

Özgün Araştırma/Original Article

Peynirde ve kaymakta nisin miktarının LC-MS/MS ile belirlenmesi

Determining the amount of nisin in cheese and cream with LC-MS/MS

Ömer Şerif Aydın^{1*}, Ayşe Binnur Karataş¹, Pınar Manarga Birlik¹

¹Gıda ve Yem Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, BURSA, TÜRKİYE

(Yazar sıralamasına göre)

ORCID ID:0000-0002-9749-5972, Gıda Yük. Müh.

ORCID ID:0000-0001-7750-5427, Gıda Yük. Müh.

ORCID ID:0000-0001-8902-1796, Gıda Yük. Müh.

*Sorumlu yazar/Corresponding author: omerserif.aydin@tarimorman.gov.tr

Geliş Tarihi : 26.01.2022

Kabul Tarihi : 01.07.2022

Öz

Amaç: *Lactococcus lactis subsp. lactis* suşları tarafından üretilen nisin; çoğunlukla gram pozitif bakterilere ve bakteri sporlarına karşı etkili olan bir lantibiyotiktir. Gıdalarda kullanıldığında bakterilere olan etkilerine yönelik pek çok çalışma mevcuttur ancak Türkiye’de gıda sektörü tarafından kullanılıp kullanılmadığı, kullanılması durumunda yasal düzenlemelere uyulup uyulmadığına dair veri yoktur. Yasal mevzuat ile peynir, krema, bazı tatlılar ve işlenmiş yumurta gibi çeşitli gıdalarda bulunabilecek miktarlarına sınırlandırma getirilmiştir. Çalışmada materyal olarak peynir ve kaymak kullanılmıştır. Nisin analizinin LC-MS/MS cihazında optimizasyonu ve metot validasyonu gerçekleştirilmiştir.

Materyal ve yöntem: Ekstrakte edilen örnekler, LC/MS-MS cihazında analiz edilmiştir. Validasyon; doğrusallık, tespit limiti (LOD), ölçüm limiti (LOQ), tekrarlanabilirlik, tekrarüretilebilirlik ve geri kazanım parametreleri ile gerçekleştirilmiştir.

Tartışma ve sonuç: Nisin için doğrusallık $R^2 \geq 0,99$ olarak saptanmıştır. LOQ değeri peynir için $2,31 \text{ mg kg}^{-1}$, kaymak için $0,95 \text{ mg kg}^{-1}$; geri kazanım oranı peynirde %96,3 kaymakta %99 olarak belirlenmiştir. Ölçüm belirsizliği sırasıyla %19,35 ve %14,00 olarak hesaplanmıştır.

Anahtar kelimeler: nişin; peynir; kaymak; LC-MS/MS

Abstract

Objective: Nisin is a lantibiotic produced by some *Lactococcus lactis subsp. lactis* has an antibacterial effect. It is effective against some gram positive bacteria and bacterial spores. There are many studies on the effects on bacteria when used in foods but there isn't any data about using level in Türkiye. It is limited with legal regulations that can be found in various foods such as cheese, cream, some sweets and processed eggs. Cheese and cream are used as materials in this study. Nisin analyses are optimized by the LC-MS/MS device and validated the method.

Material and method: Samples with extraction steps were analyzed in an LC-MS/MS instrument. Validation is carried out with linearity, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), repeatability, reproducibility, recovery.

Results and conclusion: Linearity for nisin is determined as $R^2 \geq 0.99$. The LOQ value is 2.31 mg kg^{-1} for cheese, 0.95 mg kg^{-1} for cream; the recovery rate was determined as %96.3 in cheese and %99 in cream. Measurement uncertainty is calculated as %19.35 and %14.00 respectively.

Keywords: nisin; cheese; cream; LC-MS/MS

1. Giriş

Bakteri ribozomları tarafından sentezlenen, protein veya peptit yapısında olabilen ve yakın ilişkide olduğu bakteri türleri üzerinde öldürücü veya gelişmesini inhibe edici etkiye sahip olan bileşiklere bakteriyosin denmektedir (Hampikyan, 2006). Bakteriyosinler 3 ana gruba ayrılırlar. I. sınıf, molekül ağırlığı 5 kDa'dan düşük olan ve β lantiyonin içeren bakteriyosinler olup nisin bu grupta yer almaktadır. II. sınıf termostabil peptitlerden oluşmaktadır. III. sınıf ise molekül ağırlığı 30 kDa'dan büyük olan termolabil peptitlerden oluşmaktadır. Nisin bilimsel olarak çok çalışılan aynı zamanda ticari olarak üretilen bir bakteriyosindir. GRAS (Generally Recognized as Safe) olarak tanımlanıp belgelendirilmiş ve gıda tüketiminde kullanımına izin verilmiştir (Katharopoulos vd., 2016; Kördikanlıoğlu, 2014).

Nisin; peynir, krema, işlenmiş yumurta, yumurta ürünleri ve irmik gibi gıdaları mikrobiyal etkilerden korumak amacıyla kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra ekmek ve alkollü içecekler gibi gıdalara yönelik de çalışmalar olduğu bildirilmiştir (Kışla ve Ünlütürk, 2003). Nisin, protein ve yağ gibi gıda bileşenleri ile etkileşimi sonucunda aktivitesini kaybedebilir. Nisin gıdanın raf ömrünün uzamasını sağlarken, aynı zamanda gıda kaynaklı patojen riskinin ve tuz, asit ya da diğer kimyasal koruyucuların daha az kullanımını da sağlamaktadır. Ayrıca vitaminler ve diğer organoleptik özelliklerin daha iyi korunmasına yardımcı olmaktadır (Gharsallaoui vd., 2016). Sindirim enzimlerince vücutta inaktif hale gelmektedir (Ceylan ve Mol, 2015).

Hücreye etkisi farklı şekillerde olabilmektedir; bakteri hücre membranında bulunan negatif yüklü fosfolipitler ile nisin molekülünde bulunan (+) yüklü N- ve C- terminal uçları reaksiyona girerek porlar oluşturur ve böylece membran fonksiyonlarını bozar. Membran fonksiyonlarının bozulması; porlardan hücredeki aminoasitler ve adozin trifosfatın dışarı çıkması ve hücre lipozomlarında pH'nın düşmesi ile gerçekleşmektedir. Diğer bir etki mekanizması da peptidoglikan zinciri ile Lipid II molekülünün birleşmesini önlemesi ve böylece hücre duvarı sentezini durdurması şeklindedir (Breukink ve De Kruijff, 1999; Hampikyan ve Çolak, 2007). Gram negatif bakteriler; şelat ajanları, ozmotik şok, subletal ısı veya dondurma gibi işlemler kullanılarak geçirgen olmayan dış membranlarının geçirgen hale getirilmesi suretiyle nisine karşı hassaslaştırılabilirler (Delves-Broughton vd., 1996). Çalışmalar, nisinin antimikrobiyal etkisinin gıda kaynaklı olmayan bakterileri de kapsadığını

ve bakteriyel enfeksiyonlar ile kanser ve oral hastalıklara karşı biyomedikal uygulamalarda da faydalı özellikleri bulunduğunu göstermektedir (Shin vd., 2015). Nisin; gram pozitif bakteriler, patojen bakteriler ve sporlarının inhibe edilmesinde etkin bir bakteriyosin olup ayrıca çeşitli şelat ajanları, EDTA ve NaCl gibi maddelerle kombine edilerek hem gram pozitif hem de gram negatif bakterilerin inhibisyonunda da kullanılabilir (Abee vd., 1994; Hampikyan ve Çolak, 2007).

Bakteriyosine duyarlı olmayan suşların ette hızlı çoğalabilmesi ve bakteriyosine antimikrobiyal özellik kazandıran proteinlerin proteazlar tarafından inaktive edilmesi gibi dezavantajlarından dolayı et sanayinde bakteriyosinlerin kullanımı pek tercih edilmemektedir (Çayır Üstündağ ve Yalçın, 2017). Nisinin ette çözünürlüğünün azalması ve stabilitesini koruyamaması et ürünleri için süt ürünlerine kıyasla kullanımını kısıtlamaktadır. Ayrıca et ve et ürünlerinde yüksek konsantrasyonlarda kullanım gerektirdiği için ekonomik değildir (Koplay, 2012).

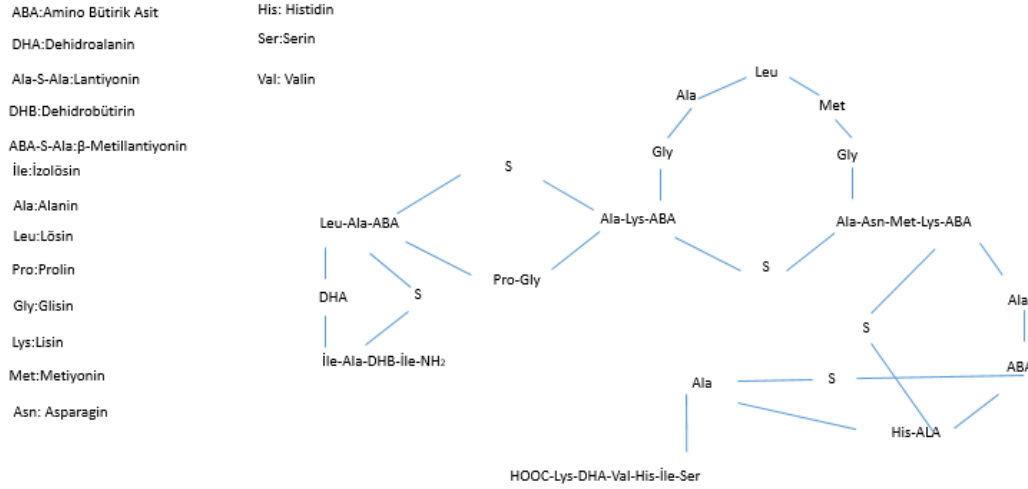
Nisin fermantasyon işlemi sonucunda peynirlerde doğal olarak da bulunabilmektedir (Güneş Altuntaş ve Ayhan, 2010). Kaymak ve peynirin mikrobiyal florası, birçok mikroorganizma için gerekli besi ortamını sağladığından çeşitlilik gösterebilmektedir. Koliform grubu, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Brucella* spp. ve *Campylobacter jejuni*, maya ve küfler peynirlerde bulunabilen mikroorganizmaların bir kısmıdır (Kaynar, 2011). Kaymakta da koliform grubu, *Staphylococcus* türleri, *Salmonella-Shigella*, maya ve küf gibi mikroorganizmalar bulunabilmektedir (Özcan Yılsay ve Bayazit, 2002).

Türk Gıda Kodeksi - Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği'ne göre gıdalarda bulunabilecek maksimum nisin miktarı; olgunlaştırılmış ve işlenmiş peynirler için 12,5 mg kg⁻¹ iken olgunlaştırılmamış peynirlerde ve kremada ise bulunmaması gerekmektedir (Anonim, 2013).

Nisin 34 adet aminoasitten oluşmakta olup, molekül ağırlığı 3,5 kDa'dır. Isıya dayanıklı olmakla birlikte (Hampikyan ve Uğur, 2007; Ko vd., 2015; Kördikanlıoğlu, 2014) aktivitesinin otoklavlandıktan sonra %40 düştüğü bildirilmiştir (Çayır Üstündağ ve Yalçın, 2017). Ayrıca kuru formda özelliklerini koruduğu bildirilmektedir. Yapısında aromatik aminoasitlerin bulunmamasından dolayı 260-280 nm dalga

boyunda ışığı absorbe etmezler. Alkali ortamda çözünürlüğü düşüktür (Kördikanlıoğlu, 2014). Rennet hariç sindirim enzimlerine hassastır.

(Hampikyan ve Çolak, 2007). Nisinin yapısı Liu ve Hansen (1990) tarafından yapılan çalışmadan uyarlanarak Şekil 1.'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Nisinin yapısı (Liu ve Hansen, 1990)

Nisinin en bilinen formu nisin A olup ticari olarak nisaplin ismi ile kullanılmaktadır (Delves-Broughton, 1996). Ticari olarak kullanımı bulunan ilk ve tek lantibiyotiktir (Field vd., 2015). İlk defa *Clostridium tyrobutyricum*'un gelişimini inhibe etmek için ticari olarak kullanılmıştır (Gharsallaoui

vd., 2016). Yapısındaki 27. aminoasidin histidin yerine asparajin olması ile nisin Z formu oluşmakta olup, ayrıca nisin F, nisin Q, nisin U, nisin H ve nisin P formları mevcuttur (Shin vd., 2015). Doğal nisin formları Çizelge 1'de Shin vd. (2015)'nin tablosundan uyarlanarak gösterilmiştir.

Çizelge 1. Doğal nisin formları (Shin vd., 2015)

Doğal Varyantlar	Aminoasit dizilimi	Orijin
Nisin A	ITSISLCTPGCKTGALMGCNMKTATCHCSIHVSK	Lc. lactis (Gross ve Morell, 1971)
Nisin Z	ITSISLCTPGCKTGALMGCNMKTATCNCSTHIVSK	Lc. lactis NIZO 22186 (Mulders vd., 1991)
Nisin F	ITSISLCTPGCKTGALMGCNMKTATCNCSTVHVS	Lc. lactis subsp. lactis F10 (DE Kwaadsteniet vd. 2008)
Nisin Q	ITSISLCTPGCKTGVLNMGCLNKTATCNCSTVHVS	Lc. lactis 61-14 (Zendo vd., 2003)
Nisin H	FTSISMCTPGCKTGALMTCNYKTATCHCSIKVSK	Streptococcus hyointestinalis (O'Connor vd., 2015)
Nisin U	ITSKSLCTPGCKTGILMTCPLKTATCGCHF	Streptococcus uberis (Wiravan vd., 2006)
Nisin U2	VTSKSLCTPGCKTGILMTCPLKTATCGCHF	Streptococcus uberis (Wiravan vd., 2006)
Nisin P	VTSKSLCTPGCKTGILMTCALKTATCGCHF	Streptococcus galloyticus subsp. pasteurianus (Zhang vd., 2012)

Bu çalışmada peynir ve kaymak örnekleri kullanılarak nisin analizinin LC-MS/MS cihazında metot optimizasyonunun gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. Peynir yapımında kullanılmaya potansiyeli bulunan bir bakteriyosinin tespiti amacıyla metot validasyonu gerçekleştirilmiştir.

2. Materyal ve yöntem

2.1. Materyal

Köy peyniri ve kaymak numuneleri ulusal marketlerden orijinal ambalajında temin edildikten

sonra validasyon çalışması için kör örnek olarak kullanılmıştır. Kör örnek çalışması 6 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Optimizasyon ile belirlenen pikin, kör örnekte bulunmadığı görülmüştür. Geri kazanım sonuçlarının AOAC limitlerine uygun olması da kör örneğin nisin içermediğinin ifadesi olarak kabul edilmiştir. Numuneler analize alınmaya kadar +4°C'de ambalajları ile muhafaza edilmiştir. Analizler 15 gün içinde tamamlanmıştır (Anonim, 2016). Analizde kullanılan standart ve kimyasalların özellikleri Çizelge 2'de belirtilmiştir.

Çizelge 2. Analizde kullanılan standart ve kimyasalların ve özellikleri

Kimyasal Adı	CAS No	Kimyasal Maddelerin Saflıkları (%)	Formül
Nisin standardı	1414-45-5	2,5	C ₁₄₃ H ₂₃₀ N ₄₂ O ₃₇ S ₇
Metanol	67-56-1	≥99	CH ₃ OH
Bovine Serum Albumin	9048-46-8	≥99	-
Trifloroasetik asit	76-05-1	>99	CF ₃ COOH
Asetonitril	75-05-8	≥99	CH ₃ CN
Asetik Asit	64-19-7	100	CH ₃ COOH
Formik asit	64-18-6	98-100	CH ₂ O ₂

Kullanılan tüm kimyasallar (Sigma-Aldrich) analitik safliktadır. 150 ppm'lik nisin stok çözeltisi; %2,5 (w/v) nisin standardından (sodyum klorür ve denatüre süttozu ile dengelenmiş, C₁₄₃H₂₃₀N₄₂O₃₇S₇, molekül ağırlığı 3354,07. CAS no. 1414-45-5, Sigma Aldrich) 300 mg tartılarak 50 mL'lik amber renkli balon jodede formik asit çözeltisi ile tamamlanarak elde edilip +4°C'de saklanmıştır. Formik asit çözeltisi, 0,41 mL formik asidin 100 mL'lik balon jojeye konulması ve su ile işaret çizgisine kadar tamamlanmasıyla hazırlanmıştır. Ara stok çözeltisi ise stok çözeltisinin bovine serum albümin (BSA) tampon çözeltisi kullanılarak 3 kat seyreltilmesi ile günlük olarak hazırlanmış ve her enjeksiyon öncesinde matriks uyumlu kalibrasyon çizilerek sonuçlar değerlendirilmiştir. BSA stok çözeltisi 10 mg BSA'nın 10 mL suda çözülmesiyle hazırlanmıştır. Daha sonra 80 mL su, 20 mL asetonitril ile karıştırılıp üzerine 0,5 mL formik asit, 0,01 mL trifloroasetik asit ve 1 ml BSA stok çözeltisi ilave edilerek yaklaşık yüzde 0,99'lük BSA tampon çözeltisi hazırlanmıştır. Kalibrasyon grafiği, nisin bulunmayan örneklerle ara stok standart çözeltisinin farklı konsantrasyonlarının (2,5, 5, 10 ve 20 mg kg⁻¹) kullanılmasıyla hazırlanmıştır.

2.2. Yöntem

Nisin analizinde, 2±0,1g örnek polipropilen tüplere tartılmış ve üzerine 10 mL %0,1 asetik asit içeren hacimce 1-9 oranındaki su-metanol karışımı eklenmiştir. Örnek 20 dk. süre ile orbital karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra +4°C de 10 dk. süreyle 5.500 devir/dk ile santrifüj (Sigma 3K15) edilmiştir. Sıvı kısım başka bir tüpe aktarılıp -18°C'de 1 saat tutulmuştur. Aynı şartlarla santrifüj gerçekleştirilip buradan 10 µl alınıp 990 µl başlangıç mobil fazı ile başka bir tüpte karıştırılmıştır. Tekrar 10 dk. süreyle 5.500 devirde santrifüj edilmiş, 0,22 µm gözenek büyüklüğündeki PTFE filtreden süzülerek viallere alınmış ve LC-MS/MS cihazı ile kantitatif olarak tayin edilmiştir. LC-MS/MS cihazı azot jeneratörü (Peak Scientific Genius 1050, UK), ikili pompa (Shimadzu AD-30, Japonya), oto örnekleyici

(Shimadzu Nexera X2 SIL-30AC, Japonya), kolon fırını (Shimadzu CTO-20AC, Japonya), kütle dedektörü (Shimadzu 8040 MSMS triple quadropole, Japonya) parçalarından oluşmaktadır. Kullanılan kolon ise Polimerik ters faz kolondur. (PLRP-S, 300A, 150 x 2 mm, 3µm, Agilent). Barnstead Nanopure Diamond saf su cihazından elde edilen deiyonize suyun rezistivite değeri >18 MΩcm'dur.

Belirtilen konsantrasyonlarda hazırlanan standartlar doğrusalılık çalışmasında kullanılmış ve kalibrasyon matriks uyumlu olarak çizilmiştir. Çalışmalar 4 farklı konsantrasyonda 2 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir (Anonim, 2002). Ölçüm limiti çalışması için; içerisinde analit tespit edilemeyen kör örneklere 2 mg kg⁻¹ konsantrasyon düzeyinden ekleme işlemi uygulanmıştır. Peynir için 10, kaymak için 10 tane bağımsız çalışma gerçekleştirilmiştir. Tekrarlanabilirlik çalışmasında 2 analist örneklere 2 farklı düzeyde işlem uygulanmış, 6'şar adet bağımsız çalışma gerçekleştirilmiş, numune hazırlama prosedürüne göre ekstraksiyon yapıp LC/MS-MS cihazıyla analizi gerçekleştirilmiştir.

Tekrarüretilebilirlik çalışmasında 2 analist, örneklere 2 farklı düzeyden katım işlemi uygulanmış, 3 farklı gün için toplam 10'ar adet farklı çalışma ile numune hazırlama yöntemine uygun olarak ekstraksiyon işlemi gerçekleştirip LC/MS-MS cihazıyla analiz edilmiştir. Nisin eklenmiş örneklerle geri kazanım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Geri kazanım çalışması; 2 farklı analist tarafından numune hazırlama prosedürüne uygun olarak 2 ayrı düzeyden ve her bir düzeyde toplamda 10 bağımsız çalışma olacak şekilde ve 3 farklı günde gerçekleştirilmiştir.

Sıvı Kromatografi (LC) Parametreleri: Mobil Faz A; 50 mL asetonitril, 450 mL su, 2,5 mL formik asit - Mobil Faz B; 400 mL asetonitril, 100 mL su, 2,5 mL formik asit şeklinde hazırlanmıştır. Gradient akışla, hızı 0,2 mL dk⁻¹ olacak şekilde çalışılmıştır. Çizelge 3'te gradient uygulama şartları belirtilmiştir. Kolon fırını sıcaklığı 30°C olup enjeksiyon hacmi peynir için 20 µl kaymak

için 5 µl'dir. Gradient akış şartları Çizelge 3'te gösterilmiştir.

Çizelge 3. Nisin analizi gradient akış mobil faz şartları

Süre (dk.)	Mobil Faz A (%)	Mobil Faz B (%)
0	85	15
1	85	15
4	65	35
9	10	90
11	85	15

Kütle Spektrometresi (MS) LC-MS/MS parametreleri Çizelge 4'te verilmiştir. Nisin tespitinde elektrosprey iyonizasyon pozitif modda kullanılmıştır.

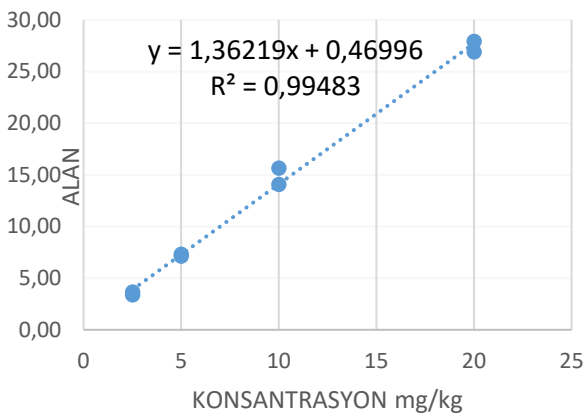
Çizelge 4. MRM moddaki LC-MS/MS değerleri

Analiz Süresi (dk.)	Ana İyon (m/z)	Ürün İyon (m/z)	Çarpışma Enerjisi	Alıkonma Süresi (dk.)	Polarite
11	671,6	86,1 ^a 110,0 ^b	-35 -43	6,5	Pozitif

^a: kantitatif ölçüm için kullanılan iyon

^b: doğrulama amaçlı kullanılan iyon

Hesaplanan standart sapmaların 3 katı LOD, 10 katı ise LOQ değeri olarak kabul edilmiştir. (Anonim, 2018a; Birlik vd., 2020). Yapılan çalışma neticesinde LOQ değeri peynir için 2,31 mg kg⁻¹ kaymak için 0,95 mg kg⁻¹ olarak tespit edilmiştir. Konsantrasyon seviyelerinin belirlenmesinde seyreltme faktörü göz önünde bulundurulmuştur.



Şekil 2. Peynirde nisin analizi doğrusallık çalışmasına ait kalibrasyon grafiği

Horwitz eşitliği kullanılarak tekrarlanabilirlik (%RSD_r) ve tekrarüretilebilirlik (%RSD_R) değerlerinin uygunluğu belirlenmiştir.

3. Bulgular ve tartışma

Konsantrasyonlara karşılık gelen cihaz sinyal düzeyiyle doğrusallık ve korelasyon katsayısı (R²) belirlenmiştir. Analit için korelasyon katsayısı (R²>0,99) sağlanmıştır. Peynirde nisin analizi doğrusallık çalışmasına ait kalibrasyon grafiği Şekil 2'de gösterilmiştir.

Çalışma sonucunda elde edilen standart sapma (S) değeri aşağıdaki formülle hesaplanmıştır:

$$S = \frac{\sqrt{\sum(X_i - \bar{x})^2}}{\sqrt{N-1}} \quad (1)$$

S: Standart sapma

X_i: Ölçüm sonuçları

\bar{x} : Ölçüm sonuçlarının ortalaması

N: Çalışma sayısı.

Tekrarlanabilirlik için %RSD_r 5,13, tekrarüretilebilirlik için %RSD_R 6,68 olarak bulunmuştur. %RSD değerlerinin uygunluk değerlendirmesi "Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü, Kimyasal ve Fiziksel Analizlerde Metot Validasyonu/Verifikasyonu Rehberi"nde bulunan kriterlere göre yapılmıştır. Bulunan tekrarlanabilirlik ve tekrarüretilebilirlik değerleri rehber kriterleri açısından uygunluk göstermektedir (Anonim, 2018a).

Geri kazanım oranı peynirde %96,3 kaymakta ise % 99,00 olarak belirlenmiştir. Şekil 3'te çalışmalar sonucunda elde edilen peynir kromatogramlarından biri örnek olarak verilmiştir. Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü, Kimyasal ve Fiziksel Analizlerde Metot Validasyonu Verifikasyonu Rehberi'nde belirtilen kriterlere göre geri kazanımda tespit edilen oranların uygunluğu değerlendirilmiştir. Geri kazanım oranı hesabı için belirtilen formül kullanılmıştır (Anonim 2018a).

$$\%GK = \frac{X - x'}{X_{katım}} \times 100 \quad (2)$$

% GK: Yüzde geri kazanım oranı

X: Katım yapılmış örneklerle yapılan analiz sonuçları ortalaması

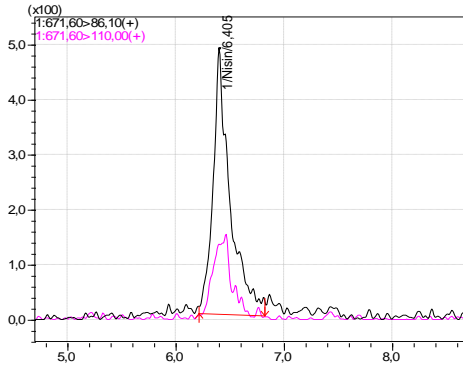
x': Katım yapılmış örneklerle yapılan analiz sonuçları ortalaması

X katım: eklenen konsantrasyon

Doğrusallık, geri kazanım, tekrarlanabilirlik, tekrarüretilebilirlik ve numune hazırlamadan gelen belirsizlikler;

$$\frac{U(X)}{X} = \sqrt{\left(\frac{U(co)}{co}\right)^2 + \left(\frac{U(RSDR)}{RSDR}\right)^2 + \left(\frac{U(RSDr)}{RSDr}\right)^2 + \left(\frac{U(gk)}{gk}\right)^2} \quad (3)$$

formülü ile birleştirilerek rölatif bileşik belirsizlik elde edilmiştir.



Şekil 3. Kör örnek içerisine 5 mg kg⁻¹ düzeyinde nisin kirletme yapılarak elde edilen LC-MS/MS kromatogramı

Genişletilmiş Ölçüm Belirsizliği = Rölatif Birleşik Belirsizlik × 2 (%95 güven aralığında, k=2) ile raporlanmıştır (Anonim, 2018b). Nisin için belirlenen genişletilmiş ölçüm belirsizliği % olarak k=2 ve %95 güven aralığında peynir için 19,35 ve kaymak için %14,00 olarak tespit edilmiştir.

DD ISO TS27106/2009 ile Molognoni vd. (2016) göre yapılan ekstraksiyon aşamaları ve buna göre oluşturulan cihaz şartları dahilinde nisin analizi gerçekleştirilmiştir. Söz konusu çalışmalar sırasında nisin ana iyon (m/z) değerinin 671,6 olduğu tespit edilmiştir ve bu sonuç DD ISO TS 27106/2009 ile Molognoni vd., (2016) sonuçları ile uyumluluk göstermektedir.

Yavru iyonlarda belirtilen çalışmalardan farklı olarak 86,1 ve 110 iyonları tespit edilmiştir. Bu duruma ekstraksiyon aşamalarının ve cihaz parametrelerinin farklı olmasının sebep olduğu düşünülmektedir. Ayrıca yavru iyonların (m/z) teyidi amacıyla piyasadan nisaplin (ticari nisin) temin edilmiş 86,1 ve 110 yavru iyonları standartta olduğu gibi nisaplinde de görülmüştür. Peynir için Molognoni vd., (2016) çalışmasında LOQ değerini 3,12 mg kg⁻¹, geri kazanım oranını %97-108, ölçüm belirsizliğini %5,24; Fuselli vd. (2012) ise çalışmasında geri kazanımı %93, metot ölçüm limitini (MQL) 0,07 olarak belirtmiştir. Çalışmamızda LOQ değeri 2,5 mg kg⁻¹, geri kazanım oranı %97,64, ölçüm belirsizliği ise %18,71 olarak tespit edilmiştir.

4. Sonuç

Verilerin uygunluk kontrolü AOAC Official Methods of Analysis Guidelines for Standard Method Performance Requirements (Appendix F)'e göre yapılmıştır ve uygun olduğu belirlenmiştir.

Nisin için doğrusallık değeri R²≥0,99 olarak tespit edilmiştir. Nisin için LOQ değeri 2,50 mg kg⁻¹ iken, LOD değeri 0,69 mg kg⁻¹ olarak belirlenmiştir. Geri kazanım oranı ise nisin için %97,79 olarak hesaplanmıştır.

Diğer taraftan nisin gıdalarda doğal olarak bulunabilmesinden dolayı, gıdalara dışarıdan katılan nisin ile doğal olarak bulunabilen nisini ayırabilecek farklı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

5. Teşekkür

Makale; TAGEM/HSGYAD/Ü/20/A3/P1/1453 projesi sonucunda yazılmıştır. Bu çalışma Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü tarafından desteklenen 'Peynirde ve Kaymakta Nisin Miktarının Belirlenmesi' isimli projenin bir parçasıdır.

6. Kaynaklar

Abee, T., Rombouts, F.M., Hugenoltzi J., Guilhard, G., and Letellier, L. (1994). Mode of action of nisin Z against *L. monocytogenes* scott a grown at high and low temperatures, *Applied and Enviromental Microbiology*, 60(6); 1962-1968.

Anonim, (2002). TS ISO 11095, Referans malzemeler kullanarak doğrusal kalibrasyon, Ankara.

Anonim, 2013 Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği, 30.06.2013 Tarih ve 28693 Sayılı Resmi Gazete.

Anonim, (2016). AOAC Official methods of analysis, guidelines for standart method performance requirements, Appendix F, p.9.

Anonim, (2018a). Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü, Kimyasal ve fiziksel analizlerde metot validasyon/verifikasyon rehberi, https://www.tarimorman.gov.tr/GKGM/Belgeler/DB_Gida_Kont/Kimyasal_Fiziksel_Val_Ver_Rehberi.pdf (Erişim: 01.04.2021).

Anonim, (2018b). Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü, Kimyasal ve fiziksel analizlerde ölçüm belirsizliği rehberi https://www.tarimorman.gov.tr/GKGM/Belgeler/DB_Gida_Kont/Kimyasal_Fiziksel_OB_Rehberi.pdf (Erişim: 01.04.2021).

- Birlik, P. M., Karataş, A.B., ve Tokat, İ.E. (2020). LC-MS/MS ile enerji içeceklerinde taurin, inositol ve glukoronolaktonun belirlenmesinde metot validasyon çalışmaları, *Gıda ve Yem Bilimi Teknolojisi Dergisi*, 23: 39-48.
- Breukink, E. and De Kruijff, B. (1999). The lantibiotic nisin a special case or not?, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1462;223-234.
- Çayır Üstündağ, H. ve Yalçın, H. (2017). Bakteriyosinler ve gıdalarda kullanımı, *MAKÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Dergisi*, 5(1);53-65.
- Ceylan, Z. ve Mol, S. (2015). Nisin ve Su Ürünleri, *Su Ürünleri Dergisi*, 32(2);115-120.
- DD ISO/TS 27106:2009, British Standarts, First Edition, 2009-12-01.
- Delves-Broughton, J., Blackburn, P., Evans, R.J., and Hugenholtz, J. (1996). Application of bacteriocin, Nisin, *Antonie van Leeuwenhoek*, 69;193-202.
- Field, Des., D Cotter, P., Ross, R.P., and Hill, C. (2015). Bioengineering of the model lantibiotic nisin, *Bioengineered*, 6:4 187-19.2.
- Fuselli, F., Guarino, C., La Mantia, A., Longo, L., Faberi, A., and Marianella, R.M. (2012). Multi-detection of preservatives in cheeses by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of chromatograph B*. 906;9-18.
- Gharsallaoui, A., Joly, C., Oulahal, N., and Degraeve, P. (2016). Nisin as a food preservative: Part 1: Physicochemical Properties, Antimicrobial Activity and Main Uses, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56:(8), 1262-1274.
- Güneş Altuntaş, E. ve Ayhan, K. (2010). Süt ve süt ürünlerinde bakteriyosin kullanımı, *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 16(1);113-120.
- Hampikyan, H. (2006). Fermente sucuklarda nisin kullanımının *Listeria monocytogenes* üzerine etkileri, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 76s. İstanbul.
- Hampikyan, H. ve Uğur, M. (2007). The effect of nisin on *L. monocytogenes* in Turkish Fermented Sausages (Sucuks), *Meat Science*, 76; 327-332.
- Hampikyan, H. ve Çolak, H. (2007). Nisin ve gıdalardaki antimikrobiyal etkisi, *TSK Koruyucu Hekimlik Bülteni*, 6(2);142-147.
- Katharopoulos, E., Touloupi, K., and Touraki, M. (2016). Monitoring of multiple bacteriocins through a developed dual extraction protocol and comparison of HPLC-DAD with Turbidometry as Thier Quantification System, *Journal of Mikrobiological Methods*, 127;123-131.
- Kaynar, P. (2011). Ülkemiz peynirleri üzerine mikrobiyolojik araştırmalar, *Türk Mikrobiyol Cem Dergisi*, 41(1);1-8.
- Kışla, D. ve Ünlütürk, A. (2003). Nisinin antimikrobiyal etkisi taze ve işlenmiş balıklarda kullanımı, *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, 20(3-4);543-550.
- Ko, K.Y., Park, S.R., Lee, C.A., and Kim, M. (2015). Analysis method for determination of Nisin A and Nisin Z in cow milk by Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, *Journal. Dairy Science.*, 98;1435-1442.
- Koplay, Z. (2012). Sığır eti raf ömrü üzerine karanfil uçucu yağı ve nisin etkisinin araştırılması, Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi-195 s. Kars.
- Kördikanlıoğlu, B. (2014). *Lactococcus lactis*'te solunumun hemin ile teşvik edildiği yarı-kesikli fermentasyon sisteminde nisin üretiminin optimizasyonu, Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 79 s. Denizli.
- Liu, W. and Hansen, J.N. (1990). Some chemical and physical properties of nisin, a small protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 56(8): 2551-2558.
- Molognoni, L., De Sa Ploencio, L.A., Valse, A.C., De Dea Lindner, J., and Daguier, H. (2016). A simple and fast method for the inspection of preservatives in cheese and cream by Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Mass Spectrometry, *Talanta*, 147;370-382.
- Özcan Yılsay, T. ve Akpınar Bayizit A. (2002). Bursa ilinde tüketilen kaymakların mikrobiyolojik özellikleri ve bazı patojen bakterilerin aranması, *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 16:77-86.
- Shin, J.M., Gwak, J.W., Kamarajan, P., Fenno, J.C., Rickard, A.H., and Kapilla, Y.L. (2015). Biomedical applications of nisin, *Journal of Applied Microbiology*, 1364-5072