1999; Chandrapati and O'sullivan, 2002). Aynı çalışmada laktoz ve galaktozun, nisin operonu promotorunun üzerinde bulunan iki tekrar seriyi (-107/-94 ve -39/-26 arasında yer alan) indüksiyon bölgesi olarak kullandığı tanımlanmıştır.

*L. lactis* subsp. *lactis* A164 suşu ile yürütülen çalışmalarda; laktoz varlığında üretilen nisZ yapısal geni transkriptlerinin, diğer şekerlere oranla daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Hücre gelişimi açısından laktozun, sakkaroz ve glukozla aynı

düzye etkinlik içermesine rağmen, laktozun daha yüksek miktarda nisin üretimine yol açması, laktozun nisin üretiminde daha etkili bir karbon kaynağı olduğunu kanıtlamaktadır (Cheigh and Pyun, 2005).

## 2. 2. Azot Kaynağının Etkisi

Nisin üretici *L. lactis* suşları gelişebilmeleri ve nisin üretebilmeleri için besiyerinde bir çok organik ve inorganik besin bileşenine ihtiyaç duymaktadır. Organik bileşikler içerisinde azot kaynakları hücrelerin gelişebilmeleri için hayati rol oynamaktadır. Özellikle laktokok suşları; gelişme ortamlarında maya özütü, proteaz pepton, kazein pepton gibi karmaşık azot kaynaklarının bulunmasına gereksinim duyarlar. Bu nedenle çeşitli azot kaynaklarının, özellikle peptitlerin ve aminoasitlerin nisin üretimi üzerine etkileri, ilgi odağı olmuştur (De Vuyst and Vandamme, 1993; De Vuyst, 1995; Kim et al., 1997; Cheigh et al., 2002; Li et al., 2002; Vazquez et al., 2004).

Bu yönde yapılan ilk çalışmada De Vuyst and Vandamme (1993) farklı azot kaynaklarını % 2 sakkaroz bulunan besiyerinde, % 1 oranında kullanmıştır. Çalışmada maya özütü, pepton, et özütü, kan, balık ve soya unlarının kullanılması durumunda yüksek nisin ve hücre biyokütlesine ulaşılmıştır. En yüksek nisin üretimi % 3 pamuk çığı ve % 4 soya ununun kullanılmasıyla elde edilmiştir (2500 IU/ml). Kazein hidrolizatı, mısır unu ve malt özütü nisin üretimi için uygun azot kaynakları olarak tanımlanamamıştır.

Nisin yanında diğer bakteriyosinlerin üretimi üzerine de etkili olduğu tespit edilmiş bir diğer azot kaynağı ise, maya özütüdür (De Vuyst 1995; Kim et al., 1997). Maya özütünün M17 laktoz besiyerine % 1 oranında ilave edilmesi durumunda, diğer azot kaynaklarına göre 2 kat daha fazla nisin üretiminin meydana geldiği belirlenmiştir. Ayrıca maya özütü oranının % 1'den % 3'e çıkarılması durumunda, nisin üretiminin ilave özüt oranı ile paralel bir şekilde yükseldiği, ancak bu seviyeden sonra hızla düştüğü tespit edilmiştir. Bu nedenle maya özütünün nisin üretimi için tek başına ideal azot kaynağı olabileceği ileri sürülmüştür (Cheigh et al., 2002). Maya özütü, serbest aminoasitler ve kısa peptitlere ilave olarak, hücre gelişimi için etkili faktörleri de içerdiği için, diğer azot kaynaklarından daha etkindir (De Vuyst 1995; Cheigh et al., 2002).

Nisin üretimine farklı özellikteki aminoasitlerin de etkili olduğu belirlenmiştir (De Vuyst 1995; Vazquez et al., 2004). Öncü peptitte yer almayan aminoasitlerin (aspartik asit, glisin, hidroksi-prolin, lizin, felinalanin, prolin, triptofan ve tirozin) sentetik

besiyerinde % 0.1 oranında kullanılması durumunda, hücre gelişiminin ve nisin üretiminin değişmediği tespit edilmiştir. Hatta prolin, hidroksiprolin, aspartik asit ve lizin, nisin üretimini durdurduğu saptanmıştır. Aynı çalışmada öncü peptitte yer alan aminoasitlerin (serin, treonin ve sistein) spesifik hücre gelişimi, hücre yoğunluğu ve nisin üretim seviyesi üzerine etkili olduğu ve sentetik besiyerinde % 0.1 oranında kullanılmaları durumunda nisin üretim düzeyini % 50 artırdıkları belirlenmiştir. Ancak aynı aminoasitlerin başlangıç konsantrasyonlarının % 0.5'i geçmesi durumunda üretici hücrelerin gelişimi engellenmiştir (De Vuyst, 1995). Klasik yöntemlerle sürekli nötralize edilen sistemlerde yürütülen nisin üretimlerinde, sistein ve triptofanın aktivatör, prolinin ise baskılayıcı rolünün olduğu saptanmıştır (Vazquez et al., 2004).

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

## 2. 3. İnorganik Bileşiklerin Etkisi

Nisin üretimi üzerine etkisi denenen ilk inorganik bileşik fosfor olmuştur. De Vuyst and Vandamme (1993) çalışmalarında, farklı fosfor kaynaklarının ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) kesikli sistemlerde nisin üretimi üzerindeki etkilerini araştırmıştır. Çalışmada *L. lactis* subsp. *lactis* NIZO 22186 suşu kullanılmıştır. Bu fosfor kaynakları içinde,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 'ün en etkili bileşik olduğu tespit edilmiştir.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 'ün başlangıç konsantrasyonunun % 5 düzeyinde kullanımı ile nisin aktivitesinin 3500 IU/ml gibi yüksek bir değere ulaştığı saptanmıştır. Ancak bu seviyeden sonra hem nisin miktarı hem de biyokütle oluşumu hızla azalmıştır. Yapılan başka bir çalışmada ise, aynı  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  konsantrasyonlarının *L. lactis* IO-1 suşunda nisin Z üretimi üzerinde etkili olmadığı belirlenmiştir. Aynı çalışmada  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 'ün aksine, 0.1-0.2 M  $\text{CaCl}_2$  ilavesinin nisin Z üretiminde % 20 artışa neden olduğu saptanmıştır. Ayrıca % 0.1 (v/v) Tween 80'nin kullanılması

sonucu nisin aktivitesinde % 30 artış tanımlanmıştır (Matsusaki et al., 1996).

Nisin üretiminde  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 'ün temel rolü ortamı tamponlaması ve hücre gelişim ajanı olarak işlev görmesi ile açıklanmaktadır (De Vuyst and Vandamme, 1992, Li et al., 2002, Liu et al., 2003). Nitekim yüksek fosfat konsantrasyonu, ATP oluşumunu teşvik ederek hücrelerin yüksek enerji seviyesinde bulunmasını sağlamaktadır.  $\text{Ca}^{+2}$ 'nin nisin üretimindeki etkisi ise, öncü nisin molekülünü modifiye eden enzimlerden NisP peptidazların aktivasyonuna yol açmasından kaynaklanmaktadır. Çünkü bu enzimler üzerinde,  $\text{Ca}^{+2}$  iyonlarının bağlanabileceği bölgeler bulunmaktadır. Diğer taraftan  $\text{Ca}^{+2}$  iyonları üretici suşlarda lipid membran bütünlüğünün korunmasında rol almaktadır. Bilindiği gibi fosfolipit yapılar lantibiyotiklerin temel hedef bölgeleridir (Matsusaki et al., 1996). Tween 80 üretilen nisinin ortamdaki çeperlere tutunmasını engelleyerek çözünürlüğünü artırmakta ve bu yolla nisin üretimini teşvik etmektedir (Liu et al., 2005).

## 2. 4. pH'in Etkisi

Bakteriyosin üretimi için optimum pH aralığı, suşa ve kullanılan besiyerine göre değişim göstermekle birlikte, genellikle 5.5–6.0 arasında tespit edilmiştir (Matsusaki et al., 1996). Bu pH aralığı üretici suşların gelişimi için gerekli seviyenin altındadır (Cheigh et al., 2002, Liu et al., 2005). Nisin üretiminde de diğer bakteriyosinler ile benzer şekilde, optimal pH aralığı 5.5-6.8 olarak saptanmıştır (De Vuyst and Vandamme, 1992, Matsusaki et al., 1996, Cheigh et al., 2002, Liu et al., 2005, Pongtharangkul and Demirci, 2006). *L. lactis* IO-1 suşu için, ksiloz bulunan ortamda en verimli nisin üretimi 6.0 pH'da gerçekleşirken, glukoz bulunan ortamda bu değer pH 5.5'te elde edilmiştir (Matsusaki et al., 1996). *L. lactis* A164 suşunun kullanıldığı bir diğer çalışmada ise, laktöz içeren ortamda en yüksek nisin üretimi pH 6.0'da gözlenmiştir.

Bakteriler, ortam koşullarındaki yüksek pH değişimlerine karşı canlılığını koruyabilse de, sitoplazmik pH'nın birçok metabolik yol için optimal olan nötral değerlerden uzaklaşması olumsuz durum yaratmaktadır. Bu nedenle birçok asit toleranslı laktik asit bakterisinde olduğu gibi; *L. lactis* hücrelerinde de iç pH, dış pH'daki düşüğe bağlı olarak 5–15 dakika içinde ayarlanmakta ve böylece sabit bir pH gradienti sağlanmaktadır (Siegumfeldt et al., 2000). Ancak düşük pH seviyelerinde metabolizmaya ait bazı enzimler inhibe edilmektedir. Ayrıca hücre gelişimi, şekerlerin katabolizması sonucu oluşan enerjinin

ATPaz tarafından sitoplazmik alkalizasyon için kullanılması nedeni ile, tamamen durmaktadır (Even et al., 2002). Nitekim Guerra and Pastrana (2003) *L. lactis subsp. lactis*'te dış ortam pH'sının 5'in altına düşmesi sonucunda, hem hücre gelişiminin ve hem de nisin üretiminin durduğunu saptamıştır.

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

## 2. 5. Nisin Miktarının Etkisi

Nisin üretimi, ortamda yüksek konsantrasyonda nisin bulunması durumunda inhibe olmaktadır. Bu durum üretici suşlarda, maksimum dirençliliğin sağlanabildiği bir sınır değer bulunmasından kaynaklanmaktadır (Kim et al., 1997, Qiao et al., 1997, Kim et al., 1998). Örneğin, *L. lactis* N8 ve LAC48 suşlarının dirençlilik gösterebildiği maksimum nisin değerleri, sırasıyla 1000 IU/ml ve 5000 IU/ml olarak ölçülmüştür (Qiao et al., 1997).

Nisin molekülleri, sitoplazmik membran üzerinde yer alan hücre duvarı öncüsü lipidII ile interaksiyona girerek membran üzerinde gözeneklerin açılmasına ve bunun sonucunda proton motivasyon gücün kaybına yol açmaktadır. Nisin üretici suşlar, membran bütünlüğünü koruyabilmek için, dirençlilikten sorumlu 4 polipeptitten oluşan bir kompleks sentezlemektedir. Bu proteinler; nisin operonu üzerinde yer alan nisI, nisF, nisE ve nisG genlerinden sentezlenen ve sırasıyla membrana bağlı bir lipoprotein, iki integral protein (ABC translokator iki adet) ve bir sitoplazmik proteindir (Takala et al., 2004). Bu genlerden üretilen proteinlerin dirençlilikten sorumlu oldukları belirlenmesine rağmen, bağışıklığın mekanizması aydınlatılamamıştır. Ancak yapılan öncü çalışmalarda nisI lipoproteininin, nisin ile stabil olmayan kompleks oluşturduğu ve böylece nisinin membrana bağlanmasının engellediği sanılmaktadır (Saris et al., 1996). NisI geninin fonksiyonun engellenmesi sonucu üretici suşta dirençliliğin %80 oranında düştüğü ve ayrıca söz konusu genlerin ifade düzeyi ile paralel bir şekilde üretici suşların nisine karşı olan dirençliliğinin değiştiği saptanmıştır (Ra et al., 1996).

### 3. NİSİN ÜRETİMİNDE KULLANILAN MODEL SİSTEMLER

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

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

#### 3. 1. Kesikli ve Yarı Kesikli Sistemler

Kesikli sistemlerde nisin üretimi ilk kez Hirsch tarafından 1951'de çalışılmıştır. Bu sistemlerde nisin üretimi, hücre gelişimi ile bağlantılı olarak artmaktadır. De Vuyst and Vandamme (1992) tarafından, başlangıç şeker konsantrasyonunun 10 g/l sakkaroz olarak alındığı kesikli fermentasyonda; *L. lactis* subsp. *lactis* NIZO 22186 suşunun ekspaniyansel fazda (4-6. saatler arası) 0.66 1/h oranında hızlı bir hücre gelişimi gösterdiği ve buna

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

Nisin üretiminde spesifik üretimin artırılması ve üretici suşların aktif fazının uzatılabilmesi amacıyla yarı-kesikli fermentasyon sistemleri devreye sokulmuştur (Kim et al., 1997, Amiali et al., 1998, Guerra and Pastrana, 2003, Lv et al., 2004a, Lv et al., 2004b). Bu sistemlerde; diğer üretim teknolojileri için başlangıçta olması gerekli yüksek besin konsantrasyonu ve ayrıca fermentasyon boyunca oluşan laktik asit miktarının üretici suş üzerindeki olumsuz etkisinin azaltılması hedeflenmiştir (Lv et al., 2004a, Lv et al., 2004b). Bilindiği gibi karbon kaynağının regülasyonu hücre gelişimi ve nisin biyosentezini doğrudan etkilemektedir (De Vuyst and Vandamme, 1992). Bu yaklaşımla yürütülen bir çalışmada besleme solusyonu, 300 g/l ve 135 g/l sakkaroz ve NaOH ilavesi ile hazırlanmıştır. Fermentasyon süresince son sakkaroz konsantrasyonu 40 g/l olacak şekilde bu solusyondan besleme yapılmıştır. Çalışmada en yüksek biyokütle oranı 4.2 g kuru ağırlık/l olarak elde edilirken, 5010 IU/ml gibi oldukça yüksek nisin aktivitesine ulaşılmıştır. Fakat kesikli sistemlerde görülen maksimum pikten sonraki düşüş, bu sistemde de meydana gelmiştir (Lv et al., 2004a). Nisin üretim miktarında meydana gelen düşmenin temel kaynağı, nötralizasyondan dolayı oluşan laktatın ve ortamda biriken nisin üretici hücre üzerinde oluşturduğu olumsuz etkidir (Hul and Gibbons, 1997, Shimizu et al., 1999, Tolonen et al., 2004). % 1 glukoz içeren minimal besiyeri ortamında, *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 suşu

kullanılarak yürütülen yarı-kesikli nisin üretim sisteminde; NaOH yerine, 6 M NH<sub>4</sub>OH kullanılması sonucu nisin üretim miktarı 1080 IU/ml'den 1260 IU/ml'ye yükselmiştir (Hul and Gibbons, 1997). Fermentasyon esnasında üretici suş tarafından oluşturulan laktik asitin üretici hücreler üzerindeki inhibisyon rolünün minimizasyonuna yönelik olarak tasarlanan bir çalışmada ise, kefirden izole edilen *Kluyveromyces marxianus* mayasının kullanımı önerilmiştir. Uygulama neticesinde saf kültürün kullanıldığı kontrol grubunda 2320 IU/ml nisin aktivitesi elde edilirken, mayanın kullanıldığı kesikli fermentasyon sisteminde 3920 IU/ml nisin aktivitesine ulaşılmıştır (Stimizu et al., 1999).

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

### 3. 2. Sürekli Sistemler

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

İmmobilizasyon tekniği kullanılarak nisin üretiminin yapıldığı ilk çalışmada, destek materyali olarak doğal kalsiyum alginat kullanılmıştır. Ancak çalışma sonucunda, amaçlanan yüksek nisin üretimine ve uzun süreli üretim stabilitesine ulaşılamamıştır (Wan et al., 1995). Devam eden çalışmalarda; hücre immobilizasyonunun etkin olarak yapılabileceği, besin akışının hızlı olduğu ve yüksek stabiliteye sahip destek materyallerinin kullanıldığı sistemlerin geliştirilmesi üzerinde durulmuştur. Sonomoto et al., (2000) nisin Z üreticisi olan *L. lactis* I0-1 suşunu kalsiyum alginat, K-karegenan, agar ve agaroz, üretan prepolimer, foto-çapraz bağlanabilir resin prepolimeri gibi materyallere tutuklayarak, kitosan veya foto çapraz bağlı resin jel tanelerine tutundurularak, hücrelerdeki nisin üretim düzeylerini ve söz konusu materyallerin kullanılabilirliklerini araştırmıştır. Tüm tutuklanmış materyallerde besin elementlerinin difüzyonunun kısıtlanması nedeniyle düşük gelişme hızı ve nisin üretimi saptanmıştır. Ayrıca foto-çapraz bağlı resin materyallerinde tutuklama işlemi esnasında kullanılan kısa dalga boyuna sahip ultraviyole ışığın hücrelerin gelişimi üzerindeki inhibisyon etkisinden dolayı, oldukça düşük üreme oranı belirlenmiştir. Aynı çalışmada, hücrelerin tutundurulduğu kitopearl SH251 ve foto-nisin çapraz bağlı resin polimerlerde, serbest hücreli kontrole göre 1.7 kat daha fazla nisin üretimi elde edilmiştir. Fakat kalsiyum alginatın kullanıldığı ve *L. lactis* DPC496 hücresinin immobilize edildiği farklı bir araştırmada, yukarıda bahsedilen iki araştırmanın sonuçlarının tersi bir sonuç rapor edilmiştir (Scannell et al., 2000). Bu çalışmada 0.3 l/h dilüsyon hızında (D), MRS broth kullanılarak, 5120 AU/ml nisin aktivitesi elde edilirken; Sonomoto et al. (2000) çalışmasında aynı materyali kullanarak 1700 AU/ml değerine ulaşabilmiştir. Kullanılan bir diğer immobilizasyon materyali ise K-karegenan/baklagil gamı'dır. Araştırmacılar bu materyale *L. lactis* UL719 suşunu immobilize ettikten sonra fermentör hacmine göre 3.5 hacim/dk havalandırma ve 0.15 h<sup>-1</sup> dilüsyon oranı kullanarak 2048 IU/ml nisin elde etmiştir (Desjardins et al., 2001).

İmmobilize hücre tekniğinin (İHT) nisin üretiminde uygulanması; hücrelerin immobilize edildiği materyalin kolon şeklinde bir kaba doldurulması ve burada stabilizasyonun sağlanması amacıyla 0.3 M KCl ve 0.03 M CaCl çözeltilerin kullanılması suretiyle yapılmaktadır. Sistemde pH'nın ayarlandığı ve taze hazırlanan besiyerinin bulunduğu ayrı bir karıştırıcı hazne bulunmaktadır. Bir pompa aracılığı ile karıştırıcı bölmede pH'sı 6'ya ayarlanan besin ortamı, hücrelerin bulunduğu immobilizasyon materyalinden geçirilmekte ve üretilen nisin bulunduğu ortam tekrar karıştırıcı bölümde toplanmaktadır (Sonomoto et al., 2000,

Scannell et al., 2000, Liu et al., 2005). İmmobilize sistemde oluşan metabolitler, belli bir seviyeden sonra üretici hücre üzerine zararlı etki yapmaktadır. Bu etkinin giderilmesi amacıyla Bertrand et al., (2001) pH kontrollü besiyeri değişimini önermiştir. K-karegenan/baklagil gamına  $10^{11}$  CFU/ml düzeyinde immobilize edilen *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* hücreleri, bir saatlik zaman aralıklarıyla yeni besi ortamına alınarak süreklilik sağlanmıştır. Yapılan çalışmada 1 saatlik değişimlerde 8200 IU/ml toplam, 5730 IU/ml.h hacimsel nisin aktivitesine ulaşılmıştır.

Nisin üretiminde geliştirilmiş model sistemler kıyaslandığında; birbirlerine karşı üstünlükleri kadar, sınırlayıcı dezavantajları da içerdikleri görülmektedir. Serbest hücrenin kullanıldığı kesikli ve yarı kesikli sistemlerde, nisin üretimi için gerekli olan lag fazı daha kısadır. Ayrıca hacimsel açıdan yüksek miktarda nisin üretimi olmamasına rağmen, spesifik üretim oldukça yüksektir. Bu durum ise, hücrelerin besin elementleri ile doğrudan temasta

olmasıyla açıklanmaktadır (Amiali et al., 1998, Tolonen et al., 2004). İmmobilize sistemlerin en büyük avantajı, yüksek oranda hücrenin reaksiyona sokulmasıdır. Ayrıca immobilize hücrelerin üretim sürecini kolaylaştırması ve kontaminasyon riskini azaltması diğer önemli hususlardır. Fakat besin elementlerin jelde difüzyonunun ve üretilen nisin jel dışına geçişinin sınırlı olması, immobilize hücrelerin serbest hücrelerden daha yavaş gelişmesine neden olmaktadır (Wan et al., 1995, Scannell et al., 2000, Sonomoto et al., 2000, Desjardins et al., 2001, Bertrand et al., 2001). Bugüne kadar yapılan çalışmalarda kullanılan sistemlerde alınan nisin üretim oranları Tablo 1’de verilmiştir. Buna göre immobilize hücre teknolojisi kullanılması ve hücrelerin saatte bir yeni ortama alınması durumunda en yüksek hacimsel nisin üretimi sağlamıştır. Bu sonuçlar, fermentasyon ortamının sürekli değiştirilmesinin; düşük pH, laktat ve nisin hücreler üzerindeki inhibisyon etkilerini ortadan kaldırdığını açıkça göstermektedir.

Tablo 1. Farklı Model Sistemlerde Nisin Üretim Miktarlarının Karşılaştırılması.

Fermentasyon Tipi	Kültür <sup>b</sup>	Canlılık (CFU/ml)	Hacimsel Üretim (IU/ml h) <sup>c</sup>	Hücresel Üretim (IU/ml h hücre) <sup>d</sup>	Kaynaklar
RCB (1-h cycles)	İK	$1.00 \times 10^{11}$	5720	$57.2 \times 10^{-9}$	Bertrand et al., 2001
Kesikli	SK	$2.80 \times 10^{10}$	529	$18.9 \times 10^{-9}$	Amiali et al., 1998.
Kesikli	SK	$6.70 \times 10^9$	854	$127 \times 10^{-9}$	Amiali et al., 1998.
Sürekli	SK	$2.75 \times 10^9$	460	$167 \times 10^{-9}$	Desjardins et al., 2001.
Sürekli	İK	$1.07 \times 10^{11}$	1760	$16.4 \times 10^{-9}$	Desjardins et al., 2001.
Sürekli <sup>a</sup>	İK	$1.37 \times 10^{10}$	216	$15.8 \times 10^{-9}$	Sonomoto et al., 2000.
Yarı-Kesikli	SK	$1.20 \times 10^9$	84	$61.3 \times 10^{-9}$	Hull and Gibbons, 1997.
Yarı-Kesikli <sup>a</sup>	SK	$2.07 \times 10^9$	626	$302 \times 10^{-9}$	Lv et al., 2004a ;
Kesikli <sup>a</sup>	SK	$3.69 \times 10^9$	400-450	$122 \times 10^{-9}$	De Vuyst and Vandamme, 1994; Parente and Ricciardi, 1999.

a : Kuru hücre ağırlığı verileri Canlılık (CFU/ml) =  $KHA = 2.02 \times 10^9 \text{ CFU} + 0.012$  denklemi kullanılarak CFU/ml’ye dönüştürülmüştür (Shimizu et al., 1999); b : SK: Serbest-hücre kültürü; İK: İmmobilize hücre kültürü; c : Toplam fermentasyon süresi sonundaki ortalama; d : Hücresel üretim (IU/ml h hücre) = Hacimsel üretim (IU/ml h)/Canlılık (CFU/ml).

### 3. 3. Nisin Üretimi İçin Geliştirilmiş Suşlar

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

genetik davranışlarının aydınlatılması, bu yöndeki çalışmalara hız kazandırmıştır.

Endüstriyel nisin üretime yönelik suş geliştirme çalışmaları, moleküler düzeyde ilk kez konjugasyon uygulamaları ile yürütülmüştür. Konjugasyon çalışmalarında alıcı ve verici suşlar karşılaştırılmış ve nisin üretim yeteneği kazanmış transkonjugatlar elde edilmiştir. Ancak bugüne kadar yapılan çalışmalarda, transkonjugantlar için verici suşta elde edilen nisin üretim düzeyi geçilememiştir. Ayrıca transkonjugatlarda nisin fenotipinin stabil olmadığı da tespit edilmiştir. Nisin üretiminde kullanılan hücrelerin, doğal nisin dirençlilik genlerinin (nisI, nisF, nisE ve nisG) yüksek düzeyde ifadesinin sağlanması, bu bakteriyosinin üretimi üzerine olumlu etki yapmaktadır.



Çünkü, daha önce de söz edildiği gibi, üretici hücrelerin dirençlilik gösterebildiği bir sınır nisin değeri bulunmaktadır. Nitekim nisI genlerinin vektör bir plazmid aracılığı ile üretici doğal suşa aktarılması ve bu genlerin ifadesinin sağlanması sonucunda, nisin üretim miktarında % 20'lik bir artışın söz konusu olduğu belirlenmiştir (Kim et al., 1998).

Dirençlilikten sorumlu nisI geninin kullanılması, operonda yer alan fonksiyonel genlerle yapılan çalışmalara ışık tutmuştur. *L. lactis* subsp. *lactis* 164 suşunda nisin Z üretimi, nisZ, nisR, nisK ve nisF, nisE, nisG genlerin çoklu kopyaları klonlanarak artırılmaya çalışılmıştır. NisZ geninin klonlandığı hücrelerde gelişim sorunları meydana gelmiş ve bu durum nisin Z ön peptidinin ana suş üzerinde toksik etki içerdiği şeklinde yorumlanmıştır. Buna karşın kontrol suşta 16.000AU/ml olan nisin aktivitesi; nisR ve nisK ve nisF, nisE, nisG genlerinin klonmasıyla 25.000AU/ml değerine ulaşmıştır. Ayrıca Northern blot analizlerinin sonucu nisR, nisK genlerinin yüksek düzeyde ifadelerinin sağlanması durumunda, nisZ geninin transkripsiyonunun da teşvik edildiği belirlenmiştir (Cheigh and Pyun, 2005).

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

#### 4. KAYNAKLAR

Akçelik, O., Tukul, Ç., Özcengiz, G. and Akçelik, M. 2006. Characterization of Bacteriocins From Two *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Isolates. Mol Nutr Food Res. 50: 306-13.

Amiali, M. N., Lacroix, C. and Simard, R. E. 1998. High Nisin Z Production by *Lactococcus lactis* UL719 in Whey Permeate with Aeration. World J. Microbiol. And Biotechnol. 14: 887-894.

Beasley, S. S. and Saris P. E. J. 2004. Nisin Producing *Lactococcus lactis* Strains Isolated From Human Milk. Appl. Environ. Microbiol. 70: 5051-5053.

Bertrand, N., Fliss, I. and Lacroix, C. 2001. High Nisin-Z Production During Repeated-cycle Batch Cultures in Supplemented Whey Permeate Using Immobilized *Lactococcus lactis* UL719. Inter. Dairy Journal. 11: 953-960.

Broughton, D. J. 1990. Nisin and Its Uses as a Food Preservative. Food Technology. 44: 100-117.

Chandrapati, S. and O'sullivan, D. J. 1999. Nisin Independent Induction of the nisA Promoter in *Lactococcus lactis* During Growth in Lactose or Galactose. FEMS Microbiol. Letters. 170: 191-198.

Chandrapati, S. and O'sullivan, D. J. 2002. Characterization of Promoter Regions Involved in Galactose and Nisin Mediated Induction of the nisA Gene *Lactococcus lactis* ATCC 11454. Molecular Microbiol. 2: 467-477.

Cheigh, C. I., Choi, H. J., Park, H., Kim, S., Kook, M., Kim, T., Hwang, J. and Pyun, Y. 2002. Influence of Growth Conditions on the Production of a Nisin-like Bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 Isolated from Kimchi. J. Biotechnol. 95: 225-235.

Cheigh, C. I. and Pyun, Y. 2005. Nisin Biosynthesis and Its Properties. Biotechnol. Letters. 27: 1641-1648.

De Vuyst, L. and Vandamme, E. J. 1993. Influence of the Phosphorus and Nitrogen Source on Nisin Production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Batch Fermentations Using a Complex Medium. Appl. Microbiol. Biotechnol. 40: 17-22.

De Vuyst L. 1995. Nutritional Factors Affecting Nisin Production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NIZO 22186 in a Synthetic Medium. J. Appl. Bacteriol. 78: 28-33.

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.

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 Journal. 11: 943-951.

- Dodd, H. M., Horn, N. and Gasson, M. J. 1990. Analysis of the Genetic Determinant for Production of the Peptide Antibiotic Nisin. *J. General Microbiol.* 136: 555-566.
- Even, S., Lindley, N. D., Loublere, P., Cocaign-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.
- Gasson, M. J. 1984. Transfer of Sucrose Fermenting Ability, Nisin Resistance and Nisin Production Into *Streptococcus lactis* 71. *FEMS Microbiol. Letters.* 21: 7-10.
- Gasson, M. J. 1990. In Vivo Genetic Systems in Lactic Acid Bacteria. *FEMS Microbiol. Reviews.* 87: 43-60.
- Gonzalez, C. F. and Kunka, B. S. 1985. Transfer of Sucrose Fermenting Ability and Nisin Production Phenotype Among Lactic streptococci. *Appl. Environ. Microbiology.* 49: 627-633.
- Guerra, N. P. and Pastrana, L. 2001. Enhanced Nisin and Pediocin Production on Whey Supplemented with Different Nitrogen Sources. *Biotechnol. Letters.* 23 : 609-612.
- Guerra, N. P. and Pastrana, L. 2002. Modelling the Influence of pH on the Kinetics of Both Nisin and Pediocin Production and Characterization of their Functional Properties. *Process Biochemistry.* 37: 1005-1015.
- Guerra, N. P. and Pastrana, L. C. 2003. Influence of pH Drop on Both Nisin and Pediocin Production by *Lactococcus lactis* and *Pediococcus acidilactici*. *Letters Appl. Microbiol.* 37: 51-55.
- Hul, 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.
- Kim, W. S., Hall R. J. and Dunn N. W. 1997. Host Specificity of Nisin Production by *Lactococcus lactis*. *Biotechnol. Letters.* 19: 1235-1238.
- Kim, W. S. 1997. Nisin Production by *Lactococcus lactis* Using two-phase Batch Culture. *Letters Appl. Microbiol.* 25: 169-171.
- Kim, W. S., Hall, R. J. and Dunn, N. W. 1998. Improving Nisin Production by Increasing Immunity/resistance Genes in the Producer Organism *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50: 429-433.
- Kim, W.S., Hall, R.J. and Dunn, N.W. 1997. The Effect of Nisin Concentration and Nutrient Depletion on Nisin Production of *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48: 449-453.
- Klaenhammer, T. R. 1993. Genetics of Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12: 39-85.
- Leblanc, D. J., Crow, V. L. and Lee, L. N. 1980. Plasmid Mediated Carbohydrate Catabolic Enzymes Among Strains of *Streptococcus lactis*. In *Plasmids and Transposons: Environmental Effects and Maintenance Mechanisms*, pp. 31-41. Edited by C.Stuttard and K.R. Rozee. New York: Academic Press.
- Li, C., Bai, J., Cai, Z. and Ouyang, F. 2002. Optimization of a Cultural Medium for Bacteriocin Production by *Lactococcus lactis* Using Response Surface Methodology. *J. Biotechnol.* 93; 27-34.
- Liu, C., Liu, Y., Liao, W., Wen, Z. and Chen, S. 2003. Application of Statistically-based Experimental Designs for the Optimization of Nisin Production from Whey. *Biotechnol. Letters.* 25; 877-882.
- Liu, X., Chung, Y-K. Yang S. T. and Yousef, A. E. 2005. Continuous Nisin Production in Laboratory Media and Whey Permeate by Immobilized *Lactococcus lactis*. *Process Biochemistry.* 40; 13-24.
- Lv, W., Cong W. and Cai, Z. 2004a. Nisin Production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* under Nutritional Limitation in Fed-batch Culture. *Biotechnol. Letters.* 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. Letters.* 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. Lantibiotic Nisin Z Fermentative Production by *Lactococcus lactis* IO-1: Relationship Between Production of the Lantibiotic and Lactate and Cell Growth. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45: 36-40.

- Pongtharangkul, T. and Demirci, A. 2006. Evaluation of Culture Medium for Nisin Production in a Repeated-batch Biofilm Reactor. *Biotechnol. Prog.* 22: 217-224.
- Qiao, M., Omaetxebarria, M. J., Ra, R., Oruetxebarria, I. and Saris, P. E. J. 1997. Isolation of a *Lactococcus lactis* Strain with High Resistance to Nisin and Increased Nisin Production. *Biotechnol. Letters.* 19: 199-202.
- Qiao, M., Ye, S., Koponen, O., Ra, R., Usabiaga, M., Immonen, T., Saris, P. E. J. 1996. Regulation of the Nisin Operon in *Lactococcus lactis* N8. *J. Appl. Bacteriol.* 80: 626-614.
- Ra, S. R., Qiao, M., Immonen, T., Pujana, I. and Saris, P. E. J. 1996. Genes Responsible for Nisin Synthesis, Regulation and Immunity from a Regulon of Two Operons and are Induced by Nisin in *Lactococcus lactis* N8. *Microbiology.* 142: 1281-1288.
- Saris, P. E. J., Immonen, T., Reis, M., and Sahl, H. G. 1996. Immunity to Lantibiotics. *Antonie van Leeuwenhoek.* 69: 151-159.
- Scannell, A. G. M., Hill, C., Ross, R. P., Marx, S., Hartmeier, W. and Arendt, E. K. 2000. Continuous Production of Lacticin 3147 and Nisin Using Cells Immobilized in Calcium Alginate. *J. Appl. Microbiol.* 89: 573-579.
- Shimuzu, H., Mizuguchi, T., Tanaka, E. and Shioya, S. 1999. Nisin Production by a Mixed –Culture System Consisting of *Lactococcus lactis* and *Kluyveromyces marxianus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3134-3141.
- Siegmundfeldt, 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.
- Sonomoto, K., Chinachoti, N., Endo, N. and Ishizaki, A. 2000. Biosynthetic Production of Nisin Z by Immobilized *Lactococcus lactis* IO-1. *J. Molecular Cat. B: Enzymatic.* 10: 325-334
- Steele, J.L. and McKay, L. L. 1986. Partial Characterization of the Genetic Basis for Sucrose Metabolism and Nisin Propduction in *Streptococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 57-64.
- Steen, M. T., Chung, Y. J. and Hansen, J. N. 1991. Characterization of the Nisin Gene as a Part of a Polycistronic Operon in the Chromosome of *Lactococcus lactis* ATCC 11454. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1181-1188.
- Takala, M. T., Koponen, O., Qiao, M. and Saris P.E.J. 2004. Lipid-free NisI: Intereaction with Nisin and Contribution to Nisin Immunity via Secretion. *FEMS Microbiol. Letters.* 237: 171-177.
- Tolonen, M., Saris, P. E. J. and Siika-aho, M. 2004. Production of Nisin with Continuous Adsorption to Ambelite XAD-4 Resin Using *Lactococcus lactis* N8 and *L. lactis* LAC48. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63: 659-665.
- Vazquez, J.A. Cabo, M. L., Gonzalez, M. P. and Murado, M. A. 2004. The Role of Amino Acids in Nisin and Pediocin Production by Two Lactic Acid Bacteria a Factorial Study. *Enzyme and Microbiol. Technol.* 34: 319-325.
- Wan, J., Hickey, W. and Coventry, M. J. 1995. Continuous Production of Bacteriocins, Brevicin, Nisin and Pediocin, Using Calcium Alginate-Immobilized Bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 79: 671-676.
- Wardani, A. H., Egawa, S., Nagahisa, K., Shimizu, H. And Shioya, S. 2006. Computational Prediction of Impact of Rerouting the Carbon Flux in Metabolic Pathway on Cell Growth and Nisin Production by *Lactococcus lactis*. *Biochemical Engineering Journal.* 28: 220-230.
- Yang, R., Johnson, M. C. and Ray, B. 1992. Novel Method to Extract Amounts of Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3355-3359.
- Yu, P. L., Dunn, N. W. and Kim, W. S. 2002. Lactate Removal by Anionic-exchange Resin Improves Nisin Production by *Lactococcus lactis*. *Biotechnol. Letters.* 24: 59-64.