

## Metabolik Mühendisliğinde Laktik Asit Bakterileri

Hülya Karaca<sup>1</sup>, Emine Dinçer<sup>2</sup>, Merih Kıvanç<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, F. Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Eskişehir

<sup>2</sup>Anadolu, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Eskişehir

### ÖZET

Gıdaların fermantasyonunda yaygın olarak kullanılan laktik asit bakterileri (LAB), basit ve kontrol edilebilir bir metabolizmaya sahiptir. Bu derlemede LAB'nin bazı karakteristik özellikleri ve bu bakterilerin fermente gıdalardaki tat ve dokuya olan katkıları metabolik yolları özetlenerek açıklanmış ve metabolik mühendisliği ile bu yolların iyileştirilmesine yönelik çalışmalar irdelenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Metabolik mühendisliği, Laktik asit bakterileri, Metabolizma

### Lactic Acid Bacteria in Metabolic Engineering

#### ABSTRACT

Lactic acid bacteria, which are widely used in food fermentation, have a simple and controllable metabolism. In this review some characteristics of LABs and their contribution to flavor and texture of fermented foods were briefly explained by presenting metabolic pathways of LABs, and studies on the improvements of these pathways by metabolic engineering were discussed.

**Key Words:** Metabolic engineering, Lactic acid bacteria, Metabolism

### GİRİŞ

Laktik asit bakterileri (LAB) endüstriyel açıdan önemli mikroorganizmalar olup, endüstriyel gıda fermantasyonlarında çeşitli şekillerde kullanılmaktadırlar. Özellikle gelişme ortamındaki karbonu metabolize etmeleri sonucu ara ürün olarak laktik asit üretmeleri, bu mikroorganizmaların gıda üretiminde kullanımının yaygınlaşmasına neden olmaktadır. LAB'nin bu özellikleri gıda hammaddelerinde asitliğin yükselmesine yol açmakta ve bu durum gıdaların raf ömrünü uzatmak açısından yararlı olmaktadır. LAB asit oluşturmalarının yanı sıra gıdalarda starter kültür olarak kullanıldıklarında tat, doku, besleyici değer gibi bazı ürün karakteristiklerine de katkıda bulunmaktadırlar [1-4]. Bu özellikleri starter kültür olarak kullanıldıkları gıdalarda, fermantasyon koşullarında metabolizmanın esas ürünü olan laktik asidi üretmelerinin yanında fermente ürünlerin tatlarına ve yapılarına katkıda bulunan asetik asit, asetaldehit, etanol, diasetil, eksopolisakkarit ve şeker alkollerini gibi diğer yan ürünleri de sentezleyebilmeleri ile ilgilidir [4-9].

Belirtilen bu özellikleri nedeni ile endüstriyel boyutta kullanılan LAB süt ürünlerinde, ürüne özel duyuusal

özelliklerini kazandırmak amacı ile kullanılmaktadırlar. Yine aynı şekilde peynir üretiminde starter kültür olarak kullanılmakta ya da birçok peynir çeşidinin starter olmayan mikroflorasında dominant mikroorganizmalar olarak bulunmaktadırlar. LAB gelişmelerinde oksijene ihtiyaç duymama, karbondioksit inhibisyonuna direnç ve tuza tolerans gibi özelliklerinden dolayı et ve et ürünlerinde buldukları gibi bitki kökenli gıdaların fermantasyonunda örneğin zeytinlerde ve turşularda; ekme ve bira gibi fermente tahıl ürünlerinin çoğunda da karşımıza çıkmaktadırlar [5, 9, 10, 11].

Karbon metabolizmaları göz önüne alındığında homofermantatif ve heterofermantatif olarak iki gruba ayrılan LAB'den homofermantatifler şekerin laktik aside hızlı bir şekilde dönüşümüne odaklanmış basit bir metabolizmaya sahiptirler. Genel habitatı yüksek oranda şeker içeren çevrelerdir. Bu şartlar altında hızlı şeker dönüşümüne izin veren ve birçok biyosentetik aktiviteden kaçınan tipik bir metabolizma geliştirmişlerdir [5, 8, 12]. Laktik asit bakterilerinin enerji ve biyosentez metabolizmaları arasında örtüşme olmadığından metabolik mühendisliği için ideal hedef organizmalardır. Bu metabolizmalar birbirini etkilemeden değişebilmektedir. Diğer bir deyişle, bu bakteri grubunun

biyosentetik kapasitesi ve metabolik değişkenliği sınırlı olup; fizyolojileri basittir ve bu da onların metabolik mühendisliğinde kullanılabilir olmalarındaki en önemli faktördür [1, 8, 13].

LAB arasında *Lactococcus lactis* fermantasyonda en çok çalışılan tür olup süt ürünlerinin üretiminde dünya çapında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu mikroorganizmanın gıda üretiminde yaygın olarak kullanımı bakteriyel fizyolojinin birçok yönünü anlamayı gerektirmektedir [6, 8]. Son yıllarda *L. lactis*' le ilgili etkili genetik kaynaklar geliştirilmekte ve bunlar süt ürünlerinin kalitesini arttırmak için farklı metabolik mühendisliği stratejileri geliştirmek amaçlı kullanılmaktadır. Bu genetik kaynaklar metabolik mühendisliği stratejilerinde kritik öneme sahip olup, arzu edilmeyen genlerin inaktivasyonunu, var olanların ya da yenilerinin fazla üretimini amaçlamaktadır [1, 3, 14].

Bu derlemede LAB'nin bazı karakteristik özellikleri ve bu bakterilerin fermente gıdalardaki tat ve dokuya olan katkıları metabolik yolları özetlenerek açıklanmaya çalışılacak ve metabolik mühendisliği ile bu yolların iyileştirilmesine yönelik çalışmalar gözden geçirilecektir.

## AROMA OLUŞUMU

Fermente süt ürünlerinde tadın geliştirilmesi karmaşık, aynı zamanda süt bileşiklerinin kimyasal ve biyokimyasal dönüşümünü içeren yavaş bir süreçtir. Gerek süt ürünleri gerekse diğer fermente gıdaların kalitesi mevcut olan tatlandırıcılar ve aromalar ile ilişkilidir. *Lactococcus lactis* spp. *lactis* ve *Lactococcus lactis* spp. *cremoris* tarafından üretilen laktik asit ve asetik asit gibi organik asitler fermente sütte arzu edilen tadı sağlamaktadır. Olgunlaşmış peynirde bulunan aroma maddeleri ise asetaldehit, diasetil, aseton ve 2-3, bütillen- glikol gibi maddeleri içermektedir. Bu aroma maddeleri *L. lactis* spp. *lactis* ve *Leuconostoc* türleri tarafından sitrattan üretilmektedirler [13-17].

Tereyağı, ayran, peynir gibi süt ürünlerinde temel aroma maddesi olan ve kimyasal olarak asetona çok benzeyen diasetil, süt fermantasyonu süresince sitrat bağımlı LAB, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* ve *Lactococcus* türleri tarafından oluşturulmaktadır [3, 8, 18]. Çeşitli LAB'de sıkça görülen diasetil üretimi ortam bileşenleri, pH ve inkübasyon sıcaklığı gibi bir çok faktöre bağlı olarak değişmektedir. Homofermantatif türler, heterofermantatif türlere nazaran daha hızlı ve daha fazla miktarda diasetil üretmektedirler [5, 19]. Yapılan son çalışmalar diasetilin, metabolik ara ürün olan  $\alpha$ -asetolaktatın oksidatif dekarboksilasyonu sonucu oluştuğunu göstermektedir.  $\alpha$ -asetolaktat 2 molekül pürivatın;  $\alpha$ -asetolaktat sentetazın aktivitesi ile üretilmektedir. Ancak, bu enzimin pürivata düşük ilgi göstermesi nedeniyle reaksiyon sadece pürivat fazlası ortamda gerçekleşmektedir. Daha sonra  $\alpha$ -asetolaktat

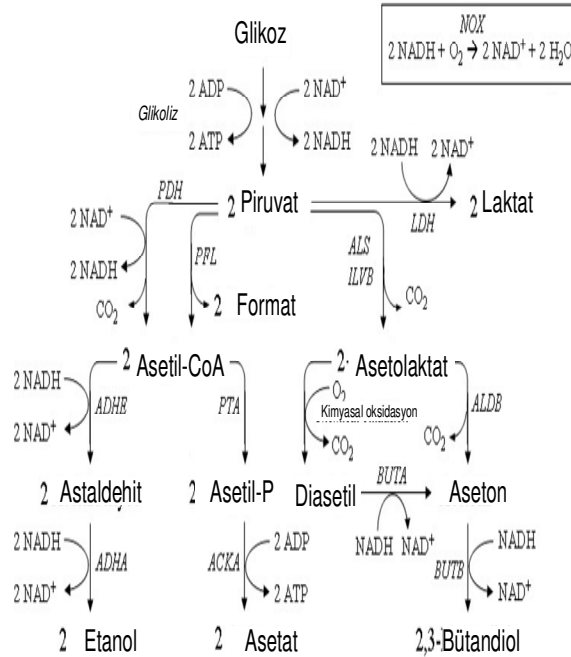
$\alpha$ -asetolaktat dekarboksilaz (ALDB) ile asetona dekarboksillenmektedir. ALDB eksik suşlarda,  $\alpha$ -asetolaktat birikmekte ve oksijen varlığında kimyasal olarak diasetile dönüştürülmektedir [1, 8, 13, 17, 18] (Şekil 1).

İndirgenmiş şeker metabolizmalarında, örneğin galaktoz gibi şeker substratlarının bulunduğu ortamda, yüksek miktarda oksijenin bulunduğu ve şekerin sınırlı olduğu durumlarda son ürünler fazla miktarda üretilmektedir. Yapılan gözlemler laktat dehidrogenaz (LDH) enziminin komple yıkımı veya inhibisyonunun metabolik akışın yeniden yönlendirilebileceği fikrini ortaya koymaktadır. Bu bilginin ışığında LAB'nde ve özellikle *Lactococcus lactis*'de *ldh* geninin yıkılması sonucu asetik asit, formik asit, aseton ve etanolün oluştuğu gözlenmektedir [1, 5, 8]. LDH yıkımına benzer bir sonuç alternatif bir yaklaşım olan NADH oksidasyonu ile elde edilmektedir. Laktik asit bakterilerinin kuvvetli havalandırılmaları sonucu asetik asit, aseton gibi alternatif metabolit ürünlerin oluştuğu gözlenmektedir. Bu bilgi kullanılarak, etkili metabolik mühendisliği stratejileri geliştirilmekte ve NADH oksidazın (NOX) fazla üretimi sağlanmaktadır. NOX'i fazla üreten bakteri suşunda LDH – negatif suşta olduğu gibi aseton ve asetik asit üretiminde artış gözlenmektedir. Bu çalışmalar ışığında ve diasetil üretim mekanizmasının bilinmesi ve metabolik akışın yeniden yönlendirilebilmesi sayesinde, metabolik mühendisliği çalışmaları sonucu *L. lactis* tarafından diasetil üretilmesi ile ilgili etkili stratejiler geliştirilmektedir. Yapılan metabolik çalışmalar LDH yıkımı veya NOX'in aşırı üretiminin ALDB'nin yıkımı ile kombinasyonun yüksek diasetil üretimi ile sonuçlandığına işaret etmektedir. İki genin yıkımının kombinasyonu teknik olarak oldukça karışık olduğundan NOX üretimi ve ALDB yıkım kombinasyonu tercih edilmektedir [1, 5, 8, 13, 20].

## DÜŞÜK KALORİLİ TATLANDIRICILARIN ÜRETİMİ

Şeker alkollerini poliol sınıfına ait karbonil şekerleri olup kendileri ile ilişkili birincil ya da ikincil hidroksil gruplarına indirgenirler. Şekerlere benzerlik gösterirler ve gıdaların besinsel profillerini iyileştirmek amacıyla kullanılırlar, düşük enerjili glisemik indeks ve insülin yanıtı oluştururlar. Doğal olarak meyve ve sebzelerde bulunurlar, aynı zamanda mikroorganizmalar tarafından da üretilmektedirler [15].

Şeker alkollerinden ksilitol, beş karbonlu olup ksiloz indirgenmesinden elde edilmektedir. Ksilitol mikroorganizmalar tarafından yoğun olarak üretildiğinden ve metabolik mühendisliği çalışmalarında kullanılabilir olduğundan, en çok rağbet gören şeker alkolüdür. Glikozun karbon kaynağı olarak kullanıldığı çalışmalarda ksiloz redüktazı kodlayan gen *Pichia stipitis*'den *L. lactis*'e aktarılarak ksilozdan ksilitol üretilmiştir [15, 27].



Şekil 1. Laktik asit bakterilerinde karbon metabolizması

Bir diğer şeker alkolü D-mannitol altı karbonlu olup klinik uygulamalarda ve tatlandırıcı olarak kullanılmaktadır. Bakterilerden ve bitkilerden elde edilmektedir. Mannitol glikozla kıyaslanabilecek kadar iyi bir tatlandırıcı olup; laktozun dönüşümü tadı çok arttırmamasına rağmen mannitol fermente ürünlerin tadını arttırmaktadır. Aynı zamanda kalorilerin indirgenmesini de sağlamaktadır. Yapılan çalışmalarda NICE sistemi (*L. lactis* tarafından üretilen, antimikrobiyal bir bileşik olan nisin'e dayalı gen aktarım sistemidir ve bu gen aktarım sistemi ile diğer genlerin kontrolü yapılmaktadır) kullanılarak mannitol-fosfat-dehidrogenazın fazla üretimi ile mannitol üretimi de artırılmıştır. Yine mannitol-1-fosfataz *Elimeria tenella*'dan *L.lactis*'e aktarılmış ve mannitol üretimi iyileştirilmeye çalışılmıştır [5, 15].

LAB'den *Lactobacillus plantarum* tarafından üretilen altı karbonlu şeker alkolü sorbitol fermentasyon ürünü olmayıp gelişim için şeker substratı olarak kullanılmaktadır. Sorbitol dehidrogenaz kodlayan genin fazla üretiminin yapıldığı suşlarda şekerin yaklaşık %50'si sorbitole dönüştürülmüştür [5, 15].

Yukarıda verilen örnekler LAB'lerin birincil metabolizmaları için verilen örnekler olup, aynı zamanda onların ikincil metabolizmalarının yeniden yönlendirilmesi için de benzer stratejiler kullanılmaktadır.

### EKZOPOLİSAKKARİT ÜRETİMİ

Ekzopolisakkaritler (EPS) dallanmış tekrarlı şeker birimlerini ve şeker türevlerini içeren uzun zincirli polisakkaritlerdir. Çeşitli mikroorganizmalar tarafından üretilmekte olan bu bileşikler laktik asit grubuna dahil olan bir çok mikroorganizma tarafından üretilmektedir. LAB GRAS (genellikle güvenli kabul edilen) statüsünde

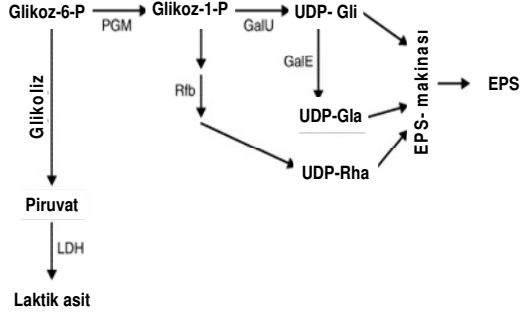
bakteriler olup; bu bakteriler tarafından üretilen EPS'ler de GRAS olarak kabul edilmektedir [1, 21]. Farklı LAB'den üretilen EPS'lerin kompozisyonları, üç boyutlu yapıları, sertlik, biyokimyasal ve biyofiziksel özellikleri, şeker bağları, polimer uzunluğu, şeker içerikleri, polimer dallanmaları, proteinlerle ilişkileri de birbirinden farklıdır [3, 21].

Mikrobiyal kaynaklardan elde edilen EPS'ler homopolisakkaritler ve heteropolisakkaritler olmak üzere iki gruba sınıflandırılmaktadır. Homopolisakkaritler bir tip monosakkaritin tekrarlanan birimlerini içermekte olup glukanlar ve fruktanlar olmak üzere 2 büyük gruba ayrılmaktadır. *Leuconostoc mesenteroides* gibi bazı mikroorganizmalar tarafından üretilmektedirler [15, 21]. Heteropolisakkaritler ise oligosakkaritlerin çoklu kopyalarından yapılmış olup her bir tekrarlı birimde iki ya da daha farklı monosakkarit ihtiva etmekte ve *L. lactis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* gibi birçok LAB tarafından üretilmektedirler [21].

Genel olarak tüketicilerin isteği düşük şeker ve yağ içerikli ve az miktarda ek katkı maddesi içeren düşük maliyetli ürünlerdir. Bu nedenle, LAB'ye ait EPS uygulanabilir alternatif olup özel tadı olmayan fermente süt ürünlerinin kıvamlarını, yapılarını iyileştirmek amacıyla kullanılabilir. EPS aynı zamanda süt ürünlerinin raf ömrünü arttıran bir bileşiktir. Probiyotik olarak aktif olan bu bileşiklerin tümör oluşumunu engelleyici, bağışıklık sistemini destekleyici ve kan kolesterolünü düşürücü özellikleri de bulunmaktadır [1, 3, 21, 22].

EPS üretimi biyosentetik yolun sonucu olup enerji üreten bir yol değildir. Glikoliz reaksiyonları ile yakından

ilişkilidir [8]. Katabolik ve anabolik yolun ayrılmasında önemli rol oynayan fosfoglukomutaz (PGM) enzimi Glikoz-6P'nin glikoz-1P'ya dönüşümünü katalizlemektedir. EPS biyosentezinde merkezi ara ürün olan Glikoz-1P şeker nükleotitleri; UDP-Glikoz, UDP-Galaktoz ve dTDP-Rhamnoz'a dönüşmektedir. Glikoz-1P'dan UDP-Glu sentezi GalU tarafından, UDP-Glu'dan UDP galaktoz sentezi GalE tarafından ve Glikoz-1P'dan dTDP-Rha sentezi Rfb tarafından katalizlenmektedir. GalU tarafından katalizlenen UDP-Glu sentezi EPS üretiminde önemli bir kontrol noktasıdır [3, 1, 8, 21] (Şekil 2).



Şekil 2. *L. lactis* de EPS biyosentetik yolu

LAB tarafından üretilen EPS'nin üretim seviyesi düşük olduğundan, üretim seviyesini sınırlayan faktörleri belirlemek önemlidir. EPS genetiği, biyolojik farklılıklar, biyosentetik yollar, metabolik modeller ve fizikleri hakkındaki bilgiler EPS üretimini ve kompozisyonunu modifiye etmek amacıyla metabolik mühendisliği çalışmalarında kullanılmaktadır. Bununla birlikte LAB'den metabolik mühendisliği yolu ile farklı EPS üretimi için açık ve kesin temel prensipler bulunmamaktadır [3, 21, 22].

Spesifik EPS genleri büyük plazmitler ile kodlanmakta ve bir laktokokal suştan diğerine konjugasyonla transfer edilmektedirler. En iyi karakterize edilen laktokokal EPS plazmiti NIZO B<sub>40</sub>'dir. Yapılan çalışmalarla enzim kodlayan genler (*galU*, *galE* ve *rfaABCD*) klonlanmakta, aktiviteleri NICE sistemi kullanılarak değiştirilmeye çalışılmakta ve bu yolla *L. lactis* deki şeker nükleotit seviyesindeki değişimin EPS üretimindeki rolü değerlendirilmektedir [1, 3].

Boels ve ark. [3] NICE sistemini kullanılarak *Escherichia coli* α-pgm genini *L. lactis*'e aktarmışlar ve fosfoglukomutaz enzim seviyesindeki değişim ile UDP glikoz ve UDP galaktozun hücre içi miktarında önemli miktarda artış gözlemişlerdir. Ara ürün miktarında ciddi bir artış olmasına rağmen *L. lactis* NIZO B<sub>40</sub>'da EPS üretim seviyesi değişmemiştir.

*galU* Aktivite değişiminin *L. lactis* NIZO B<sub>40</sub> EPS üretim seviyesine ve şeker nükleotit biyosentezi üzerine etkisini belirlemek için *galU* üretim seviyesi 20 kez artırılmış ve

sonuç olarak UDP glikoz ve UDP galaktozun hücre içi seviyesinde güçlü bir artış gözlenmiştir. Ancak dTDP rhamnoz seviyesi ise *rfa* geninin aşırı üretimi ile sadece iki katına çıkarılmıştır [1, 3, 22].

*L. lactis* NIZO B<sub>40</sub> *galE* mutant suşunda EPS biyosentezi değerlendirilmiş ve glikozun tek karbon kaynağı olarak bulunduğu ortamda *galE* mutant hücrelerde EPS biyosentezi gerçekleşmezken, ortama galaktozun eklenmesi ile yeniden düzenlendiği görülmüştür. Bu sonuç *galE* nin glikozdan UDP-galaktozun sentezlenmesinde kritik rol oynadığını işaret etmektedir [3, 22].

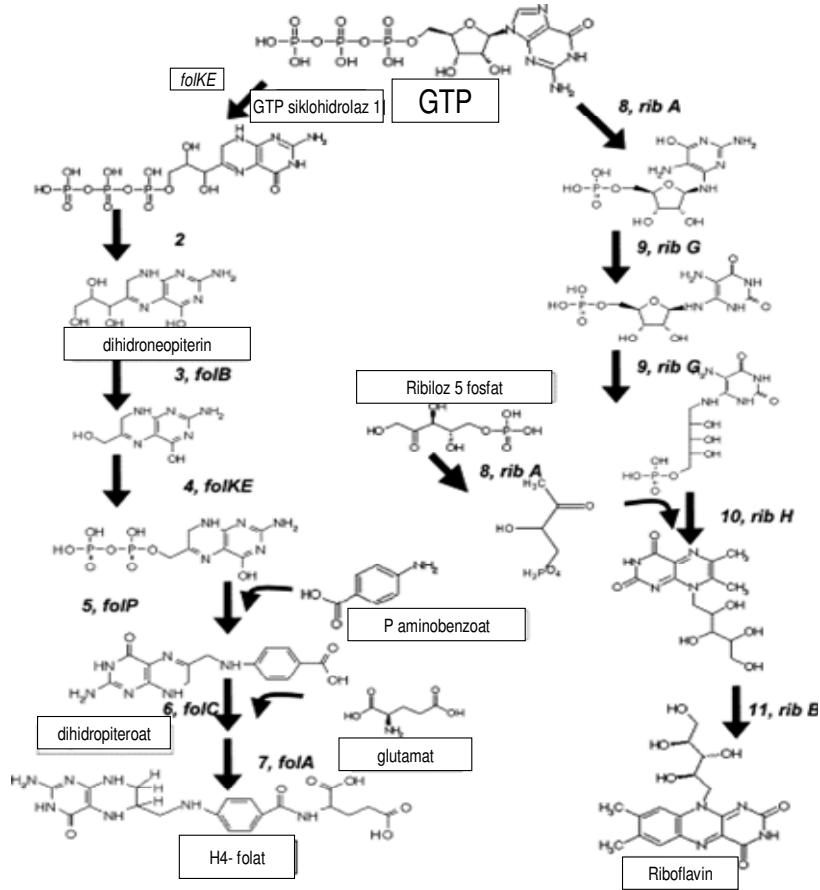
*L. lactis*'in gelişme ortamı fruktoz ise EPS üretimi glikoz ve laktozunkine oranla daha düşüktür. Bu ise fruktoz-1-fosfatazin (*fbf*) düşük aktivitesinin sonucudur. *L. lactis*'de NICE sistemi ile *fbp* gen ürününün aşırı üretimi ile nükleotit şekerlerinin hücre içi seviyesi artmakta, bununla birlikte gelişim daha hızlı olduğu gibi EPS miktarında da artış görülmektedir [8].

## VİTAMİN ÜRETİMİ

Metabolik mühendisliğinin diğer bir hedefi LAB'nin ikincil metabolizmalarından olan vitamin üretimidir. İnsan beslenmesinde temel B vitaminlerinden olan folat, riboflavin ve B12 yaşamsal metabolik aktivitelerde (aminoasit ve nükleik asit biyosentezi) kofaktör olarak üretilmektedirler [5, 14, 23] Vitamin eksikliği tüm dünya da; özellikle yaşlı insanlarda ve büyümekte olan gençlerde karşılaşılan bir problemdir. Birçok LAB bu vitaminleri üretmekte ve bakteriyel üretim sonucu fermente ürünler bu vitaminlerce zenginleşmektedir [1].

B vitaminlerinden folat; çok sayıdaki folik asit türevlerinin genel adıdır, bu türevler oksidasyon durumu, petridin zincirindeki tek karbonun yeri ve poliglutamat kuyruğunun uzunluğu ile farklılık göstermekte; nükleotidlerin, DNA ve RNA ların yapı taşlarının biyosentezi gibi birçok metabolik reaksiyonda kofaktör olarak görev yapmaktadır. Folat aynı zamanda bazı kanser türlerine karşı koruyucu olarak kullanılmakta olup kronik hastalıklar, mental bozukluklar ve psikiyatrik hastalık tablosunun düşük folat seviyesi ile ilişkili olduğu bilinmektedir [ 3, 5, 14, 23]. Sebzeler, süt ürünleri ve diğer fermente ürünlerle karşılaştırıldığında bakteriler folatı az miktarda depolamaktadırlar. Folatı zenginleştirmek amaçlı kullanılan metabolik mühendisliği stratejileri vitamin biyosentezini arttırmaya yöneliktir [ 14, 3 ].

Folat biyosentezi çoklu enzim yolu içermektedir ve öncül molekül GTP'dir. Folat sentezinde görevli olan genler *L. lactis* MG1363 de karakterize edilmiş ve NICE sistemi kullanılarak üretilmiştir. GTP- siklohidrolaz 1 enziminin fazla üretimi ile toplam folat üretimi 3 katına çıkarılmıştır (Şekil 3) [ 5, 1, 14 ]



Şekil 3. Folat ve riboflavin sentez yolu [23]

Sybesma ve ark. [5] tarafından yapılan çalışma sonucu GTP-siklohidroksilazı kodlayan *gch* geninin aşırı üretimi ile folat üretimi 2-3 kez artırılırken, dihidroredüktaz kodlayan son gen *folA*'nın aşırı üretimi ile folat üretimi iki kez indirgenmiştir. Yapılan başka bir çalışma ile *folA* hariç diğer tüm folat genlerinin aşırı üretimi sonucu folatın beklenmeyen derecede çok üretildiği gözlenmiştir.

*L. lactis* MG1363 suşu tarafından üretilen toplam folat miktarı yaklaşık 100 ng/mL olup bunun %90'ı hücre içinde birikirken yalnızca %10'u çevreye verilmektedir. Yapılan çalışmada; sıçan veya insan kaynaklı  $\gamma$ -glutamil hirolaz enzimini kodlayan cDNA klonları NICE sistemi kullanılarak *L. lactis*'e ekspres edilmiş ve üretilen *L. lactis*'in uzaysal dağılımının ters döndüğü görülmüştür. Bunun sonucunda ise folat hücre dışına salınmaya başlanmıştır [3, 5].

Bir diğer B vitamini riboflavin; hücre metabolizmanın temel bileşiği olup, karbonhidratların enzimatik oksidasyonunda gerekli olan FMN ve FAD'ın öncüsüdür. Birçok mikroorganizma, bitki ve fungus riboflavin sentezleme yeteneğindedir. İnsanlar bunları sentezleyemediklerinden besinlerden almaktadırlar. İnsanda riboflavin eksikliği saç kaybı, deri iltihaplanmaları, görme bozuklukları, gelişim bozukluklarına sebep olmaktadır [23-25].

Folat gibi riboflavin sentezinde de öncül molekül GTP olup başlangıç aşaması da benzer enzim GTP siklohidrolaz II tarafından katalizlenmektedir. Riboflavinin fazla üretimi için metabolik mühendisliği çalışmaları ile GTP siklohidrolaz II geni NICE sistemi kullanılarak fazla miktarda üretilmiş, riboflavin üretiminin 3 katına çıktığı gözlenmiştir. Riboflavinin toksik analogu olan roseoflavine karşı dirençli mutant suşlar geliştirmek *L. lactis*'de riboflavinin fazla üretimi için seçilen bir başka yoldur. Roseoflavin birçok bakteri için toksik olup, riboflavine çok benzer ve aynı şekilde alınır, fakat kofaktör aktivitesi yoktur. *L. lactis*'in roseoflavine direnç için seçtiği yol riboflavinin fazla üretimidir [1, 5, 24, 26].

Riboflavinin yüksek miktarda üretimi için biyosentezinden sorumlu 4 gen (*ribG*, *ribB*, *ribA*, *ribH*) farklı LAB'lerde farklı şekillerde aktif olup, NICE sistemi kullanılarak *rib* genleri *L. lactis*'te yüksek oranlarda üretilmiş ve riboflavinin yüksek miktarda üretimi için bu genlerden sadece birinin değil hepsinin aynı anda fazla üretimine gerekli olduğu bildirilmiştir [3, 24, 25] (Şekil 3).

B<sub>12</sub> vitamini (kobalamin) ile ilgili bilgi sınırlı olup, kimyasal olarak sentezlenememektedir, bitki hücrelerinde bulunmaz ve sadece bir kaç bakteri tarafından üretilmektedir. *Lactobacillus reuteri* kobalamin

üreten tek laktik asit bakterisi olup, B<sub>12</sub> sentez yolu oldukça karışıktır ve 25 dönüşüm basamağı 25 farklı enzim tarafından katalizlenmektedir. “Metabolik mühendisliği kullanılarak B<sub>12</sub> üretimi artırılabilir mi?” sorusuna henüz net cevap verilememektedir. Üretimi arttırmak amacı ile hangi genin hedefleneceği belirlenememiştir [1, 5].

## SONUÇ

LAB metabolik mühendisliği için uygun mikroorganizmalar olup, etkili metabolik mühendisliği çalışmaları ile LAB’de metabolik akış yönlendirilebilmektedir. Bu strateji ile bazı metabolitler yüksek miktarda üretilirken diğer taraftan bazıları ise az miktarda üretilmekte ya da hiç üretilmemektedir. Tatlandırıcılar, EPS ve vitaminlerin etkili üretimi için farklı LAB üzerinde çalışılmaktadır. LAB’nin metabolik mühendisliği çalışmalarında etkili bir şekilde kullanılmalarının sebebi, bu bakterilerin basit olması ve genetik çeşitliliğinin olmamasıdır. LAB’nin bu özelliği spesifik enzim aktivitesinin yıkılması gereken durumlarda büyük avantaj sağlamaktadır. Şimdiye kadar LAB’ye uygulanan birçok metabolik mühendisliği stratejisi birincil metabolizma ile ilişkili olup, laktokokal pürivat metabolizmasının yönünü değiştirmesine dayanmaktadır. Metabolik mühendisliği çalışmaları dahilinde daha kompleks olan ikinci yol ise sekonder metabolizma ile ilgili olup EPS ve vitamin üretimini içermektedir. Etkili metabolik mühendisliği çalışmaları metabolik akışın iyi bilinmesini ve genlerin iyi anlaşılmasını gerektirmektedir.

## KAYNAKLAR

- [1] Kleerebezem, M., Hugenholtz, J., 2003. Metabolic pathway engineering in lactic acid bacteria. *Current Opinion in Biotechnology* 14: 232-237.
- [2] Coşkun, F., 2006. Gıdalarda bulunan doğal koruyucular. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi* 2: 27-33.
- [3] Kleerebezem, M., Boels, I. C., Groot, M. N., Mierau, I., Sybesma, W., Hugenholtz, J., 2002. Metabolic engineering of *Lactococcus lactis*: the impact of genomics and metabolic modelling. *Journal of Biotechnology* 98: 199-213.
- [4] Hylckama, Vlieg van J. E. T., Hugenholtz, J., 2007. Mining natural diversity of lactic acid bacteria for flavour and health benefits. *International Dairy Journal* 17: 1290-1297.
- [5] Hugenholtz, J., 2008. The lactic acid bacterium as a cell factory for food ingredient production. *International Dairy Journal* 18: 466-475.
- [6] Bolotin, A., Wincker, P., Mauger, S., Jaillon, O., Malarme, K., Weissenbach, J., Ehrlich, S. D., Sorokin, A., 2001. *Genome Research* 11: 731-753.
- [7] Gürsoy, O., Kınık, O., 2005. Laktobasiller ve probiyotik peynir üretiminde kullanım potansiyelleri. *Mühendislik Bilimleri Dergisi* 12: 105-116.
- [8] Hugenholtz, J., Kleerebezem, M., 1999. Metabolic engineering of lactic acid bacteria: overview of the approaches and result of pathway rerouting involved in food fermentations. *Current Opinion in Biotechnology* 10: 492-497.
- [9] Caplice, E., Fitzgerald, G. F., 1999. Food fermentations: Role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology* 50: 131-149.
- [10] Lücke, F. K., 1996. Lactic acid bacteria involved in food fermentations and their present and future uses in food industry. NATO ASI Series, Series H: Cell Biology, New York 98: 81-99.
- [11] Egan, A. F., 1983. Lactic acid bacteria of meat and meat products. *Antonie van Leeuwenhoek* 49: 327-336.
- [12] Hols, P., Kleerebezem, M., Schanck, A. N., Ferain, T., Hugenholtz, J., Delcour, J., Vos de W. M., 1999. Conversion of *Lactococcus lactis* from homoalactic to homoalanine fermentation through metabolic engineering. *Nature Biotechnology* 17: 588-592.
- [13] Monnet, C., Aymes, F., Corrieu, G., 2000. Diacetyl and alfa-acetolactate overproduction by *Lactococcus lactis subsp. lactis* biovar diacetylactis mutants that are deficient in alfa-acetolactat decarboxylase and have a low lactate dehydrogenase activity. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 5518-5520.
- [14] Sybesma, W., Starrenburg, M., Kleerebezem, M., Mierau, I., Vos de W. M., Hugenholtz, J. 2003. Increased production of folate by metabolic engineering of *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 3069-3076.
- [15] Akinterinwa, O., Khankal, R., Carmen Cirino, P., 2008. Metabolic engineering for bioproduction of sugar alcohols. *Current Opinion in Biotechnology* 19: 461-467.
- [16] Kranenburg, van R., Kleerebezem, M., Hylckama, Vlieg van J., Ursing, B. M., Boekhorst, J., Simit, B. A., Ayad, E. H. E., Simit, G., Siezen, R. J. 2001. Flavour formation from amino acids by lactic acid bacteria predictions from genome sequence analysis. *International Dairy Journal* 12: 111-121.
- [17] Bartowsky, E. J., Henschke, P. A., 2004. The ‘buttery’ attribute of wine—diacetyl—desirability, spoilage and beyond. *International of Food Microbiology* 96: 235-252.
- [18] Platteeuw, C., Hugenholtz, J., Starrenburg, M., Alen-Boerrigter van I. Vos de W. M., 1995. Metabolic Engineering of *Lactococcus lactis* influence of the overproduction of alfa-acetolactate synthase in strains deficient in lactate dehydrogenase as a function of culture conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 3967-3971.
- [19] Christensen, M. D., Pederson, C. S., 1958. Factors affecting diacetyl production by lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 6: 316-318.
- [20] Lopez de Felipe, F., Kleerebezem, M., Vos de W. M., Hugenholtz, J., 1998. Cofactor engineering a novel approach to metabolic engineering in *Lactococcus lactis* by controlled expression of NADH oxidase. *Journal of Bacteriology* 180: 3804-3808.
- [21] Welman, A. D., Maddox, S., 2003. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. *Trends in Biotechnology* 21: 269-274.

- [22] Kleerebezem, M., Kranenburg van, R., Tuinier, R., Boels, I. C., Zoon, P., Looijesteijn, E., Hugenholtz, J., Vos de W. M., 1999. Exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*: from genetic engineering to improved rheological properties. *Antonie van Leeuwenhoek* 76: 357-365.
- [23] Sybesma, W., Burgess, C., Starrenburg, M., Sinderen van, D., Hugenholtz, J., 2003. Multivitamin production in *Lactococcus lactis* using metabolic engineering. *Metabolic Engineering* 6: 109-115.
- [24] Burgess, C., O2 Connell- Motherway, M., Sybesma, W., Hugenholtz J., Sinderen van, D., 2004. Riboflavin production in *Lactococcus lactis*: potential for in situ production of vitamin-enriched foods. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 5769 - 5777.
- [25] LeBlanc, J. G., Burgess, C., Sesma, F., Giori de, G. S., Sinderen van, D., 2005. Ingestion of milk fermented by genetically modified *Lactococcus lactis* improves the riboflavin status of deficient rats. *American Dairy Science Association* 88: 3435-3442.
- [26] Fischer, M., Bacher, A., 2008. Biosynthesis of vitamin B<sub>2</sub> : structure and mechanism of riboflavin synthase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 474: 252-265.
- [27] Akinterinwa, O., Cirino, P. C., 2008. Heterologous expression of D-xylulokinase from *Pichia stipitis* enables high levels of xylitol production by engineered *Escherichia coli* growing on xylose. *Metabolic Engineering* 11: 48-55.
- 
-