

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**DEGLİKOLİZE KOLİSİN M VE K FORMLARININ BİTKİDE *IN VIVO*
ÜRETİMİ, SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE DOĞAL GIDA
KATKI MADDESİ OLARAK KULLANIM OLANAKLARI**

Merve ILGIN BÜYÜKSINDIR

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

MART 2023

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**DEGLİKOLİZE KOLİSİN M VE K FORMLARININ BİTKİDE *IN VIVO*
ÜRETİMİ, SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE DOĞAL GIDA
KATKI MADDESİ OLARAK KULLANIM OLANAKLARI**

Merve ILGIN BÜYÜKSINDIR

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

MART 2023

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DEGLİKOLİZE KOLİSİN M VE K FORMLARININ BİTKİDE *IN VIVO*
ÜRETİMİ, SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE DOĞAL GIDA
KATKI MADDESİ OLARAK KULLANIM OLANAKLARI**

Merve ILGIN BÜYÜKSINDIR

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

MART 2023

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DEGLİKOLİZE KOLİSİN M VE K FORMLARININ BİTKİDE *IN VIVO*
ÜRETİMİ, SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE DOĞAL GIDA
KATKI MADDESİ OLARAK KULLANIM OLANAKLARI**

Merve ILGIN BÜYÜKSINDIR

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

Bu tez 09/03/2023 tarihinde jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.

JÜRİ: Prof. Dr. Tarlan MAMMEDOV (Danışman)

Prof. Dr. Mehmet Fatih CENGİZ

Prof. Dr. İrfan TURHAN

Prof. Dr. Yaşar KARAKURT

Doç. Dr. Muhammet TONGUÇ

ÖZET

DEGLİKOLİZE KOLİSİN M VE K FORMLARININ BİTKİDE İN VİVO ÜRETİMİ, SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE DOĞAL GIDA KATKI MADDESİ OLARAK KULLANIM OLANAKLARI

Merve ILGIN BÜYÜKSINDIR

Doktora Tezi, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Tarlan MAMMEDOV

Mart 2023; 99 sayfa

Günümüzde gıdalarda yaygın olarak bulunan bakteriyel patojenlere karşı artan direnç, küresel halk sağlığı ve gıda güvenliği için kritik bir tehdit oluşturmaktadır. Ayrıca tüketicilerin kimyasal katkı maddesi içermeyen doğal gıdalara olan talebinin artması bilim insanlarını alternatif gıda koruyucuları bulmaya yöneltmiştir. Kolisinler, belirli *Escherichia coli* (*E. coli*) suşları tarafından üretilen, konakçı olmayan *E. coli* suşlarını öldüren ve diğer bakteri suşları ile rekabeti azaltmak için çevreye salınan antimikrobiyal proteinlerdir. Kolisin-M, dış hücre zarını tahrip ederek yakından ilişkili diğer bakteri suşlarına etki eden bu grubun bir üyesidir ve FDA tarafından güvenli (GRAS) olarak kabul edilmiştir, bu nedenle güçlü bir antimikrobiyal madde olarak büyük bir potansiyele sahiptir.

Kolisin M (CM), geçici ekspresyon sistemi kullanılarak bitkilerde rekombinant olarak eksprese edilmiş ve antimikrobiyal aktivitesi gösterilmiştir. Bakteriyel protein olarak kolisin M, doğal konakçılarda glikozile edilmez ve bu nedenle bitkiler dahil herhangi bir ökaryotik sistemde anormal şekilde glikozile edilir. Bakteriyel Endo H deglikozilasyon enzimi ile ortak ifade yoluyla hedef proteinleri glikozile edilmemiş bitkiler de dahil olmak üzere ökaryotik sistemde proteinler üretmek için sağlam bir teknoloji geliştirilmiştir. Bu teknoloji, şarbona, sıtmaya, Covid-19'a, kuduza karşı aşı üretmek ve bazı terapötikler için başarıyla uygulanmıştır. Bu çalışmanın amacı, *Nicotiana benthamiana* (*N. benthamiana*)'da N-glikozile edilmemiş, doğal benzeri formda Endo H deglikozilasyon teknolojisi kullanılarak rekombinant Kolisin-M üretmektir.

Bu çalışmada, enzimatik Endo H deglikozilasyon teknolojisi kullanılarak, *N. benthamiana* bitkisinde hem glikozile edilmiş (gCM) hem de-glikozile edilmiş (dCM) formda rekombinant kolisin M ürettik ve bunların antimikrobiyal aktivitesi ve stabilitesi karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Kolektif bulgularımız, dCM'nin glikozile edilmiş formuyla karşılaştırıldığında stabilitesinin ve aktivitesinin daha yüksek olduğunu gösterdi.

Karşılaştırma için Kolisin K (CK), *N. benthamiana*'da hem Endo H ile hem de Endo H olmadan ifade yoluyla üretildi. CK'nin birkaç potansiyel N-glikozile edilmiş bölgesi olmasına rağmen, sonuçlarımız CK'nin *N. benthamiana* bitkisinde eksprese edildiğinde glikozile olmadığını doğruladı. Rekombinant bitki tarafından üretilen proteinler (hem Endo H ile ortak ifade ile hem de olmadan), Ni-kolon afinite kromatografisi kullanılarak kısmen saflaştırıldı ve stabilize ve aktivite açısından

karakterize ettiğimiz kısmi saflaştırılmış CK proteinlerinde Endo H ile ifade edilen veya edilmeyen CK'ler arasında anlamlı bir fark gözlenmedi.

Tez çalışmasından elde edilen sonuçlar; bitkide üretimi gerçekleştirilen gCM ve dCM proteinlerinin SDS-PAGE ve Western-Blot analizine göre, moleküler kütleleri sırasıyla ~29 ve 26 kDa olarak bulunmuştur. Hem gCM hem de dCM'nin stabilite analizi, +4 °C, +25 °C ve +37 °C'de uzun süre (sırasıyla 4 ay, 12 gün ve 6 gün) incelenmiş ve dCM, glikozile edilmiş muadilleriyle karşılaştırmada tüm sıcaklıklarda üstün stabilite göstermiştir. Bitkide üretilen CM proteinlerinin antimikrobiyal aktivite testleri, seçilen *E. coli* DH5α ve ATCC 25322, *Salmonella* ATCC 17028 ve *Staphylococcus aureus* (S. aureus) ATCC25923 suşları üzerinde gerçekleştirilmiştir. Tüm aktivite testlerinde dCM proteini, glikozile edilmiş muadilinden daha aktif sonuçlar vermiştir. Sırasıyla aralarında, 3,8, 1,7, 4,4 ve 2,4 katlık bir oran çıkmıştır. Ek olarak, dCM'nin ekspresyon seviyesi ve saflaştırma verimi, glikozile edilmiş muadili ile karşılaştırıldığında 2 kat daha yüksek çıkmıştır.

Sonuç olarak, sonuçlarımız, deglikozile edilmiş Endo H teknolojisinin, glikozile edilmemiş diğer kolisinleri, doğal benzeri formlarında üretmek için kullanılabileceğini göstermektedir; bu, bu kolisinlerin bir gıda katkı maddesi olarak ticarileşme potansiyelini artırmak için önemli olacaktır.

ANAHTAR KELİMELE: *Agrobacterium tumefaciens*, antimikrobiyal protein, EndoH, gen aktarımı, Kolisin M ve K, Mikrobiyal aktivite, N-glikolizasyon, Protein saflaştırılması (His-Tag).

JÜRİ: Prof. Dr. Tarlan MAMMEDOV

Prof. Dr. Mehmet Fatih CENGİZ

Prof. Dr. İrfan TURHAN

Prof. Dr. Yaşar KARAKURT

Doç. Dr. Muhammet TONGUÇ

ABSTRACT

IN VIVO PRODUCTION, PURIFICATION, CHARACTERIZATION OF DEGLYCOLYSED COLICINE M AND K FORMS IN PLANT AND USAGE AS NATURAL FOOD ADDITIVES

Merve ILGIN BÜYÜKSINDIR

PhD Thesis in Agricultural Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Tarlan MAMMEDOV

March 2023; 99 pages

Today, increasing resistance of bacterial pathogens common in food poses a critical threat to global public health and food security. In addition, the increase in consumers' demand for natural food without chemical additives has led scientists to find alternative food preservatives. Colicins are antimicrobial proteins produced by certain strains of *Escherichia coli* (*E. coli*), which kill non-host *E. coli* strains and are released into the environment to reduce competition with other bacterial strains. Colicin-M is one member of this group that acts on other closely related bacterial strains by destroying their outer cell membrane and is recognized as safe (GRAS) by the FDA, therefore, it has great potential as a potent antimicrobial agent.

Colicin M has been recombinantly expressed in plants using the transient expression system and its antimicrobial activity was demonstrated. Colicin M as bacterial protein is not glycosylated in native hosts, and therefore, aberrantly glycosylated in any eukaryotic system including plants. A robust technology to produce proteins in eukaryotic system including plants in non-glycosylated, in their native-like form by co-expression target proteins with bacterial Endo H deglycosylation enzyme was developed. This technology has been successfully applied to produce vaccines against, malaria, Covid-19, rabies, and some therapeutics. The goal of this study is to produce recombinant Colicin-M in *Nicotiana benthamiana* (*N.benthamiana*) in non-N-glycosylated, native-like form using Endo H deglycosylation technology.

In this study, using enzymatic Endo H deglycosylation technology, we produced recombinant colicin M in the *N. benthamiana* plant in both glycosylated (gCM) and deglycosylated (dCM) forms, and their antimicrobial activity and stability were comparatively studied. Our collective findings demonstrated superior stability and activity of dCM compare with that of glycosylated form.

For comparison, Colicin K (CK) was also produced in *N. benthamiana* with or without Endo H by co-expression. Although, CK has several potential N-glycosylated sites, but our results confirmed that CK is not glycosylated when expresses in *N. benthamiana* plant. Both (with or without co-expression by Endo H) recombinant plant produced proteins were partially purified using Ni-column affinity chromatography and partial purified CK protein we characterized for stability and activity. No significant differences were observed between CKs, which were produced with or without co-expression with Endo H.

In conclusion, our results demonstrate that the deglycosylated Endo H technology can be used to produce other colicins in non-glycosylated, in their native-like form, which would be important to increase the commercialization potential of these colicins as a food additive.

KEYWORDS: *Agrobacterium tumefaciens*, Antimicrobial protein, Colicin M and K, Gene transfer, EndoH, Microbial activity, N-glycosylation, Protein purification (His-Tag).

COMMITTEE: Prof. Dr. Tarlan MAMMEDOV

Prof. Dr. Mehmet Fatih CENGİZ

Prof. Dr. İrfan TURHAN

Prof. Dr. Yaşar KARAKURT

Assoc. Prof. Dr. Muhammet TONGUÇ

ÖNSÖZ

İnsan nüfusunun her geçen gün arttığı dünyamızda güvenilir gıdaya ulaşma talebi ve bu talebin beraberinde getirdiği zorlukları aşabilmek için biyoteknoloji alanında gerçekleştirilmiş gelişmeler önemli bir yer tutmaktadır. Günümüzde endüstriyel anlamda üretilen gıdalarda yaygın şekilde kimyasal koruyucular ve antibiyotikler kullanılmaktadır. Bu koruyucuların bilinçsiz ve aşırı kullanımı maalesef antibiyotiğe dirençli mikroorganizmaların yaygınlaşmasına sebep olmuştur. Bilinçli tüketicilerin kimyasal içerikli gıda koruyucularını kullanmak istememeleri ve doğal olanına yönelmeleri sonucunda gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde yeni teknolojik çalışmalar yaygın şekilde gündeme gelmektedir.

Bu kapsamda biyoteknolojik yollarla üretilen ürünlerden biri de bakteriyel bir protein olan Kolisin M'dir. Kolisin M proteini, gıdalarda bozulmaya ve dolayısıyla insanlarda zehirlenme ve hatta ölümlere sebep olan birçok patojen mikroorganizmaya karşı inaktif etme özelliğine sahiptir. Kolisin M proteini doğrudan veya gıda yoluyla insanların tüketimine uygundur. İnsanlar üzerinde tespit edilmiş hiçbir zararı yoktur ve bağırsaklarda kısa sürede parçalanıp yok olabilmektedir. İnsanlık için kıymetli bir protein olan Kolisin M'nin rekombinant protein üretiminde yaygın olarak kullanılan model organizma *Nicotiana benthamiana*'dan kontrollü şatlar altında üretimi ölçek büyütme çalışmalarıyla çok büyük seralarda ve tarlalarda yılın her mevsimi gerçekleştirilebilir.

Bu çalışmaların ortaya koyduğu sonuç hem güvenilir ve ucuz hem de hızlı bir ekspresyon yöntemiyle yüksek ölçekli üretim sağlayarak bakteriyel bir gıda koruyucu proteini bitkiden elde etmemize olanak sağlamaktadır. Ayrıca, EndoH ile deglikolizasyon teknolojinin bitkide geçici ekspresyon sistemiyle üretilen proteinlerde kullanımının hem ekspresyon seviyesini arttırdığını hem de stabilite ve aktivite testlerinde glikolize muadiline kıyasla daha iyi sonuçlar verdiğini daha önce bu teknolojiyle üretilmiş olan birçok farklı protein ile ispatlanmıştır. Bu teknoloji daha birçok çalışmada değerlendirilerek ülke ekonomilerine katkı sağlayacaktır.

Kolisin M proteinine ait genin uygun plazmitlere klonlanmasından, bitkide *Agrobacterium* aracılığıyla proteinin glikolize ve EndoH ile deglikolize formlarının üretimi, His etiketli proteinlerin saflaştırılması ve aktivite ve stabilite testleriyle kıyaslanmalarına kadarki tüm basamakları bünyesinde barındıran bu tez çalışmasının özellikle ülkemizde ve dünyada farklı gıda koruyucusu proteinlerin üretimine de ışık tutacağı düşünülmektedir. Gıdaya olan talebin asla azalmayacağı ve nüfusun artışıyla birlikte her geçen gün daha da artacağını düşürsek ülkemizin böyle teknolojileri kullanmaya daha fazla ihtiyacı olduğunu ön görebiliriz. Böylelikle gıda endüstrisinde kullanılan doğal gıda koruyucularının daha fazlasının ülkemizde üretilmeye başlanması ile hem akademik ve bilimsel anlamda çalışan birçok insana faydalı olacak, hem yeni iş imkânları ortaya çıkacak hem de katma değeri yüksek ürünler sayesinde ülke ekonomisi güçlenecek ve dışa bağımlılığımız biraz daha azalacaktır.

Bana bu tez konusunu çalışmama fırsat ve imkân sağladığı için ve doktora sürecimde bilgi ve donanım kazanmama yardımlarından dolayı değerli danışman hocam Prof. Dr. Tarlan MAMMEDOV'a çok teşekkür eder saygılarımı sunarım.

Ayrıca, doktora eğitimim boyunca hep desteğini üzerimde bildiğim, vazgeçtiğim her anda bana olan güveniyle bu yolda yürümeme katkı sağlayan, ondan öğrendiğim akademik bilgileri ve çalışma ahlakını doktora hayatımın her alanında kullandığım çok kıymetli Yüksek Lisans danışman hocam ve Tez İzleme Komitesi üyesi Prof. Dr. İrfan TURHAN'a sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım. Beraberinde diğer Tez İzleme Komitesi üyesi Prof. Dr. Mehmet Fatih CENGİZ'e de bilgi ve deneyimleriyle verdiği katkılardan dolayı çok teşekkür ederim. Tezimde kullandığım bazı mikroorganizmaların teminini sağlayan Yıldız Teknik Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Ömer ŞİMŞEK hocama ve ekibine teşekkür ederim.

Doktora eğitimim süresince “YÖK 100/2000 Öncelikli Alanlar” ve “TÜBİTAK 2211-A Yurt İçi Doktora Burs Programı” ile finansal olarak beni destekleyen YÖK ve TÜBİTAK'a da teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım süresince laboratuvarıda işlerimi kolaylaştırıp bana destek sağlayan sevgili Mamedov Lab. ekibine, aynı kaderi paylaştığımız lisansüstü ofis arkadaşlarıma ve ayrıca bu meşakkatli yola birlikte çıktığım, her zorlukta birlikte ağlayıp ardından birlikte güldüğüm, zorda kaldığım her anda duruşumdan ve bakışımdan beni anlayıp, derdimle dertlenip birlikte bir çıkış yolu aradığım ve şimdi bu yolu birlikte tamamladığım kıymetli arkadaşım Fadime DEMİREL'e ne kadar teşekkür etsem az. Laboratuvar içi ve dışında gerek yaptığım deneylerde gerekse ihtiyacım olan her konuda desteklerini benden esirgemeyen, motivasyonumu hep yukarılara taşıyan değerli arkadaşlarım Fatma AKÇAKALE KABA, Arş. Gör. Adem KABA ve Emirhan CİHAN'a da çok teşekkür ederim.

Eğitim hayatımın en başından bu yana okutmaktan, destek olmaktan bir an bile vazgeçmeyen, her daim arkamda duran, başarılarımla gururlanıp düştüğümde kaldıran, gecesini gündüzüne katıp var gücüyle eğitimim için çabalayan ve bu noktaya gelmemde en büyük pay sahibi olan biricik annem Nafiye ve babam Raci ILGIN en büyük teşekkürüm sizlere... Ve canım abim Tuncay ILGIN ve kardeşim Berna, desteğinizi her daim bilmek beni hep güçlü kıldı. Son olarak sevgili eşim Muhammed Ali BÜYÜKSINDIR, tanışmamızdan bu yana öğrenci olmamın getirdiği stres, zorluk ve daha ne varsa benimle seve seve paylaştığın, bu yolda benimle gönüllü olarak yürüdüğün, bana olan inancınla cesaretlendirdiğin, sabrın ve anlayışınla zor günlerime ortak olduğun ve güzel günlere beni hep inandırdığın için iyi ki sen...

Tezimi, gelişini dört gözle beklediğim biricik kızım Meva BÜYÜKSINDIR'a ithaf ediyorum.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
AKADEMİK BEYAN	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI.....	9
2.1. Antimikrobiyal Proteinler.....	9
2.2. Bakteriyosinler	10
2.3. Bakteriyosinlerin Sınıflandırılmaları.....	10
2.3.1. Gram pozitif bakteriler tarafından üretilenler.....	11
2.3.2. Gram negatif bakteriler tarafından üretilenler	12
2.4. Kolisin M ve K'nin Antimikrobiyal Etki Mekanizması.....	14
2.4.1. Dış zar hücre yüzeyi reseptörlerine (FhuA, Tsx) bağlanma	14
2.4.2. Translokasyon.....	14
2.4.3. Sitotoksik aktivite	14
2.5. Bakteriyosinlerin / Kolisinlerin Gıda Biyoteknolojisindeki Uygulamaları.....	16
2.6. Rekombinant Protein Ekspresyon Sistemleri	17
2.6.1. Bitki ekspresyon sistemleri.....	19
2.6.2. Bitkilerde rekombinant protein üretimi için ifade türleri	20
2.6.3. Bitkilerde rekombinant protein üretimi için uygun konukçu bitkilerin seçimi.....	23
2.7. Bitkilerde Post Translasyonel Modifikasyonlar	24
2.7.1. Glikozilasyon.....	24
2.7.2. N-bağlı glikozilasyon:	24
2.7.3. Deglikozilasyon enzimi EndoH ile <i>in vivo</i> deglikozilasyon stratejisi	25
3. MATERYAL VE METOT	27
3.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Tampon Çözeltiler, Besiyerleri ve Hazır Kitler ...	27
3.1.1. Gen klonlama çalışmalarında agaroz jel için gerekli tampon çözeltiler ve kullanılan kitler.....	28

3.1.2. Western-Blot ve SDS-PAGE için kullanılan tampon çözeltiler	29
3.1.3. Bakteriyel Büyüme ve Geliştirme Ortamları	31
3.1.4. Protein Saflaştırma (His-tag) Tamponları	32
3.2. Mikrobiyolojik Çalışmalar	33
3.3. Tez Çalışmasında Kullanılan Bakteriyel Suşlar ve Genlerin Tasarımı	36
3.4. CM1 ve CK1 Genlerinin Klonlama Çalışmaları, <i>N. benthamiana</i> Bitkilerinde İnfiltrasyon Yoluyla CM1 ve CK1 Proteinlerinin Glikolize ve EndoH ile Deglikolize Formlarının Geçici İfadesi	36
3.5. <i>N. benthamiana</i> 'da Üretilen gCM1 ve gCK1 ile Endo H ile Deglikolize Forma Getirilen dCM1 ve dCK1 Proteinlerinin Saflaştırılması	40
3.6. <i>In Vivo</i> Olarak <i>N. benthamiana</i> 'da Üretilen gCM1 ve dCM1 ile gCK1 ve dCK1 Proteinlerinin <i>In Vitro</i> Olarak Ticari Endo H Enzimiyle Kesimi	41
3.7. <i>N. benthamiana</i> 'da <i>In Vivo</i> Üretilen Glikozile CM1'in Deglikozile Muadili ile Karşılıklı Stabilite Çalışması	42
3.8. SDS-PAGE ve Western Blot Analizi	42
3.9 <i>N. benthamiana</i> 'da <i>In Vivo</i> Üretilen gCM1 ve dCM1'in Biyolojik Aktivite Testleri	43
3.9.1. Mikrobiyal suşlar	43
3.9.2. CM1'in besiyeri ortamında antibakteriyel aktivite testi	43
3.9.3. CM1'in gıda numunesi üzerindeki bakteriyel bulaşmaya karşın aktivite testi ve kantitatif bakteri sayımı	44
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	46
4.1. Kolisin M ve K'nin Klonlanması, <i>N. benthamiana</i> Bitkilerine İnfiltrasyonu ve Ekspresyonu	46
4.2. <i>N. benthamiana</i> Bitkisinde Üretilen CM1 ve CK1 Proteinlerinin Saflaştırılması	50
4.3. <i>In Vivo</i> Olarak <i>N. benthamiana</i> 'da Üretilen gCM1 ve dCM1 ile gCK1 ve dCK1 Proteinlerinin <i>In Vitro</i> Olarak Ticari EndoH Enzimiyle Kesimi	52
4.4. <i>In Vivo</i> Deglikozile Edilmiş CM1 ve Glikozile CM1 Formlarının Karşılıklı Stabilite Çalışması	53
4.5. CM1'in Besiyeri Ortamında Antibakteriyel Aktivite Testi	55
4.6. CM1'in Gıda Numunesi Üzerindeki Bakteriyel Bulaşmaya Karşın Aktivite Testi ve Kantitatif Bakteri Sayımı	56

4.6.1. <i>E. coli</i> DH5 α suşu üzerinde aktiflik testi.....	57
4.6.2. <i>E. coli</i> ATCC 25322 suşu üzerinde aktiflik testi	60
4.6.3. <i>S. aureus</i> ATCC 25923 suşu üzerinde aktiflik testi.....	64
4.6.4. <i>Salmonella</i> ATCC 17028 suşu üzerinde aktiflik testi	74
4.7. CK Proteini ile Et Numunesi Üzerinde Yapılan Aktivite Testi	83
5. SONUÇLAR	87
6. KAYNAKLAR	89
ÖZGEÇMİŞ	



AKADEMİK BEYAN

Doktora Tezi olarak sunduğum “Deglikolize Kolisin M ve K Formlarının Bitkide *In Vivo* Üretimi, Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Doğal Gıda Katkı Maddesi Olarak Kullanım Olanakları” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

09/03/2023

Merve ILGIN BÜYÜKSINDIR



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

g	: Gram
kDa	: Kilo Dalton
L	: Litre
LB	: Lysogeny Broth
μL	: Mikrolitre
μg	: Mikrogram
μg	: Mikrogram
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
M	: Molar
ng	: Nanogram
rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı
X	: Kat
°C	: Santigrat Derece

Tezde ondalık ayırıcı olarak virgül (,) kullanılmıştır (Örn. “21,01”).

Kısaltmalar

bp	: Baz Çifti
OD	: Optik Yoğunluk
PTM	: Post-Translasyonel Modifikasyon
UV	: Ultraviyole

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Kolisinlerin gözenek oluşturucu (Kolisin K) ve peptidoglikan sentezini inhibe edici (Kolisin M) aktiviteleri ile antimikrobiyal etki mekanizmaları	15
Şekil 2.2. T-DNA ikili klonlama vektörünün ekspresyon için ilgilenilen bir gene sahip olarak oluşturulması.....	21
Şekil 2.3. Bitki transformasyonu için ikili klonlama sisteminin oluşturulması	22
Şekil 2.4. Endo H enziminin glikoproteinde glikan bölgesini kesimi	26
Şekil 3.1. CM1 ve CK1 genlerinin pEAQ vektörüne ligasyonu ve <i>E. coli</i> 'de çoğaltılması aşamaları	38
Şekil 3.2. CM1 ve CK1 genlerini taşıyan ekspresyon vektörünün <i>A. tumefaciens</i> suşlarına elektroporasyonu.....	38
Şekil 3.3. pEAQ-CM1 ve pEAQ-CK1 plazmitlerini taşıyan <i>A. tumefaciens</i> AGL-1 ve EHA-105 suşlarının LB+kan platede ve BBL+kan sıvı besiyerinde geliştirilmesi ...	39
Şekil 3.4. <i>N. benthamiana</i> bitkilerinin yapraklarına <i>A. tumefaciens</i> aracılığıyla infiltrasyon uygulaması.....	39
Şekil 3.5. İnfiltrasyon yapılan <i>N. benthamiana</i> bitkilerinden farklı dpi'da alınan yaprak kesitlerinin ekstraksiyon ve örnek hazırlama işlemleri	40
Şekil 3.6. His-etiketli glikolize ve deglikolize CM1 ve CK1 proteinlerinin IMAC afinite kromatografisi	41
Şekil 3.7. Bakteriyel seri seyreltme hazırlama ve seyreltme faktörü hesaplama	44
Şekil 3.8. Bakteriyel aktivite testinde gerçekleştirilen basamaklar	45
Şekil 4.1. Kodon optimizasyonu yapılmış ve bitkide ifadesi için uygun şekle getirilmiş gen dizisi	46
Şekil 4.2. Restriksiyon enzimleriyle kesilip taşıyıcı plazmit PUC57'den ayrılan CM1 ve CK1 genlerinin agaroz jel görüntüsü.....	46
Şekil 4.3. pEAQ vektörü (temsili) ve restriksiyon enzimleriyle kesilip yapışkan uçlu duruma gelmiş agaroz jel görüntüsü	47
Şekil 4.4. pEAQ vektörü ile birleştirilen CM1 ve CK1 genlerinin <i>E. coli</i> 'de büyütüldükten sonra seçilen kolonilerin plazmit izolasyonu sonucu agaroz jel görüntüleri	47

Şekil 4.5. CM1 ve CK1 genlerinin farklı <i>Agrobacterium</i> suşlarında ekspresyonlarını gösteren Western-Blot görüntüleri.....	48
Şekil 4.6. İklim odasında uygun koşullarda yetiştirilen ve yapraklarına infiltrasyon yapılan <i>N. benthamiana</i> bitkileri.....	49
Şekil 4.7. Saflaştırması yapılmış gCM1 ve dCM1 proteinlerinin Western-Blot görüntüsü; pp (plant produce) APA-100 ng (80 kDa)	49
Şekil 4.8. Saflaştırma sonrası glikolize ve deglikolize CM1 proteinlerinin SDS-PAGE ve Western-Blot görüntüleri.....	50
Şekil 4.9. Saflaştırması yapılmış gCK1 ve dCK1 proteinlerinin Western-Blot görüntüsü.....	51
Şekil 4.10. <i>In vivo</i> üretilen glikolize ve deglikolize CM1 ve CK1 proteinlerinin <i>in vitro</i> ticari EndoH enzimiyle kesimi sonucunu gösteren Western-Blot görüntüleri.....	52
Şekil 4.11. Glikolize ve deglikolize CM1 proteininin 37 °C’de stabilite sonucu Western-Blot görüntüleri	54
Şekil 4.12. Glikolize ve deglikolize CM1 proteininin 25 °C’de stabilite sonucu Western-Blot görüntüleri.	54
Şekil 4.13. Glikolize ve deglikolize CM1 proteininin 4 °C’de stabilite sonucu Western-Blot görüntüleri	55
Şekil 4.14. <i>E. coli</i> DH5α bakterileri üzerinde 3, 4 ve 5 µg glikolize ve deglikolize CM1 proteinlerinin aktivite testi sonucu petri görüntüleri	56
Şekil 4.15. <i>E. coli</i> DH5α üzerinde gCM1 ve dCM1 proteinlerinin 1. tekrar aktivite testi sonucu petri görüntüleri ve kob/g et logaritmik ifadesini veren grafik	57
Şekil 4.16. <i>E. coli</i> DH5α üzerinde gCM1 ve dCM1 proteinlerinin 2. tekrar aktivite testi sonucu petri görüntüleri ve kob/g et logaritmik ifadesini veren grafik	58
Şekil 4.17. <i>E. coli</i> DH5α üzerinde gCM1 ve dCM1 proteinlerinin 3. tekrar aktivite testi sonucu petri görüntüleri ve kob/g et logaritmik ifadesini veren grafik	59
Şekil 4.18. <i>E. coli</i> ATCC 25322 üzerinde 1, 3 ve 5 µg gCM1 ve dCM1 proteinlerinin aktivite testi sonucu petri görüntüleri.....	60
Şekil 4.19. <i>E. coli</i> ATCC 25322 üzerinde gCM1 ve dCM1 proteinlerinin 1. tekrar aktivite testi sonucu petri görüntüleri ve kob/g et logaritmik ifadesini veren grafik	61
Şekil 4.20. <i>E. coli</i> ATCC 25322 üzerinde gCM1 ve dCM1 proteinlerinin 2. tekrar aktivite testi sonucu petri görüntüleri ve kob/g et logaritmik ifadesini veren grafik	62

Şekil 4.21. <i>E. coli</i> ATCC 25322 üzerinde gCM1 ve dCM1 proteinlerinin 3. tekrar aktivite testi sonucu petri görüntüleri ve kob/g et logaritmik ifadesini veren grafik	63
Şekil 4.22. <i>S. aureus</i> ATCC 25923 üzerinde farklı konsantrasyonlarda gCM1 ve dCM1 proteinlerinin aktivite testi sonucu petri görüntüleri (1 gün).....	65
Şekil 4.23. <i>S. aureus</i> ATCC 25923 üzerinde gCM1 ve dCM1 proteinlerinin aktivite testi sonucu petri görüntüleri ve kob/g et logaritmik ifadesini veren grafik (1 gün)	65
Şekil 4.24. <i>S. aureus</i> ATCC 25923 üzerinde farklı konsantrasyonlarda gCM1 ve dCM1 proteinlerinin aktivite testi sonucu petri görüntüleri (3 gün).....	66
Şekil 4.25. <i>S. aureus</i> ATCC 25923 üzerinde gCM1 ve dCM1 proteinlerinin aktivite testi sonucu petri görüntüleri ve kob/g et logaritmik ifadesini veren grafik (3 gün)	67
Şekil 4.26. <i>S. aureus</i> ATCC 25923 üzerinde gCM1 ve dCM1 proteinlerinin 1. tekrar aktivite testi sonucu petri görüntüleri ve kob/g et logaritmik ifadesini veren grafik (1 gün).....	68
Şekil 4.27. <i>S. aureus</i> ATCC 25923 üzerinde gCM1 ve dCM1 proteinlerinin 2. tekrar aktivite testi sonucu petri görüntüleri ve kob/g et logaritmik ifadesini veren grafik (1 gün).....	69
Şekil 4.28. <i>S. aureus</i> ATCC 25923 üzerinde gCM1 ve dCM1 proteinlerinin 3. tekrar aktivite testi sonucu petri görüntüleri ve kob/g et logaritmik ifadesini veren grafik (1 gün).....	70
Şekil 4.29. <i>S. aureus</i> ATCC 25923 üzerinde gCM1 ve dCM1 proteinlerinin 3. tekrar aktivite testi sonucu petri görüntüleri ve kob/g et logaritmik ifadesini veren grafik (3 gün).....	71
Şekil 4.30. <i>S. aureus</i> ATCC 25923 üzerinde gCM1 ve dCM1 proteinlerinin 4. tekrar aktivite testi sonucu petri görüntüleri ve kob/g et logaritmik ifadesini veren grafik (1 gün).....	72
Şekil 4.31. <i>S. aureus</i> ATCC 25923 üzerinde gCM1 ve dCM1 proteinlerinin 4. tekrar aktivite testi sonucu petri görüntüleri ve kob/g et logaritmik ifadesini veren grafik (3 gün).....	73
Şekil 4.32. <i>Salmonella</i> ATCC 14028 üzerinde farklı konsantrasyonlarda gCM1 ve dCM1 proteinlerinin aktivite testi (1 gün)	75
Şekil 4.33. <i>Salmonella</i> ATCC 14028 üzerinde gCM1 ve dCM1 proteinlerinin aktivite testi sonucu petri görüntüleri ve kob/g et logaritmik ifadesini veren grafik (1 gün)	75
Şekil 4.34. <i>Salmonella</i> ATCC 14028 üzerinde gCM1 ve dCM1 proteinlerinin 1. tekrar aktivite testi sonucu petri görüntüleri ve kob/g et logaritmik ifadesini veren grafik (1 gün).....	76

Şekil 4.35. <i>Salmonella</i> ATCC 14028 üzerinde gCM1 ve dCM1 proteinlerinin 2. tekrar aktivite testi sonucu petri görüntüleri ve kob/g et logaritmik ifadesini veren grafik (1 gün).....	77
Şekil 4.36. <i>Salmonella</i> ATCC 14028 üzerinde gCM1 ve dCM1 proteinlerinin 3. tekrar aktivite testi sonucu petri görüntüleri ve kob/g et logaritmik ifadesini veren grafik (1 gün).....	78
Şekil 4.37. <i>Salmonella</i> ATCC 14028 üzerinde gCM1 ve dCM1 proteinlerinin 3. tekrar aktivite testi sonucu petri görüntüleri ve kob/g et logaritmik ifadesini veren grafik (3 gün).....	79
Şekil 4.38. <i>Salmonella</i> ATCC 14028 üzerinde gCM1 ve dCM1 proteinlerinin 4. tekrar aktivite testi sonucu petri görüntüleri ve kob/g et logaritmik ifadesini veren grafik (1 gün).....	80
Şekil 4.39. <i>Salmonella</i> ATCC 14028 üzerinde gCM1 ve dCM1 proteinlerinin 4. tekrar aktivite testi sonucu petri görüntüleri ve kob/g et logaritmik ifadesini veren grafik (3 gün).....	81
Şekil 4.40. 5 µg dCM1 proteininin <i>E. coli</i> DH5α, <i>E. coli</i> ATCC 25322, <i>S. aureus</i> ATCC 25923 ve <i>Salmonella</i> ATCC 17028 üzerindeki aktifliği	832
Şekil 4.41. <i>S. aureus</i> (ATCC 25923) üzerinde gCK1 ve dCK1 proteinlerinin aktivite testi sonucu petri görüntüleri ve kob/g et logaritmik ifadesini veren grafik (1 gün)	83

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Rekombinant protein ekspresyon sistemlerinin karşılaştırılması	18
Çizelge 3.1. %10 ve %12'lik poliakrilamid jellerin bileşimleri	30
Çizelge 4.1. CM1 proteininin <i>E. coli</i> DH5α üzerindeki tekrarlı aktiflik testi sonuçları .	59
Çizelge 4.2. CM1 proteininin <i>E. coli</i> ATCC 25322 üzerindeki tekrarlı aktiflik testi sonuçları	64
Çizelge 4.3. 5 µg gCM1 ve dCM1 proteinlerinin <i>S. aureus</i> ATCC 25923 üzerinde +4 °C'de 1 ve 3 günlük tekrarlı aktiflik testi sonuçlarının karşılaştırılması	74
Çizelge 4.4. 5 µg gCM1 ve dCM1 proteinlerinin <i>Salmonella</i> ATCC 14028 üzerinde +4 °C'de 1 ve 3 günlük tekrarlı aktiflik testi sonuçlarının karşılaştırılması	81

1. GİRİŞ

Mikrobiyal gıda kaynaklı hastalıklar, artan insan nüfusu ve sağlıklı, sürdürülebilir gıda kaynaklarına olan talep ile çoğalan, küresel olarak devam eden bir sorun olmaya devam etmektedir. Patojenik ve gıda bozulmasına neden olan organizmalar, tüketici ölümlerine, ekonomik etkilere ve büyük hacimlerde gıda israfına neden olur (Meade vd. 2020). Gram-negatif *Salmonella enterica*, *Campylobacter jejuni* ve Gram-pozitif *Listeria monocytogenes* ve *Clostridium perfringens* gibi bakteri türleri yaygın gıda kaynaklı patojenlerdir. Shiga toksin üreten *Escherichia coli* (STEC) suşlarının bir alt kümesi olan Enterohemorajik *Escherichia coli* (EHEC) dünya genelinde bakteriyel enterik enfeksiyonların önde gelen nedenlerinden biridir. Bu hastalıklar, kontamine olmuş hayvansal ürünlerin ve sebzelerin tüketimiyle ilişkilendirilmiştir. Günümüzde, termal olarak inaktivasyon dışında, gıdadaki patojen bakterileri ortadan kaldırmak için etkili bir yöntem yoktur (Schulz vd. 2015). Ancak, gıda zincirini üretimin tüm aşamalarında mikrobiyal kontaminasyondan korumak da, halk sağlığı güvenliğini sağlamak için büyük önem taşımaktadır (Meade vd. 2020). Günümüzde artık gıda güvenliği açısından kimyasal koruyucu kullanımının önlenmesi konusunda farkındalık artmıştır. Gıda zehirlenmesi başta olmak üzere birçok gıda kaynaklı bozulmaya sebep olan patojenlerin antimikrobiyal dirençlerinin artmasıyla birlikte insanların güvenli gıdaya ulaşma talebi de hızla yaygınlaşmıştır. Antimikrobiyal direnç mikroorganizmaların (bakteri, protozoa, mantar veya virüs) patojenik aktivitelerini yok etmek için kullanılan antimikrobiyal ilaçlar varlığında hala büyümeye ve gelişmeye devam etme yeteneğidir (Thapar ve Salooja 2022).

Dünya çapında gıda kaynaklı hastalıklara ilişkin raporlar ve antibiyotiğe dirençli patojen bakterilerin yaygınlığı derinleşen bir küresel sorun haline gelmiştir. Bu durum gıdalarımızın güvenliğini sağlamak için yeni müdahaleleri zorunlu kılmaktadır (Laxminarayan vd. 2020). 20. yüzyılda bilim insanlarının çalışmaları neticesinde antibiyotikler ve bakteriyosinler olmak üzere iki farklı antimikrobiyal molekül grubu keşfedilmiştir. Antibiyotikler ikincil metabolitler olarak üretilen biyolojik olarak aktif ikincil metabolitler olarak literatüre geçerken, bakteriyosinleri ribozomal olarak kodlanmış peptitler veya proteinler olarak tanımlamışlardır. Antibiyotikler ağırlıklı olarak *Streptomyces* cinsi bakteriler tarafından üretilip geniş bir bakteri spektrumuna karşı etkilidirler. Buna karşılık bakteriyosinler ise, dar bir etki spektrumuna sahip olabilirler ancak çok çeşitli bakteriler tarafından üretilebilme avantajına sahiptirler. Özellikle *E. coli* ve ayrıca yakından ilişkili *Shigella* izolatlarından üretimi mevcuttur. Ayrıca, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Enterobacter* ve *Leclercia* cinslerine ait diğer enterobakteriyel türler arasında da bakteriyosin üretimine rastlanmış fakat *E. coli* ile karşılaştırıldığında üretim performansı daha düşük görülmüştür. Antibiyotikler bakteriyel enfeksiyonlarla baş etme şeklini temelden değiştirip patojen suşlara karşı dirençsiz duruma gelince bakteriyosinlerin kullanımı antibiyotiklere karşı potansiyel bir alternatif haline gelmiştir (Meade vd. 2020; Bosák vd. 2021). 21. yüzyılın başlangıcıyla birlikte, patojen bakterilerin geliştirdiği antibiyotik direncindeki artışla kontrolsüz antibiyotik kullanımının sona ermesi gerektiği düşüncesi yaygın hale gelmiştir. Mikroplar, antimikrobiyal direncin gelişmesiyle sonuçlanan antibiyotik ilaçların mekanizmasını aşma yeteneğine sahiptir. Mevcut birçok kanıt, büyük miktarlarda geleneksel antibiyotiklerin sık kullanımının ilaca dirençli patojenlere, özellikle de antibiyotiğe dirençli bakterilere yol açtığını göstermiştir (Shanmugaraj vd. 2021). Halihazırda, bir dizi antibiyotiğe dirençli patojenlerin, ölüm dahil olmak üzere

ciddi sağlık komplikasyonlarına yol açtığı bilinmektedir (Organization 2014). Avrupa Birliği tarafından yapılan çalışmalardan birinde, *Salmonella* spp.'nin hindi, kırmızı et ve domuzdan izole edilen türlerinde sülfonamid, tetrasiklin, ampisilin ve florokinolonlar gibi antibiyotiklere karşı antimikrobiyal direnç gösterdikleri belirlenmiştir. Ayrıca, hem et ve hindilerden izole edilen *E. coli*'nin farklı türleri hem de bu hayvansal gıdaları tükettikten sonra gıda zehirlenmesi yaşayan hastalar sülfonamid, tetrasiklin ve ampisilin gibi antibiyotiklerine karşı antimikrobiyal direnç göstermişlerdir (Dall 2020). Raf ömrünü uzatmak, mikrobiyal büyümeyi ve olası bozulmayı geciktirmek için gıdalara antibiyotikler veya gıda koruyucular (örn., Nitrit ve kükürt dioksit) ilave edilmeye başlanmıştır. Fakat, çoğu ticari koruyucu kimyasal sentez yoluyla geliştirilmektedir ve sentetik koruyucuların uzun süreli tüketimi insan vücudu üzerinde olumsuz etkilere sebep olabilmektedir (Yang vd. 2014). Ayrıca hayvancılık üretiminde çiftliklerde aşırı antibiyotik kullanımı, toprak ve su kaynaklarının kirlenmesine neden olmaktadır. Çevredeki antibiyotik rezervuarlarının sürekli seçici baskısına maruz kalan bakteriler, antibiyotik direnç genleri geliştirmeye meyillidir. Antibiyotiklere karşı bakteriyel direnç geliştirme tehdidi, hükümetleri yemdeki kullanımlarını sınırlamaya ve bilim insanlarını patojenlere karşı yeni çözümler aramaya yöneltmiştir (Woolhouse vd. 2015). Avrupa Komisyonu Antimikrobiyal Direnç Eylem Planı, yeni antimikrobiyaller veya antibiyotiklere alternatifler geliştirmeye büyük önem vermektedir. Avrupa İlaç Ajansı, bulaşıcı hastalıklar için tedavi alternatifleri konusunda birçok yeniliği teşvik etmektedir ve bu durum benzer şekilde Amerika Birleşik Devletleri'nde ve diğer ülkelerde de görülmektedir (Anderson vd. 2020; Mader vd. 2021). Ayrıca bilim insanları, COVID-19 pandemisinin antibiyotiklere karşı bakteriyel direnç oranını artırabileceğini ve 2050 yılına kadar antimikrobiyal direncin yılda 10 milyon ölümden sorumlu olabileceğini tahmin ediyor (Strathdee vd. 2020). Bundan dolayı, doğal kaynaklı antibiyotik olmayan ama anti-mikrobiyal etkinlik gösteren maddeler (antimikrobiyal proteinler ve peptitler (AMPs)), araştırmacıların ilgi odağı olmuştur (Łojewska vd. 2020). AMP'ler, hemen hemen her canlı organizmada doğal olarak bulunan geniş bir molekül grubudur. İnsanlarda, hayvanlarda, böceklerde, bitkilerde, mantarlarda ve bakterilerde bulunurlar (Bahar ve Ren 2013). Bitkiler, böcekler, memeliler, mikroorganizmalar dahil olmak üzere tüm canlı formlarda bulunan ve konakçı organizmanın doğuştan gelen bağışıklık sisteminde önemli bir rol oynayan kısa peptit sınıfıdır. AMP'ler, son birkaç yılda yenilikçi antibiyotikler olarak oldukça önem kazanmıştır. Bu peptitlerin, hücre zarında bulunan biyolojik moleküllerin işlevselliğini engelleyerek mikroorganizmaları duyarlı hale getirdiği ve üzerlerinde antimikrobiyal aktiviteye sahip oldukları gösterilmiştir (Shanmugaraj vd. 2021). Güvenlikleri açısından önemli olan, peptitlerin kolay bozunmalarından dolayı ortamdaki dayanıklılıklarının antibiyotiklere göre daha kısa olmasıdır. AMP'ler genellikle oldukça küçüktür (15-50 amino asit) ve negatif yüklü bakteri zarına bağlanmaya yardımcı olan pozitif bir yüke sahiptirler, çünkü bu proteinler bir organizmanın ilk savunma mekanizmasına katkıda bulunurlar. Antibiyotiklerin aksine bakteriyosinlerin antimikrobiyal ilaç olarak kullanılması, kommensal ve faydalı bakterilerin öldürülmesi nedeniyle bağırsak mikrobiyal dengesizliği tehlikesi oluşturmaz. Bu gibi avantajlarından dolayı, AMP'ler hem insanlar ve hayvanlarda farmasötik kullanımda hem de gıda ve yemlerde kullanım için oldukça faydalı koruyucular haline gelmiştir (Drider vd. 2016; Ahmad vd. 2017).

İnsan kaynaklı gıda hastalıklarına; *Salmonella enterica* spp., *Campylobacter*, *Listeria monocytogenes* ve *Shiga* toksin üreten *E. coli* (STEC) suşlarının bir alt kümesi

olan Enterohemorajik *E. coli* (EHEC) bakterileri neden olmaktadır. Bu önemli patojenik bakteriler doğrudan ve dolaylı olarak her yıl 2 milyondan fazla hastalığa ve 750 ölüme neden olmakta ve ABD ekonomisine yıllık 8 milyar dolardan fazlaya mal olmaktadır. Bir EHEC serotipi olan *E. coli* O157: H7 ve diğer ilgili STEC suşları oldukça virülenttir. Bu nedenle gıda endüstrisi, özellikle gıdalardaki *E. coli* O157: H7 ile mücadele etmek için yıllık 2 milyar doları aşkın harcama yapmaktadır. Günümüzde, termal olarak inaktivasyon dışında, gıdadaki patojen bakterileri ortadan kaldırmak için etkili bir yöntem yoktur (Callaway ve Sheridan 2015; Schulz vd. 2015).

Bakteriyosinler, gıda muhafazası ve güvenliği konusunda alternatif bir koruyucu olarak kullanılabilmektedir. Gıdalarda istenmeyen ve patojenitesi olan çeşitli mikroorganizmalar üzerinde inhibitör etki gösteren ribozomal sentezlenmiş proteinlerdir (Thapar ve Salooja 2022). Bakteriyosinler, genel olarak güvenli gıda katkı maddeleri olarak kabul edilirler ve gastrointestinal sistem tarafından alındıktan sonra vücuda bir zararı yoktur (Yang vd. 2014). Özellikle Gr-pozitif veya Gr-negatif bakteriler tarafından sentezlenen bir AMP olan bakteriyosinler düşük konsantrasyonlarda bile aktiftirler, oldukça seçicidirler ve organizmanın ilk savunma mekanizmasına katkıda bulunurlar (Dridr vd. 2016). Bakteriyosinlerin üretiminde, gram pozitif laktik asit bakterileri önemli bir yere sahip oldukları kadar *Pseudomonadaceae* ve *Enterobacteriaceae* gibi çeşitli gram negatif bakteriler arasında da üretimi yaygındır (Michel-Briand ve Baysse 2002; Cascales vd. 2007; Kleantous 2010). Antibiyotiklerin aksine, bağırsaktaki komensal ve faydalı bakterileri öldürmeyip mikrobiyal tehlikeye sebep olmamasından dolayı antimikrobiyal ilaçlar olarak kullanılmaktadırlar (Cavera vd. 2015). Ayrıca, bakteriyosinlerin çoğu ısı stabilitesine sahip olup, asidik gıdalarda aktivite gösterebilmekte ve sindirim sistemi orijinli proteolitik enzimlerle parçalanabilmektedir (Łojewska vd. 2020).

Bakteriyosinler genel olarak 3 sınıfa ayrılmışlardır. 5 kDa'dan az olan Sınıf I bakteriyosinler, uygun formu oluşturmak için post-translasyonel modifikasyonlara ve ardından bölünmeye uğrayan, lantionin ve metillantionin amino asitlerinden oluşan küçük, proteolize ve ısıya dayanıklı peptitlerden oluşur. Sınıf II bakteriyosinler (<10 kDa) dört alt tipten oluşur (pediosin benzeri, iki peptit, dairesel ve pediosin benzeri olmayan lineer) ve küçük lantionin içermeyen, modifiye edilmemiş, membran aktif, sıcaklığa ve pH dirençli polipeptitlerdir. Son olarak, Sınıf III bakteriyosinler büyük (>30 kDa) ısıya dayanıklı proteinlerdir (O'Bryan vd. 2018; Kumariya vd. 2019).

E. coli bakteriyosinleri, moleküler yapılarına ve boyutlarına göre mikrosinler ve kolisinler olarak sınıflandırılırlar. Mikrosinler, 10 kDa'ya kadar moleküler ağırlığa sahip sıcaklığa, pH'a ve proteaza dirençli oligopeptitlerdir. Kromozomal veya plazmit kodludurlar ve sıklıkla post-translasyonel olarak modifiye edilirler. Bugün 13 farklı mikrosin tipi (B17, C, D93, H47, J25, L, M, N, PDI, S, V, 15m ve 15n) tanımlanmış ve çeşitli moleküler karakterizasyon seviyelerine göre analiz edilmiştir. Mikrosinler, genellikle sitoplazmik membranı, protein sentezi enzimlerini veya nükleik asit metabolizmasında yer alan enzimleri hedef alır (Duquesne vd. 2007; Baquero vd. 2019).

Bakteriyosinlerin tanımlanmasına yönelik ilk ve en kapsamlı çalışma 1925'te Gratia tarafından keşfedilen ve *E. coli* tarafından sentezlenen kolisin'in tespit edilmesiyle başlamıştır (Dridr vd. 2016). Kolisinler, patojen özellikteki *E. coli*'nin suşlarını öldüren veya büyümesini inhibe eden ve yine *E. coli*'nin belirli patojenik olmayan suşları

tarafından üretilen doğal, antibiyotik olmayan bakteriyosin sınıfı bir AMP grubudur. (Schneider vd. 2018a). Kolisinler, moleküler ağırlığı 100 kDa'a kadar olan proteinlerdir (çoğunlukla 25-80 kDa), yalnızca plazmitler üzerinde kodlanırlar ve çoğunlukla operonlarda bulunurlar (Ch  rier vd. 2021). Bugün, *E. coli* izolatları arasında yirmi beş kolisin tipi tanımlanmış ve değişen ayrıntı seviyelerine göre karakterize edilmiştir (A, B, D, E1- E9, Ia, Ib, JS, K, M, N, R, S4, U, Y, Z, 5 ve 10) (Cascales vd. 2007; Kleanthous 2010).

İlgili gram-negatif bakteri *E. coli*'nin patojenik su  larını kontrol etmek için yeni alternatifler ararken, yakın zamanda kolisinlere çok fazla ilgi gösterilmiştir. Kolisin, ekolojik baskınlık oluşturmak için *E. coli*'nin diğer suşlarının büyümesini engeller veya inhibe eder. Kolisine benzer bakteriyosinler yapısal olarak üç alanda düzenlenir: Bakteriyel translokasyon proteinlerinin aracılık ettiği hücre dış zarı boyunca aktarımdan sorumlu bir amino-terminal translokasyon (T) alanı, bakteriyel dış zarı boyunca transferde yer alan ve etkileşime girmekten sorumlu merkezi bir reseptör-bağlanma (R) alanı ve antibakteriyel sitotoksik aktiviteden sorumlu karboksi-terminal (C) alanı. Kolisin üreten bakteriyel hücreleri sitotoksik aktivitelerinden korumak için, immünite proteinleri adı verilen inhibitörler eşzamanlı olarak üretilir (Kleanthous 2010; Ch  rier vd. 2021). Kolisinler, gram negatif bakteriler tarafından üretilen tüm bakteriyosinlerden farklı olarak büyük proteinlerdir. Hücre zarında por oluşturarak kolisinlerin büyüklükleri 449–629 amino asit arasında değişim gösterir (Schneider vd. 2018b).

Literatür çalışmalarına bakıldığında, *E. coli* O157: H7 ile kontamine olmuş etlerin kullanıldığı deneylerde, kolisinlerin patojen popülasyonunu en az 2 log kadar azalttığı g  r  lm    tur (Schulz vd. 2015). Et ve et ürünlerinde majör patojenik STEC kontrolüne yönelik umut verici gıda katkı maddeleri oldukları söylenmiştir (Stephan vd. 2017). Ayrıca gıdalarda kritik gıda kaynaklı patojenik tür olan *E. coli* O157: H7'nin yanı sıra *Salmonella* spp., *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Listeria*, *Shigella* ve diğer bazı *E. coli* su  larını da inhibe ettiği ispatlanmıştır (Callaway ve Sheridan 2015; Bos  k vd. 2021).

Gıda endüstrisi tarafından gıda güvenliği konusundaki mücadelede antimikrobiyal proteinlerin benimsenmesinin önündeki en önemli engel, mevcut fermentasyona dayalı yaklaşımları kullanan yüksek üretim maliyetleridir (McNulty vd. 2020). Ayrıca bakteriyel yöntem ya da memeli sistemlerinde üretilen rekombinant protein maliyetin yanı sıra, translasyon sonrası modifikasyonlar (PTM), mikrobiyal veya patojen bulaşma riski engeline de takılmaktadır (Mamedov vd. 2012). Bu durum bitki kaynaklı platformlardan bu tür ürünlerin üretilmesi beklentisini arttırmıştır. Bitki ekspresyon sistemlerinde AMPs   retimi, tüm dünyada birçok araştırma ekibi tarafından üstlenilen bir fikirdir (Lee vd. 2017; Gonelimali vd. 2018; McNulty vd. 2020). 1986'da, rekombinant insan büyüme hormonu, transgenik tütün ve ay   eğinde üretilen ilk bitki kaynaklı farmasötik protein olarak literatüre geçmiştir (Barta vd. 1986). Bitkilerde yaygın olarak ifade edilen kolisin de bir AMPs olup farklı tipleri karakterize edilmiş ve gıdalarda *E. coli*'yi kontrol etmek için gıda katkı maddeleri olarak m  kemm   adaylar oldukları keşfedilmiştir (Schulz vd. 2015). ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) ve ABD Tarım Bakanlığı (USDA) tarafından bitki, meyve ve sebze ve et ürünlerine uygulanacak antimikrobiyaller olarak 'Genel Olarak Güvenli Olarak Tanınır' (Grassin ve Fauquembergue-GRAS) statüsünde oldukları kabul edilmiştir. Bu sebeple, kolisinler gıda kaynaklı *E. coli* enfeksiyonlarının kontrolünü sağlamada gıda katkı maddeleri veya gıda işleme yardımcıları olarak

ticarileştirilebilmeleri için yoğun şekilde çalışılmaktadırlar Schneider (Schneider vd. 2018a; Łojewska vd. 2020).

Bitki üretim sistemleri model bir konakçı organizma olup, uygun ökaryotik protein modifikasyonları, düşük maliyet, üretimleri esnasında hayvan veya insan patojenlerinden uzakta olmalarıyla ve yüksek miktarlarda üretimi yapılacak ürünler için uygun sistem oluşlarıyla diğer üretim sistemlerine göre üstünlük sağlamaktadırlar. Genellikle aşı adayları, terapötik proteinler, enzimler ve antikorlar gibi farmasötik ürünler üretmek için kullanılır (Moreira vd. 2020; Planas vd. 2021). Aynı zamanda potansiyel pandemileri kontrol etmek için eşi benzeri görülmemiş bir hızda ve güvenilirlikte özel post translasyonel modifikasyonlarla biyolojik üretime izin vermektedir. Bununla birlikte, bitkilerin, öngörülebilir gelecekte biyolojik üretim için birincil konakçı olarak memeli hücrelerinin yerini alması çok muhtemeldir (Chen ve Davis 2016; Łojewska vd. 2020). Tüm bunların yanı sıra, transgenik bitki yaklaşımında, esas olarak uzun üretim süresi ile ilişkili bazı endişeler vardır. Ancak, bitki geçici ifade sistemi, kalıcı ifadeye göre bir takım avantajlara sahiptir (Rattanapisit vd. 2020).

Tütünün vahşi bir akrabası olan *N. benthamiana* bitkisi, biyo-farmasötikler, aşılar ve biyomateryaller dahil olmak üzere çeşitli rekombinant proteinleri üretmek için tercih edilen konakçı organizma haline gelmiştir (Tusé vd. 2015; Mamedov vd. 2016; Pillet vd. 2016; Mamedov vd. 2017b). *N. benthamiana*'nın, çok çeşitli rekombinant proteinleri üretmek için tercih edilme sebeplerinden birincisi, gıda dışı bir türde üretim sağlamasıdır. İkincisi, bu bitki türü kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır; genetiği, fizyolojisi ve agronomisi iyi anlaşılmıştır ve ayrıca transgenik ekspresyonda kullanılırken çok yüksek rekombinant protein ekspresyon seviyeleri sağlar. Üçüncüsü, *N. benthamiana*'nın güvenliği IND (Investigational New Drug) altında klinik değerlendirmede kanıtlandığı gibi, insan aşıları, antikorlar ve diğer proteinler dahil olmak üzere çeşitli ürünlerin üretim konakçısı olarak kullanımı FDA tarafından da kabul edilmiştir (Stephan vd. 2017). Tüm bu sebeplerden dolayı *N. benthamiana* geçici ekspresyon sistemi, gıda koruyucusu adayı olan Kolisin M (CM1) yapısal proteininin uygun maliyetli, güvenli ve hızlı üretimi için ideal bir platform olabilir.

Dikkate değer olarak, bitki yapımı kolisinler, FDA ve ABD Tarım Bakanlığı (USDA) tarafından GRAS olarak listelenmiş ve geniş bir alana *E. coli* antibakteriyelleri olarak uygulanmasına izin verilmiştir. Bitkiden üretilen kolisinler, hem bitki hem de hayvansal gıda ürünlerinde patojenik *E. coli*'nin geniş kontrolü için etkili bir şekilde kullanılabilir. Özellikle, et ve ürünlerde majör patojenik Shiga toksini üreten *E. coli* serovarlarının kontrolüne yönelik umut verici gıda katkı maddeleridir (Schulz vd. 2015; Stephan vd. 2017).

Ayrıca yapılan bir çalışmada, *N. benthamiana*'da üretildiğinde, gıda antimikrobiyalleri olarak kolisinlerin amaçlanan kullanımına dayalı olarak hesaplanan maksimum günlük nikotin alımı, evrensel olarak domates, patates veya patlıcan gibi nikotin içeren gıdaları yemekten kaynaklanan nikotin alımından çok daha düşüktür ve standart diyetimizin bir parçası olarak güvenle tüketilebilir (Stephan vd. 2017). Kolisinlerin günümüzde potansiyel patojenikliğe sahip suşlardan elde edilmesi, kolisin gen sekansının patojenik olmayan bir suşa veya başka bir konakçıya aktarılmasını içeren genetik mühendisliği yöntemlerinin kullanımını gerektirmektedir (Łojewska vd. 2020).

Hızla yaşanan nüfus artışı ve buna paralel olarak artan bağışıklık sisteminin baskılanmasıyla, salgınların zararlı etkileri halk sağlığı açısından daha önemli hale gelmiştir, böylece gıda zinciri boyunca gıda güvenliğini artırmak için yeni yöntemler geliştirme ve uygulama ihtiyacı doğmuştur (Callaway ve Sheridan 2015). Son yıllarda, çoklu ilaca dirençli patojenlerin sayısının artması ciddi bir sorun haline gelmiştir ve yeni nesil antimikrobiyal ajanların bulunması veya geliştirilmesi giderek önem kazanmıştır (Yang vd. 2014).

Bakteriyosinlerin gıda güvenliği konusundaki önemi ve gıdalarda uygulanabilirliği de literatürde önemli bir yer kapsamaktadır. Daha önce yapılan çalışmalarda yaygın kullanılan bazı bakteriyosinlerin birçok gıda uygulamasında koruyucu olarak kullanıldığı gösterilmiştir. Bakteriyosinler, peynir ürünlerinde *C. botulinum* sporlarının çimlenmesini (Mathur vd. 2018) ve soğutulmuş süt ürünlerinde *L. monocytogenes* büyümesini önlemek için kullanıldığı yerlerde nisinli gıda koruyucuları olarak başarıyla uygulanmıştır (Silva vd. 2018). Çalışmalar ayrıca işlenmiş peynirde *S. aureus*, *B. cereus* ve *B. Subtilis*'e karşı nisin aktivitesini tanımlamıştır (Field vd. 2018). Gram pozitif *Lactococcus lactis* 6F3 suşu tarafından üretilen nisin, mikrobiyal direnç göstermeden elli yılı aşkın bir süredir bir gıda koruyucusu olarak başarıyla uygulanmaktadır (Meade vd. 2020). Diğer yandan pediosin, hazır gıda ürünlerinde *L. monocytogenes* büyümesini engelleme potansiyeli göstermektedir. ABD ve Kanada'da micocin olarak pazarlanan carnocyclin A, yemeye hazır et ürünlerinde *L. monocytogenes*'i inhibe etmek için geliştirilmiştir (da Costa vd. 2019). Gıda ürünlerinde kullanılan bakteriyosinler, tüketicinin yüksek kaliteli ve kimyasal ürün kullanılarak işlenmemiş güvenli gıda talebini karşılamaya yardımcı olur (Meade vd. 2020). Bununla birlikte bakteriyosinler, gıda maddelerinin raf ömrünü ve güvenliğini artırmak için diğer koruma yöntemleriyle birlikte de kullanılabilir. Kanatlı hayvanlarda *C. jejuni*'nin kontrolü, dünya çapında artan *Campylobacter* enfeksiyonlarının sayısı ile halk sağlığı güvenliği için devam eden bir sorun olmaya devam etmektedir (Sarp vd. 2016). Kanatlı hayvan yemine bakteriyosinlerin eklenmesi, enfeksiyonlu türlerin azaltılmasına yardımcı olabilir. Çalışmalar, polivinilpirolidon içinde kapsüllenmiş bakteriyosin enterosin içeren yemlerin kümes hayvanlarında *C. Jejuni*'nin popülasyonunu azalttığını göstermiştir (Ben Lagha vd. 2017). Gıda ürünlerinde kullanım için bu peptitlerin, geniş bir aktivite spektrumuna sahip olması, tüketiciler için güvenli olması, ısı ve pH kararlılığı ve gıda matrisinde çözünür ve kararlı olması gibi bazı temel özelliklere sahip olması gerekir (Field vd. 2018).

Kolisinlerin GRAS statüsünde olmaları güvenli olduklarını ve hem gıdalarda hem de insan ve veterinerlik alanlarında uygulanabilir olduklarını göstermektedir. Kolisinler, insan bağırsığında ortak enterik bakteriler tarafından endojen olarak üretilen doğal olarak oluşan antibakteriyel proteinlerdir. Kolisinlerin alerjenik olduğuna veya aşırı duyarlılık riski oluşturduğuna dair herhangi bir rapor bulunmamaktadır. Bitki yapımı rekombinant kolisin proteinlerinin bileşimleri, bakteriyel kolisin proteinlerinininkile eşleşmektedir. Bitki yapımı kolisinlerin spesifik aktiviteleri (etkinliği), bakteriyel kolisinler için bildirilenler aralığındadır. Ayrıca, hayvanların bağırsaklarındaki bakterileri kontrol etmek için antibiyotik alternatifleri olarak kolisin/bakteriyosin bazlı yem tedavileri uygulanmaktadır. İnsan gastrointestinal sistemdeki bakteri veya virüsleri kontrol etmek için fonksiyonel (tıbbi) gıdalar olarak tüketilebilmektedir. Gıda sektöründe kalorisiz tatlandırıcılar, tat değiştiriciler vb. olarak bakteriyosinlerin kullanımı mevcuttur (örneğin, taumatin). Ek olarak gıdaya eklenen antikorlar veya lektinler (griffithsin) gibi antiviraller

(örneğin, norovirüs, rotavirüs, grip kontrolü) olarak kullanım alanları vardır. Kolisinlerin insanlar tarafından tüketilmesinin bazı sağlıksal problemlere yol açabileceği üzerine yapılmış olan çalışmalara istinaden, kolisin içeren gıdaların tüketilmeden önce ısıtma işlemine tabi tutulması termal olarak kolisinleri inaktive etmektedir. Ayrıca pişirme yapılmadan tüketilen gıdalarda da insan midesindeki düşük pH sebebiyle parçalanıp denatüre olmakta ve üst ve orta gastrointestinal sistemdeki proteazlar tarafından hızla sindirilmektedirler. Dolayısıyla insan sağlığına doğrudan tüketilerek bir zararının olmadığı saptanmıştır. (Hahn-Löbmann vd. 2019).

Kolisinler, *E. coli* suşları tarafından üretilen bir bakteriyosin grubudur. Bunlar arasında kolisin M, etkili bir antibakteriyel protein olarak kullanılmasını sağlayan spesifik özelliklere sahiptir. Bakteri hücre duvarı polimer peptidoglikan sentezini bloke eden bilinen tek kolisindir. Çünkü bugüne kadar tanımlanan tüm diğer kolisinler ya bir zar gözenek oluşturucu ya da bir nükleaz aktivitesi sergilemiştir (Barreteau vd. 2020). Kolisin M, 271 amino asit kalıntısı içerir; moleküler kütlesi yaklaşık 29 kDa'dır, bu da onu bilinen tüm kolisinler arasında en küçüklerinden biri yapar. Alım ve yer değiştirme adımları için, FhuA reseptörü ve Ton sistemini kullanır. (Chérrier vd. 2021). Etki mekanizması, peptidoglikan lipid ara maddesinin fosfoester bağının hidrolize edilmesine dayanır. Bu peptidoglikanaz, duyarlı hücrelere girmek için bir FhuA reseptör yolu kullanır. 10'dan daha az kolisin M molekülü, tek bir bakteri hücrelerini öldürebilir, bu da onu çok etkili bir ilaç yapar (Łojewska vd. 2020). Kolisin M'nin geçici ifadesinde konakçı bitki olarak tütün, ıspanak ve yapraklı pancar gibi yenilebilir türler kullanılmaktadır (Schulz vd. 2015; Stephan vd. 2017). Patojenik *E. coli* suşlarının geniş kontrolü için bitki kaynaklı kolisinler hem büyük ölçekli üretim hem de ucuz bir gıda koruyucusu olarak önerilmektedir. Çoğu kolisin türünün bitkilerde yüksek verimlerde eksprese edilebildiğini ve tamamen işlevsel olduğunu literatürde yapılmış olan çalışmalar göstermektedir (Callaway ve Sheridan 2015; Schulz vd. 2015). Fakat tütün ile yapılan çalışmalarda bugüne kadar, farklı bitkilere kıyasla 10 kata kadar daha yüksek rekombinant kolisin üretimi görülmüştür (Schulz vd. 2015). Günümüzde, tütünün özellikle *N. benthamiana* türünde kolisinlerin ekspresyonuna büyük ilgi vardır. Son araştırmalar, bu protein grubunun özellikle antibiyotiklere veya yeni gıda işleme yardımcılara uygulanabilir bir alternatif olarak benzersiz bir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir (Paškevičius vd. 2017; Schneider vd. 2018b; Hahn-Löbmann vd. 2019; Olshevska vd. 2019). Ancak *N. benthamiana*'da yapılan bu girişimler, PTM sınırlamalar ve dolayısıyla güvenlik problemi nedeniyle sınırlandırılmıştır. Çünkü ökaryotik bir sisteme sahip olan *N. benthamiana* bitkisinde protein ekspresyonu sırasında PTM gerçekleşmektedir. Karbonhidratların bağlanması proteinin spesifik aktivite, stabilite, ligand-reseptör etkileşimleri, immünojeniklik gibi fizyokimyasal özelliklerini değiştirir. Dolayısıyla elde edilen protein *in vivo* kullanıldığında güvenlik riski oluşturabilir (Mamedov vd. 2012); (Mamedov ve Yusibov 2014). Bu tez çalışmasında bu eksikliğin *in vivo* deglikozile edici enzimle giderilmesi hedeflenmiştir. Rekombinant kolisin proteininin bu enzimlerle *in vivo* ve *in vitro* olarak kesilmesi sonucunda tamamen aktif olduğu gösterilecek olup *in vivo* enzimatik deglikozilasyonunun, glikozile olan muadilinden daha fazla stabil ve aktif olduğu kanıtlanacaktır. Çalışmalarda konakçı organizma olarak transgenik *N. benthamiana* bitkileri kullanılmıştır. *N. benthamiana* hızlı büyümesi ve iyi anlaşılmış genetik ve metabolik süreçleri nedeniyle moleküler tarım için örnek bir bitkidir. Ayrıca, yüksek rekombinant protein verimine sahip olduğundan, farklı endüstrilerde uygulamaları olan proteinler üretmek için iyi bir seçim olarak kabul edilmiştir (Mamedov

vd. 2016; Mamedov vd. 2017b; Mammedov 2017). *N. benthamiana* bitkilerinde *in vivo* deglikozile formda CM1 proteini üretilmiş ve deglikozilasyon için deglikozile edici enzim Endo H (Endo- β -N-acetylglucosaminidase) enzimi kullanılmıştır (Mamedov vd. 2017b). Bu sayede, bitkide üretilen deglikozile edilmiş kolisin M proteininin, gelecekte yüksek potansiyelli birer gıda koruyucusu adayı olacağı öngörülmektedir. Tez çalışmasındaki bulgularımız neticesinde, bitkilerden elde edilen rekombinant dCM1'in ticari, farmasötik ve tarımsal kullanım için gelecekteki ilgi çekici adaylardan olabileceği düşünülmektedir.

Bu tez çalışmasında, *N. benthamiana* bitki ekspresyon sisteminde glikozile ve deglikozile formda ifade edilen CM1 ve CK1 için basit ve ucuz bir üretim stratejisi kurulmuştur. Bu kolisinler, aktivitelerinin daha geniş ve daha yüksek olmasından dolayı diğerlerinden seçilmiştir (Stephan vd. 2017). Çalışma kapsamında, deglikozilasyon enzimlerinin, CM1 ve CK1 genlerinin tasarımı, genlerin ifade vektörüne klonlanması, genleri içeren vektörün *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*)'e transformasyonu, vektörlerin CM1 ve CK1'in glikozile edilmiş ve deglikozile edilmiş formlarının üretimi için şırıngayla *N. benthamiana* bitkisine aktarılması gerçekleştirilmiştir. Ardından belirlenen gün sonrasında, *N. benthamiana*'da ekspresyonu tamamlanan hedef proteinlerin ekstraksiyonu, saflaştırılması, stabilite, aktivite ve antimikrobiyal testleri yapıp et numunesi üzerinde etkinliği test edilmiştir. Bu çalışmalar neticesinde, proteinin glikolize ve deglikolize formları arasındaki farklılıklar ortaya konmuştur.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Antimikrobiyal Proteinler

AMP'ler, hemen hemen her canlı organizmada doğal olarak bulunan geniş bir molekül grubudur. İnsanlarda, hayvanlarda, böceklerde, bitkilerde, mantarlarda ve bakterilerde bulunurlar (Bahar ve Ren 2013). AMP'ler genellikle oldukça küçüktür (15-50 amino asit) ve bu proteinler bir organizmanın ilk savunma mekanizmasına katkıda bulunduğundan, negatif yüklü bakteri zarına bağlanmaya yardımcı olan pozitif bir yüke sahiptirler (Łojewska vd. 2020). Antibiyotiklerin hem insan ve hayvan sağlığında hem de çiftçilik uygulamalarında aşırı ve bilinçsiz kullanımı, bakterilerde antibiyotik direncini artırmıştır. Özellikle gıda üretiminde uygunsuz antibiyotik kullanımı dirençli bakterilerin gelişimi ile ilişkilendirilmektedir (Lagadinou vd. 2020). Antibiyotiğe dirençli bakteriler artık ulusal sağlık kuruluşları tarafından büyük ve hızla artmakta olan bir tehdit olarak görülüyor ve bu da bakteriler ve özellikle patojen suşlarıyla mücadele etmek için yeni stratejilere olan ihtiyacı birinci öncelik haline getirmektedir. Küresel antibiyotik kullanımının 2030 yılına kadar yüksek gelirli ülkelerde %67 artacağı ve Brezilya, Rusya Federasyonu, Hindistan, Çin ve Güney Afrika'da neredeyse iki katına çıkacağı öngörülmektedir (Van Boeckel vd. 2015). Dünya Sağlık Örgütü'ne (Organization 2017) göre, antibiyotiklerin insan ve hayvanlarda aşırı ve yanlış kullanımının yanı sıra antibiyotiklerin geniş spektrumlu öldürmeye neden olma kapasitesi dünya çapında hızla artan ve artık ciddi bir halk sağlığı sorunu haline gelen çoklu ilaca dirençli bakterilerin ortaya çıkmasına neden olmuştur. Bilinçsiz antibiyotik kullanımı, yılda 700.000 insanı öldürüyor. Ayrıca bilim adamları, COVID-19 pandemisinin antibiyotiklere karşı bakteri direnci oranını bile artırabileceğini ve 2050 yılına kadar antimikrobiyal direncin yılda 10 milyon ölümden sorumlu olabileceğini tahmin ediyor ve bu durumun toplam maliyeti 100 trilyon ABD dolarını bulmaktadır (de Kraker vd. 2016; Strathdee vd. 2020). Gram-negatif bakteriler olarak *Enterobacteriaceae*, antimikrobiyal ajanlara direnç gösterme kapasiteleriyle ünlüdür (Hawkey 2015; Li vd. 2015). Ayrıca *Enterobacteriaceae* ölümle sonuçlanan vakalardan sorumlu olsalar da hepsi patojen tür değildir. Bu da onları yeni ilaç geliştirmek için önemli bir hedef haline getirir (Bonomo vd. 2017; MacVane 2017).

Antimikrobiyal dirençli bakteriler, yeni ilaçların geliştirilmesinden daha hızlı ortaya çıkıp yayılmaktadır. Ayrıca, son otuz yılda geliştirilen ve onaylanan antibiyotiklerin sayısının yarıdan fazla azalması gerçeği bilim insanlarını yeni antimikrobiyal ajanlar veya stratejiler geliştirmeye yöneltmiştir (Telhig vd. 2020). Bu konuda, probiyotikler, lizinler ve antimikrobiyal peptitler gibi umut vaat eden stratejiler çeşitli geliştirme aşamalarında (Ghosh vd. 2019). Küresel olarak, doğada birkaç alternatif bulunmasına rağmen, bunların insan ve hayvanlarda etkinliklerini ve kullanımlarını kanıtlama mücadelesi devam etmektedir (Telhig vd. 2020). Avrupa Komisyonu Antimikrobiyal Direnç Eylem Planı, yeni antimikrobiyallerin veya antibiyotiklere alternatiflerin geliştirilmesine büyük önem vermektedir. Avrupa İlaç Ajansı, bulaşıcı hastalıkların tedavi alternatiflerinde yeniliği teşvik etmektedir ve benzer bir durum Amerika Birleşik Devletleri'nde ve diğer birçok ülkede de yaşanmaktadır (Anderson vd. 2020; Mader vd. 2021).

2.2. Bakteriyosinler

Bakteriyosinler, bakteriler tarafından üretilen geniş bir AMP ailesine sahiptirler. Bakteriyosinler, modifiye edilmemiş veya post-translasyonel olarak modifiye edilmiş peptitler olabilirler (Montalbán-López vd. 2021). *In vitro* patojenlerin inhibitörleri olarak bilinirler. Antibiyotiğe dirençli olanlar da dahil olmak üzere birçok bakteriyosin klinik suşlara karşı yüksek bir spesifik aktiviteye sahiptir. Günümüzde bakteriyosinler, özellikle gıda endüstrisine yönelik olarak en yaygın şekilde tanımlanan antibakteriyel alternatiflerden biridir (Silva vd. 2018; Łojewska vd. 2022). Patojenitesi olan ve gıdalarda bozulma yapan mikroorganizmaların inhibitörleri oldukları konusu detaylı şekilde araştırılmıştır (Deegan vd. 2006). Bu nedenle, bazılarının terapötik amaçlar için ve geleneksel antibiyotiklere alternatif olarak kullanılabileceğine yaygın olarak inanılmaktadır (Egan vd. 2017; Cameron vd. 2019). Antibiyotiklerin aksine, bakteriyosinlerin antimikrobiyal ilaçlar olarak kullanılması, kommensal ve faydalı bakterileri öldürmek sebebiyle bağırsak mikrobiyal dengesizliği tehlikesi oluşturmaz (Cavera vd. 2015). Ayrıca bakteriyosinler antibiyotiklere kıyasla çok daha yüksek moleküler boyut, daha yüksek molar aktivite ve farklı etki mekanizmalarına sahiptirler (Hahn-Löbmann vd. 2019). Bakteriyosinler, genellikle piko- veya nanomolar konsantrasyonlarda hareket ederler. Geniş bir pH aralığında aktivite ve yüksek termal strese tolerans, bakteriyosinlerin diğer avantajlarıdır (Cleveland vd. 2001). Bu durum da, bakteriyel AMP'leri hem insanlar ve hayvanlar hem de gıda ve yemlerde koruyucu olarak farmasötik kullanım için son derece yararlı hedefler haline getirir (Ahmad vd. 2017). Bakteriyosin aktivitesi çoğunlukla çok spesifiktir, bu da potansiyel tedavinin antibiyotik kullanımında olduğu gibi mikrobiyal dengesizlik riskine neden olmayacağı anlamına gelir. Potansiyel patojeniteye sahip suşlardan bakteriyosin elde etmek, çoğunlukla bakteriyosin kodlayan genin patojenik olmayan bir suşa transferini içeren genetik mühendisliği araçlarının kullanılması ile gerçekleştirilir (Arthur vd. 2014).

2.3. Bakteriyosinlerin Sınıflandırılmaları

Bakteriyosinler, gram pozitif bakteriler, gram negatif bakteriler ve bazı arkea grubu mikroorganizmalar tarafından üretilen peptit yapıdaki bileşiklerdir. Kolisin olarak adlandırılan ilk bakteriyosin, 1925 yılında Gratia tarafından keşfedilmiştir. O zamandan beri, tanımlanan bakteriyosinlerin sayısı önemli ölçüde artmış bu nedenle farklı veri tabanlarında farklı şekillerde sınıflandırılmış ve büyük bir heterojen antimikrobiyal bileşik grubu olarak değerlendirilmiştir (Drider vd. 2006). Bugüne kadar birkaç yüz bakteriyosin tanımlanmıştır. Genel olarak bakteriyosinlerin sınıflandırılması üretici organizmanın gram pozitif ya da gram negatif olmasına göre yapılmaktadır ve ek olarak arkea domaini üyeleri tarafından üretilen birkaç bakteriyosin de karakterize edilmiştir (Fidan ve Uğraş 2022). Ayrıca, farklı bakteriyosin türleri büyüklük, inhibe edici mekanizma, hedef hücreler, etki spektrumu, bağışıklık sistemi ile etkileşim ve biyokimyasal özelliklere göre sınıflandırılmıştır (Hill vd. 2017).

Gram-pozitif bakterilerde, gram-negatif bakteriler gibi birçok farklı bakteriyosin üretmektedir. Ancak bu gruba dahil olan bakteriyosinler gram-negatif bakterilerin bakteriyosinlerinden temelde farklılık gösterirler. Gram-pozitif bakterilerde bakteriyosinin salınmasından sorumlu transport mekanizması, gram-negatif bakterilerin mekanizması ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde farklı bulunmuştur. Sonuç olarak gram-pozitif bakteriler bakteriyosinlere özgü regülasyonlara sahipken, gram-negatif

bakterilerin bakteriyosinleri yalnız konakçı regülasyon sistemlerini kullanmaktadır. Gram-pozitif bakterilerde bakteriyosin üretimi, genellikle logaritmik fazdan durağan faza geçiş sırasında gerçekleşmektedir (Hammami vd. 2007).

2.3.1. Gram pozitif bakteriler tarafından üretilenler

Bakteriyosinler için farklı sınıflandırmalar yapılmakla birlikte, daha çok Klaenhammer'in özellikle gram pozitif bakterileri dikkate alarak yaptığı sınıflandırma kullanılmaktadır. Ancak, biyokimyasal tanımlanması bakımından daha çok ilk 3 sınıf dikkate alınmaktadır (And ve Hoover 2003).

- I. Grup bakteriyosinler:** Büyüklüğü 5 kDa'dan az olan, olgun formu oluşturmak için post-translasyonel modifikasyonlara ve ardından bölünmeye uğrayan, lantionin ve β -metillantionin amino asitlerinden oluşan küçük, proteolize ve ısıya dayanıklı peptitlerden oluşur. Lantibiyotikler yapısal özellikleri ve antimikrobiyel aktivite farklılığından A ve B olmak üzere iki alt gruba ayrılırlar. Tip A lantibiyotikler hedef hücrenin sitoplazmik zarını depolarize ederek etki gösterirler. Ortalama büyüklükleri 21-38 amino asittir. Isı stabiliteeleri yüksek olup, asidik pH'da 100 °C'ye kadar stabil kalabilmektedirler. Bu grubun en bilinen üyesi nisin'dir. Tip B lantibiyotikler, Tip A'ya göre oldukça küçüktür. Büyüklükleri 19 amino asiti aşmamaktadır. Tip B lantibiyotikler konakçı hücre enzimlerini inhibe ederler (Guder vd. 2000; And ve Hoover 2003).
- II. Grup bakteriyosinler:** 30-60 amino asit kalıntısına sahip, ısıya dayanıklı ve lantionin içermeyen peptitlerdir. Nisin A, en yaygın Sınıf II bakteriyosindir ve laktik asit bakterisi *Lactococcus lactis*'in suşları tarafından ribozomal olarak üretilir. Ayrıca, molekül ağırlıkları 10kDa'dan daha düşük olup, bazı türleri 100 °C'den 121 °C'ye kadar olan sıcaklıklara karşı stabildirler. Grup II bakteriyosinler de alt gruplara ayrılmıştır. Grup IIa en büyük gruptur ve özellikle listeria'ya karşı aktif olup, grubun üyeleri korunmuş bir amino terminal dizi (Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys) içermeleri ile diğerlerinden ayrılmaktadır. Tip A Lantibiyotikleri gibi sitoplazmik membranda por oluşturarak etkilerini gösterirler. Grup IIb bakteriyosinler hedef hücre zarında por yapısı meydana getirirler. Grup IIc bakteriyosinler ise salgı sinyallerine bağlı olarak üretilen peptitlerdir (And ve Hoover 2003; O'Bryan vd. 2018; Kumariya vd. 2019).
- III. Grup bakteriyosinler:** Bu grupta yer alan bakteriyosinler büyük (>30 kDa) , ısıya duyarlı proteinlerdir (Kumariya vd. 2019).
- IV. Grup bakteriyosinler:** Bu gruptaki bakteriyosinler ise büyük ve kompleks moleküller olup, aktiviteleri için karbonhidrat veya lipid bileşenlerine gereksinim duymaktadırlar (Şükrü ve ZORBA 2005).

2.3.2. Gram negatif bakteriler tarafından üretilenler

Gram negatif bakterilerden özellikle *Enterobacteriaceae* tarafından üretilen bakteriyosinler, kolisinler ve mikrosinler olarak bilinen ribozomda sentezlenmiş proteinlerdir (Flaherty vd. 2014). *Enterobacteriaceae* sıklıkla bakteriyosinleri SOS yanıt sistemi gibi stres koşulları altında üretir (Gordon ve O'Brien 2006). Çok çeşitli kolisin ve mikrosinler, etki mekanizması olarak gözenek oluşumu, peptidoglikan öncüllerinin bozunması, fosfataz aktivitesi, RNAz aktivitesi (genellikle 16S rRNA'yı ve spesifik tRNA'ları hedef alır) ve DNAz aktivitesi dahil olmak üzere çok sayıda sitotoksik mekanizma kullanır (Cascales vd. 2007). Bakteriyosin üreten bakteride spesifik bağışıklık proteini de birlikte sentezlenir ve üreticileri bakteriyosin antibakteriyel eylemi sırasında kendi kendini öldürmekten korur (Cameron vd. 2019).

Kolisinler

En kapsamlı çalışılmış gram negatif bakteriyosini *E. coli* tarafından üretilen kolisindir (AKKOÇ vd. 2009). Kolisinler, bakteriyosinler içinde şimdiye kadar en çok araştırılan gruptur. 30-80 kDa aralığında moleküler kütleyle sahip bu moleküller, spesifik *E. coli* suşları tarafından ribozomal olarak üretilir ve başka bir *E. coli* suşuna ve diğer *Enterobacteriaceae*'ye karşı etki gösterirler (Cascales vd. 2007; Drider ve Rebuffat 2011; Marković vd. 2022). İlk olarak 1925 yılında André Gratia tarafından *E. coli*'de keşfedildi. Daha sonra, 1945 yılında Fredericq ve Gratia, 'koli öldürmek' anlamına gelen 'kolisin' terimini icat ettiler (Cursino vd. 2002). Kolisin protein molekülleri yalnızca plazmitler üzerinde kodlanırlar ve çoğunlukla operonlarda bulunurlar. Kolisin operonu aktivite, bağışıklık ve lizis genlerinden oluşur. Aktivite proteini öldürme aktivitesinden sorumludur, bağışıklık proteini üretici hücreyi kolisinin öldürücü etkisinden korur ve lizis proteini onun salınmasını kolaylaştırır. Kolisinler, esas olarak merkezi reseptör bağlama alanı, translokasyon alanı ve sitotoksik alan olmak üzere üç alandan oluşur. Merkezi reseptör bağlama alanı, hedef hücrenin yüzeyindeki bir proteini bağlamak için gereklidir ve hücre zarında por oluşturur, N-terminal alanı, dış zar yoluyla translokasyona dahil olur ve C-terminal alanı, gözenek oluşumu, peptidoglikan öncüllerinin bozunması, fosfataz aktivitesi, RNAz aktivitesi (genellikle 16S rRNA'yı ve spesifik tRNA'ları hedef alır) ve DNAz aktivitesi dahil olmak üzere çok sayıda sitotoksik mekanizma kullanır (Cascales vd. 2007; Schneider vd. 2018b; Chérrier vd. 2021). Enzimatik aktiviteye sahip kolisinler, konakçı hücrenin DNA (DNAz) veya RNA'sındaki (rRNAz veya tRNAz) fosfodiester bağlarını hedefleyen hidrolazlar veya transferazlar olarak işlev görebilir (Cascales vd. 2007). Protein molekülü, reseptör bağlama alanı yoluyla hedef hücre üzerindeki aynı kökenli reseptöre bağlanır ve Tol sistemi veya Ton sistemi yoluyla hücreye translokasyona uğrar. Hedef hücreye girdikten sonra, kolisinlerin öldürme özelliklerini uyguladıkları çeşitli mekanizmalar devreye girer. Bunlar, DNAz aktivitesi, RNAz aktivitesi ve hedef hücre zarında gözenek oluşumu veya peptidoglikan sentezi inhibisyonunu içerir (Cuttawala vd. 2022). DNAz kolisinleri, tekrarlanan bölünme ile dsDNA'da girintiler üreterek DNA'yı bozar (Cascales vd. 2007). Bu kolisinler metale bağımlıdır, araştırmalar Zn^{+2} ve Ni^{+2} 'nin enzim aktivitesi için kofaktörler olarak gerekli olduğunu düşündürmektedir (James vd. 2002). RNAz kolisinleri, protein sentezini inhibe ederek hücre ölümüne neden olabilir ve bu aktivite için herhangi bir kofaktör gerekmez. RNAz kolisinlerinin hedef molekülleri, 16S rRNA ve tRNA'nın antikodon halkalarıdır. Nükleaz kolisinler, üretici hücreyi öldürücü aktiviteden koruyan nükleaza

özgü bağışıklık proteinleri ile kompleks halinde hücreden üretilir ve salınır (Marković vd. 2022). Kolisinlerin olası bir sınıflandırması, kullandıkları translokasyon sistemine yani bakteri üzerindeki etki mekanizmalarına dayanmaktadır. Böylece A ve B gruplarından kolisinler sırasıyla Tol ve Ton sistemlerini kullanılarak çalışmaktadırlar. İç zara sokulduktan sonra, gözenek oluşturunca kolisinler Grup A, kolisin A, E1 ila E9, K, L, N, S4, U ve Y'den oluşurken; B grubu kolisinleri ise kolisin B, D, H, Ia, Ib, M, 5 ve 10'dan oluşmaktadırlar (Ch  rier vd. 2021). A grubu, iyonların sitoplazmadan dışarı akmasına izin verirler. B grubu kolisinleri ise, sitoplazmada veya periplazmik alanda DNA, RNA veya hücre duvarı oluşumunun enzimatik olarak inhibe edilmesi şeklinde etki ederler (Callaway ve Sheridan 2015).

Bazı kolisin üreticisi *E. coli* suşları, insanlarda hastalığa neden olabilen, Shiga-toksin üreten patojen suş *E. coli*'yi inhibe edebilir (Jordi vd. 2001). Günümüzde birçok bakteri antibiyotiklere karşı direnç göstermektedir. Kolisin benzeri bakteriyosinler, biyofilm halinde büyüyen hedef hücreleri öldürmede oldukça etkilidir ve kronik bakteriyel enfeksiyonların tedavisi için faydalı terapötik seçenekler oluşturabilir (Brown vd. 2012).

▪ Kolisin M

Kolisin M, etkili bir antibakteriyel protein olarak kullanılmasını sağlayan spesifik özelliklere sahiptir. Bakteriyel hücre duvarı polimeri peptidoglikan lipid II ara maddesini enzimatik olarak parçalayabilen tek kolisindir. Bu nedenle, genellikle seçici bir antibakteriyel madde olarak tanımlanır (Touz   vd. 2012). Diğer kolisin türleri ya bir zar gözenek oluşturunca ya da bir nükleaz aktivitesi sergilerler (Braun vd. 2002). 271 amino asit kalıntısı içerir; moleküler kütlesi yaklaşık 29 kDa'dur, bu da onu bugüne kadar tanımlanmış en köşk kolisinlerden biri yapar (Köşk vd. 1987). CM protein molekülleri çoğunlukla plazmitler tarafından kodlanır. Kolisin operonu aktivite, bağışıklık ve lizis genlerinden oluşur. Aktivite proteini öldürme aktivitesinden sorumludur, bağışıklık proteini üretici hücreyi kolisinin öldürücü etkisinden korur ve lizis proteini onun salınmasını kolaylaştıır. CM 3 boyutlu yapısı ilk kez 2008'de belirlenmiştir ve yapıları üşümüş diğer kolisinlere kıyasla kompakt bir yapı sunmaktadır (Zeth vd. 2008). CM'nin 10'dan daha az molekülü tek bir bakteri hücresini öldürebilir, bu da onu çok etkili bir koruyucu yapmaktadır (Pressler vd. 1986). CM, 2011 yılında Avrupa'da ölümcül bir salgına neden olan STEC (O104:H4) suşu başta olmak üzere *E. coli*'nin farklı patojen suşlarına karşı yüksek etkiye sahiptir (Rubino vd. 2011). Bugüne kadar CM proteini bitki ekspresyon sistemi olarak ıspanak ve yapraklı pancarda da denenmiş fakat yaygın şekilde tütünde üretilmiştir (Schulz vd. 2015; Stephan vd. 2017; Łojewska vd. 2020).

▪ Kolisin K

Kolisin K   retimi üç gen tarafından kodlanmaktadır: kolisin aktivite proteinini kodlayan cka, kolisin üreten suşu koruyan bağışıklık proteinini kodlayan cki ve lizis proteinini kodlayan ccl genleri. CK köşk ColE1 plazmitlerinde kodlanan gözenek oluşturunca kolisinler grubuna dahildir. Bu transmembran toksin sınıfı kolisin, sitoplazmik membranı depolarize ederek hücresel enerjinin dağılmasına yol açar (Mrak vd. 2007).

2.4. Kolisin M ve K'nin Antimikrobiyal Etki Mekanizması

Kolisinlerin etki mekanizması esas olarak reseptör bağlama alanı, translokasyon alanı ve sitotoksik alan olmak üzere üç alandan oluşur. Bağlanma alanı ve translokasyon alanı aynı işlevde gerçekleşir fakat sitotoksik aktiviteleri CM ve CK kolisinleri için farklılık gösterir.

2.4.1. Dış zar hücre yüzeyi reseptörlerine (FhuA, Tsx) bağlanma

CM ve CK hedeflediği hücreye bağlanmak için, duyarlı hücrelerin dış zarında bulunan spesifik reseptör proteinlerini dış zardan parazitler. FhuA, ferrikrom alımında yer alır ve aynı zamanda bakteriyofajlar T1, T5 ve $\phi 80$ 'in de hedefidir. CM bağlanması, merkezi bölge ve özellikle $\alpha 1$ sarmalını içerir (Helbig vd. 2011; Ch  rier vd. 2021).

2.4.2. Translokasyon

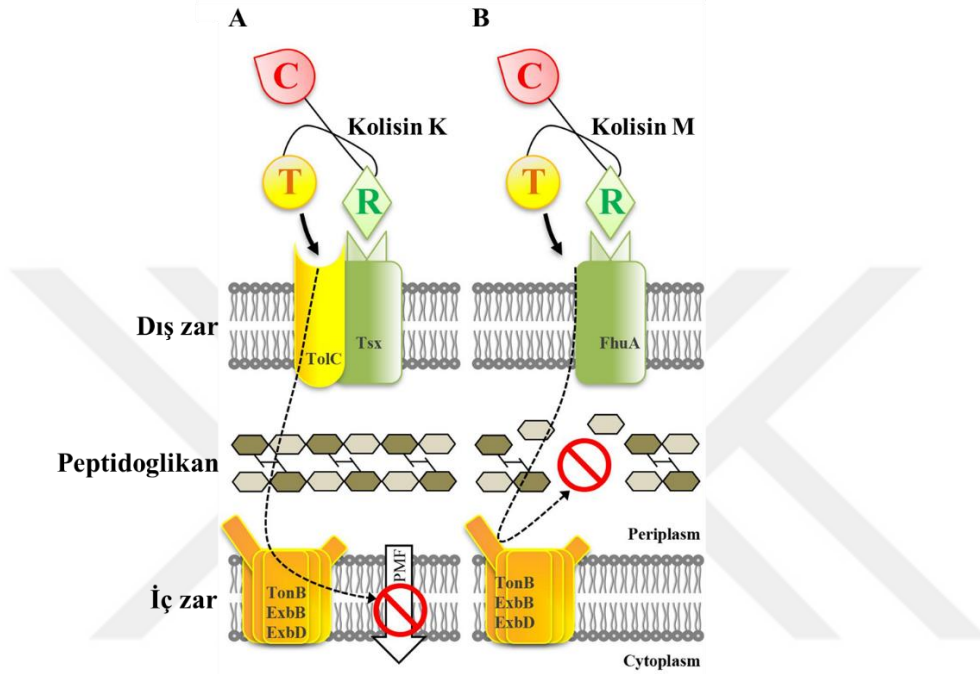
Reseptöre bağlandıktan sonra, translokasyona N-terminal alanı aracılık eder (Dreher vd. 1985). TonB/ExbB/ExbD translokasyonu yoluyla periplazmik boşluğa ilerler ardından Tol sistemi veya Ton sistemi yoluyla hücreye translokasyona uğrar. TonB kutusu, hücreleri CM'ye dirençli hale getirmiştir. Bu sonuçlar, FhuA ve TonB arasında doğrudan bir etkileşim olduğunu ve TonB'nin C-terminal alanı ile kompleks oluşturduğunu doğruladı. Ayrıca, CM'nin translokasyonu için TonB-FhuA ve TonB-CM etkileşimleri esas duruma gelmiştir. Bu durumda CM   nce FhuA'ya bağlanır, ardından TonB kutusu aracılığıyla TonB ile etkileşime girer. CM'nin N-terminal alanı daha sonra reseptörü geçebilir ve sonrasında TonB proteini ile etkileşime girebilir. Ton sisteminin getirdiği enerji, CM'nin FhuA ucundan geçmesine izin verir. Ardından,   l  mc  l etkisini göstermek için CM'nin periplazmada yeniden katlanma/olgunlaşma sürecinden geçmesi gerekir (Ch  rier vd. 2021).

2.4.3. Sitotoksik aktivite

Translokasyon işleminin ardından hedef üzerinde öldürme etkisinin uygulanmasından sorumlu olan C-terminal sitotoksik alanı devreye girer (Hahn-Löbmann vd. 2019). Kolinler hedeflerine, yani plazma zarının dış tarafında bulunan lipid II moleküllerine ulaşabilir ve bozabilir. Hedef hücreye girdikten sonra, kolisinlerin   ld  r  c  l  klerini uyguladıkları çeşitli mekanizmalar vardır. Bunlar, DNaz aktivitesi, RNaz aktivitesi ve hedef hücre zarında gözenek oluşumu veya peptidoglikan sentezi inhibisyonunu içerir (Barreteau vd. 2020; Calcuttawala vd. 2022). CM, dış zardan geçtikten sonra öldürücü etkisini, sonunda bakteriyel lizise yol açan peptidoglikan biyosentezinin inhibisyonu yoluyla gösterir (El Ghachi vd. 2006). CK ise hücre zarının bütünlüğünü bozarak hücre zarı depolarizasyonu nedeniyle hücre ölümüne sebep olur (Hahn-Löbmann vd. 2019).

CM bağışıklık proteini Cmi'nin   retimi, CM üreten hücreyi toksinin etkilerine karşı korumak için CM ile gerçekleştirilir (  lschl  ger vd. 1984). Periplazma içinde

Cmi'nin çözünür bölgesinin ekspresyonu, hücreleri CM'nin etkisine karşı korumak için yeterlidir. Bununla birlikte, Cmi zara sabitlendiğinde bağışıklık daha etkili olmuştur (Gérard vd. 2011). CM yüzeyinde pozitif yüklü kalıntılardan oluşur, Cmi ise negatif yüklü kalıntılar barındırdığı için aralarında elektrostatik etkileşime girebilecekleri öne sürülmüştür. Fakat gerçek bir etkileşim açıkça gösterilmemiştir ve Cmi'nin tam etki mekanizması hala bilinmemektedir (Chérier vd. 2021). CM ve CK'nin antimikrobiyal etki mekanizmasının şematize edilmiş hali Şekil 2.1'de verilmiştir.



Şekil 2.1. Kolisinlerin gözenek oluşturucu (CK) ve peptidoglikan sentezini inhibe edici (CM) aktiviteleri ile antimikrobiyal etki mekanizmaları. R) kolisin reseptör bağlama alanı; T) kolisin molekülünün hücre içine translokasyon bölgesi; C) taşınan kolisinlerin yerleştirildiği sitotoksik alan; PMF) sitotoksik alanın yok ettiği proton hareket kuvveti ((Hahn-Löbmann vd. 2019)'dan değiştirilerek alınmıştır)

Şekil 2.1'de "A" görselinde gözenek oluşturan CK, reseptör bağlama alanı (R) hedef hücrenin dış zar reseptörüne bağlanır. Ardından CK molekülünün hücre içine translokasyonuna, translokasyon bölgesinin (T) bir hücre translokasyon mekanizması (Tol veya Ton sistemleri) ile etkileşimi aracılık eder. Dış zar ve hücre duvarı boyunca iç zara taşınan kolisin sitotoksik alanı, iç zara yerleştirilir ve proton hareket kuvvetini (PMF) yok eden ve zar bütünlüğünü bozan bir gözenek oluşturur. "B" görselinde ise CM, CK ile aynı yolu izler. Öncelikle dış zar protein reseptörü FhuA'ya bağlanarak dış zar boyunca yer değiştirir ardından TonB/ExbB/ExbD içe aktarma mekanizmasını etkisiz hale getirir. Periplazmadaki sitotoksik aktivitesini lipit I ve lipit II peptidoglikan ara maddelerinin bozulmasını katalize ederek gösterir ve peptidoglikan biyosentezini durdurarak hücrenin parçalanmasını sağlar (Kim vd. 2014; Hahn-Löbmann vd. 2019). Ayrıca CM bugüne kadar hücre duvarı peptidoglikan biyosentezini inhibe ettiği bildirilen tek kolisindir (Barreteau vd. 2012).

2.5. Bakteriyosinlerin / Kolisinlerin Gıda Biyoteknolojisindeki Uygulamaları

Bakteriyosinler, tek başına veya diğer koruma yöntemleriyle kombinasyon halinde çeşitli gıdaların biyokorunmasında kullanılmıştır (Thapar ve Salooja 2022). Bir bakteriyosin grubunun gıda biyoteknolojisinde koruyucu olarak kullanılabilmesi için bazı kriterleri sağlaması beklenmektedir. Bunlar, bakteriyel üretim yapılacaksa üretimde kullanılacak suş GRAS statüsünde olmalıdır, yüksek spesifik aktivite ve geniş bir inhibisyon alanı içermelidir, sağlıkla ilgili risk taşımamalı, gıdaların tadını yada kalitesini etkilememelidir, sıcaklığa karşı ısıl stabilitesi olmalıdır (Cotter vd. 2005; Leroy ve De Vuyst 2010).

Bakteriyosinler gıdaları belirli patojen mikroorganizmaların bakteriyel aktivitesinden korumak için yaygın şekilde kullanılmaktadır. Patojeniteye sebep olan bakterilerden yaygın olarak, peynirlerde *Listeria monocytogenes* (Gutián vd. 2019), et ve süt ürünlerinde *S. aureus* (Li vd. 2021), et ve fermente sosislerde *Clostridium botulinum* (Swetwathana ve Visessanguan 2015), *Salmonella* spp. (Hu vd. 2019), *Campylobacter* spp. (El-Hack vd. 2021) ve *E. coli* (Yan vd. 2021) gibi patojen mikroorganizmalardan ve *Toksoplazma gondii* ve *Taenia solium* gibi bazı viral ve parazitik türlerden gıdaları korumak için bakteriyosinler ya doğrudan gıdaya aşılanarak ya da gıda paketlenme filmlerine/ambalajlarına dahil edilerek uygulanabilir (Ibarguren vd. 2015; Salgado vd. 2015). Bugüne kadar bakteriyosin grubundan yaygın şekilde gıda koruyucusu olarak gram-pozitif *Lactococcus lactis* 6F3 suşu tarafından üretilen nisin kullanılmıştır (Hansen ve Sandine 1994). Ayrıca, bakteriyel olarak üretilip gıda katkı maddesi olarak ticarileştirilen ve kullanılan bakteriyosinler de olmuştur. Pediosin PA-1 (Bédard vd. 2018), plantarisiklin A (Borrero vd. 2018), micocin (O'Connor vd. 2020), carnocyclin A (Yi vd. 2022) ve enterosin (Gutián vd. 2019) bunlardan bazılarıdır.

Gıda katkı maddeleri, gıdaların güvenliğini, tazeliğini, tadını, dokusunu veya görünümünü korumak veya iyileştirmek için eklenen maddelerdir. Gıda katkı maddelerinin pazara sunulmadan önce insan sağlığı üzerindeki potansiyel zararlı etkileri açısından kontrol edilmesi gerekir (Organization 2019). Bakteriyosinlerin yaygın kullanımı insan bağışıklık sistemini de olumlu yönde etkilemektedir. Bağışıklığı güçlendirmede önemli bir rol olmaktadır. Gastrointestinal sistemdeki spesifik bakteri suşlarının hayatta kalmasına izin verirlerken, bağırsaktaki patojenik türlerin kolonizasyonunu da engellerler. Bakteriyosinler ayrıca bazı hayvanlarda ve insanlarda tümör hücrelerinin büyümesini engelleyerek antikanser özellik de gösterirler (Thapar ve Salooja 2022).

Dünya çapındaki özellikle patojen mikroorganizmaların antibiyotiklere olan dirençlerinin artışıyla birlikte gıda sektörü alternatif arayışına girmiş ve kolisinlerin kullanımının yaygınlaştırılması üzerine çok durulmuştur. Bakteriyel olarak bir gıda koruyucusunun taşıyabileceği risklerde düşünüldüğünde bilim insanları daha güvenilir ve daha ucuz bir üretim sistemi olan bitkilere yönelmiştir. Günümüzde artık bitki bazlı ekspresyon sistemleri ile kolisin üretimi ve üretilen kolisinlerin et numuneleri üzerindeki denemeleri yaygın şekilde çalışılmaya başlanmıştır (Schulz vd. 2015; Stephan vd. 2017; Hahn-Löbmann vd. 2019; Łojewska vd. 2020; McNulty vd. 2020). Daha önce bahsedildiği gibi, *Enterobacteriaceae* tarafından üretilen bakteriyosinler, *E. coli* O157:H7, *Shigella* spp. (örn., *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* ve *S. sonnei*) ve *Salmonella* spp. (örn., *S. typhi* ve *S. typhimurium*) gibi gıda kaynaklı patojenlerin

gelişimini kontrol etmek için kullanılabilir. Kolisin, patojenik organizmaların gelişimini engellemek için et ve süt ürünlerine ve/veya et ve süt işleme ekipmanının yüzeyleri ve kesme tahtası gibi diğer ilgili aparatlara uygulanabilir. Kolisin sıvı bir bileşim halinde veya dondurularak kurutulmuş, toz (konsantre veya seyreltilmiş) ve benzeri gibi kuru bir formda formüle edilebilir (Lyon vd. 1996). FDA tarafından GRAS statüsüne kazandırılan bu mikrobiyal ajanın gıda biyoteknolojisinde yer alabilmesini sağlayan en önemli özelliklerinden biri de proteaz enzimlerine karşı oldukça hassas oldukları için gıda yoluyla insan ince bağırsağına ulaşan herhangi bir miktar bağırsaklarda çok kısa sürede parçalanabilmektedir (Ritala vd. 2020). Ayrıca Nomad Bioscience, gıda antimikrobiyalleri olarak kolisinler gibi bitki yapımı bakteriyosinlerin GRAS tanımlaması için FDA onayını başarıyla alan ilk şirkettir (Hahn-Löbmann vd. 2019).

Gıda antimikrobiyalleri olarak kolisinlerin güvenliğini ve uygunluğunu desteklemek için bazı belgeler kullanılmıştır. Kolisinler ve hastalık arasında belgelenmiş bir ilişki yoktur; kolisinler ısı, asit ve proteolitik sindirime karşı dayanıklıdır; kolisinlerin alerjik olduğuna veya aşırı duyarlılık riski oluşturduğuna dair herhangi bir rapor yoktur; bitki yapımı rekombinant kolisin proteinlerinin bileşimleri, bakteriyel kolisin proteinleriyle uyumludur; bitkisel kolisinlerin hedef özgüllükleri, bakteriyel kolisinler için bildirilenlerle eşleşir; kolisin, amaçlanan son kullanıma bağlı olarak farklı saflıklarda formüle edilebilir; kolisin, 10 mg kolisin/kg gıdayı aşmayan kullanım oranlarında, hedef gıda patojenlerine karşı aktiftir (Hahn-Löbmann vd. 2019).

Gün geçtikte artan antimikrobiyal direnç ve insan sağlığının önemine yönelik farkındalığın artması ile kolisin benzeri bakteriyosinlere gıda sektöründe ihtiyaç ve talep de artmaktadır. Kolisinler olarak gıda koruyucularının kullanımı gıdanın raf ömrünü uzatmakta ve güvenilir gıdaya ulaşmamızı kolaylaştırmaktadır (Rossi ve Pallotta 2016).

2.6. Rekombinant Protein Ekspresyon Sistemleri

Protein ekspresyon sistemlerinin birbirleri arasında karşılaştırılması Çizelge 2.1’de görüldüğü gibidir.

Çizelge 2.1. Rekombinant protein ekspresyon sistemlerinin karşılaştırılması (Pratheesh ve Vineetha 2015; Burnett ve Burnett 2020; Siddiqui vd. 2020)

Ekspresyon Sistemi	Maliyet	Üretim Süresi	Ölçek Büyütme	Ürün Kalitesi	Glikozilasyon	Kontaminasyon Riski	Depolama Maliyeti	Gen Büyüklüğü	Protein Verimi	Protein Katlanması
Bakteri	Düşük	Kısa	Yüksek	Düşük	Yok	Endotoksin	Orta	Bilinmiyor	Orta	Düşük
Maya	Orta	Orta	Yüksek	Orta	Hatalı	Düşük	Orta	Bilinmiyor	Yüksek	Orta
Memeli hücre kültürü	Çok yüksek	Uzun	Çok düşük	Çok yüksek	Doğru	Virüsler, prionlar ve onkojenik DNA	Çok pahalı	Sınırlı	Orta-yüksek	Yüksek
Hayvan	Yüksek	Çok uzun	Düşük	Çok yüksek	Doğru	Virüsler, prionlar ve onkojenik DNA	Pahalı	Sınırlı	Orta-yüksek	-
Bitki doku kültürü	Orta	Orta	Orta	Yüksek	Küçük farklılıklar	Düşük	Orta	-	-	-
Bitki	Çok düşük	Uzun	Çok yüksek	Yüksek	Kloroplast hariç	Düşük	Ucuz	Sınırsız	Yüksek	Yüksek

2.6.1. Bitki ekspresyon sistemleri

Bitkiler, rekombinant DNA teknolojisi aracılığıyla, farmasötik ve endüstriyel proteinler dahil olmak üzere çok çeşitli heterolog proteinler üretmek üzere modifiye edilir. Yeşil biyoreaktörler olarak bitkiler, büyüme odalarındaki küçük ölçekli denemelerden büyük açık alan seri üretimine kadar neredeyse sınırsız ölçeklenebilirlik gibi çeşitli avantajlar sunar ve tümü nispeten ucuz maliyetle sağlanır. Bitkiler, aşılar gibi tıbbi uygulamalardan endüstriyel kullanımlara sahip biyolojik olarak parçalanabilen plastikler ve birçok antimikrobiyal proteinlerin üretilmesi gibi çeşitli değerli biyolojik moleküller üretmek için geleneksel ifade sistemlerine göre umut verici bir alternatif haline gelmiştir (Twyman vd. 2005; Wilken ve Nikolov 2012; Schulz vd. 2015; Mamedov vd. 2019a; Mamedov vd. 2019b; Łojewska vd. 2020; Mamedov vd. 2021b). Ek olarak bitkiler, antikorların ve diğer kompleks proteinlerin üretimi için bakteriler gibi diğer protein ekspresyon sistemlerine göre birçok avantaja sahiptir, çünkü çoklu alt birimlerden oluşan proteinleri üretebilir, katlayabilir ve doğru bir şekilde bir araya getirebilirler. Şu anda, geçici ekspresyon sistemleri, kapalı bir ortamda çok sayıda bitkinin kullanılması için diğer herhangi bir transgenik sisteme göre daha fazla tercih edilmektedir. Bitkiden üretilen proteinler, klasik ökaryotik hücre sistemlerine karşı yüksek rekabet gücü vadetmektedir. Ayrıca, bitkileri hızla transfekte etmek ve birçok rakip ifade sistemi için aylarca sürebilecek olan terapötik proteini haftalar içinde üretmek için bir mekanizma sağlar. Bitki ekspresyon sistemlerinin spesifik güçleri, yakın gelecekte belirli terapötik proteinlerin hızlı ve ucuz bir şekilde üretilmesini kolaylaştırabilir (Komarova vd. 2010; Burnett ve Burnett 2020). Bitkiler daha önce terapötik rekombinant proteinler için ifade sistemleri olarak kabul edilmişti ve bilim adamları rekombinant proteinler üretme verimliliğini artırmaya çalıştıkça kavram yeniden güç kazanıyor (Tekoaş vd. 2015; Burnett ve Burnett 2020). Bitkiler, bir rekombinant protein üretim platformu olarak birçok çekici özelliğe sahiptir: ucuz büyüme koşulları, iyi anlaşılmış üretim uygulamaları, yüksek düzeyde ölçeklenebilirlik, karmaşık proteinleri sentezleme yeteneği, mevcut endüstri altyapısı, hızlı üretim potansiyeli ve insanlarda patojen kontaminasyonu konusunda düşük risklere sahiptir (Moustafa vd. 2016). Bitkilerin protein üretiminde uygun ekspresyon sistemleri olduğunu işaret eden bazı durumlar vardır.

Protein boyutu: *E. coli* veya diğer prokaryot hücreler, küçük proteinler (<30 kDa) için tercih edilen ifade sistemidir, ancak bitkiler gibi ökaryot sistemlerde büyük peptitlerin yüksek verimlerini daha kolay üretmek için mücadele ederler (Demain ve Vaishnav 2009).

Protein katlanması: Özellikle terapötik bir proteinin doğru katlanması, aktivite için esastır ve karmaşık proteinler, bunu kolaylaştırmak için spesifik şaperon proteinleri gerektirebilir (Margolin vd. 2018). Ayrıca, bazı ekspresyon sistemleri (özellikle *E. coli*), ürün aşırı eksprese edildiğinde çözünmeyen protein birikimi sorunlarına sahiptir (Burnett ve Burnett 2020).

Translasyon sonrası değişiklik: Translasyondan sonra birçok protein modifiye edilir ve bu modifikasyonlar, disülfid köprülerinde olduğu gibi kovalent bağların oluşumunu veya glikozilasyon olarak bilinen bir süreçte karbonhidrat moleküllerinin eklenmesini içerebilir. Bu PTM mekanizmalarının çoğu ökaryotlar ve prokaryotlar arasında korunur, ancak glikozilasyon mekanizmaları türler arasında bile farklılık gösterebilir. Ayrıca, glikozilasyon olayı insan dışı hücrelere dayalı ifade sistemleri için

bir sorun ortaya çıkarır, bu nedenle glikozilasyon, her ifade sistemi için önemli bir endişe kaynağıdır. Bitkilerin glikozilasyon gerçekleştirme kapasitesi, prokaryotik ifade sistemlerine göre bir avantajdır; ve hatta böcek ve maya hücrelerinde glikozilasyon kapasitesi sınırlıdır (Marsian ve Lomonossoff 2016).

Güvenlik: İnsan dışı PTM'ler, terapötik proteine karşı bir bağışıklık tepkisine neden olabilir ve bazı ekspresyon sistemlerinin proteine başka kontaminantları sokma riski vardır. Memeli ifade sistemlerinin hastaya patojenleri aktarma riski daha yüksektir (Lico vd. 2012). Bakteriyel ekspresyon sistemleri, O-antijeni gibi toksinlerin ortaya çıkması riskini taşır (Fischer ve Emans 2000). Bitki sistemleri genellikle bu tuzaklardan kaçınır.

Verim: Tüm ekspresyon sistemlerinde amaç doğru şekilde katlanmış ve post-translasyonel olarak modifiye edilmiş proteinin maksimum verimle üretimini yapabilmektir. Ancak üretiminden sonra ki saflaştırma prosedürlerinin de çok pahalı olduğu göz önüne alınarak gerekli düzenleme ve iyileştirmeler yapılmalıdır (Kozlowski ve Swann 2006).

Büyüme koşulları ve oranı: Üretim genellikle toplu bir şekilde gerçekleştiğinden, büyüme oranı sistemin üretkenliğini önemli ölçüde etkileyecektir. Spesifik büyüme gereksinimleri aynı zamanda bir işlemin maliyetini de etkiler; örneğin maya veya bakteri gibi hücre türleri, ucuz ve basit bir ortam üzerinde yüksek konsantrasyonda büyütülebilirken, memeli hücreleri karmaşık ve pahalı ortamları gerektirir. Bitkiler, memeli hücre sistemlerinden daha ölçeklenebilir ve uygun maliyetli olurken, bakterilerden daha büyük terapötik proteinler üretebilen ve her iki sisteme kıyasla patojen ve toksik kirletici riskini azaltan ideal bir üretim sistemi olduklarını kanıtlamaktadırlar (Burnett ve Burnett 2020).

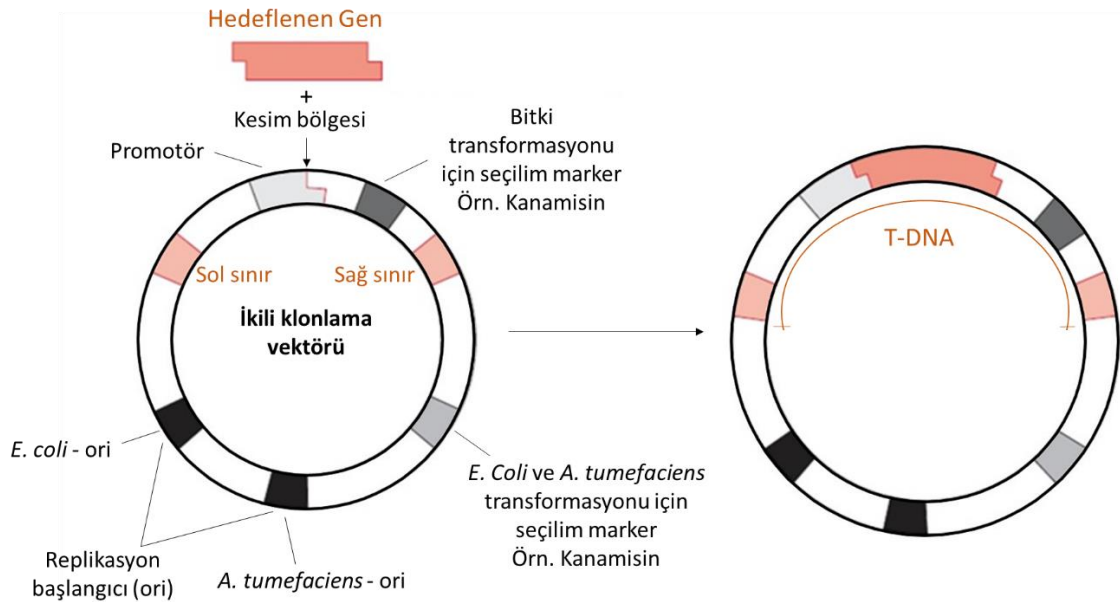
2.6.2. Bitkilerde rekombinant protein üretimi için ifade türleri

Rekombinant proteinler üretmek için nükleer ifade, kloroplast ifadesi ve son olarak geçici ifade kullanılabilir.

Geçici ifade, bitkilerden rekombinant protein üretiminde en yaygın kullanılan yöntemidir. İfade sisteminin geliştirme süresini büyük ölçüde azaltarak rekombinant proteinlerin hızlı üretimine izin verir. Bu, genetik yapıları test etmek ve fonksiyonel analiz için rekombinant proteinlerin hızlı bir şekilde üretilmesi için kullanılabilir. Geçici ekspresyon aynı zamanda ana üretim platformu olarak büyük miktarlarda protein üretimi için kullanılma potansiyeline sahiptir, ancak sonuçta transgenik bitkilerle karşılaştırıldığında sınırlı ölçek büyütme potansiyeline sahiptir (Burnett ve Burnett 2020). Geçici ifade sistemleri sayesinde pandemi durumlarında ya da aşı ihtiyacı olan durumlarda hızlı ve etkili sonuçlar vermektedir (D'Aoust vd. 2010; Mamedov vd. 2021b; Mammedov vd. 2022). İki geçici ifade yöntemi vardır. Bunlardan ilkinde, tütün mozaik virüsü gibi bitki virüsleri, transgeni enfekte olmuş bir bitkiye sokmak için kullanılır (Shih ve Doran 2009), ancak viral vektörün ekosistemdeki bitkileri enfekte etme riski vardır. İkinci yöntem, yüksek seviyeli ve yüksek verimli ifade için bitki hücrelerine T-DNA (transfer edilmiş DNA)'yı sokan *Agrobacterium* aracılı geçici gen ifadesini içerir.

***Agrobacterium* Tİ-plazmit aracılı geçici ifade sistemi:**

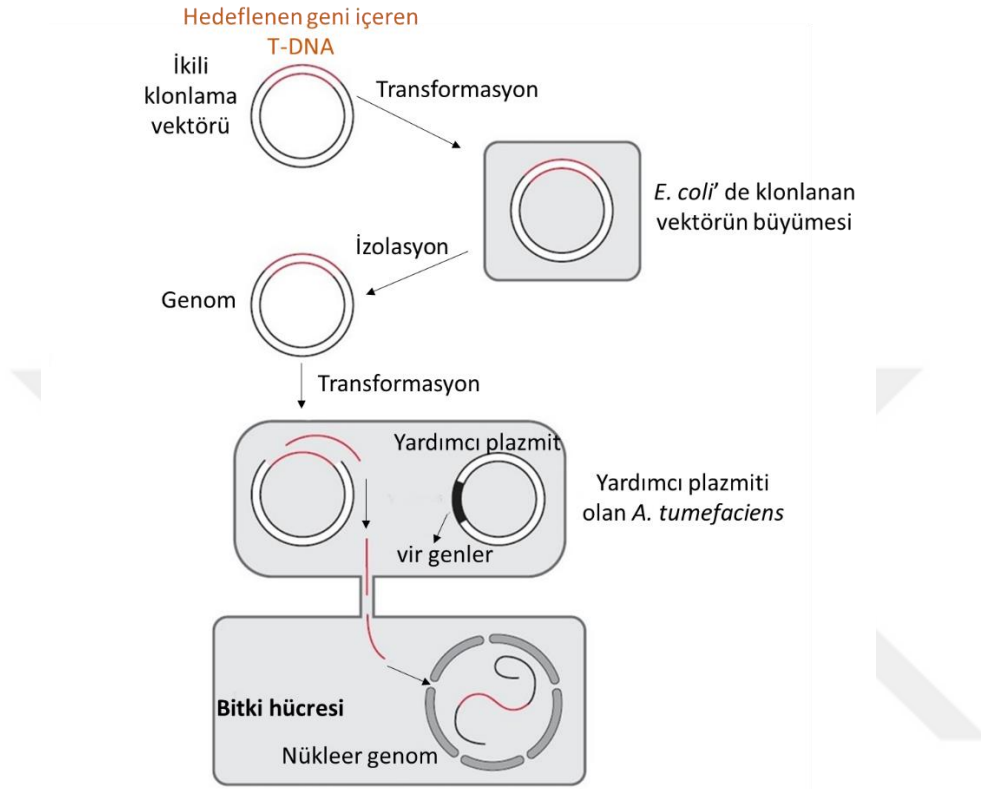
Toprak bakterisi *A. tumefaciens*, genetik materyalinin bir kısmını bir dikotiledon bitki hücresinin kromozomuna aktarma konusunda eşsiz bir yeteneğe sahiptir. T-DNA olarak adlandırılan bakteriyel plazmitin, DNA'nın belirli bir segmentinin bitki hücresi genomuna transferi, entegrasyonu ve ekspresyonu gerçekleştirilir. Bitkiye aktarılan bu bakteri DNA'sı bitkinin normal büyümesine müdahale eden “taç safra tümörü” oluşumunu tetiklemektedir. “Tümöre neden olan” (Ti) plazmit *A. tumefaciens*'in çoğu suşu tarafından taşınır ve Ti plazmidine sahip olmayan *A. tumefaciens* suşları, taç safra tümörlerini indükleyemez. Ti plazmitler birçok genin ifadesi için transformasyon vektörleri olarak kullanılabilir. Ancak, vektörler olarak kullanılmadan önce Ti-plazmitlerin modifiye edilmesi gereklidir. Oksin ve sitokinin sentezine yönelik genler, hedef genlerin ifade edileceği bitkilerde tümör oluşumunu önlemek için çıkarılır. Bir opin sentezi transgenik bir bitki için gereksiz olduğundan ve metabolizması üzerinde bir yük oluşturacağından, opin sentezi için genler de çıkarılır. Böylelikle, T-DNA yalnızca iki sınır dizisi tarafından tanımlanır (sağ ve sol sınır). Bu iki sınır dizisi arasına hedeflenen bir gen yerleştirmek için, birkaç restriksiyon endonükleazı için kesim bölgelerini içeren bir DNA dizisinin dahil edilmesi gereklidir. Eklenen DNA'nın konakçı hücrede ekspresyonunu sağlayan bir promotör, bölünme bölgesinin solunda yer almaktadır (Şekil 2.2) (Heldt ve Piechulla 2011).



Şekil 2.2. T-DNA ikili klonlama vektörünün ekspresyon için ilgilenilen bir gene sahip olarak oluşturulması ((Heldt Piechulla 2011)’den değiştirilerek alınmıştır)

Modern transformasyon sistemlerinde, Ti-plazmitten türetilen vektörler artık herhangi bir virülans (vir) geni içermez ve bu nedenle kendi başlarına bir bitki hücresini dönüştüremezler. Dönüşüm için, vir genlerini içeren ancak T-DNA içermeyen ve bu nedenle bir bitkiyi kendi başına dönüştüremeyen ikinci bir sözde yardımcı

plazmitin yardımına ihtiyaç duyarlar. Günümüzde biyoteknolojik uygulamalarda kullanılan bu *A. tumefaciens* suşları, yardımcı plazmide sahiptirler. Dönüşüm için kullanılan vektöre ikili klonlama vektörü denilmektedir ve çeşitli uygulamalar için tasarlanıp ticari olarak temin edilebilir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Bitki transformasyonu için ikili klonlama sisteminin oluşturulması ((Heldt Piechulla 2011)’den değiştirilerek alınmıştır)

Bitkiye aktarılacak yeterli miktarda DNA öncelikle önce *E. coli*’de klonlanarak çoğaltılır. Ardından izole edilip *Agrobacterium* içerisine transforme edilir. *A. tumefaciens* süspansiyonunun bütün yaprağı dokusuna sızmasıyla, T-DNA’nın hücrelerin çok yüksek bir yüzdesine transferini gerçekleştirir. *A. tumefaciens* bütün yaprağının yaralanan bölgesindeki bir hücreye bağlanır. İlk bağlanma adımından sonra *A. tumefaciens*, bakteriyi bitki hücresi yüzeyine sıkıca bağlayan bir selüloz fibril ağı üretir. Yaralanan bitki dokusu ortama asetosiringon (AS) ve hidroksiasetosiringon (HA) gibi belirli bitki fenolik bileşikler salgılar ve bakteriler bu bileşiklere yanıt verir. Bu küçük moleküller (yani AS ve HA), Ti plazmidi üzerinde taşınan vir genlerini indüklemek üzere hareket eder. İndüklenen vir genler agrobakteriyel plazmitten (Ti-plazmit) bir DNA uzantısı olan T-DNA’nın bitki nükleer genomuna aktarılmasına neden olur ve bitki genomunda rastgele bir konuma entegrasyonu ile ilk dönüştürülmüş hücre oluşturulur. Daha sonra, T-DNA’nın parçası olan iki sınıf gen ifade edilir. İlk olarak, dönüştürülmüş bitki hücresi, sürekli çoğalan bir kallus (tümör) oluşturan hücre farklılaşmasına ve hücre bölünmesine neden olan bitki hormonlarını (oksinler ve sitokininler) aşırı üretmeye

başlar. İkincisi, dönüştürülmüş bitki hücreleri, bitkiye hiçbir faydası olmayan, ancak tümörün içindeki apoplastik boşlukta yaşayan Agrobakteriler tarafından bir karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılan yeni amino asitleri (opinleri) sentezlemeye başlar. Fakat hedeflenen bir genin bitkide ifadesi çalışıldığında Ti plazmitte birkaç değişiklik yapılır. Bitki genomuna aktarılacak DNA segmentini (T-DNA) sınırlayan T-DNA sınır dizileri arasındaki, taç tümör oluşumuna neden olan genler çıkarılıp ardından ilgilenilen genlerle değiştirilmiş T-DNA bölgesi yerleştirilir. Böylelikle T-DNA'nın sağ ve sol sınırları arasına yerleştirilen hedef DNA parçası da bitki tarafından sentezlenmeye başlar. Burada bitki transgeni geçici ifadeyle çok yüksek seviyelerde ifade eder. Bu yöntem artık klinik dereceli biyo-farmasötiklerin üretilmesi için çok hızlı, yüksek verimli bir geçici ekspresyon stratejisi olarak geliştirilmiştir (Regnard vd. 2010; Obembe vd. 2011).

2.6.3. Bitkilerde rekombinant protein üretimi için uygun konukçu bitkilerin seçimi

Moleküler rekombinant protein teknolojisinin uygulanması için uygun konakçı seçimi, genel başarı için çok önemlidir. Bu nedenle, moleküler çiftçilik için uygun konukçu bitkilerin seçiminde ekonomik değerlendirme en önemli konudur. Önemli ekonomik faktörler arasında toplam biyokütle verimi, depolama özellikleri (tesisler), taşıma kolaylığı, kurulum maliyetleri, ölçek büyütme ve bakım maliyetleri, muhafaza maliyetleri, işgücü mevcudiyeti, gerekli arazi alanı, üretim döngüsünün uzunluğu ve sonraki işleme maliyetleri gelmektedir (Schillberg vd. 2005; Obembe vd. 2011). Uygun konuk organizma ekonomik değerlendirmeye ek olarak, dönüşüme ve yenilenmeye uygun olmalıdır. Literatürde rekombinant protein üretimine ilişkin birçok farklı bitkilerle çalışılmıştır. Mısır, pirinç ve buğday gibi tahıl tohumları (Obembe vd. 2011; Lee vd. 2017), soya fasulyesi ve bezelye gibi baklagiller (Perrin vd. 2000) ve marul, domates ve en sık olarak patates gibi bir dizi meyve ve sebze ürünü de terapötik rekombinant proteinler üretmek için kullanılmıştır (Daniell vd. 2019) fakat bu ürünlerde doz ve kaliteyi garanti etmek oldukça zor olmuştur.

Tütün, transformasyona ve yenilenmeye son derece yatkın olmasının yanı sıra, yüksek biyokütle verimi, yüksek ölçek büyütme kapasitesi, gıda dışı/yem dışı statüsü (transgenik materyalin gıdaları kirletmesinden ve yem zinciri), köklü dönüşüm protokolleri, tüm yıl boyunca büyüme, hasat ve işleme için büyük ölçekli altyapının mevcudiyeti gibi birçok olumlu kritere sahiptir (Fischer vd. 2004; Biemelt ve Sonnewald 2005). Antikorlar, aşılar ve sitokinler dahil olmak üzere farmasötik olarak ilgili proteinlerin moleküler çiftçiliği için en çok tercih edilen bitkidir (De Muynck vd. 2010; Mamedov vd. 2016). Ayrıca, gelişmiş ülkelerin çoğunda ve günümüzde bazı gelişmekte olan ülkelere halka açık yerlerde yasaklanan tütünün sigara yerine faydalı bir kullanım alanı bulması ve bu bitkinin dolaylı olarak da hayat kurtarıcı olabileceği gerçeği insanların ilgisini çekmektedir (Milne 2008). Tütünün yanı sıra yonca, marul ve ıspanak gibi alternatif yapraklı mahsuller artık moleküler tarım için uygun konakçılar olarak araştırılmaktadır (Rosales-Mendoza vd. 2010).

2.7. Bitkilerde Post Translasyonel Modifikasyonlar

Birçok protein etkinlik gösterebilmek, fonksiyon ve çeşitliliği artırabilmek için PTM adı verilen işleme gerek duymaktadır. Proteinin sentezlenmesi (translasyonu) doğrudan protein üretimi olarak ifade edilemez. Polipeptitler, sentezlendikten sonra belirli üç boyutlu yapıları kazanma gereksinimi duyarlar. PTM'lara, fosfat ve metil gibi küçük moleküllerin ya da karbonhidrat ve lipit gibi büyük ve karmaşık moleküllerin proteine kovalent olarak bağlanması örnek olarak gösterilebilir. Modifikasyonu sağlayan moleküller proteinin üzerindeki belirli aminoasitlere enzimler ile bağlanır (Yalçın 2012). Böylelikle proteinin özelliklerini değiştiren ve kimyasal bileşimini genişleten bir biyokimyasal işlem gerçekleşmiş olur. Hücre içinde PTM çeşitinin yüzlercesi olduğu bilinmekle birlikte bugüne kadar, bitkilerde yaygın olarak çalışılan PTM'lar protein fosforilasyonu, asetilasyon, ubikuitinasyon, süksinilasyon gibi glikozilasyon modifikasyonlarıdır (Xue vd. 2022). Modifikasyonlar, hücrenin çekirdek, sitoplazma, golgi gibi farklı organellerinde gerçekleşebilir. PTM'ler, hücre içi sinyalleşme, gen ifadesi, protein stabilitesi, hücre içi lokalizasyonu ve enzim kinetiği gibi farklı amaçlarda rol alır (Yalçın 2012).

2.7.1. Glikozilasyon

Ökaryotik hücrelerde en yaygın PTM'dir ve en çeşitli modifikasyonlardan biridir. Glikozilasyon, bir glikan oluşturmak için bir karbonhidrat grubunun bir hidroksile veya başka bir fonksiyonel molekül grubuna bağlandığı reaksiyondur ve kovalent olarak proteine bağlanan karbonhidrat sonrasında protein glikoprotein ismini alır. Neredeyse tüm hücre yüzey proteinleri glikozillenmiş şekilde üretilir. Glikozilasyon endoplazmik retikulum (ER)'da proteinlerin katlanıp üç boyutlu yapısını kazanması, proteinlerin gerekli hücre içi bölümlere taşınması ve hücrelerin birbirleri ile etkileşiminde tanınma noktaları olarak rol alır fakat bunların yanı sıra anormal katlanmalarda gerçekleşebilmektedir (Helenius vd. 2001; Helenius ve Aeby 2004; Yalçın 2012). Glikozilasyon, proteinlerin düzgün katlanmasını, stabilitesini, proteolize direncini, taşınmasını ve sınıflandırılmasını etkileyebilir (Gomord vd. 2010). Glikozilasyon sırasında amino asit ile şeker grubu arasındaki bağın tipine göre N- ve O-bağlı glikozilasyon olarak ikiye ayrılır.

2.7.2. N-bağlı glikozilasyon:

N-bağlı glikozilasyon bir asparajin (Asn) amino asitinin amino (NH₂) grubu ile spesifik bir karbonhidrat grubu arasındadır. ER'da salgılanan ökaryotik proteinlerin çoğu, Asn-X-Ser/Thr ve/veya Asn-X-Cys (sitozin) motiflerinin bir parçası olan bir Asn vasıtasıyla N-glikozile edilir (Burada X, prolin hariç herhangi bir amino asittir) (Gomord vd. 2010). N- bağli glikan daha sonra, ER, Golgi ve post-Golgi aparatı üzerinde enzimler tarafından çeşitli derecelerde işleme ve modifikasyonlara tabi tutulur. ER'da son olarak yanlış katlanmış glikoproteinler, ER ile ilişkili bozunma yoluyla proteozomal bozunma için hedeflenirken, doğru katlanmış proteinler, kompleks tip glikanların oluşumunun

üstlenildiği Golgi aparatına taşınır (Saint-Jore-Dupas vd. 2007). N- bağı glikozilasyonun biyolojisi, önemi, tespiti ve bitkilerdeki glikoproteinler son zamanlarda kapsamlı bir şekilde çalışılmıştır (Song vd. 2011; Song vd. 2013). Salgı proteinlerinin büyük çoğunluğu glikozile edildiğinden, bitki büyümesinin, gelişiminin, metabolizmasının ve (a)biyotik tepkilerin birçok yönü, enzim fonksiyonları üzerindeki doğrudan etkiler dahil olmak üzere N -glikozilasyondan etkilenir (Friso ve van Wijk 2015).

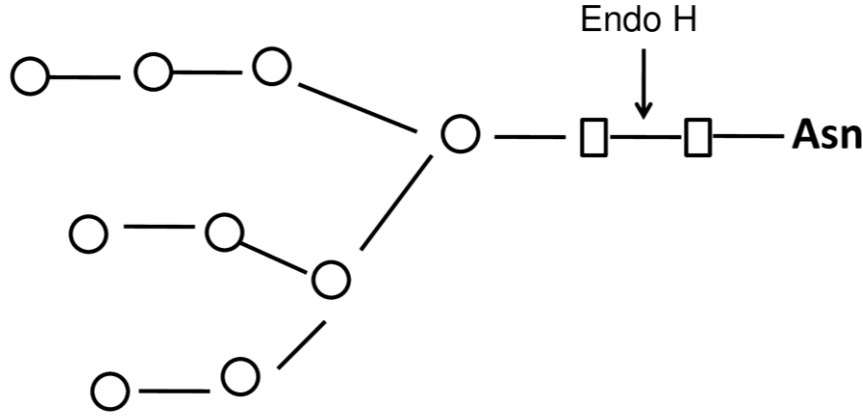
Son on yılda, memelilere/insana özgü N-glikanları sunarken bitkiye özgü N-glikanları azaltmaya veya ortadan kaldırmaya yönelik önemli ilerlemeler kaydedilmiştir (Gomord vd. 2010). Bitki yapımı rekombinant proteinlerin hücre içi hedeflemesi, başlangıçta hedef proteinlerin verimlerini artırmanın bir yolu olarak kullanıldı (Streatfield 2007). Bununla birlikte, bir proteinin glikozilasyon durumu üzerinde de etkiye sahip olabileceği kabul edildi. En yaygın örnek, proteinin C-terminal ucuna etiketinin H/KDEL etiketinin eklenmesi yoluyla rekombinant proteinlerin ER’da tutulmasıdır (Vitale ve Pedrazzini 2005). Yüksek mannoz içerikli glikan, H/KDEL etiketli proteinlere eklenir, ancak Golgi’ye girişi kısıtlayarak, glikanların karmaşık modifikasyonu önemli ölçüde azaltılır (Goetze vd. 2011).

Terapötik uygulamalar için genellikle bitkiye özgü glikanların eklenmesinin ortadan kaldırılması arzu edilir. Bu konuda *in vivo* olarak deglikolize edici enzimlere ihtiyaç duyulmaktadır.

2.7.3. Deglikozilasyon enzimi EndoH ile *in vivo* deglikozilasyon stratejisi

Yapısal proteinler, kan proteinleri, immünoglobulinler ve büyüme hormonları gibi bazı ökaryotik proteinlerde hücre canlılığı için N-glikozilasyon gereklidir. Fakat, protein zincirine glikan gruplarının eklenmesi, biyolojik davranışı büyük ölçüde değiştirebilir ve bu genellikle istenmeyen bir durumdur (Mamedov ve Yusibov 2013). Anormal glikozilasyon, proteinlerin önemli epitoplarını maskeleyerek proteinlerin yanlış katlanmasına yol açabilir (Mamedov vd. 2012). Son zamanlarda, bitki yapımı rekombinant proteinlerin bu istenmeyen anormal glikozilasyonundan kaçınmak için, bakteriyel deglikozilasyon enzimi EndoH (Endo- β -N-asetilglukosaminidaz) ile birlikte ifade edilerek bitkilerde geçici ifade sistemiyle proteinlerin *in vivo* deglikozilasyonu önerilmiştir (Mamedov vd. 2017b).

Deglikolizasyon işlemi, Endo H enziminin bitkide glikoprotein yapısında üretilen proteinlerin N-bağı oligosakaritlerinin iki asetilglukosamin (GlcNAc) arasındaki bölünmeyi bir asparajin kalıntısı bırakarak katalize etmesiyle gerçekleşir (Bkz. Şekil 2.2). Böylelikle Endo H sayesinde hedef proteinlerin doğal yapısında kalması engellenmiş olur (Mamedov vd. 2017b; Mamedov vd. 2019a).



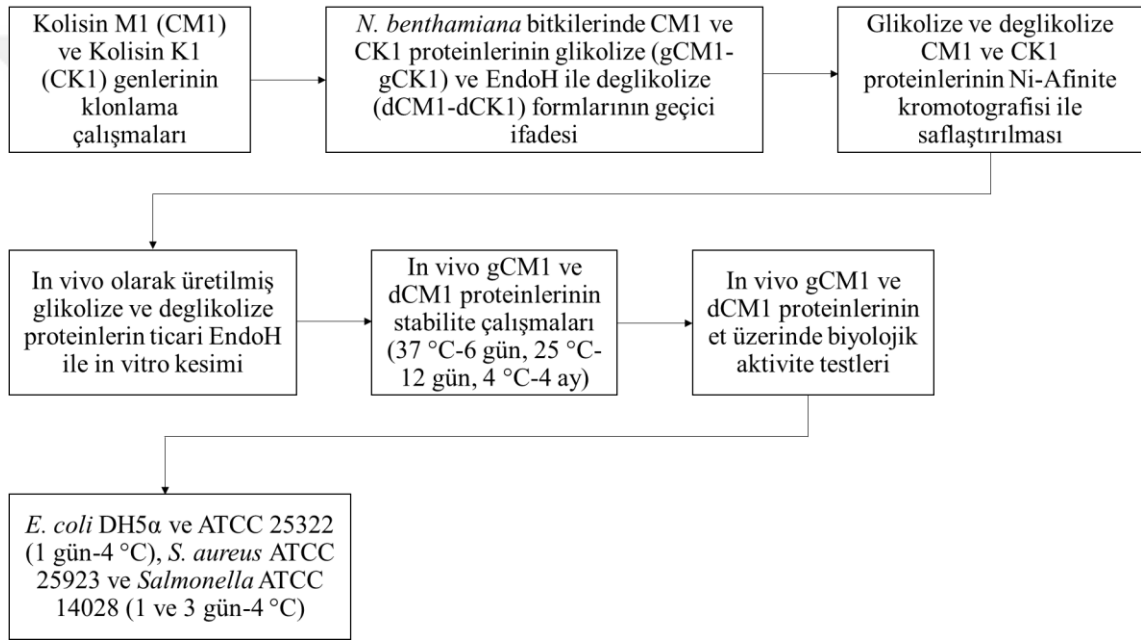
Şekil 2.4. Endo H enziminin glikoproteinde glikan bölgesini kesimi ((Mamedov vd. 2017b)'den alınmıştır)

EndoH, proteinlerin doğal yapısını korurken farklı sıcaklıklarda oldukça kararlı proteinler sağlamaktadır. Bu nedenle, Endo H ile *in vivo* deglikozilasyon yaklaşımı, aşı antijenleri, terapötik proteinler, antikorlar ve endüstriyel enzimler geliştirmek için başka fırsatlar sağlamaktadır (Mamedov vd. 2017b).

Verilen literatür bilgileri ışığında bu tez çalışmasının özgünlüğü ve amacı, *N. benthamiana*'da N-glikozile edilmemiş, doğal benzeri formda Endo H deglikozilasyon teknolojisi kullanılarak rekombinant CM üretmektir. Deglikozilasyon teknolojisinin bitkide ekspresyon seviyesini artırdığını SDS-PAGE ve Western-Blot analizleriyle ispatlamaktır. Ardından, bitkide başarılı şekilde üretilen hem glikozile hem de deglikozile CM proteinlerinin antimikrobiyal aktivite ve stabilite testlerini karşılaştırmalı olarak inceleyip dCM1'in glikolize muadilinden hem aktivite hem stabilitesinin daha iyi olduğunu göstermektir.

3. MATERİYAL VE METOT

Bu tez çalışmasında, *N. benthamiana* bitki ekspresyon sisteminde glikozile ve deglikozile formda ifade edilmiş olan CM1 ve CK1 için basit ve ucuz bir üretim stratejisi kurulmuştur. CM1, literatürde çokça çalışıldığı ve aktivitesinin daha geniş ve yüksek olmasından dolayı diğer kolisin türleri arasından seçilmiştir (Stephan vd. 2017). CK1 tez çalışmasını zenginleştirmek amacıyla seçilmiştir. Çalışma kapsamında, CM1 ve CK1 genlerinin klonlama çalışmaları laboratuvarımızda yapılmış ve bitkiye infiltrasyonu gerçekleştirilmiştir. gCM1 ile dCM1 ve gCK1 ile dCK1 proteinlerinin saflaştırılmaları gerçekleştirilip, CM1 için stabilite ve antimikrobiyal aktivite testleri yapıp gıda (et) üzerinde etkinliği test edilmiştir. Bu çalışmalar neticesinde, proteinin glikolize ve deglikolize formları arasındaki farklılık ortaya konmuştur. Bu kapsamda tüm çalışmalar bir şablon halinde aşağıda toplanmıştır. Ardından kullanılan çözelti ve tamponlar ve beraberinde uygulanan yöntem ve teknikler maddeler halinde sunulmuştur.



3.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Tampon Çözeltiler, Besiyerleri ve Kitler

▪ 1N HCl ve 1N NaOH çözeltileri:

Tez çalışmasında gerektiğinde çözelti pH değerini ayarlamak amacıyla 1N hidroklorik asit ve 1N sodyum hidroksit hazırlanmıştır. 1N hidroklorik asit çözeltisi hazırlamak için %37 HCl'den (derişik asidin yoğunluğu (d): 1 g/ml) 8,3 ml alınıp 100 ml'ye saf su ile seyreltilmiştir. 1N sodyum hidroksit çözeltisi hazırlamak için ise 4 g sodyum hidroksit 100 ml saf suda çözölmüştür. Gerektiğinde daha konsantre HCl ve NaOH çözeltileri hazırlanmıştır.

3.1.1. Gen klonlama çalışmalarında agaroz jel için gerekli tampon çözeltiler ve kullanılan kitler

▪ 50X Tris-Asetat-EDTA (TAE) tamponu

Jel elektroforezi çalışmalarında kullanmak üzere, ihtiyaç duyulan pH stabilizasyonunu ve iletkenliği sağlamak amacıyla TAE tamponu kullanılmıştır. TAE tamponu 50x konsantrasyonda hazırlanmış ve kullanım öncesi 1x konsantrasyona seyreltilmiştir. 50x TAE tamponu hazırlamak için 242 g Tris base, 57,1 ml glacial acetic acid ve 100 ml 0,5 M EDTA 800 ml saf suya eklenip çözülmüştür, pH değeri 8,2 ile 8,4 aralığına ayarlanıp 1 litreye tamamlanmıştır.

▪ 1X TAE tamponu

50x TAE tamponundan 49 kat saf su ile seyreltme yapılarak elde edilmiştir. Bunun için, 490 ml saf su üzerine 10 ml 50x TAE tamponu eklenip karıştırılarak elde edilmiştir.

▪ Agaroz jel (%1)

Çalışmalarda %1'lik agaroz jel kullanılmıştır. Bunun için 60 ml 1X TAE tamponu üzerine 0,6 g agaroz tartılmış ve mikrodalga içerisinde 1-1,5 dakika tutulup erimesi sağlanmıştır.

▪ Etidyum bromür (10mg/ml, Invitrogen; Kat. No: 15585011)

Agaroz jel elektroforezinde çift iplikli DNA'daki bağlara bağlanarak UV ışık altında görünür olmasını sağlayan kimyasaldır. Hazırlanan ve sıcaklığı 55-60 °C'ye getirilen jel içerisine %0,02 (µl /ml) olacak şekilde eklenir.

▪ Yükleme tamponu (New England, Biolab; Kat. No: B7025S)

Jele yüklenecek örneklerin içerisine eklenir (6x) ve boyama özelliği ile yürütme esnasında örneklerin jel içerisinde görünür olmasını sağlar.

▪ Monarch, DNA Jel extraction kiti (New England, Biolab, Kat. No: T1020S)

Jelden kesilen DNA bantlarının kontaminantlardan temizlenmesi için kullanılmıştır.

▪ Monarch, Plazmit Miniprep kiti (New England, Biolab, Kat.No: T1010S)

Bakteri hücrelerinde çoğaltılan plazmitlerden DNA eldesinde kullanılmıştır.

▪ Restriksiyon enzimleri

İlgili geni taşıyan ifade vektörlerinin kontrolünü sağlamak için enzimle kesim ve agaroz jelde kontrol metodu uygulanır. Bu tez çalışmasında XhoI (New England, Biolab #R0146L) ve AgeI (New England, Biolab #R3552) kullanılmıştır.

3.1.2. Western-Blot ve SDS-PAGE için kullanılan tampon çözeltiler

- **SDS / Western jeline örnek yükleme çözeltisi (5x Laemli tampon)**

5x laemli tamponu 9,38 ml Tris-HCl (1 M); 11,9 ml gliserol; 3,33 g SDS; 7,5 ml 2-merkaptotanol (%25); 660 µl Bromofenol mavisi stok süspansiyonu (0.01%) eklenip karıştırılmış ve HCl ile pH 6,8'e ayarlanmıştır. Son hacim 40 ml olacak şekilde hazırlanıp 1 ml'lik tüplere bölünmüş ve ileride kullanılmak üzere -20 °C'de saklanmıştır. Jel yüklenmeden önce tüm protein numuneleri 1/4 hacim (5x) Laemli Tampon ile karıştırılıp kaynatılmıştır.

- **%40 Akrilamid/Bis-akrilamid**

38,96 g akrilamid ve 1,04 g bis-akrilamid tartılmış ve önce 38.96 g akrilamid 30 ml otoklavlanmış saf su içerisinde çözündürülmüştür. Sonra bis-akrilamid eklenir ve tamamen çözündükten sonra hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Alüminyum folyo ile sarılı şişe içerisinde +4 °C'de saklanmıştır.

- **Tris HCl (1,5 M, pH: 8,8):**

1,5 M Tris-HCl hazırlamak için 92,5 g Tris, 400 ml otoklavlanmış ddH₂O içinde eritilmiş ve pH değeri, HCl ile 8,8'e ayarlanıp otoklavlanmış saf su ile hacim 500 ml'ye tamamlanmıştır.

- **Tris HCl (0,5 M, pH: 6,8):**

0,5 M Tris-HCl hazırlamak için 30 g Tris, 400 ml otoklavlanmış ddH₂O içinde çözündürülmüş ve HCl ile pH 6,8'e ayarlanıp otoklavlanmış saf su ile hacim 500 ml'ye tamamlanmıştır.

- **APS çözeltisi (%10):**

50 mg APS, 500 µl saf suda çözündürülerek hazırlanmıştır. APS taze hazırlanmış ve kullanılmıştır.

- **SDS solüsyonu (%10):**

10 g SDS, 90 ml saf suda çözündürülerek hazırlanmıştır.

- **TEMED (Tetramethylethylenediamine, Sigma; Kat. No: T9281):**

Güneş ışığına maruz kalmayacak şekilde muhafaza edilmiştir.

▪ **Jellerin Hazırlanışı (%10 ve %12-bir jel için):**

Çizelge 3.1. %10 ve %12'lik poliakrilamid jellerin bileşimleri

Bileşim	Alt jel		Üst Jel	
	10%	12%	10%	12%
Otoklavlanmış saf su	2,425 ml	2,175 ml	1,98 ml	1,917 ml
%40'lık Akrilamid-Bis solüsyonu	1,25 ml	1,5 ml	368 µl	374,4 µl
Tris-HCl	1,25 ml	1,25 ml	787 µl	787 µl
%10 SDS	50 µl	50 µl	31,25 µl	31,25 µl
TEMED	2,5 µl	2,5 µl	3,125 µl	3,125 µl
%10 APS	25 µl	25 µl	15,62 µl	15,62 µl

Üst jel bir falkon tüp içerisinde hazırlanıp nazikçe karıştırıldıktan sonra sıkıştırılmış iki ince cam arasına dökülmüştür. Üzerine izopropanol alkol eklenip jelin yüzeyi kapatılmıştır ve oda sıcaklığında 20 dakika polimerizasyona bırakılmıştır. Alt jel tamamen donduktan sonra aynı şekilde üst jel hazırlanmış ve dökülmüştür. Hemen ardından da örnek yüklemede kuyucukları oluşturacak olan tarak takılmıştır. Tez çalışması boyunca CM1 için %12'lik, CK1 için ise %10'luk akrilamid jelleri hazırlanmıştır.

▪ **SDS jel boyama tamponu (Coomassie Blue boyama):**

500 ml metanol; 100 ml glasiyel asetik asit ve 1 g Coomassie Blue R250 (Gel Code Blue, Pierce Rockford, IL) otoklavlanmış saf suda eritilmiş ve nihai hacim 1000 ml olarak ayarlanmıştır.

▪ **SDS jel leke çıkarma tamponu:**

700 ml saf su; 200 ml metanol ve 100 ml asetik asit karıştırılarak hazırlanmıştır.

▪ **1xPBS (fosfat tamponlu tuzlu tablet) tamponu (Fisher BioReagents; Kat No: BP2944):**

1 tablet 200 ml saf suda çözündürülmüştür (0,01 M). (PBS tableti 137 mM NaCl ve 2,7 mM KCl içerir; pH 7,4).

▪ **Ekstraksiyon tamponu:**

Kullanılacak yaprak ağırlığının 3 katı olacak hacimde hazırlanır. 1x PBS içerisine önceden hazırlanmış olan 1 mM dietilditiyokarbamik asit (DIECA)'den eklenerek elde edilmiştir (Örn, 60 ml ekstraksiyon tamponu içerisine 120 µl 1 mM DIECA).

- **Running tampon (1x):**

3,03 g Tris; 14,3 g Glisin ve 10 ml SDS (%10) 800 ml otoklavlanmış saf su içinde çözdürülüp son hacim 1 L'ye tamamlanmıştır.

- **Western Blot için transfer tamponu (1x):**

5,8 g Tris; 2,93 g Glisin ve 370 µl %10 SDS karıştırılıp son hacim 1 L'ye tamamlanmıştır.

- **5xTBS:**

5xTBS, 20 mM Tris ve 150 mM NaCl içerir. 12,12 g Tris ve 43,9 g NaCl, 800 ml otoklavlanmış saf su içinde çözdürülmüştür. pH, HCl ile 7,5'e ayarlanmış ve otoklavlanmış saf su ile hacim 1 L'ye tamamlanmıştır.

- **1xTBS:**

200 ml 5X TBS üzerine son hacim 1 L olacak şekilde saf su eklenerek hazırlanmıştır.

- **I-Block (Thermo Fisher Scientific; Kat. No: 1507079):**

1 g I-blok, 100 ml 1XTBS ile karıştırılarak hazırlanmıştır.

- **Primer antikor (4x anti-His Tag; BioLegend USA, Kat No: 652502):**

10 µl antikor, 10 ml I-blok içinde karıştırılarak hazırlanmıştır.

- **Sekonder antikor (HRP Goat anti-mouse IgG; BioLegend USA, Kat No: 405306):**

2 µl antikor, 10 ml I-blok içinde karıştırılarak hazırlanmıştır.

3.1.3. Bakteriyel Büyüme ve Geliştirme Ortamları

Tez çalışmasında kullanılacak plazmitlerin muhafazası ve çoğaltılması için *E. coli*'nin DH5α ve XL1-Blue suşları kullanılmıştır. Bu nedenle tez çalışması boyunca bakteriye yönelik stok hazırlama, kompetent hücre hazırlama, transformasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu işlemler için gerekli katı ve sıvı besiyeri, uygun kimyasallar kullanılarak laboratuvarımızda hazırlanmıştır.

- **LB broth with agar ortamı (Sigma; Kat. No: L3147):**

1 litre katı besiyeri hazırlamak için, standart hazırlanış olarak 25 g LB Broth with agar 1 L saf suda çözülmüştür. Hazırlanan çözelti, 121 °C sıcaklıkta 30 dk sterilize edilmiştir. Sterilizasyon işlemi sonrası cam şişedeki besiyeri, 50 °C sıcaklıktaki su banyosunda 1 saat boyunca bekletilmiş ve besiyerinin çalışma sıcaklığına gelmesi sağlanmıştır. Gerektiğinde bu aşamadan sonra steril kabin içerisinde şişenin içerisine kanamisin (50 mg/ml) antibiyotiği eklenmiştir ve karıştırılarak steril petri kaplarına 25'er ml olacak şekilde dökülmüştür. Donduktan sonra da antibiyotik varlığı gibi içerik bilgileri ve üretim tarihi ile etiketlendikten sonra ışıktan korunması için alüminyum folyoya sarılıp, 4 °C sıcaklıkta üç ay süreyle muhafaza edilmiştir.

- **LB broth ortamı (Sigma; Kat. No: L3522):**

25 g LB Broth (Sigma) tartılmış ve 1 L saf suda çözölmüştür. Katı besiyeri ile aynı şekilde sterilize edilen ve soğutulan besiyeri, 4 °C sıcaklıkta üç ay süreyle muhafaza edilmiştir.

- **SOC (Super Optimal broth with Catabolite repression) ortamı:**

20 g baktotripton, 5 g bakto maya ekstraktı, 2 ml 5M NaCl, 2,5 ml 1M KCl, 30 ml 1M MgCl₂ ve 30 ml 1M MgSO₄ 800 ml otoklavlanmış saf suda çözdüröldükten sonra 1 L'ye tamamlanmış ve 30 dakika 121 °C'de otoklavlanmıştır. Çözelti otoklavdan çıkarıldıktan sonra sıcaklık 50 °C'ye düşürölüp ardından steril kabin içerisinde 20 ml 1M glukoz ilave edilerek +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

- **SYS (BBL) ortamı:**

10 g soya hidrolizat, 5 g maya ekstraktı ve 5 g NaCl 800 ml otoklavlanmış saf suda çözdürölümüştür. 1N KOH veya NaOH ile pH 7,0'a ayarlanıp son hacim saf su ile 1 L'ye tamamlanmış ve 121 °C'de 30 dakika otoklavlanıp +4 °C'de tutulmuştur.

- **MMA ortamı:**

MES ortamı 10 mM MES, 10 mM MgCl₂ olarak hazırlanır. 1,9 g MES ve 2,03 g MgCl₂.6H₂O 800 ml otoklavlanmış saf su içinde çözdürölümüştür. Ardından NaOH ile pH 5,8'e ayarlanıp hacim saf su ile 1 L'ye tamamlandıktan sonra ortam 121°C'de 30 dakika otoklavlanmış ve +4 °C'de tutulmuştur.

- **100 mM Acetosyringone (AS) stok solüsyonu:**

0,4 g Acetosyringone tartılır 12 ml %95 etanol ve 8 ml saf su içinde çözdüröldükten sonra 20 ml'lik son hacme ayarlanmıştır. Stok çözelti 0.45 µm'lık filtreden geçirildikten sonra 250 µl'lik aliquotlar halinde -20 °C'de muhafaza edilmiştir. 1 L MMA için 150 µl Acetosyringone gereklidir (15 mM).

3.1.4. Protein Saflaştırma (His-tag) Tamponları

- **1 M NaH₂PO₄:**

13,8 g NaH₂PO₄ 100 ml saf suda çözdürölülerek elde edilmiştir.

- **1M Na₂HPO₄:**

28,38 g Na₂HPO₄ 100 ml saf suda çözdürölülerek elde edilmiştir.

- **Sodyum fosfat tamponu (20 mM sodyum fosfat+0,3 M NaCl):**

15.48 ml 1 M Na₂HPO₄; 4,52 ml NaH₂PO₄ ve 17.59 g NaCl 800 ml saf suda karıştırılır. HCl ile pH 7,4'e ayarlandıktan sonra saf su ile hacim 1 L'ye tamamlanmıştır.

- **100 mM imidazol stok solüsyonu:**

0,34 g imidazol, 50 ml Sodyum fosfat çözeltisi (20 mM) içinde karıştırılarak elde edilmiştir.

- **Kolon dengeleme tamponu (10 mM imidazol):**

5 ml imidazol stok solüsyonu, 45 ml Sodyum fosfat solüsyonu (20 mM) ile karıştırılarak hazırlanmıştır.

- **Ekstraksiyon tamponu (10 mM imidazol):**

Kullanılacak yaprak ağırlığının 3 katı olacak hacimde hazırlanır. Kolon dengeleme tamponu (10 mM imidazol) içerisine önceden hazırlanmış olan 1 mM DIECA'dan eklenerek elde edilmiştir (Örn, 60 ml ekstraksiyon tamponu içerisine 60 µl 1 mM DIECA).

- **Yıkama tamponu (25 mM imidazol):**

12,5 ml imidazol stok solüsyonu ile 37,5 ml Sodyum fosfat solüsyonu (20 mM) karıştırılarak hazırlanmıştır.

- **Elüsyon tamponu (250 mM imidazol):**

0,85 g imidazol, 50 ml Sodyum fosfat çözeltisi (20 mM) içinde çözündürülmüştür.

3.2. Mikrobiyolojik Çalışmalar

E. coli'nin DH5α ve XL1-Blue suşları 'heat-shock', *Agrobacterium*'un AGL1 ve EHA105 suşları da "elektroporasyon" yöntemiyle plazmit çoğaltmada kullanılmıştır. Bunun için bu hücrelerin kompetent hücre haline getirilmesi gerek olup tez çalışmaları esnasında düzenli aralıklarla stokların yenilenmesi gerçekleştirilmiştir.

E. coli (DH5α ve XL1-Blue) "stok hazırlama" protokolü için steril koşullar altında, stoktan bir miktar bakteri örneği steril plastik öze ile alınmış ve antibiyotik içermeyen katı besiyerine (LB) üç aşamada yayılmıştır. Yayma işlemi her aşamada petri kabının %25-30'unu tarayacak şekilde ve her seferinde plastik öze değiştirerek yapılmış, böylece her aşamada bakteri konsantrasyonunun bir miktar azalması sağlanmıştır. Elde edilen *E. coli* katı hücre kültürü 37 °C sıcaklıkta gün aşırı inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün, 15 ml hacimli falkon tüpüne 5 ml antibiyotiksiz besiyeri eklenmesi ile üç adet sıvı kültür ortamı oluşturulmuş, oluşturulan bu tüplere oluşan kolonilerden üç tanesi steril öze ile seçilmiş ve inoküle edilmiştir. Bu şekilde elde edilen *E. coli* sıvı hücre kültürü, 37°C sıcaklıkta ve 225 dev/dak çalkalama hızında gün aşırı inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün hücre yoğunluğunu belirlemek amacıyla, spektrofotometre cihazı kullanılarak 600 nm dalga boyunda (OD₆₀₀) ölçüm yapılmıştır. Kör okuma olarak 900 µl saf su ve 100 µl sıvı besiyeri kullanılmış, örnek olarak ise 900 µl saf su ve 100 µl kültür kullanılmıştır. *E. coli* stoğu için ideal OD₆₀₀ aralığı, tez çalışmasında 0,6-0,8 aralığında tercih edilmiş, ölçüm sonucu bu değerin altında kaldığında inkübasyona devam edilmiş ve 20 dakikalık periyotlarda ölçüm alınarak değerin istenilen aralığa gelmesi beklenmiştir. Ölçüm sonucu bu değerin üstünde çıktığında ise hücre kültürü sıvı besiyeri ile OD₆₀₀ 0,3 değerine denk gelecek oranda seyreltilmiş, bu noktada hücre kültürü tekrar inkübasyona alınmış ve 20 dakikalık periyotlarda ölçüm alınmıştır. Arzu edilen OD₆₀₀ değerine ulaşan (0,6-0,8) hücre kültürünün, dondurarak muhafaza aşamasına geçilmiştir. Normal donma sırasında hücreler ozmotik şoka uğramakta ve ölmektedir. Bu durumu engellemek için farklı kriyoprotektan kimyasallar, örneğin gliserol (%15-25 (hacimce) oranında), sıklıkla kullanılmaktadır. Hazırlanan hücre kültüründen 500µl örnek, donma sırasında oluşacak

ozmotik şoku engellemek amacıyla 500 µl %40 gliserol (hacimce, son konsantrasyon %20) ile karıştırılmış ve *E. coli*-stok elde edilmiştir. Elde edilen stok içerik bilgileri ve üretim tarihi ile etiketlendikten sonra, -80 °C sıcaklıktaki 6 ay süreyle muhafaza edilmiştir.

E. coli (DH5α ve XL1-Blue) stoğundan “heat-shock” kompetent hücre hazırlamak amacıyla, -80 °C’de saklanan stoktan bir miktar bakteri örneği alınmış ve ilk sıvı hücre kültürü yoğunluğu ölçümü aşamasında kadar “stok hazırlama” protokolü harfiyen takip edilmiştir. Hücre kültürü yoğunluğu ölçüldükten sonra 100 ml besiyerine seyreltilmiş ve 20 dakika periyotlarla yapılan yoğunluk ölçümü, OD₆₀₀ değeri 0,8’e gelene kadar inkübasyona bırakılmıştır. OD aralığı 0,8 olarak tercih edilmiş, ölçüm sonucu bu değer altında kaldığında inkübasyona devam edilmiş ve 20 dakikalık periyotlarda ölçüm alınarak değer istenilen aralığa gelmesi beklenmiştir. Arzu edilen yoğunluğa oluşan sıvı hücre kültürü iki adet 50 ml’lik falkon tüpe paylaştırılmıştır. Tüpler kültür gelişimini olabildiğince yavaşlatmak amacıyla buza konulmuş ve bu aşamadan sonraki tüm işlemler buz üzerinde gerçekleştirilmiştir. Hücre kültürleri 20 dakika süresince buz üzerinde inkübasyona bırakılmış, daha sonra 4000 dev/dak hızında, 3 dakika süreyle santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Santrifüj işleminin ardından süpernatant dikkatlice dökülmüştür. Oluşan bakteri çöküntüsü, her tüp için 5 ml 0,1 M CaCl₂ çözeltisi ile yavaşça çözülmüş ve buz üzerinde 20 dakika süresince yeniden inkübasyona bırakılmıştır. İkinci inkübasyonun sonunda 4000 dev/dak hızında, 3 dakika boyunca santrifüj yapılmış ve süpernatant dikkatlice dökülmüştür. Elde kalan bakteri çözüntüsü, her tüp için 2,5 ml 0,1 M CaCl₂: 15% gliserol (hacimce) karışımı ile çözülmüştür. Toplam 5 ml kompetent hücre, her 1,5 ml hacimli mikrosantrifüj tüpüne 100 µl olacak şekilde pay edilmiş ve -80°C sıcaklıktaki ultra derin dondurucuda muhafaza altına alınmıştır.

Kompetent *E. coli* hücrenin “heat-shock” metoduyla transformasyonu için -80 °C’den bir adet *E. coli*-kompetent alınıp, çözülmesi için buzun üzerine yerleştirilmiştir. Aynı şekilde, *E. coli* bakterisine aktarılabilecek ilgili plazmitte buzun üzerine yerleştirilmiştir. Sonrasında, ilgili plazmitten 5µl örnek, *E. coli*-kompetent’in bulunduğu mikrosantrifüj tüpüne eklenmiş ve bakteri:plazmit karışımı 5 dakika boyunca buz üzerinde inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda karışım 50 saniye boyunca 42 °C sıcaklığa maruz bırakılmıştır. “Heat-shock” işleminin ardından karışım, 2 dakika boyunca buz üzerinde bekletilip, soğutulmuştur. Isıl işlemlerin ardından karışıma 400µl antibiyotiksiz sıvı besiyeri eklenmiş ve tüp çalkalamalı inkübatöre yerleştirilmiştir. Çalkalamalı inkübatör 225 dev/dak hızda, 37 °C sıcaklıkta çalıştırılmış ve hücre kültürü 1 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonrası tüpten 50 µl hücre kültürü alınmış ve ilgili plazmitin taşıdığı seleksiyona uygun antibiyotiği içeren katı besiyerine inoküle edilmiştir. Katı hücre kültürü, koloni oluşturma için 37 °C sıcaklıkta bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün koloni gelişimi gözlenmiş ve ihtiyaca göre steril öze ile 3-5 koloni seçilip 15ml hacimli falkon tüplerin içindeki uygun miktarda antibiyotik içeren 5 ml sıvı besiyeri içerisine bırakılmıştır. Transformant *E. coli*’den plazmit saflaştırmak için bakteri taşıyan falkon tüpler 225 dev/dak hızda, 37°C sıcaklıkta bir gece gelişime bırakılmıştır. Ertesi gün hücre kültürleri inkübatörden alınmış ve plazmit saflaştırma kiti kullanılarak saf plazmit elde edilmiştir. İlgili plazmitin doğrulanması için plazmit içerisindeki hedef gen parçasına ait restriksiyon enzimleriyle kesim işlemi gerçekleştirilmiştir. Saf plazmit içerisinden 5 µl alınıp üzerine kesimi yapılacak restriksiyon enzimleri eklenir. Enzimlere uygun gerçekleştirilen protokol sonrasında plazmit parçası ve genden oluşan tüpün üzerine yükleme boyası eklenerek %1 agaroz

jeline yüklenmiş ve jel 120V potansiyel farkta, 30-45 dakika boyunca elektroforez tankında yürütülmüştür. Elektroforez sonrası agaroz jel UV görüntüleyici sistemde görüntülenmiş ve seçilen kolonilerin transformant olup olmadığı değerlendirilmiştir. Eğer plazmit doğru yerde bant veriyse elde edilen plazmit uygun etiketleme işleminden sonra -20 °C sıcaklıktaki dondurucuda muhafaza edilmiştir.

Tez çalışmasında, sentetik genleri (CM1 ve CK1) taşıyan transformasyon vektörlerinin bitkiye aktarılması için *A. tumefaciens* bakterisinin AGL1 ve EHA105 suşları kullanılmıştır. Bu nedenle tez çalışması boyunca bakteriye yönelik stok hazırlama, kompetent hücre hazırlama, transformasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

A. tumefaciens (AGL1 ve EHA105) stoklarını hazırlamak için, *E. coli* için uygulanan protokole bazı düzenlemeler yapılarak protokol aynı şekilde uygulanmıştır. Bu düzenlemelerden ilki sıcaklıktır, *A. tumefaciens* bakterisinin optimal olarak geliştiği sıcaklık olması sebebiyle protokoldeki tüm sıcaklıklar 28 °C olarak değiştirilmiştir. İkinci değişiklik olarak tüm besiyerlerine, bakterinin kromozomal olarak dayanım taşıması sebebiyle uygun miktarda Rifampisin (25 mg/L) eklenmiştir. Son olarak spektroskopik ölçümler 20 dakikalık periyotlar yerine, saatlik periyotlar ile yapılmıştır. Protokol sonrasında elde edilen *A. tumefaciens* (AGL1 ve EHA105) stokları içerik bilgileri ve üretim tarihi ile etiketlendikten sonra, -80 °C sıcaklıktaki 6 ay süreyle muhafaza edilmiştir.

A. tumefaciens (AGL1 ve EHA105) stoğundan “elektroporasyona uygun” kompetent hücre hazırlamak amacıyla, -80 °C saklanan stoktan bir miktar bakteri örneği alınmış ve ilk sıvı hücre kültürü yoğunluğu ölçümü aşamasında kadar *A. tumefaciens*’e yönelik modifiye stok hazırlama protokolü harfiyen takip edilmiştir. Hücre kültürü ilk yoğunluk ölçümünün ardından 100 ml besiyeri ilavesi ile seyreltilip, inkübasyona bırakılmıştır. Bir saatlik periyotlarla yapılan yoğunluk ölçümleri sonucu OD₆₀₀ değeri 0,8’e ulaşan kültür, 50 ml hacimde falkon tüplere paylaştırılmıştır. Tüpler, kültür gelişimini olabildiğince yavaşlatmak amacıyla buza konulmuş ve bu aşamadan sonraki tüm işlemler buz üzerinde gerçekleştirilmiştir. Hücre kültürleri 30 dakika boyunca buz üzerinde inkübe edilmiştir. Soğutma işleminin ardından hücre kültürü, 4000 dev/dak hızında, 10 dakika boyunca santrifüje maruz bırakılmıştır. Santrifüj işlemi sonrası oluşan süpernatant dikkatlice dökülmüş, bakteri çökeltisi steril soğuk (4 °C) saf su ile tekrar çözülmüştür. Hücre kültürüne tekrar 4000 dev/dak hızında, 10 dakika boyunca santrifüj uygulanmıştır. Yıkama ve santrifüj işlemleri toplamda dört defa tekrarlanmıştır. Mükerrer yıkama/santrifüj işlemleri sonrası bakteri çöküntüleri 2,5 ml steril soğuk (4 °C) saf su ile çözdürülmüş ve tek bir falkon tüpte birleştirilmiştir. Tekrar 4000 dev/dak hızında, 10 dakika boyunca santrifüj işleminin ardından bakteri çöküntüsü 2 ml %15’lik gliserol (hacimce) içeren steril soğuk (4 °C) su ile çözdürülmüştür. Hücre kültürü her tüpte 100µl olacak şekilde 1,5ml hacimdeki mikrosantrifüj tüpüne 100µl olacak şekilde pay edilmiş ve -80 °C sıcaklıktaki ultra derin dondurucuda muhafaza altına alınmıştır.

Kompetent *A. tumefaciens* (AGL1 ve EHA105) hücrelerin “elektroporasyon” metoduyla transformasyonu için -80 °C’den bir adet *A. tumefaciens* (AGL1 ve EHA105) kompetent alınmış ve çözülmesi için buzun üzerine yerleştirilmiştir. Aynı şekilde, *A. tumefaciens*’e aktarılacak ilgili plazmit -20 °C sıcaklıktaki dondurucudan çıkartılıp, buz üzerinde çözdürülmüştür. Transformasyon öncesi ilgili plazmitin konsantrasyonunun ölçülmesi gerekmektedir; zira konsantrasyonu 80 ng/µl’nin üzerinde olan plazmitlerin

elektroporasyon işleminde elektrik arkı oluşumu gibi sorunlarla karşılaşmakta ve elektroporasyon işleminin gerçekleştirildiği küveti patlatabilmektedir. Bu amaçla laboratuvarımızda yer alan Biodrop cihazı ile ilgili plazmitin konsantrasyonu ölçülmüştür ve gerektiğinde saf su kullanılarak konsantrasyon 80 ng/μl'nin altına indirilmiştir. Elektroporasyon işlemi için ilk olarak ilgili plazmitten 1 μl örnek, buz üzerinde çözölmüş *A. tumefaciens*-kompetent hücrelere eklenmiştir. Plazmit:bakteri karışımı 5 dakika boyunca buz üzerinde inkübe edildikten sonra, Bio-Rad marka 2 mm'lik Gene Pulsar küvetlere, hava kabarcığı oluşturmamaya dikkat edilerek aktarılmıştır. Elektroporasyon işlemi için laboratuvarımızda yer alan elektroporasyon cihazı kullanılmıştır. İnkübasyonun ardından küvet iyice kurulandıktan sonra cihaza alınmış, 2500 V, 25 μF kapasitans ve 400 ohm direnç ayarlarında, yaklaşık 10 ms süresince elektroporasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Elektroporasyon işleminin ardından 900 μl SOC besiyeri küvete eklenmiştir. Küvetten pipet yardımıyla alınan hücre kültürü 1,5 ml hacimli mikrosantrifüj tüpüne aktarılmış ve 2 saat boyunca 225 dev/dak hızda, 28 °C sıcaklıkta inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda 50 μl örnek uygun antibiyotikleri (kanamisin; 50 mg/ml) taşıyan katı besiyerine inoküle edilmiştir. Katı hücre kültürü, koloni oluşturma için 28 °C sıcaklıkta 2 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Koloni gelişimi gözlenen katı hücre kültürleri ve akabindeki işlemler öncesi katı hücre kültürü alüminyum folyoya sarılıp, 4 °C sıcaklıktaki buzdolabına konulmuştur.

3.3. Tez Çalışmasında Kullanılan Bakteriyel Suşlar ve Genlerin Tasarımı

Çalışmalarda kullanılmak üzere CM1 ve CK1 genleri *N. benthamiana* bitkilerinde ekspresyon için optimize edilmiş (kodon optimizasyonu, mRNA stabilitesi vb.) ve GeneArt1 AG (Thermo Fisher Scientific) tarafından sentezlenmiştir. KDEL dizisi (ER tutma sinyali) ve His6 etiketi (afinite saflaştırma etiketi) C-terminal ucuna eklenmiştir. *N. benthamiana* bitkilerinde, sinyal peptidi (amino asitler 1-42), *Nicotiana tabacum* PR-1a sinyal peptidi (MGFVLFSQLPSFLLVSTLLLFLVISHSCRA) ile değiştirilmiş ve genlerin N-terminal uçlarına eklenmiştir. Elde edilen diziler, ticari bir plazmit olan PUC57 aracılığıyla laboratuvarımıza gönderilmiştir (PUC57-CM1/CK1). Endo H geninin (GenBank katılımı AAA26738.1) tasarım aşamaları daha önce laboratuvarımızda gerçekleştirilmiştir. Çalışmalar neticesinde pBI121 ekspresyon vektörüne yerleştirilerek pBI-Endo H-FLAG-KDEL yapısı elde edilmiştir (Mamedov vd. 2017b) ve *Agrobacterium* stoğu içerisinde -80 °C'de saklanmıştır. Tez çalışmaları boyunca bu stok yenilenmiştir ve Endo H deglikolize edici enzim olarak tez çalışmasında kullanılmıştır.

Yabani tip *N. benthamiana*, Akdeniz Üniversitesi'nde iklim odasında (sıcaklık, nem ve ışık kontrollü sistem) toprakta yetiştirilmiştir. Tez çalışmaları boyunca kullanılan bakteri suşları, "DH5α ve XL1-Blue" (*E. coli*), "AGL-1 ve EHA-105" (*A. tumefaciens*) laboratuvarımızda tez çalışması öncesinde temin edilmiş ve -80 °C'de stok olarak muhafaza edilmiştir. Çalışmalar esnasında ihtiyaca göre hazırlanıp, kullanılmıştır.

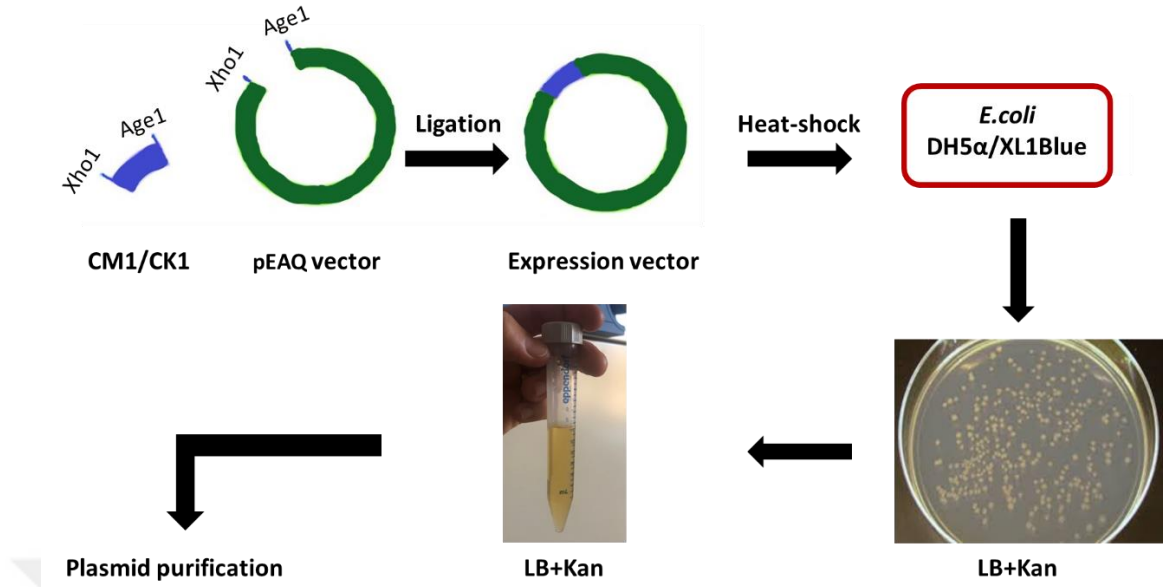
3.4. CM1 ve CK1 Genlerinin Klonlama Çalışmaları, *N. benthamiana* Bitkilerinde İnfiltrasyon Yoluyla CM1 ve CK1 Proteinlerinin Glikolize ve EndoH ile Deglikolize Formlarının Geçici İfadesi

Genler ticari bir plazmit (PUC57) içerisinde gelmiştir ve XhoI ve AgeI enzimleriyle kesilmiştir. Kesim reaksiyonu için enzimlerin temin edildiği firmanın yönergeleri takip edilmiş; 10 μl plazmit, 2,5 μl XhoI, 2,5 μl AgeI, 5 μl tampon çözelti

(1-1 NEBuffer (10x); New England, Biolabs), ve 30 µl saf su (nuclease free) kullanılarak reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Karışım 37 °C sıcaklıkta, 1 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Kesilme yapıldıktan sonra ürünler %1'lik agaroz jelde, 120V potansiyel farkta, 30-45 dakika boyunca yürütülmüştür. Ardından UV görüntüleyicide (UVP, High Performance UV Transilluminator) görüntülenmiş ve açılan plazmitler jelden steril bisturi yardımıyla izole edilmiştir. Son olarak, jel parçaları uygun jel saflaştırma kiti kullanılarak (Monarch, DNA jel ekstraksiyon kiti) temizlenmiş ve klonlamaya hazır hale getirilmiştir. Elde edilen “açılmış” plazmit uygun etiketleme işleminden sonra -20 °C sıcaklıktaki dondurucuda muhafaza edilmiştir.

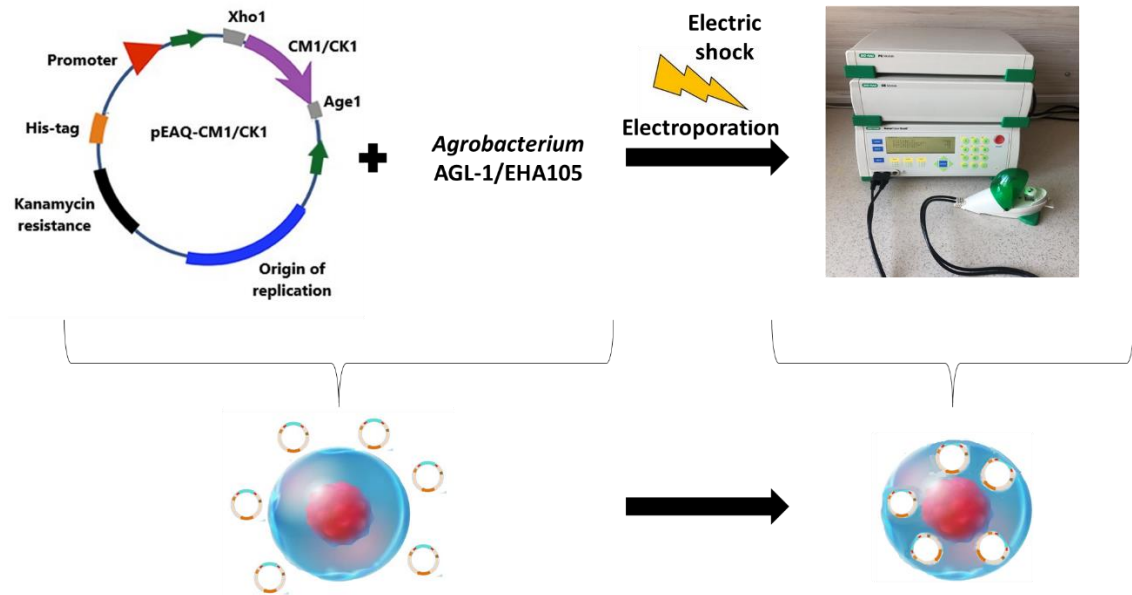
Tez çalışmasında ilgili genlerin *N. benthamiana* bitkisinde ifade edilebilmesi için pEAQ ikili ifade vektöründen faydalanılmıştır. pEAQ tez çalışmasından önceki süreçte laboratuvarımıza temin edilmiştir (Sainsbury vd. 2009). Yalnızca bu çalışma için *E. coli*'de “heat-shock” yöntemi ile çoğaltılmış, sonrasında hem klonlanacak genetik materyalde hem de ekspresyon vektörünün başında ve sonunda bulunan uygun (Xho1 ve Age1) restriksiyon enzimleriyle kesilerek “açık uçlu” hale getirilmiş ve jelden geri kazanım yöntemiyle elde edilmiştir. Ardından uygun etiketleme işlemi yapıp -20 °C sıcaklıktaki dondurucuda muhafaza edilmiştir.

CM1 ve CK1 gen dizilerinin pEAQ vektörlerine yerleştirilmesinde ligaz enzimi (BioLabs, Quick Ligase, #M2200L) kullanılmıştır. Bunun için, ligasyon kitinin temin edildiği firmanın yönergeleri takip edilmiş; 4 µl saf su (nuclease free), 10 µl ligase buffer (T4 DNA ligaz; BioLabs #M0202S), 1 µl pEAQ vektörü, 5 µl DNA ve 1 µl quick ligase enzimi kullanılarak reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Karışım oda sıcaklığında 20 dakika boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Sonrasında pEAQ-CM1-His6-KDEL ve pEAQ-CK1-His6-KDEL plazmit yapıları elde edilmiştir. Ligasyon işleminin ardından plazmitler ısı şoku (heat-shock) yöntemi ile (42 °C'de 50 saniye) *E. coli* DH5α ve XL1-Blue kompetent hücrelerine atılmıştır. 37 °C'de 225 rpm çalkalama hızında 1 saat geliştirildikten sonra kanamisin (50 mg/mL) antibiyotiği içeren LB agar (LB+kan) üzerine yayılarak 37 °C'de etüv içerisinde bir gece gelişime bırakılmıştır. Gelişen petrilerden koloni seçimi yapıp kanamisin içerikli LB besiyerinde overnight geliştirilmiştir (Bkz. Şekil 3.1) ve plazmit izolasyon kiti (Monarch, Plasmid Miniprep Kit) yardımıyla plazmitler, *E. coli* DH5α ve XL1-Blue içerisinden çıkartılmışlardır. Biodrop ile konsantrasyonları ölçülmüştür. Hem plazmitin içine CM1 ve CK1 genlerinin yapışıp yapışmadığını kontrol etmek hem de plazmitin çoğaldığını görmek için içerisinden bir miktarı alınıp tekrar Xho1 ve Age1 enzimleriyle kestirilmiştir. Ardından agaroz jele yüklenip kontrolleri sağlanmıştır.



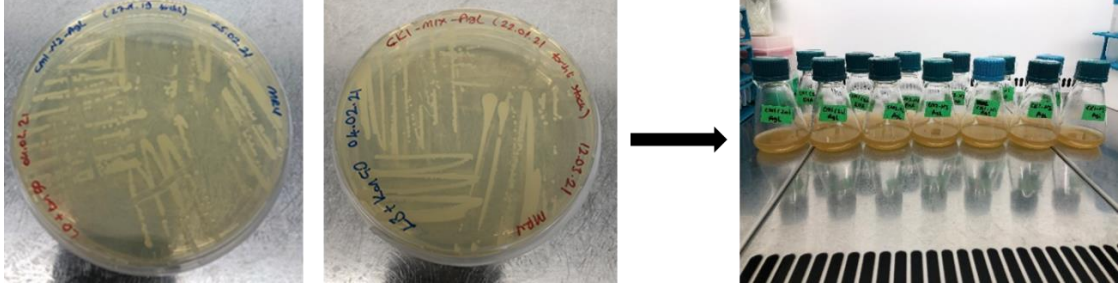
Şekil 3.1. CM1 ve CK1 genlerinin pEAQ vektörüne ligasyonu ve *E. coli*'de çoğaltılması aşamaları

Doğrulanması yapılan plazmitler elektroporasyon yöntemi kullanılarak *A. tumefaciens* suşu AGL1 ve EHA-105'e transfer edilmiştir. Yaklaşık 50-60 µg olacak şekilde ilgili plazmit stok kompetent bakteri (100 µl) içerisine eklenmiş ve ardından elektroporasyon küvetinin merkezine aktarılmıştır. Buz üzerinde bekletilen küvet iyice kurulandıktan sonra elektroporasyon cihazının ilgili yerine yerleştirilmiş ve cihazın gerekli ayarları yapıldıktan sonra elektrik akımı etkisiyle plazmitler Agro kompetent hücrelerinin porlarından içeriye girmiştir (Bkz. Şekil 3.2).



Şekil 3.2. CM1 ve CK1 genlerini taşıyan ekspresyon vektörünün *A. tumefaciens* suşlarına elektroporasyonu

Hemen ardından SOC besiyeri ilave edilmiş (1 ml) ve küvetin içerisindekilerin tamamı ayrı bir ependorfa alındıktan sonra 28 °C sıcaklık ve 220 rpm çalkalama hızında 2 saat gelişime bırakılmıştır. Süre tamamlanınca içerisinde ~50 µL'si alınarak LB+kan petrilere yayılmıştır. 28 °C'de etüvde 3 gün gelişimi beklenen bakterilerden 3. günde koloni seçimi yapıp BBL+kan (50 mg/ml) besiyeri içerisine atılmış ve overnight gelişime bırakılmıştır (Bkz. Şekil 3.3).



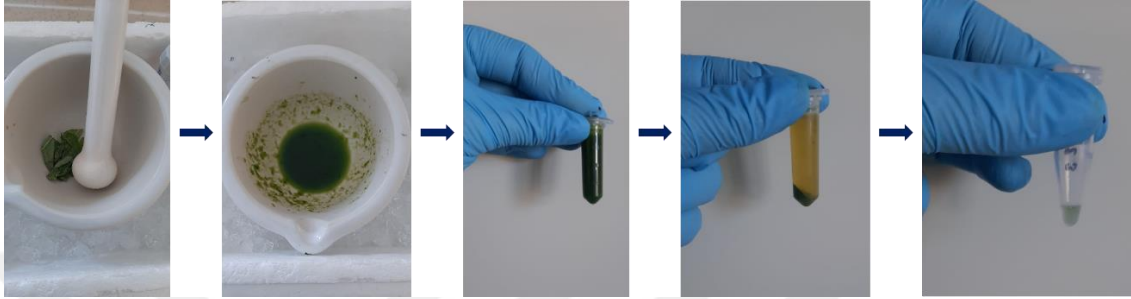
Şekil 3.3. pEAQ-CM1 ve pEAQ-CK1 plazmitlerini taşıyan *A. tumefaciens* AGL-1 ve EHA-105 suşlarının LB+kan platede ve BBL+kan sıvı besiyerinde geliştirilmesi

Spektrofotometre yardımıyla OD değerleri ölçülen hücreler falcon tüplere alınıp santrifüjle (3000xg, 5 dk, 4 °C) çöktürülmüştür. Ardından MMA medium içerisinde nazikçe çözündürülmüş ve içerisine %15 olacak şekilde asetosiringon (100 mM stok) eklenmiştir. Oda sıcaklığında 2 saat çalkalanmaya bırakılıp ardından ucu kesilmiş şırınga aracılığıyla *N. benthamiana* bitkilerine infiltrasyonu gerçekleştirilmiştir. *N. benthamiana* bitkileri perlit ve torftan oluşan drenajlı karışıma tohumdan ekilerek iklim odasında optimum sıcaklık (25 °C) ve nem oranlarında (%60-70) yetiştirilmiştir. Kaselere ekilen tohumların gövdeleri yaklaşık 6-7 cm uzunluğuna gelince fidanlar aynı karışımı içeren saksılara alınmıştır. *Agrobacterium* aracılığıyla infiltrasyon işlemi, kesik uçlu şırıngalar yardımıyla *N. benthamiana* bitkilerinin yaklaşık 5-7 cm çapındaki yapraklarının altlarından enjeksiyon şeklinde tüm yaprağa yayılarak gerçekleştirilmiştir (Bkz. Şekil 3.4).



Şekil 3.4. *N. benthamiana* bitkilerinin yapraklarına *A. tumefaciens* aracılığıyla infiltrasyon uygulaması

İnfiltrasyondan sonraki 4, 5 ve 6.dpi (CM1) ve 5,6 ve 7.dpi (CK1) günlerde yapraklardan kesit alınıp buz üzerinde steril porselen havan içerisinde yaprak ağırlığının 3 katı hacimde ekstraksiyon tamponunda (1xPBS içinde çözünmüş, 1 mM DIECA içerir) ekstraksiyon solüsyonu ile ezilmiştir. Ezilen bitki ekstraktı havan içerisinde alınıp 1,5 veya 2 ml hacimli ependorf tüplere alınmıştır. +4 °C’de 20.000 xg’de 5 dakika santrifüj edilmiş sonrasında tüplerin üstünde biriken toplam çözünebilir protein (TSP) kısmından alınıp üzerine 5x laemli tampon ilave edilerek 100 °C’de 5 dakika su banyosunda bekletilip proteinin denatüre olması sağlanmıştır (Bkz. Şekil 3.5).



Şekil 3.5. İnfiltrasyon yapılan *N. benthamiana* bitkilerinden farklı dpi’da alınan yaprak kesitlerinin ekstraksiyon ve örnek hazırlama işlemleri

Western-Blot ile ekspresyon seviyeleri kontrol edilmiştir. Western sonucuna göre maksimum üretimin gözlemlendiği gün için sonraki üretimler devam ettirilmiştir. Proteinlerin hem glikozile hem de deglikozile formları çoklu miktarda olarak iklim odasında üretilmiştir. Deglikolizasyon işlemi için, Endo H enzimi ve kolisin proteinlerini ifade eden plazmit yapılarını içeren *A. tumefaciens* hücreleri uygun oranlarda karıştırılmış (9+1) ve bu genlerin *N. benthamiana* bitkisinde birlikte ekspresyonu (co-expression) yapılarak rekombinant deglikolize proteinler üretilmiştir.

3.5. *N. benthamiana*’da Üretilen gCM1 ve gCK1 ile Endo H ile Deglikolize Forma Getirilen dCM1 ve dCK1 Proteinlerinin Saflaştırılması

Daha önce laboratuvarımızda glikozile ve deglikozile formda elde edilmiş rekombinant proteinlerin saflaştırılması için saflaştırma prosedürü geliştirilmiştir (Mamedov vd. 2016; Mamedov vd. 2017b). Tez çalışması kapsamında da CM1 ve CK1 proteinlerinin saflaştırılmasında HisPur Ni-NTA resin (Thermo Fisher Scientific, Kat. No. 88221) kullanılarak His-etiketli rekombinant protein IMAC afinite kromatografisi (Immobilized Metal Affinity Chromatography) ile saflaştırılmıştır (Bkz. Şekil 3.6).



Şekil 3.6. His-etiketli glikolize ve deglikolize CM1 ve CK1 proteinlerinin IMAC afinite kromatografisi

Bu metotla saflaştırmada, doğrudan infiltre edilmiş gCM1 ile Endo H ile co-expression şeklinde infiltre edilmiş dCM1 proteinlerine ait ~30'er gram, CK1 proteinlerine ait ~80'er gram yaprak dokusu *N. benthamiana* bitkilerinden hasat edilmiştir. Ardından fosfat bazlı bir ekstraksiyon çözeltisi (20 mM sodyum fosfat, 0,3 M NaCl, 10 mM imidazol ve 1 mM DIECA, pH 7,4) içinde 45 saniye boyunca öğütülmüş bitkinin yaprak ekstraktı gazlı bezden geçirilip 4 °C'de 20.000 rpm'de 30 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüjlemeden sonra bitki hücresi süpernatantları, daha önce 2 kolon hacmi (CV) dengeleme tamponu (20 mM sodyum fosfat, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH 7,4) ile dengelenmiş olan HisPur Ni-NTA reçinesi kullanılarak 0.45 µm çaplı filtreden geçirilmiştir.

Süzülmüş süpernatantın tamamı kolondan geçirildikten sonra, kolon 10 CV yıkama tamponu (20 mM sodyum fosfat, 0,3 M NaCl, 25 mM imidazol, pH 7,4) ile yıkandı. Saflaştırma kolonundaki resinden proteinleri toplamak için elüsyon tamponu (20 mM sodyum fosfat, 0,3 M NaCl, 250 mM imidazol, pH 7,4) kolondan geçirilmiş ve 500'er µl olacak şekilde ependorf tüplere toplanmışlardır. Saflaştırılmış proteinlerin konsantrasyonları, Biodrop ile ölçülmüş ve yüksek konsantrasyonlu olan elüsyon fragmanları birleştirilmiştir. Daha sonra fragmanlar Millipore yoğunlaştırıcı (10K MWCO) ile 4 °C'de 8000 g'de konsantre edilmiştir. Konsantrasyon esnasında hem glikolize hem de Endo H enzimi ile deglikolize formda olan CM1 ve CK1 proteinlerinin içerisinde bulunduğu dengeleme tamponu ile (1xPBS) değişimi yapılmıştır.

Yaklaşık 1 µg/µl konsantrasyona getirilip 1,5 ml'lik ependorf tüplere 500'µl olacak şekilde bölünmüştür. Konsantre proteinin SDS-PAGE ve Western-Blot analizleri yapılmış ve -80° C'de bir sonraki çalışmaya kadar saklanmıştır.

3.6. In Vivo Olarak *N. benthamiana*'da Üretilen gCM1 ve dCM1 ile gCK1 ve dCK1 Proteinlerinin In Vitro Olarak Ticari Endo H Enzimiyle Kesimi

Bitkide *in vivo* olarak üretimi gerçekleştirilip IMAC tarafından saflaştırılan glikolize CM1/CK1 ve bitkide *in vivo* olarak üretilmiş EndoH ile deglikolize forma getirilen CM1/CK1 proteinlerinin glikolize ve deglikolize olduklarını kanıtlamak için laboratuvarımızda ticari olarak satın alınmış bakteriyel EndoH (Kat. No. P0702S, New England Biolabs) enzimi ile kestirilip kontrolleri sağlanmıştır. Bu amaçla, gCM1/CK1

ve dCM1/CK1 proteinleri (1-2 µg) üzerine Glycoprotein denaturation buffer (10X) eklenip 100 °C’de 10 dakika denatüre edilmiştir. Sonrasında Endo H protokolüne göre tüp içerisine Glycobuffer 3 (10X) (New England, BioLabs #B3704S) ve ticari Endo H (New England, BioLabs #P0702S) eklenmiştir. Tüpler 37 °C’de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonunda Western-Blot analizleri yapılmıştır. Görüntü, yüksek duyarlılığa sahip GeneGnome XRQ Chemiluminescence görüntüleme sistemi (Syngene, A Division of Synoptics Ltd) kullanılarak alınmıştır (Mamedov vd. 2017b).

3.7. *N. benthamiana*’da *In Vivo* Üretilen Glikozile CM1’in Deglikozile Muadili ile Karşılıklı Stabilite Çalışması

Deney tasarımı, buzdolabında tutulan, daha sonra çıkartılan ve belirsiz bir süre boyunca buzdolabından uzak tutulan gıda numunelerini modellemeyi amaçlamıştır. Böyle bir durum karşısında koruyucu olarak kullandığımız CM1 proteininin stabilitesini ne kadar süre koruyabildiğini test etmek amacıyla farklı sıcaklıklarda stabilite deneyleri gerçekleştirilmiştir. Literatürde yer alan benzer çalışmalar incelendiğinde CM1 için stabilite testlerinin sıcaklıkları +4 °C, 25 °C ve 37 °C olarak belirlenmiştir (Kazanaviçiūtė vd. 2018; Hahn-Löbmann vd. 2019). Başlangıç örnekleri ile tüm zaman aralıkları için 2 tekrarlı ayrı ayrı işaretlenen her bir tüpün içerisine gCM1 ve dCM1 proteinlerinden ~350-400 ng aralığında protein eklenmiş ve belirlenen sıcaklıklarda ve sürelerde stabilite testine tabi tutulmuştur. 37 °C için 6 gün, 25 °C için 12 gün ve +4 °C için de 4 ay olarak proteinlerin stabilite çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Başlangıç örneği hiç bekletilmeden doğrudan -80 °C’ye kaldırılan örneği temsil eder. Stabilite süresi biten örneklerle 5x laemli tampon (SDS boyası ile) eklenerek -80 °C’de bekletilmiş ve son stabilite örneği alındıktan sonra toplu şekilde Western-Blot analizleri yapılmıştır.

3.8. SDS-PAGE ve Western Blot Analizi

gCM1 ve dCM1 proteinlerinin bitkide üretimlerinin her seferinde ekstraksiyondan sonra, saflaştırmalardan sonra ve stabilite testleri sonucunda sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ve Western blot analizleri gerçekleştirilmiştir.

SDS-PAGE analizleri, genel anlamda Coomassie Blue boyası ile boyanmış %10’luk ve %12’lik poliakrilamid jelleri (Bkz. Çizelge 3.1) üzerinde gerçekleştirilmiştir. Öncelikle jeller üzerindeki kuyucuklara örnekler yüklendikten sonra tank içerisine Running tampon (Bkz. 3.1.2) koyulup 100 V’da 15 dk ve 200V’da 45 dakika yürütülmüştür. Süre tamamlanınca jel takıldığı kasetten çıkartılıp üst jel kısmı kesilerek uzaklaştırılmıştır. Alt jel kısmı distile suya bırakılıp 5 dakika yıkanmıştır. Jel yıkandıktan sonra 1 saat Coomassie boyama tamponu ile boyandı ve 15-20 dakika arayla boya giderme tamponu ile boyadan arındırıldı. Jellerin boya giderme tamponu ile yıkanması, jel rengi temizlenene kadar devam etti. Son adımda jel fotoğrafları çekildi.

Western Blot analizinde iki adım vardır: İlk adım, SDS-PAGE analizi ile aynıdır. Yine örnekler %10’luk ve %12’lik poliakrilamid jellere yüklenmiştir ve sonrasında SDS-PAGE metodu ile yürütülmüştür. Sonrasında transfer tamponu ile 1 saat 100 V’da yürütülerek Polyvinylidene difluoride (PVDF, Millipore, Billerica, MA) membrana aktarılmıştır. Membran, %1 I-blok (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) ile 1 saat bloke edilmiştir. İşaretli proteinler, anti-4x His primer antikoru ile saptanmıştır. Ardından ortamda bağlanmadan kalan birincil antikoru temizlemek için önce I-blok ile ardından da

1xTBS ile yıkamalar yapılmıştır. Sonrasında membran bir anti-mause horseradish peroksidaz (HRP)-konjuge sekonder antikor ile etiketlenmiştir. Son olarak kemilüminesan substrat (Enhancer (2,5 ml) + peroxidase (2,5 ml); SuperSignal West Pico, Thermo Fisher Scientific, Grand Island, NY) ile sinyal üretimi sonucu gCM1 ve dCM1 proteinleri tespit edilmiş ve görüntülenmiştir. Görüntüler, GeneGnome üzerinde GeneSnap yazılımı ile görüntülenmiş ve Gene Tools yazılımı (Syngene Bioimaging, BK) kullanılarak nicelleştirilmiştir.

3.9. N. benthamiana’da In Vivo Üretilen gCM1 ve dCM1’in Biyolojik Aktivite Testleri

3.9.1. Mikrobiyal suşlar

E. coli DH5α ve patojen suşlar *E. coli* ATCC 25322, *Salmonella* ATCC 14028 ve *S. aureus* ATCC 25923 üzerinde mikrobiyolojik çalışmalar yapılmıştır. Patojen olmayan bakteriler Mamedov Lab.’da daha önceden stok halinde bulunmaydı. Patojen olan bakteriler ise “Yıldız Teknik Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü”nden temin edilmiştir. Seçilmiş olan suşlar öncelikle LB agar plakelerde 37 °C’de overnight canlandırılmışlardır. Ardından aktivite testi yapılacak olan suşlar LB Broth içerisinde 37 °C-225 rpm’de aerobik koşullar altında geliştirilmişlerdir. Suşlar, kullanım zamanına kadar -80 °C’de dondurucuda saklanmıştır.

3.9.2. CM1’in besiyeri ortamında antibakteriyel aktivite testi

Burada çalışmalar kolisin proteininin aktifliğini bakteriler üzerinde LB ortamında test ederek gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla öncelikle, *E. coli* DH5α -80 °C’de bulunan stoktan alınarak LB besiyeri ortamında gece boyunca büyütülmüşlerdir (37 °C, 225 rpm). Ardından OD₆₀₀’de ölçüm alınmış ve bir kısmına (1-3 ml) gerekli seyreltme işlemi yapıp (200-400x) seyreltilmiş örnekten 100 µl ayrı bir tüpe alınarak üzerine 2 µl lügol çözeltisi (Sigma) eklenmiş ve bakteriler fikse edilmiştir (hareketsiz bırakılmışlardır). Hareketsiz hale getirilen bakteri süspansiyonundan 10 µl alınarak lam-lamel arasına damlatılmıştır. Thoma lamı yöntemi kullanılarak fikse edilmiş bakterilerin mikroskopta sayımları gerçekleştirilmiştir (Zeiss PrimoVert). Sayım sonrasında gerekli hesaplamalar yapılarak bakteriyi geliştirdiğimiz LB besiyeri ortamının 1 ml’inde kaç bakteri hücresi olduğu hesaplanmıştır (Bkz. Formül 3.1).

$$\frac{\text{Bakteri sayısı}}{\text{ml}} = \text{sayılan toplam bakteri sayısı} \times \text{seyreltme oranı} \times 10000 \quad (3.1)$$

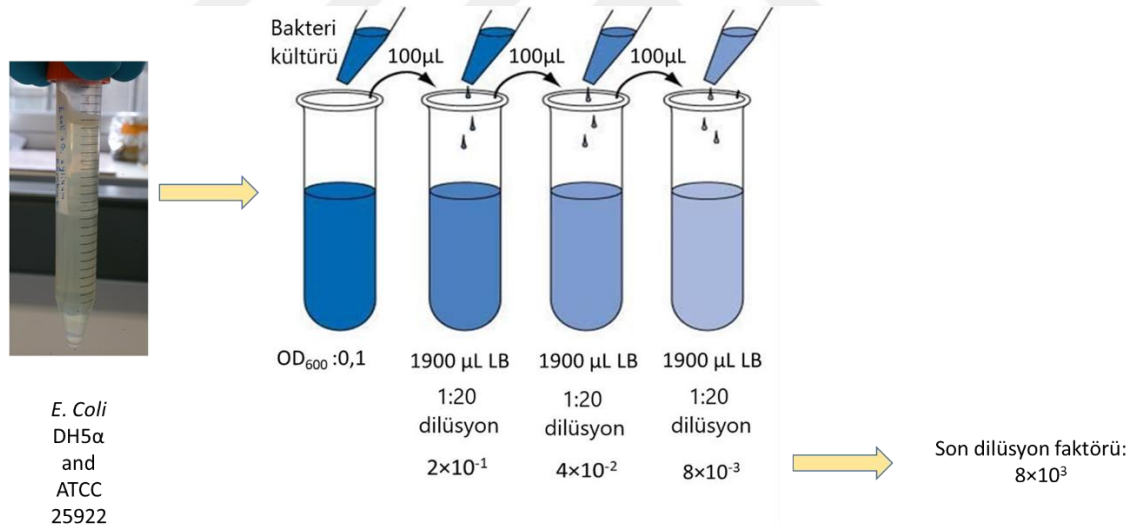
Thoma lamı üzerinde sayılan toplam bakteri sayısı, yapılmış olan seyreltme oranıyla, sonrasında da thoma lamı üzerinde sayım yapılan karenin alanıyla (10⁴) çarpılır. Hesaplanan bakteri sayısına göre aktivite deneyinde kullanmak üzere toplamda 1×10⁶ *E. coli* bakterisi olacak şekilde deneye eklenmiştir.

LB besiyeri içerisinde alınan yaklaşık 1×10⁶ *E. coli* bakterisi gCM1 ve dCM1 için aynı miktarlarda ayrı ependorf tüplere eklenmiştir (LB besiyeri ile hacim 150 µl’ye tamamlanmıştır). Bakterilerin üzerine farklı konsantrasyonlarda (3-4-5 µg) protein eklenmiştir (protein hacmi 1xPBS ile 100 µl’ye tamamlanmıştır). (+) kontrol grubuna protein yerine 1xPBS eklenmiştir. Bir gece 25 °C oda sıcaklığında bekletilen örnekler ertesi gün antibiyotiksiz LB plakelere 50 µl’si yayılmıştır. 37 °C’de bir gece bekletilen

petrilerden ertesi gün koloni sayımı yapılmıştır (koloniler önce OpenCFU 3.9.0 programı ile sayılmış ardından gözle tekrar sayılarak tekrar edilmiştir). Çalışmalar pozitif (LB agar üzerine aynı miktarda hücre ve kolisin miktarı kadar da 1xPBS) kontrol ile birlikte gerçekleştirilmiştir (Schulz vd. 2015). Burada proteinin farklı konsantrasyonlarda *E. coli* DH5α suşu üzerinde gösterdiği aktifliği ve bu aktiflik sonucunda petrilerde oluşacak kolonilerin (+) kontrol gruplarına kıyasla ne kadar azaldığı kantitatif olarak değerlendirilmiştir.

3.9.3. CM1'in gıda numunesi üzerindeki bakteriyel bulaşmaya karşı aktivite testi ve kantitatif bakteri sayımı

E. coli'nin DH5α ve ATCC 25322 numaralı suşları ile *Salmonella* ATCC 14028 ve *S. aureus* ATCC 25923 numaralı suşlar LB Broth besiyerinde geliştirilmiştir. OD₆₀₀'de her biri 0,1'e seyreltilmiştir. Ardından seri dilüsyonlar gerçekleştirilip optimum bakteri seyreltme oranları belirlenmiştir. *E. coli* DH5α ve ATCC 25322 numaralı suşları 3 kez 20 kat, *Salmonella* ATCC 14028 ve *S. aureus* ATCC 25923 suşları ise 3 kez 15 kat seri seyreltmeye tabi tutulmuşlardır ve deneyde kullanılacak bakteriyel kontaminasyon çözeltileri bu şekilde hazır hale getirilmiştir. Seri dilüsyonun nasıl gerçekleştirildiği seyreltme faktörünün hesaplanması *E. coli* için Şekil 3.7'de örneklendirilmiştir. *Salmonella* ve *S. aureus* için de dilüsyonlar aynı yöntemle yapılmıştır.



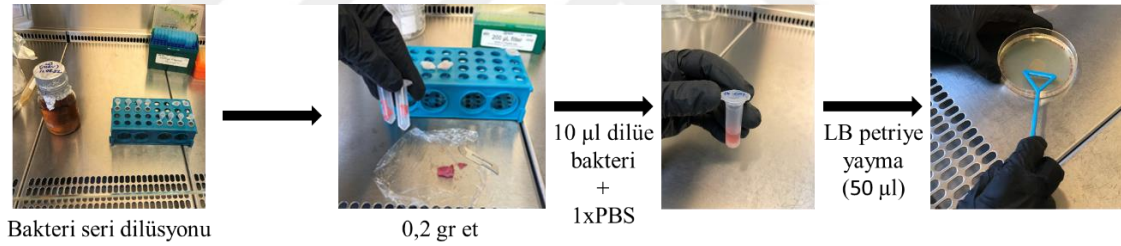
Şekil 3.7. Bakteriyel seri seyreltme hazırlama ve seyreltme faktörü hesaplama

Son seyreltme faktörleri seri seyreltmeler sonrasında hesaplanmıştır. *E. coli* DH5α ve ATCC 25322 için 3 kez 20 kat seyreltmenin sonunda 8x10³, *Salmonella* ve *S. aureus* için ise 3 kez 15 kat seyreltmenin sonunda 3,4x10³ (1,5x10¹ – 2,25x10² – 3,4x10³) olarak kabul edilmiştir. Ardından LB petriye yayılan seyreltme örneklerinde koloniler sayılmıştır. Deneyde kullanılan bakteri süspansiyonunun 1 ml'sinde koloni oluşturan birimlerin (kob) sayısı aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır (Bortolaia ve Hendriksen 2017) (Formül 3.2).

$$\frac{kob}{mL} = \frac{(koloni\ sayısı \times son\ seyreltme\ faktörü)}{petriye\ yayılan\ hacim} \quad (3.2)$$

Deneyde kullanılan yağsız dana eti parçaları yerel bir kasaptan satın alınmıştır. Etler yaklaşık 0,5 g olacak şekilde ayrı ependorflar içerisine bırakılmış ve üzerlerine bakteri kontaminasyon çözeltisinden 10 µL ilave edilerek iyice yedirilmesi sağlanmıştır. Yaklaşık olarak 30 dakika oda sıcaklığında steril kabin içerisinde beklemeye bırakılan etlerin üzerine belirlenen miktarda (*E. coli* için 1-3-5 µg, *Salmonella* ve *S. aureus* için 0,62-1,25-2,5-5 µg) gCM1 ve dCM1 proteinleri ayrı ayrı eklenmiştir ve etlerin üzerlerini kapatacak şekilde ependorf tüplerin hacmi 1xPBS ile 250 µL'ye tamamlanmıştır. Tüpler oda sıcaklığında beklemeye bırakılmıştır (~45 dakika). Ardından ependorflar kapakları kapalı şekilde 4 °C'de 1 gün ve 3 gün (n=en az 2) olacak şekilde beklemeye bırakılmıştır. Süresi tamamlanan ependorflar +4 °C'den alınıp sıvı kısmından belli miktarı (50 µL) LB agar üzerine yayılıp (Bkz. Şekil 3.8) 37 °C'de gece boyunca gelişime bırakılmıştır ve ertesi gün koloni sayımı yapılmıştır. Çalışmalar pozitif (kontaminasyon çözeltisi eklenmiş et numunesi ve kolisin miktarı kadar 1xPBS) ve negatif (kontamine edilmemiş et numunesi ve kolisin miktarı kadar 1xPBS) kontroller ile birlikte tekrarlı şekilde gerçekleştirilmiştir (Schulz vd. 2015). Deneyler sonrasında petriyelerde gelişen koloniler önce OpenCFU 3.9.0 programı ile sayılmış ardından gözle tekrar sayılarak tekrar edilmiştir. Ardından kob/g et cinsinden hesaplamaları yapılmıştır (Formül 3.3).

$$\frac{kob}{gr} = \frac{\text{koloni sayısı} \times \text{son seyreltme faktörü} \times \frac{(\text{petriye yayılan hacim})}{(\text{ependorf içerisindeki toplam hacim})}}{\text{deneyde kullanılan et miktarı}} \quad (3.3)$$



Şekil 3.8. Bakteriyel aktivite testinde gerçekleştirilen basamaklar

Deney sırasında yapılan bakteri ekimi, seri seyreltme hazırlama, etlerin parçalara bölünmesi ve deneyin gerçekleştirilmesinin tüm aşamaları steril kabin içerisinde gerçekleştirilmiştir. Laboratuvarımızda kullandığımız steril kabin (Thermo Scientific, S2020, Class II, Safety Cabinet) patojen suşlarla çalışmak için gerekli BSL (Biyogüvenlik seviye) seviyesine sahiptir. Çalışmaların öncesinde ve sonrasındaki hijyen ve sanitasyon koşullarına çok dikkat edilmiştir.

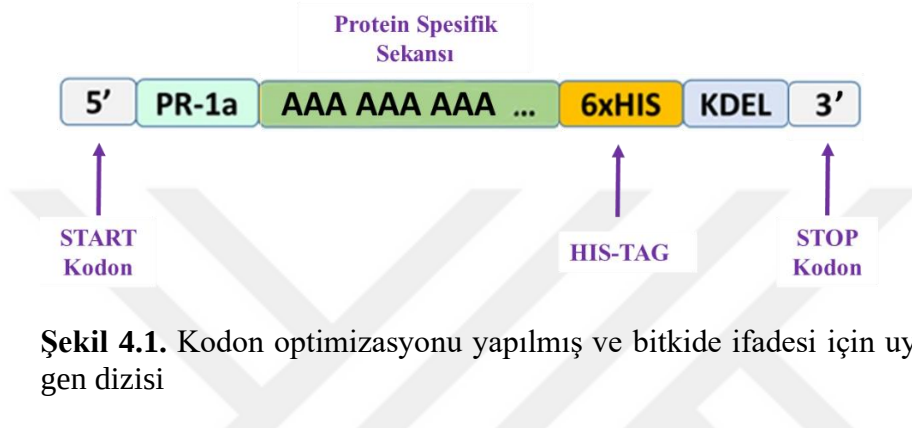
3.10. İstatistiksel Analiz

Tez çalışmasında elde edilen verilerin istatistiksel analiz değerlendirmeleri için GraphPad Prism 7.0 programı kullanılmıştır. Student's t-testi bulguların istatistiksel olarak değerlendirilmesinde tercih edilmiştir. Sonuçlar %95'lik güven aralığında ve anlamlılık $p < 0,05$ seviyesinde değerlendirilmiştir.

4. 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

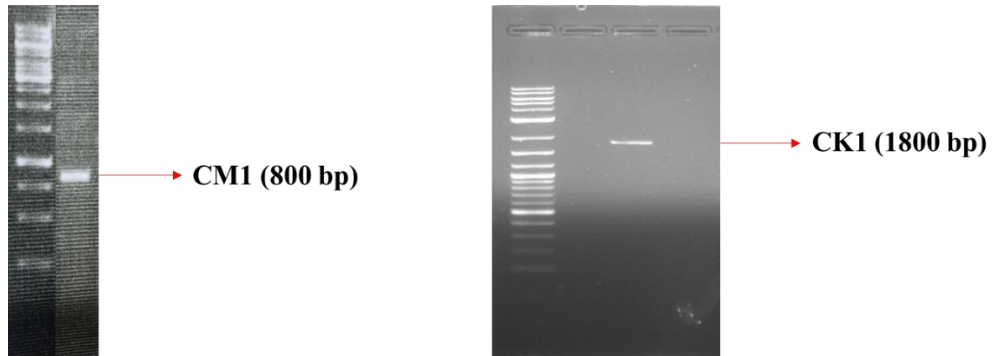
4.1. Kolisin M ve K'nin Klonlanması, *N. benthamiana* Bitkilerine İnfiltrasyonu ve Ekspresyonu

CM1 ve CK1 proteinlerini kodlayan genlerinin C-terminal uçlarına KDEL dizisi ve His6 etiketi eklenmiş N-terminal uçlarına ise PR-1a sinyal peptidi eklenmiştir. *N. benthamiana*'da ekspresyonları için tasarlanıp optimizasyonları yapılmıştır. GeneArt1 AG tarafından sekanslamaları yapıp ticari plazmit PUC57 içerisinde laboratuvarımıza gelmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Kodon optimizasyonu yapılmış ve bitkide ifadesi için uygun şekle getirilmiş gen dizisi

Hem PUC57 hem de CM1 ve CK1 için ortak kesim bölgeleri olan Xho1 ve Age1 restriksiyon enzimleriyle enzim protokollerine uygun şekilde kestirilip agaroz jelde yürütülmüş ve 800 bp bandındaki CM1 ile 1800 bp bandındaki CK1 genlerinin UV ışık altında steril bistüri ile kesilerek plazmitten ayrılmaları sağlanmıştır. DNA Jel Ekstaksiyon kiti aracılığıyla protokole uygun şekilde genler jel içerisinden temizlenmiştir. Elde edilen CM1 ve CK1 genleri için doğrulama yapılması amacıyla agaroz jele yüklenip UV florasan ışık altında görüntüleri alınmıştır (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Restriksiyon enzimleriyle kesilip taşıyıcı plazmit PUC57'den ayrılan CM1 ve CK1 genlerinin agaroz jel görüntüsü

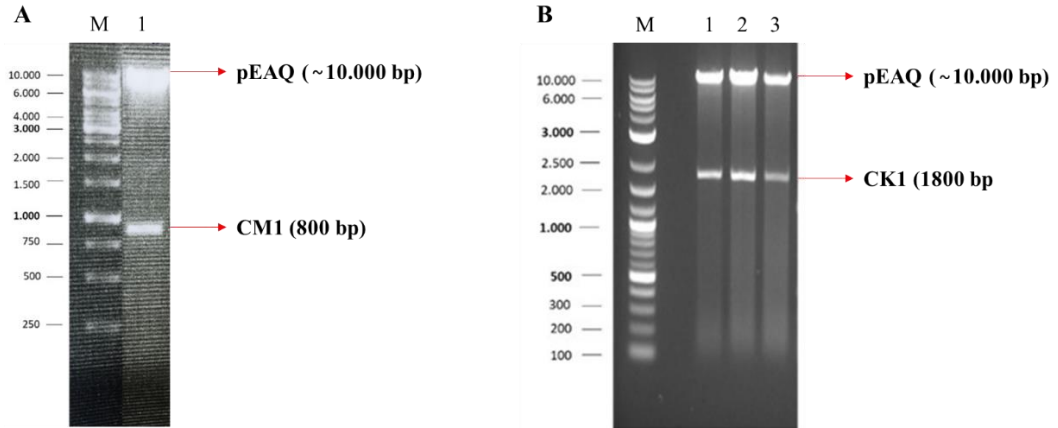
Jelden geri kazanılmış olan CM1 ve CK1 genleri ligasyon kitinin metoduna uygun olarak ligaz enzimi sayesinde *N. benthamiana* bitkilerinde ekspresyonu için uygun olan pEAQ vektörlerine yerleştirilmiştir. İkisinde de bulunan yapışkan uçlar sayesinde birleşme doğru şekilde gerçekleşmiştir. Bu birleşme için laboratuvarımızda bulunan

pEAQ vektörler öncesinde restriksiyon enzimleriyle kesilerek yapışkan uçlu ve açık forma getirilmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. pEAQ vektörü (temsili) ve restriksiyon enzimleriyle kesilip yapışkan uçlu duruma gelmiş agaroz jel görüntüsü

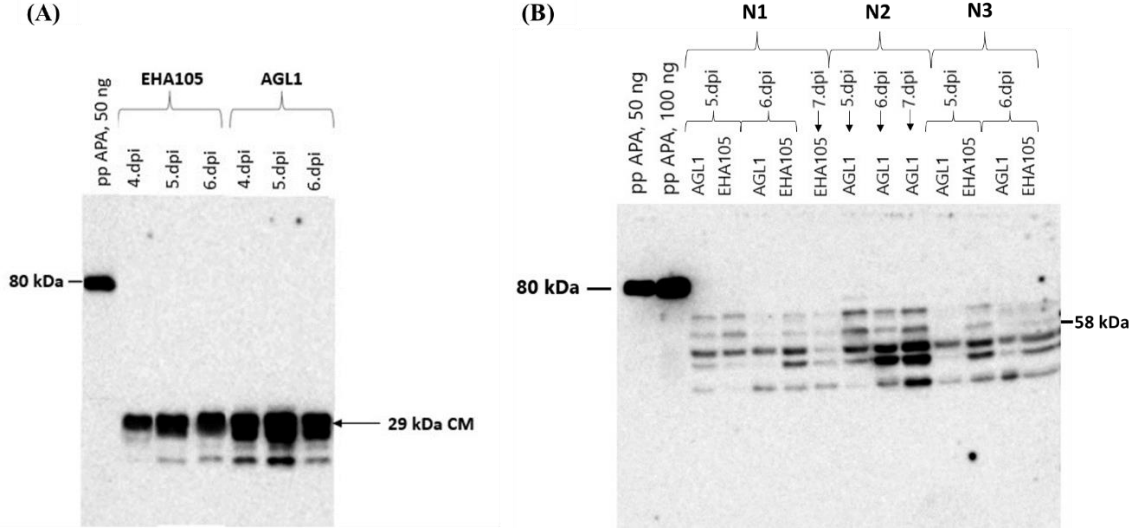
Ardından kapalı bir plazmit haline gelen pEAQ vektörü ve CM1/CK1 genleri çoğaltılmak üzere *E. coli*'nin DH5 α suşuna heat-shock yöntemi ile transfer edilmiştir. *E. coli* kanamisin içeren LB agar (LB+kan, 50 mg/mL) üzerine yayılmıştır. 1 gece 37 °C'lik inkübatörde gelişime bırakıldıktan sonra koloniler seçilmiş ve sıvı LB'ye alınmıştır. Ertesi günü gelişen hücrelerin içerisinden plazmit saflaştırma kiti ile plazmitler çıkarılmıştır. Doğruluğunu kontrol etmek için içerisinden bir miktarı alınıp tekrar Xho1 ve Agel enzimleriyle kestirilmiştir. Ardından agaroz jele yüklenip doğrulamaları gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. pEAQ vektörü ile birleştirilen CM1 ve CK1 genlerinin *E. coli*'de büyütüldükten sonra seçilen kolonilerin plazmit izolasyonu sonucu agaroz jel görüntüleri. **A-1)** pEAQ-CM1 plazmitinin DH5 α 'dan izole edilen N1 kolonisi; **B-1)** DH5 α 'nın 1 numaralı kolonisinden (N1) izole edilen pEAQ-CK1 plazmiti; **B-2)** DH5 α 'nın 2 numaralı kolonisinden (N2) izole edilen pEAQ-CK1 plazmiti; **B-3)** DH5 α 'nın 3 numaralı kolonisinden (N3) izole edilen pEAQ-CK1 plazmiti; M- 1 kb DNA marker (BioLabs, #N3232S)

Doğrulaması yapılan plazmitlerin DNA konsantrasyonları BioDrop cihazı ile ölçülmüştür ve bant kalınlığına da bakılarak en yüksek konsantrasyonları veren A-1 (185 ng/ μ L) ve B-2 (192 ng/ μ L) plazmitleri elektroporasyon yöntemi kullanılarak *A. tumefaciens* suşu AGL-1 ve EHA-105'e transfer edilmek üzere seçilmiştir. AGL-1 ve

EHA-105 stok kompetent bakterileri içerisine atılmıştır (60-70 ng konsantrasyonda olacak şekilde). SOC besiyeri içerisinde 2 saat 28 °C’de çalkalayıcıda bekletildikten sonra BBL+kan içeren petrilere yayılmıştır. 3 günlük BBL+kan petride gelişimin ardından seçilen koloniler BBL+kan sıvı besiyerinde overnight büyütülerek bitkiye infiltrasyon için gerekli protokoller uygulanmıştır (Bkz. 3.4). Bitkilere infiltre edilen pEAQ-CM1 plazmiti için 4.dpi, 5.dpi ve 6.dpi (day post infiltration)’da pEAQ-CK1 plazmiti için 5.dpi, 6.dpi ve 7.dpi’da yapraklardan örnekler alınarak ezilmiş ve Western-blot analizleri ile kontrolleri sağlanmıştır (Şekil 4.5).



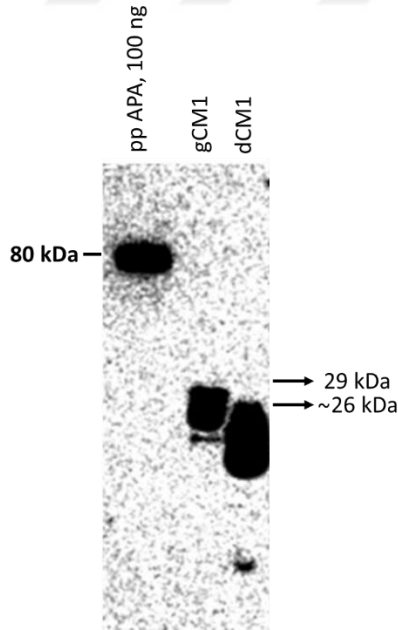
Şekil 4.5. CM1 ve CK1 genlerinin farklı *Agrobacterium* suşlarında ekspresyonlarını gösteren Western-Blot görüntüleri. **A)** CM1 geninin *A. tumefaciens*’in AGL1 ve EHA105 suşları aracılığıyla *N. benthamiana* bitkisinde farklı dpi (day post infiltration)’de ekspresyonları; **B)** CK1 geninin *A. tumefaciens*’in AGL1 ve EHA105 suşları aracılığıyla *N. benthamiana* bitkisinde farklı dpi’de ekspresyonları; pp APA 50-100 ng (80 kDa)

Hem CM1 hem de CK1 proteini için en iyi bant kalınlığının görüldüğü *A. tumefaciens* stoğundan devam edilmiştir. CM1 için Şekil 4.5’in “A” görselinde AGL1 suşunda 5.dpi’da en iyi bandı vermiştir, CK1 ise “B” görselinde 58 kDa seviyesinde en iyi bant kalınlığı 2 numaralı plazmitin AGL1 suşunda görülmüştür. Daha kısa sürede protein elde edildiğinden dolayı da 5.dpi sonraki çalışmalar için seçilmiştir. Hem gCM1 ve gCK1 hem de EndoH ile koekspresyon yapılarak üretilen dCM1 ve dCK1 proteinlerinin çok miktarda üretimi için iklim odasında uygun koşullar altında yetiştirilen *N. benthamiana* bitkilerinin yapraklarından biomass yapılmıştır (Şekil 4.6). Literatürle kıyaslandığında CM1 ve CK1 için maksimum protein seviyesine daha erken ulaşıldığı anlaşılmıştır (Schulz vd. 2015; Hahn-Löbmann vd. 2019).



Şekil 4.6. İklim odasında uygun koşullarda yetiştirilen ve yapraklarına infiltrasyon yapılan *N. benthamiana* bitkileri

Biomass yapıldıktan sonra infiltrasyon yapılan yapraklar 5.dpi'da toplanmıştır. İnfiltrate yapraklar üst üste dizilmiş ve tümünü kapsayacak şekilde çok az miktarda kesit alınmıştır. Ardından ekstraksiyonu yapıp Western-blot ile kontrolü sağlanmıştır (Şekil 4.7).



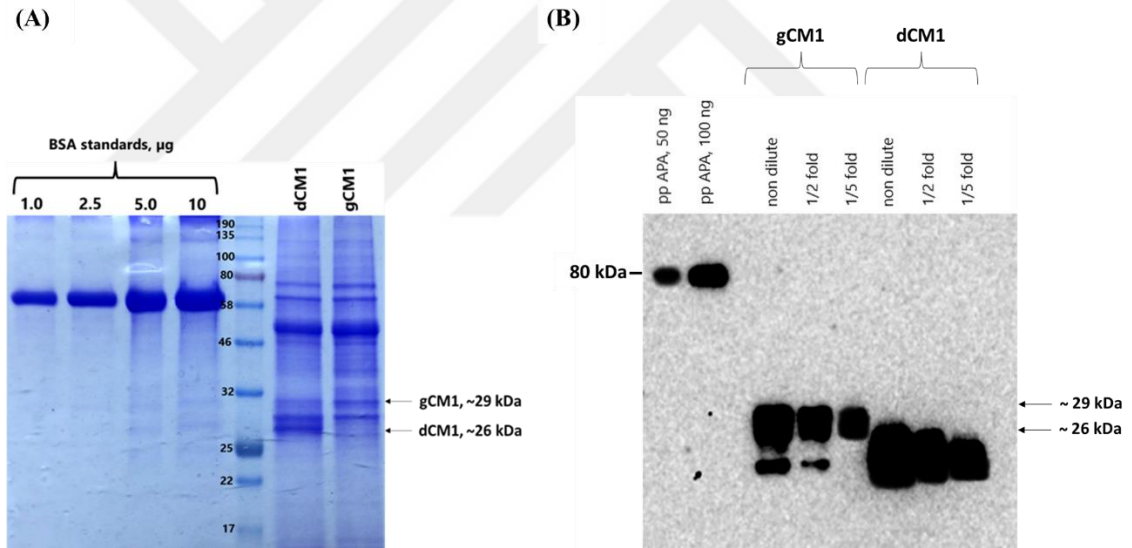
Şekil 4.7. Saflaştırması yapılmış gCM1 ve dCM1 proteinlerinin Western-Blot görüntüsü; pp (plant produce) APA-100 ng (80 kDa)

Biomass yapılan yapraklarda yeterince protein olduğu Şekil 4.7 ile gösterilmiştir. Bant kalınlıkları Gene Tools yazılımı ile hesaplanmış ve gCM1 110 ng dCM1 230 ng

çıkıştır. Buradan hesaplamaları yapıldığında gCM1 proteininin ekspresyon seviyesi 41,25 mg/kg (0,04 mg/g) çıkarken dCM1'in 86,25 mg/kg (0,09 mg/g) çıkıştır. Literatürde dCM1 ilk kez bu çalışmayla gösterildiği için yorum yapılamamaktadır ancak gCM1'in 1,5-2,8 mg/g aralığında ekspresyon gösterdiği belirtilmiştir (Schulz vd. 2015; Hahn-Löbmann vd. 2019; Łojewska vd. 2020). Glikolize proteinin ekspresyon verimi literatürden düşüktür. Artırılması için gerekli optimizasyonlar sonraki çalışmalarda yapılabilir. Fakat deglikolize proteinin glikolize muadiline kıyasla bitkide 2 katından daha fazla ekspresyon gösterdiği kanıtlanmıştır. Bu sürecin hemen arkasından protein saflaştırılması gerçekleştirilmiştir.

4.2. *N. benthamiana* Bitkisinde Üretilen CM1 ve CK1 Proteinlerinin Saflaştırılması

gCM1 ve dCM1 ile infiltre edilmiş *N. benthamiana* bitkilerinden ~30'ar ve gCK1 ve dCK1 ile infiltre edilmiş yapraklardan ise ~80'er gram yaprak dokusu hasat edilmiş ve sonrasında afinite kromatografisi prosedürüne göre saflaştırma gerçekleştirilmiştir. Yaklaşık 1 mL son hacme indirilip 500'er µL olacak şekilde aliquat edilerek -80° C'de bir sonraki çalışmaya kadar saklanmıştır. Saflaştırılan proteinlerin konsantrasyonları SDS-PAGE ve Western-Blot analizleri sonucunda bant kalınlıklarına göre hesaplanmıştır (Şekil 4.8).

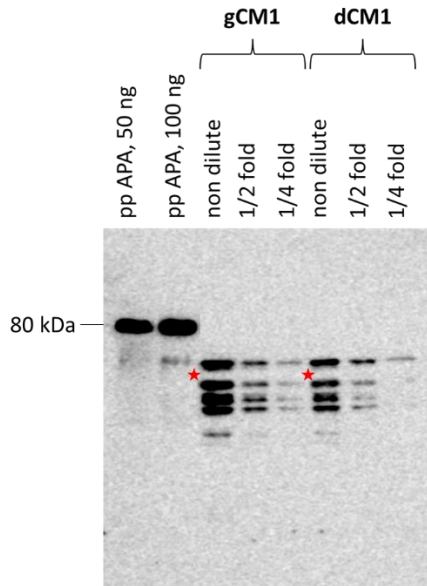


Şekil 4.8. Saflaştırma sonrası glikolize ve deglikolize CM1 proteinlerinin SDS-PAGE ve Western-Blot görüntüleri. **A)** Saflaştırılması yapılmış gCM1 ve dCM1 proteinlerinin SDS-PAGE görüntüleri; BSA standards (BioLabs, #B9000S)- 1.0, 2.5, 5.0 and 10 µg; M—color prestained protein standard (NEB); **B)** Saflaştırılması yapılmış gCM1 ve dCM1 proteinlerinin Western-Blot görüntüleri; pp (plant produced) APA standart- 50 ng and 100 ng (80 kDa)

Şekil 4.8'deki SDS-PAGE görüntüsünde proteinin moleküler kütlesi, CM proteininin moleküler kütlesi ile tutarlı olan ~29 kDa'da doğru noktada bant vermiştir. Hemen altında da EndoH ile deglikolize forma getirdiğimiz dCM1 proteini bant vermiştir. SDS bandının çok ince çıkmasından dolayı proteinimize Western analizi yapılmıştır ve Western-Blot görüntüsündeki bant kalınlıkları Gene Tools yazılımı ile hesaplanmıştır. Buradan da 5 kat dilüe edilmiş (1/5 fold) gCM1 proteinin konsantrasyonu yaklaşık 80 ng

olarak hesaplanmıştır. Bu durumda seyreltme yapılmamış protein bandının 400 ng/8 μ L (50 ng/ μ L) olduğunu söyleyebiliriz. 30 gram yapraktan 1 ml protein elde ettiğimizi düşünürsek gCM1 proteini için saflaştırma verimi 1,7 mg/kg bitki biyokütlesidir. dCM1 proteinin 5 kat dilüe edilmiş (1/5 fold) halinin konsantrasyonu ise yaklaşık 180 ng olarak hesaplanmıştır. Buradan seyreltme yapılmamış protein bandının 950 ng/8 μ L (112,5 ng/ μ L) olduğu belirlenmiştir. 30 gram yapraktan 1 ml protein elde ettiğimizi düşünürsek dCM1 için saflaştırma verimi yaklaşık 3,75 mg/kg bitki biyokütlesi olduğu saptanmıştır. Eşit ağırlıkta yapraktan saflaştırılmalarına rağmen dCM1'in saflaştırma verimi ile gCM1 proteininin verimi arasında 2,2 katlık bir oran gözlenmiştir. Buradan da proteinin deglikolize formunun bitkide 2,2 kat daha fazla saflaştırma verimine sahip olduğu sonucuna varabiliyoruz. gCM1 proteinin saf ve sonrasında elde edilen SDS-PAGE ve Western-Blot görüntüleri literatürde yapılmış başka çalışmalarla benzerlik göstermektedir, fakat glikolize proteinin saflaştırma verimi literatüre göre daha az bulunmuştur (Hahn-Löbmann vd. 2019; Łojewska vd. 2020). Ancak deglikolize CM1 proteini ilk kez bu çalışmada ifade edildiği için saflaştırma verimi hakkında yorum yapılamamaktadır. Yine de ekspresyon seviyelerinin, dolayısıyla saflaştırma verimlerinin yükseltilmesi için ileriki çalışmalarda bazı optimizasyonlar gerçekleştirilebilir. Fakat her halükârda deglikolizasyon ile daha yüksek ekspresyon ve saflaştırma verimlerinde protein elde edebileceğimiz bu çalışmayla kanıtlanmış olmaktadır.

CK1 proteinleri saflaştırmadan sonra konsantratör içerisinde son hacim ~2 mL olacak şekilde bırakılmıştır. BioDrop ile ölçüm yapıldığında protein konsantrasyonunun çok yüksek çıkmasından dolayı -80 °C'de proteinin parçalanıp hasar görmemesi adına daha fazla konsantre edilmemiş ve 2 mL son hacimde bırakılmıştır. Ardından proteinler ependorf tüpler içerisine aliquat edilerek kullanım anına kadar -80 °C'de muhafaza edilmiştir. CK1 proteinlerinin konsantrasyonlarının tahmini belirlenebilmesi için Western-Blot analizi gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.9).

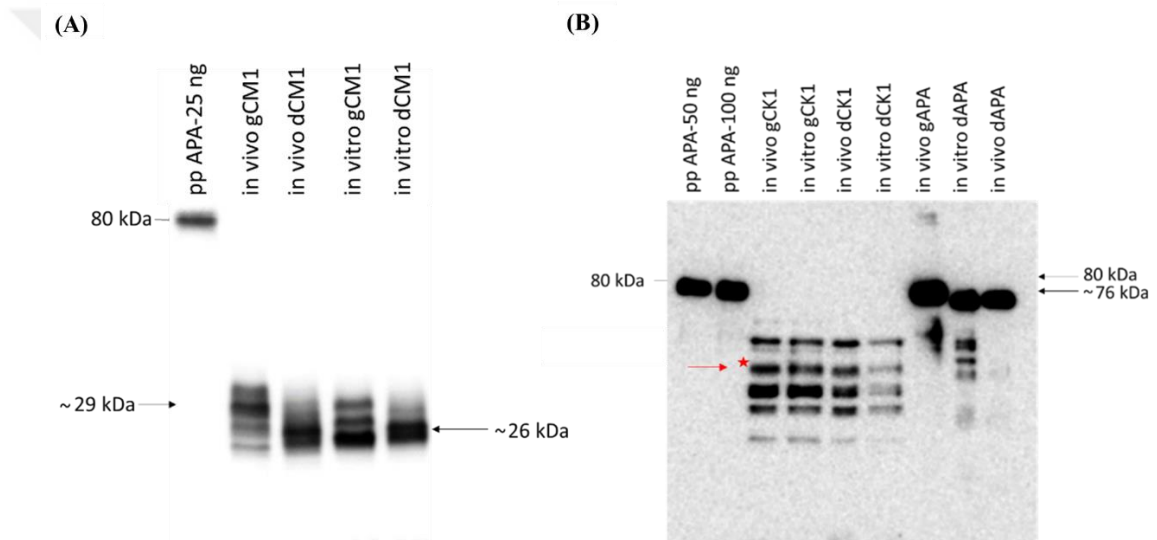


Şekil 4.9. Saflaştırması yapılmış gCK1 ve dCK1 proteinlerinin Western-Blot görüntüsü; pp (plant produce) APA-50 and 100 ng (80 kDa)

Saflaştırmadan sonra Western-Blot analizi yapılan gCK1 ve dCK1 proteinlerinin protein bantlarının aynı seviyede çıktığı ve glikolize ve deglikolize formlarının bitkide ayrı ayrı üretilmediği ve hatta üretilen bu 2 tip proteinin de deglikolize olduğu düşünülmüştür. Ardından hem CM1 hem de CK1 proteinlerinin glikolize ve deglikolize formlarının *in vitro* olarak ticari enzimle kesimi gerçekleştirilmiştir.

4.3. *In Vivo* Olarak *N. benthamiana*'da Üretilen gCM1 ve dCM1 ile gCK1 ve dCK1 Proteinlerinin *In Vitro* Olarak Ticari EndoH Enzimiyle Kesimi

Bitkide *in vivo* üretimi gerçekleştirilen glikolize ve deglikolize CM1 ve CK1 proteinlerinin glikolizasyon ve deglikolizasyon mekanizmalarının kontrolünü sağlamak için *in vitro* EndoH enzimi ile daha önce bahsedilen protokole göre kesimleri gerçekleştirilmiştir (Bkz. 3.6). Kesim işlemi sonrasında tüm örnekler görünür bant kalınlığında olacak şekilde (1/5 kat dilüsyon) jele yüklenmiş ve Western-Blot analiziyle gösterilmiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. *In vivo* üretilen glikolize ve deglikolize CM1 ve CK1 proteinlerinin *in vitro* ticari EndoH enzimiyle kesimi sonucunu gösteren Western-Blot görüntüleri. **A)** *In vivo* gCM1 ve dCM1 proteinlerinin ticari EndoH enzimiyle *in vitro* kesilmiş ve kesilmemiş formlarının karşılaştırılmasına yönelik Western-Blot görüntüsü; **B)** *In vivo* gCK1 ve dCK1 proteinlerinin ticari EndoH enzimiyle *in vitro* kesilmiş ve kesilmemiş formlarının karşılaştırılmasına yönelik Western-Blot görüntüsü; pp (plant produce) APA-25 ng (80 kDa)

Şekil 4.10'da "A" görüntüsüne baktığımızda *in vivo* olarak *N. benthamiana*'da ürettiğimiz gCM1 proteininin yaklaşık 29 kDa'da bant verdiği görülmektedir. Hemen yanında ise aynı proteinin bitkide *in vivo* üretilen EndoH enzimiyle deglikolize edilmiş formunun bitkide üretilmiş bant görüntüsü vardır. EndoH enzimiyle kesilmeyen gCM1'in protein bandı glikan bölgelerinin varlığından dolayı daha ağır olduğu için üstte yer almaktadır. dCM1 ise glikan bölgesi kesildiğinden dolayı ona göre daha aşağıda bant vermiştir. Hem glikolize hem de deglikolize olarak *in vivo* şeklinde üretilen bu iki protein laboratuvarımızda daha önceden satın alınmış olan ticari EndoH enzimiyle kestirilmiştir. *In vivo* olarak bitkide üretilen gCM1 proteini ticari EndoH ile kestirildiğinde de deglikolize forma dönmektedir (bant yoğunluğu aşağıdadır, Bkz. Şekil 4.10-A- *in vitro*

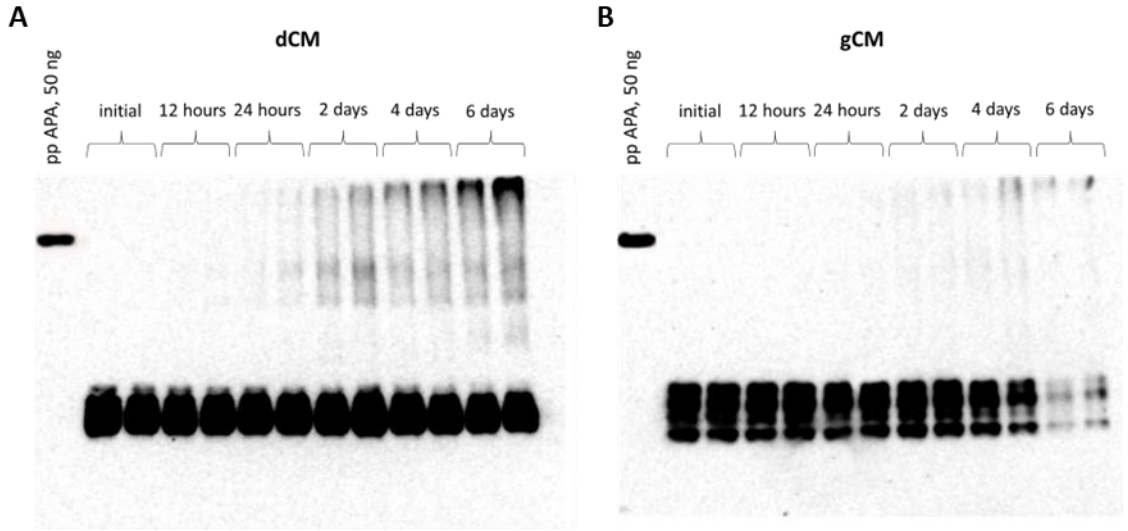
gCM1). Zaten *in vivo* deglikolize forma getirilen dCM1 proteini ise tekrar ticari EndoH ile kestirildiğinde ise bant hizasından bir değişiklik olmadığı görülmüştür (Bkz. Şekil 4.10-A- *in vitro* dCM1). Buradan da *in vivo* dCM1 proteinin bitkide ürettiğimiz EndoH enzimi ile deglikolize forma dönüştürülebildiği de kesin olarak sabitlenmiş olmaktadır.

“B” görüntüsüne baktığımızda ise, yine bitkide *in vivo* olarak üretimi gerçekleştirilen gCK1 ve EndoH ile eksprese edilerek üretilen dCK1 proteinlerinin glikolizasyon ve deglikolizasyon durumunu kontrol etmek için ticari EndoH enzimiyle protokole uygun şekilde ayrı ayrı kesimleri gerçekleştirilmiştir. Ticari EndoH enzimiyle kestirildikten sonra da bant görüntülerinde, molekül büyüklüklerinde hiçbir değişiklik olmadığı gözlenmiştir. Yanına kontrol olarak daha önce bitkide üretimi gerçekleştirilen *in vivo* gAPA yüklenmiş (80 kDa) hemen yanına bu proteinin ticari EndoH ile *in vitro* kestirilmiş formu olan dAPA yüklenmiştir. Ve ticari EndoH enziminin glikan bölgeyi kesmesinden dolayı proteinin moleküler ağırlığının azalıp daha aşağıda bant verdiği görülmüştür (~76 kDa). En sonda da *in vivo* olarak bitkide EndoH enzimiyle deglikolize forma getirilen *in vivo* dAPA’ya ait protein bandının *in vitro* dCK1 ile aynı seviyede (~76 kDa) olduğu ve ticari EndoH enziminin doğru çalıştığı da bu şekilde doğrulanmıştır.

Buradan vardığımız sonuç göre *N. benthamiana*’da *in vivo* olarak EndoH enzimiyle birlikte eksprese edilen dCK1 proteininin bitkide deglikolizasyona uğramadığı ve zaten hem glikolize hem de deglikolize formunun bitkide hep deglikolize olarak üretildiği sonucuna varılmıştır. Bu aşamada klonlama çalışmaları, proteinin bitkide tekrar üretilmesi, proteinin saflaştırılması ve Western-Blot analizleri tekrarlanmıştır. Ancak sonuçta bir değişiklik gözlenmemiştir. İleriki çalışmalarda bu durumun düzeltilmesi için CK1 proteininin geriye dönük gen sekanslama işlemleri tekrar yapıp glikolize formunun bitkide üretimi gerçekleştirilebilir. Ayrıca her seferinde tüm Western sonuçlarında birden fazla bant vermesi de yine gen dizayn ve sekanslama işlemlerinin tekrar yapılması gerektiğini göstermektedir. Tez çalışmasının bu aşamasından sonrasındaki çalışmalara CM1 proteini ile devam edilmiştir.

4.4. *In Vivo* Deglikozile Edilmiş CM1 ve Glikozile CM1 Formlarının Karşılıklı Stabilite Çalışması

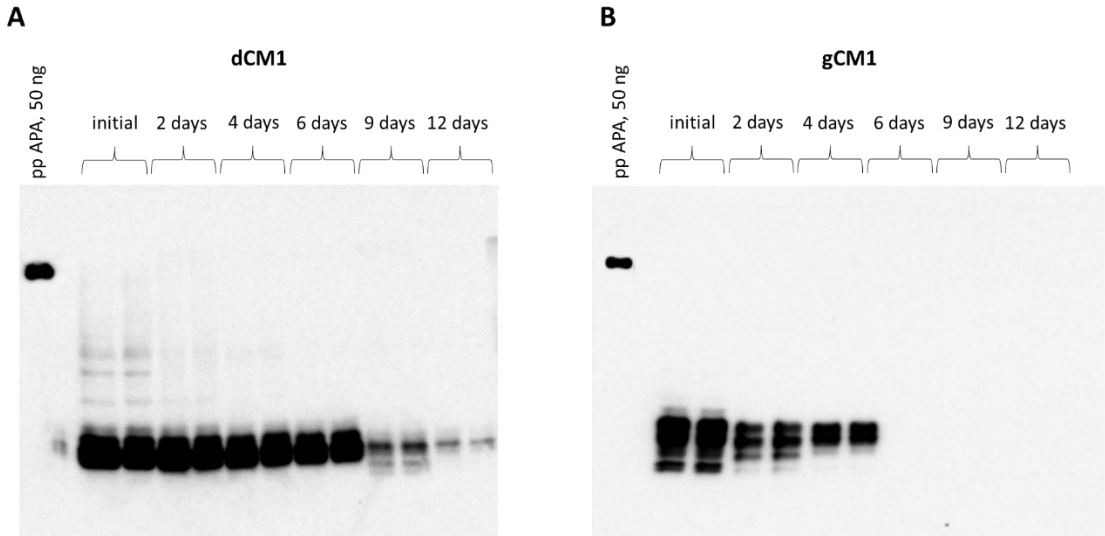
gCM1 ve dCM1 proteinlerinin 37 °C’de 6 günlük stabilite sonrası Western-Blot sonucu Şekil 4.11’da verildiği gibidir.



Şekil 4.11. Glikolize ve deglikolize CM1 proteininin 37 °C’de stabilite sonucu Western-Blot görüntüleri. **A)** dCM1 proteininin 37 °C sıcaklıkta 6 günlük stabilitesi; **B)** gCM1 proteininin 37 °C sıcaklıkta 6 günlük stabilitesi

Şekilden de anlaşılacağı gibi dCM1 proteini gCM1 proteinine göre 37 °C’de oldukça fazla stabilite göstermiştir. gCM1 4.günün sonunda stabilitesinin yaklaşık % 30’unu ve 6.günde %80’ini kaybetmiştir. Ancak dCM1 proteinine baktığımızda 6.günün sonunda bile stabilitesinin neredeyse %100’ünü korumuştur. Proteinimizin bir gıda koruyucusu olarak yüksek denilebilecek bir sıcaklıkta bile stabilitesini 6 gün boyunca kararlılıkla koruyabiliyor olması büyük bir avantajdır.

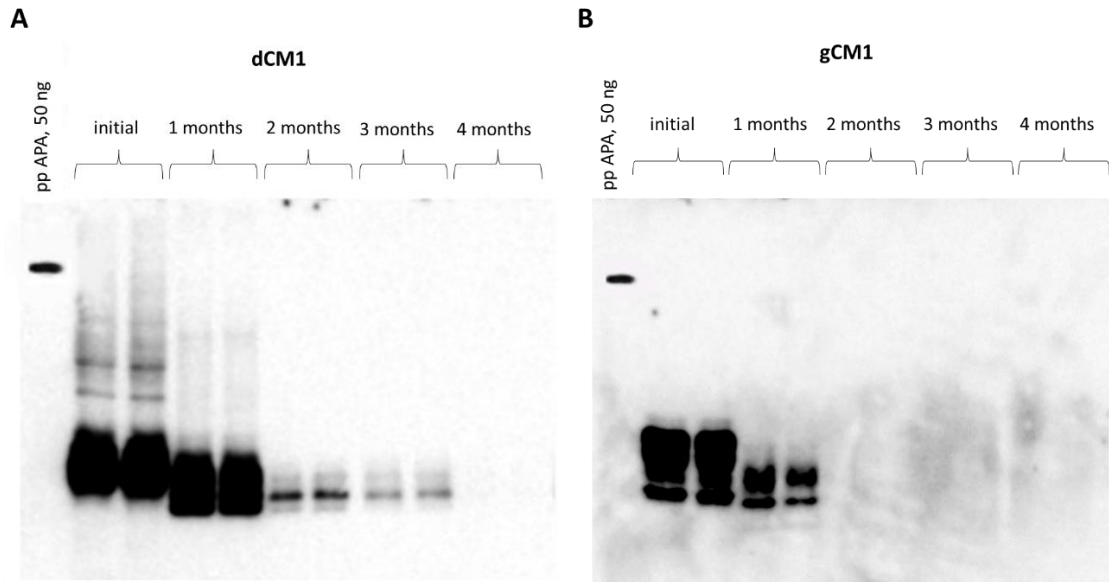
CM1 proteinlerinin oda sıcaklığındaki (25 °C) stabilitesine de bakılmıştır. Bu amaçla hem glikolize hem de deglikolize CM1 proteinlerinin 12 gün boyunca stabilitesi takip edilmiştir. Sonuçlar Şekil 4.12’de Western-Blot görüntüsünde görüldüğü gibidir.



Şekil 4.12. Glikolize ve deglikolize CM1 proteininin 25 °C’de stabilite sonucu Western-Blot görüntüleri. **A)** dCM1 proteininin 25 °C sıcaklıkta 12 günlük stabilitesi; **B)** gCM1 proteininin 25 °C sıcaklıkta 12 günlük stabilitesi

gCM1 proteini oda sıcaklığındaki stabilitesini 2.günün sonunda yaklaşık %45 kaybederken 4.günde %55'e kadar kaybettiği görülmüştür. Daha sonraki günlerde hiç protein görülmemesi stabilitesini 4.günden sonra tamamen kaybettiğini göstermektedir. dCM1 proteini ise glikolize olana kıyasla çok daha iyi bir stabilite göstermiştir. 4. günde %15, 6. günde %20, 9. günde %58 ve 12. günün sonunda 85'ini kaybetmiştir.

Son olarak CM1 proteininin +4 °C'deki stabilitesi test edilmiştir. Bu amaçla hem gCM1 hem de dCM1 proteinlerinin belli miktarları buzdolabında +4 °C'lik bölümünde 1'er aylık periyotlarla 4 ay takip edilmiştir. Örneklerin toplu şekilde Western-Blot analiziyle protein stabiliteyi gösterilmiştir (Şekil 4.13).



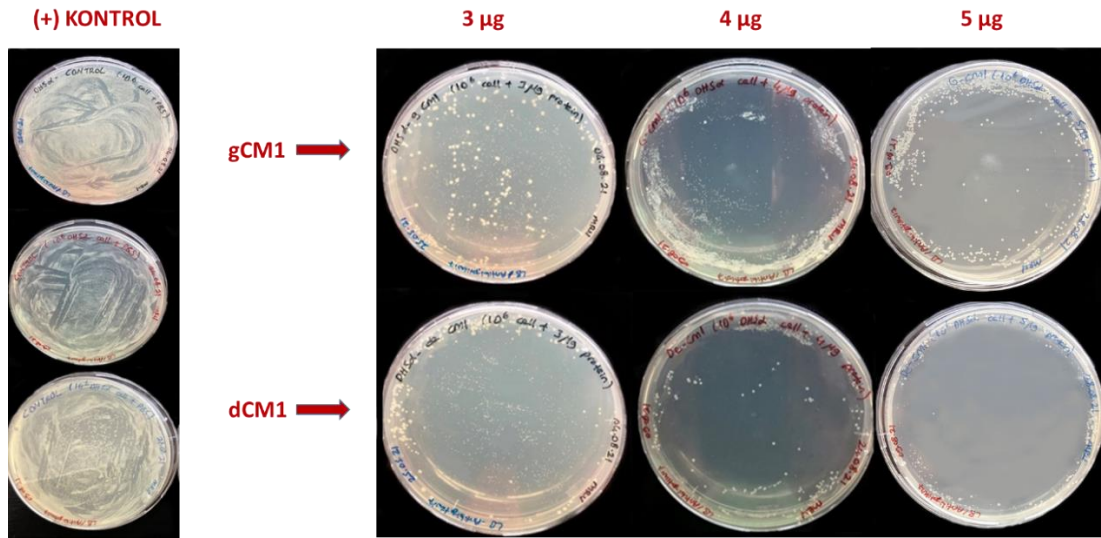
Şekil 4.13. Glikolize ve deglikolize CM1 proteininin 4 °C'de stabilite sonucu Western-Blot görüntüleri. **A)** dCM1 proteininin +4 °C sıcaklıkta 4 aylık stabilitesi; **B)** gCM1 proteininin +4 °C sıcaklıkta 4 aylık stabilitesi

37 ve 25 °C'de olduğu gibi +4 °C sıcaklıktada dCM1 proteini gCM1'a göre daha uzun süre stabilite göstermiştir. gCM1 proteini 1.ayın sonunda başlangıç örneğine göre stabilitesinin yaklaşık olarak %65'ini kaybederken dCM1 sadece %10'unu kaybetmiştir. gCM1 proteini 2.ay ve sonrasında hiç stabilite göstermeyerek proteini kaybetmiştir. Ancak, dCM1 2.ayda %15'ini, 3.ayda ise %10'luk stabilitesini hala korumuştur.

Stabilite çalışmalarından genel olarak anlaşılacağı üzere proteinimizin deglikolize formu glikolize olan muadiline kıyasla 37, 25 ve +4 °C sıcaklıkların her birinde daha uzun süre stabil kalmıştır. Buda dCM1 proteininin gıdalarda uygulanabilirliğinin gCM1'e göre daha uygun olduğunu göstermektedir.

4.5. CM1'in Besiyeri Ortamında Antibakteriyel Aktivite Testi

Saflaştırılmış gCM1 ve dCM1 proteinleri, *E. coli* DH5α suşuna karşı LB broth içerisinde antimikrobiyal aktivitesi için test edilmiştir. Deneyin yapılış aşaması yukarıda anlatılmıştır (Bkz. 3.9.2). 3, 4 ve 5 µg/µL konsantrasyonlarda proteinin antimikrobiyal aktivitesi (+) kontrol gruplarına kıyasla petrilere bulunan bakterilerin azalması kantitatif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. *E. coli* DH5α bakterileri üzerinde 3, 4 ve 5 µg glikolize ve deglikolize CM1 proteinlerinin aktivite testi sonucu petri görüntüleri (25 °C – 1 gün)

Sonuçlar, gCM1 ve dCM1 proteinlerinin her ikisinin de *E. coli* DH5α suşu üzerinde etkili olduğunu ancak deglikolize proteinin glikolize olanına göre daha aktif olduğunu göstermiştir. Ortama eklenen protein miktarıyla doğru orantılı şekilde mikrobiyal yük miktarı dolayısıyla koloni sayısı da azalmıştır. Kontrol grubuna deneyin başında eklenen 1×10^6 bakteri hücresinin deney aşamasında 1 gün oda sıcaklığında bekletilip ertesi gün LB agar petriye yayıldıktan sonra 37 °C’de gece boyunca tutulduktan sonra kolonilerin sayılamayacak kadar fazla çoğaldığı görülmüştür. Şekil 4.14’e baktığımızda 1 milyondan fazla bakterinin bulunduğu bir ortamda 3 µg CM1 proteinini bile (+) kontrol grubuna kıyasla gözle görülür bir azalma sağlamıştır. Protein miktarı 4 µg’a çıkartıldığında daha fazla azalma ve 5 µg eklendiğinde ise daha da fazla bir azalma ile diğer konsantrasyonlara kıyasla maksimum aktiflik görülmüştür. Proteinin hem glikolize hem de deglikolize formunun DH5α suşu üzerinde aktivitesi vardır diyebiliriz. Ancak tüm konsantrasyonlarda dCM1, gCM1’a göre çok daha fazla etkili olmuştur. Özellikle 5 µg dCM1 proteinini eklenen petride (+) kontrol grubuna kıyasla koloni sayılarında neredeyse %90 oranında bir azalma görülmüştür.

Genel olarak Şekil 4.14’e bakıldığında 5 µg konsantrasyonda dCM1 proteinini varlığında koloni sayılarına bakıldığında mikrobiyal yük glikolize olan muadiline göre yarı yarıya daha düşmüştür. Bu da bize LB besiyeri ortamında yapılan deneyde deglikolize CM1 proteininin aktifliğinin glikolize olanına göre 2 kattan daha fazla olduğunu göstermektedir.

4.6. CM1’in Gıda Numunesi Üzerindeki Bakteriyel Bulaşmaya Karşın Aktivite Testi ve Kantitatif Bakteri Sayımı

Et deneylerinde kullanılan *E. coli* DH5α ve ATCC 25322, *Salmonella* ATCC 14028 ve *S. aureus* ATCC 25923 bakteri kültürleri yukarıda tarif edildiği gibi LB besiyeri içerisinde geliştirildikten sonra optimum seyreltme katsayısına seyreltilmiş son seyreltme faktörleri hesaplanmıştır (Bkz. 3.9.3). Ardından deneylerde kullanılan bakteri süspansiyonunun hücre sayısı konsantrasyonu yukarıda verilen formüle göre hesaplanmıştır (Bkz. Formül 3.2). *E. coli* DH5α ve ATCC 25322 suşları için $1,6 \times 10^7$,

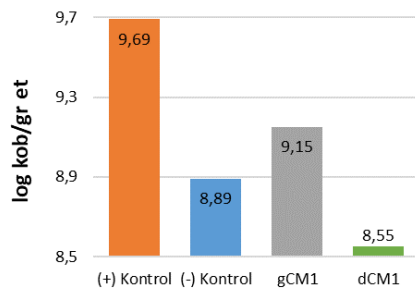
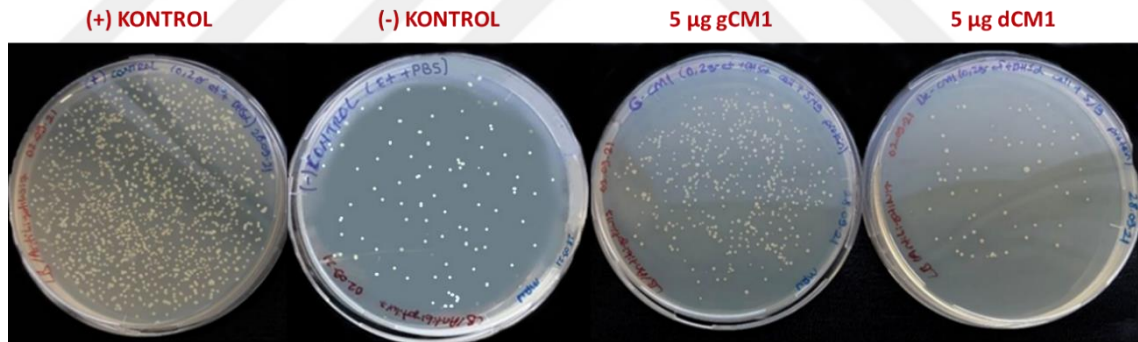
Salmonella ve *S. aureus* için ise sırasıyla 2×10^7 ve $1,9 \times 10^7$ kob/mL olarak bulunmuştur. Seyreltilen bakteri kontaminasyon solüsyonları et numuneleri üzerine inoküle edilmiştir. gCM1 ve dCM1 proteinlerinin farklı konsantrasyonları farklı bakteri suşları ile kontamine edilen et numuneleri üzerine ilave edilmiştir. Belirlenen süre boyunca (1 ve/veya 3 gün) $+4^\circ\text{C}$ 'de bekletilen örnekler LB agar üzerine yayılmıştır. Ertesi gün petrilerdeki koloniler sayılmıştır ve 1 gram et üzerinde koloni oluşturan birimlerin (kob) kob/g et cinsinden hesaplamaları yapılmıştır (Bkz. Formül 3.3). Bu kapsamda yapılan aktivite testlerine ait petri görüntüleri, petrilerde sayılan koloni sayıları ve kob/g et değerlerine ilişkin grafikler aşağıda sırasıyla gösterilmiştir.

Yapılan tekrarlı çalışmalarda aynı miktarda bakteri kullanılmasına rağmen kontrol gruplarında farklı sayılarda kolonilerin oluşması etin her noktasında ve her alımında eşit bakteri yükü taşımadığından kaynaklıdır. Bu sebeple deneyler tekrarlı gerçekleştirilmiştir.

4.6.1. *E. coli* DH5 α suşu üzerinde aktiflik testi

Daha önce *E. coli* DH5 α ile besiyeri ortamında yapmış olduğumuz aktivite testinde en iyi sonucu 5 μg protein ortamında elde ettiğimiz için aynı konsantrasyonda protein ile devam edildi. 0,5 g et numunelerine bulaştırılan $1,6 \times 10^7$ kob/mL konsantrasyonda *E. coli* DH5 α bakterileri üzerinde 5 μg gCM1 ve dCM1 proteinlerinin aktiflik testi için $+4^\circ\text{C}$ 'de 1 gün bekletilerek tekrarlı (n=3) denemeler gerçekleştirildi.

I.

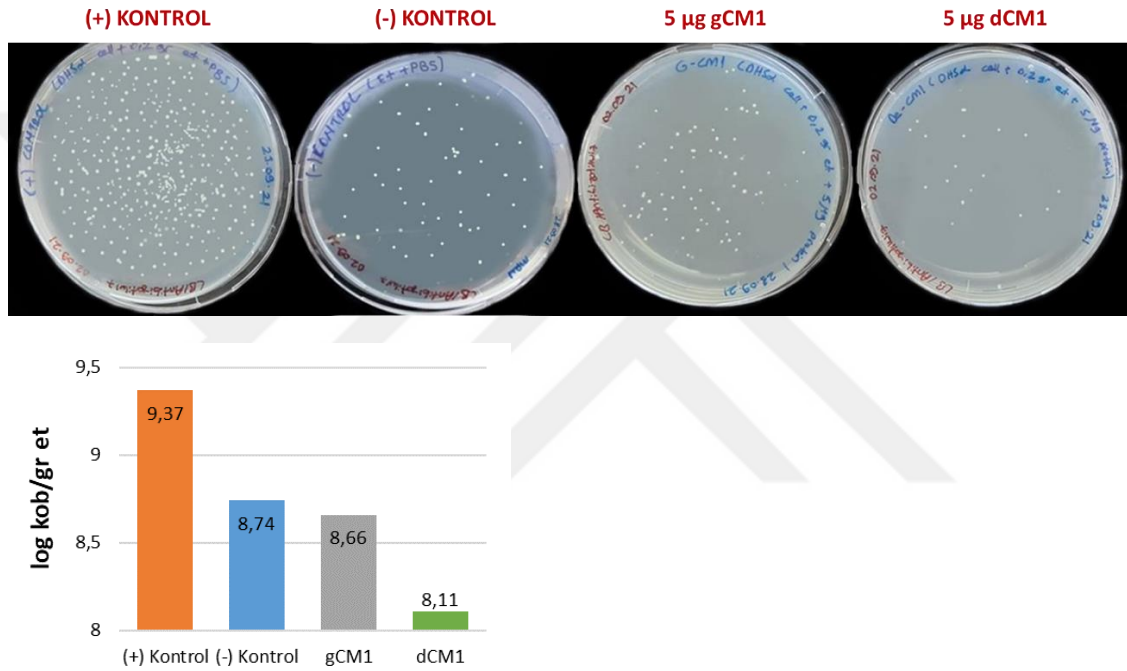


Şekil 4.15. *E. coli* DH5 α üzerinde gCM1 ve dCM1 proteinlerinin 1. tekrar aktivite testi sonucu petri görüntüleri ve kob/g et logaritmik ifadesini veren grafik

Yapılmış olan ilk tekrar deney grubunun pozitif kontrol grubunda 761 koloni sayılırken, negatif kontrolde 122 koloni sayılmıştır. gCM1 proteini eklenen petride 223

ve dCM1 eklenen petride ise 55 koloni sayılmıştır. Deglikolize protein eklenen petrideki koloni sayısı ile glikolize protein eklenen arasında yaklaşık 4 katlık bir oran vardır. Oransal olarak incelendiğinde, koloni sayısı bakımından gCM1 proteini 0,5 g et üzerinde (+) kontrole kıyasla koloni sayılarında %70,7'lik bir azalma sağlarken dCM1 proteini %92,8'lik bir azalma sağlayarak glikolize olan muadilinden daha aktif olduğunu göstermiştir. Logaritmik olarak bakıldığında ise, Formül 3.3'e göre hesaplamaları yapıldığında sırasıyla (+) ve (-) kontrolde 9,69 ve 8,89 kob/g et koloni sayılırken ortama 5 µg gCM1 proteini eklendiğinde bu sayı 9,15'e düşerken, 5 µg dCM1 ile 8,55 kob/g et'e düşmüştür. Buradan da dCM1'in (+) kontrole kıyasla koloni sayılarını 1,14 logaritma düşürdüğü anlaşılmıştır.

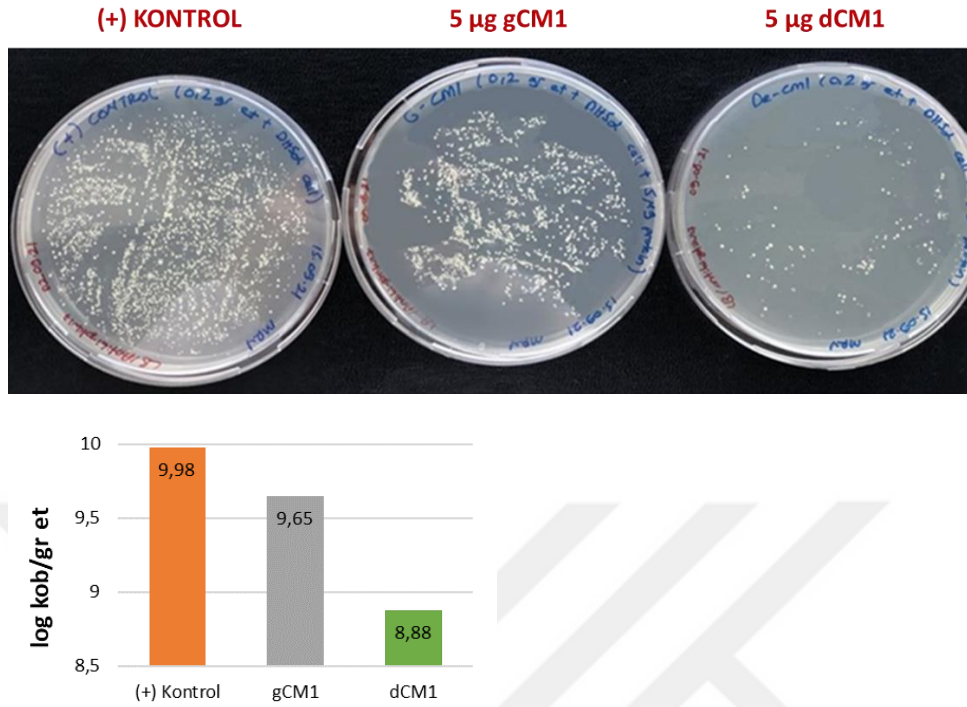
II.



Şekil 4.16. *E. coli* DH5α üzerinde gCM1 ve dCM1 proteinlerinin 2. tekrar aktivite testi sonucu petri görüntüleri ve kob/g et logaritmik ifadesini veren grafik

2.tekrar deney grubuna baktığımızda ise (+) kontrol grubunda 365, (-) kontrol grubunda ise 85 koloni sayılmıştır. 5 µg gCM1 proteini eklenen petride 72 ve dCM1 eklenen petride ise 20 koloni sayılmıştır. Deglikolize protein eklenen petrideki koloni sayısı ile glikolize protein eklenen arasında 3,6 katlık bir oran vardır. Oransal olarak sonuçlara bakıldığında, koloni sayısı bakımından gCM1 proteini 0,5 gram et üzerinde (+) kontrole kıyasla koloni sayılarında %80,3'lük bir azalma sağlarken dCM1 proteini %94,5'lik bir azalma sağlayarak glikolize olan muadilinden daha aktif olduğunu göstermiştir. Logaritmik olarak kob/g et üzerinden hesaplamalar yapıldığında ise Şekil 4.16'te grafikten anlaşılabacağı gibi (+) kontrole kıyasla dCM1 proteini koloni sayılarında 1,26 logaritmalık azalma sağlamıştır.

III.



Şekil 4.17. *E. coli* DH5α üzerinde gCM1 ve dCM1 proteinlerinin 3. tekrar aktivite testi sonucu petri görüntüleri ve kob/g et logaritmik ifadesini veren grafik

3.tekrar denemesi (+) kontrol grubunda aşırı gelişme olmuştur petri dilimlere bölünerek sayım gerçekleştirilmiştir. Bu şekilde sayıldığında ~1500 koloni olduğu varsayılmıştır. Ancak yine de protein eklenen gruplarda (+) kontrole kıyasla koloni sayılarda ciddi bir azalma olduğu görülmektedir. gCM1 proteini eklene petride (+) kontrole kıyasla %66'lık azalma ile ~500 koloni sayılırken, dCM1 eklenen petride %92'lik azalma ile 125 koloni sayılmıştır. Bu durumda koloni sayıları bakımından glikolize ve deglikolize petriler arasında neredeyse 4 katlık bir oran olduğu saptanmıştır. 5 µg gCM1 logaritmik olarak (+) kontrole kıyasla 1 gram et üzerinde 0,33 log kob/g azalma gösterirken, 5 µg dCM1 proteini 1,1 log kob/g azalma göstermiştir. *E. coli* DH5α üzerinde yapılan 3 tekrarın genel sonuçları Çizelge 4.1'de verilmiştir.

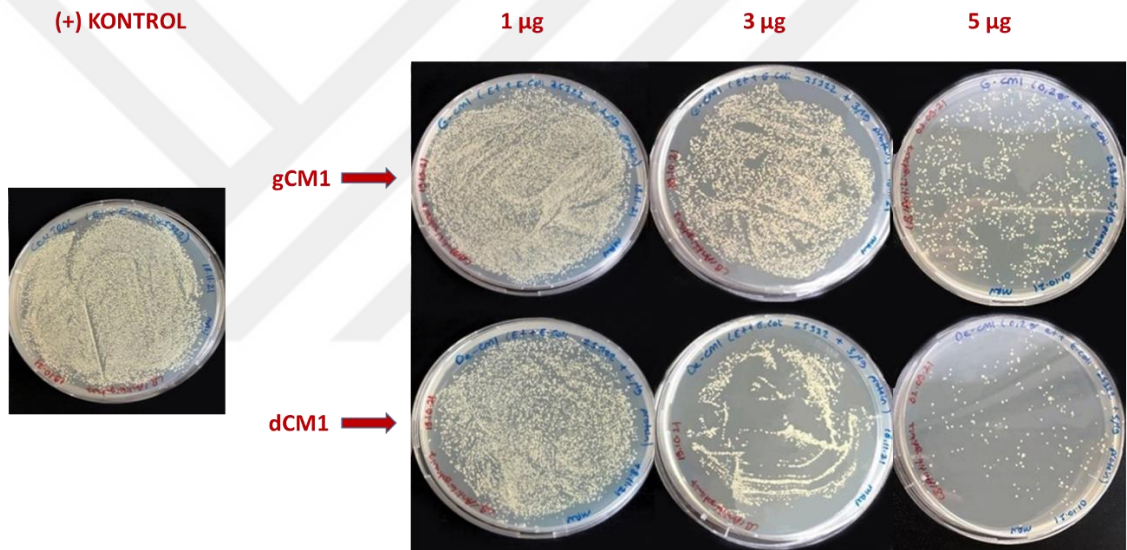
Çizelge 4.1. CM1 proteininin *E. coli* DH5α üzerindeki tekrarlı aktiflik testi sonuçları

	Koloni Sayıları				Koloni Azaltma Oranı (+) kontrole kıyasla)	
	(+) Kontrol	gCM1	dCM1	gCM1/dCM1	dCM1 (%)	dCM1 (log kob/g)
1.Tekrar	761	223	55	4	92,8	1,14
2.Tekrar	365	85	20	3,6	94,5	1,26
3.Tekrar	~1500	~500	125	4	92	1,1

Tekrarlı yapılan et numuneleri üzerindeki *E. coli* DH5 α bakterisinde proteinlerimizin hem glikolize hem de deglikolize formlarının aktifliklerine ayrı ayrı bakılmıştır. 3 tekrarın sonuçlarından da anlaşıldığı üzere dCM1 ile muadili gCM1 arasında koloni sayıları bakımından ortalama 3,8 katlık bir oran vardır ve dCM1 daha fazla aktivite göstermiştir. dCM1 proteini (+) kontrole kıyasla koloni sayılarında ortalama %93'lük azalma sağlamıştır. Ayrıca Kolisin M'nin *E. coli* DH5 α üzerinde aktivite göstermesi literatürle tutarlı sonuçlar göstermiştir (El Ghachi vd. 2006).

4.6.2. *E. coli* ATCC 25322 suşu üzerinde aktiflik testi

E. coli'nin patojen bir suşu olan ATCC 25322 suşu üzerinde gCM1 ve dCM1 proteinlerinin aktifliklerine bakılmıştır. Bu bağlamda farklı bir bakteri grubu olduğu için çalışmamıza farklı konsantrasyonlarda protein içerikleri ile başlanmıştır. 0,5 g ete inoküle edilen $1,6 \times 10^7$ kob/mL konsantrasyonda bakteri süspansiyonu üzerine 1, 3 ve 5 μ g protein eklenen deney grupları 1 gün +4 °C'de bekletilme sonrasında petrilere yayılarak ertesi gün koloni sayımları gözlemlenmiştir (Şekil 4.18).

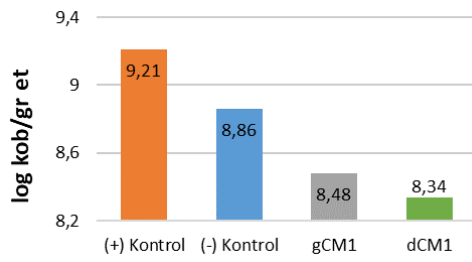
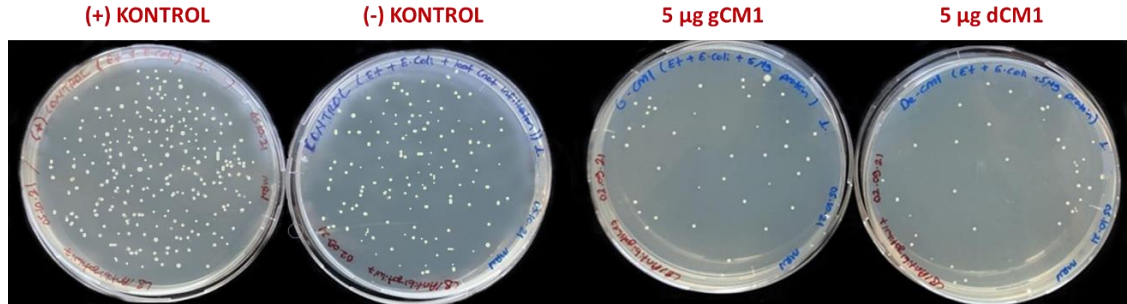


Şekil 4.18. *E. coli* ATCC 25322 üzerinde 1, 3 ve 5 μ g gCM1 ve dCM1 proteinlerinin aktivite testi sonucu petri görüntüleri

Şekil 4.18'de ki petri görüntüleri et numuneleri üzerine farklı konsantrasyonda eklenen CM1 proteinlerinin mikrobiyal üreme üzerindeki aktifliğini göstermektedir. Şekilden de anlaşılabileceği üzere ortama eklenen protein konsantrasyonu arttıkça ortamda üreyen koloni sayısı azalmaktadır. Aktivite testi sonucunda pozitif kontrol olan petride sayılamayacak kadar koloni olduğu gözlenmiştir. Ortama 1 μ g protein eklendiğinde koloni sayısında fark edilir bir değişim olmadığı görülmüştür. Protein miktarı 3 μ g'a çıkartıldığında ise her 2 petride de koloni sayısında daha fazla azalma görülmüştür fakat son olarak 5 μ g protein eklendiğinde petrilere maksimum mikrobiyal azalma gözlenmiştir. 5 μ g gCM1 proteini eklenen petride kontrol grubuna göre yaklaşık %40-50 oranında, dCM1 proteini varlığında ise kontrole kıyasla yaklaşık %90'ın üzerinde azalma gözlenmiştir. Elde edilen sonucun tutarlılığını test etmek amacıyla en iyi aktiflik sonucunu aldığımız 5 μ g gCM1 ve dCM1 proteinleri ile ete inoküle edilen $1,6 \times 10^7$

kob/mL *E. coli* ATCC 25322 bakterisi üzerinde tekrarlı denemeler (n=3) gerçekleştirilmiştir (1 gün +4° C).

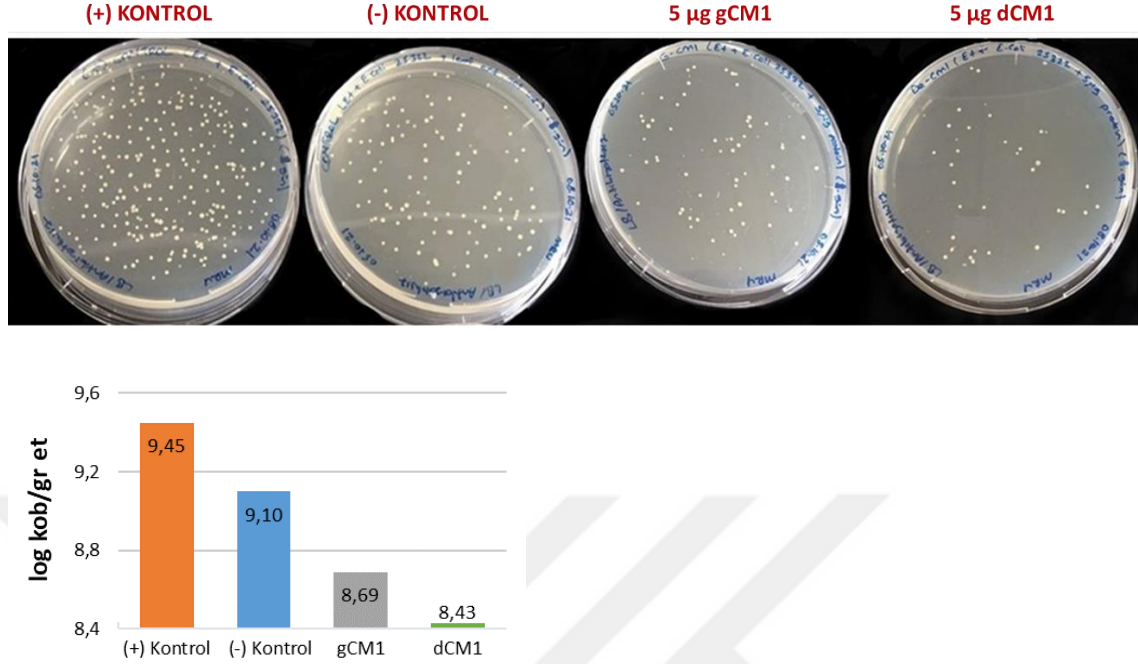
I.



Şekil 4.19. *E. coli* ATCC 25322 üzerinde gCM1 ve dCM1 proteinlerinin 1. tekrar aktivite testi sonucu petri görüntüleri ve kob/g et logaritmik ifadesini veren grafik

Et üzerine *E. coli* ATCC 25322 bulaştırılarak başlatılan deneyde 1.günün sonunda (+) kontrolde 255 ve (-) kontrolde 112 koloni sayılmıştır. 5 µg gCM1 proteinin *E. coli* üzerindeki aktifliğine bakıldığında (+) kontrole kıyasla koloni sayısı %81,5 oranında azalmış ve 47 koloniye düşmüştür. Bu sayı 5 µg dCM1 proteini ile %86'lık bir azalmayla sonuçlanmış ve 36 koloniye düşmüştür. Deglikolize protein eklenen petrideki koloni sayısı ile glikolize protein eklenen arasında yaklaşık 1,3 katlık bir oran vardır. Logaritmik olarak ise değerler grafikte görüldüğü gibidir. dCM1 (+) kontrole kıyasla kob/g et cinsinden 0,87 log'luk azalma sağlamıştır.

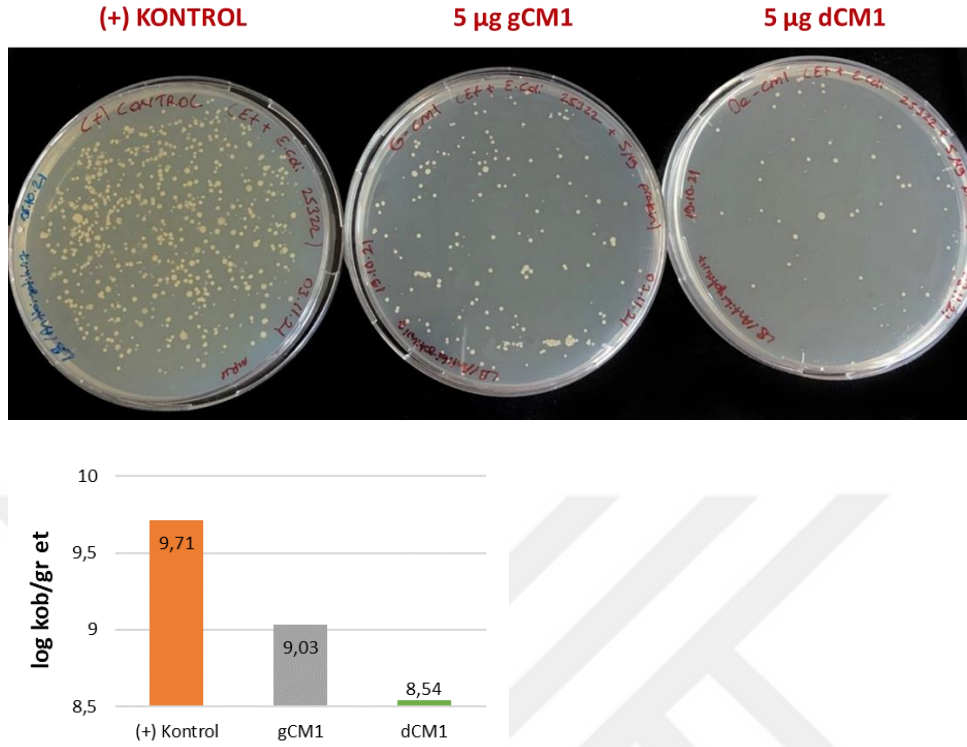
II.



Şekil 4.20. *E. coli* ATCC 25322 üzerinde gCM1 ve dCM1 proteinlerinin 2. tekrar aktivite testi sonucu petri görüntüleri ve kob/g et logaritmik ifadesini veren grafik

2.tekrar aktiflik testinde (+) kontrolde koloni sayısı 442 ve (-) kontrolde 198 olarak sayılmıştır. Bununla birlikte gCM1 proteini eklenmiş deney grubunda bu sayı (+) kontrole göre %75 oranında azalarak 76 koloniye düşerken, dCM1 proteininde ise %90,5'lik bir azalma ile 42 koloniye düşmüştür. Koloni sayıları bakımından kıyaslandığında glikolize ve deglikolize petriler arasında 1,8 katlık bir oran vardır. dCM1 proteini daha fazla aktiflik göstermiştir. Logaritmik olarak kob/g et değerlerine bakıldığında ise dCM1 proteinin (+) kontrole kıyasla 1 log'luk azalma göstermiştir.

III.



Şekil 4.21. *E. coli* ATCC 25322 üzerinde gCM1 ve dCM1 proteinlerinin 3. tekrar aktivite testi sonucu petri görüntüleri ve kob/g et logaritmik ifadesini veren grafik

3. tekrardaki petrilere ise pozitif kontrol grubunda ~800 koloni sayılmıştır. gCM1 proteini (+) kontrole kıyasla koloni sayılarında %79'luk bir azalma sağlayarak koloni sayısını 168'e düşürürken, dCM1 proteini ise %91'lik bir azalma ile glikolize olan muadilinden daha fazla aktiflik göstermiştir ve petrideki kolonileri 75'e düşürmüştür. Deglikolize protein eklenen petrideki koloni sayısı ile glikolize protein eklenen arasında koloni sayısı bakımından yaklaşık 2,2 katlık bir oran vardır. Grafikteki 1 gram et üzerinde koloni oluşturacak birimlerin değerlerine baktığımızda ise dCM1 grubunda (+) kontrole göre 1,17 log'luk bir azalma olduğunu görmekteyiz. *E. coli* ATCC 25322 üzerinde yapılan aktiflik testlerinin bazı sonuçları Çizelge 4.2'de özetlenmiştir.

Çizelge 4.2. CM1 proteininin *E. coli* ATCC 25322 üzerindeki tekrarlı aktiflik testi sonuçları

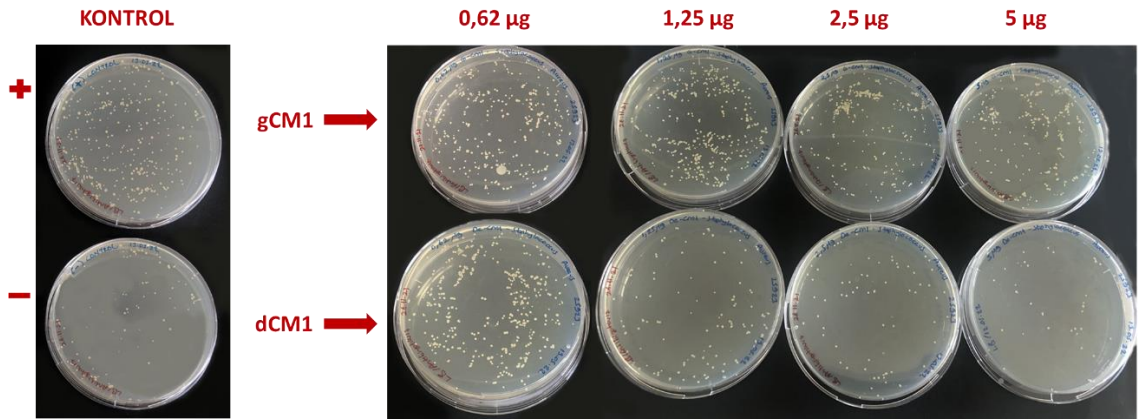
	Koloni Sayıları				Koloni Azaltma Oranı (+) kontrole kıyasla)	
	(+) Kontrol	gCM1	dCM1	gCM1/dCM1	dCM1 (%)	dCM1 (log kob/gr)
1.Tekrar	255	47	36	1,3	86	0,87
2.Tekrar	442	76	42	1,8	90,5	1
3.Tekrar	~800	168	75	2,2	91	1,17

Genel olarak bitkide üretilen gCM1 ve dCM1 proteinlerimizin *E. coli* ATCC 25322 üzerindeki aktiflik deneyinde kendi aralarında kıyaslama yaparsak dCM1, gCM1'e göre daha iyi sonuçlar vermiştir ve daha aktiftir diyebiliriz. 3 tekrarın ortalamasına baktığımızda dCM1 proteini (+) kontrol üzerinde %89,2 oranında aktiftir.

Bitkide üretimini gerçekleştirdiğimiz glikozile ve deglikozile CM1 proteinlerinin farklı patojen suşlar üzerindeki aktifliğine bakılarak aktivite testleri zenginleştirilmiştir. Bu amaçla patojen suşlar *Salmonella* ATCC 17028 ve *S. aureus* ATCC 25923 suşları aktivite testlerine dahil edilmiştir.

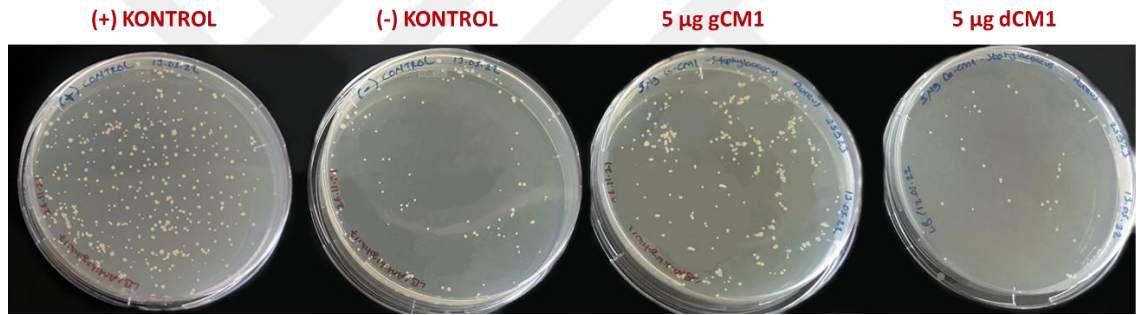
4.6.3. *S. aureus* ATCC 25923 suşu üzerinde aktiflik testi

Öncelikle farklı konsantrasyonlarda glikolize ve deglikolize CM1 proteinlerinin aktifliklerine bakılmıştır. Bu amaçla 0,5 g ete inoküle edilen 2×10^7 kob/ml konsantrasyonda *S. aureus* ATCC 25923 üzerine 0,62-1,25- 2,5 ve 5 µg konsantrasyonlarda protein eklenerek deneyler gerçekleştirilmiştir. +4 °C'de 1 gün ve 3 gün bekletilme sonrasında petrilerde gelişen koloni sayıları kontrol gruplarıyla kıyaslanarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.22).



Şekil 4.22. *S. aureus* ATCC 25923 üzerinde farklı konsantrasyonlarda gCM1 ve dCM1 proteinlerinin aktivite testi sonucu petri görüntüleri (1 gün)

0,62-5 µg protein konsantrasyonu aralığında yapılmış olan aktivite testi sonuçlarında petrilerdeki bakteri yüküne bakılmıştır. En fazla azalma 5 µg protein varlığında tespit edilmiştir ve detaylı incelemesi Şekil 4.23'te verilmiştir.

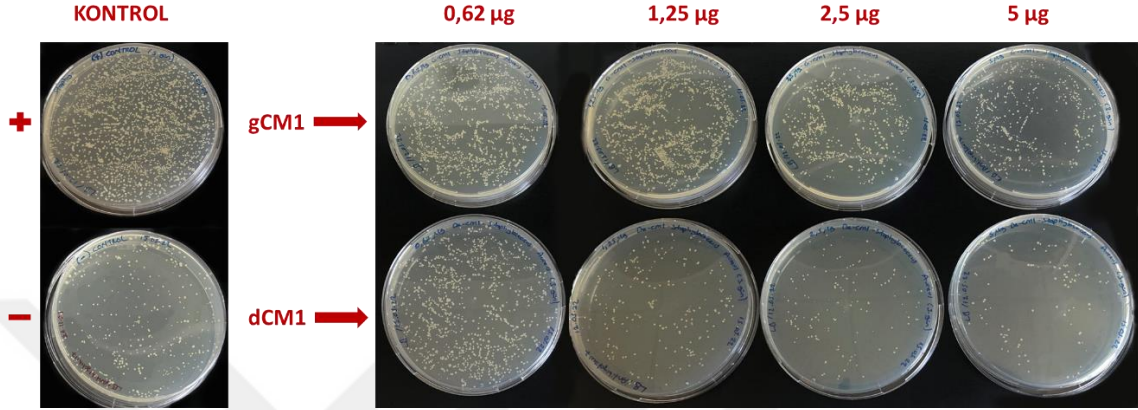


Şekil 4.23. *S. aureus* ATCC 25923 üzerinde gCM1 ve dCM1 proteinlerinin aktivite testi sonucu petri görüntüleri ve kob/g et logaritmik ifadesini veren grafik (1 gün)

Petrilerde gelişmiş olan koloniler sayıldığında (+) kontrol grubunda 514, (-) kontrol grubunda ise 105 koloni olduğu kaydedilmiştir. 5 µg gCM1 proteini eklenen petride (+) kontrole kıyasla kolonilerde %50,3'lük azalma ile 255'e düşerken, dCM1 proteini %93,2'lik azalma ile 35 koloniye düşmüştür. Bu durumda bize koloni sayısı bakımından dCM1 proteini ile gCM1 arasında 7,3 katlık bir oran olduğunu ve dCM'in *S. aureus* ATCC 25923 üzerinde daha aktif olduğunu göstermektedir. Grafikte log kob/g et

cinsinden kolonilerin karşılaştırılmasına bakıldığında dCM1 (+) kontrole kıyasla 1 gram et üzerinde koloni oluşturan birimlerin sayısını 1,16 log azaltmıştır.

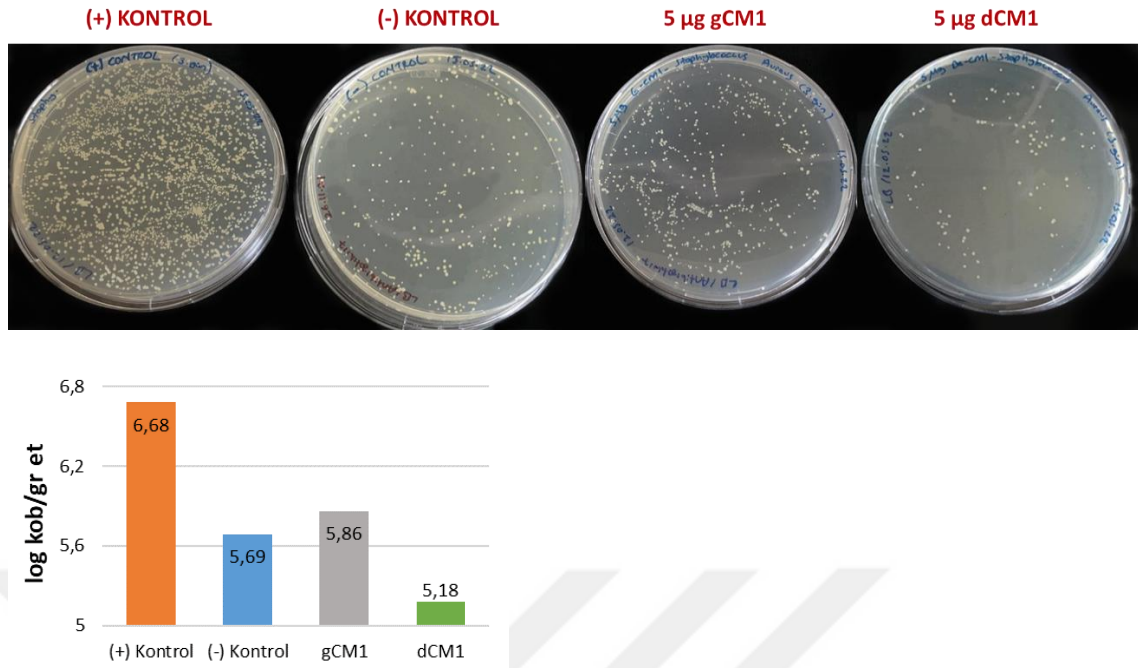
S. aureus (ATCC 25923) üzerinde farklı protein konsantrasyonlarında yapılan aktivite deneyi aynı koşullarda (4 °C) 3 gün bekletme sonrasında petrilere yayılarak tekrarlanmıştır (Şekil 4.24).



Şekil 4.24. *S. aureus* ATCC 25923 üzerinde farklı konsantrasyonlarda gCM1 ve dCM1 proteinlerinin aktivite testi sonucu petri görüntüleri (3 gün)

3 gün bekletme sonrasında kolonilerde en çok azalma yine 5 µg protein eklenen petrilere görülmüştür. 1 günlük bekleme sonrasındaki aktivite testine kıyasla, petrilere koloni sayılarında genel olarak artma olmuştur ancak proteinimizde aktifliğini (+) kontrole kıyasla yüksek oranda sürdürmüştür. Şekil 4.13'te stabilite testi sonucunda gördüğümüz gibi 4 °C'de birinci ayın sonunda dCM1 stabilitesinin neredeyse tamamını korumuştur, gCM1 proteini ise %30'unu korumuştur. Buradaki sonuçlara göre 3 günlük sürede de proteinlerin stabilitelerini koruduklarını düşünmekteyiz.

0,62-5 µg protein konsantrasyonu aralığında yapılmış olan aktivite testi sonuçlarında petrilere bakteri yüküne bakılmıştır. En fazla azalma 5 µg protein varlığında tespit edilmiştir ve detaylı incelemesi Şekil 4.25'te verilmiştir.



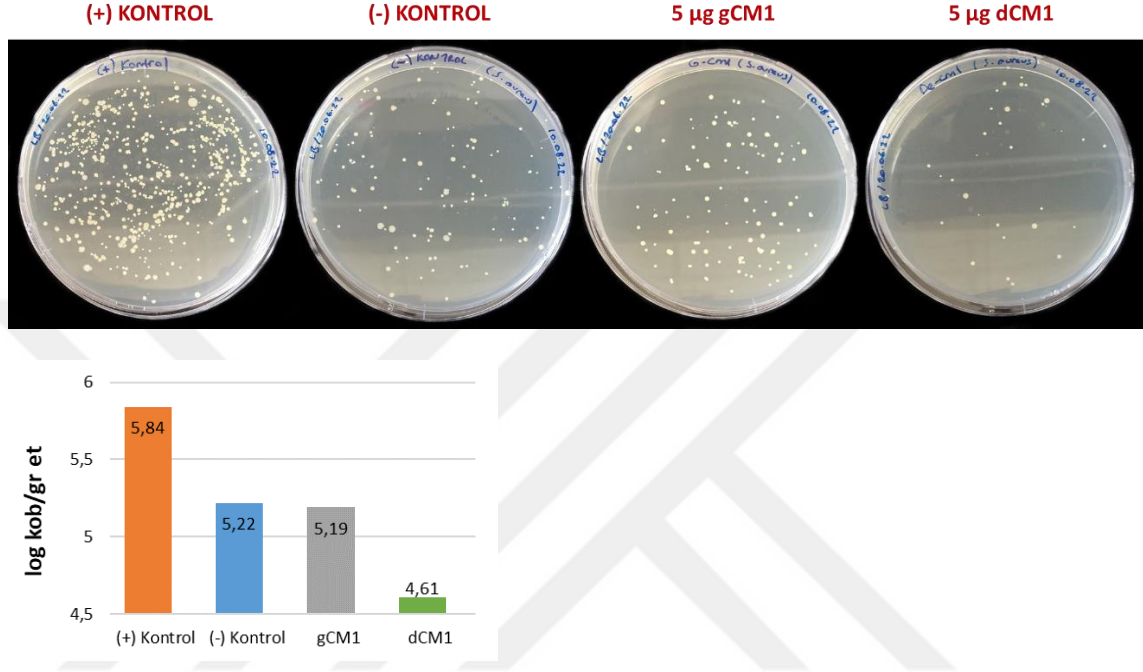
Şekil 4.25. *S. aureus* ATCC 25923 üzerinde gCM1 ve dCM1 proteinlerinin aktivite testi sonucu petri görüntüleri ve kob/g et logaritmik ifadesini veren grafik (3 gün)

5 µg protein eklenen grubun 3 gün +4 °C’de bekletildikten sonra petrilere yayılması sonucu petrilere (+) kontrolde sayılmayacak kadar çok koloni gelişmiştir. Petriyi eşit dilimlere bölüp sayım yaptığımızda ~3500 koloni olduğu varsayılırken, (-) kontrol grubunda 360 koloni sayılmıştır. gCM1 eklenen deney grubu (+) kontrole kıyasla %85’lik azalma ile 530 koloniye sahipken, dCM1 eklenen grupta (+) kontrole kıyasla yaklaşık %97 azalma olmuştur ve koloni sayısı 112’ye gerilemiştir. Bu durumda bize koloni sayısı bakımından dCM1 proteini ile gCM1 arasında 4,7 katlık bir oran olduğunu göstermektedir. Logaritmik olarak kob/g et değerlerine baktığımızda ise dCM1 proteini (+) kontrole kıyasla kob sayısını 1,5 log azaltmıştır. 1 gün bekletilen deney gruplarına kıyasla 3 gün bekletilen grupta (+) kontrolde bakteri yükü çok artmasına rağmen özellikle deglikolize protein eklenmiş olan petride yine de bakteri sayısının azalmış olması aktiflik seviyesinin oldukça yüksek olduğunu göstermektedir.

1 ve 3 günlük bekleme süresi sonundaki aktiflikleri kıyasladığımızda, deney grupları +4 °C’de bekletilmesine rağmen hem (+) hem de (-) kontrol gruplarında bekleme süresince bakterilerde çoğalmalar devam etmiştir. Fakat protein eklenen gruplara bakıldığında, (+) kontroldeki aşırı artışa rağmen CM1 proteini hala aktifliğini sürdürmüş hatta ilk güne kıyasla bakteri üzerinde daha yüksek bir aktivite göstermiştir. Rakamsal sonuçlardan da anlaşılacağı üzere dCM1 proteini glikolize olan muadilinden daha fazla aktiflik göstermiştir. dCM1’in (+) kontrole kıyasla koloni sayısında 1.günde %93.2 oranında olan azalma, 3. günün sonunda ise %97 gibi yüksek bir oranda azalma sağladığını görmekteyiz. Ayrıca 1.günde dCM1 (+) kontrole kıyasla 1,16 log kob/g azalma gösterirken 3.günde 1,5 log kob/g azalma göstermiştir.

Elde edilen sonucun tutarlılığını test etmek amacıyla en iyi aktiflik sonucunu aldığımız 5 µg gCM1 ve dCM1 proteinleri ile ete inoküle edilen 2×10^7 kob/ml konsantrasyonda *S. aureus* ATCC 25923 bakterisi üzerinde 1 günlük (n=4) ve 3 günlük (n=2) bekletilme ile tekrarlı denemeler gerçekleştirilmiştir.

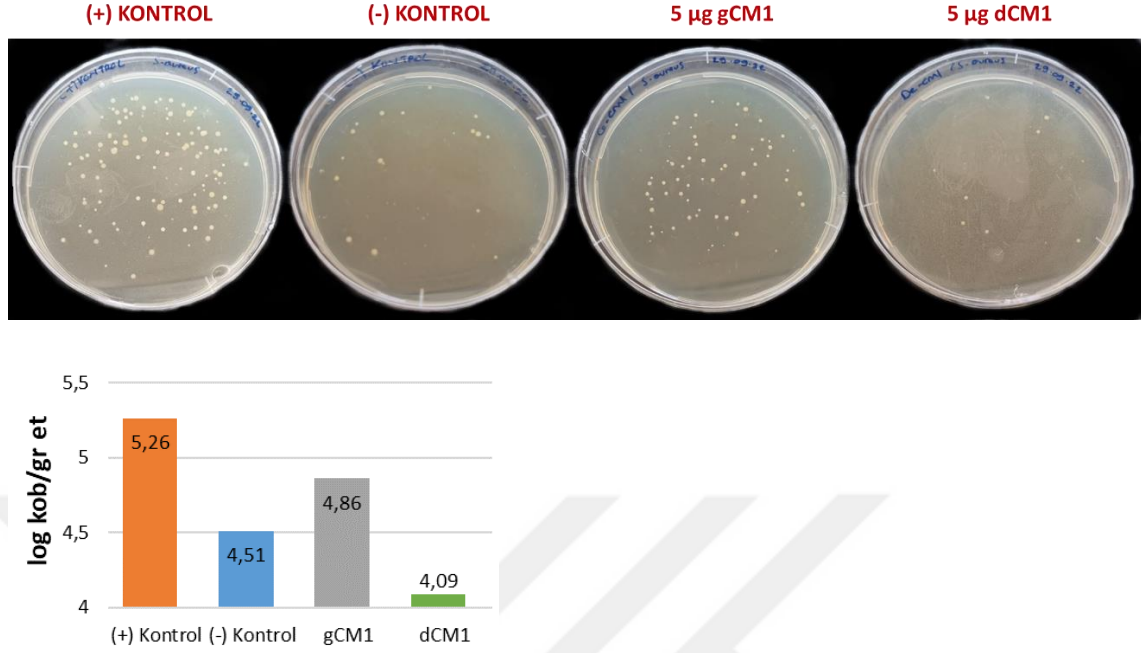
I.



Şekil 4.26. *S. aureus* ATCC 25923 üzerinde gCM1 ve dCM1 proteinlerinin 1. tekrar aktivite testi sonucu petri görüntüleri ve kob/g et logaritmik ifadesini veren grafik (1 gün)

S. aureus ile yapılan 1. tekrar denemesinde (+) kontrol grubu olan petride 512, (-) kontrol grubunda 123 koloni sayılmıştır. Ortama 5 µg gCM1 proteini ilave edilince bakteri kolonilerinin sayısı (+) kontrole kıyasla %77,7'lik bir azalma ile 114'e düşerken bu sayı dCM1 proteini ilave edilen deney grubunda %94,1 azalma ile 30 koloniye düşmüştür. Bu durumda bize koloni sayısı bakımından dCM1 proteini ile gCM1 arasında 3,8 katlık bir oran olduğunu ve deglikolize CM1'in daha yüksek aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir. Logaritmik olarak grafiğe baktığımızda gCM1 proteini olan grupta yapılan hesaplama göre et üzerindeki kolonilerde (+) kontrole kıyasla 0,65 log kob/g azalma varken, dCM1 proteini varlığında 1,23 log kob/g azalma olmuştur.

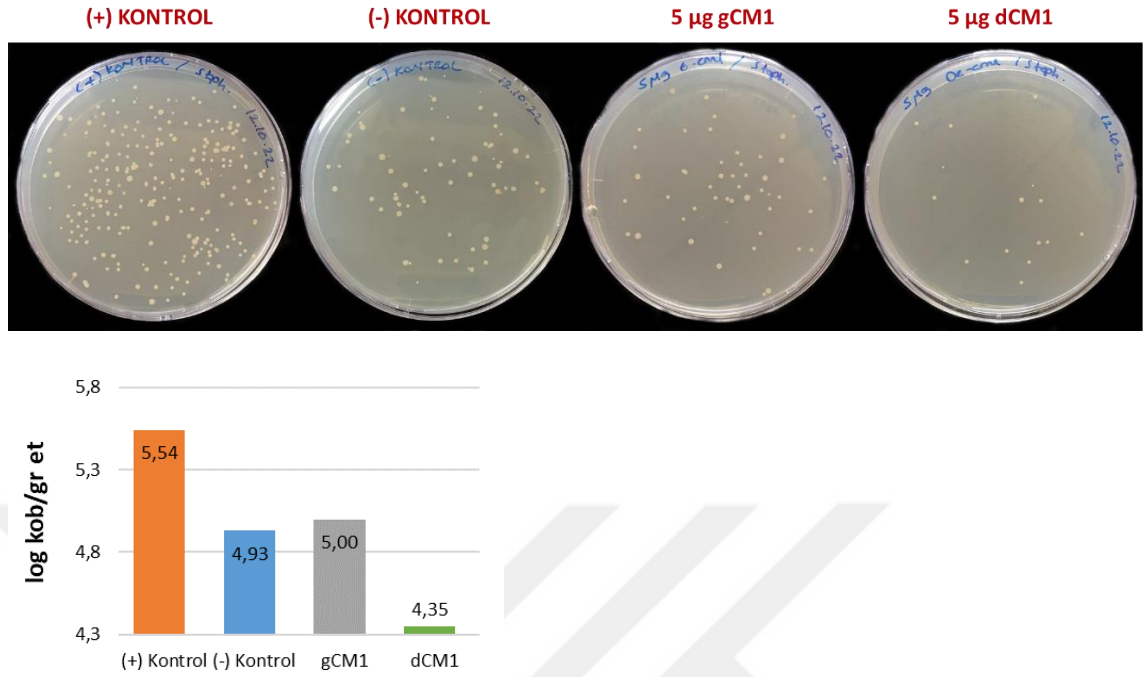
II.



Şekil 4.27. *S. aureus* ATCC 25923 üzerinde gCM1 ve dCM1 proteinlerinin 2. tekrar aktivite testi sonucu petri görüntüleri ve kob/g et logaritmik ifadesini veren grafik (1 gün)

S. aureus üzerinde yapılan 2.denemede (+) kontrolde 134, (-) kontrolde 24 koloni sayılmıştır. Ortama eklenen gCM1 (+) kontrole kıyasla %60'lık azalma sağlayarak 53, dCM1 eklenen petride ise %93,3'lük azalma ile toplamda 9 koloniye düşmüştür. Koloni sayıları bakımından aktiflik kıyaslaması yapacak olursak proteinin deglikolize olan muadili ile glikolize olan muadili arasında 5,9 katlık bir oran görülmüştür. Oldukça yüksek olan bu farkla deglikolize olan proteinin glikolize muadilinden daha etkili ve aktif olduğu anlaşılmaktadır. Logaritmik olarak kob/g et değerlerine grafik üzerinden baktığımızda, 5 µg gCM1 0,4 log'luk azalma gösterirken, dCM1 1,17 log'luk azalma göstermiştir.

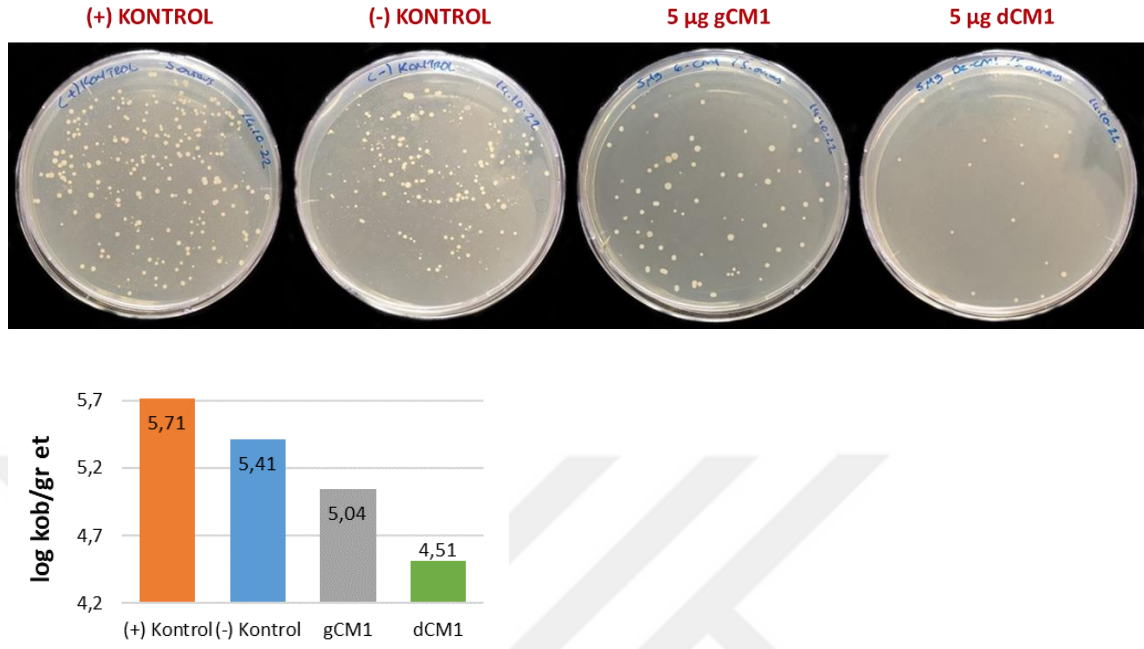
III.



Şekil 4.28. *S. aureus* ATCC 25923 üzerinde gCM1 ve dCM1 proteinlerinin 3. tekrar aktivite testi sonucu petri görüntüleri ve kob/g et logaritmik ifadesini veren grafik (1 gün)

S. aureus üzerinde yapılan 3.denemede (+) kontrolde 253, (-) kontrolde 62 koloni sayılmıştır. Ortama eklenen 5'er µg gCM1 ve dCM1 proteinlerinden sonra ise gCM1 eklenen petride (+) kontroldeki koloni sayısına kıyasla %71'lik bir azalma ile 73, dCM1 eklenen petride ise %93,7'lik bir azalma ile toplamda 16 koloni gözlenmiştir. Koloni sayıları bakımından aktiflik kıyaslaması yapacak olursak proteinin deglikolize olan muadili ile glikolize olan muadili arasında yaklaşık 4,6 katlık bir oran görülmüştür. Oldukça yüksek olan bu farkla deglikolize olan muadilin patojen *S. aureus* üzerinde daha etkili ve aktif olduğunu rahatlıkla söyleyebiliriz. Proteinlerin aktifliğine 1 g et üzerinde koloni oluşturan birimlerin sayılarındaki logaritmik ifadeyle bakacak olursak yapılan hesaplamalar neticesinde grafik üzerinden de anlaşıldığı gibi dCM1 proteini (+) kontrole 1,19 log'luk azalma göstermiştir.

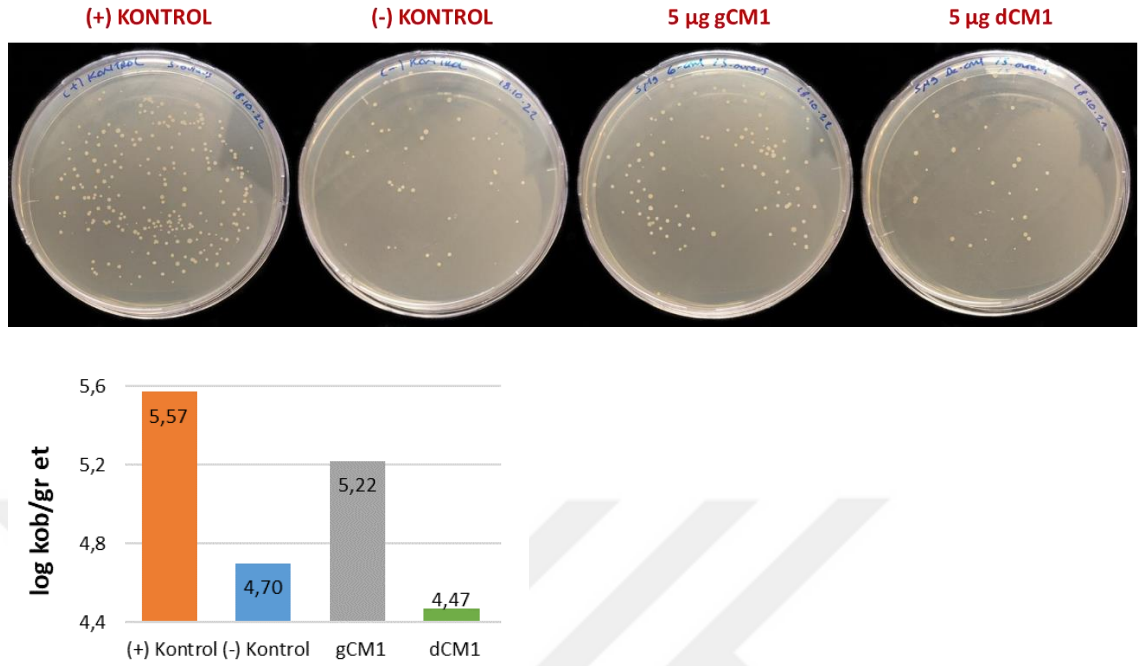
Aynı deney 1.günün ardından 3 gün +4 °C’de bekletilerek tekrar petrilere yayılarak gerçekleştirilmiş ve petri görüntüleri incelenmiştir.



Şekil 4.29. *S. aureus* ATCC 25923 üzerinde gCM1 ve dCM1 proteinlerinin 3. tekrar aktivite testi sonucu petri görüntüleri ve kob/g et logaritmik ifadesini veren grafik (3 gün)

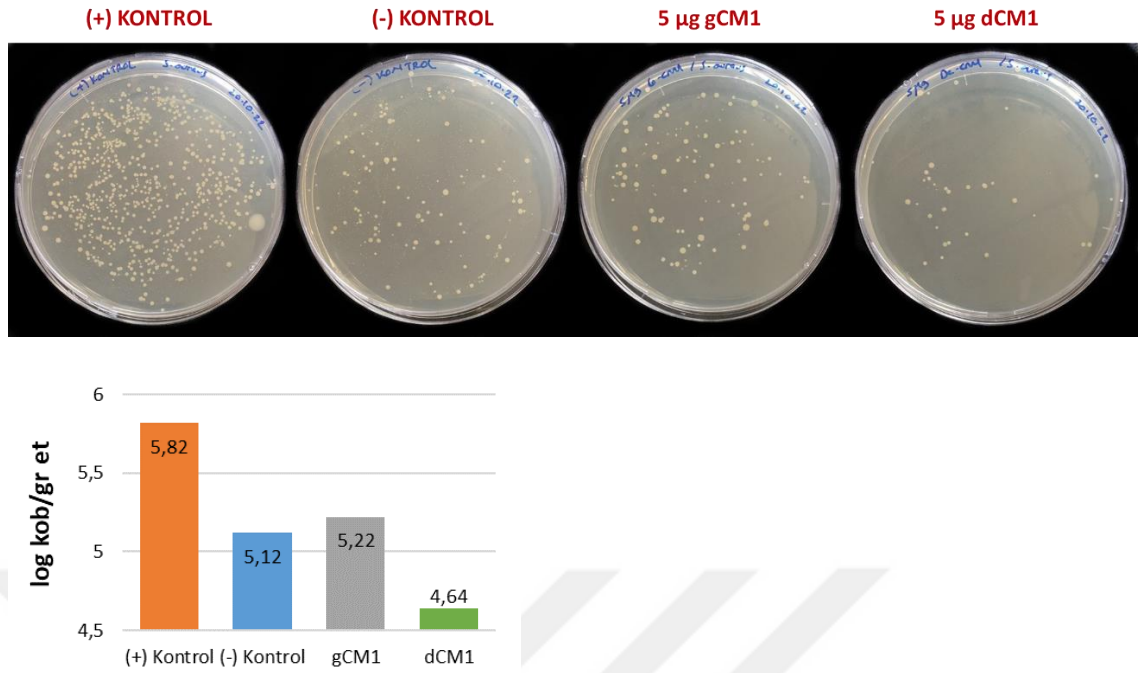
3.günün sonunda yayılan deney gruplarının petrillerdeki görüntüsü Şekil 4.28’deki gibidir. (+) kontrol grubunun koloni sayısı 378 olurken (-) kontrolde bu sayı 187’ye ulaşmıştır. gCM1 proteini eklendiğinde petride oluşan koloniler (+) kontrole kıyasla %78,5 azalarak 81 olurken, dCM1 ile birlikte %94’lük azalma ile 23’e gerilemiştir. Yine koloni sayısı bakımından kıyasladığımızda proteinin glikolize ve deglikolize muadilleri arasında 3,52 katlık bir oran söz konusudur. Ayrıca yine Şekil 4.28’de grafikte görüldüğü gibi 1 gram et üzerinde deglikolize proteinin glikolize olandan daha etkili olduğu, logaritmik olarak 5 µg dCM1 proteininin ise 1,2 log kob’luk azalma sağladığı anlaşılmaktadır.

IV.



Şekil 4.30. *S. aureus* ATCC 25923 üzerinde gCM1 ve dCM1 proteinlerinin 4. tekrar aktivite testi sonucu petri görüntüleri ve kob/g et logaritmik ifadesini veren grafik (1 gün)

4. tekrar aktivite testinde 1 gün +4 °C’de bekletilip yayıldıktan sonra (+) kontrolde 274, (-) kontrolde 37 koloni sayılmıştır. Ortama eklenen gCM1 proteini ile koloni sayılarında (+) kontrole kıyasla %56 oranında azalma sağlayarak 121 koloniye, dCM1 proteini ise %92’lik azalma ile 22 koloniye düşüş sağlamıştır. Koloni sayıları bakımından aktifliklerinin kıyasladığımızda glikolize ve deglikolize protein arasında 5,5 katlık bir oran olduğu ve deglikolizenin daha aktif olduğu anlaşılmıştır. Lagaritmik olarak gCM1 0,36 log kob/g et azalma gösterirken, dCM1 ise koloni oluşturan birimde 1,10 log’luk azalma göstermiştir. 4.tekrar testinin 3.gün aktivite testi sonucu aşağıda verilmiştir.



Şekil 4.31. *S. aureus* ATCC 25923 üzerinde gCM1 ve dCM1 proteinlerinin 4. tekrar aktivite testi sonucu petri görüntüleri ve kob/g et logaritmik ifadesini veren grafik (3 gün)

4.tekrar testinin 3 gün +4 °C’de bekletilmesi sonrasındaki petri görüntüleri Şekil 4.31’de verilmiştir. Sayımı yapılan petrilere (+) kontrol grubunda 485, (-) kontrol grubunda ise 98 koloni olduğu belirlenmiştir. 5 µg gCM1 proteini eklenen petride (+) kontrole kıyasla %74’lük azalma ile 123 koloni sayılırken dCM1 proteini eklenen petride ise %93,4 azalma ile 32 koloni sayılmıştır. Ortamda bulunan koloni sayıları bakımından kıyaslama yapıldığında iki protein arasında 3,8 katlık bir oran mevcuttur. Bu durumda bize aktiflikleri arasında ciddi bir fark olduğunu ve deglikolize CM1’in glikolizeye göre 3 günlük bekleme sonrasında bile *S. aureus* üzerinde 3,8 kat daha fazla aktif olduğunu ortaya koymaktadır. Yapılan deneyin 1 gram et numunesi üzerinde meydana getireceği koloni oluşturan birimlerin logaritmik olarak hesaplamaları da yapılmıştır ve grafikte gösterilmiştir. Yapılan hesaplamalara göre dCM1 (+) kontrole kıyasla 1,18 log’luk azalma göstermiştir. CM1 proteininin *S. aureus* ATCC 25923 bakterisi üzerinde göstermiş olduğu aktivite ve bu aktiflik sonucu sayılan koloniler ve hesaplamalara yönelik genel tablo Çizelge 4.3’te verilmiştir.

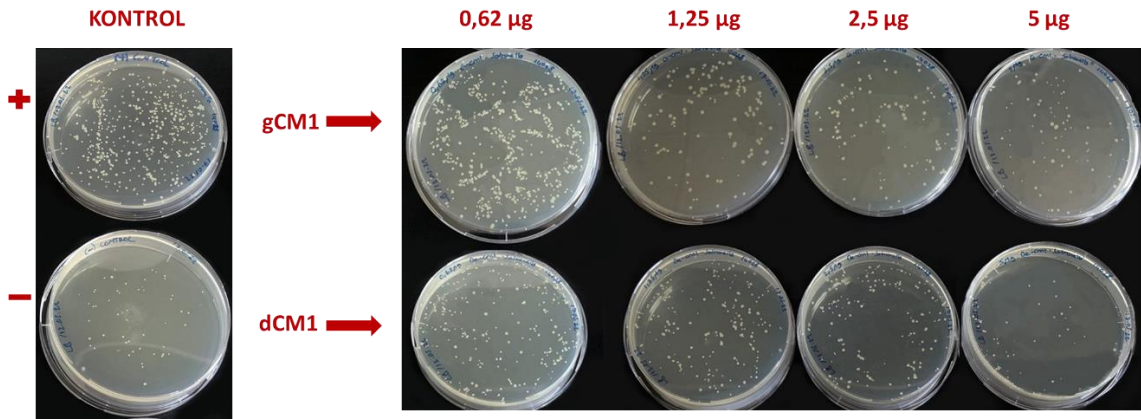
Çizelge 4.3. 5 µg gCM1 ve dCM1 proteinlerinin *S. aureus* ATCC 25923 üzerinde +4 °’de 1 ve 3 günlük tekrarlı aktiflik testi sonuçlarının karşılaştırılması

	Koloni Sayıları					Koloni Azaltma Oranı (+) kontrole kıyasla)	
	Aktivite günü	(+) Kontrol	gCM1	dCM1	gCM1/dCM1	dCM1 (%)	dCM1 (log kob/gr)
1.Tekrar	1.gün	512	114	30	3,8	94,1	1,23
2.Tekrar	1.gün	134	53	9	5,9	93,3	1,17
3.Tekrar	1.gün	253	73	16	4,6	93,7	1,19
	3.gün	378	81	23	3,52	94	1,22
4.Tekrar	1.gün	274	121	22	3,5	92	1,10
	3.gün	485	123	32	3,8	93,4	1,18

Çizelge 4.3’ten de anlaşılacağı üzere dCM1 proteininin *S. aureus* ATCC 25923 üzerinde yapılmış olan 4 tekrarında da 1. ve 3. günlerde aktiflik gösterdiği sonucu çıkmıştır. Tüm tekrar denemelerinde dCM1’in gCM1’e kıyasla daha aktif olduğu ve bu aktiflik oranının 3,5 ile 5,9 kat arasında değiştiğini görmekteyiz. dCM1’in (+) kontrole kıyasla kolonileri azaltma oranı da %92 ile %94,1 aralığında kalmıştır ve bu oran oldukça yüksektir. Yine dCM1’in logaritmik olarak 1 gram et üzerindeki koloni oluşturan birimlerin sayısındaki azaltma oranına baktığımızda ise 1,10 ile 1,23 log kob/g olarak değişmektedir. Proteinlerin et üzerindeki bekletilme süresi 1 günden 3 güne çıkartıldığında (+) kontrol grubunda kolonilerin arttığı, ancak dCM1 proteininin de aktifliğini yüksek oranda sürdürdüğü tespit edildi. Hatta 1.güne kıyasla 3.günde göstermiş olduğu aktifliğin daha yüksek olduğu kolonileri azaltma oranlarından anlaşılmaktadır. 3.tekrarda %93,7 olan oran %94’e, 4. tekrarda ise %92 olan oran %93,4’e çıkmıştır. Logaritmik olarak 1 gram et üzerindeki kolonileri azaltma oranlarına baktığımızda ise, 3.tekrarda 1,19 log kob/g olan değer 1,22 log kob/g’a, 4.tekrarda ise 1,10 log kob/g olan değer 1,18 log kob/g’a yükselmiştir.

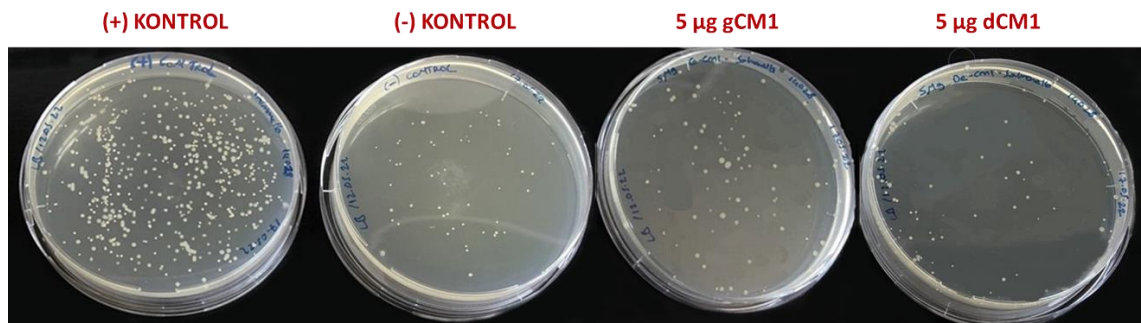
4.6.4. *Salmonella* ATCC 17028 suşu üzerinde aktiflik testi

Öncelikle farklı konsantrasyonlarda glikolize ve deglikolize CM1 proteininin aktifliklerine bakılmıştır. Bu amaçla $1,9 \times 10^7$ kob/mL konsantrasyonda *Salmonella* ATCC 17028 inoküle edilmiş 0,5 g et üzerine 0,62-1,25- 2,5 ve 5 µg konsantrasyonlarda protein eklenerek +4 °C’de 1 gün ve 3 gün bekletilme sonrasında petrilerde gelişen koloni sayıları kontrol gruplarıyla kıyaslanarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.32).



Şekil 4.32. *Salmonella* ATCC 14028 üzerinde farklı konsantrasyonlarda gCM1 ve dCM1 proteinlerinin aktivite testi (1 gün)

Bitkide ürettiğimiz proteinlerin *Salmonella* ATCC 14028 üzerindeki etkinliğine bakmak istediğimizde 0,62-5 µg aralığında farklı konsantrasyonlarda aktivite deneyi yapılmıştır. (+) kontrol petrisinde 524, (-) kontrol petrisinde 52 koloni sayılmıştır. Ortama 0,62 µg protein eklendiğinde (+) kontrole kıyasla petrideki koloni sayılarında gözle fark edilir bir azalma gözlenmemiştir. Protein miktarı 1,25 µg'a çıkartıldığında gCM1 proteini olan petride koloni sayısı 164'e, dCM1 olan petride 110'a düşmüştür. Protein miktarı 2,5 µg'a çıkartıldığında ise koloni sayıları sırasıyla 138 ve 82 olmuştur. Protein miktarının artışıyla birlikte aynı oranda kolonilerde bir azalma görülmektedir. En fazla azalma 5 µg protein varlığında tespit edilmiştir ve detaylı incelemesi Şekil 4.33'te verilmiştir.

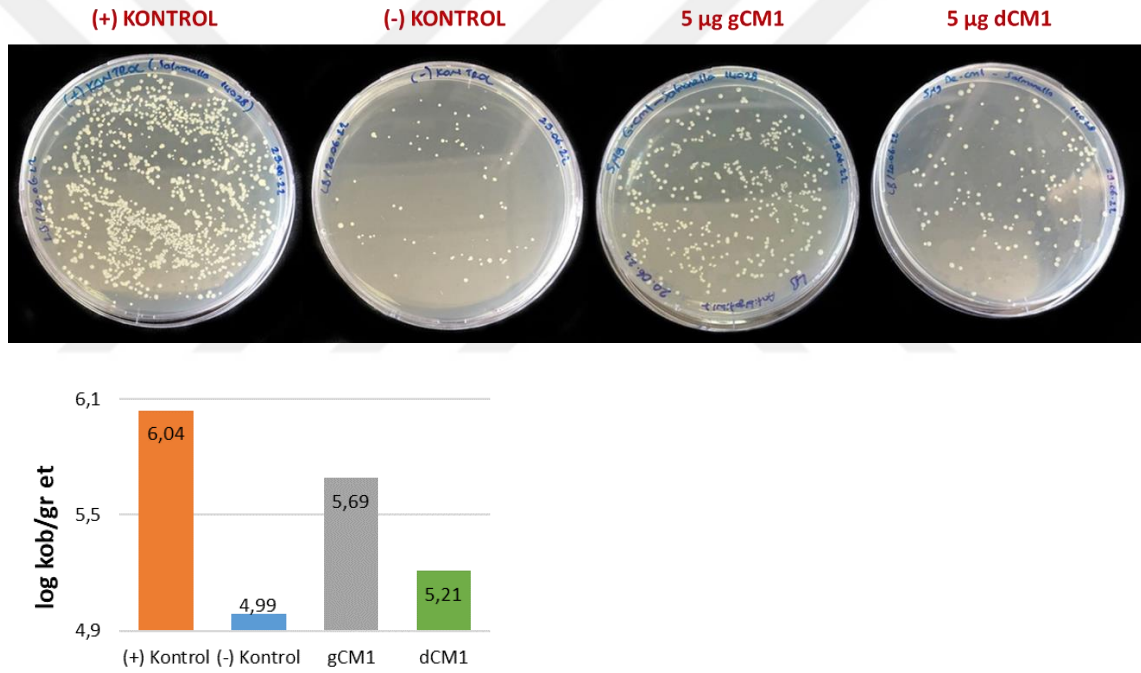


Şekil 4.33. *Salmonella* ATCC 14028 üzerinde gCM1 ve dCM1 proteinlerinin aktivite testi sonucu petri görüntüleri ve kob/g et logaritmik ifadesini veren grafik (1 gün)

(+) kontrol petrisinde 524, (-) kontrol petrisinde 52 koloni sayılmıştır. 5 µg gCM1 proteini eklenen deney grubunda koloni sayısı (+) kontrole kıyasla 128 iken dCM1 eklenen grupta 41 olmuştur. Genel olarak birbirleriyle kıyaslayınca koloni sayısı bakımında proteinin deglükolize olan muadili glükolize olan muadilinden *Salmonella* üzerinde 3,1 katı aktiflik göstermektedir. 1 gram et üzerinde koloni oluşturacak birimlerin sayısının logaritmik olarak ifadesini veren grafiğe bakıldığında ise gCM1'in (+) kontrol grubuna kıyasla 0,61, dCM1'in ise 1,11 log kob/g et azalttığını göstermiştir.

Deneyin sonucunun tutarlılığını kontrol etmek için en iyi aktiflik sonucunu aldığımız 5 µg gCM1 ve dCM1 proteinleri kullanılarak ete inoküle edilen $1,9 \times 10^7$ kob/mL konsantrasyonda *Salmonella* ATCC 17028 bakterisi üzerinde 1 günlük (n=4) ve 3 günlük (n=2) bekletilme (+4 °C) ile tekrarlı denemeler gerçekleştirilmiştir.

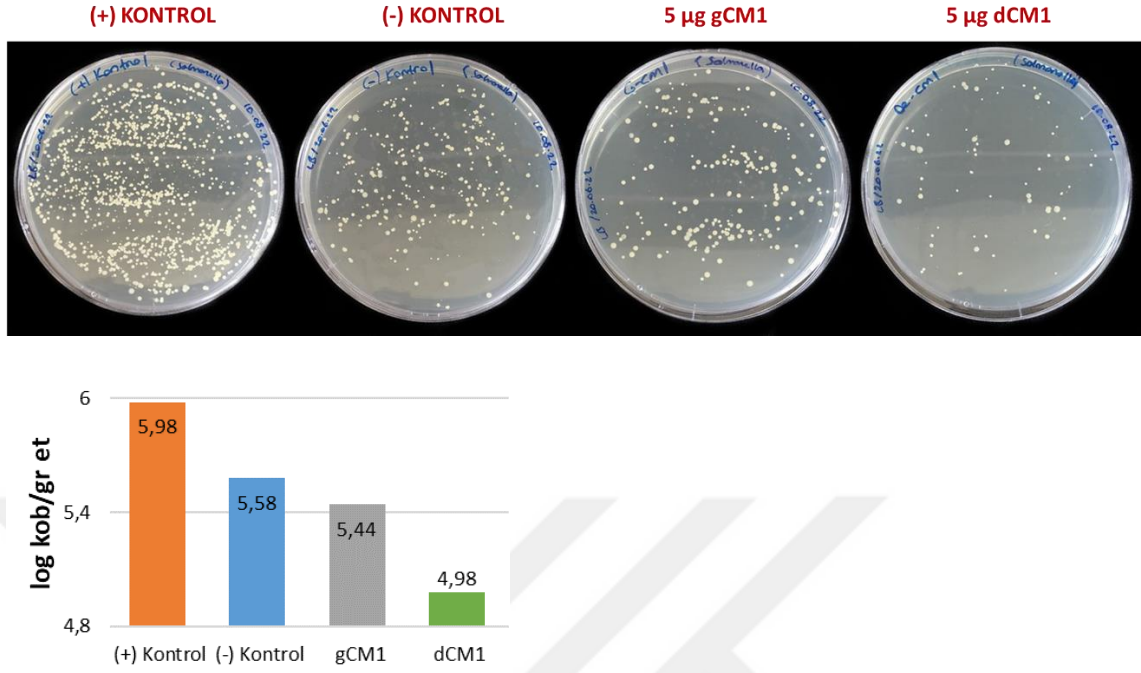
I.



Şekil 4.34. *Salmonella* ATCC 14028 üzerinde gCM1 ve dCM1 proteinlerinin 1. tekrar aktivite testi sonucu petri görüntüleri ve kob/g et logaritmik ifadesini veren grafik (1 gün)

Salmonella ile yapılan 1. tekrar denemesinde petrilere (+) kontrol grubunda ~800, (-) kontrol grubunda 72 koloni sayılmıştır. 5 µg gCM1 proteini eklenen petride (+) kontrole kıyasla %54,5 azalma ile 364, dCM1 proteini eklenen petride ise %85,5 azalma ile 116 koloni sayılmıştır. Koloni sayıları göz önüne alındığında dCM1 proteini ile gCM1 arasında 3,1 katlık bir oran vardır. Logaritmik olarak 1 gram et üzerindeki koloni oluşturan birimleri ifade eden grafiğe bakıldığında ise (+) kontrole kıyasla gCM1 proteini 0,35, dCM1 proteini ise 0,83 log kob azalma sağlamıştır.

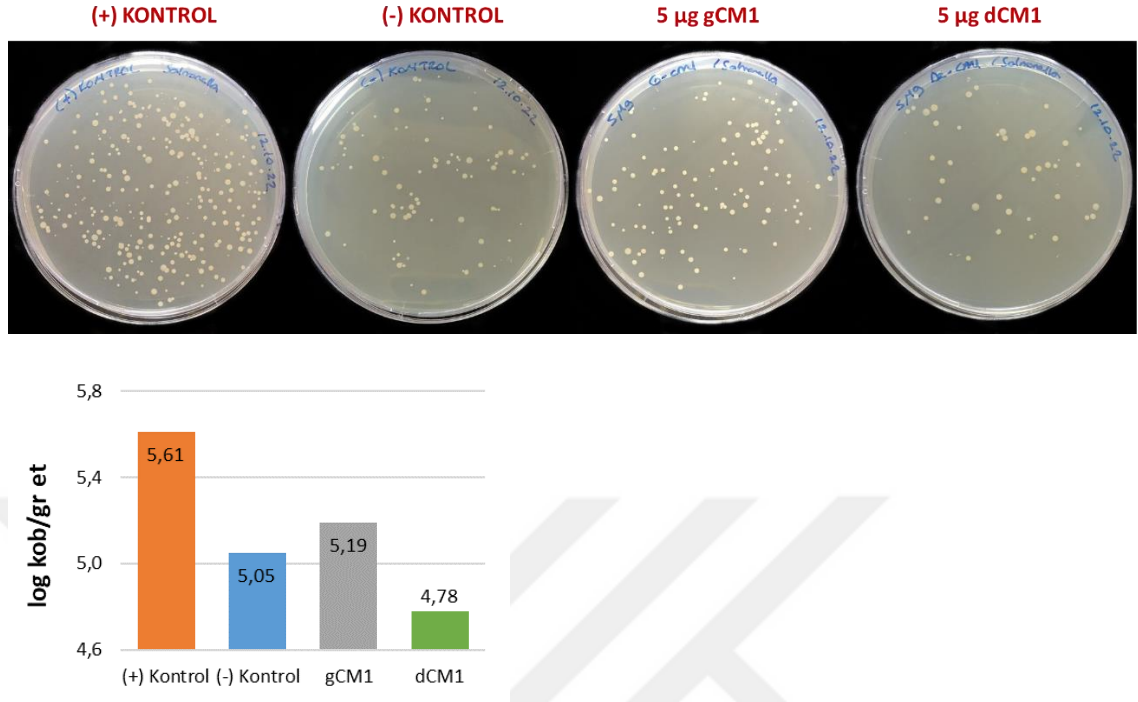
II.



Şekil 4.35. *Salmonella* ATCC 14028 üzerinde gCM1 ve dCM1 proteinlerinin 2. tekrar aktivite testi sonucu petri görüntüleri ve kob/g et logaritmik ifadesini veren grafik (1 gün)

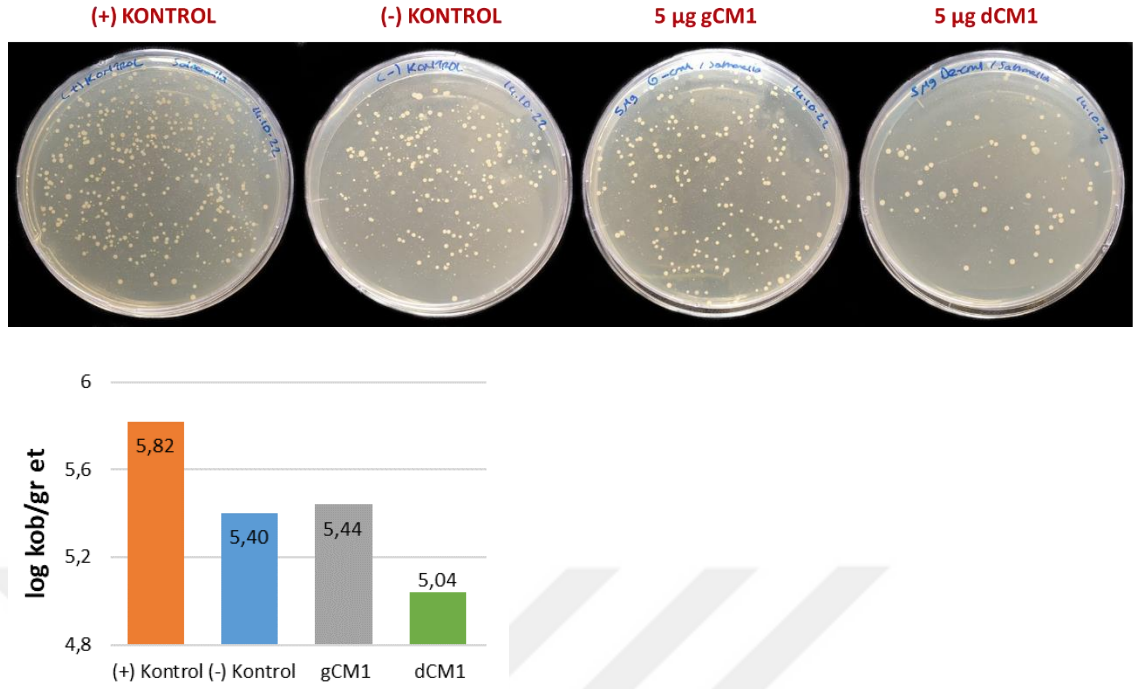
2. tekrar çalışmasında petrilerde (+) kontrol grubunda ~700, (-) kontrol grubunda ise 305 koloni sayılmıştır. gCM1 proteini eklenen petride (+) kontrole kıyasla %70 azalma ile 205, dCM1 proteini eklenen petride ise %90 azalma ile 71 koloni sayılmıştır. Koloni sayıları göz önüne alındığında dCM1 proteini ile gCM1 arasında 2,9 katlık bir oran olduğu gözlenmiştir. Logaritmik olarak grafiğe bakıldığında ise (+) kontrole kıyasla gCM1 proteini 0,54, dCM1 proteini ise 1 log kob/g et azalma sağlamıştır.

III.



Şekil 4.36. *Salmonella* ATCC 14028 üzerinde gCM1 ve dCM1 proteinlerinin 3. tekrar aktivite testi sonucu petri görüntüleri ve kob/g et logaritmik ifadesini veren grafik (1 gün)

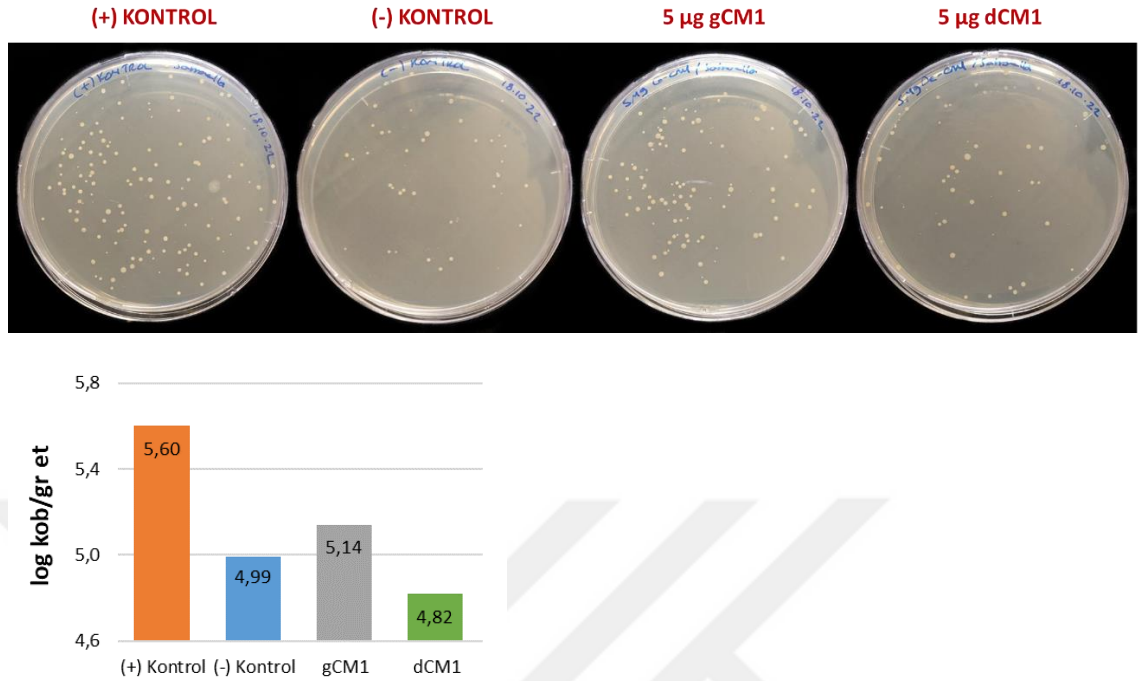
Bu deneyde (+) kontrol grubunun yayıldığı petride 302 koloni sayılırken, (-) kontrolde 82 koloni sayılmıştır. 5 µg gCM1 proteini eklendiğinde ortamdaki koloni sayısı (+) kontrole kıyasla %62,5 azalarak 113 olarak saptanırken, 5 µg dCM1 proteini ile bu sayı %83 azalarak 51'e düşmüştür. Meydana gelen koloni sayıları bakımından proteinin glikolize ve deglikolize muadilleri arasında bir kıyaslama yaptığımızda 2,2 katlık bir oran olduğunu görmekteyiz. Proteinlerin 1 gram et üzerindeki koloni oluşturan birim sayısını veren grafiğe baktığımızda ise, gCM1 proteini (+) kontrole kıyasla 0,49, dCM1 proteini 0,83 log kob'luk azalma göstermiştir. 3.tekrar testinin 3.gün aktivite testi sonucu aşağıda verilmiştir.



Şekil 4.37. *Salmonella* ATCC 14028 üzerinde gCM1 ve dCM1 proteinlerinin 3. tekrar aktivite testi sonucu petri görüntüleri ve kob/g et logaritmik ifadesini veren grafik (3 gün)

3.tekrar deneyinin 3.gün aktivite testinde (+) kontrolde 487, (-) kontrolde 185 koloni sayılmıştır. 5 µg gCM1 ilave edilen deney grubunda bu sayı (+) kontrole kıyasla %56 azalarak 214'e düşerken, dCM1 ile %84 azalarak 78'e düşmüştür. Petri ortamında sayılan koloni sayıları bakımından proteinlerin aktivitesi kıyaslandığında aralarında 2,6'lık bir oran gözlenmiştir. Proteinimizin deglikolize muadili glikolize olana kıyasla *Salmonella* (ATCC 14028) suşu üzerinde daha iyi bir aktivite göstermiştir. Deneyin 1 gram et numunesi üzerinde koloni oluşturacak birimleri ifade eden grafiğe baktığımızda, gCM1 proteini (+) kontrole kıyasla 0,36, dCM1 ise 0,8 log kob'luk azalma sağlamıştır.

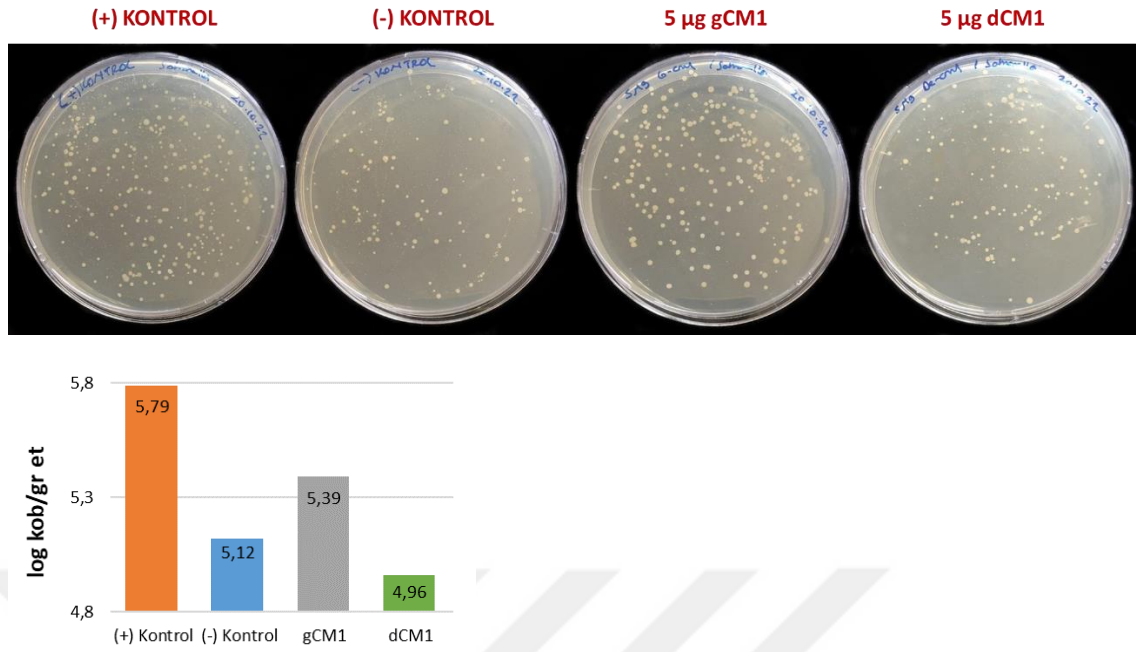
IV.



Şekil 4.38. *Salmonella* ATCC 14028 üzerinde gCM1 ve dCM1 proteinlerinin 4. tekrar aktivite testi sonucu petri görüntüleri ve kob/g et logaritmik ifadesini veren grafik (1 gün)

4.tekrar denemesinde 1 gün +4 °C’de bekletilme sonrasında petrilerde oluşan koloni sayıları (+) kontrolde 293, (-) kontrolde 72 olmuştur. 5 µg gCM1 proteini (+) kontrole kıyasla %65,5 oranında azalma sağlayarak koloni sayısını 101’e düşürürken, dCM1 proteini ise %83,3’lük azalma sağlayarak 49 koloniye düşürmüştür. Petrilerde meydana gelen koloni sayıları bakımından glikolize ve deglikolize proteinler kıyaslandığında aralarında 2 katlık bir oran olduğu görülmüştür. Proteinin deglikolize formu glikolize muadilinden 2 kat daha iyi sonuç vermiştir. Şekil 4.38’de ki grafik incelendiğinde ise 1 gram et üzerinde koloni oluşturan birimlerin sayılarında gCM1 0,46, dCM1 ise 0,78 log kob’luk azalma sağlamıştır.

4.tekrar testinin 3 gün bekletildikten sonraki petri görüntüleri ve aktivite sonuçları aşağıda verilmiştir.



Şekil 4.39. *Salmonella* ATCC 14028 üzerinde gCM1 ve dCM1 proteinlerinin 4. tekrar aktivite testi sonucu petri görüntüleri ve kob/g et logaritmik ifadesini veren grafik (3 gün)

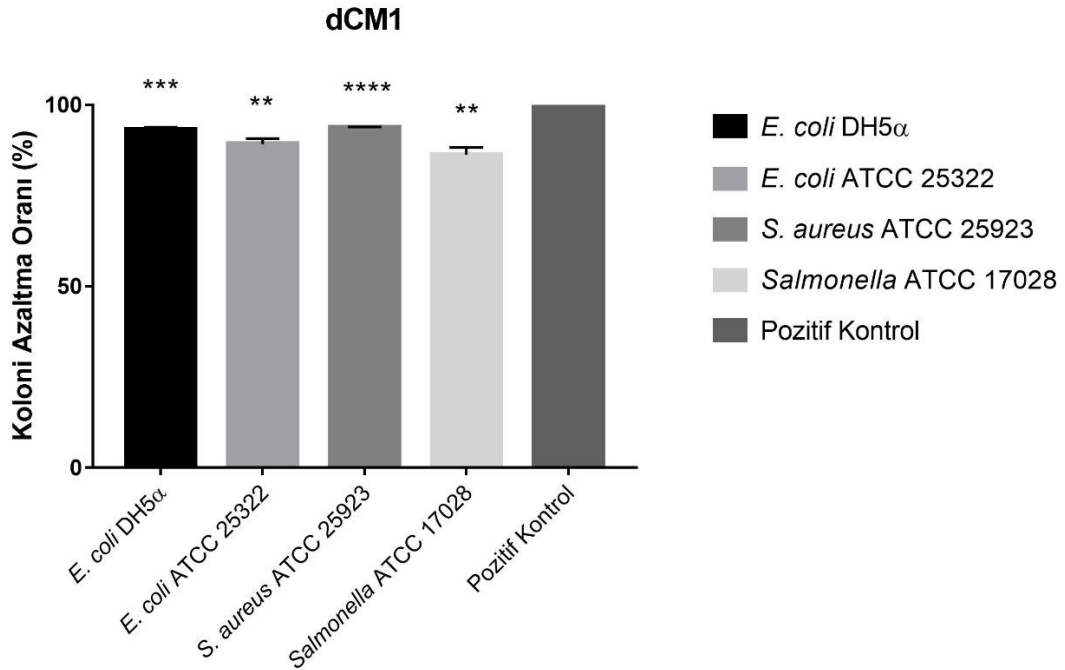
3 gün +4 °C’de bekletilen deney grupları petrilere yayılıp gelişimi bakterilerin gelişimi tamamlandıktan sonra (+) kontrol grubunda 453, (-) kontrol grubunda ise 98 koloni sayılmıştır. Ortama eklenmiş olan 5 µg gCM1 proteini ile koloni sayıları %60’lık bir azalma ile 182’ye düşerken, dCM1 proteini ile bu sayı ile %85’lik azalma ile 68’e düşmüştür. Petrilerde meydana gelen koloni sayılarını birbiriyle kıyasladığımızda 2 protein formu arasında 2,6’lık bir oran olduğunu görmekteyiz. Deneyin 1 g et üzerindeki etkinliğine baktığımızda ise gCM1’in (+) kontrole göre 0,4, dCM1’in ise 0,83 log kob’luk azalma sağladığı Şekil 4.39’da ki grafikten anlaşılmaktadır. CM1 proteininin *Salmonella* ATCC 14028 bakterisi üzerinde göstermiş olduğu aktivite ve bu aktiflik sonucu sayılan koloniler ve hesaplamalara yönelik genel tablo Çizelge 4.4’te verilmiştir.

Çizelge 4.4. 5 µg gCM1 ve dCM1 proteinlerinin *Salmonella* ATCC 14028 üzerinde +4 °’de 1 ve 3 günlük tekrarlı aktiflik testi sonuçlarının karşılaştırılması

Koloni Sayıları						Koloni Azaltma Oranı (++) kontrole kıyasla)	
	Aktivite günü	(+) Kontrol	gCM1	dCM1	gCM1/dCM1	dCM1 (%)	dCM1 (log kob/gr)
1.Tekrar	1.gün	800	364	116	3,1	85,5	0,83
2.Tekrar	1.gün	700	205	71	2,3	90	1
3.Tekrar	1.gün	302	113	51	2,2	83	0,8
	3.gün	478	204	78	2,6	84	0,8
4.Tekrar	1.gün	293	101	49	2	83,3	0,78
	3.gün	453	182	68	2,6	85	0,83

Çizelge 4.4'ten de anlaşılacağı üzere dCM1 proteininin *Salmonella* ATCC 14028 üzerinde yapılmış olan 4 tekrarında da 1. ve 3. günlerde aktiflik gösterebildiğini görmekteyiz. Tüm tekrar denemelerinde dCM1'in gCM1'e kıyasla daha aktif olduğu ve bu aktiflik oranının 2 ile 3,1 kat arasında değiştiğini görmekteyiz. dCM1'in (+) kontrole kıyasla kolonileri azaltma oranı da %83 ile %90 aralığında kalmıştır ve bu oran kabul edilebilir şekilde yüksektir. Yine dCM1'in logaritmik olarak 1 gram et üzerindeki koloni oluşturan birimlerin sayısındaki azaltma oranına baktığımızda ise 0,78 ile 1 log kob/g olarak değişmektedir. Proteinlerin et üzerindeki bekletilme süresi 1 günden 3 güne çıkartıldığında (+) kontrol grubunda kolonilerin arttığı, ancak dCM1 proteininin de aktifliğini yüksek oranda sürdürdüğü tespit edildi. Hatta 1.güne kıyasla 3.günde göstermiş olduğu aktifliğin daha yüksek olduğu kolonileri azaltma oranlarından anlaşılmaktadır. 3.tekrarın 1 ve 3.gününe baktığımızda, %83 olan oran %84'e, 4.tekrarda ise %83,3 olan oran %85'e çıkmıştır. Logaritmik olarak 1 gram et üzerindeki kolonileri azaltma oranlarına baktığımızda ise, 3.tekrarda bir değişiklik gözlenmez iken, 4.tekrarda 0,78 log kob/g olan değer 0,83 log kob/g'a yükselmiştir.

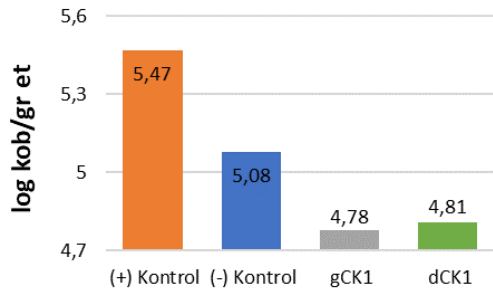
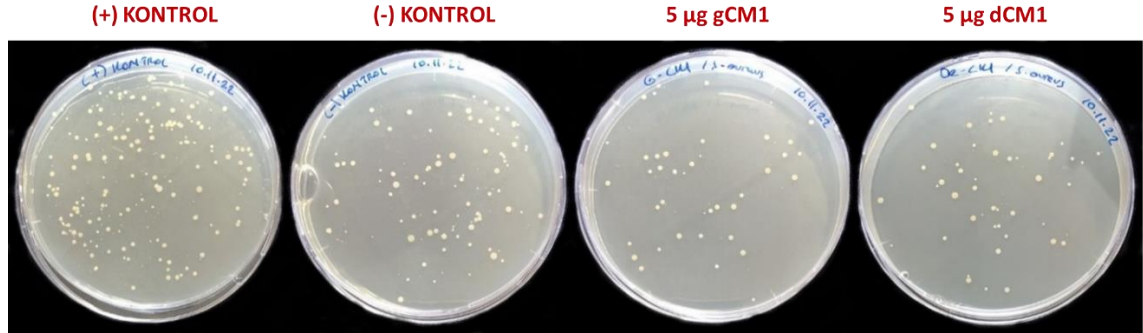
Aktivite testinin yapıldığı tüm mikroorganizmaların (+) kontrole göre koloni azaltma oranlarının (%) istatistiksel analizleri GraphPad Prism 7.0 programı ile hesaplanmış ve grafike edilmiştir (Şekil 4.40). İstatistik sonuçları ile dCM1 proteininin seçilmiş olan mikroorganizmalar üzerinde yapılmış olan 3 tekrarlı aktivite testi sonucunda anlamlı bir aktiflik gösterdiği görülmüştür.



Şekil 4.40. 5 µg dCM1 proteininin *E. coli* DH5α, *E. coli* ATCC 25322, *S. aureus* ATCC 25923 ve *Salmonella* ATCC 17028 üzerindeki aktifliği (*p<0.0001, **p<0.0005, ***p<0.005, *p<0.05, n=3)

4.7. CK1 Proteini ile Et Numunesi Üzerinde Yapılan Aktivite Testi

CM1 proteinin en çok aktivite gösterdiği *S. aureus* ATCC 25923 üzerinde aynı koşullarda CK1 proteininin aktivite testi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.41. *S. aureus* (ATCC 25923) üzerinde gCK1 ve dCK1 proteinlerinin aktivite testi sonucu petri görüntüleri ve kob/g et logaritmik ifadesini veren grafik (4 °C- 1 gün)

CK1 proteininin hem glikolize hem de deglikolize formları Western-blot analizi ile bakıldığında (Bkz. Şekil 4.9) aynı bant seviyesinde oldukları görülmüştü. Ardından ticari EndoH enzimiyle kestirilip kontrolleri sağlandığında da (Bkz. Şekil 4.10) kesim işleminin gerçekleşmeyip hem glikolize hem de *in vivo* deglikolize olarak bitkide üretilen proteinlerin aslında deglikolize olarak üretildiği anlaşılmıştı. Ancak yine de aktivitelerinde bir fark olup olmadığının anlaşılması için bu deney gerçekleştirilmiştir. Aktivite deneyi (+) ve (-) kontrol gruplar ile gCK1 ve dCK1 proteinleri eklenen gruplar olarak hazırlanıp gerçekleştirilmiş ve +4 °C’de 1 gün bekletildikten sonra petrilere yayılmış ve 37 °C’de gelişime bırakılmışlardır. Meydana gelen petri görüntüleri Şekil 4.40’ta görüldüğü gibidir. Sayımı yapılan petrilere (+) kontrol grubunda 216, (-) kontrol grubunda ise 88 koloni sayılmıştır. Glikolize CK1 proteini eklenen petride (+) kontrole kıyasla %80 oranında azalma ile 44 koloniye düşürmüştür. Deglikolize CK1 proteini ise %78 azalma ile 47 koloniye düşürmüştür. Her iki protein tipi de hemen hemen aynı aktiviteyi göstermiştir. Aralarında *S. aureus* suşu üzerinde aktivite testi sonucunda kayda değer bir farkın olmadığı anlaşılmıştır. Buradan da bitkide *in vivo* üretilen CK1 proteinlerinin hem glikolize hem de deglikolize formlarının ikisinin de deglikolize olarak üretilmiş olduğu sonucuna tekrar varılmıştır.

Genel olarak tez çalışmasında yapılmış olan tüm çalışmaların sonuçları yukarıda paylaşıldığı şekildedir. Sonuçlarımız bir gıda koruyucu adayı olabilecek CM proteininin hem glikolize hem de deglikolize formunun bitkide başarılı bir şekilde ifade edildiğini ve sırasıyla 1,7 ve 3,75 mg saf protein/kg bitki biyokütlesi saflaştırma verimiyle saflaştırıldığını göstermektedir. gCM1 için elde edilen bu sonuç literatürde benzer çalışmalara kıyasla daha düşük verim elde ettiğimizi göstermektedir (Schulz vd. 2015; Łojewska vd. 2020). Bu durum proteinin bitkide ekspresyon seviyesinin düşük olmasından kaynaklanmaktadır. Deglikolize CM1 proteini ilk kez bu çalışmayla gerçekleştirildiği için ona yönelik bir yorum yapılamamaktadır. Fakat yine de ekspresyonun seviyesinin artırılması için ileriki çalışmalarda optimizasyonlar yapılabilir. Stabilitate çalışmalarında dCM1 güçlü bir protein olduğunu (özellikle glikolize muadiline kıyasla) ve aktivite testleriyle de patojen suşlar üzerinde yüksek oranlarda bakteriyel yükü azaltma gücüne sahip olduğunu göstermiştir. dCM1 proteini maksimum aktifliğini patojen suş *S. aureus* ATCC 25923 üzerinde ve maksimum 1,23 log kob/g et'lik azalma ile göstermiştir. Literatürde kendi çalışmamıza endeksleyip kıyasladığımızda kolisin kokteyli (M + E7 + Ia + 5 + K + U) kullanmışlar ve koloni sayılarında 1-3 log kob/g et azalma sağlamışlardır. Bakteri azaltmanın konsantrasyona bağlı olarak arttığını söylemişlerdir. Ayrıca kolisin karışımlarının bakteri popülasyonları üzerinde tek başına bir kolisine göre çok daha fazla etkinlik gösterdiğini açıklamışlardır (Hahn-Löbmann vd. 2019). Bulgularımız literatüre yakın sonuçlar vermiştir.

Gıda güvenliği piyasası ihtiyaçları, gıda güvenliği sorunları etrafında dönen iki temel unsurda şekillenmiştir. İlki, gıdalarda bulunan yaygın bakteriyel patojenlerin çoklu ilaca dirençli formlarının hızla artması, ikincisi, tüketicilerin kimyasal katkı maddeleri veya genetiği değiştirilmiş bileşenlerden yoksun 'doğal' bir gıdaya sahip olma arzusudur. Burada ikinci unsur gıda şirketleri tarafından aktif olarak kullanılmaktadır. Çünkü 'doğal', 'GDO' suz', 'antibiyotiksiz', 'organik', 'biyolojik' vb. olarak sınıflandırılan gıdalar için olan talebi karşılama yönünde çalışmalar sürdürmektedirler. Durum böyle olunca da kimyasal yöntemlerle gıdaları mikrobiyal yüklerinden arındırma teknikleri kullanılmayıp doğal antimikrobiyal yöntemlere olan ilgi artmıştır (Hahn-Löbmann vd. 2019). Şimdiye dek çoğunlukla kolisinlerin üretimi bakteriyel olarak gerçekleştirilmiştir ve literatürde de bu şekilde yer almaktadır. Gram pozitif *Lactococcus lactis* 6F3 suşu tarafından üretilen nisin, gıda koruyucusu olarak kullanılan en yaygın koruyucudur fakat yine de kapsamlı bir kullanım alanı yoktur (Chérier vd. 2021).

Bakteriyel üretimdeki yüksek maliyet ve güvenlik sorunları başta olmak üzere diğer birçok faktör göz önüne alındığında rekombinant protein üretimi için bitkilerin kullanılmasının popülaritesi de artmıştır (Mamedov vd. 2016; Lee vd. 2017; Mamedov vd. 2021a). CM benzeri bakteriyosinler, son yıllarda gıda koruyucuları olarak potansiyel kullanımlarından dolayı büyük ilgi görmüştür. Antimikrobiyal aktiviteye sahip yeni bileşiklerin elde edilmesine olan ihtiyaç göz önüne alındığında, bitki hücrelerinden kolisin üretilmesi ve pratikte kullanılabilmesi için günümüzde birçok çalışma yürütülmüştür (Schulz vd. 2015; Stephan vd. 2017; Hahn-Löbmann vd. 2019; Łojewska vd. 2020; McNulty vd. 2020). Bitki bazlı ekspresyon sistemleri kullanılarak, gıda kaynaklı çoklu ilaca dirençli *E. coli* O104:H4 serotipini kontrol etmek için birkaç rekombinant kolisin tarif edilmiştir. Ayrıca, bu çalışmalarda test edilen birçok kolisin arasında, kolisin M'nin yedi ana gıda kaynaklı enterohemorajik *E. coli*'nin ((EHEC)

susları ve O157:H7 serotipi dahil) kontrolü için geniş ölçüde aktif olduğu gösterilmiştir (Hahn-Löbmann vd. 2019). Birçok umut verici araştırmalar, NOMAD BIOSCIENCE Ltd.'nin ColE1, ColE7, ColIa, ColN, ColK, ColU, Col5, ColB ve ColM'den oluşan COLICIN kokteyli için GRAS statüsüne başvurmasına yol açtı. Bu kolisin karışımının meyve ve et ürünlerini gıda kaynaklı patojenlerden koruması beklenmektedir (Ch  rier vd. 2021).

Günümüzde *N. benthamiana*, birçok nedenden ötürü çok çeşitli rekombinant proteinler üretmek için yaygın olarak tercih edilen bir konakçı bitkidir. T  r, kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır; genetiği, fizyolojisi ve agronomisi iyi anlaşılmıştır. Özellikle geçici ekspresyon sistemi kullanılırken çok yüksek rekombinant protein seviyeleri sağlamaktadır (Cummings vd. 2014; Mamedov vd. 2019a; Mamedov vd. 2019b; Mamedov vd. 2021a; Mamedov vd. 2021b). Çoğu   irket *N. benthamiana*'ya dayalı GMP (iyi üretim uygulamaları) uyumlu süreçler oluşturmuştur bazıları da çalışmalarını sürdürmektedir. Örneğin, Icon Genetics GmbH (Halle (Saale), Almanya), Kentucky BioProcessing, Inc. (KBP) (Owensboro, KY, ABD), iBio, Inc. (Newark, DE, ABD), Medicago Inc. (Qu  bec   ehri, QC, Kanada) ve Fraunhofer USA (Newark, DE, ABD). *N. benthamiana* bitkileri metrekare başına, ticari tütün *N. tabacum*'dan daha az biyokütle vermelerine rağmen, rekombinant protein verimleri çok daha yüksektir. Bu durumda işlenecek daha az biyokütle ile hektar başına daha fazla rekombinant protein sağlanmaktadır. *N. benthamiana*'nın güvenliği IND (Investigational New Drug) altında klinik değerlendirmede saptanmış olup, insan a  ıları, antikorlar ve diğer birçok proteinin üretiminde konakçı olarak kullanımı FDA tarafından kabul edilmiştir (Park vd. 2019; Ahn vd. 2021; Mamedov vd. 2021b) Güvenlik risklerini daha da azaltmak ve ürün işlevselliğini iyileştirmek için deglikolize edici enzimlerle *N. benthamiana* bitkisinde yüksek ekspresyonlu protein üretim mekanizmaları tasarlanmıştır (Mammedov ve Yusibov 2014; Mamedov vd. 2016; Mamedov vd. 2017a; Mammedov 2017).

Şu anda, bitki hücrelerinde bakteriyosinlerin ekspresyonuna büyük ilgi vardır. Son araştırmalar, bu protein grubunun özellikle antibiyotiklere veya yeni gıda işleme yardımcılarına uygulanabilir bir alternatif olarak benzersiz bir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir (Schneider vd. 2018b; Hahn-Löbmann vd. 2019; O  ishevskaya vd. 2019; Łojewska vd. 2020). Ispanak veya yapraklı pancar gibi diğer mahsuller de kolisinleri oldukça iyi ifade etmelerine rağmen, *N. benthamiana*'nın üretim hattı, ekonomisi ve verimliliği açısından diğerlerine göre daha uygun olduğu ve kolisinlerin çoğunun yüksek verimlerde eksprese edilebildiğini ve tamamen işlevsel olduğunu göstermişlerdir (Schulz vd. 2015; Stephan vd. 2017).

Kolisin veya kolisin benzeri bakteriyosin kullanmanın önemli bir avantajı da, kolisinler mide-bağırsak sisteminde proteolitik enzimler ve deterjanların etkisine kar  şı oldukça hassastır, bu nedenle gıda yoluyla insan ince bağırsağına ulaşan herhangi bir miktar bağırsaklarda çok kısa sürede parçalanmaktadır ve toksik hiçbir etki göstermemektedir. Bu da kolisinleri bağırsak mikroflorası ve   evre için güvenli kılar

(Schaller ve Bodenmüller 1981; Cotter vd. 2013; Ritala vd. 2020). Kolisin M peptitleri, alerjik bir reaksiyonu tetikleme eşiği olan 3 kDa'dan daha küçük parçalara ayrışabilir. Böylece kullanımından kaynaklı herhangi bir alerjik reaksiyon durumu ortadan kalkar. Ayrıca yapısı bilinen herhangi bir gıda proteinli alerjen ile homolog değildir. Bitkisel kolisinler son zamanlarda FDA (GRAS durumu) tarafından genel olarak güvenli olarak kabul edilmiş ve gıda ürünleri ile kullanımlarına izin verilmiştir (Łojewska vd. 2020).



5. SONUÇLAR

Mevcut tez çalışmasında, *N. benthamiana*'da başarılı şekilde üretilen CM1 kolisini için basit ve ucuz bir üretim ve saflaştırma stratejisi kullanılmıştır. CM, daha geniş aktivite ve farklı patojenik suşlara karşı daha yüksek potansiyeli nedeniyle diğerleri yerine seçilmiştir. Bu kolisinin antibakteriyel etki şekli ve sinerjisi, gıda güvenliği açısından kullanımını destekler. Bu çalışmada ilk kez *in vivo* deglikozilasyon amaçlı Endo H enzimiyle ortak ekspresyon stratejisinin, *N. benthamiana* bitkisinde geçici ekspresyon sistemleri kullanarak doğal formda deglikolize rekombinant CM proteinini üretmek için kullanılabileceği gösterilmiştir. Böylelikle bitki sistemlerinde CM1 proteininin hızlı, güvenilir, büyük ölçekli ve glikolize olan muadiline göre hem daha stabil hem de aktifliği daha yüksek bir proteinin üretimi için deglikolizasyon işlemi *in vivo* olarak gerçekleştirilmiştir. Endo H sekansı, pBI121 ekspresyon vektörlerine yerleştirilerek pBI-Endo H-FLAG-KDEL yapısı elde edilmiştir. CM1 gen dizisi, pEAQ vektörlerine yerleştirilerek pEAQ-CM1-His6-KDEL ekspresyon kaseti oluşturulmuştur. Proteinlerin bitkide *in vivo* glikolize ve deglikolize şekilde üretimi ve saflaştırılması işlemleri başarıyla gerçekleştirilmiştir. Hem Western-Blot hem de SDS-PAGE analizi, rekombinant vektörde genin varlığını ve *N. benthamiana*'da rekombinant proteinin ekspresyonunu doğrulamıştır. SDS-PAGE ve Western-Blot analizine göre, bitkide üretilen gCM1 ve dCM1 proteinlerinin moleküler kütleleri sırasıyla ~29 ve 26 kDa olarak bulunmuştur. Bir His-tag etiketi kullanılarak HIS-Select Nikel Afinite Kromatografisi ile CM'nin saflaştırılması sağlanmıştır. CM1 proteinini yüksek bir saflaştırma verimiyle elde edilmiştir. Aynı miktarda yapraktan elde edilmelerine rağmen gCM1 proteinini 1,7 mg/kg, dCM1 proteinini 3,75 mg/kg bitki biyokütlesi saflaştırma verimine sahiptir. Deglikolize CM1'in hem bitkide ekspresyon seviyesi hem de saflaştırma verimi glikolize muadilinin 2 katından daha fazladır.

Stabilite çalışmaları gerçekleştirilmiş ve deglikolize CM1 proteinini glikolize olan muadiline kıyasla tüm sıcaklık koşullarında (37, 25 ve 4 °C) daha uzun süre denatüre olmadan stabilitesini korumuştur. 37 °C'de 6.günün sonunda stabilitesinin neredeyse %100'ünü korumuştur. 25 °C'de ise 6.güne kadar stabilitesinin %80'inini, 12. günün sonrasında ise %15'ini koruyabilmiştir. Son olarak +4 °C'de gerçekleştirilen testin 1. ayında stabilitesinin %90'ını korumuş ve sonrasında 2. ayda ve 3. ayda oldukça azalmıştır ama glikolize muadiline kıyasla hala stabilite göstermeye devam etmiştir.

CM1'in aktivite testlerinden de başarılı sonuçlar elde edilmesi bize sadece belirlenen suşların gelişmesine engel olmayıp, aynı zamanda gıda üzerinde farklı patojen türlere karşı geniş spektrumlu bir koruyucu olabileceğini göstermiştir. *N. benthamiana* bitkisinde üretmiş olduğumuz dCM1'in yerel bir kasaptan farklı zamanlarda alınmış yağsız dana eti parçalarına inoküle edilmiş patojen olmayan suş *E. coli* DH5α ve patojen suşlar *E. coli* ATCC 25322, *S. aureus* ATCC 25923, *Salmonella* ATCC 17028 üzerindeki aktifliklerine yönelik kantitatif bakteri sayımı yöntemi ile tekrarlı denemeleri gerçekleştirilmiştir. Rekombinant yolla daha güvenilir ve ucuz bir yöntemle üretimini gerçekleştirdiğimiz bir gıda koruyucusu aday olan CM'nin aktivite testleri sonrasında bu 4 farklı suşa karşıda aktivite gösterdiği anlaşılmıştır. (+) ve (-) kontrol gruplarıyla birlikte gerçekleştirilen deneylerde başlangıç bakteri sayısının aynı olmasına rağmen (*E. coli* suşları için $1,6 \times 10^7$, *Salmonella* ve *S. aureus* için ise sırasıyla 2×10^7 ve $1,9 \times 10^7$ kob/mL) (+) kontrol gruplarında farklı sayılarda koloni sayılmasının sebebi etten gelen farklı miktarlarda bakteri yükleridir. Bu durumu da zaten (-) kontrol gruplarında

saydığımız koloniler ispatlamaktadır. Fakat sonuçlarımız değerlendirirken bu durum göz ardı edilip proteinin aktifliği (+) kontrol grubuna kıyasla kolonileri yok etme % oranına göre hesaplanmıştır. Saflaştırılmış rekombinant CM proteinin test edilen ve muhtemel gıda zehirlenmelerinde yaygın olarak karşılaşılan bakteriler üzerinde antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu kanıtlanmıştır. Aktivite testlerinde de stabilite testlerinde olduğu gibi dCM1 proteini gCM1 proteinine göre seçilmiş olan suşlar üzerinde daha yüksek aktivite göstermiştir. 4 farklı bakteri üzerinde gerçekleştirilen aktivite testlerinde dCM1 proteini en yüksek aktiviteyi patojen *S. aureus* ATCC 25923 suşu üzerinde göstermiştir. Tekrarlı testlerin ortalamalarına bakıldığında (+) kontrol üzerindeki kolonilerin 1. günde %93,3'ünü, 3. günde ise %93,8'ini yok etmiştir ve 1 gram et üzerinde sırasıyla 1,18 ve 1,2 log kob'luk azalma sağlamıştır. Ardından 2. yüksek aktiviteyi *E. coli* DH5a suşu üzerinde göstermiştir. 1 günlük +4 °C'de bekletilme sonrasında (+) kontrole kıyasla %93,1 oranında koloni yok etme ve 1,17 log kob/g et'lik azalma sağlamıştır. Aktivite sıralamasında 3. sırada patojen *E. coli* ATCC 25322 suşu vardır. 1 günlük bekletilme sonrasında %89,2 oranında koloni yok etme ve 1 log kob/g et'lik azalma olmuştur. Son sırada ise 1. günde %85,4, 3.günde %84,5 oranında koloni yok etme ve sırasıyla 0,85 ve 0,81 log kob/g et'lik azalma ile patojen *Salmonella* ATCC 14028 üzerinde gösterdiği aktivite vardır.

Karşılaştırma için, CK1 aynı zamanda *N. benthamiana*'da Endo H ile veya Endo H olmadan ortak ifade ile üretilmiştir. CK1'in birkaç potansiyel N-glikozile edilmiş bölgesi olmasına rağmen, sonuçlarımız CK1'in *N. benthamiana* bitkisinde eksprese edildiğinde glikozile olmadığını doğruladı. Rekombinant bitki tarafından üretilen proteinler (hem Endo H ile ortak ifade ile hem de olmadan), Ni-kolon afinite kromatografisi kullanılarak kısmen saflaştırıldı. Stabilite ve aktivite açısından karakterize ettiğimiz kısmi saflaştırılmış CK1 proteininin Endo H ile ifade edilen ve edilmeyen CK1'ler arasında anlamlı bir fark gözlenmedi.

Özetle, EndoH ile deglikolizasyon teknolojinin bitkide geçici ekspresyon sistemiyle üretilen proteinlerde kullanımının hem ekspresyon seviyesini arttırdığını hem de stabilite ve aktivite testlerinde glikolize muadiline kıyasla daha iyi sonuçlar verdiğini daha önce yapılan birçok farklı çalışma gibi bu çalışma ile bir kez daha ispatlamış oluyoruz. Sonuçlarımız, deglikozile edilmiş Endo H teknolojisinin, diğer kolisinleri glikozile edilmemiş, doğal benzeri formlarında üretmek için kullanılabileceğini göstermektedir; bu, bu kolisinlerin bir gıda katkı maddesi olarak ticarileşme potansiyelini artırmak için önemli olacaktır. Ayrıca özellikle ülkemizde ve dünyada farklı gıda koruyucusu proteinlerin üretimine de ışık tutacağı düşünülmektedir. Gıdaya olan talebin asla azalmayacağı ve nüfusun artışıyla birlikte bilinçli tüketicilerinde de artarak çoğalacağını düşürsek ülkemizin böyle teknolojileri kullanmaya daha fazla ihtiyacı olduğunu ön görebiliriz. Böylelikle gıda endüstrisinde kullanılan doğal gıda koruyucularının daha fazlasının ülkemizde üretilmeye başlanması ile hem akademik ve bilimsel anlamda çalışan birçok insana faydalı olacak, hem yeni iş imkânları ortaya çıkacak hem de katma değeri yüksek ürünler sayesinde ülke ekonomisi güçlenecek ve gıda endüstrisi gelişimine ivme kazandıracaktır.

6. KAYNAKLAR

- Ahmad, V. vd. 2017. Antimicrobial potential of bacteriocins: in therapy, agriculture and food preservation. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 49(1): 1-11.
- Ahn, G. vd. 2021. Production of a Bacteria-like Particle Vaccine Targeting Rock Bream (*Oplegnathus fasciatus*) Iridovirus Using *Nicotiana benthamiana*. *Journal of Plant Biology*: 1-8.
- Akkoç, N. vd. 2009. Bakteriyosinler: Alternatif Gıda Koruyucuları. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fen Bilimleri Dergisi*, 25(1): 59-70.
- And, H. C. ve D. Hoover. 2003. Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 2(3): 82-100.
- Anderson, M. vd. 2020. Strengthening implementation of antimicrobial resistance national action plans. *European Journal of Public Health*, 30(Supplement_5): ckaa165. 1200.
- Arthur, T. D. vd. 2014. On bacteriocin delivery systems and potential applications. *Future microbiology*, 9(2): 235-248.
- Bahar, A. A. ve D. Ren. 2013. Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals*, 6(12): 1543-1575.
- Baquero, F. vd. 2019. Microcins in Enterobacteriaceae: peptide antimicrobials in the eco-active intestinal chemosphere. *Frontiers in microbiology*, 10: 2261.
- Barreteau, H. vd. 2020. CbrA mediates colicin M resistance in *Escherichia coli* through modification of undecaprenyl-phosphate-linked peptidoglycan precursors. *Journal of bacteriology*, 202(23): e00436-00420.
- Barreteau, H. vd. 2012. Functional and structural characterization of PaeM, a colicin M-like bacteriocin produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biological Chemistry*, 287(44): 37395-37405.
- Barta, A. vd. 1986. The expression of a nopaline synthase—human growth hormone chimaeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue. *Plant molecular biology*, 6(5): 347-357.
- Bédard, F. vd. 2018. Synthesis, antimicrobial activity and conformational analysis of the class IIa bacteriocin pediocin PA-1 and analogs thereof. *Scientific reports*, 8(1): 1-13.
- Ben Lagha, A. vd. 2017. Antimicrobial potential of bacteriocins in poultry and swine production. *Veterinary research*, 48(1): 1-12.
- Biemelt, S. ve U. Sonnewald. 2005. Molecular farming in plants. *Nature encyclopedia of life sciences*, London: Nature Publishing Group.
- Bonomo, R. A. vd. 2017. Gram-negative bacterial infections: research priorities, accomplishments, and future directions of the Antibacterial Resistance Leadership Group. *Clinical Infectious Diseases*, 64(suppl_1): S30-S35.
- Borrero, J. vd. 2018. Plantaricyclin A, a novel circular bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* NI326: purification, characterization, and heterologous production. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(1): e01801-01817.

- Bortolaia, R. ve R. Hendriksen. 2017. Laboratory Protocol.
- Bosák, J. vd. 2021. Non-antibiotic antibacterial peptides and proteins of Escherichia coli: efficacy and potency of bacteriocins. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 19(3): 309-322.
- Braun, V. vd. 2002. Ton-dependent colicins and microcins: modular design and evolution. *Biochimie*, 84(5-6): 365-380.
- Brown, C. L. vd. 2012. Colicin-like bacteriocins as novel therapeutic agents for the treatment of chronic biofilm-mediated infection, Portland Press Ltd.
- Burnett, M. J. ve A. C. Burnett. 2020. Therapeutic recombinant protein production in plants: Challenges and opportunities. *Plants, People, Planet*, 2(2): 121-132.
- Calcuttawala, F. vd. 2022. Structural and functional insights into colicin: a new paradigm in drug discovery. *Archives of Microbiology*, 204(1): 1-9.
- Callaway, T. R. ve T. G. Sheridan. 2015. Smarter arrow now available in the food safety quiver. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(40): 12230-12231.
- Cameron, A. vd. 2019. Bacteriocin occurrence and activity in Escherichia coli isolated from bovines and wastewater. *Toxins*, 11(8): 475.
- Cascales, E. vd. 2007. Colicin biology. *Microbiology and molecular biology reviews*, 71(1): 158-229.
- Cavera, V. L. vd. 2015. Bacteriocins and their position in the next wave of conventional antibiotics. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 46(5): 494-501.
- Chen, Q. ve K. R. Davis. 2016. The potential of plants as a system for the development and production of human biologics. *F1000Research*, 5.
- Chérier, D. vd. 2021. The Biology of Colicin M and Its Orthologs. *Antibiotics*, 10(9): 1109.
- Cleveland, J. vd. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International journal of food microbiology*, 71(1): 1-20.
- Cotter, P. D. vd. 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 3(10): 777-788.
- Cotter, P. D. vd. 2013. Bacteriocins—a viable alternative to antibiotics? *Nature Reviews Microbiology*, 11(2): 95-105.
- Cummings, J. F. vd. 2014. Safety and immunogenicity of a plant-produced recombinant monomer hemagglutinin-based influenza vaccine derived from influenza A (H1N1) pdm09 virus: a Phase 1 dose-escalation study in healthy adults. *Vaccine*, 32(19): 2251-2259.
- Cursino, L. vd. 2002. Recent updated aspects of colicins of Enterobacteriaceae. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33: 185-195.
- D'Aoust, M. A. vd. 2010. The production of hemagglutinin-based virus-like particles in plants: a rapid, efficient and safe response to pandemic influenza. *Plant biotechnology journal*, 8(5): 607-619.

- da Costa, R. J. vd. 2019. Preservation of meat products with bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from meat. *Journal of Food Quality*, 2019.
- Dall, C. 2020. EU Notes Rising Resistance in Common Foodborne Pathogens. *News Report*.
- Daniell, H. vd. 2019. Plant cell-made protein antigens for induction of Oral tolerance. *Biotechnology advances*, 37(7): 107413.
- de Kraker, M. E. vd. 2016. Will 10 million people die a year due to antimicrobial resistance by 2050? *PLoS medicine*, 13(11): e1002184.
- De Muynck, B. vd. 2010. Production of antibodies in plants: status after twenty years. *Plant biotechnology journal*, 8(5): 529-563.
- Deegan, L. H. vd. 2006. Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *International dairy journal*, 16(9): 1058-1071.
- Demain, A. L. ve P. Vaishnav. 2009. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology advances*, 27(3): 297-306.
- Dreher, R. vd. 1985. Functional domains of colicin M. *Archives of microbiology*, 140: 343-346.
- Drider, D. vd. 2016. Bacteriocins: not only antibacterial agents. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 8(4): 177-182.
- Drider, D. vd. 2006. The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiology and molecular biology reviews*, 70(2): 564-582.
- Drider, D. ve S. Rebuffat. 2011. Prokaryotic antimicrobial peptides: from genes to applications. Place, Published, Springer Science & Business Media.
- Duquesne, S. vd. 2007. Microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. *Natural product reports*, 24(4): 708-734.
- Egan, K. vd. 2017. Bacteriocins: antibiotics in the age of the microbiome. *Emerging Topics in Life Sciences*, 1(1): 55-63.
- El-Hack, A. vd. 2021. Approaches to prevent and control *Campylobacter* spp. colonization in broiler chickens: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(5): 4989-5004.
- El Ghachi, M. vd. 2006. Colicin M exerts its bacteriolytic effect via enzymatic degradation of undecaprenyl phosphate-linked peptidoglycan precursors. *Journal of Biological Chemistry*, 281(32): 22761-22772.
- Fidan, A. ve S. Uğraş. 2022. Bakteriyosinlerin Sağlık Alanında Kullanımı. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*: 145.
- Field, D. vd. 2018. Developing bacteriocins of lactic acid bacteria into next generation biopreservatives. *Current Opinion in Food Science*, 20: 1-6.
- Fischer, R. ve N. Emans. 2000. Molecular farming of pharmaceutical proteins. *Transgenic research*, 9(4): 279-299.
- Fischer, R. vd. 2004. Molecular farming in plants: technology platforms. *Encyclopedia of plant and crop science*: 753-756.

- Flaherty, R. A. vd. 2014. The wide world of ribosomally encoded bacterial peptides. *PLoS pathogens*, 10(7): e1004221.
- Friso, G. ve K. J. van Wijk. 2015. Posttranslational protein modifications in plant metabolism. *Plant physiology*, 169(3): 1469-1487.
- Gérard, F. vd. 2011. X-ray structure and site-directed mutagenesis analysis of the Escherichia coli colicin M immunity protein. *Journal of bacteriology*, 193(1): 205-214.
- Ghosh, C. vd. 2019. Alternatives to conventional antibiotics in the era of antimicrobial resistance. *Trends in microbiology*, 27(4): 323-338.
- Goetze, A. M. vd. 2011. High-mannose glycans on the Fc region of therapeutic IgG antibodies increase serum clearance in humans. *Glycobiology*, 21(7): 949-959.
- Gomord, V. vd. 2010. Plant-specific glycosylation patterns in the context of therapeutic protein production. *Plant biotechnology journal*, 8(5): 564-587.
- Gonelimali, F. D. vd. 2018. Antimicrobial properties and mechanism of action of some plant extracts against food pathogens and spoilage microorganisms. *Frontiers in microbiology*, 9: 1639.
- Gordon, D. M. ve C. L. O'Brien. 2006. Bacteriocin diversity and the frequency of multiple bacteriocin production in Escherichia coli. *Microbiology*, 152(11): 3239-3244.
- Grassin, C. ve P. Fauquembergue. 2009. Enzymes, fruit juice processing. *Encyclopedia of Bioprocess Technology*.
- Guder, A. vd. 2000. Posttranslationally modified bacteriocins—the lantibiotics. *Peptide Science*, 55(1): 62-73.
- Gutián, M. V. vd. 2019. Anti-Listeria monocytogenes effect of bacteriocin-incorporated agar edible coatings applied on cheese. *International dairy journal*, 97: 92-98.
- Hahn-Löbmann, S. vd. 2019. Colicins and salmocins—new classes of plant-made non-antibiotic food antibacterials. *Frontiers in plant science*, 10: 437.
- Hammami, R. vd. 2007. BACTIBASE: a new web-accessible database for bacteriocin characterization. *BMC microbiology*, 7(1): 1-6.
- Hansen, J. N. ve W. Sandine. 1994. Nisin as a model food preservative. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 34(1): 69-93.
- Hawkey, P. 2015. Multidrug-resistant Gram-negative bacteria: a product of globalization. *Journal of Hospital Infection*, 89(4): 241-247.
- Helbig, S. vd. 2011. Activation of colicin M by the FkpA prolyl cis-trans isomerase/chaperone. *Journal of Biological Chemistry*, 286(8): 6280-6290.
- Heldt, H. ve B. Piechulla. 2011. 22-Biotechnology alters plants to meet requirements of agriculture, nutrition and industry. *Plant Biochemistry*: 551-586.
- Helenius, A. vd. 2001. Intracellular functions of N-linked glycans. *Science*, 291(5512): 2364-2369.

- Helenius, A. ve M. Aebi. 2004. Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annual review of biochemistry*, 73(1): 1019-1049.
- Hill, D. vd. 2017. Recent advances in microbial fermentation for dairy and health. *F1000Research*, 6.
- Hu, Z. Y. vd. 2019. Effect of chitosan, and bacteriocin-producing *Carnobacterium maltaromaticum* on survival of *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium* on beef. *International journal of food microbiology*, 290: 68-75.
- Ibarguren, C. vd. 2015. Gelatine based films added with bacteriocins and a flavonoid ester active against food-borne pathogens. *Innovative food science & emerging technologies*, 28: 66-72.
- James, R. vd. 2002. Killing of *E. coli* cells by E group nuclease colicins. *Biochimie*, 84(5-6): 381-389.
- Jordi, B. J. vd. 2001. Sensitivity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains for colicins under different experimental conditions. *FEMS microbiology letters*, 204(2): 329-334.
- Kazanavičiūtė, V. vd. 2018. Plant-expressed bacteriophage lysins control pathogenic strains of *Clostridium perfringens*. *Scientific reports*, 8(1): 10589.
- Kim, Y. C. vd. 2014. Colicin import into *E. coli* cells: a model system for insights into the import mechanisms of bacteriocins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1843(8): 1717-1731.
- Kleanthous, C. 2010. Swimming against the tide: progress and challenges in our understanding of colicin translocation. *Nature Reviews Microbiology*, 8(12): 843-848.
- Komarova, T. V. vd. 2010. Transient expression systems for plant-derived biopharmaceuticals. *Expert review of vaccines*, 9(8): 859-876.
- Kozlowski, S. ve P. Swann. 2006. Current and future issues in the manufacturing and development of monoclonal antibodies. *Advanced drug delivery reviews*, 58(5-6): 707-722.
- Köck, J. vd. 1987. Primary structure of colicin M, an inhibitor of murein biosynthesis. *Journal of bacteriology*, 169(7): 3358-3361.
- Kumariya, R. vd. 2019. Bacteriocins: Classification, synthesis, mechanism of action and resistance development in food spoilage causing bacteria. *Microbial pathogenesis*, 128: 171-177.
- Lagadinou, M. vd. 2020. Antimicrobial properties on non-antibiotic drugs in the era of increased bacterial resistance. *Antibiotics*, 9(3): 107.
- Laxminarayan, R. vd. 2020. The Lancet Infectious Diseases Commission on antimicrobial resistance: 6 years later. *The Lancet Infectious Diseases*, 20(4): e51-e60.
- Lee, I. H. vd. 2017. SP-LL-37, human antimicrobial peptide, enhances disease resistance in transgenic rice. *Plos one*, 12(3): e0172936.

- Leroy, F. ve L. De Vuyst. 2010. Bacteriocins of lactic acid bacteria to combat undesirable bacteria in dairy products. *Australian journal of dairy technology*, 65(3): 143-149.
- Li, H.-W. vd. 2021. A novel bacteriocin from *Lactobacillus salivarius* against *Staphylococcus aureus*: Isolation, purification, identification, antibacterial and antibiofilm activity. *LWT*, 140: 110826.
- Li, X.-Z. vd. 2015. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clinical microbiology reviews*, 28(2): 337-418.
- Lico, C. vd. 2012. The use of plants for the production of therapeutic human peptides. *Plant cell reports*, 31(3): 439-451.
- Łojewska, E. vd. 2022. Heterologous overexpression and preliminary antimicrobial activity test of salmocin M, a novel colicin M-like bacteriocin against *Salmonella* sp. *Archives of Microbiology*, 204(2): 1-10.
- Łojewska, E. vd. 2020. Production of recombinant colicin M in *Nicotiana tabacum* plants and its antimicrobial activity. *Plant Biotechnology Reports*, 14(1): 33-43.
- Lyon, W. J. vd. 1996. Method and colicin composition for inhibiting *Escherichia coli* 0157: H7 in food products, Google Patents.
- MacVane, S. H. 2017. Antimicrobial resistance in the intensive care unit: a focus on gram-negative bacterial infections. *Journal of intensive care medicine*, 32(1): 25-37.
- Mader, R. vd. 2021. Building the European antimicrobial resistance surveillance network in veterinary medicine (EARS-Vet). *Eurosurveillance*, 26(4): 2001359.
- Mamedov, T. vd. 2016. Production of functionally active and immunogenic non-glycosylated protective antigen from *Bacillus anthracis* in *Nicotiana benthamiana* by co-expression with peptide-N-glycosidase F (PNGase F) of *Flavobacterium meningosepticum*. *Plos one*, 11(4).
- Mamedov, T. vd. 2017a. In vivo production of non-glycosylated recombinant proteins in *Nicotiana benthamiana* plants by co-expression with Endo- β -N-acetylglucosaminidase H (Endo H) of *Streptomyces plicatus*. *PloS one*, 12(8): e0183589.
- Mamedov, T. vd. 2017b. In vivo production of non-glycosylated recombinant proteins in *Nicotiana benthamiana* plants by co-expression with Endo- β -N-acetylglucosaminidase H (Endo H) of *Streptomyces plicatus*. *Plos one*, 12(8).
- Mamedov, T. vd. 2019a. A Plant-Produced in vivo deglycosylated full-length Pfs48/45 as a Transmission-Blocking Vaccine Candidate against malaria. *Scientific reports*, 9(1): 1-12.
- Mamedov, T. vd. 2012. Production of non-glycosylated recombinant proteins in *Nicotiana benthamiana* plants by co-expressing bacterial PNGase F. *Plant biotechnology journal*, 10(7): 773-782.
- Mamedov, T. vd. 2019b. Engineering, and production of functionally active human Furin in *N. benthamiana* plant: In vivo post-translational processing of target proteins by Furin in plants. *Plos one*, 14(3): e0213438.

- Mamedov, T. vd. 2021a. Plant-produced glycosylated and In vivo Deglycosylated receptor binding domain proteins of SARS-CoV-2 induce potent neutralizing responses in mice. *Viruses*, 13(8): 1595.
- Mamedov, T. vd. 2021b. Production and Characterization of Nucleocapsid and RBD Cocktail Antigens of SARS-CoV-2 in *Nicotiana benthamiana* Plant as a Vaccine Candidate against COVID-19. *Vaccines*, 9(11): 1337.
- Mamedov, T. ve V. Yusibov. 2013. In vivo deglycosylation of recombinant proteins in plants by co-expression with bacterial PNGase F. *Bioengineered*, 4(5): 338-342.
- Mammedov, T. 2017. Production of in vivo n-deglycosylated recombinant proteins by co-expression with endo h, Google Patents.
- Mammedov, T. vd. 2022. Plant-produced RBD and cocktail-based vaccine candidates are highly effective against SARS-CoV-2, independently of its emerging variants. *bioRxiv*: 2022.2004. 2007.487347.
- Mammedov, T. ve V. Yusibov. 2014. In vivo de-glycosylation of recombinant proteins by co-expression with pngase f, Google Patents.
- Margolin, E. vd. 2018. Production of complex viral glycoproteins in plants as vaccine immunogens. *Plant biotechnology journal*, 16(9): 1531-1545.
- Marković, K. G. vd. 2022. Colicins and Microcins Produced by Enterobacteriaceae: Characterization, Mode of Action, and Putative Applications. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(18): 11825.
- Marsian, J. ve G. P. Lomonosoff. 2016. Molecular pharming—VLPs made in plants. *Current opinion in biotechnology*, 37: 201-206.
- Mathur, H. vd. 2018. Fighting biofilms with lantibiotics and other groups of bacteriocins. *npj Biofilms and Microbiomes*, 4(1): 1-13.
- McNulty, M. J. vd. 2020. Techno-economic analysis of a plant-based platform for manufacturing antimicrobial proteins for food safety. *Biotechnology progress*, 36(1): e2896.
- Meade, E. vd. 2020. Bacteriocins, potent antimicrobial peptides and the fight against multi drug resistant species: resistance is futile? *Antibiotics*, 9(1): 32.
- Michel-Briand, Y. ve C. Baysse. 2002. The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie*, 84(5-6): 499-510.
- Milne, R. 2008. Public attitudes toward molecular farming in the UK.
- Montalbán-López, M. vd. 2021. New developments in RiPP discovery, enzymology and engineering. *Natural Product Reports*, 38(1): 130-239.
- Moreira, R. A. vd. 2020. Quantitative determination of mechanical stability in the novel coronavirus spike protein. *Nanoscale*, 12(31): 16409-16413.
- Moustafa, K. vd. 2016. Molecular farming on rescue of pharma industry for next generations. *Critical reviews in biotechnology*, 36(5): 840-850.
- Mrak, P. vd. 2007. Heterogeneity in expression of the *Escherichia coli* colicin K activity gene *cka* is controlled by the SOS system and stochastic factors. *Molecular Genetics and Genomics*, 277: 391-401.

- O'Bryan, C. A. vd. 2018. Characteristics of bacteriocins and use as food antimicrobials in the United States. *Food and feed safety systems and analysis*: 273-286.
- O'Connor, P. M. vd. 2020. Antimicrobials for food and feed; a bacteriocin perspective. *Current opinion in biotechnology*, 61: 160-167.
- Obembe, O. O. vd. 2011. Advances in plant molecular farming. *Biotechnology advances*, 29(2): 210-222.
- Olishevskaya, S. vd. 2019. Bacillus and Paenibacillus secreted polyketides and peptides involved in controlling human and plant pathogens. *Applied microbiology and biotechnology*, 103(3): 1189-1215.
- Organization, W. H. 2014. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. Place, Published, World Health Organization.
- Organization, W. H. 2017. Global diffusion of eHealth: making universal health coverage achievable: report of the third global survey on eHealth. Place, Published, World Health Organization.
- Organization, W. H. 2019. Evaluation of certain food additives: Eighty-sixth report of the joint FAO/WHO expert committee on food additives. Place, Published, World Health Organization, 965.
- Ölschläger, T. vd. 1984. Cloning and expression of the activity and immunity genes of colicins B and M on ColBM plasmids. *Molecular and General Genetics MGG*, 196(3): 482-487.
- Park, Y. vd. 2019. Development of recombinant protein-based vaccine against classical swine fever virus in pigs using transgenic *Nicotiana benthamiana*. *Frontiers in plant science*, 10: 624.
- Paškevičius, Š. vd. 2017. Plant-expressed pyocins for control of *Pseudomonas aeruginosa*. *Plos one*, 12(10).
- Perrin, Y. vd. 2000. Transgenic pea seeds as bioreactors for the production of a single-chain Fv fragment (scFV) antibody used in cancer diagnosis and therapy. *Molecular Breeding*, 6: 345-352.
- Pillet, S. vd. 2016. A plant-derived quadrivalent virus like particle influenza vaccine induces cross-reactive antibody and T cell response in healthy adults. *Clinical immunology*, 168: 72-87.
- Planas, D. vd. 2021. Reduced sensitivity of SARS-CoV-2 variant Delta to antibody neutralization. *Nature*: 1-7.
- Pratheesh, P. ve M. Vineetha. 2015. Genetic engineering of microalgae for production of therapeutic proteins. *Handbook of Marine Microalgae*, Elsevier: 415-427.
- Pressler, U. vd. 1986. Structural and functional properties of colicin B. *Journal of Biological Chemistry*, 261(6): 2654-2659.
- Rattanapisit, K. vd. 2020. Rapid production of SARS-CoV-2 receptor binding domain (RBD) and spike specific monoclonal antibody CR3022 in *Nicotiana benthamiana*. *Scientific reports*, 10(1): 1-11.

- Regnard, G. L. vd. 2010. High level protein expression in plants through the use of a novel autonomously replicating geminivirus shuttle vector. *Plant biotechnology journal*, 8(1): 38-46.
- Ritala, A. vd. 2020. Proceedings of ISPMF 2018-Plant Molecular Farming, Frontiers Media SA. 11: 492.
- Rosales-Mendoza, S. vd. 2010. Expression of an immunogenic F1-V fusion protein in lettuce as a plant-based vaccine against plague. *Planta*, 232: 409-416.
- Rossi, F. ve M. L. Pallotta. 2016. Bacteriocin producing cultures: a sustainable way for food safety improvement and probiotics with additional health promoting effects. *Int J Med Biol Front*, 22(1): 59.
- Rubino, S. vd. 2011. Escherichia coli (STEC) serotype O104 outbreak causing haemolytic syndrome (HUS) in Germany and France. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 5(06): 437-440.
- Sainsbury, F. vd. 2009. pEAQ: versatile expression vectors for easy and quick transient expression of heterologous proteins in plants. *Plant biotechnology journal*, 7(7): 682-693.
- Saint-Jore-Dupas, C. vd. 2007. From planta to pharma with glycosylation in the toolbox. *TRENDS in Biotechnology*, 25(7): 317-323.
- Salgado, P. R. vd. 2015. Edible films and coatings containing bioactives. *Current Opinion in Food Science*, 5: 86-92.
- Schaller, H. C. ve H. Bodenmüller. 1981. Isolation and amino acid sequence of a morphogenetic peptide from hydra. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(11): 7000-7004.
- Schillberg, S. vd. 2005. Opportunities for recombinant antigen and antibody expression in transgenic plants—technology assessment. *Vaccine*, 23(15): 1764-1769.
- Schneider, T. vd. 2018a. Plant-made Salmonella bacteriocins salmocins for control of Salmonella pathovars. *Scientific reports*, 8(1): 4078.
- Schneider, T. vd. 2018b. Plant-made Salmonella bacteriocins salmocins for control of Salmonella pathovars. *Scientific reports*, 8(1): 1-10.
- Schulz, S. vd. 2015. Broad and efficient control of major foodborne pathogenic strains of Escherichia coli by mixtures of plant-produced colicins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(40): E5454-E5460.
- Shanmugaraj, B. vd. 2021. Biotechnological insights on the expression and production of antimicrobial peptides in plants. *Molecules*, 26(13): 4032.
- Shih, S. M.-H. ve P. M. Doran. 2009. Foreign protein production using plant cell and organ cultures: advantages and limitations. *Biotechnology advances*, 27(6): 1036-1042.
- Siddiqui, A. vd. 2020. Engineering microalgae through chloroplast transformation to produce high-value industrial products. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 67(1): 30-40.

- Silva, C. C. vd. 2018. Application of bacteriocins and protective cultures in dairy food preservation. *Frontiers in microbiology*, 9: 594.
- Skarp, C. vd. 2016. Campylobacteriosis: the role of poultry meat. *Clinical Microbiology and Infection*, 22(2): 103-109.
- Song, W. vd. 2011. N-glycoproteomics in plants: perspectives and challenges. *Journal of Proteomics*, 74(8): 1463-1474.
- Song, W. vd. 2013. N-glycan occupancy of Arabidopsis N-glycoproteins. *Journal of Proteomics*, 93: 343-355.
- Stephan, A. vd. 2017. Simple Purification of Nicotiana benthamiana-Produced Recombinant Colicins: High-Yield Recovery of Purified Proteins with Minimum Alkaloid Content Supports the Suitability of the Host for Manufacturing Food Additives. *International journal of molecular sciences*, 19(1): 95.
- Strathdee, S. A. vd. 2020. Confronting antimicrobial resistance beyond the COVID-19 pandemic and the 2020 US election. *The Lancet*, 396(10257): 1050-1053.
- Streatfield, S. J. 2007. Approaches to achieve high-level heterologous protein production in plants. *Plant biotechnology journal*, 5(1): 2-15.
- Swetwivathana, A. ve W. Visessanguan. 2015. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for safety improvements of traditional Thai fermented meat and human health. *Meat science*, 109: 101-105.
- Şükrü, K. ve Ö. ZORBA. 2005. Bakteriyosinler ve gıdalarda kullanım olanakları. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 16(1): 77-83.
- Tekoah, Y. vd. 2015. Large-scale production of pharmaceutical proteins in plant cell culture—the protalix experience. *Plant biotechnology journal*, 13(8): 1199-1208.
- Telhig, S. vd. 2020. Bacteriocins to thwart bacterial resistance in gram negative bacteria. *Frontiers in microbiology*, 11: 586433.
- Thapar, P. ve M. K. Salooja. 2022. Bacteriocins: Applications in Food Preservation and Therapeutics. *Lactobacillus-A Multifunctional Genus*, IntechOpen.
- Touzé, T. vd. 2012. Colicin M, a peptidoglycan lipid-II-degrading enzyme: potential use for antibacterial means?, Portland Press Ltd.
- Tusé, D. vd. 2015. Clinical safety and immunogenicity of tumor-targeted, plant-made Id-KLH conjugate vaccines for follicular lymphoma. *BioMed research international*, 2015.
- Twyman, R. M. vd. 2005. Transgenic plants in the biopharmaceutical market. *Expert opinion on emerging drugs*, 10(1): 185-218.
- Van Boeckel, T. P. vd. 2015. Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(18): 5649-5654.
- Vitale, A. ve E. Pedrazzini. 2005. Recombinant pharmaceuticals from plants: the plant endomembrane system as bioreactor. *Molecular Interventions*, 5(4): 216.
- Wilken, L. R. ve Z. L. Nikolov. 2012. Recovery and purification of plant-made recombinant proteins. *Biotechnology advances*, 30(2): 419-433.

- Woolhouse, M. vd. 2015. Antimicrobial resistance in humans, livestock and the wider environment. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1670): 20140083.
- Xue, H. vd. 2022. qPTMplants: an integrative database of quantitative post-translational modifications in plants. *Nucleic Acids Research*, 50(D1): D1491-D1499.
- Yalçın, A. 2012. Posttranslasyonel Modifikasyon ve Protein Fonksiyonu. *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 31(1): 29-38.
- Yan, H. vd. 2021. Action mode of bacteriocin BM1829 against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Food Bioscience*, 39: 100794.
- Yang, S.-C. vd. 2014. Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Frontiers in microbiology*, 5: 241.
- Yi, Y. vd. 2022. Current status and potentiality of class II bacteriocins from lactic acid bacteria: Structure, mode of action and applications in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*.
- Zeth, K. vd. 2008. Crystal structure of colicin M, a novel phosphatase specifically imported by *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 283(37): 25324-25331.

ÖZGEÇMİŞ

MERVE ILGIN BÜYÜKSINDIR

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Doktora	Akdeniz Üniversitesi
2018-2023	Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Biyoteknoloji Programı, Antalya
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2015-2018	Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Bölümü, Antalya
Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2010-2015	Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Antalya

ESERLER

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1. Germeç M., Ilgin M., İlhan E., Turhan İ., "Optimization of acidic hydrolysis conditions of rice husk for fermentable sugar production", ENERGY SOURCES PART A-RECOVERY UTILIZATION AND ENVIRONMENTAL EFFECTS, vol.38, pp.3103-3108, 2016
2. Germeç M., Kartal F.K., Bilgic M., Ilgin M., İlhan E., Guldali H., et al., "Ethanol production from rice hull using Pichia stipitis and optimization of acid pretreatment and detoxification processes", BIOTECHNOLOGY PROGRESS, vol.32, pp.872-882, 2016
3. Yatmaz E., Karahalil E., Germeç M., Ilgin M., Turhan İ., "Controlling filamentous fungi morphology with microparticles to enhanced beta-mannanase production", BIOPROCESS AND BIOSYSTEMS ENGINEERING, vol.39, pp.1391-1399, 2016

4. Inulinase production and mathematical modeling from carob extract by using *Aspergillus niger*. Ilgin M., Germec M., TURHAN İ. BIOTECHNOLOGY PROGRESS, cilt.36, sa.1, 2020.
5. Statistical and kinetic modeling of *Aspergillus niger* inulinase fermentation from carob extract and its partial concentration. Ilgin M., Germec M., TURHAN İ. INDUSTRIAL CROPS AND PRODUCTS, cilt.156, 2020.
6. Production and Characterization of Nucleocapsid and RBD Cocktail Antigens of SARS-CoV-2 in *Nicotiana benthamiana* Plant as a Vaccine Candidate against COVID-19. Mamedov T., Yuksel D., Ilgin M., Gürbüzaslan I., Gulec B., Mammadova G., Ozdarendeli A., Yetiskin H., Kaplan B., Shaikh Terkis Islam Pavel, Uygut M. And Hasanova G. Vaccines 2021, 9(11), 1337; <https://doi.org/10.3390/vaccines9111337>, 2021.
7. Plant-Produced Glycosylated and *In Vivo* Deglycosylated Receptor Binding Domain Proteins of SARS-CoV-2 Induce Potent Neutralizing Responses in Mice. Mamedov T., Yuksel D., Ilgin M., Gurbuzaslan I., Gulec B., Yetiskin H., Uygut M., Pavel I., Ozdarendeli A., Mammadova G., Say D. and Hasanova G. Viruses 2021, 13(8), 1595; <https://doi.org/10.3390/v13081595>, 2021.
8. Engineering, production and characterization of Spike and Nucleocapsid structural proteins of SARS-CoV-2 in *Nicotiana benthamiana* as vaccine candidates against COVID-19. View ORCID. Mamedov T., Yuksel D., Ilgin M., Gürbüzaslan I., Gulec B., Mammadova G., Say D., Hasanova G.. bioRxiv 2020.12.29.424779; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.12.29.424779>.
9. Soluble Human Angiotensin- Converting Enzyme 2 as a Potential Therapeutic Tool for COVID-19 is Produced at High Levels In *Nicotiana benthamiana* Plant With Potent Anti-SARS-CoV-2 Activity. Mamedov T., Gurbuzaslan I, Yuksel D., Ilgin M., Mammadova G., Ozkul A. and Hasanova G.. ORIGINAL RESEARCH article. Front. Plant Sci., 06 December 2021. Sec. Plant Biotechnology. Volume 12-2021 <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.742875>.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

1. Yatmaz E., Turhan İ., Germeç M., Ilgin M., Karahalil E., "Filamentous Fungus Fermentation to Produce Microbial β -Mannanase in a Stirred Tank Bioreactor by Adding Microparticle Agents", International Conference "Agriculture for Life, Life for Agriculture", Bükreş, ROMANYA, 8-10 Haziran 2017, pp.28-28

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

1. Turhan İ., Germeç M., Ilgin M., Ilhan E., "Fermente edilebilir şeker üretimi için pirinç kavuzunun asidik hidroliz koşullarının optimizasyonu (Optimization of acidic hydrolysis conditions of rice husk for fermentable sugars production) ",Türkiye 12. Gıda Kongresi, Edirne, TÜRKİYE, Ekim 2016.