



T.C.
NİĞDE ÖMER HALİSDEMİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

DİETİL PİROKARBONAT, HOMOSİSTEİN TİYOLAKTON VE
METİLGİOKSAL İLE MODİFİYE EDİLEN NİSİNİN ÖZELLİKLERİ

DOKTORA TEZİ

NİĞDE ÖMER HALİSDEMİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

EZGİ DEMİR ÖZER

Şubat 2018

T.C.
NİĞDE ÖMER HALİSDEMİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

DİETİL PİROKARBONAT, HOMOSİSTEİN TİYOLAKTON VE
METİLGİOKSAL İLE MODİFİYE EDİLEN NİSİNİN ÖZELLİKLERİ

EZGİ DEMİR ÖZER

Doktora Tezi

Danışman

Prof. Dr. Metin YILDIRIM

Şubat 2018

Ezgi DEMİR ÖZER tarafından **Prof. Dr. Metin YILDIRIM** danışmanlığında hazırlanan “**Dietil Pirokarbonat, Homosistein Tiylolakton ve Metilglioksal ile Modifiye Edilen Nisinin Özellikleri**” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Gıda Mühendisliği** Ana Bilim Dalı’nda Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Nihat AKIN
Selçuk Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Yahya Kemal AVŞAR
Mustafa Kemal Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Zeliha YILDIRIM
Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Metin YILDIRIM
Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi

Üye : Yrd. Doç. Dr. Ayşe ÖZBEY
Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi

ONAY:

Bu tez, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca belirlenmiş olan yukarıdaki jüri üyeleri tarafından 09/02/2018 tarihinde uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu’nun/...../20.... tarih ve sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

...../...../20...

Doç. Dr. Murat BARUT
MÜDÜR V.

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.



Ezgi DEMİR ÖZER

ÖZET

DİETİL PİROKARBONAT, HOMOSİSTEİN TİYOLAKTON VE METİLGİOKSAL İLE MODİFİYE EDİLEN NİSİNİN ÖZELLİKLERİ

DEMİR ÖZER, Ezgi

Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman

:Prof. Dr. Metin YILDIRIM

Şubat 2018, 70 sayfa

Dietil pirokarbonat (DEPK), homosistein tiyolakton (HSTL) ve metilglioksal (MG) ile modifiye edilen nisin'in bazı özelliklerinin incelenmesi bu tez çalışmasının temel amacını oluşturmuştur. Ticari nisin, diklorametan ile çöktürme ve katyon değiştirici kolon kromatografisi yöntemleri birleştirilerek en az %95 düzeyinde saflaştırılmıştır. Yüksek saflıktaki Nisin Z DEPK ile %13,68, HSTL ile %6,30 ve MG ile %70,51 düzeyinde modifiye edilmiştir. Tripsin ve termolisin enzimleriyle hidrolizasyon ve trisin-sodyum-dodesil-sülfat poliakrilamid jel elektroforez analiziyle modifikasyonun gerçekleştiği gösterilmiştir. DEPK ve MG ile modifiye edilen nisin, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* AÜ, *Enterococcus faecium* ATCC 9097, *Listeria monocytogenes* NCTC 5348 ve *Escherichia coli* RSKK bakterilerine karşı antibakteriyel aktivite göstermemiştir. HSTL ile modifiye edilmiş nisin ise sadece *Enterococcus faecium* ATCC 9097'ye karşı antibakteriyel aktivite göstermiş ve minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) değeri 16,75 µM olarak saptanmıştır.

Anahtar Sözcükler: Bakteriyosin, nisin, kimyasal modifikasyon, dietil pirokarbonat, homosistein tiyolakton, metilglioksal, antibakteriyel aktivite.

SUMMARY

PROPERTIES OF NISIN MODIFIED WITH DIETHYLPYROCARBONATE, HOMOCYSTEINE THIOLACTONE OR METHYLGLYOXAL

DEMİR ÖZER, Ezgi

Niğde Ömer Halisdemir University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Food Engineering

Supervisor : Prof. Dr. Metin YILDIRIM

February 2018, 70 pages

The main purpose of this study is to investigate some properties of nisin modified with diethylpyrocarbonate (DEPC), homocysteine thiolactone (HCTL) and methylglyoxal (MG). Commercial nisin was purified to at least 95% using the method developed by combining dichloromethane precipitation and cation exchange column chromatography methods. High-purity Nisin Z was modified by 13.68% with DEPC, 6.30% with HCTL and 70.51% with MG. The modification was confirmed by using hydrolyzing activities of trypsin and thermolysin enzymes followed by tricine-sodium-dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. The nisin modified with DEPC or MG did not show any antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* AÜ, *Enterococcus faecium* ATCC 9097, *Listeria monocytogenes* NCTC 5348 or *Escherichia coli* RSKK. HCTL modified nisin had a little antibacterial activity against *Enterococcus faecium* ATCC 9097 and the minimum inhibitory concentration (MIC) of HCTL modified nisin was 16.75 µM against *Enterococcus faecium* ATCC 9097.

Keywords: Bacteriocin, nisin, chemical modification, diethyl pyrocarbonate, homocysteine thiolactone, methylglyoxal, antibacterial activity.

ÖN SÖZ

Doktora tez çalışmamın her aşamasında bana yol gösteren, araştırmamın gerçekleştirilmesi ve değerlendirilmesinde katkılarını esirgemeyen; bana her konuda destek olan ve bilimsel bir bakış açısı kazanmamı sağlayan değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Metin YILDIRIM'a,

Çalışmam sırasında öneri ve bakış açılarıyla önemli katkılarda bulunan Tez İzleme Komitesinin değerli üyeleri Sayın Prof. Dr. Zeliha YILDIRIM ve Sayın Prof. Dr. Yahya Kemal AVŞAR'a,

Bu çalışmaya 2014/21-BAGEP numaralı proje ile finansal destek sağlayan Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine,

Çalışmalarım sırasında bilgi ve deneyimini esirgemeyen sayın bölüm hocalarıma,

Her zaman beraber çalışmaktan keyif alacağım tüm laboratuvar çalışma arkadaşlarıma,

Çalışmamın her aşamasında beni teşvik ederek destekleyen sevgili eşim Yrd. Doç. Dr. Cem Okan ÖZER'e,

Beni her konuda destekleyen ve sevgileri ile hep yanımda olan canım aileme, en içten teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak doktora tezimi, varlığıyla beni her zaman umutlandıran ve mutlu eden canım oğlum Barış ÖZER'e ithaf ediyorum.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iv
SUMMARY.....	v
ÖN SÖZ.....	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
FOTOĞRAF VB. MALZEMELER DİZİNİ.....	xii
SİMGE VE KISALTMALAR.....	xiii
BÖLÜM I GİRİŞ.....	1
BÖLÜM II KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	3
2.1 Nisinin Fizikokimyasal Özellikleri, Antimikrobiyal Aktivitesi ve Kullanımı.....	3
2.2 Nisinin Saflaştırılması.....	7
2.3 Nisine Uygulanan Genetik Modifikasyonlar.....	8
2.4 Nisine Uygulanan Kimyasal Modifikasyonlar.....	12
2.5 Dietil pirokarbonat, Homosistein Tiyolakton ve Metilglioksal ile Yapılan Modifikasyonlar.....	13
BÖLÜM III MATERYAL VE METOT.....	19
3.1 Materyal.....	19
3.2 Metot.....	19
3.2.1 Nisinin saflaştırılması.....	19
3.2.2 Trisin sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (Trisin-SDS-PAGE).....	21
3.2.3 Asetik asit üre poliakrilamid jel elektroforezi (AAÜ-PAGE).....	22
3.2.4 Nisinin kimyasal modifikasyonu.....	24
3.2.4.1 Nisinin dietil pirokarbonat ile modifikasyonu.....	24

3.2.4.2 Nisinin homosistein tiyolaktan ile modifikasyonu	24
3.2.4.3 Nisinin metilglioksal ile modifikasyonu	25
3.2.5 Modifiye edilmiş örneklerin hazırlanması	25
3.2.6 Homosistein tiyolaktan ile modifikasyonun derecesinin belirlenmesi	25
3.2.7 Dietil pirokarbonat ve metilglioksal ile modifikasyon derecesinin belirlenmesi	27
3.2.8 Protein analizi	28
3.2.9 Antibakteriyel aktivitedeki değişimin belirlenmesi	29
3.2.10 Modifikasyon bölgelerinin belirlenmesi	31
3.2.10.1 LC-MS-MS analizi	31
3.2.10.2 Enzimatik hidrolizasyon - Trisin SDS-PAGE analizi	31
3.2.11 İstatistiksel analiz	32
BÖLÜM IV BULGULAR VE TARTIŞMA	33
4.1 Nisinin Saflaştırılmasına İlişkin Sonuçlar	33
4.2 Nisinin Kimyasal Modifikasyonu	35
4.2.1 Nisinin MG ile modifikasyonu	36
4.2.2 Nisinin DEPK ile modifikasyonu	40
4.2.3 Nisinin HSTL ile modifikasyonu	45
4.3 Modifiye Edilen Nisin Örneklerinin Protein İçerikleri	50
4.4 Antibakteriyel Aktivitedeki Değişimin Belirlenmesi	51
4.5 Modifikasyon Bölgelerinin Belirlenmesi	55
BÖLÜM V SONUÇLAR	59
KAYNAKLAR	61
ÖZ GEÇMİŞ	69

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Nisine uygulanan genetik modifikasyonlar ve sonuçları	11
Çizelge 2.2. Nisine uygulanan kimyasal modifikasyonlar ve sonuçları.....	13
Çizelge 3.1. Trisin-SDS-PAGE yönteminde kullanılan çözeltiler ve jel kompozisyonu.	22
Çizelge 3.2. AAÜ-PAGE yöntemine ait jel kompozisyonu	23
Çizelge 4.1. Farklı pH değerlerinde saptanan modifikasyon oranları.....	36
Çizelge 4.2. Farklı MG konsantrasyonlarında saptanan modifikasyon oranları.....	37
Çizelge 4.3. Farklı reaksiyon süresinde saptanan modifikasyon oranları (%).....	37
Çizelge 4.4. Farklı çalkalama hızlarında (d/dk) saptanan modifikasyon oranları (%)....	38
Çizelge 4.5. Farklı sıcaklıklarda (°C) saptanan modifikasyon oranları (%).....	38
Çizelge 4.6. Nisinin MG ile optimum modifikasyon koşulları.....	38
Çizelge 4.7. Farklı pH değerlerinde saptanan modifikasyon oranları (%)	41
Çizelge 4.8. Farklı DEPK konsantrasyonlarında saptanan modifikasyon oranları (%) ..	42
Çizelge 4.9. Farklı sıcaklıklarda (°C) saptanan modifikasyon oranları (%).....	42
Çizelge 4.10. Farklı reaksiyon süresi ve çalkalama hızında (d/dk) saptanan modifikasyon oranları (%).....	43
Çizelge 4.11. Nisinin DEPK ile Optimum Modifikasyon Koşulları	43
Çizelge 4.12. Farklı pH değerleri, HSTL konsantrasyonları ve reaksiyon sürelerinde saptanan modifikasyon oranları (%).....	46
Çizelge 4.13. Farklı pH değerleri ve HSTL konsantrasyonlarında saptanan modifikasyon oranları (%).....	47
Çizelge 4.14. Farklı süre ve sıcaklık değerlerinde saptanan modifikasyon oranları (%) .	48
Çizelge 4.15. Nisinin HSTL ile optimum modifikasyon koşulları	49
Çizelge 4.16. Kimyasal modifikasyon sonrası örneklerin protein oranları	51
Çizelge 4.17. HSTL ile modifiye edilen nisinin <i>Enterococcus faecium</i> 'a karşı MİK değerleri.....	55

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Nisinin biyosentez sonrası değişime uğratılması	4
Şekil 2.2. Nisin çeşitlerinin aminoasit dizilimleri	5
Şekil 2.3. Nisinin antibakteriyel etki mekanizması	6
Şekil 2.4. Histidin ve lizinin Dietil pirokarbonat (DEPK) ile modifikasyonu	14
Şekil 2.5. Histidinin Dietil pirokarbonat ile modifikasyonu ve modifikasyonun hidroksilamin ile giderilmesi	15
Şekil 2.6. Proteinin Homosistein tiyolaktin (HSTL) ile modifikasyonu	15
Şekil 2.7. Proteinin metilglioksal (MG) ile modifikasyonu	18
Şekil 3.1. Nisinin saflaştırılması	20
Şekil 3.2. Trinitrobenzen sülfonik asit (TNBS) reaksiyonu	27
Şekil 3.3. Sığır Serum Albumini ve Nisin standartlarına ait kalibrasyon eğrileri	29
Şekil 4.1. Nisinin CM Sepharose kromatogramı	33
Şekil 4.2. Saflaştırma işlemlerine ait Trisin-SDS-PAGE elektroforetogramı	35
Şekil 4.3. MG ile modifiye edilen nisin örneklerinin, %22,5'lik AAÜ-PAGE ve %16,5'lik Trisin SDS-PAGE elektroforetogramı	40
Şekil 4.4. DEPK ile modifiye edilen nisin örneklerinin, %22,5'lik AAÜ-PAGE ve %16,5'lik Trisin SDS-PAGE elektroforetogramı	45
Şekil 4.5. HSTL ile modifiye edilen nisin örneklerinin, %22,5'lik AAÜ-PAGE ve %16,5'lik Trisin SDS-PAGE elektroforetogramı	50
Şekil 4.6. DEPK modifikasyonuna ait spot-on-lawn tekniği ile antibakteriyel aktivite sonuçları	52
Şekil 4.7. HSTL modifikasyonuna ait spot-on-lawn tekniği ile antibakteriyel aktivite sonuçları	53
Şekil 4.8. MG modifikasyonuna ait spot-on-lawn tekniği ile antibakteriyel aktivite sonuçları	54
Şekil 4.9. Modifiye edilen nisin örneklerinin tripsin ve termolisin enzimleri ile hidrolizasyonu sonrası Trisin SDS-PAGE elektroforetogramı	57

Şekil 4.10. Modifikasyon şartlarındaki kontrol nisın örneklerinin tripsin ve termolisin enzimleri ile hidrolizasyonu sonrası Trisin-SDS-PAGE elektroforetogramı58



FOTOĞRAF VB. MALZEMELER DİZİNİ

Fotoğraf 3.1. AAÜ-PAGE yönteminde jelleşmeyi başlatmak için kullanılan aydınlatma düzeni.....	23
---	----



SİMGE VE KISALTMALAR

Kısaltmalar	Açıklama
DEPK	Dietilpirokarbonat
HSTL	Homosistein tiyolakton
MG	Metilglioksal
Trisin SDS-PAGE	Trisin Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
AAÜ-PAGE	Asetik Asit Üre Poliakrilamid Jel Elektroforezi
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
APS	Amonyumpersülfat
TCA	Trikloroasetik Asit

BÖLÜM I

GİRİŞ

Tüketicilerin doğal ve katkısız ürünlere gösterdikleri talepteki artış nedeniyle laktik asit bakterileri ve bakteriyosinler potansiyel gıda koruyucusu olarak önem kazanmıştır (Marth, 1998; Cleveland vd., 2001). Bakteriyosinler, ribozomal olarak sentezlenen, biyosentez sonrası değişime uğrayabilen, küçük katyonik, hidrofobik veya amfifilik karakterli, insan sindirim sistemi proteazları tarafından parçalanabilen, geniş bir pH aralığında aktif olan ve genellikle ısıya direnç gösteren doğal antimikrobiyal peptidler ve/veya proteinlerdir (Klaenhammer, 1993). Nisin, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* tarafından kimyasal bir savunma sistemi olarak yarışma içerisinde bulunduğu mikroorganizmalara karşı üretilen bakteriyosindir. Gıda katkı maddesi (Avrupa Birliği gıda katkı maddesi kodu E234) olarak ticari boyutta kullanılan ilk bakteriyosin (Galvez vd., 2007) olan nisin günümüzde sebze, süt, peynir, et ve diğer bazı gıda maddelerinin üretiminde kullanılmaktadır (Yang vd., 2014).

Bugün Türkiye de dâhil olmak üzere birçok ülkede nisinden gıda katkı maddesi olarak yararlanılmaktadır (Yıldırım, 2010). Ancak nötr solüsyonlarda çözünürlüğünün düşük, antibakteriyel spektrumunun sınırlı ve proteolitik enzimler tarafından hızla parçalanabilir olması nisinin kullanımını sınırlayan önemli faktörler arasında yer almaktadır (Guiotto vd., 2003). Bu olumsuzluklar genetik ve kimyasal modifikasyonları da kapsayan çeşitli bilimsel faaliyetlerle giderilmeye çalışılmaktadır. C-terminal amidasyonu, halkalı yapı oluşturulması, D-aminoasitlerin ilavesi ve halojen eklenmesi gibi uygulamalar ile antimikrobiyal peptidlerin biyolojik aktivitelerinin ve proteazlara karşı stabilitelerinin arttırılmasına yönelik çalışmalar yapılmıştır (Wang, 2012).

Bazı protein ve enzimlerin modifiye edilmesinde dietilpirokarbonat, homosistein tiyolaktan ve metilglioksal kullanılmıştır (Hnizda vd., 2008; Jalili vd., 2011; Banerjee ve Chakraborti, 2013). Dietil pirokarbonat, lizinin yan grubundaki pozitif yükü uzaklaştırıp yerine etil grubu ekleyerek proteinlerin hidrofobik özelliğini arttırmaktadır (Pal ve Ghosh, 1998). Dietil pirokarbonat histidin, lizin ve tirozin ile reaksiyona girebilmektedir. Modifiye edilmiş proteinin hidroksilamin ile reaksiyonu sonucunda histidin ve tirozin modifikasyonu geri alınabilmektedir. Böyle bir uygulama ile sadece

lizinin yan grubunun modifiye edilmesi sağlanabilmektedir (Hnizda vd., 2008). Homosistein tiyolakton, proteinlerdeki lizin aminoasidinin yan zincirindeki serbest amino grubuyla kolaylıkla reaksiyona girerek homosistein-εN-Lys-protein oluşumunu sağlamaktadır (Jalili vd., 2011). Metilglioksal lipit ve protein katabolizmasının ürünü ve glikolizin ise yan ürünü olup Maillard benzeri reaksiyona giren bir bileşiktir (Pietkiewicz vd., 2011; Banerjee ve Chakraborti, 2013). Maillard benzeri reaksiyonlar açısından metilglioksalın glikozdan 20 000 kat daha aktif olduğu belirlenmiştir. Metilglioksalın, pozitif yüklü aminoasitlerle reaksiyona girerek ya yan grupların modifikasyonuna ya da çapraz bağlanmaya yol açtığı saptanmıştır (Banerjee ve Chakraborti, 2013).

Protein mühendisliğindeki gelişmeler, nisinin eczacılık ve tarım alanlarında da terapötik (tedavi edici) bir ajan olarak kullanılmasına olanak sağlamaktadır (Sen vd., 1999). Küçük doğal bir antimikrobiyal protein olan ve gıda katkı maddesi olarak kullanılmasına izin verilen nisinin antimikrobiyal etkinliğinin kimyasal modifikasyonlarla arttırılabileceği değerlendirilmiştir. Yapılan kaynak taramalarında temel olarak proteine bağlı lizin aminoasidinin yan grubunun modifikasyonunu sağlayan dietil pirokarbonat, homosistein tiyolakton ve metilglioksal ile nisinin modifiyasyonunu konu alan herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu yüzden dietil pirokarbonat, homosistein tiyolakton ve metilglioksal ile sadece lizin aminoasidinin yan grubunun modifiye edilmesinin nisinin bazı özellikleri üzerine etkisinin incelenmesi bu tez çalışmasının temel amacını oluşturmuştur.

BÖLÜM II

KAYNAK ARAŞTIRMASI

Bu bölümde, nisinin yapısal özelliklerinden ve günümüze kadar nisine uygulanan genetik ve kimyasal modifikasyonlardan bahsedilmiştir. Ayrıca diğer bazı proteinlerin dietil pirokarbonat, homosistein tiyolakton ve metilglioksal ile modifikasyonlarına da yer verilmiştir.

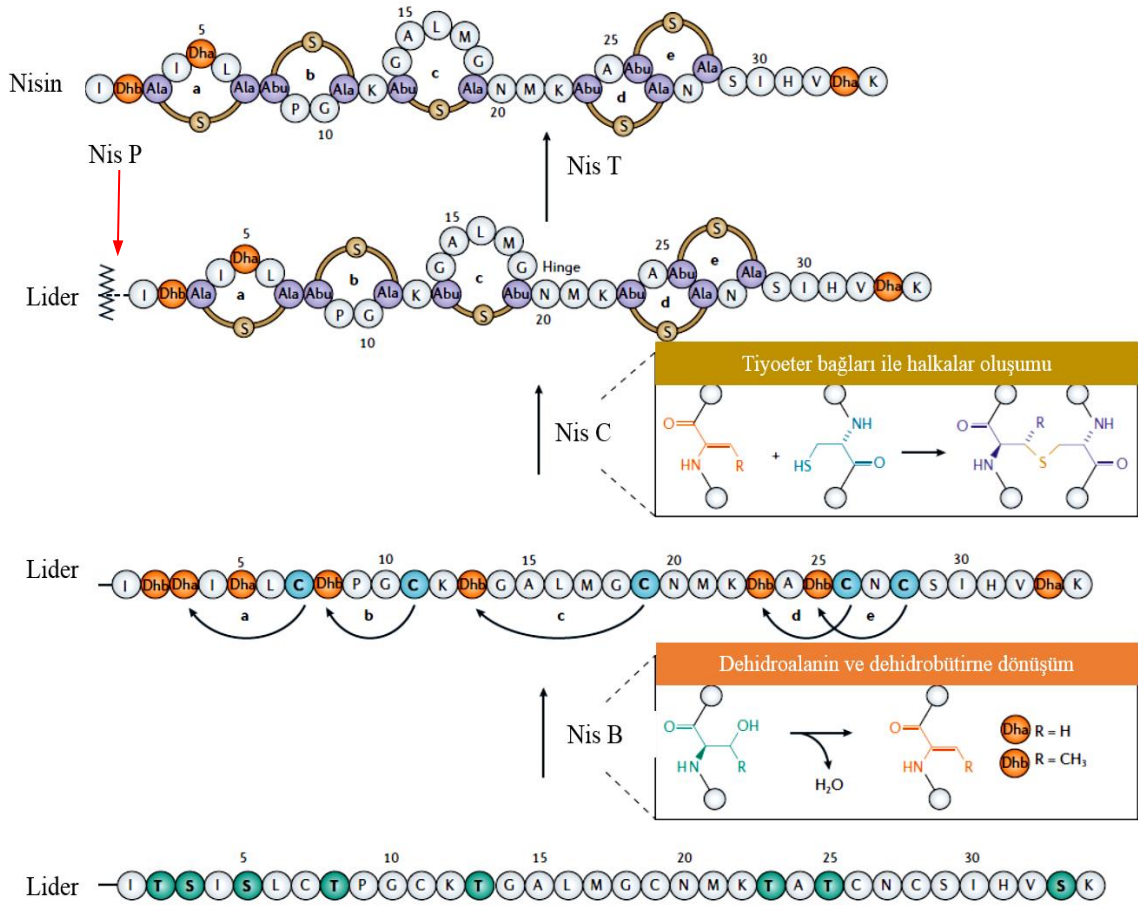
2.1 Nisinin Fizikokimyasal Özellikleri, Antimikrobiyal Aktivitesi ve Kullanımı

Bakteriyosinler, gıda kaynaklı patojenleri ve bozulma etmeni mikroflorayı inhibe edebilmektedir. Bu özelliklerinden dolayı bakteriyosin üretici laktik asit bakterileri veya bunların ürettikleri saflaştırılmış bakteriyosinler gıda sistemlerinde biyokoruyucu olarak büyük bir kullanım potansiyeline sahiptir (De Martinis vd., 2002).

Birçok gıdada biyokoruyucu olarak kullanılan ve *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* tarafından üretilen nisin ilk kez 1928 yılında tanımlanmıştır (Rogers, 1928). FAO ve WHO (Gıda Tarım Örgütü/Dünya Sağlık Örgütü) tarafından 1969 yılında gıda katkı maddesi olarak kullanılmasına izin verilen nisin, ticari boyuta taşınan ilk bakteriyosindir (Abdullah vd., 2010; Plat vd., 2011). FAO ve WHO tarafından bir günde kg vücut ağırlığı başına alınabilecek nisin düzeyi (ADI değeri) 2 mg olarak belirlenmiştir (FAO/WHO, 2013).

Yapısal, fizikokimyasal ve moleküler özellikler temelinde laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinler sınıf I (ısıya dirençli modifiye küçük peptidler, lantibiyotikler), sınıf II (ısıya dirençli modifiye edilmemiş küçük peptidler, lantionin içermeyenler) ve sınıf III (ısıya duyarlı büyük proteinler) olmak üzere 3 ana gruba ayrılmaktadır (Zacharof ve Lovitt, 2012). Sınıf I lantibiyotikler grubunda yer alan nisin 3,5 kDa moleküler ağırlıkta olup 34 aminoasit içermektedir (Parada vd., 2007; Plat vd., 2011). Nisinin birincil yapısı 1971'de Gross ve Morell (1971) tarafından belirlenmiştir. Lantibiyotikler, dehidroalanin, dehidrobütirin, lantionin ve β -metil-lantionin gibi ender aminoasitleri içerirler (Breukink ve de Kruijff, 1999; Koponen vd., 2002).

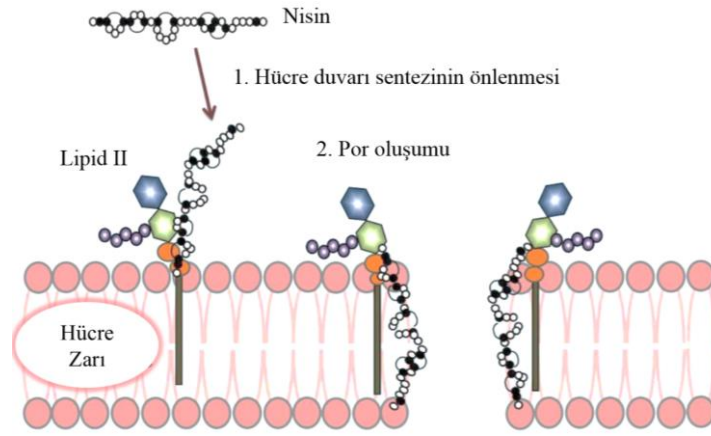
Nisin inaktif formda 57 aminoasit olarak sentezlenir. Bu aminoasitlerin 23'ü lider peptidi ve 34'ü ise aktif nisini oluşturur. İnaktif nisindeki serin ve treonin aminoasitleri NisB enzimi tarafından sırasıyla dehidroalanin (didehidroalanin) ve dehidrobütirne (didehidrobütirin) dönüştürülür. Sonra NisC enzimi yardımıyla bunlar arasında kurulan tiyoeter bağları halka oluşumunu sağlar. Daha sonra NisP enzimiyle lider peptit uzaklaştırılıp aktif nisin olarak NisT tarafından hücre dışına salgılanır (Şekil 2.1) (Kuipers vd., 1995; Koponen vd., 2002; Breukink ve de Kruijff, 2006; Perez vd., 2015).



Şekil 2.1. Nisinin biyosentez sonrası değişime uğratılması (Breukink ve de Kruijff, 2006)

Nisin, ender rastlanan aminoasitler içermesinden dolayı düşük pH değerlerinde otoklavlanırsa bile aktivitesini kaybetmemektedir (Hansen, 1994; Guiotto vd., 2003). Şu ana kadar nisin A, Z, Q, F, U ve U2 olmak üzere 6 doğal çeşidi tanımlanmıştır (Şekil

halkalarının ilk ikisinin lipit II'yi bağlamada, son üçünün ise membrana tutunmada önemli olduğu belirtilmiştir (Hasper vd., 2006).



Şekil 2.3. Nisinin antibakteriyel etki mekanizması

Diğer bakteriyosinlere oranla daha yüksek bir antimikrobiyal aktiviteye sahip olan nisin minimum inhibisyon konsantrasyonunun 10 µg/L (3 nM) kadar düşük olduğu bildirilmiştir (De Vos vd., 1993; Kuipers vd., 1995). Nisin doğal bir koruyucu olarak peynir, sıvı yumurta, salata sosları, konserve gıdalar, süt ürünleri ve kıymada (kırmızı et) bakteri gelişimini kontrol altına almak amacıyla kullanılmaktadır (Rollema vd., 1996; Wilson-Stanford vd., 2009). Ayrıca metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* ve vankomisine dirençli enterokoklar gibi antibiyotiklere dirençli Gram pozitif koklara karşı etkinliği nedeniyle nisin tedavisi amaçlı kullanım olanağı da bulunmaktadır (Brumfitt vd., 2002; Dischinger vd., 2014). Ancak nisin proteolize karşı duyarlı olması ve ağız yoluyla zayıf bir biyo-elverişliliğe sahip olması klinik kullanımını kısıtlamaktadır (Maher vd., 2009).

Nisin pH 5-7 aralığında ısıtıldığında stabilitesi ve aktivitesi azalmaktadır. Asidik koşullarda yüksek bir çözünürlüğe (pH 2'de 57 mg/mL) sahipken nötr ve alkali koşullardaki çözünürlüğü ise çok düşüktür (pH 8-12 aralığında 0,25 mg/mL) (Liu ve Hansen, 1990). Gıda bileşenleriyle etkileşime girmesi ve proteolitik enzimlere duyarlı olması nedeniyle nisin gıda sistemlerindeki antimikrobiyal etkinliği azalmaktadır (Aasen vd., 2003; Lopes vd., 2017).

Antibiyotiklere dirençli klinik patojenlere etkili olabilmesi sağlık sektörünün antibiyotiklere karşı olan ilgisini arttırmıştır (Dischinger vd., 2014). Bulaşıcı hastalıkların yaygınlaşması ve hayatı tehdit eden bir durum olarak antibiyotiklere karşı direncin artması mikroorganizmaların kontrolünde yeni yollar aranmasında etkili olmuştur (Bonev vd., 2004).

Nisinin nötr ve hafif alkali çözeltilerde düşük çözünürlüğe sahip olması, antibakteriyel spektrumunun sınırlı olması, proteolitik enzimler tarafından hızla parçalanabilmesi ve gıda koşullarına dayanıksızlık gibi kullanımını sınırlayıcı olumsuzluklardan dolayı, bilimsel çalışmalar genetik ve kimyasal modifikasyonlara yönelmiştir. Ancak bu çalışmaların başarısını etkileyen en önemli unsurlardan birisi nisinin saflık düzeyidir. Bu nedenle ilk basamak olarak nisinin saflaştırılması aşaması önemli olmaktadır.

2.2 Nisinin Saflaştırılması

Bakteriyosinler, kısmi (örneğin ticari formda %2,5 saflıktaki nisaplin, Danisco, Amerika Birleşik Devletleri) veya tam saflaştırılmış formda direkt ya da üretici mikroorganizmaların kullanılmasıyla dolaylı olarak gıdalara ilave edilebilmektedir.

Bakteriyosinlerin farklı aminoasit dizisine ve üç boyutlu yapıya sahip olmaları nedeniyle saflaştırılmaları için genel bir metot ya da protokol mevcut değildir (Heng vd., 2007; Pingitore vd., 2007). Bu nedenle bakteriyosinlerin saflaştırılmasında farklı teknikler kullanılmaktadır. Bu tekniklerden en sık kullanılanları tuzla çöktürme, iyon değiştirici ve ters faz C-18 katı faz ekstraksiyonu, adsorbsiyon-desorbsiyon, ters faz yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (RP-HPLC) ve sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS PAGE) gibi teknikleridir (Pingitore vd., 2007).

Kompleks bir bileşime sahip olan besiyeri ortamından ayrılmasında bakteriyosinlerin katyonik ve hidrofobik karakterlerinden faydalanılır (Cheigh vd., 2004). Saflaştırmada kullanılan metotlarda genel olarak, bakteriyosinlerin organik çözücülere karşı olan ilgisinden, konsantre tuz çözeltilerinde ve farklı pH'larda çözünebilme yeteneklerinden yararlanılmaktadır (Parada vd., 2007).

Nisinin saflaştırılmasında Cheigh vd. (2004) tek basamakta gerçekleştirilen expanded bed iyon değiştirici kromatografi yöntemini kullanmışlardır. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 tarafından üretilen nisin Z bu yöntemle saflaştırıldığında %90 düzeyinde verim ve 31 katlık saflık artışı elde edilmiştir. Bu yöntem, çok fazla işlem basamağı ve pahalı ekipmanlar gerektiren ancak yine de geri kazanım oranının çok düşük olduğu mevcut saflaştırma tekniklerinden daha üstün bulunmuştur.

Suarez vd. (1997), nisinin saflaştırılmasında, immunoafinite kromatografisi temeline dayanan tek basamaklı saflaştırma tekniğini kullanmışlardır. Bu teknik ile besiyeri ortamında bulunan nisinin %72,7'sini geri kazanmışlar ve saflık düzeyinde ise 10,3 katlık artış sağlamışlardır. Önerilen tekniğin, geleneksel yöntemlere göre hızlı, tekrarlanabilir ve yüksek verimli olduğu belirtilmiştir.

Ticari nisin (%2,5) etil alkol ve metil alkol kullanılarak saflaştırılmıştır. Etil alkol kullanıldığında, en yüksek saflık düzeyi 5,5 kat ile %70 etil alkol konsantrasyonunda elde edilmiştir. Bu koşullardaki verim düzeyi ise %84,7 olarak saptanmıştır. Metil alkol kullanılması durumunda ise en yüksek saflık düzeyi 5,3 kat ile %90 metil alkol konsantrasyonunda elde edilmiş ve verim ise %91 düzeyinde gerçekleşmiştir (Xiao vd., 2010).

Nisin ticari olarak %2,5 saflıkta pazarlanmaktadır. Ancak bilimsel çalışmalarda daha yüksek saflık derecelerine ihtiyaç duyulmaktadır. Slootweg vd. (2013a) ticari nisini (%2,5) diklorometan ve selit muamelesi ile %34 saflık düzeyine çıkarabilmişlerdir. Bir başka çalışmada ise pH'sı 3 olan 50 mM laktik asit içerisinde çözündürülen ticari nisin (%2,5) katyon değiştirici kolondan geçirilmiştir. Tek bir aşamada gerçekleştirilen bu uygulama ile yüksek saflık ve verimde nisin elde edilebilmiştir (Abts vd., 2011).

2.3 Nisine Uygulanan Genetik Modifikasyonlar

Nisin ile ilgili biyomühendislik alanındaki çalışmalar yaklaşık 30 senedir sürmektedir. Literatürün kapsamlı bir şekilde incelenmesi sonucunda, çok sayıda nisin türevi oluşturulmasına karşın, patojen mikroorganizmalara karşı az sayıda başarı sağlandığı saptanmıştır.

Nisin Z üzerinde genetik modifikasyonun gerçekleştirildiği ilk çalışmada, Met-17'nin Gln'e ve Gly-18'in Thr'e dönüştürülmesiyle *Micrococcus flavus*'a karşı antimikrobiyal aktivitenin arttığı, *Bacillus cereus* ve *Streptococcus thermophilus*'a karşı ise antimikrobiyal aktivitenin azaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca Ser-5 Thr'e ve sentez sonrası modifikasyonla da Dha-5'in Dhb'e dönüşümü sağlandığında da aktivitenin azaldığı tespit edilmiştir (Kuipers vd., 1992). Kuipers vd. (1995) tarafından yapılan bir diğer çalışmada, Ile-1 Trp'a, Thr-2 Ser'e, Ser-3 Thr'e, Lys-12 Pro'e, Thr-13 Cys'e, Met-17 Trp'a, Asn-27 Lys'e ve His-31 Lys'e dönüştürülmüştür. Bu dönüşümlerden Ile-1'in Trp'a ve Thr-13'ün Cys'e dönüşümü aktivitede azalmaya yol açarken Thr-2'nin Ser'e dönüşümü ise *Micrococcus flavus* ve *Streptococcus thermophilus*'a karşı olan aktivitede 2 katlık artış meydana getirmiştir. Lys-12'nin Pro'e dönüştürülmesi aktivitede değişiklik oluşturmadığından bu pozitif yükün nisinin antimikrobiyal aktivitesi için elzem olmadığı ancak çözünürlüğü arttırabileceği belirtilmiştir. Çalışmada oluşturulan mutantların çoğunluğunun antimikrobiyal aktivitesinde azalma gerçekleşmiştir.

Nisinin klinik amaçlı kullanımında, en büyük problem fizyolojik pH'da düşük çözünürlüğe sahip olmasıdır. Nisinin çözünürlüğünü arttırmak amacıyla Rollema vd. (1995) tarafından yapılan çalışmada, Asn-27 ve His-31 aminoasitlerinin lizine dönüştürülmesi sonucu elde edilen iki mutantın nötral pH'daki çözünürlüğünün belirgin bir şekilde arttığı tespit edilmiştir.

Yapılan bir başka çalışmada ender aminoasitlerin antimikrobiyal aktivite üzerine etkileri araştırılmıştır (van Kraaij vd., 2000). Bu çalışmada, biyosentez sonrası modifikasyondan önce dizideki Thr-13, Cys'e dönüştürülüp C halkasındaki tiyoeter bağlarının oluşumu engellenmiştir. NMR analizleri, bu mutantın yapısının doğal nisine oldukça benzediğini göstermiştir. Buna karşın antimikrobiyal aktivitesi oldukça azaldığından bu durum C halkasının antimikrobiyal aktivitedeki öneminin göstergesi olarak kabul edilmiştir. Aynı çalışmada Ser-5 ve Met-17'nin Cys'e dönüştürülmesinin ise antimikrobiyal aktiviteyi arttırdığı tespit edilmiştir.

Asn-20'nin Lys'e ve Met-21'in yine Lys'e dönüştürüldüğü iki ayrı mutantın Gram negatif *Shigella*, *Pseudomonas* ve *Salmonella* türlerine karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca her iki mutantın genetik olarak modifiye edilmemiş nisine göre daha yüksek çözünürlük gösterdiği saptanmıştır. Oluşturulan nisin mutantlarının *Micrococcus flavus* ve *Streptococcus thermophilus*'a karşı aktivitelerinde azalma meydana geldiği saptanmıştır (Yuan vd., 2004).

Tesadüfi mutasyonlarla elde edilen 8 000 nisin türe arasında Lys-22 yerine Thr içeren varyantın insan ve sığır için patojen olan *Streptococcus agalactiae*'e karşı yüksek aktivite gösterdiği saptanmıştır. Aynı çalışmada *Listeria monocytogenes* ve *Staphylococcus aureus* da dâhil olmak üzere bazı Gram pozitif patojen bakterilere karşı daha yüksek aktiviteye sahip Asn-20 yerine Pro, Met-21 yerine Val ve Lys-22 yerine Ser içeren nisin çeşitleri oluşturulmuştur (Field vd., 2008).

Field vd. (2012), nisin A molekülü üzerinde genetik müdahale ile üretilen ve Ser-29 yerine Gly içeren varyantın *Staphylococcus aureus* üzerinde daha yüksek aktiviteye sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca Ser-29 yerine Ala, Asp ve Glu eklenen nisin varyantlarının *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium ve *Cronobacter sakazakii* gibi Gram negatif bakterilere etki gösterdikleri de tespit edilmiştir.

Zhou vd. (2016) yaptıkları çalışmada nisinin Ile-1, Met-17 ve Val-32 aminoasitlerinde 3 farklı triptofan analogunun oluşturulmasıyla nisinin biyokimyasal özelliklerinin değiştiğini ve modifiye nisinlerin antimikrobiyal aktivitelerinin azaldığını gözlemişlerdir.

Nisinin kullanımını sınırlayan olumsuzlukların giderilmesine yönelik genetik modifikasyonlar özet halinde Çizelge 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Nisine uygulanan genetik modifikasyonlar ve sonuçları

Yapılan Modifikasyonlar	Sonuçlar	Kaynaklar
Met-17 yerine Gln ve Gly-18 yerine Thr içeren nisin çeşitleri oluşturulması	<i>Micrococcus flavus</i> karşı antimikrobiyal aktivite atmış, <i>Bacillus cereus</i> ve <i>Streptococcus thermophilus</i> 'a karşı ise antimikrobiyal aktivite azalmıştır.	Kuipers vd., 1992
Dha-5 yerine Dhb içeren nisin çeşitleri oluşturulması	Antimikrobiyal aktivite azalmıştır.	Kuipers vd., 1992
Ile-1 yerine Trp ve Thr-13 yerine Cys çeşitleri oluşturulması	Antimikrobiyal aktivite azalmıştır.	Kuipers vd., 1995
Thr-2 aminoasitinin Ser'e dönüştürülmesi	<i>M. flavus</i> ve <i>Str. thermophilus</i> 'a karşı olan aktivitede 2 katlık artış meydana getirmiştir.	Kuipers vd., 1995
Ile-1, Met-17 ve Val-32 aminoasitlerinin Trp aminoasidine dönüştürülmesi	Antimikrobiyal aktivitede azalma meydana gelmiştir.	Zhou vd., 2016
Asp-27 ve His-31 aminoasitlerinin Lys'e dönüştürülmesi	Nisinin nötral pH'daki çözünürlüğünde artış sağlanmış ve asit katalizli kimyasal bozulmalara karşı direnç kazandırılmıştır.	Rollema vd., 1995
Thr-13'ün Cys'e dönüştürülmesi ve C halkasındaki tiyoeter bağlarının oluşumunun engellenmesi	Antimikrobiyal aktivite oldukça azalmıştır.	van Kraaij vd., 2000
Ser-5 ve Met-17'nin Cys'e dönüştürülmesi	Antimikrobiyal aktivitede artış sağlanmıştır.	van Kraaij vd., 2000
Asn-20'nin Lys'e ve Met-21'in yine Lys'e dönüştürülmesi	<i>Shigella</i> , <i>Pseudomonas</i> ve <i>Salmonella</i> 'ya karşı antimikrobiyal aktivite gözlenmiştir. <i>M. flavus</i> ve <i>Str. thermophilus</i> 'a karşı aktivitelerinde ise azalma gözlenmiştir.	Yuan vd., 2004
Asn-20 yerine Pro, Met-21 yerine Val ve Lys-22 yerine Ser içeren nisin çeşitleri oluşturulması	<i>Listeria monocytogenes</i> ve <i>S. aureus</i> da dâhil olmak üzere bazı Gram pozitif patojen bakterilere karşı daha yüksek biyolojik aktivite sağlanmıştır.	Field vd., 2008
Tesadüfî mutasyonların oluşturulması	Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere karşı etkili varyantlar oluşturulmuştur.	Field vd., 2008
Ser-29 yerine Gly eklenmesi	<i>S. aureus</i> üzerinde daha yüksek antimikrobiyal aktivite sağlanmıştır.	Field vd., 2012
Ser-29 yerine Ala, Asp veya Glu eklenmesi	<i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella Typhimurium</i> ve <i>Cronobacter sakazakii</i> gibi Gram negatif bakterilere karşı aktivite kazandırılmıştır.	Field vd., 2012

2.4 Nisine Uygulanan Kimyasal Modifikasyonlar

Protein ve nükleik asit gibi büyük moleküllerin yapılarında kimyasal reaksiyonlarla değişiklikler oluşturmaya kimyasal modifikasyon denir. Proteinlerin kimyasal modifikasyonu, bilim ve teknolojide karşılaşılan sorunları çözüme kavuşturmak için kullanılan araçlardan birisidir (Feeney vd., 1982). Proteinlerin doğal yapılarının aydınlatılması, terapötik etkili proteinlerin oluşturulması ve yeni protein yapılarının üretilmesi gibi uygulamalarda kimyasal modifikasyondan yararlanılabilir (Spicer ve Davis, 2014).

Nisinin nötral ve hafif alkali ortamlarda yetersiz çözünmesinden ve proteolitik enzimlerle kolayca parçalanmasından dolayı FDA tarafından onaylı, toksik ve immunojenik olmayan polietilen glikolün nisine bağlanması ile söz konusu olumsuzlukların giderilmesine çalışılmıştır. Nisinin N-terminal-amino grubuna polietilen glikolün bağlanması sonucunda nisinin antibakteriyel aktivitesinin tamamen kaybolduğu gözlenmiştir (Guiotto vd., 2003). N-terminal-amino grubunun metilasyonu sonucunda da nisinin antibakteriyel aktivitesi kaybolmuştur (Bonev vd., 2004). Glikoz ile 95°C'de Maillard reaksiyonuna uğratılan nisinin antibakteriyel etkinliğinin azaldığı ve tripsin ile hidrolizinin zorlaştığı tespit edilmiştir (Abdullah vd., 2010). Ancak Muppalla vd. (2012) tarafından tam tersi bir sonuca ulaşılmıştır. Bu araştırmacılar, radyasyon uygulamasıyla oluşturulan nisin-karbonhidrat komplekslerinin daha yüksek antibakteriyel etkiye sahip olduğunu belirlemişlerdir.

Asetik asit varlığında hidrojen peroksit ile oksidasyona uğratılan nisinin bakterisidal etkisini tamamen kaybettiği belirlenmiştir (Wilson-Stanford vd., 2009). Antimikrobiyal aktiviteye zarar vermeden başarılı bir şekilde uygulanan nisinin ilk C terminal modifikasyonu biotinin C terminaline bağlanmasıyla gerçekleştirilmiştir (Maher vd., 2009). Benzer bir şekilde C terminaline propargilamin (2-propinilamin) bağlanmasıyla modifiye edilen nisinin aktivitesini koruduğu Sloomweg vd. (2013a) tarafından bildirilmiştir.

Nisinin kullanımını sınırlayan olumsuzlukların giderilmesine yönelik kimyasal modifikasyonlar Çizelge 2.2'de özetlenerek verilmiştir.

Çizelge 2.2. Nisine uygulanan kimyasal modifikasyonlar ve sonuçları

Yapılan modifikasyonlar	Sonuçlar	Kaynaklar
N-terminal-amino grubuna polietilen glikolün bağlanması	Antibakteriyel aktivitenin tamamen kayıp olması	Guiotto vd., 2003
N-terminal-amino grubunun metilasyonu	Antibakteriyel aktivitenin azalması	Bonev vd., 2004
Asetik asit varlığında hidrojen peroksit ile lantioninin oksidasyonu	Antibakteriyel aktivitenin azalması	Wilson-Stanford vd., 2009
C-terminal-karboksil grubuna biotin eklenmesi	Antibakteriyel aktivitenin etkilenmemesi	Maher vd., 2009
Glikoz ile 95°C'de Maillard reaksiyonuna maruz bırakılması	Antibakteriyel aktivite azalırken tripsin ile hidrolizin zorlaşması	Abdullah vd., 2010
Radyasyon uygulaması ile nisin-karbonhidrat kompleksinin oluşturulması	Antibakteriyel aktivitenin artması	Muppalla vd., 2012
C-terminal-karboksil grubuna propargilamin bağlanması	Aktivitenin korunması	Slootweg vd., 2013a

2.5 Dietil pirokarbonat, Homosistein Tiyolakton ve Metilglioksal ile Yapılan Modifikasyonlar

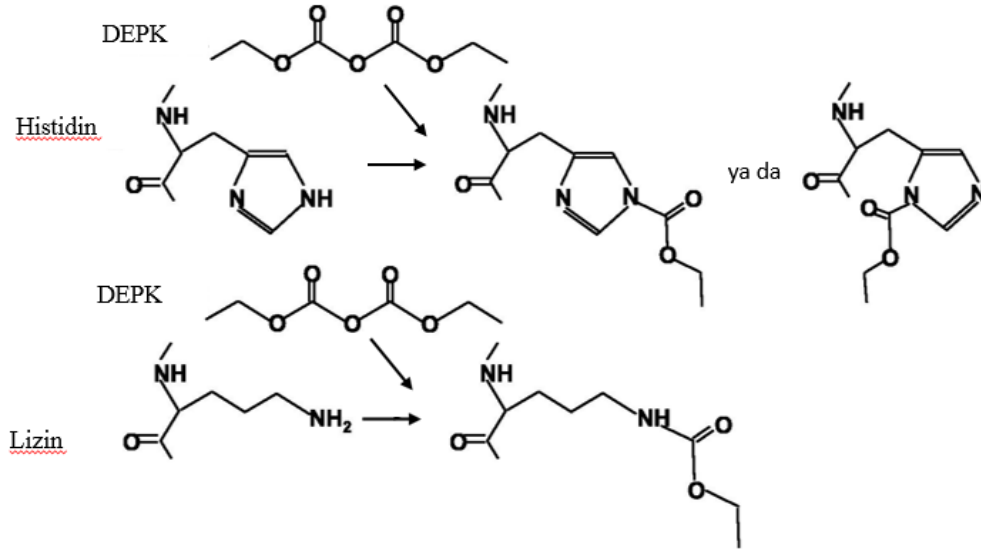
Kimyasal modifikasyonların gerçekleşmesi kullanılan kimyasala, seçilen bölgeye ve modifikasyon koşullarına bağlıdır (Spicer ve Davis, 2014). Çoğu aminoasidin yan grupları biyosentez sonrası modifiye edilmektedir. Bu modifikasyonlar serin, treonin ve tirozinin fosforilasyonu gibi enzimatik ya da sisteinin nitrozilasyonu gibi enzimatik olmayan koşullarda gerçekleşebilir (Azevedo ve Saiardi, 2016). Lizin, sistein, glutamik asit, aspartik asit, serin, tirozin ve triptofan aminoasitlerinin sahip oldukları yan gruplar aktif kimyasal bileşiklerle modifiye edilebilmektedir (Hackenberger ve Schwarzer, 2008; Minten vd., 2014).

Dietilpirokarbonat, homosistein tiyolakton ve metilglioksal ilk kez bu tez çalışmasında nisinin modifikasyonu için kullanıldığından literatürde nisinin bu kimyasallarla

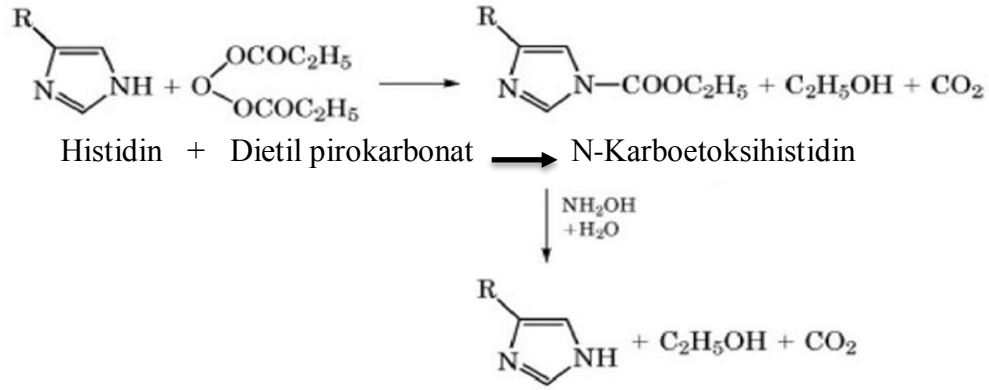
modifikasyonuna ilişkin herhangi bir çalışmaya ulaşamamıştır. Bu nedenle aşağıda, söz konusu kimyasalların bazı protein ve enzimlerin modifiye edilmesinde kullanımına ilişkin çalışmalara yer verilmiştir.

Dietil pirokarbonat (DEPK) proteindeki histidin yan grubu ile reaksiyona girerek N- karboetoksihistidin türevleri oluşturur (Şekil 2.4) (Hnizda vd., 2008). Ayrıca bu bileşik histidin yan sıra lizin, (Şekil 2.4) ve tirozinin yan grupları ve polipeptit zincirinin N terminali ile de reaksiyona girebilmektedir (Konkle vd., 2010).

Modifiye edilmiş proteinin hidroksilamin ile reaksiyonu sonucunda histidin ve tirozin modifikasyonları geri alınabilmektedir (Şekil 2.5). Hidroksilamin ile gerçekleşen reaksiyon kullanılarak sadece lizinin yan zincirinin modifiye edilmesi sağlanabilmektedir (Hnizda vd., 2008). DEPK, lizinin yan grubundaki pozitif yükü uzaklaştırıp yerine etil grubu eklemesi nedeniyle hidrofobik özelliği artırmaktadır (Pal ve Ghosh, 1998).



Şekil 2.4. Histidin ve lizinin dietil pirokarbonat (DEPK) ile modifikasyonu (Narumi vd., 2012)

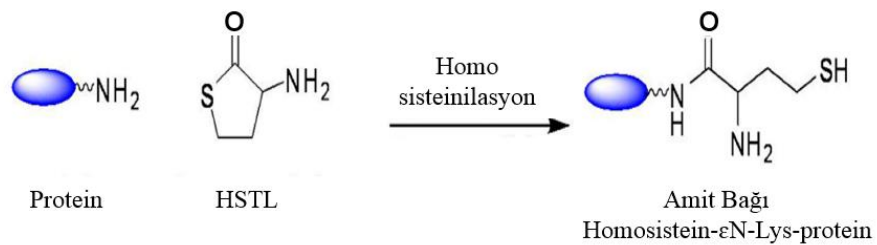


Şekil 2.5. Histidin'in Dietil pirokarbonat (DEPK) ile modifikasyonu ve modifikasyonun hidroksilamin ile giderilmesi

DEPK ile laktat dehidrogenaz ve pridoksamin-5'-fosfat-oksidazda bulunan histidin kalıntıları modifiye edilmiştir (Hnizda vd., 2008; Lundblad, 2014).

DEPK ile insülin, sitokrom C, lizozim ve insan serum albümünü modifiye edilmiştir. Çalışma sonucunda modifikasyon için aktif yan grupların proteinin yüzeyinde olması gerektiği belirlenmiştir. Ancak reaksiyonun gerçekleşmesi için bunun tek başına yeterli olmadığı, yan grupların bulunduğu ortamın ve protein yapısının da reaksiyonun gerçekleşmesinde etkili olduğu saptanmıştır (Hnizda vd., 2008).

Homosistein tiyolakton (HSTL), proteinlerdeki lizin aminoasidinin yan zincirindeki serbest amino grubuyla kolaylıkla reaksiyona girerek homosistein-εN-Lys-protein oluşumunu sağlamaktadır (Şekil 2.6) (Jalili vd., 2011).



Şekil 2.6. Protein'in homosistein tiyolakton (HSTL) ile modifikasyonu (Zang vd., 2016)

Sığır pankreatik insülinin HSTL varlığındaki özellikleri Jalili vd. (2011) tarafından incelenmiştir. Çalışma sonucunda artan HSTL konsantrasyonlarının sığır pankreatik insülininde yapısal değişmeye ve agregasyona yol açtığı tespit edilmiştir.

HSTL ile modifikasyonun proteinlerin fonksiyonel ve yapısal özelliklerinde değişiklik yaptığı belirtilmiştir. Örneğin düşük yoğunluklu lipoproteinlerde, fibrinojen, sitokrom C, myoglobin, RNaz A, transferrin, γ -globulin ve hemoglobin gibi çoğu proteinde N-homosisteinilasyon işleminin agregasyona neden olduğu belirtilmiştir. Tripsin, metionil-tRNA sentetaz, paraoksonaz gibi enzimlerin N-homosisteinilasyon reaksiyonu sonucunda modifikasyon derecesine bağlı olarak aktiviteleri ya azalmış ya da tamamen ortadan kalkmıştır (Perla-Kaján vd., 2007).

Serbest homosistein tiyolaktonun vücuttaki konsantrasyonunun artmasının kalp damar rahatsızlıkları, sinir sistemi bozuklukları gibi bazı hastalıklara neden olduğu ve bu durumun proteinlerin HSTL ile modifikasyonundan kaynaklandığı belirtilmiştir. Yetersizliği bu hastalıklara neden olabilen RNaz-A, lizozim ve karbonik anhidraz enzimlerinin HSTL modifikasyonuna duyarlı olup olmadıklarını belirlemek için yapılan çalışmada, söz konusu enzimler HSTL ile bir gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Bir gecelik inkübasyon RNaz-A ve lizozim enzimlerinde herhangi bir aktivite kaybına yol açmazken, karbonik anhidraz enziminde aktivitenin tamamen yitirilmesine neden olmuştur. Ayrıca inkübasyon süresinin birkaç güne çıkarılmasının RNaz-A ve lizozim enzimlerinde de aktivite kaybına yol açtığı belirlenmiştir (Sharma ve Singh, 2017).

Stroylova vd. (2011) α_{s1} , β ve κ kazeinin HSTL ile modifikasyonun gerçekleştirildiği çalışmada modifikasyon sonrası disülfid bağının yanısıra beta kazein kümelerinin oluştuğu tespit edilmiştir. Oluşan bu kümelerin beta merkaptan etanol ve 8 M guanidine hidroklorit varlığından etkilenmemesinden dolayı disülfid bağından farklı bir bağ ile bağlanma sonucu oluştuğu belirtilmiştir.

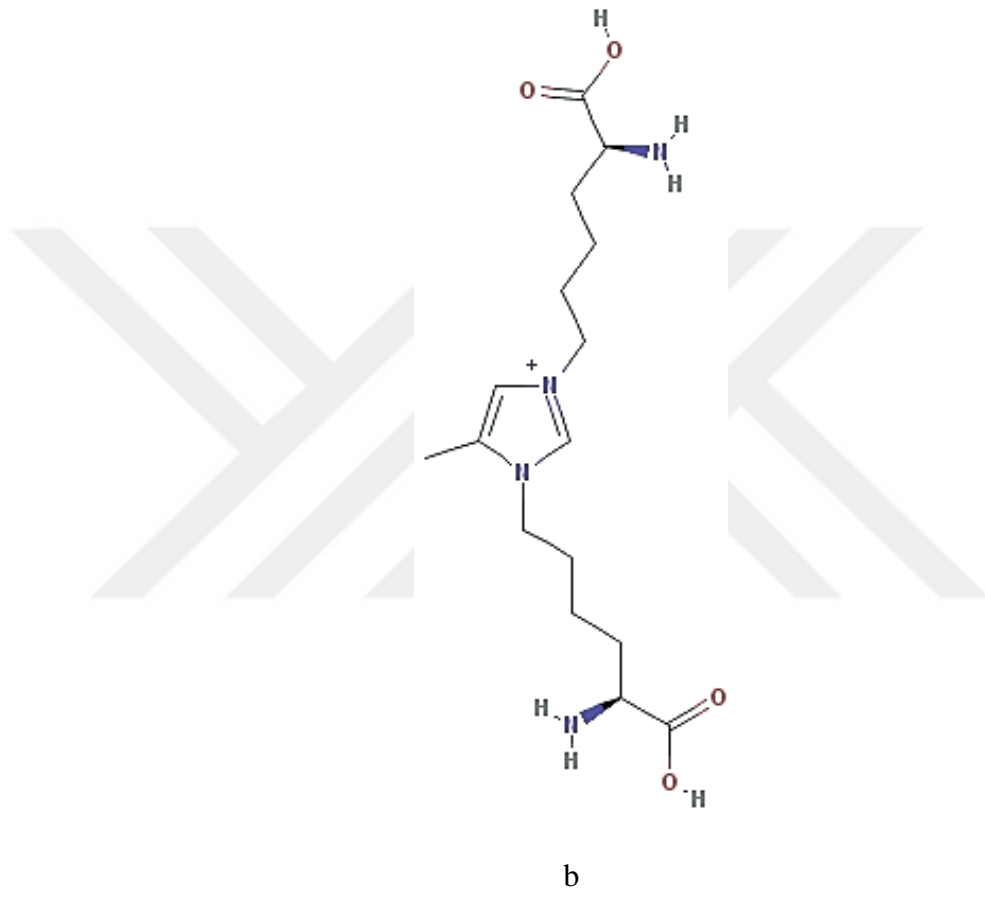
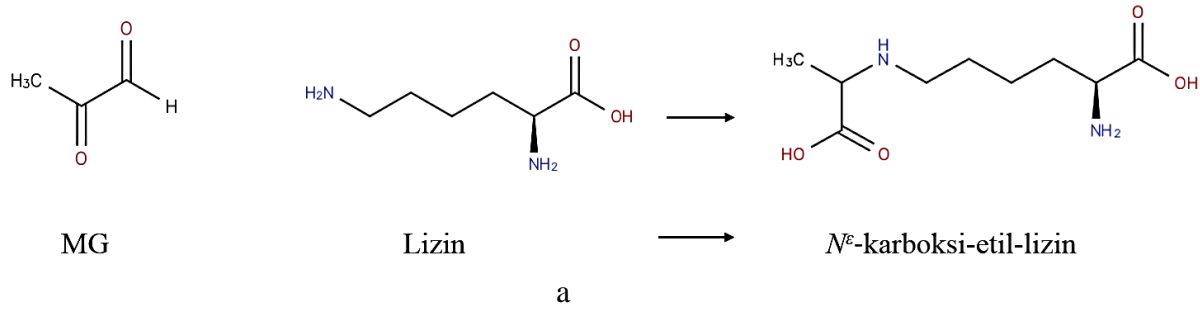
İleri Maillard reaksiyonu ürünlerinin diyabet, katarakt, böbrek hastalıkları, eklem rahatsızlıkları, Alzheimer gibi hastalıkların nedenleri arasında olduğu belirtilmiştir (Westwood ve Thornalley, 1995; Parmaksız, 2011; Yeh vd., 2017). Diyabet hastalarında oksidatif streste artışıyla bağlı olarak şeker veya lipidlerin oksidasyona uğraması, düşük

moleköl ağırlıklı yüksek aktiviteli metilglioksal (MG) gibi dikarbonil bileşiklerinin oluşumuna yol açar. Bu bileşiklerin en önemlilerinden birisi olan MG, glikozdan 20 000 kat daha hızlı bir şekilde Maillard benzeri reaksiyonlara girme eğilimindedir (Pietkiewicz vd., 2011; Banerjee ve Chakraborti, 2013; Banerjee vd., 2016).

MG protein bağlı lizin (arjinine oranla daha düşük reaksiyona girme eğilimine sahiptir) ve arjinin aminoasitlerinin yan gruplarıyla reaksiyona girebilir. Lizin ile reaksiyon sonucunda ya Nε-(1-karboksi etil) lizin şeklinde modifikasyona (Şekil 2.7a) ya da 1,3-di(Nε-lizin)-4-metil-imidazolium (Şekil 2.7b) şeklinde çapraz bağlanmaya yol açar. MG ile reaksiyon sonrasında modifiye proteinin net yükü daha negatif değerlere ulaşır (Banerjee ve Chakraborti, 2013).

Sığır serum albümini, ribonükleaz A, lizozim, glikoliz enzimleri, alyuvar membran proteinleri, mikrotübüler proteinler ve kolajen MG ile modifiye edilmiştir (Lo vd., 1994). Göz lenslerinde bulunan α-kristalin MG ile modifiye edildiğinde yüzey hidrofobitesinin azaldığı tespit edilmiştir (Mukhopadhyay vd., 2010).

Banerjee vd. (2016) tarafından miyoglobinin, MG ile 25°C'de 7-18 gün boyunca modifiye edilmiştir. MG ile modifikasyon sonrası miyoglobinde, hem grubu kaybı, triptofanın floresan şiddeti değişikliği, β-plakalı yapı içeriğinin artışı ve α-heliks içeriğinin azalışı gibi önemli yapısal değişiklikler tespit edilmiştir.



Şekil 2.7. Proteinin metilgliksal (MG) ile modifikasyonu

BÖLÜM III

MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

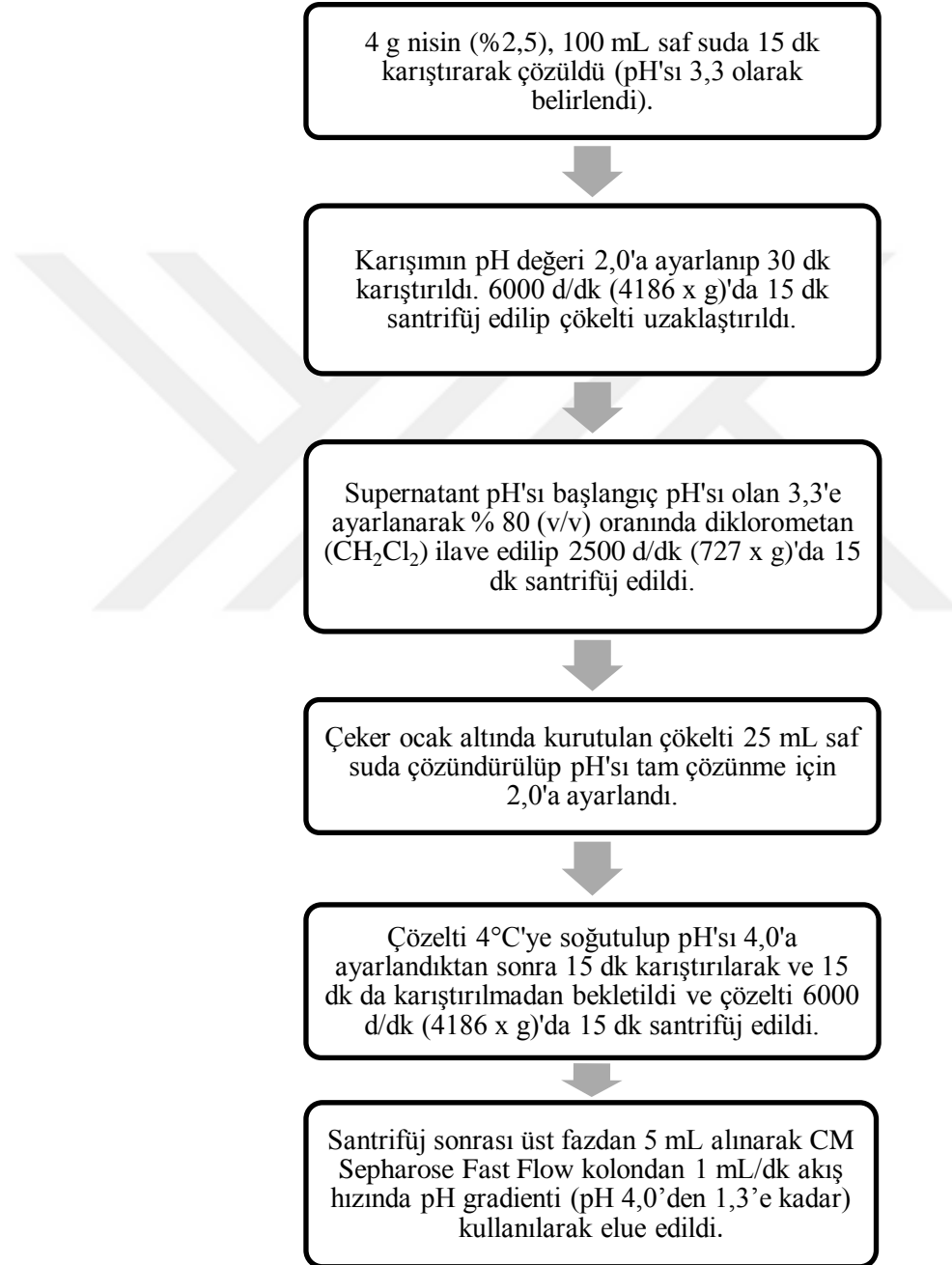
Yüksek saflıkta (%95) nisin Handary SA (Belçika), düşük saflıkta (%2,5) ticari nisin İntermak (Türkiye), CM Sepharose Fast Flow GE Health Care (İngiltere); sodyum karbonat, sodyum hidroksit, bakır sülfat, potasyum hidroksit, Folin-Ciocalteau reaktifi, sığır serum albümini (bovine serum albümin-BSA), gliserol, tetrametiletilediamin (TEMED), Tris(hidroksimetil)aminometan (tris), N-[Tris(hidroksimetil)metil]glisin (Trisin) ve termolisin Merck (Almanya); akrilamid, bisakrilamid, merkapto etanol, hidroklorik asit, asetik asit, amonyum persülfat, amonyum hidroksit, üre, agar, glisin, fenolfitaleyn, Coomassie Brilliant Blue G 250, riboflavin 5 fosfat (R5P), tripsin, 5,5'-dithio-bis-2(nitro benzoik asit) (DTNB) ve 2,4,6-trinitrobenzen sülfonik asit (TNBS, %5) Sigma (Amerika Birleşik Devletleri); sodyum potasyum tartarat Carlo Erba (İtalya); metanol VWR (Amerika Birleşik Devletleri); dithiothreitol Fisher Scientific (Amerika Birleşik Devletleri); brain heart infusion (BHI), de Man Rogosa-Sharpe (MRS) ve nutrient agar (NA) LabM (İngiltere) firmalarından temin edilmiştir. Nisinin modifikasyonunda kullanılan homosistein tiyolaktan (HSTL, hidroklorid formunda, >%99 saflıkta), hidroksilamin (hidroklorid formunda, %97 saflıkta) ve metilglioksal (MG, %40, v/v saflıkta) Across-Organics (Amerika Birleşik Devletleri) ve dietil pirokarbonat (DEPK, %97 saflıkta) AppliChem (Almanya) firmalarından temin edilmiştir.

3.2 Metot

3.2.1 Nisinin saflaştırılması

Slootweg vd. (2013b) tarafından önerilen çöktürme yöntemi ile Bailey ve Hurst (1971) tarafından önerilen kromatografik yöntem birleştirilip kullanılmıştır. Ticari nisin (%2,5) örneği, Şekil 3.1'de verilen işlem basamakları kullanılarak çöktürülmüş ve daha yüksek saflık elde etmek için zayıf katyon değiştirici (CM Sepharose Fast Flow, 22 mm çapında ve 300 mm uzunluğundaki kolona doldurulmuş) kolondan geçirilmiştir. Kolonu dengeye getirmek için içerisinde yaklaşık 100 mL 0,0001 M HCl çözeltisi (pH 4,0) geçirilmiştir. Çöktürme işleminin son aşamasında elde edilen çözeltinin 5 mL'si

(yaklaşık 0,8 g ticari nisine eşdeğer) dengeye getirilmiş kolona yüklenmiştir. Örnek kolondan HCl çözeltileri (0,0001 ve 0,05 M) ile oluşturulan pH gradienti (pH 4,0'den 1,3'e kadar) kullanılarak 1 mL/dk akış hızında elue edilmiştir. 5 mL hacminde fraksiyonlar toplanıp 215 nm'de absorbansları ölçülmüş ve sonra fraksiyonlar 35°C'deki hava akımlı etüvde kurutulmuştur. Kurutulmuş fraksiyonlar analiz edilinceye kadar buzdolabı sıcaklığında (4-6°C) muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.1. Nisinin saflaştırılması

3.2.2 Trisin sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (Trisin SDS-PAGE)

Saflaştırma işlemi sonucunda elde edilen fraksiyonların saflık düzeyleri elektroforez tekniği ile belirlenmiştir. Elektroforez işlemi (Schägger, 2006) tarafından önerilen Trisin SDS-PAGE yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yığıma jeli (stacking gel) %4,125 ve ayırma jeli (separating gel) ise %16,5 akrilamid konsantrasyonunda hazırlanmıştır. Kullanılan çözeltiler ve jel kompozisyonu Çizelge 3.1’de belirtilmiştir. Örnekler yığıma jelinden çıkıncaya kadar 30 V sabit voltaj uygulanmıştır. Örneklerin ayırma jeline girmesiyle birlikte voltaj kademeli olarak 300 V kadar çıkartılarak elektroforez işleminin 9 saat içerisinde tamamlanması sağlanmıştır. Koşurma sonrasında jel fiksasyon çözeltisinde (%50 metanol,%10 asetik asit) 1 saat, boyama çözeltisinde (%10 asetik asit, %0,025 Coomassie Brilliant Blue G 250) 1 gece bekletilmiştir. Boyanan jel, boya giderme çözeltisine (%10 asetik asit) aktarılıp, birkaç kez değiştirilerek boyanın aşırısı uzaklaştırılmıştır. Jelin arka planı yeterince açıldıktan sonra jelin görüntüleme sistemi (Biorad Moleculer Imager, Gel Doc XR+) yardımıyla fotoğrafı çekilmiştir.

Çizelge 3.1. Trisin-SDS-PAGE yönteminde kullanılan çözeltiler ve jel kompozisyonu

Örnek hazırlama çözeltisi	
SDS (g)	1,2
Merkaptoethanol (g)	0,6
Gliserol (g)	3,0
Coomasie Brilliant Blue G250 (mg)	5,0
1M Tris/HCl (pH 7,0) (mL)	1,5
Son Hacim (Su ile tamamlanır) (mL)	10,0

Bileşen	Anot Tamponu (10×)	Katot Tamponu (10×)	Gel Tamponu (3×)
Tris (M)	1,0	1,0	3,0
Trisin (M)	-	1,0	-
HCl (M)	0,225	-	1,0
SDS (% , m/v)	-	1,0	0,3
pH	8,90	8,25	8,45

Bileşen	Yığıma jeli (%4,125)	Ayırma jeli (%16,5)
Akrilamid-Bisakrilamid (%49,5T, m/v) (mL)	1	10
Gel Tamponu (3x) (pH 8,45) (mL)	3	10
Gliserol (g)	-	3
APS (%10, m/v) (µL)	90	100
TEMED (%99, m/v) (µL)	9	10
Son Hacim (Su ile tamamlanır) (mL)	12	30

3.2.3 Asetik asit üre poliakrilamid jel elektroforezi (AAÜ-PAGE)

Modifikasyon işlemi sonrası nisin molekülünün taşıdığı yükte oluşan değişikliği belirlemek için AAÜ-PAGE tekniği kullanılmıştır. Bu amaçla, Waterborg (2009) tarafından belirtilen yöntem %4,5 yığıma ve %22,5 ayırma jeli konsantrasyonlarında uygulanmıştır. Jel hazırlamada kullanılan çözeltiler ve oranları Çizelge 3.2’de sunulmuştur. Bu yöntemde jelleşmeyi başlatmak için riboflavin 5 fosfat (R5P) ve ışık enerjisi kullanıldığından tarafımızca toplam 3 750 lümen ışık veren 3 adet (3 x 1 250 lümen) spiral floresan lamba (Lights On, Çin) içeren özel bir düzenek hazırlanmıştır (Fotograf 3.1).

Çizelge 3.2. AAÜ-PAGE yöntemine ait jel kompozisyonu

Kullanılan çözeltiler	Yığıma jeli	Ayırma jeli
Akrilamid (% 60, m/v)	0,900 mL	11,25 mL
Bisakrilamid (%2,5 m/v)	0,768 mL	1,68 mL
Asetik asit (17,5 M)	0,684 mL	1,80 mL
Amonyum hidroksit (%25-30, m/m)	0,042 mL	0,10 mL
Üre (8 M)	14,400 g	5,76 g
Saf su	28,000 mL	11,20 mL
	Hava alınması	Hava alınması
Riboflavin 5 fosfat (%0,006, m/v)	0,780 mL	2,00 mL
TEMED (%99, m/v)	0,060 mL	0,15 mL
Toplam	12,000 mL	30,00 mL
Floresan ışık altında jelleşme (3 750 lümen)	2 saat	1 saat



Fotoğraf 3.1. AAÜ-PAGE yönteminde jelleşmeyi başlatmak için kullanılan aydınlatma düzeneği

Örnekler 5 µg/µL olacak şekilde örnek hazırlama çözeltilerinde çözündürülmüştür. Örnek hazırlama çözeltileri 90 mL 8 M üre, 5 mL %1'lik fenolftalein çözeltileri (%95 v/v'lik etanolde hazırlanmış) ve 5 mL amonyum hidroksit (%25-30, m/m) karıştırılarak hazırlanmıştır. Bu şekilde hazırlanan örnekten 50 µL alınmış ve üzerine 4 µL örnek hazırlama çözeltileri kullanılarak hazırlanmış %10 (m/v)'luk dithiothreitol (DTT) çözeltileri ilave edilip 5 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra 2,9 µL asetik asit ve %2 (m/v)'lik 2 µL metilen mavisi ilave edilerek hazırlanan örneklerin 10 µL'si jelle yüklenmiştir. Elektroforez işlemi 175 voltta 18 saat süreyle gerçekleştirilmiştir. Elektroforez tamponu 1 M asetik asit ve 0,1 M glisin içerecek şekilde hazırlanmıştır. Jellerin boyanması %0,1 Coomassie Brilliant Blue G 250, %20 metanol ve %7 asetik asit

içeren çözeltide 1 saat bekletilerek gerçekleştirilmiştir. Boyanın aşırısını gidermek amacıyla %20 metanol ve %7 asetik asit içeren karışım 30 dk aralıklarla 3 kez değiştirilerek kullanılmıştır.

3.2.4 Nisinin kimyasal modifikasyonu

3.2.4.1 Nisinin dietil pirokarbonat ile modifikasyonu

Nisinin DEPK ile optimum modifikasyon koşulları, Hnizda vd. (2008) tarafından belirtilen yöntem referans alınarak belirlenmiştir. Optimum modifikasyon koşullarını belirlemek için pH değerinin 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0 ve 9,0; metil alkolde hazırlanan DEPK konsantrasyonunun (mM) 40, 120, 180, 360, 540, 720, 900 ve 1000; sıcaklığın (°C) 25, 30, 35 ve 40; sürenin (dakika) 30, 60, 90 ve 120; çalkalama hızının (d/dk) 150 ve 245 seviyeleri incelenmiştir. Tüm parametrelerin incelenmesi aşamasında kullanılan nisin çözeltisi 1 mg/mL konsantrasyonda 4 M üre içeren 0,05 M potasyum fosfat tamponu ile hazırlanmıştır. Modifikasyon reaksiyonu tamamlandıktan sonra modifiye edilmiş nisin 4°C'de, %20 (m/v) trikloroasetik asit (TCA) varlığında 30 dk süreyle çöktürülmüş ve 4°C sıcaklıkta 4100 d/dk (1955 x g)'de 40 dk süreyle santrifüj edilmiştir. Çökelti günlük olarak hazırlanan 3 mL 1 M hidroksilamin çözeltisi (pH 6,8 olacak şekilde KOH çözeltisi ile ayarlandı) içerisinde oda sıcaklığında 1 saat bekletilmiştir. Böylece tersinir olan histidin aminoasidinin modifikasyonu geri alınmış ve sadece lizin aminoasidinin modifiye halde kalması sağlanmıştır. Hidroksilamin ile muamele edilmiş örnekler 4°C'de, %20 TCA varlığında 30 dk süreyle çöktürülmüş ve sonra 4°C'de 4100 d/dk (1955 x g)'de 40 dk süreyle santrifüj edilmiştir. Modifikasyondan sonra çökelti halindeki nisin örnekleri modifikasyon derecesinin belirlenmesi için kullanılmıştır.

3.2.4.2 Nisinin homosistein tiyolaktan ile modifikasyonu

Nisinin HSTL ile optimum modifikasyon koşulları, Jalili vd. (2011) tarafından belirtilen yöntem referans alınarak belirlenmiştir. HSTL ile optimum modifikasyon koşullarını belirlemek için pH değerinin 3,0, 4,0, 4,5, 5,0, 6,0 ve 8,0; HSTL konsantrasyonunun (mM) 1, 10, 100, 150 ve 200; sıcaklığın (°C) 45, 60 ve 80, sürenin (saat) 2, 4, 6, 18, 24

ve 48; çalkalama hızının (d/dk) 150 ve 245 seviyeleri incelenmiştir. Tüm parametrelerin incelenmesi aşamasında kullanılan nisin çözeltisi (6 mg/mL) 4 M üre içeren 0,1 M sodyum fosfat tamponu ile hazırlanmıştır. Modifikasyon reaksiyonu tamamlandıktan sonra modifiye edilmiş nisin 4°C'de, %20 TCA varlığında 30 dk süreyle çöktürülmüş ve sonra 4°C'de 4100 d/dk (1955 x g)'da 40 dk süreyle santrifüj edilmiştir. Çökelti halindeki nisin örnekleri modifikasyon derecesinin belirlenmesi için kullanılmıştır.

3.2.4.3 Nisinin metilglioksal ile modifikasyonu

Nisinin MG ile optimum modifikasyon koşulları, Banerjee ve Chakraborti (2013) tarafından belirtilen yöntem referans alınarak belirlenmiştir. Optimum modifikasyon koşullarını belirlemek için pH değerinin 3,0, 3,5, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0 ve 9,0; MG konsantrasyonunun (mM) 50, 75, 100, 125, 150 ve 200 mM; sıcaklığın (°C) 30, 45 ve 60; sürenin (saat) 1, 2, 4, 6, 8, 12, 18, 24 ve 36; çalkalama hızının (d/dk) 150 ve 245 seviyeleri incelenmiştir. Tüm parametrelerin incelenmesi aşamasında kullanılan nisin çözeltisi (1 mg/mL) 4 M üre içeren 0,1 M sitrik asit-sodyum fosfat tamponu ile hazırlanmıştır. Modifikasyon reaksiyonu tamamlandıktan sonra modifiye edilmiş nisin 4°C'de, %20 TCA varlığında 30 dk süreyle çöktürülmüş ve sonra 4°C'de 4100 d/dk (1955 x g)'da 40 dk süreyle santrifüj edilmiştir. Çökelti halindeki nisin örnekleri modifikasyon derecesinin belirlenmesi için kullanılmıştır.

3.2.5 Modifiye edilmiş örneklerin hazırlanması

Nisinin DEPK, HSTL ve MG ile modifikasyonu için optimum koşullar yukarıda açıklanan şekilde belirlenmiştir. Belirlenen optimum koşullarda modifiye edilen nisin örnekleri trikloroasetik asit (TCA) ile çöktürülmüş, (-)80°C'lik dondurucuda (Esco, ABD) 12 saat dondurulmuş ve daha sonra donuk kurutucuda (Cool Safe, Danimarka) kurutulmuştur.

3.2.6 Homosistein tiyolaktan ile modifikasyonun derecesinin belirlenmesi

Homosistein tiyolaktan ile modifikasyonun derecesinin belirlenmesi Ellman tarafından geliştirilen 5,5'-dithio-bis-2(nitro benzoik asit) (DTNB) yöntemi kullanarak gerçekleştirilmiştir (Ellman, 1959). DTNB suda çözünebilen serbest sülfidril gruplarının

belirlenmesinde kullanılan bir yöntemdir. Sülfidril gruplarıyla reaksiyon sonucu oluşan sarı renkli bileşiğin 412 nm’de absorbanısı ölçülmüştür. Analiz için modifiye edilmiş ve edilmemiş nisin örnekleri 6 mg/mL konsantrasyonda, 8 M üre ve 2 mM β -merkaptanetanol içeren çözeltide 37°C’de 1 saat süreyle inkübe edilmiştir. Sonra 4°C’de, %20 TCA varlığında 30 dk süreyle çöktürülmüş ve 4°C sıcaklıkta 4100 d/dk (1955 x g)’da 40 dk süreyle santrifüj edilmiştir. Çökeltiyeye nisin konsantrasyonu 3 mg/mL olacak şekilde reaksiyon tamponu (1 mM EDTA içeren 0,1 M sodyum fosfat tamponu, pH 8,0) ilave edilmiştir. Sonra her 1 mL örneğe 2,3 mL reaksiyon tamponu ve reaksiyon tamponunda hazırlanmış 15 μ L DTNB (4 mg/mL) ilave edilmiştir. Karışım 15 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra her örnek kontrole karşı 412 nm’de okunmuştur. Modifikasyonla oluşturulmuş sistein (serbest-SH) konsantrasyonu aşağıdaki formülle hesaplanmıştır.

$$c = A / (b \cdot 14290)$$

(3.1)

c: Modifikasyonla oluşturulmuş sistein konsantrasyonu (M)

A: Modifiye edilen örneğin absorban değeri - modifiye edilmeyen (modikasyon kimyasalı içermeyen) örneğin absorban değeri

b: Işık yolu (1 cm)

14290: 8 M üre içinde hazırlanan Elman reaktifinin 412 nm’deki molar absorpsivite katsayısı ($M^{-1}cm^{-1}$)

$$g = (c \cdot V \cdot MA_{\text{sistein}}) / 1000$$

(3.2)

g: Modifikasyonla oluşturulmuş sistein miktarı (g)

c: Konsantrasyon (M)

V: reaksiyonun gerçekleştiği toplam hacim (3,315 mL)

MA_{sistein} : Sisteinin molekül ağırlığı (121,16 g)

1000: litre-mililitre dönüşüm katsayısı

$$\% MD = (100 \cdot (g/m)) / 0,1038$$

(3.3)

MD: Modifikasyon derecesi (%)

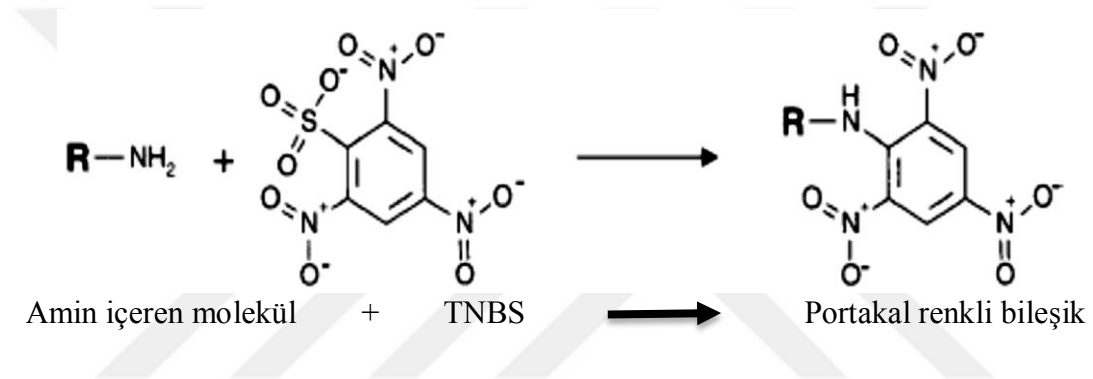
g: Modifikasyonla oluşturulmuş sistein miktarı (g)

m: Reaksiyon ortamındaki nisin miktarı (g)

0,1038: 1 g nisinde modifikasyonla oluşturulabilecek toplam sistein miktarı (g)

3.2.7 Dietil pirokarbonat ve metilglioksal ile modifikasyon derecesinin belirlenmesi

Dietil pirokarbonat ve metilglioksal ile modifikasyonun derecesinin belirlenmesinde 2,4,6-trinitrobenzen sülfonik asit (TNBS) metodu kullanılmıştır (Hermanson, 2013). TNBS metodunda renk değişimi ile aminoasitlerin, peptitlerin ve protein modifikasyonlarının belirlenmesi sağlanabilir (Şekil 3.2). TNBS lizin aminoasidinin yan grupları ile aşağıda gösterilen şekilde reaksiyona girerek renkli bileşik oluşturur (Fields, 1972).



Şekil 3.2. Trinitrobenzen sülfonik asit (TNBS) reaksiyonu

Modifiye edilmiş ve edilmemiş nisin örnekleri 200 µg/mL konsantrasyonda 0,1 M sodyum bikarbonat tamponunda (pH 8,5) hazırlanmıştır. Sodyum bikarbonat tamponunda (0,1 M, pH 8,5) % 0,01 (m/v) konsantrasyonda hazırlanan TNBS reaktifinden her 1 mL nisin çözeltisine 0,5 mL ilave edilmiş ve 37°C’de 2 saat bekletilmiştir. Daha sonra üzerine 0,5 mL SDS (%10, m/v) ve 0,25 mL 1 N HCl ilave edilmiştir. Örneklerin absorbans değerleri şahide karşı 335 nm’de okunmuş ve modifikasyon düzeyi aşağıdaki formül yardımıyla hesaplanmıştır.

$$\% \text{ MD} = (\text{KA} - \text{MA}) \times 100 / \text{KA}$$

(3.4)

MD: Modifikasyon derecesi (%)

KA: Kontrol örneğine ait absorbans değeri

MA: Modifiye edilen örneğe ait absorbans değeri (modifiye edilememiş gruplardan ileri gelen absorbans değeri)

3.2.8 Protein analizi

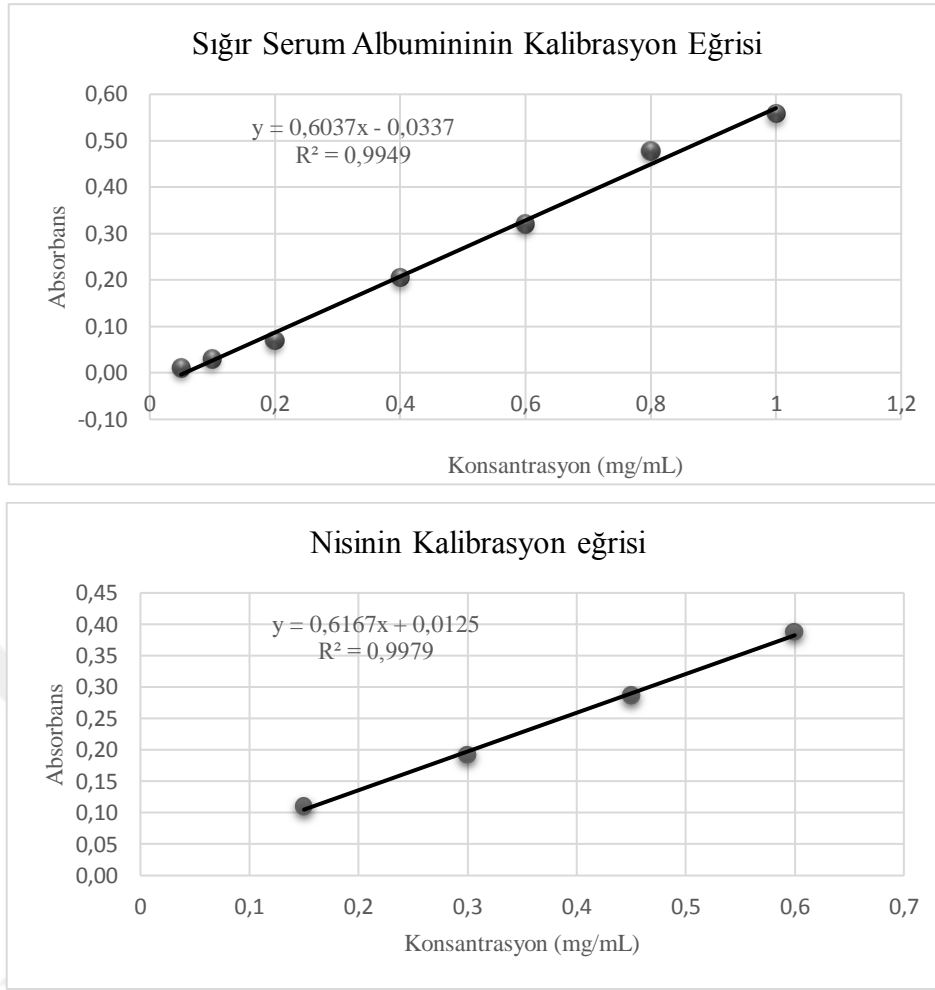
Çalışmada örneklerin protein içeriklerinin belirlenmesinde Lowry yöntemi kullanılmıştır (Waterborg, 2009). Yöntem uygulanırken reaksiyonun pH 9,3 değerinde gerçekleşmesi sağlanmıştır. Analizde aşağıda belirtilen çözeltiler kullanılmıştır.

A çözeltisi: 0,1 N NaOH ve %2 (m/v)'lik sodyum karbonat çözeltileri eşit hacimlerde karıştırılarak hazırlanmıştır.

B çözeltisi: %1,56 (m/v)'lik bakır sülfat ve %2,37 (m/v)'lik sodyum potasyum tartarat eşit hacimlerde karıştırılarak hazırlanmıştır.

C çözeltisi (alkali bakır çözeltisi): 100 mL A çözeltisi ile 2 mL B çözeltisi karıştırılarak hazırlanmıştır.

Donuk kurutulmuş örneklerin 0,4-0,7 mg/mL konsantrasyona sahip çözeltileri hazırlanmıştır. Bu çözeltilerden 0,2 mL'lik hacimler deney tüplerine aktarılıp üzerine 2 mL yukarıdaki gibi hazırlanan alkali bakır sülfat çözeltisi (C çözeltisi) ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında 10 dk bekletilen karışım üzerine 0,2 mL 1 N Folin-Ciocalteu reaktifi eklenip 30 dk bekletildikten sonra 660 nm dalga boyuna ayarlanmış spektrofotometrede (Evolution 300 UV-Vis spektrofotometre, Thermo Fisher, Amerika Birleşik Devletleri) absorbans değerleri okunmuştur. 0,15-0,60 mg/mL konsantrasyon aralığındaki nisin (%95 saflıkta) ve 0,05-1,00 mg/mL konsantrasyon aralığındaki sığır serum albumini (Bovine Serum Albumini, BSA, >%98) çözeltileri kullanılarak kalibrasyon eğrileri hazırlanmıştır. Örneklerdeki protein konsantrasyonunun belirlenmesinde daha doğru sonuç alınacağı varsayımıyla nisin kullanılarak çizilen kalibrasyon eğrisi kullanılmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Sığır serum albumini ve nisin standartlarına ait kalibrasyon eğrileri

3.2.9 Antibakteriyel aktivitedeki değişimin belirlenmesi

Kimyasal modifikasyonlar sonrasında nisinin antibakteriyel özelliklerindeki değişimin belirlenmesinde bölümümüzün kültür koleksiyonunda bulunan *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* AÜ (Ankara Üniversitesi), *Enterococcus faecium* ATCC 9097, *Listeria monocytogenes* NCTC 5348 ve *Escherichia coli* RSKK kullanılmıştır. Uygulanması daha kolay olduğu için öncelikle spot-on-lawn yöntemiyle kimyasal modifikasyonların bahsedilen bakterilere karşı nisinin antibakteriyel özelliklerinde değişim oluşturup oluşturmadığı incelenmiş ve daha sonra değişim oluşturan modifikasyon yöntemi ile modifiye edilen nisinin minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) belirlenmiştir.

Spot-on-lawn yöntemi uygulanmadan önce *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* ve *Enterococcus faecium* MRS broth, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes* ve *Escherichia coli* BHI broth besiyerinde iki kez aktifleştirilmiştir (Mayr-Harting vd., 1972). Aktifleştirilen yedişer μL *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* ve *Enterococcus faecium* MRS yumuşak agara, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes* ve *Escherichia coli* BHI yumuşak agara ilave edilip Nutrient agar üzerine dökülmüş ve 30 dk katılaşması için bekletilmiştir. Daha sonra bunların üzerine modifiye edici kimyasal olmaksızın modifikasyon aşamalarından geçirilen nisin (kontrol, modifiye edilmemiş nisin), modifiye edilmiş nisin ve saf nisin örnekleri eşit konsantrasyonlarda hazırlanarak onar μL ilave edilmiş ve 35°C 'de 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası oluşan inhibisyon bölgelerinin büyüklüğü ile antibakteriyel aktivite düzeyleri değerlendirilmiştir.

Minimum inhibisyon konsantrasyonunun belirlenmesi için hedef bakteriler yukarıda açıklanan besiyerlerinde aktifleştirilmiştir. Hücre konsantrasyonun istenen değerde olması için bakteri hücrelerinden ekim yapılmış ve spektrofotometre ile hücre yoğunluğu ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Yapılan tüm MİK hesaplamalarında bu yöntem uygulanmıştır. MİK'in belirlenmesi için modifiye nisinin %0,2 BSA ve %0,01 asetik asit içeren çözeltide $100 \mu\text{M}$ 'lık stok çözeltisi hazırlanmıştır. Aynı çözelti, stok nisin çözeltisinin 3 katlık seyreltmeleri için de kullanılmıştır. MRS ve BHI besiyerlerinde son konsantrasyonu 10^7 kob/mL olacak şekilde hazırlanan bakterilerden $500 \mu\text{L}$ alınıp üzerine $500 \mu\text{L}$ farklı konsantrasyonlardaki (50,00 16,70, 5,56, 1,85, 0,62, 0,21, 0,07 ve $0 \mu\text{M}$) nisin çözeltisinden ilave edilmiştir. Negatif kontrol olarak bakteri ilave edilmemiş besiyeri kullanılmıştır. Çalkalamalı inkübatörde 120 d/dk hızda, 35°C 'de 24 saat inkübasyon işleminden sonra 630 nm 'de optik yoğunluk ölçülmüştür. Bakteri gelişimini engelleyen en düşük konsantrasyon (μM) MİK olarak hesaplanmıştır (Slootweg vd., 2013a).

3.2.10 Modifikasyon bölgelerinin belirlenmesi

3.2.10.1 LC-MS-MS analizi

Proje önerisinde, modifiye edilen nisin örneklerinin modifikasyona uğrayan bölgelerinin matris destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyon kütle spektrometresi (MALDI-TOF) ile tespit edileceği belirtilmişti. Ancak MALDI-TOF yönteminden daha ayrıntılı sonuç alınacağı gerekçesiyle sıvı kromatografisi - kütle - kütle spektrometresi (LC-MS-MS) yöntemi kullanılmıştır. Elektroforez jeli üzerindeki örnekler, Erciyes Üniversitesi Genom ve Kök Hücre (GENKÖK) Merkezinde bulunan LC-MS-MS (TripleTOF® 5600+ sistemi, AB SCIEX, Amerika Birleşik Devletleri) cihazı ile analiz edilmiştir. LC-MS-MS ile elde edilen kütle spektrumları Analyst TF v.1.6 (AB SCIEX, Amerika Birleşik Devletleri) programı yardımıyla kaydedilip ProteinPilot ve SwisProt veri tabanlarında tanımlanmaya çalışılmıştır (Alessio vd., 2017).

3.2.10.2 Enzimatik hidrolizasyon - Trisin SDS-PAGE analizi

Modifikasyon bölgelerini belirlemek için enzimatik hidroliz sonrası elektroforez yöntemi de kullanılmıştır. Modifikasyonda kullanılan yöntemler temel olarak lizin aminoasidinin yan grubunu hedef aldığı için kullanılacak enzimlerin seçimi de bu bilgi doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla tripsin ve termolisin enzimleri kullanılmış, hidroliz sonrası karışımdaki peptitlerin boyutları ise Trisin SDS-PAGE yöntemiyle (Bölüm 3.2.2) belirlenmiştir. Örnekler tripsin ve termolisin enzimleri ile (enzim substrat oranı 1:5) 5 mM CaCl₂ içeren 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) tamponunda 3 saat süreyle hidrolizasyona uğratılmıştır (Chan vd., 1996; Mu vd., 2015).

3.2.11 İstatistiksel analiz

Çalışma 2 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçların ortalamaları standart sapmaları ile birlikte verilmiştir. Verilerin istatistiksel değerlendirilmesi ve karşılaştırılması SPSS programında (IBM SPSS Statistics 22.0, Amerika Birleşik Devletleri) tek yönlü ANOVA analizi kullanılarak yapılmıştır ($p \leq 0,05$). Ortalamalar arasındaki farklılık ise Duncan testi kullanılarak ($p \leq 0,05$) belirlenmiştir.



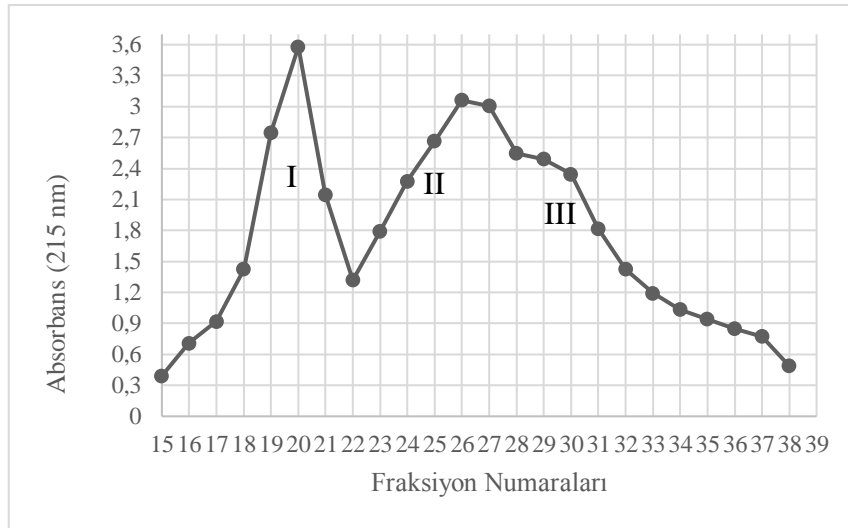
BÖLÜM IV

BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Nisinin Saflaştırılmasına İlişkin Sonuçlar

İki fazlı (bifazik) çöktürme ve kromatografik yöntem birlikte uygulanarak ticari nisin (%2,5) saflaştırılmıştır. Saflaştırmanın ikinci aşamasında uygulanan CM Sepharose kolonu ile elde edilen kromatogram Şekil 4.1’de sunulmuştur.

Kromatogramda 3 pik tespit edilmiş ve bunlara karşılık gelen fraksiyonlar toplanıp (1. pik için 18-21. fraksiyonlar, toplam 20 mL; 2. pik için 23-27. fraksiyonlar, toplam 25 mL ve 3. pik için 28-32. fraksiyonlar, toplam 25 mL) hava akımlı etüvde 35°C’de kurutulmuştur. Kurutulmuş fraksiyonlar Trisin-SDS-PAGE (Şekil 4.2) ile analiz edildiğinde birinci pikin nisine ait olduğu görülmüştür (hat 5). CM Sepharose kolonu ile gerçekleştirilen kromatografi işlemi sonucunda istenilen saflıkta nisin üretimi mümkün olmuş; hatta yüksek saflıktaki (%95) ticari nisinden (hat 4) bile daha iyi bir saflık düzeyi elde edilmiştir. Ancak bu yöntemle 0,8 g düşük saflıktaki (%2,5) ticari nisin kullanılarak yaklaşık %50 verimle sadece 10 mg yüksek saflıkta nisin elde edilebilmiştir.



Şekil 4.1. Nisinin CM Sepharose kromatogramı

Nisinin saflaştırılmasında etanol ve metanol gibi organik çözücüler kullanımı (Taylor vd., 2007), amonyum sülfat çöktürmesi ve pH 2’de asit ile çöktürme gibi işlemler (Yang

vd., 1992) kullanılmaktadır (de Arauz vd., 2009). Çöktürme işlem basamaklarından sonra izoelektik odaklama ya da katyon değiştirmeyi de kapsayan çoklu kromatografik ayırma, jel filtrasyon, hidrofobik interaksiyon ve ters faz sıvı kromatografisi teknikleri yüksek saflıkta bakteriyosin elde edebilmek için gereklidir. Parada vd. (2007), çok fazla işlem basamağı içeren bu saflaştırma tekniklerinde verimin genelde çok düşük olduğunu belirtmişlerdir. Sözü edilen bu yöntemlerin uygulanması sonucunda verimin %3-10 arasında değiştiği tespit edilmiştir (Prioult vd., 2000).

Slootweg ve arkadaşları (2013b) diklorometan ve selit muamelesi ile ticari nisinin (%2,5) saflık oranını %34 düzeyine çıkarmışlardır.

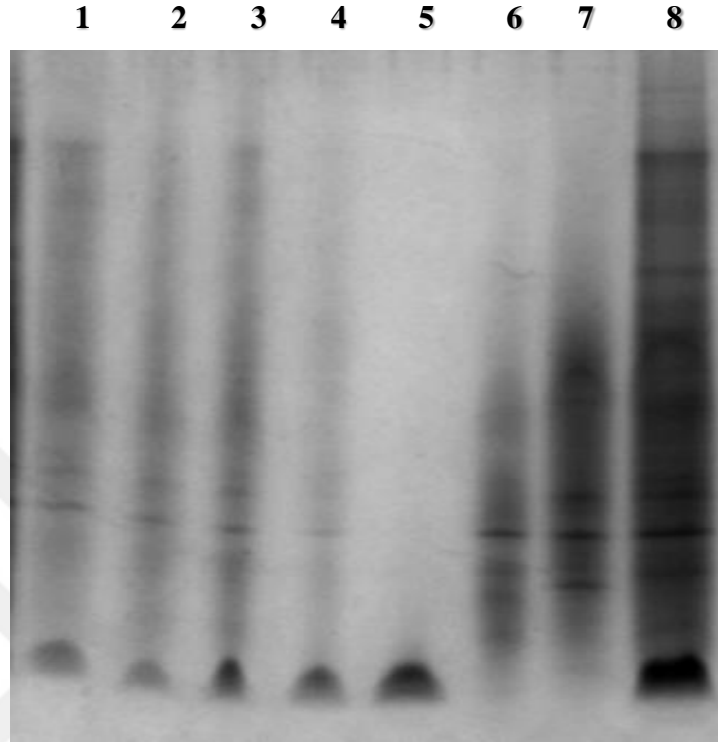
Suarez vd. (1997) tarafından yapılan çalışmada, immunoafinite kromatografisi temeline dayanan tek basamaklı saflaştırma tekniği ile besiyeri ortamında bulunan nisinin %72,7'si geri kazanılmış ve saflık düzeyinde ise 10,3 katlık artış sağlanmıştır. Tek basamaklı bu yöntemle geleneksel yöntemlere göre hızlı, tekrarlanabilir ve yüksek miktarda nisin elde edilebildiği belirtilmiştir.

Ticari nisin (%2,5) etil alkol ve metil alkol kullanılarak saflaştırılmıştır. Etil alkol kullanıldığında, en yüksek saflık düzeyi 5,5 kat ile %70 etil alkol konsantrasyonunda elde edilmiştir. Bu koşullardaki verim düzeyi ise %84,7 olarak saptanmıştır. Metil alkol kullanılması durumunda ise en yüksek saflık düzeyi 5,3 kat ile %90 metil alkol konsantrasyonunda elde edilmiş ve verim ise %91 düzeyinde gerçekleşmiştir (Xiao vd., 2010).

Cheigh vd. (2004), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 tarafından üretilen nisin Z'nin saflaştırılmasında tek basamakta gerçekleştirilen iyon değiştirici kromatografiyi (expanded bed) kullanmışlardır. Çalışma sonucunda %90'lık verim ve saflıkta 31 katlık artış sağlanmıştır.

Tez çalışmasında planlanılan modifikasyonların gerçekleştirilmesi için fazla miktarda saf nisine ihtiyaç duyulmuştur. İhtiyaç duyulan miktarda saf nisin elde edebilmek için yukarıda belirtilen saflaştırma basamaklarının defalarca tekrarlanması gerekmiştir. Bu şekildeki bir uygulamanın kimyasal madde, zaman ve emek kaybına yol açacağı

gerekçesiyle çalışmamıza ticari kaynaktan temin edilen yüksek saflıktaki (%95) nisin (Handary SA, Belçika) ile devam edilmiştir.



Şekil 4.2. Saflaştırma işlemlerine ait Tris-Glycine SDS-PAGE elektroforetogramı.1: Diklorometan uygulaması sonrası nisin, 2: pH 4,0'a ayarlanıp trikloroasetik asit (TCA) ile çöktürülen nisin, 3: pH:4,0'a ayarlanıp direkt kurutulan nisin, 4: Yüksek saflıkta ticari nisin (%95), 5: CM Sepharose kromotografisinde elde edilen 1. pik, 6: CM Sepharose kromotografisinde elde edilen 2. pik, 7: CM Sepharose kromotografisinde elde edilen 3. pik, 8: Ticari nisin (%2,5)

4.2 Nisinin Kimyasal Modifikasyonu

Nisinin MG, DEPK ve HSTL ile modifikasyonu için optimum koşulların (pH, sıcaklık, modifikasyonda kullanılan kimyasal bileşiğin konsantrasyonu, reaksiyon süresi ve çalkalama hızı) belirlenmesinde iş yükünün çok artacağı gerekçesiyle antibakteriyel aktivitedeki değişim dikkate alınmaksızın öncelikle en yüksek modifikasyon düzeyinin elde edilmesi hedeflenmiştir. En yüksek modifikasyon koşullarının belirlenmesinden sonra antibakteriyel aktivitedeki değişim incelenmiştir.

4.2.1 Nisinin MG ile modifikasyonu

Nisinin metilglioksal ile modifikasyonu sonucunda serbest amino grupları sayısında azalma gerçekleştiğinden bu grupların sayısının belirlenmesi modifikasyon düzeyinin takibi için gösterge olmaktadır. Bu amaçla, TNBS reaksiyonu kullanılmıştır. MG ile optimum modifikasyon koşullarının belirlenmesinde tüm denemeler, 4 M üre içeren 100 mM sitrik asit-sodyum fosfat tamponu içerisinde 1 mg/mL konsantrasyonda hazırlanan nisin çözeltisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ancak pH denemelerindeki yüksek pH değerleri (7, 8 ve 9) için sitrik asit-sodyum fosfat tamponu yerine potasyum fosfat tamponu kullanılmıştır. Optimum pH, sıcaklık, MG konsantrasyonu, reaksiyon süresi ve çalkalama hızı faktörlerinin düzeylerini belirleyebilmek için her seferinde bir faktörün literatür bilgilerinden yararlanılarak tespit edilen farklı seviyelerinin incelendiği bir dizi deney gerçekleştirilmiştir.

Optimum pH'nın belirlenmesi için sıcaklık 45°C, MG konsantrasyonu 100 mM, reaksiyon süresi 24 saat ve çalkalama hızı 150 d/dk değerinde sabit tutulmuş ve 3,0, 3,5, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0 ve 9,0 pH değerleri incelenmiştir. Analiz sonucunda belirlenen modifikasyon düzeyleri Çizelge 4.1'de sunulmuştur. Çizelgeden de görülebileceği gibi en yüksek modifikasyon derecesi %70,61 olarak pH 3,5 değerinde saptanmıştır.

Çizelge 4.1. Farklı pH değerlerinde saptanan modifikasyon oranları (%)

pH değeri	Modifikasyon oranı (%) [*]
3,0	25,50±0,321
3,5	70,61±0,342
4,0	62,99±0,288
5,0	69,39±0,684
6,0	61,28±0,369
7,0	60,25±0,480
8,0	42,63±0,409
9,0	43,39±0,312

^{*}Ortalama ± standart sapma

Optimum MG konsantrasyonunun belirlenebilmesi için pH 3,5, sıcaklık 45°C, reaksiyon süresi 24 saat ve çalkalama hızı 150 d/dk değerinde sabit tutulmuş ve 50, 75, 100, 125, 150 ve 200 mM MG konsantrasyonları incelenmiştir. Bu şartlarda en iyi

sonuç %70,51 modifikasyon düzeyi ile 100 mM MG konsantrasyonunda elde edilmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Farklı MG konsantrasyonlarında (mM) saptanan modifikasyon oranları (%)

MG konsantrasyonları (mM)	Modifikasyon oranı (%)*
50	65,84±0,494
75	67,15±0,681
100	70,51±0,400
125	67,74±0,260
150	65,84±0,494
200	65,54±0,498

* Ortalama ± standart sapma
MG: Metilglioksal

Optimum modifikasyon süresinin belirlenebilmesi için pH 3,5, sıcaklık 45°C, MG konsantrasyonu 100 mM ve çalkalama hızı 150 d/dk değerinde sabit tutulmuş ve 1, 2, 4, 6, 8, 12, 18, 24 ve 36 saat reaksiyon süreleri denenmiştir. Sonuçta en yüksek modifikasyon düzeyi %70,28 ile 24 saatlik reaksiyon süresinde elde edilmiştir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Farklı reaksiyon süresinde saptanan modifikasyon oranları (%)

Reaksiyon süresi (saat)	Modifikasyon oranı (%)*
1	39,46±0,540
2	39,53±0,551
4	43,39±0,506
6	55,24±0,099
8	59,69±0,043
12	64,35±0,925
18	68,67±0,518
24	70,28±0,071
36	69,40±0,436

* Ortalama ± standart sapma

Optimum çalkalama hızının belirlenmesi için pH 3,5, sıcaklık 45°C, MG konsantrasyonu 100 mM ve reaksiyon süresi 24 saat değerinde sabit tutulmuş ve 150 ve 245 d/dk çalkalama hızları incelenmiştir. En iyi sonuç %70,51 modifikasyon düzeyi ile 150 d/dk'da elde edilmiştir (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. Farklı çalkalama hızlarında (d/dk) saptanan modifikasyon oranları (%)

Çalkalama hızı (d/dk)	150	245
Modifikasyon oranı (%)	70,51±0,400	55,41±0,286

Optimum sıcaklığın belirlenmesi için pH 3,5, MG konsantrasyonu 100 mM, 150 d/dk çalkalama hızı ve reaksiyon süresi 24 saat değerinde sabit tutulmuş ve 30, 45 ve 60°C reaksiyon sıcaklıkları denenmiştir. En iyi sonuç %70,51 modifikasyon düzeyi ile 45°C’de elde edilmiştir (Çizelge 4.5).

RNaz enzimi (20 mg/mL) MG (30 mM) ile fosfat tamponunda (0,2 M, pH 7,4) 37°C’de 96 saat süreyle reaksiyona bırakıldığında modifikasyon oranının %40 düzeyinde gerçekleştiği saptanmıştır (Ahmed vd., 1997).

Çizelge 4.5. Farklı sıcaklıklarda (°C) saptanan modifikasyon oranları

Sıcaklık (°C)	30	45	60
Modifikasyon oranı (%)	51,5±0,072	70,51±0,400	34,5±0,051

Bu verilerden MG ile en yüksek modifikasyon düzeyinin %70,51 olduğu ve bunun Çizelge 4.6’da belirtilen koşullarda elde edildiği anlaşılmaktadır.

Çizelge 4.6. Nisinin MG ile optimum modifikasyon koşulları

pH	MG Konsantrasyonu (mM)	Sıcaklık (°C)	Süre (saat)	Çalkalama Hızı (d/dk)	Modifikasyon derecesi (%)
3,5	100	45	24	150	70,51

MG: Metilglioksal

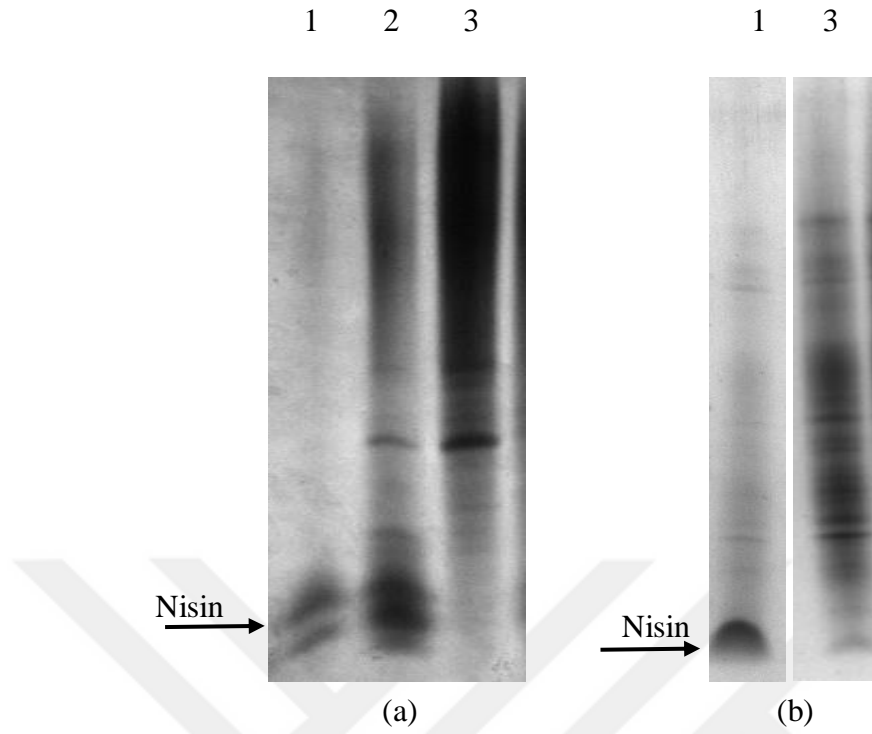
Optimum koşullar belirlendikten sonra nisin, bu koşullarda MG ile modifiye edilip donuk kurutulmuştur. Modifiye edilen örnekler %22,5’lik AAÜ-PAGE ve %16,5’lik Trisin SDS-PAGE yöntemleriyle analiz edilmiştir (Şekil 4.3). Şekil 4.3’de gösterilen elektroforetogramlar kırılıp yeniden düzenlenmiştir.

AAÜ-PAGE, molekül üzerinde gerçekleşen tek bir yük değişikliğini dahi gösteren bir yöntemdir. Şekil 4.3a'da 1. hat saf nisine aittir. Saf nisinin tek bant oluşturması beklenirken iki banttandır olduğu görülmektedir. Bu durumu açıklayabilmek için yapılan literatür taramasında nisin AAÜ-PAGE ile analizine dair herhangi bir bulguya rastlanmamıştır. Diğer yandan saf nisin, moleküler ağırlığa göre ayırım yapan Trisin SDS-PAGE yönteminde (hat 1) tek bir bant oluşturmuştur (Şekil 4.3b). Bu durum nisin yük-kütle oranı farklı olan iki fraksiyondan oluştuğunu, bu fraksiyonların moleküler ağırlıklarının çok küçük farklılık göstermesi nedeniyle Trisin SDS-PAGE yönteminde ayırlamadıklarını ortaya koymuştur.

Cruz vd. (1996) tarafından nisin üzerinde yapılan çalışmada, major nisin (3354,14 Da) yanı sıra tüm nisin örneklerinde bulunan ve minör nisin (3372,2 Da) olarak adlandırılan bir nisin çeşidinin de bulunduğu belirtilmiştir. Minör nisin, normal aminoasit dizisindeki Ala-33'ün Ser-33'e dönüşmesi ile bakteriyel üretim sırasında oluştuğu ve bütün nisin örneklerinde bulunduğu belirtilmiştir. AAÜ-PAGE analizinde nisin örneğinin çift bant şeklinde görünmesine bu durumun neden olabileceği değerlendirilmiştir.

Şekil 4.3a'da 2. ve 3. hatlar sırasıyla MG-kontrol (MG olmaksızın modifikasyon aşamalarından geçirilen nisin) ve MG-modifiye nisin örneklerine aittir. Modifikasyon sonrası nisin örneğine ait olan hat 3'te nisin bantlarının neredeyse kaybolduğu, yük/kütle oranları daha düşük ürünlere dönüştüğü görülmektedir. Yalnızca moleküler ağırlığa göre ayırım sağlayan Trisin SDS-PAGE elektroforetogramında da modifikasyon sonrası nisin bandında azalış, daha büyük moleküler ağırlığa sahip ürünlerde ise artış görülmektedir (hat 3, Şekil 4.3b). Bu durum, MG ile %70,51 gibi yüksek bir düzeyde modifikasyon gerçekleştiğini ortaya koymaktadır.

Proteinlerin MG ile reaksiyonu sonucunda ya Nε-(1-karboksi etil)lizin şeklinde modifikasyon (lizin üzerindeki pozitif yükün negatife dönüşmesi) ya da 1,3-di(Nε-lizin)-4-metil-imidazolium şeklinde çapraz bağlanma oluştuğu belirtilmiştir (Banerjee ve Chakraborti, 2013).



Şekil 4.3. MG ile modifiye edilen nisin örneklerinin, %22,5'lik AAÜ-PAGE (a) ve %16,5'lik Tris-Glycine SDS-PAGE elektroforetogramı (b). 1: Saf nisin, 2: MG-kontrol nisin (MG olmaksızın modifikasyon aşamalarından geçirilen nisin), 3: MG-modifiye nisin

Göz merceğinde bulunan α -kristalin proteinin MG ile modifikasyon sonucunda çözünmez hale geldiği, kovalent çapraz bağlanmaların ve renk değişikliklerinin olduğu saptanmıştır. α -kristalinde meydana gelen kovalent çapraz bağlanmaların büyük moleküler ağırlıklı ürünler oluşturduğu belirtilmiştir (Kumar vd., 2004).

Banerjee vd. (2016) yaptıkları çalışmada, miyoglobinin MG ile uzun süre (18 gün) inkübasyona bırakılması sonucunda protein agregatlarının oluştuğunu saptamışlardır.

Bu literatür bilgileri, nisinin hem molekül ağırlığında artış hem de yük-kütle oranında değişim olabileceğini göstermektedir.

4.2.2 Nisinin DEPK ile modifikasyonu

Nisinin dietil pirokarbonat (DEPK) ile modifikasyonu sonucunda, serbest amino gruplarının sayısında azalma gerçekleştiği için bu grupların sayısının belirlenmesi modifikasyon düzeyinin takibini sağlayabilmiştir (Şekil 2.4 ve 2.5). Bu amaçla TNBS

reaksiyonu kullanılmıştır. DEPK ile optimum modifikasyon koşullarının belirlenmesinde tüm denemeler, 4 M üre içeren 50 mM potasyum fosfat tamponu ile 1 mg/mL konsantrasyonda hazırlanan nisin çözeltisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Optimum pH, sıcaklık, DEPK konsantrasyonu, reaksiyon süresi ve çalkalama hızı faktörlerinin düzeylerini belirleyebilmek için her seferinde bir faktörün literatür bilgilerinden yararlanılarak tespit edilen farklı düzeylerinin incelendiği bir dizi deney gerçekleştirilmiştir.

Modifikasyon reaksiyonunda optimum pH düzeyinin belirlenmesi için sıcaklık 25°C, DEPK konsantrasyonu 540 mM, reaksiyon süresi 1 saat ve çalkalama hızı 150 d/dk değerinde sabit tutulmuş ve 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0 ve 9,0 pH değerleri incelenmiştir. Analiz sonucunda belirlenen modifikasyon düzeyleri Çizelge 4.7’de sunulmuştur. Çizelgeden de görülebileceği gibi en yüksek modifikasyon derecesi %9,48 olarak pH 7,0 değerinde saptanmıştır.

Çizelge 4.7. Farklı pH değerlerinde saptanan modifikasyon oranları (%)

pH değeri	Modifikasyon oranı (%)*
3,0	3,75±0,037
4,0	4,20±0,028
5,0	4,71±0,016
6,0	4,91±0,890
7,0	9,48±0,026
8,0	4,95±0,111
9,0	4,93±0,338

* Ortalama ± standart sapma

Optimum pH değerinin belirlenmesinden sonra optimum DEPK konsantrasyonunun saptanmasına yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, pH 7,0, sıcaklık 25°C, reaksiyon süresi 1 saat ve çalkalama hızı 150 d/dk değerinde sabit tutulmuş ve 40, 120, 180, 360, 540, 720, 900 ve 1000 mM DEPK konsantrasyonları denenmiştir. Bu şartlarda en iyi sonuç %9,70 modifikasyon düzeyi ile 540 mM DEPK konsantrasyonunda elde edilmiştir (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8. Farklı DEPK konsantrasyonlarında (mM) saptanan modifikasyon oranları (%)

DEPK konsantrasyonları (mM)	Modifikasyon oranı (%)*
40	3,59±0,324
120	2,54±0,225
180	2,68±0,193
360	3,87±0,081
540	9,70±0,225
720	2,70±0,006
900	3,46±0,183
1000	2,29±0,098

* Ortalama ± standart sapma
DEPK: Dietil pirokarbonat

Optimum modifikasyon sıcaklığının belirlenebilmesi için pH 7,0, DEPK konsantrasyonu 540 mM, reaksiyon süresi 1 saat ve çalkalama hızı 150 d/dk değerinde sabit tutulmuş ve 25, 30, 35 ve 40°C reaksiyon sıcaklıkları denenmiştir. Analiz sonucunda belirlenen modifikasyon düzeyleri Çizelge 4.9’da sunulmuştur. Çizelgeden de görülebileceği gibi en yüksek modifikasyon düzeyi %9,85 ile 30°C sıcaklıkta elde edilmiştir.

Çizelge 4.9. Farklı sıcaklıklarda (°C) saptanan modifikasyon oranları (%)

Reaksiyon Sıcaklığı (°C)	Modifikasyon oranı (%)*
25	9,54±0,758
30	9,85±0,108
35	5,60±0,402
40	4,81±0,421

* Ortalama ± standart sapma

Son olarak optimum reaksiyon süresi ve çalkalama hızının belirlenebilmesi için pH 7,0, sıcaklık 30°C ve DEPK konsantrasyonu 540 mM değerinde sabit tutulmuş ve 30, 60, 90 ve 120 dakika reaksiyon süreleri ile 150 ve 245 d/dk çalkalama hızları incelenmiştir. Sonuçta en yüksek modifikasyon düzeyi %13,68 ile 90 dakikalık reaksiyon süresi ve 150 d/dk’lık çalkalama hızında elde edilmiştir (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.10. Farklı reaksiyon süresi ve çalkalama hızında (d/dk) saptanan modifikasyon oranları (%)

Çalkalama hızı (d/dk)	Reaksiyon süresi (dk)	Modifikasyon oranı (%)*
150	30	7,5±0,249
	60	10,22±0,206
	90	13,68±0,077
	120	13,13±0,700
245	30	6,46±0,182
	60	12,27±0,837
	90	12,84±0,576
	120	12,74±0,709

* Ortalama ± standart sapma

Nisinin DEPK ile modifikasyonda optimum reaksiyon koşullarını belirlemek için yapılan çalışmalar sonucunda ulaşılan optimum koşullar Çizelge 4.11’de sunulmuştur. Çizelgeden de görüleceği üzere optimum koşullarda elde edilen modifikasyon oranı %13,68 gibi düşük bir değerde kalmıştır.

Çizelge 4.11. Nisinin DEPK ile optimum modifikasyon koşulları

pH	DEPK Konsantrasyonu (mM)	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	Çalkalama Hızı (d/dk)	Modifikasyon derecesi (%)
7,0	540	30	90	150	13,68

DEPK: Dietil pirokarbonat

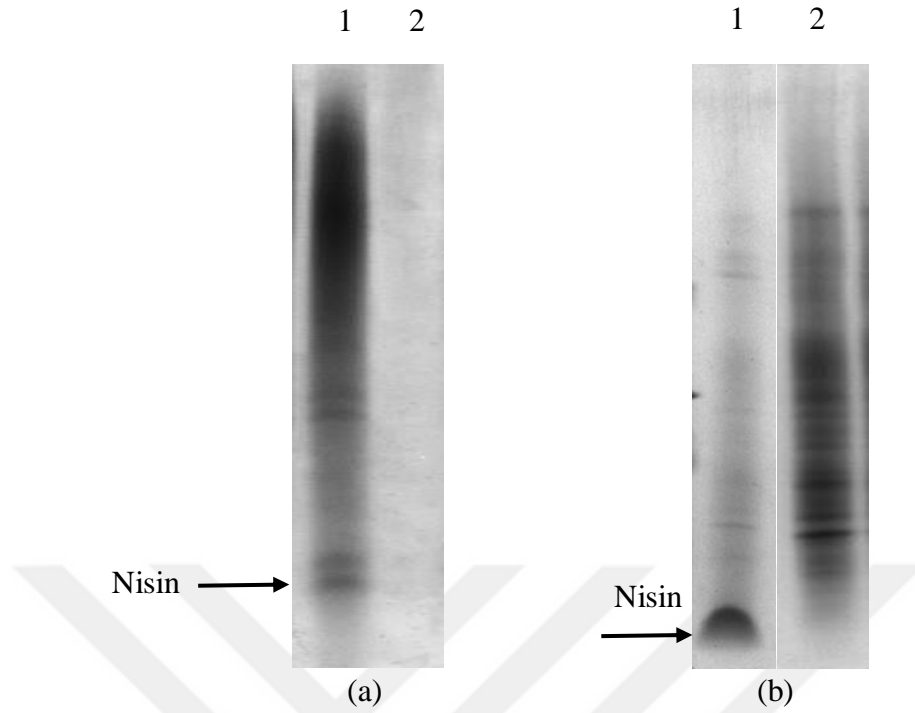
DEPK ile yapılan modifikasyon çalışmalarında proteinleri oluşturan aminoasitlerin aktif yan gruplarının erişilebilirliği ile buldukları ortamın reaksiyonun gerçekleşmesinde etkili olduğu belirlenmiştir (Hnizda vd., 2008). Ayrıca aminoasitlerin DEPK ile reaksiyona girme yeteneklerinin de önemli bir faktör olduğu belirtilmiştir (Li vd., 2017). Nisinin DEPK ile %13,68 gibi düşük bir düzeyde modifikasyona uğramasında söz konusu nedenlerin etkili olabileceği değerlendirilmektedir.

Zhou ve Vachet (2012) tarafından yapılan bir çalışmada sitokrom-C, miyoglobin ve β -2-mikroglobulin proteinleri DEPK ile modifiye edilmiştir. DEPK ile sitokrom-C %56-57, miyoglobin %73-83 ve β -2-mikroglobulin ise %49-68 oranlarında modifikasyona uğramıştır. Modifikasyon düzeylerindeki değişkenliğin nedeni olarak modifikasyona

uğrayabilecek aminoasit yan gruplarının buldukları konumların farklılığı belirtilmiştir.

Optimum koşullar belirlendikten sonra nisin, bu koşullarda DEPK ile modifiye edilip donuk kurutulmuştur. Bu şekilde DEPK ile %13,68 düzeyinde modifiye edilen örnekler %22,5'lik AAÜ-PAGE ve %16,5'lik Trisin SDS-PAGE yöntemleriyle analiz edilmiştir (Şekil 4.4).

Gerek AAÜ-PAGE gerekse Trisin SDS-PAGE elektroforetogramından, DEPK ile yapılan modifikasyon sonucunda (hat 2), nisine ait bantların neredeyse tamamen ortadan kalktığı görülmektedir. DEPK, lizinin yan grubundaki pozitif yükü uzaklaştırıp yerine etil grubu eklediğinden hidrofobik özelliği arttırmaktadır (Pal ve Ghosh, 1998). Bu nedenle %13,68'lik bir modifikasyonun Trisin SDS-PAGE elektroforetogramındaki nisin bandında bu denli bir azalmaya yol açması beklenmedik bir durumdur. AAÜ-PAGE analizinde ise ayırım yük-kütle oranına göre gerçekleştiği için burada nisin bandının yok olması beklenen bir durumdur. Ancak bu analizde de modifikasyon sonucu oluşan nisin türevlerine rastlanmamıştır. Bu durumun modifikasyon işlemi sonucunda ayırma jeline giremeyecek özellikte fraksiyonların oluşmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. DEPK ile modifikasyonda, lizinin ϵ -amino grubu ile aspartik asit veya glutamik asidin karboksil grupları arasında peptit bağı benzeri bağlar oluşabildiği belirtilmiştir (Wolf vd., 1970).



Şekil 4.4. DEPK ile modifiye edilen nisin örneklerinin, %22,5'lik AAÜ-PAGE (a) ve %16,5'lik Trisin SDS-PAGE elektroforetogramı (b). 1: DEPK-kontrol nisin (DEPK olmaksızın modifikasyon aşamalarından geçirilen nisin), 2: DEPK-modifiye nisin

4.2.3 Nisinin HSTL ile modifikasyonu

Nisinin homosistein tiyolaktan (HSTL) ile modifikasyonu sonucunda serbest -SH grupları olduğu için bu grupların miktarını belirleyerek modifikasyonun düzeyi saptanabilmektedir (Şekil 2.5). Bu nedenle HSTL ile modifikasyonun derecesini saptamak amacıyla DTNB reaksiyonu kullanılmıştır. Optimum modifikasyon koşullarının belirlenmesinde tüm parametrelerin aynı anda incelenmesi mümkün olmadığından her bir parametrenin optimum seviyesi kontrollü şartlarda ayrı ayrı belirlenmiştir. Optimum modifikasyon koşulları saptanırken 4 M üre içeren 0,1 M sodyum fosfat tamponu ile 6 mg/mL konsantrasyonda hazırlanan nisin çözeltisi kullanılmıştır. Sıcaklık, pH, HSTL konsantrasyonu, reaksiyon süresi ve çalkalama hızı faktörlerinin düzeyleri literatür bilgilerinden yararlanılarak tespit edilmiştir.

Optimum koşulların belirlenmesinde ilk olarak sıcaklık (45°C) ve çalkalama hızı (150 d/dk) sabit tutulurken pH değeri, HSTL konsantrasyonu ve reaksiyon süresinin farklı seviyeleri incelenmiştir. Uygulama esnasında nisin, her bir pH (3,0, 6,0 ve 8,0)

değerinde 1, 10 ve 100 mM HSTL ile 6, 24 ve 48 saat boyunca modifiye edilmiştir. Analiz sonucunda en yüksek modifikasyon düzeyinin (%4,35), 3,0 pH, 100 mM HSTL konsantrasyonu ve 6 saat reaksiyon süresi şartlarında gerçekleştiği saptanmıştır (Çizelge 4.12).

Çizelge 4.12. Farklı pH değerleri, HSTL konsantrasyonları ve reaksiyon sürelerinde saptanan modifikasyon oranları (%)

Süre (saat)	HSTL (mM)	pH değeri	Modifikasyon oranı (%)*
6	1	3,0	0,14±0,001
		6,0	0,05±0,016
		8,0	0,65±0,021
	10	3,0	0,39±0,089
		6,0	2,74±0,019
		8,0	1,89±0,024
	100	3,0	4,35±0,018
		6,0	4,30±0,024
		8,0	4,14±0,034
24	1	3,0	0,04±0,008
		6,0	0,12±0,019
		8,0	1,21±0,024
	10	3,0	1,85±0,025
		6,0	2,10±0,641
		8,0	3,07±0,084
	100	3,0	3,98±0,095
		6,0	4,34±0,010
		8,0	3,10±0,040
48	1	3,0	0,29±0,014
		6,0	0,61±0,010
		8,0	1,19±0,016
	10	3,0	2,66±0,001
		6,0	1,24±0,201
		8,0	3,13±0,214
	100	3,0	4,08±0,036
		6,0	4,31±0,018
		8,0	2,94±0,054

* Ortalama ± standart sapma
HSTL:Homosistein tiyolaktan

Bu sonuçlar en uygun modifikasyon koşullarının 6 saat, 100 mM HSTL ve 3 pH olduğunu göstermiş, fakat pH ve HSTL konsantrasyonunun daha ayrıntılı incelenmesinin yararlı olacağı düşünüldüğünden bu faktörlerin farklı düzeylerinin denenmesine devam

edilmiştir. Sonraki aşama için sıcaklık 60°C, çalkalama hızı 150 d/dk ve reaksiyon süresi 6 saat şeklinde sabit tutularak farklı pH değerleri (3,0, 4,0, 4,5 ve 5,0) ve HSTL (100, 150 ve 200 mM) konsantrasyonlarında modifikasyon gerçekleştirilmiştir. Burada en iyi sonuç %6,30 modifikasyon düzeyi ile pH 3,0 ve HSTL konsantrasyonu 150 mM iken elde edilmiştir (Çizelge 4.13).

Çizelge 4.13. Farklı pH değerleri ve HSTL konsantrasyonlarında saptanan modifikasyon oranları (%)

HSTL (mM)	pH değeri	Modifikasyon oranı (%)*
100	3,0	6,07±0,002
	4,0	6,15±0,001
	4,5	5,53±0,002
	5,0	5,73±0,002
150	3,0	6,30±0,020
	4,0	6,22±0,021
	4,5	5,86±0,008
	5,0	5,74±0,050
200	3,0	5,96±0,035
	4,0	6,09±0,015
	4,5	5,85±0,030
	5,0	5,73±0,036

* Ortalama ± standart sapma
HSTL:Homosistein tiyolaktan

Bu verilerle, modifikasyon için optimum pH değerinin 3,0 ve HSTL konsantrasyonunun 150 mM olduğu sonucuna varılmıştır. Reaksiyon süresi olarak daha önceki deneylerde en küçük değer olarak 6 saat kullanılmış olup daha kısa sürelerin de incelenmesine ihtiyaç duyulmuştur. Bu nedenle pH değeri 3,0, HSTL konsantrasyonu 150 mM ve çalkalama hızı 245 d/dk olarak sabit tutulup farklı reaksiyon süreleri (2, 4 ve 6 saat) ve sıcaklık düzeyleri (60 ve 80°C) kullanılarak modifikasyon gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4.14). Bu koşullarda en iyi sonuç %5,35 modifikasyon oranıyla 6 saat ve 60°C sıcaklıkta elde edilmiş, çalkalama hızının ve sıcaklığın artışı modifikasyonu iyileştirmemiştir.

Bu verilerden HSTL ile en yüksek modifikasyon düzeyinin %6,30 olduğu ve bunun Çizelge 4.15’da belirtilen koşullarda elde edildiği anlaşılmaktadır.

Çizelge 4.14. Farklı süre ve sıcaklık değerlerinde saptanan modifikasyon oranları (%)

Sıcaklık (°C)	Süre (saat)	Modifikasyon oranı (%)*
60	2	1,46±0,006
	4	2,70±0,008
	6	5,35±0,023
80	2	4,31±0,050
	4	4,99±0,113
	6	5,23±0,224

* Ortalama ± standart sapma

HSTL ile serum albümini, fibrinojen, α -makroglobulin, miyoglobin ve sitokrom C gibi pek çok proteinin modifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Modifikasyonlar genel olarak 7,4 pH ve 37°C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. HSTL ile modifikasyon oranının modifiye edilen proteinin lizin içeriği ile orantılı olduğu belirtilmiştir (Jakubowski, 1999; Beltowski, 2005). Proteinin içerdiği lizin miktarının 10 adetten az olması durumunda modifikasyonun çok düşük seviyelerde kaldığı saptanmıştır (Jakubowski, 1999). Ayrıca büyük molekül ağırlıklı proteinlerde de lizin içeriğiyle orantılı olmayan bir şekilde, muhtemelen lizine ulaşamaması nedeniyle modifikasyonun daha düşük seviyelerde gerçekleştiği gözlenmiştir (Beltowski, 2005).

HCTL ile methionil-tRNA sentaz (64 kDa) ve tripsin (24 kDa) modifiye edilmiştir. İşlem sonrası methionil-tRNA sentazdaki lizinin %33'ü ve tripsindeki ise %88'i modifiye edilebilmiştir (Jakubowski, 1999).

Sharma vd. (2014) yaptıkları çalışmada her proteinin HSTL ile fonksiyonel ve yapısal modifikasyona uygun olmadığını tespit etmişlerdir.

Çizelge 4.15. Nisinin HSTL ile optimum modifikasyon koşulları

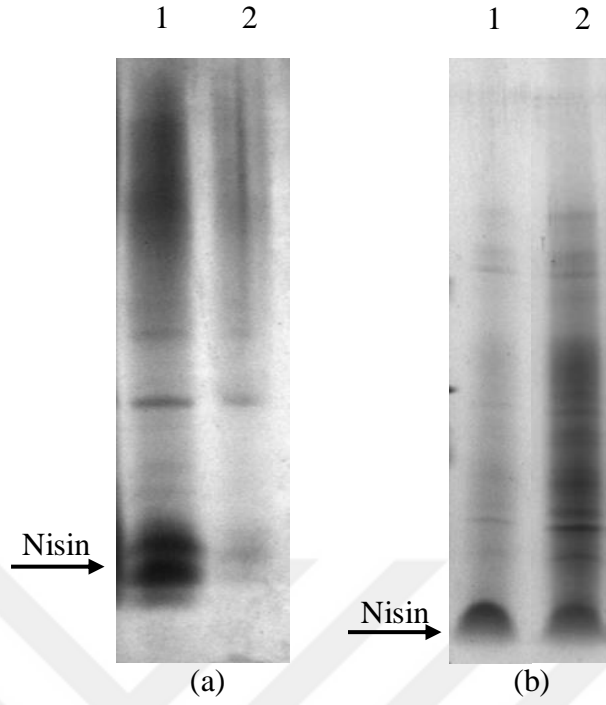
pH	HSTL Konsantrasyonu (mM)	Sıcaklık (°C)	Süre (saat)	Çalkalama Hızı (d/dk)	Modifikasyon derecesi (%)
3,0	150	60	6	150	6,30

HSTL:Homosistein tiyolaktan

Optimum koşullar belirlendikten sonra nisin, bu koşullarda HSTL ile modifiye edilip donuk kurutulmuştur. Bu şekilde HSTL ile %6,30 düzeyinde modifiye edilen örnekler %22,5'lik AAÜ-PAGE ve %16,5'lik Trisin SDS-PAGE yöntemleriyle analiz edilmiştir (Şekil 4.5).

AAÜ-PAGE elektroforetogramından, HSTL ile yapılan modifikasyon sonucunda (hat 2), %6,30'luk modifikasyon düzeyi ile orantısız bir şekilde nisine ait bantların neredeyse tamamen ortadan kalktığı görülmektedir. HSTL, proteinlerdeki lizin aminoasidinin yan zincirindeki serbest amino grubuyla kolaylıkla reaksiyona girerek homosistein-εN-Lys-protein oluşumunu sağlamaktadır (Jalili vd., 2011). Bu reaksiyon sonucunda nisine yeni bir -SH grubu eklenmekte, yük-kütle oranı değişmektedir. Oluşan SH grupları oksidasyon sonucunda -S-S- köprülerine dönüşerek daha büyük nisin kümeleri meydana getirebilir. Ancak elektroforez işleminde -S-S- köprülerini kıran DTT kullanıldığından oluşan kümelerin elektroforetogramda görünmemesi gerekmektedir.

Trisin SDS-PAGE analizinde modifiye nisin bandı (hat 2), %6,30'luk modifikasyon düzeyi ile orantılı bir şekilde çok fazla değişim göstermemiştir. Nisin bandındaki azalmaya paralel olarak daha büyük molekül ağırlıklı fraksiyonlar oluşmuştur. Benzer şekilde beta kazeinin HSTL ile modifikasyonunun gerçekleştirildiği bir çalışmada, modifikasyon sonrası beta kazein kümelerinin oluştuğu, bu kümelerin beta merkaptolanol ve 8 M guanidin hidroklorit varlığından etkilenmediği, bu nedenle kümelerin disülfid bağından farklı bir bağ ile bağlanma sonucu oluştuğu belirtilmiştir (Stroylova vd., 2011).



Şekil 4.5. HSTL ile modifiye edilen nisin örneklerinin, %22,5'lik AAÜ-PAGE (a) ve %16,5'lik Trisin SDS-PAGE elektroforetogramı (b). 1: HSTL-kontrol nisin (HSTL olmaksızın modifikasyon aşamalarından geçirilen nisin), 2: HSTL-modifiye nisin

4.3 Modifiye Edilen Nisin Örneklerinin Protein İçerikleri

Optimum koşullarda modifiye edilen ve donuk kurutulan nisin örneklerinin antibakteriyel özelliklerinin belirlenmesinde konsantrasyon hesaplamaları protein oranları üzerinden gerçekleştirildiği için örneklerin protein içeriklerinin belirlenmesi gerekmiştir. Örneklerin protein içerikleri Lowry yöntemi ile belirlenmiştir. Protein analizi için hem BSA hem de saf nisin kullanılarak kalibrasyon eğrileri hazırlanmış, ancak daha doğru sonuçlar alınacağı düşüncesiyle kimyasal modifikasyon işlemi sonrasındaki modifiye edilmiş ve edilmemiş nisin örneklerinin protein oranları %95'lik saf nisin ile hazırlanan kalibrasyon eğrisiyle hesaplanmış ve sonuçlar Çizelge 4.16'da sunulmuştur. Metilglioksal dışında diğer iki yöntemle yapılan modifikasyonlar sonucunda kurutulan örneklerin protein oranları %86,65-99,75 aralığında saptanmıştır. Ancak metilglioksal ile yapılan modifikasyon sonrası ilginç bir şekilde donuk kurutulan örneklerin dokuları yapışkan ve protein oranları çok düşük (%49,92) çıkmıştır. Bu durumun, metilglioksal ile modifiye edilen nisin polaritesinin, dolayısıyla su tutma kapasitesinin artmasından kaynaklandığı değerlendirilmektedir. Benzer bir şekilde MG

ile modifiye edilen α -kristalinin yüzey polaritesinde artış meydana geldiği de saptanmıştır (Mukhopadhyay vd., 2010).

Çizelge 4.16. Kimyasal modifikasyon sonrası örneklerin protein oranları

Örnekler		Protein Oranı (%) [*]
DEPK ile modifikasyon	Kontrol ^{**}	97,61±0,311
	Modifiye nisin	86,27±0,544
HSTL ile modifikasyon	Kontrol ^{**}	99,77±0,256
	Modifiye nisin	88,58±0,330
MG ile modifikasyon	Kontrol ^{**}	94,32 ±0,192
	Modifiye nisin	49,92±0,016

* Ortalama ± standart sapma

**DEPK, HSTL ve MG olmaksızın modifikasyon aşamalarından geçirilen nisin

DEPK: Dietil Pirokarbonat

HSTL: Homosistein Tiyolakton

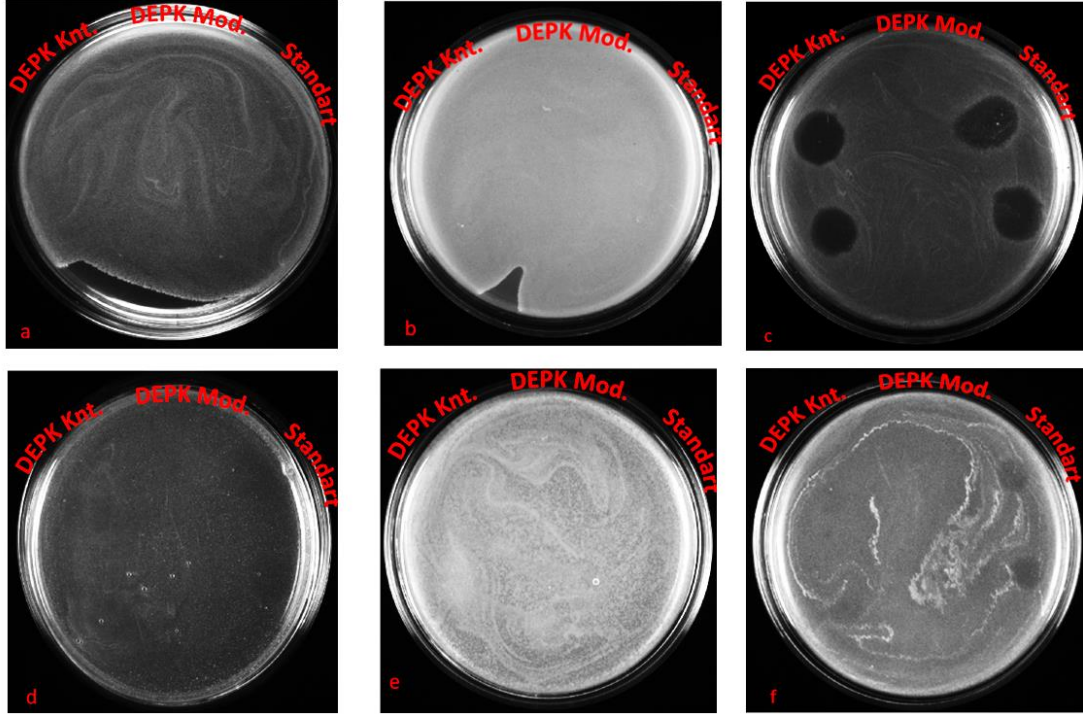
MG: Metilglioksal

4.4 Antibakteriyel Aktivitedeki Değişimin Belirlenmesi

Modifikasyon işlemlerinin nisinin antibakteriyel özelliklerindeki etkisi öncelikle spot-on-lawn yöntemiyle incelenmiştir. Çalışmamızda kullanılan nisin Z, geniş bir Gram pozitif bakteri grubuna karşı antimikrobiyal etki göstermesinin yanı sıra, *Ent. faecium* gibi antibiyotiğe dirençli türlere karşı da antimikrobiyal etki göstermektedir (Severina vd., 1998; Tong vd., 2014). Saf nisin örneği test edilen mikroorganizmalardan (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* AÜ, *Enterococcus faecium* ATCC 9097, *Listeria monocytogenes* NCTC 5348 ve *Escherichia coli* RSKK) sadece *Ent. faecium*'a karşı aktivite göstermiştir.

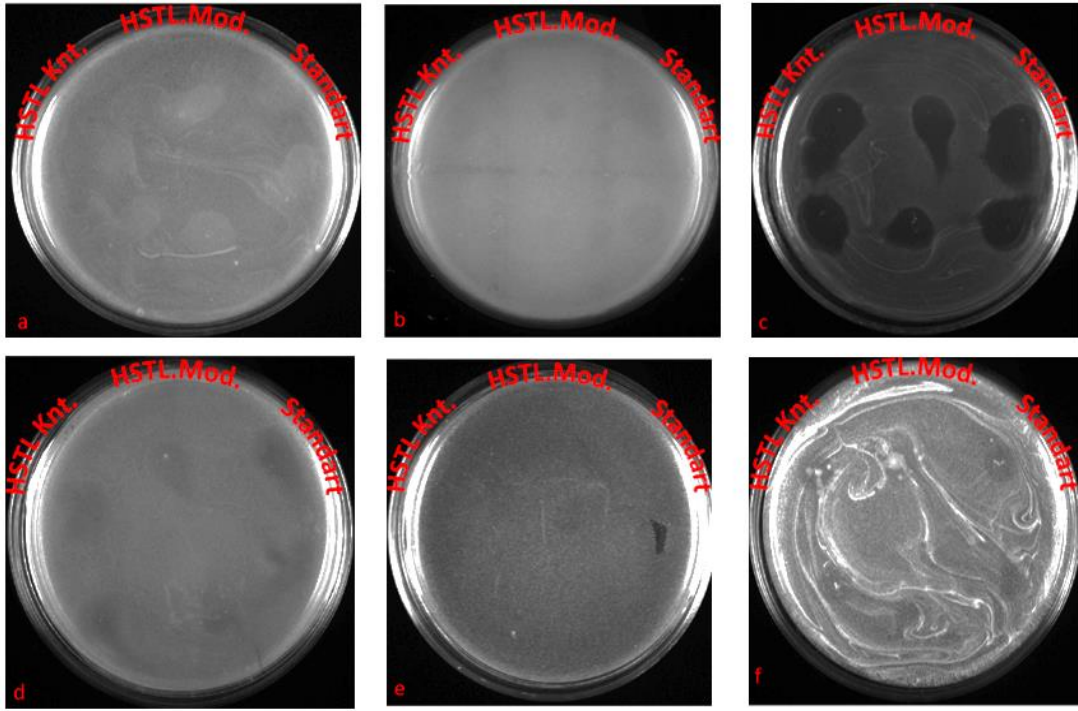
Modifikasyon derecesi düşük olmasına rağmen DEPK ile modifiye edilen nisin *S. aureus*, *B. subtilis*, *Lac. lactis* ssp. *cremoris*, *Ent. faecium*, *L. monocytogenes* ve *E. coli* bakterilerine karşı herhangi bir antibakteriyel aktivite göstermemiştir (Şekil 4.6). Bu durum, DEPK ile gerçekleştirilen modifikasyon işleminin nisinin antibakteriyel aktivitesinde herhangi bir gelişme sağlamadığının göstergesidir. DEPK ile gerçekleştirilen modifikasyon nisinin antibakteriyel aktivitesinde önemli olan yapısal

değişikliklere yol açmıştır. Bu nedenle nisinin DEPK ile modifikasyonunun yararlı bir uygulama olduğu sonucuna ulaşılmıştır.



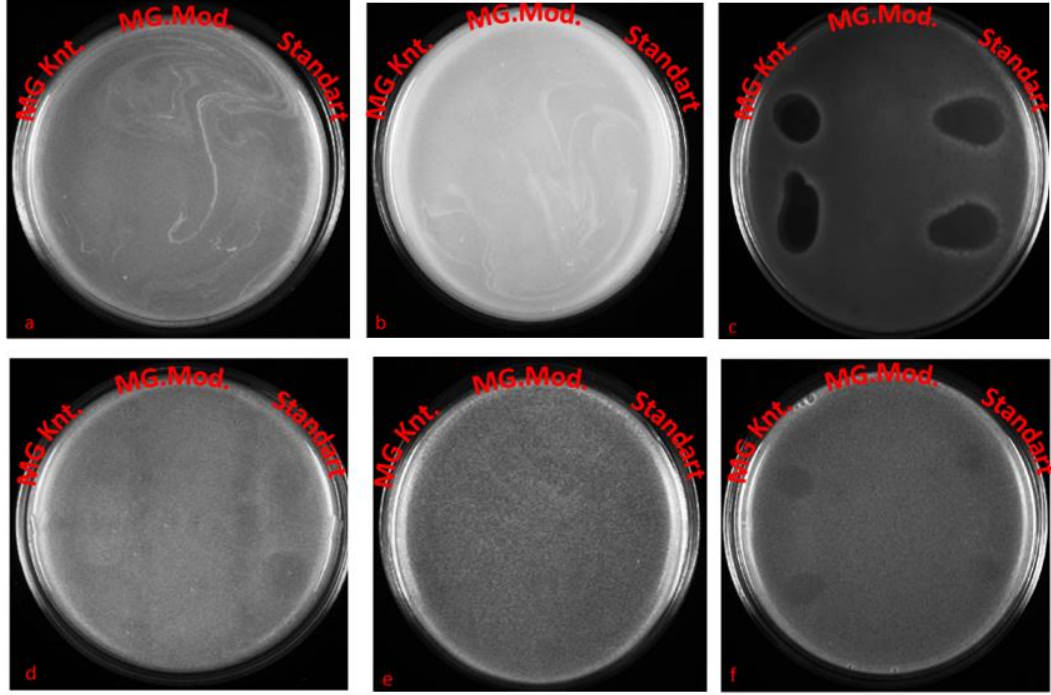
Şekil 4.6. DEPK modifikasyonuna ait spot-on-lawn tekniği ile antibakteriyel aktivite sonuçları a: *Escherichia coli*, b: *Listeria monocytogenes*, c: *Enterococcus faecium*, d: *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, e: *Bacillus subtilis*, f: *Staphylococcus aureus*. 50 ppm protein içerecek şekilde onar μ L örnek uygulanmıştır. DEPK Knt.: DEPK olmaksızın modifikasyon aşamalarından geçirilen nisin, DEPK Mod.: DEPK ile modifiye edilen nisin, Standart: Saf nisin

HSTL ile modifiye edilen nisin, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, *Listeria monocytogenes* ve *Escherichia coli* bakterilerine karşı antibakteriyel aktivite göstermediği, ancak *Enterococcus faecium*'a karşı düşük de olsa antibakteriyel bir etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.7). Modifiye nisin antibakteriyel aktivitesini belli ölçüde koruması ya modifikasyonun %6,30 gibi düşük bir düzeyde kalmasından ya da modifikasyon sonucunda nisine eklenen -SH gruplarının tam bir aktivite kaybına yol açmamasından kaynaklandığı değerlendirilmektedir.



Şekil 4.7. HSTL modifikasyonuna ait spot-on-lawn tekniği ile antibakteriyel aktivite sonuçları a: *Escherichia coli*, b: *Listeria monocytogenes*, c: *Enterococcus faecium*, d: *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, e: *Bacillus subtilis*, f: *Staphylococcus aureus*, 50 ppm protein içerecek şekilde onar µL örnek uygulanmıştır. HSTL Knt.: HSTL olmaksızın modifikasyon aşamalarından geçirilen nisin, HSTL Mod.: HSTL ile modifiye edilen nisin, Standart: Saf nisin

MG ile modifiye edilen nisin, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, *Enterococcus faecium*, *Listeria monocytogenes* ve *Escherichia coli* bakterilerine karşı antibakteriyel aktivitesini tamamen yitirmiştir (Şekil 4.8). Bu duruma nisinin yapısında meydana gelen değişikliklerin yol açtığı değerlendirilmiştir. Benzer bir sonuç, glikoz ile 95°C’de Maillard reaksiyonuna uğratılan nisinde de gözlenmiştir (Lo vd., 1994). Ayrıca MG ile modifikasyon sonrasında enzimatic aktivitenin de kaybolduğu belirlenmiştir (Abdullah vd., 2010).



Şekil 4.8. MG modifikasyonuna ait spot-on-lawn tekniği ile antibakteriyel aktivite sonuçları

a: *Escherichia coli*, b: *Listeria monocytogenes*, c: *Enterococcus faecium*, d: *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, e: *Bacillus subtilis*, f: *Staphylococcus aureus*. 50 ppm protein içerecek şekilde onar μ L örnek uygulanmıştır. MG Knt.: MG olmaksızın modifikasyon aşamalarından geçirilen nisin, MG Mod.: MG ile modifiye edilen nisin, Standart: Saf nisin

Spot-on-lawn tekniği ile yapılan analizler sonucunda, DEPK ve MG ile modifiye edilen nisinin incelenen bakteriler üzerinde herhangi bir antibakteriyel etkisinin bulunmadığı ve antibakteriyel spektrumunda da herhangi bir gelişme sağlanamadığı tespit edilmiştir. Bu durum modifikasyon sonrası antibakteriyel aktivitenin artmadığını, tersine modifikasyon öncesi mevcut olan antibakteriyel aktivitenin dahi kaybolduğunu göstermektedir.

HSTL ile modifiye edilmiş nisinin sınırlı da olsa antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Bu modifiye nisinin, saf nisine benzer şekilde sadece *Enterococcus faecium* bakterisine karşı antibakteriyel aktivite gösterdiği ve antibakteriyel spektrumunda herhangi bir gelişme sağlanamadığı belirlenmiştir. Bu nedenle DEPK ve MG ile modifiye edilen nisin örneklerinde MİK analizi gerçekleştirilmenin bir anlamı olmayacağından yalnızca HSTL ile modifiye edilen nisinin MİK değeri belirlenmiştir.

HSTL ile %6,3 düzeyinde modifiye edilen nisinin *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, *Listeria monocytogenes* ve *Escherichia coli* bakterilerine karşı saf nisine benzer şekilde herhangi bir antibakteriyel etki göstermediğinden MİK analizi sadece *Enterococcus faecium* kullanılarak gerçekleştirilmiştir. HSTL ile modifiye edilen nisin ile saf nisin örneklerinin *Enterococcus faecium*'a karşı tespit edilen MİK değerleri Çizelge 4.17'da verilmiştir.

HSTL ile modifiye edilen nisinin *Enterococcus faecium*'a karşı MİK değeri (16,75 µM) saf ve kontrol nisin örneklerine göre yaklaşık 10 kat daha yüksek tespit edilmiştir. MİK değerinin yükselmesi modifikasyon sonrası antibakteriyel aktivitenin zarara uğradığını göstermektedir.

Çizelge 4.17. HSTL ile modifiye edilen nisinin *Enterococcus faecium*'a karşı MİK değerleri

Bakteri	Saf nisin (%95)*	HSTL-kontrol nisin¹*	HSTL-modifiye nisin*
<i>Enterococcus faecium</i> 'a karşı MİK (µM)	1,85±0,0 ^b	1,85±0,0 ^b	16,75±0,0 ^a

* Ortalama ± standart sapma

¹Homosistein Tiyolakton (HSTL) olmaksızın modifikasyon aşamalarından geçirilen nisin

a,b : Aynı satırda farklı harflerle gösterilen değerler istatistiksel açıdan farklıdır (p≤0,05)

Tüm bu veriler dikkate alındığında kullanılan kimyasal bileşiklerle gerçekleştirilen modifikasyon işlemleri sonucunda ne antibakteriyel aktivitede artış ve ne de antibakteriyel spektrumda iyileşme sağlanabilmiştir.

4.5 Modifikasyon Bölgelerinin Belirlenmesi

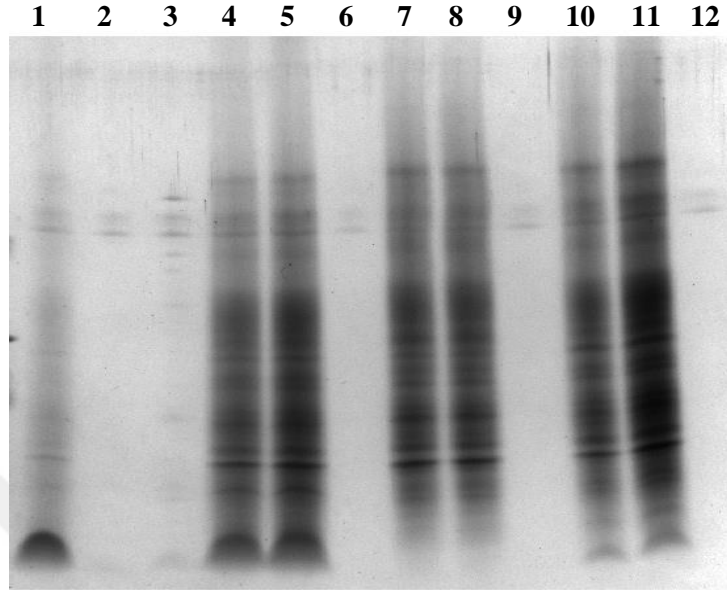
Tez önerisinde belirtilen MALDI-TOF yerine kullanılan LC-MS-MS yöntemi proteinlerin aminoasit dizisini belirleyebilecek üstünlüğe sahiptir. Bu yöntemde örnekler öncelikle Trisin-SDS-PAGE ile fraksiyonlarına ayrılmış ve daha sonra jel üzerindeki fraksiyonlar kesilip mikrotüplere alınmıştır. Kesilerek mikrotüplere alınan fraksiyonlar tripsin ile hidrolize edildikten sonra LC-MS-MS (TripleTOF® 5600+ sistemi, AB SCIEX, Amerika Birleşik Devletleri) cihazı ile analiz edilmiştir. LC-MS-

MS ile elde edilen kütle spektrumları Analyst TF v.1.6 (AB SCIEX, Amerika Birleşik Devletleri) programı yardımıyla kaydedilip ProteinPilot ve SwisProt veri tabanlarında tanımlanmaya çalışılmıştır (Alessio, 2017). Ancak örneklerin analizi sonucunda elde edilen spektrumlar, mevcut kütüphanelerdeki veriler yardımıyla tanımlanamamıştır. Bu durumun nisinin rutin dışı (unusual) aminoasitler içermesinden ve uygulanan modifikasyon işlemlerinden kaynaklandığı değerlendirilmiştir.

LC-MS-MS analizi ile sonuç alınamaması nedeniyle modifikasyon bölgelerini belirlemek için enzimatik hidroliz sonrası Trisin SDS-PAGE yöntemi uygulanmıştır. Modifikasyonda kullanılan yöntemler temel olarak lizin aminoasidinin yan grubunu hedef aldığı için kullanılacak enzimlerin seçimi de bu bilgi doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla tripsin ve termolisin enzimleri kullanılmıştır. Tripsin enzimi, lizin ve arjinin aminoasitlerine özgünlük göstermekte ve bu aminoasitlerin oluşturduğu peptit bağlarını karboksil ucundan hidrolizasyona uğratmaktadır. Nisinin aminoasit dizisinde arjinin yer almadığı için tripsinin sadece lizin aminoasidinin bulunduğu bölgelerden hidroliz gerçekleştirmesi beklenmektedir. Nisinin (nisin Z, 3354 Da moleküler ağırlığında olup 34 aminoasit içermektedir) yapısında 3 adet lizin bulunmaktadır. Bunlardan biri C ucunda yer aldığı için tripsin tarafından tanınmaz. Sterik bir etki söz konusu olmaması durumunda diğer iki lizin aminoasidinin oluşturduğu peptit bağları tripsin tarafından ya kısmi hidrolizasyona uğratılarak 5 (bir adet 10, iki adet 12 ve iki adet 22 aminoasit içeren peptit) ya da tam hidrolizasyona uğratılarak 3 peptit parçası oluşturulur. Bu dizilere ait teorik moleküler ağırlıklar 1154,7, 1009,5, 1213,7, 2146,2 ve 2468,9 Da şeklindedir. Ancak modifiye edilen lizin aminoasitleri tripsin enzimi tarafından tanınmayacağı için bu noktalardan hidroliz gerçekleşmeyecektir.

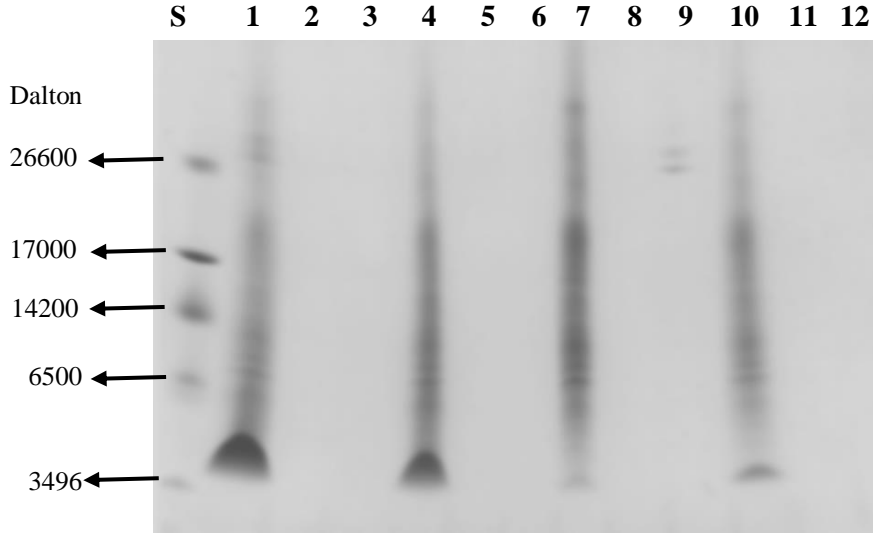
Tripsin hidrolizi sonucu elde edilen ürünlere ait elektroforetogram Şekil 4.9'da sunulmuştur. Şekilden de görüleceği üzere HSTL (hat 5), dietil pirokarbonat (DEPK, hat 8) ve metilglioksal (MG, hat 11) ile modifiye edilmiş örneklere ait hatların hiçbirisinde parçalanma söz konusu değilken kontrol örneği tripsin ile tam bir hidrolizasyona uğramıştır (hat 2). Ayrıca modifikasyon işleminde kullanılan kimyasalların ilavesi dışında diğer bütün aşamalara maruz bırakılan kontrol örneklerinin tripsin ile tamamen hidrolizasyona uğradıkları da saptanmıştır (Şekil 4.10). Bu veriler,

modifikasyon işlemi uygulanan nisin örneklerinde lizin aminoasitlerinin yan gruplarının değişime uğradığını kesin bir şekilde göstermiştir.



Şekil 4.9. Modifiye edilen nisin örneklerinin tripsin ve termolisin enzimleri ile hidrolizasyonu sonrası Trisin SDS-PAGE elektroforetogramı. 1: Saf nisin (%95), 2: Tripsin ile muamele edilen saf nisin, 3: Termolisin ile muamele edilen saf nisin, 4: HSTL ile modifiye edilmiş nisin, 5: HSTL ile modifiye edilip tripsin ile muamele edilmiş nisin, 6: HSTL ile modifiye edilip termolisin ile muamele edilmiş nisin, 7: DEPK ile modifiye edilmiş nisin, 8: DEPK ile modifiye edilip tripsin ile muamele edilmiş nisin, 9: DEPK ile modifiye edilip termolisin ile muamele edilmiş nisin, 10: MG ile modifiye edilmiş nisin, 11: MG ile modifiye edilip tripsin ile muamele edilmiş nisin, 12: MG ile modifiye edilip termolisin ile muamele edilmiş nisin

Termolisin enzimi, lösin, fenilalanin, valin, izolösin, alanin ve metionin aminoasitlerine özgünlük göstermekte ve bu aminoasitlerin oluşturduğu peptit bağlarını amino ucundan hidrolizasyona uğratmaktadır. Teorik olarak termolisinin, modifiye edilmiş nisin örneklerini tamamen hidrolize etmesi gerekmektedir. Şekil 4.9'dan da görüleceği gibi termolisin ile gerçekleştirilen hidroliz sonucunda kontrol örneği de dahil olmak üzere modifiye edilmiş bütün nisin örnekleri teorik bilgiye paralel bir şekilde parçalanmaya uğramıştır (hat 3, 6, 9 ve 12). Nisin örneklerinin tripsin ve termolisin ile hidrolizasyonu sonucunda oluşan peptitler jel üzerinde görünmemektedir. Bu durumun Kruger (2009) tarafından da belirtildiği gibi 3000 Da'dan daha küçük peptitlerin Coomassie Brilliant Blue G 250 ile boyanmamasından ileri geldiği değerlendirilmektedir.



Şekil 4.10. Modifikasyon şartlarındaki kontrol nisin örneklerinin tripsin ve termolisin enzimleri ile hidrolizasyonu sonrası Trisin SDS-PAGE elektroforetogramı. S: Standart, 1: Saf nisin (%95), 2: Tripsin ile muamele edilmiş saf nisin, 3: Termolisin ile muamele edilmiş saf nisin, 4: HSTL kontrol nisin, 5: Tripsin ile muamele edilmiş HSTL kontrol nisin, 6: Termolisin ile muamele edilmiş HSTL kontrol nisin, 7: DEPK kontrol nisin, 8: Tripsin ile muamele edilmiş DEPK kontrol nisin, 9: Termolisin ile muamele edilmiş DEPK kontrol nisin, 10: MG kontrol nisin, 11: Tripsin ile muamele edilmiş MG kontrol nisin, 12: Termolisin ile muamele edilmiş MG kontrol nisin

Modifikasyon bölgelerini belirlemeye yönelik çalışmalar sonucunda, modifiye edilen nisin örneklerinin tripsin hidrolizasyonuna direnç gösterirken termolisin enzimi ile tamamen hidrolize olmaları her üç modifikasyon işlemi ile lizin aminoasitlerinin değişime uğradığını göstermektedir. Ayrıca nisin üzerinde bulunan Lys-12 ve Lys-22'nin modifiye olduğu kesin bir şekilde ortaya konulmaktadır. Ancak Lys-34'ün modifiye edilip edilmediğine dair kesin bir yargıya ulaşmak mümkün olamamıştır.

BÖLÜM V

SONUÇLAR

Bu tez çalışması sonucunda, ticari nisin (%2,5) diklorometan ile çöktürme ve katyon değiştirici kolon kromatografisi yöntemlerinin birleştirilmesiyle geliştirilen metot kullanılarak en az %95 düzeyinde saflaştırılmıştır.

Yüksek saflıktaki nisin örnekleri 1 mg/mL konsantrasyonda 540 mM DEPK ile pH 7,0, 30°C, 90 dk ve 150 d/dk çalkalama hızı olarak belirlenen optimum koşullarda %13,68 modifikasyon derecesine ulaşmıştır.

Yüksek saflıktaki nisin örnekleri 6 mg/mL konsantrasyonda, 150 mM HSTL ile pH 3,0, 60°C, 6 saat ve 150 d/dk çalkalama hızı olarak belirlenen optimum koşullarda %6,30 modifikasyon derecesine ulaşmıştır.

Yüksek saflıktaki nisin örnekleri 1 mg/mL konsantrasyonda 100 mM MG ile pH 3,5, 45°C, 24 saat ve 150 d/dk çalkalama hızı olarak belirlenen optimum koşullarda %70,51 modifikasyon derecesine ulaşmıştır.

DEPK ve MG ile modifiye edilen nisin örnekleri, *S. aureus*, *B. subtilis*, *Lac. lactis* ssp. *cremoris*, *Ent. faecium*, *L. monocytogenes* ve *E. coli* bakterilerine karşı herhangi bir antibakteriyel aktivite göstermemiştir. DEPK ve MG ile nisinin modifiye edilmesi nisinin antibakteriyel aktivitesini tamamen yok ettiğinden, nisinin bu kimyasallarla modifikasyonunun yararsız bir uygulama olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

HSTL ile modifiye edilmiş nisinin ise sadece *Enterococcus faecium* bakterisine karşı antibakteriyel aktivite gösterdiği ve antibakteriyel spektrumunda herhangi bir gelişme sağlanamadığı belirlenmiştir. HSTL ile modifiye edilen nisinin yalnızca *Enterococcus faecium*'a karşı antibakteriyel etki göstermesi nedeniyle sadece bu bakteriye karşı olan MİK değeri (16,75 µM) hesaplanabilmiştir.

Tüm bu sonuçlar dikkate alındığında modifikasyon işlemleriyle antibakteriyel etkinin arttırılması ve antibakteriyel spektrumun genişletilmesine ilişkin herhangi bir iyileşme

sağlanamamıştır. Nisinin DEPK, HSTL ve MG ile modifikasyona uğradığı, tripsin ve termolisin enzimleriyle hidrolizasyonu ve ardından yapılan Trisin SDS-PAGE analiziyle gösterilmiştir.

Bu tez çalışması, nisinin kimyasal modifikasyonunda farklı bileşik ve yöntemlerin kullanılarak antimikrobiyal aktivitesinin iyileştirilmesine ve spektrumunun genişletilmesine yönelik araştırmalara ihtiyaç bulunduğunu ortaya koymuştur.



KAYNAKLAR

- Aasen, I. M., Markussen, S., Moretro, T., Katla, T., Axelsson, L. and Naterstad, K., "Interactions of the bacteriocins sakacin P and nisin with food constituents", *Int J Food Microbiol*, 87(1-2): 35-43, 2003.
- Abdullah, S. U., Badaruddin, M., Ali, R. and Riaz, M. N., "Effect of elementary and advanced glycation products of nisin on its preservative efficacy and digestibility", *Food Chem*, 122(4): 1043-1046, 2010.
- Abts, A., Mavaro, A., Stindt, J., Bakkes, P. J., Metzger, S., Driessen, A. J., Smits, S. H. and Schmitt, L., "Easy and rapid purification of highly active nisin", *Int J Pept*, 2011, 2011.
- Ahmed, M. U., FRYE, E. B., Degenhardt, T. P., Thorpe, S. R. and Baynes, J. W., "N ϵ -(carboxyethyl) lysine, a product of the chemical modification of proteins by methylglyoxal, increases with age in human lens proteins", *Biochem J*, 324(2): 565-570, 1997.
- Alessio, N., Özcan, S., Tatsumi, K., Murat, A., Peluso, G., Dezawa, M. and Galderisi, U., "The secretome of MUSE cells contains factors that may play a role in regulation of stemness, apoptosis and immunomodulation", *Cell Cycle*, 16(1): 33-44, 2017.
- Azevedo, C. and Saiardi, A., "Why always lysine? The ongoing tale of one of the most modified amino acids", *Adv Biol Regul.*, 60: 144-150, 2016.
- Bailey, F. and Hurst, A., "Preparation of a highly active form of nisin from *Streptococcus lactis*", *Can J Microbiol*, 17(1): 61-67, 1971.
- Banerjee, S. and Chakraborti, A. S., "In Vitro Study on Structural Alteration of Myoglobin by Methylglyoxal", *Protein J*, 32(3): 216-222, 2013.
- Banerjee, S., Maity, S. and Chakraborti, A. S., "Methylglyoxal-induced modification causes aggregation of myoglobin", *Spectrochim Acta A*, 155: 1-10, 2016.
- Bełtowski, J., "Protein homocysteinylation: a new mechanism of atherogenesis? Modyfikacja białek przez tiolakton homocysteiny–nowy mechanizm powstawania miażdżycy?", *Postepy Hig Med Dosw.(online)*, 59: 392-404, 2005.
- Bonev, B. B., Breukink, E., Swiezewska, E., De Kruijff, B. and Watts, A., "Targeting extracellular pyrophosphates underpins the high selectivity of nisin", *Faseb J*, 18(15): 1862-1869, 2004.
- Breukink, E. and de Kruijff, B., "The lantibiotic nisin, a special case or not?", *Bba-Biomembranes*, 1462(1-2): 223-234, 1999.
- Breukink, E. and de Kruijff, B., "Lipid II as a target for antibiotics", *Nature reviews. Drug discovery*, 5(4): 321, 2006.

- Brumfitt, W., Salton, M. R. J. and Hamilton-Miller, J. M. T., "Nisin, alone and combined with peptidoglycan-modulating antibiotics: activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci", *J Antimicrob Chemoth*, 50(5): 731-734, 2002.
- Cheigh, C. I., Kook, M. C., Kim, S. B., Hong, Y. H. and Pyun, Y. R., "Simple one-step purification of nisin Z from unclarified culture broth of *Lactococcus lactis* subsp *lactis* A164 using expanded bed ion exchange chromatography", *Biotechnol Lett*, 26(17): 1341-1345, 2004.
- Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F. and Chikindas, M. L., "Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation", *Int J Food Microbiol*, 71(1): 1-20, 2001.
- Cruz, L., Garden, R. W., Kaiser, H. J. and Sweedler, J. V., "Studies of the degradation products of nisin, a peptide antibiotic, using capillary electrophoresis with off-line mass spectrometry", *J Chromatogr A*, 735(1-2): 375-385, 1996.
- de Arauz, L. J., Jozala, A. F., Mazzola, P. G. and Penna, T. C. V., "Nisin biotechnological production and application: a review", *Trends Food Sci Tech*, 20(3-4): 146-154, 2009.
- De Martinis, E., Alves, V. and Franco, B., "Fundamentals and perspectives for the use of bacteriocins produced by lactic acid bacteria in meat products", *FOOD REV INT*, 18(2-3): 191-208, 2002.
- De Vos, W. M., Mulders, J., Siezen, R., Hugenholtz, J. and Kuipers, O., "Properties of nisin Z and distribution of its gene, *nisZ*, in *Lactococcus lactis*", *Appl Environ Microb*, 59(1): 213-218, 1993.
- Dischinger, J., Chipalu, S. B. and Bierbaum, G., "Lantibiotics: Promising candidates for future applications in health care", *Int J Med Microbiol*, 304(1): 51-62, 2014.
- Ellman, G. L., "Tissue sulfhydryl groups", *Arch Biochem Biophys*, 82(1): 70-77, 1959.
- FAO/WHO, "Evaluation of certain food additives and contaminants Introduction", *Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants: seventy-seventh report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*, 983: 1-75, 2013.
- Feeney, R. E., Yamasaki, R. B. and Geoghegan, K. F., "Chemical Modification of Proteins - an Overview", *Adv Chem Ser*, (198): 3-55, 1982.
- Field, D., Begley, M., O'Connor, P. M., Daly, K. M., Hugenholtz, F., Cotter, P. D., Hill, C. and Ross, R. P., "Bioengineered Nisin A Derivatives with Enhanced Activity against Both Gram Positive and Gram Negative Pathogens", *Plos One*, 7(10), 2012.
- Field, D., Connor, P. M. O., Cotter, P. D., Hill, C. and Ross, R. P., "The generation of nisin variants with enhanced activity against specific Gram-positive pathogens", *Mol Microbiol*, 69(1): 218-230, 2008.
- Fields, R., "[38] The rapid determination of amino groups with TNBS", *Methods in enzymology*, 25: 464-468, 1972.

- Galvez, A., Abriouel, H., Lopez, R. L. and Ben Omar, N., "Bacteriocin-based strategies for food biopreservation", *Int J Food Microbiol*, 120(1-2): 51-70, 2007.
- Gross, E. and Morell, J. L., "Structure of nisin", *J Am Chem Soc*, 93(18): 4634-4635, 1971.
- Guiotto, A., Pozzobon, M., Canevari, M., Manganelli, R., Scarin, M. and Veronese, F. M., "PEGylation of the antimicrobial peptide nisin A: problems and perspectives", *II Farmaco*, 58(1): 45-50, 2003.
- Hackenberger, C. P. R. and Schwarzer, D., "Chemoselective Ligation and Modification Strategies for Peptides and Proteins", *Angew Chem Int Edit*, 47(52): 10030-10074, 2008.
- Hansen, J. N., "Nisin as a Model Food Preservative", *Crit Rev Food Sci*, 34(1): 69-93, 1994.
- Hasper, H. E., Kramer, N. E., Smith, J. L., Hillman, J. D., Zachariah, C., Kuipers, O. P., de Kruijff, B. and Breukink, E., "An alternative bactericidal mechanism of action for lantibiotic peptides that target lipid II", *Science*, 313(5793): 1636-1637, 2006.
- Heng, N. C., Wescombe, P. A., Burton, J. P., Jack, R. W. and Tagg, J. R., The diversity of bacteriocins in Gram-positive bacteria. *Bacteriocins*, Springer: 45-92, (2007).
- Hermanson, G. T., *Bioconjugate techniques*, Academic press, (2013).
- Hnizda, A., Santrucek, J., Sanda, M., Strohalm, M. and Kodicek, M., "Reactivity of histidine and lysine side-chains with diethylpyrocarbonate - A method to identify surface exposed residues in proteins", *J Biochem Bioph Meth*, 70(6): 1091-1097, 2008.
- Jakubowski, H., "Protein homocysteinylation: possible mechanism underlying pathological consequences of elevated homocysteine levels", *Faseb J*, 13(15): 2277-2283, 1999.
- Jakubowski, H., "Protein homocysteinylation: possible mechanism underlying pathological consequences of elevated homocysteine levels", *The FASEB Journal*, 13(15): 2277-2283, 1999.
- Jalili, S., Yousefi, R., Papari, M.-M. and Moosavi-Movahedi, A. A., "Effect of homocysteine thiolactone on structure and aggregation propensity of bovine pancreatic insulin", *Protein J*, 30(5): 299-307, 2011.
- Klaenhammer, T. R., "Genetics of Bacteriocins Produced by Lactic-Acid Bacteria", *Fems Microbiol Rev*, 12(1-3): 39-86, 1993.
- Konkle, M. E., Elsenheimer, K. N., Hakala, K., Robicheaux, J. C., Weintraub, S. T. and Hunsicker-Wang, L. M., "Chemical Modification of the Rieske Protein from *Thermus thermophilus* Using Diethyl Pyrocarbonate Modifies Ligating Histidine 154 and Reduces the [2Fe-2S] Cluster", *Biochemistry-Us*, 49(34): 7272-7281, 2010.

- Koponen, O., Tolonen, M., Qiao, M. Q., Wahlstrom, G., Helin, J. and Saris, P. E. J., "NisB is required for the dehydration and NisC for the lanthionine formation in the post-translational modification of nisin", *Microbiol-Sgm*, 148: 3561-3568, 2002.
- Kuipers, O. P., Rollema, H. S., Beerthuyzen, M. M., Siezen, R. J. and deVos, W. M., "Protein engineering and biosynthesis of nisin and regulation of transcription of the structural nisA gene", *Int Dairy J*, 5(8): 785-795, 1995.
- Kuipers, O. P., Rollema, H. S., Yap, W., Boot, H. J., Siezen, R. J. and de Vos, W. M., "Engineering dehydrated amino acid residues in the antimicrobial peptide nisin", *J Biol Chem*, 267(34): 24340-24346, 1992.
- Kumar, M. S., Mrudula, T., Mitra, N. and Reddy, G. B., "Enhanced degradation and decreased stability of eye lens alpha-crystallin upon methylglyoxal modification", *Exp Eye Res*, 79(4): 577-583, 2004.
- Li, S. Y., Oyala, P. H., Britt, R. D., Weintraub, S. T. and Hunsicker-Wang, L. M., "Reactive sites and course of reduction in the Rieske protein", *J Biol Inorg Chem*, 22(4): 545-557, 2017.
- Liu, W. and Hansen, J. N., "Some Chemical and Physical-Properties of Nisin, a Small-Protein Antibiotic Produced by Lactococcus-Lactis", *Appl Environ Microb*, 56(8): 2551-2558, 1990.
- Liu, W. and Hansen, J. N., "Enhancement of the Chemical and Antimicrobial Properties of Subtilin by Site-Directed Mutagenesis", *J Biol Chem*, 267(35): 25078-25085, 1992.
- Lo, T. W. C., Westwood, M. E., Mclellan, A. C., Selwood, T. and Thornalley, P. J., "Binding and Modification of Proteins by Methylglyoxal under Physiological Conditions - a Kinetic and Mechanistic Study with N-Alpha-Acetylarginine, N-Alpha-Acetylcysteine, and N-Alpha-Acetyllysine, and Bovine Serum-Albumin", *J Biol Chem*, 269(51): 32299-32305, 1994.
- Lopes, N. A., Pinilla, C. M. B. and Brandelli, A., "Pectin and polygalacturonic acid-coated liposomes as novel delivery system for nisin: Preparation, characterization and release behavior", *Food Hydrocolloid*, 70: 1-7, 2017.
- Lundblad, R. L., Chemical reagents for protein modification, CRC press, (2014).
- Maher, S., Vilks, G., Kelleher, F., Lajoie, G. and McClean, S., "Chemical Modification of the Carboxyl Terminal of Nisin A with Biotin does not Abolish Antimicrobial Activity Against the Indicator Organism, *Kocuria rhizophila*", *Int J Pept Res Ther*, 15(3): 219-226, 2009.
- Marth, E. H., "Extended shelf life refrigerated foods: Microbiological quality and safety", *Food Technol-Chicago*, 52(2): 57-62, 1998.
- Mayr-Harting, A., Hedges, A. and Berkeley, R., "Chapter VII methods for studying bacteriocins", *Methods in microbiology*, 7: 315-422, 1972.

Minten, I. J., Abello, N., Schooneveld-Bergmans, M. E. F. and van den Berg, M. A., "Post-production modification of industrial enzymes", *Appl Microbiol Biot*, 98(14): 6215-6231, 2014.

Mukhopadhyay, S., Kar, M. and Das, K., "Effect of methylglyoxal modification of human α -crystallin on the structure, stability and chaperone function", *Protein J.*, 29(8): 551-566, 2010.

Muppalla, S. R., Sonavale, R., Chawla, S. P. and Sharma, A., "Functional properties of nisin-carbohydrate conjugates formed by radiation induced Maillard reaction", *Radiat Phys Chem*, 81(12): 1917-1922, 2012.

Narumi, R., Yamamoto, T., Inoue, A. and Arata, T., "Substrate-induced conformational changes in sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase probed by surface modification using diethylpyrocarbonate with mass spectrometry", *FEBS Letters*, 586(19): 3172-3178, 2012.

Pal, J. and Ghosh, S. K., "Influence of chemical modification of cysteine and histidine side chains upon subunit reassembly of alpha crystallin", *J Protein Chem*, 17(7): 617-632, 1998.

Parada, J. L., Caron, C. R., Medeiros, A. B. P. and Soccol, C. R., "Bacteriocins from lactic acid bacteria: Purification, properties and use as biopreservatives", *Braz Arch Biol Techn*, 50(3): 521-542, 2007.

Parmaksız, İ., "Advanced Glycation End-Products in Complications of Diabetes Mellitus", *Marmara Medical Journal*, 24(3): 8, 2011.

Perez, R. H., Perez, M. T. M. and Elegado, F. B., "Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: A Review of Biosynthesis, Mode of Action, Fermentative Production, Uses, and Prospects", *International Journal of Philippine Science and Technology*, 8(2): 61-67, 2015.

Perła-Kaján, J., Marczak, Ł., Kaján, L., Skowronek, P., Twardowski, T. and Jakubowski, H., "Modification by homocysteine thiolactone affects redox status of cytochrome C", *Biochemistry-Us*, 46(21): 6225-6231, 2007.

Pietkiewicz, J., Bronowicka-Szydelko, A., Dzierzba, K., Danielewicz, R. and Gamian, A., "Glycation of the Muscle-Specific Enolase by Reactive Carbonyls: Effect of Temperature and the Protection Role of Carnosine, Pirydoxamine and Phosphatidylserine", *Protein J*, 30(3): 149-158, 2011.

Pingitore, E. V., Salvucci, E., Sesma, F. and Nader-Macias, M. E., "Different strategies for purification of antimicrobial peptides from lactic acid bacteria (LAB)", *Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology*, 1: 557-568, 2007.

Plat, A., Kuipers, A., de Lange, J. G., Moll, G. N. and Rink, R., "Activity and Export of Engineered Nisin-(1-22) Analogs", *Polymers-Basel*, 3(3): 1282-1296, 2011.

- Prioult, G., Turcotte, C., Labarre, L., Lacroix, C. and Fliss, I., "Rapid purification of nisin Z using specific monoclonal antibody-coated magnetic beads", *Int Dairy J*, 10(9): 627-633, 2000.
- Rogers, L., "The inhibiting effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*", *J Bacteriol*, 16(5): 321, 1928.
- Rollema, H. S., Kuipers, O. P., Both, O., Devos, W. M. and Siezen, R. J., "Improvement of Solubility and Stability of the Antimicrobial Peptide Nisin by Protein Engineering", *Appl Environ Microb*, 61(8): 2873-2878, 1995.
- Rollema, H. S., Metzger, J. W., Both, P., Kuipers, O. P. and Siezen, R. J., "Structure and biological activity of chemically modified nisin A species", *Eur J Biochem*, 241(3): 716-722, 1996.
- Schägger, H., "Tricine-SDS-PAGE", *Nat Protoc*, 1(1): 16-22, 2006.
- Sen, A. K., Narbad, A., Horn, N., Dodd, H. M., Parr, A. J., Colquhoun, I. and Gasson, M. J., "Post-translational modification of nisin - The involvement of NisB in the dehydration process", *Eur J Biochem*, 261(2): 524-532, 1999.
- Severina, E., Severin, A. and Tomasz, A., "Antibacterial efficacy of nisin against multidrug-resistant Grampositive pathogens", *J Antimicrob Chemoth*, 41(3): 341-347, 1998.
- Sharma, G. S., Kumar, T. and Singh, L. R., "N-Homocysteinylation Induces Different Structural and Functional Consequences on Acidic and Basic Proteins", *Plos One*, 9(12), 2014.
- Sharma, G. S. and Singh, L. R., "Insights Into The Mechanism Of Protein Functional Loss Upon Covalent Modification By Homocysteine Thiolactone", *The FASEB Journal*, 31(1 Supplement): 603.604-603.604, 2017.
- Slootweg, J. C., Liskamp, R. M. J. and Rijkers, D. T. S., "Scalable purification of the lantibiotic nisin and isolation of chemical/enzymatic cleavage fragments suitable for semi-synthesis", *J Pept Sci*, 19(11): 692-699, 2013b.
- Slootweg, J. C., van der Wal, S., van Ufford, H. C. Q., Breukink, E., Liskamp, R. M. J. and Rijkers, D. T. S., "Synthesis, Antimicrobial Activity, and Membrane Permeabilizing Properties of C-Terminally Modified Nisin Conjugates Accessed by CuAAC", *Bioconjugate Chem*, 24(12): 2058-2066, 2013a.
- Spicer, C. D. and Davis, B. G., "Selective chemical protein modification", *Nat Commun*, 5, 2014.
- Stroylova, Y. Y., Zimny, J., Yousefi, R., Chobert, J. M., Jakubowski, H., Muronetz, V. I. and Haertle, T., "Aggregation and structural changes of alpha(S1)-, beta- and kappa-caseins induced by homocysteinylation", *Bba-Proteins Proteom*, 1814(10): 1234-1245, 2011.

- Suarez, A. M., Azcona, J. I., Rodríguez, J. M., Sanz, B. and Hernandez, P. E., "One-step purification of nisin A by immunoaffinity chromatography", *Appl Environ Microb*, 63(12): 4990-4992, 1997.
- Suarez, A. M., Azcona, J. I., Rodríguez, J. M., Sanz, B. and Hernandez, P. E., "One-step purification of nisin A by immunoaffinity chromatography", *Appl Environ Microb*, 63(12): 4990-4992, 1997.
- Taylor, T. M., Davidson, P. M. and Zhong, Q. X., "Extraction of nisin from a 2.5% commercial nisin product using methanol and ethanol solutions", *J Food Protect*, 70(5): 1272-1276, 2007.
- Tong, Z. C., Zhang, Y. J., Ling, J. Q., Ma, J. L., Huang, L. J. and Zhang, L. D., "An In Vitro Study on the Effects of Nisin on the Antibacterial Activities of 18 Antibiotics against *Enterococcus faecalis*", *Plos One*, 9(2), 2014.
- Van Den Hooven, H. W., Doeland, C. C. M., vandeKamp, M., Konings, R. N. H., Hilbers, C. W. and vandeVen, F. J. M., "Three-dimensional structure of the lantibiotic nisin in the presence of membrane-mimetic micelles of dodecylphosphocholine and of sodium dodecylsulphate", *Eur J Biochem*, 235(1-2): 382-393, 1996.
- van Kraaij, C., Breukink, E., Rollema, H. S., Bongers, R. S., Kusters, H. A., de Kruijff, B. and Kuipers, O. P., "Engineering a disulfide bond and free thiols in the lantibiotic nisin Z", *Eur J Biochem*, 267(3): 901-909, 2000.
- Wang, G., "Post-translational modifications of natural antimicrobial peptides and strategies for peptide engineering", *Current biotechnology*, 1(1): 72-79, 2012.
- Waterborg, J. H., "Acetic Acid—Urea Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Basic Proteins", *The protein protocols handbook*: 239-249, 2009.
- Waterborg, J. H., "The Lowry method for protein quantitation", *The protein protocols handbook*: 7-10, 2009.
- Westwood, M. E. and Thornalley, P. J., "Molecular Characteristics of Methylglyoxal-Modified Bovine and Human Serum Albumins - Comparison with Glucose-Derived Advanced Glycation Endproduct-Modified Serum Albumins", *Journal of Protein Chemistry*, 14(5): 359-372, 1995.
- Wilson-Stanford, S., Kalli, A., Hakansson, K., Kastrantas, J., Orugunty, R. S. and Smith, L., "Oxidation of Lanthionines Renders the Lantibiotic Nisin Inactive", *Appl Environ Microb*, 75(5): 1381-1387, 2009.
- Wolf, B., Lesnaw, J. A. and Reichmann, M. E., "A mechanism of the irreversible inactivation of bovine pancreatic ribonuclease by diethylpyrocarbonate", *The FEBS Journal*, 13(3): 519-525, 1970.
- Xiao, D., Davidson, P. M., D'Souza, D. H., Lin, J. and Zhong, Q. X., "Nisin extraction capacity of aqueous ethanol and methanol from a 2.5% preparation", *J Food Eng*, 100(2): 194-200, 2010.

- Yang, R. G., Johnson, M. C. and Ray, B., "Novel Method to Extract Large Amounts of Bacteriocins from Lactic-Acid Bacteria", *Appl Environ Microb*, 58(10): 3355-3359, 1992.
- Yang, S.-C., Lin, C.-H., Sung, C. T. and Fang, J.-Y., "Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals", *Front Microbiol*, 5: 241, 2014.
- Yeh, W.-J., Hsia, S.-M., Lee, W.-H. and Wu, C.-H., "Polyphenols with antiglycation activity and mechanisms of action: A review of recent findings", *Journal of Food and Drug Analysis*, 25(1): 84-92, 2017.
- Yıldırım, R., "Nisin üreticisi Lactococcus lactis subsp. lactis LL27 suşunun beyaz peynirde Listeria monocytogenes' in gelişiminin engellenmesi üzerine etkisi", Yüksek Lisans Tezi, *Ankara Üniversitesi* (2010).
- Yuan, J., Zhang, Z. Z., Chen, X. Z., Yang, W. and Huan, L. D., "Site-directed mutagenesis of the hinge region of nisinZ and properties of nisinZ mutants", *Appl Microbiol Biot*, 64(6): 806-815, 2004.
- Zacharof, M. and Lovitt, R., "Bacteriocins produced by lactic acid bacteria a review article", *APCBEE Procedia*, 2: 50-56, 2012.
- Zang, T. Z., Pottenplackel, L. P., Handy, D. E., Loscalzo, J., Dai, S. J., Deth, R. C., Zhou, Z. S. and Ma, J. S., "Comparison of Protein N-Homocysteinylation in Rat Plasma under Elevated Homocysteine Using a Specific Chemical Labeling Method", *Molecules*, 21(9), 2016.
- Zhou, Y. P. and Vachet, R. W., "Increased Protein Structural Resolution from Diethylpyrocarbonate-based Covalent Labeling and Mass Spectrometric Detection", *J Am Soc Mass Spectr*, 23(4): 708-717, 2012.

ÖZ GEÇMİŞ

Ezgi DEMİR ÖZER 05.04.1986 tarihinde Isparta'da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Isparta'da tamamladı. 2004 yılında girdiği Süleyman Demirel Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nden Haziran 2009'da mezun oldu. 2009-2012 yılları arasında Süleyman Demirel Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümünde yüksek lisans öğrenimini tamamladı. 2013-2014 öğretim yılında Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'ne araştırma görevlisi olarak atandı ve doktora öğrenimine devam etti. O tarihten beri yine aynı bölümde araştırma görevlisi olarak çalışmakta ve doktora öğrenimine devam etmektedir. Bilim dalındaki ilgi alanı süt bilimi ve teknolojisidir.

Tez Çalışmasından Üretilen Eserler

Bu tez çalışmasından, 1 (bir) adet ulusal makale ile 1 (bir) adet ulusal ve uluslararası çalışma üretilmiştir. Bu üretilen çalışmalar aşağıda sunulmuştur.

Demir Özer E. ve Yıldırım M.,” Nisinin Modifikasyonu”. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 8(Ek 1), 239-244, 2017.

Demir, E.Ö., Yıldırım, M. “Doğal Bir Koruyucu Olan Nisinin Modifikasyonu”. *İç Anadolu Bölgesi 2. Tarım ve Gıda Kongresi*, 154s., 28-30 Nisan, Nevşehir. 2015.

