

Çeşitli kaynaklardan izole edilen bazı mikroorganizmaların sistein üretim kapasitelerinin belirlenmesi

Ertan Ermiş^{a,*}, Cihat Güner^{a*}, Ayşenur Erman^a

^a Istanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Halkalı Cad No:2, 34303, İstanbul, Türkiye

YAYIN BİLGİSİ

Yayın geçmişi:

Gönderilen tarih: 31 Ekim 2018

Kabul tarihi: 06 Mart 2019

Anahtar kelimeler:

Bakteriler

mikrobiyal sistein üretimi

moleküler karakterizasyon

ÖZET

Bu çalışmada, çeşitli kaynaklardan (toprak ve çeşitli peynirler) izole edilen mikroorganizmaların sistein üretme kapasitelerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla toplamda 9 farklı kaynaktan 262 bakteri izole edildi; bunların ürettiği besiyeri ortamlarının hepsinde değişen oranlarda sistein varlığı tespit edildi. Bakterilerin sistein üretme kapasitesi (0.452-1.855 g/L aralığında), Nurtient Broth kullanılarak 37 °C'de 72 saat fermantasyon işlemi sonucunda spektrofotometrik yöntemle belirlendi. Sistein, serin ve metionin amino asitlerinin FTIR karakterizasyonu yapıldı ve ayrıca değişen konsantrasyonlarda sistein içeren sulu çözeltilerinin FTIR spektrumları incelendi. Elde edilen spektrumlara göre, sistein konsantrasyonuna bağlı olarak band yoğunlukların farklılaştığı sonucuna varıldı.

ABSTRACT

In this study, it was aimed to determine the cysteine production capacity of microorganisms isolated from various sources (soil and various types of cheese). For this purpose, 262 bacteria were isolated from 9 different sources. Cysteine was present in varied concentrations (0.452-1.855 g/L) in all of the liquid media. The cysteine concentration was determined by spectrophotometric method after fermentation process using Nurtient Broth at 37 °C for 72 hours. FTIR characterization of the cysteine, serine and methionine amino acids was performed, and also the FTIR spectra of aqueous solutions containing cysteine at varying concentrations were examined to evaluate the differences in spectrums. According to the spectrums obtained, it was concluded that the peak intensities were changed based on the concentration of cysteine.

1. Giriş

Sistein, yirmi doğal amino asitten birisidir. Yapısında kükürt atomu bulunan bu aminoasit, insan vücudu için gereklidir. Günümüzde gıda, ilaç ve kişisel bakım endüstrilerinde yoğun olarak kullanılmaktadır (Fernando, 2006). E920 kodu ile anılan Sistein, gıda sanayinde özellikle ekmek başta olmak üzere bazı unlu mamullerin kalitesinin iyileştirilmesinde kullanılabilir. Ülkemiz Sistein ve benzeri çoğu gıda katkı maddelerinin temininde dışa bağımlıdır (Karaali ve Özçelik, 1993). Geleneksel olarak, endüstriyel L-sistein üretimi, esas olarak insan veya hayvan kıllarının asit veya alkali hidrolizi sonucunda elde edilir (Gortner ve Hoffman, 1925; Hashim, Ismail, Jamal, Othman, ve Salleh, 2014). L-Sistein, hem biyolojik hem ticari olarak çok önemli bir amino asittir. Çoğu amino asit ticari olarak fermentasyon ile üretilmesine rağmen, sistein esas olarak proteinlerin hidrolizi

ile üretilir (Hashim vd., 2014).

Sistein genellikle ucuz olan hayvan proteinlerinden (deri, tüy, tırnak vb) elde edilmektedir. Bunun yanında mikrobiyal kaynaklardan üretimi de mümkün olabilmektedir (Ali, Shakoori, ve Shakoori, 2011). Ancak bu konuda yapılan çalışmalar yok denecek kadar azdır. Hayvansal kaynaklardan sistein üretiminde hayvanın cinsine ve kesim yöntemine bağlı olarak helal veya mekruh olup olmama konusu söz konusu olmaktadır (Dhillon, Nagasawa, ve Yamada, 1987; Ermis, 2017). Bu gıda katkı maddesinin yurt dışında üretiliyor olması, üretim proseslerinin ve kullanılan hammaddelerin kontrolünü zorlaştırmaktadır. Bu nedenle bu çalışma kapsamında hem dışa bağımlılığın azaltılması hem de helal üretim yollarının belirlenmesi için mikroorganizmalardan Sistein üretiminin araştırılması düşünülmüştür. Mikrobiyal sistein üretimi yapan firmaların tamamı yurt dışı kaynaklı olup patentli mikroorganizmalar ile üretim yapmaktadır. Bu durum

*Sorumlu yazar/Corresponding author.

E-mail address: ertan.ermis@gmail.com, chtgner@gmail.com

ise Sistein konusunda dışa bağımlı kalmamıza sebep olmaktadır.

Fourier dönüşümü kızıl ötesi (FTIR) yöntemi ışığın kızıl ötesi bölgede ölçülen analit tarafından absorpsiyonunun ölçülmesi esasına dayanan bir yöntemdir (Skoog, Holler, ve Crouch, 2007). FTIR yöntemi ile belirgin ve tekrarlanabilir moleküler parmak izleri elde edilebilmektedir (Koca, Rodriguez-Saona, Harper, ve Alvarez, 2007). Bir organik maddenin ışık dizisinde 4000–1200 cm^{-1} aralığına, ‘fonksiyonel gruplar bölgesi’ denir. 1200–700 cm^{-1} bölgesi ise parmak izi bölgesi olarak tanımlanan ikinci bölgedir. Kızıl ötesi ışık dizisindeki farklı bantlardaki absorpsiyon yoğunluğu madde miktarlarıyla orantılı olarak değişmekte ve bu özellikten kalitatif ve kantitatif olarak yararlanılmaktadır (van de Voort, 1992).

Ülkemizde farklı bölgelerinde farklı iklim ve doğa şartlarının bulunması bizlere geniş bir mikroorganizma kaynağı sunmaktadır (Güven, Matpan Bekler, ve Gul Güven, 2018). Bu çalışmada toprak ve çeşitli peynirlerden izole edilen mikroorganizma türlerinin Sistein üretebilme potansiyelinin spektrofotometrik yöntemle belirlenmesi ve FTIR karakterizasyonunun yapılması hedeflenmiştir.

2. Materyal ve Yöntem

2.1 Bakteri izolasyonu ve fermentasyon işlemleri

Bakteriler Türkiye’nin çeşitli bölgelerinden toplanan toprak ve peynir örneklerinden seçilen besiyeri ortamları kullanılarak izole edilmiştir. Toprak numuneleri Türkiye’nin 7 bölgesinden farklı ortam sıcaklık ve yükseklikten temin edilmiştir. Çeçil peyniri, eski kaşar, mihaliç peyniri, otlu peynir, örgü peyniri, tulum peyniri, yörük peyniri ve tereyağı örnekleri çeşitli yörelerden toplanmıştır. Bu çalışmada kullanılan örnekler ve toplandıkları bölgeler Tablo 1’de verilmiştir. Her bir örnekten 2 g alınarak daha önce steril edilmiş %15 lik izotonik çözeltiliye konulmuştur. Daha sonra numunelerin öze yardımı ile daha önce steril edilmiş Nutrient Agar, Tryptic Soy Agar, Nutrient Agar + Pepton, Plate Count Agar ve Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA) olmak üzere 5 farklı katı besiyerine tarama yöntemi ile ekilmiştir. Ekim yapılan besiyerleri 48 saat süresince 37 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonucunda üreme gösteren koloniler ürettiği tür agar besiyerine saf tek tür mikroorganizma elde edilmesi amacıyla seyreltme yöntemi ile ekim yapılmış ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat sonunda aynı işlem saf koloni elde etmek amacı ile 2 kez tekrar uygulanmıştır. Toplam 72 saatlik 3 farklı inkübasyon sonucunda 262 koloni izole edilmiştir.

Daha sonra katı besiyeri üzerinde gelişen bakteri kolonilerinden 50 mL hacimdeki sıvı besiyerlerine (Nutrient Broth) ekim yapılarak ve fermentasyon işlemi için 48 saat süre ile çalkalamalı inkübatörde 125 rpm’de 37 °C’de inkübasyona bırakılmıştır (Ali vd., 2011). İnkübasyon sonrasında 4000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilerek sıvı kısım spektrofotometrik ölçümler için falkon tüplere alınmıştır.

2.2 Spektrofotometrik ölçümler ile Sistein miktarı tayini

Spektrofotometrik yöntemler hassas olmayan fakat hızlı sonuç veren yöntemlerdir. Sıvı besiyerleri ortamında üretilen sistein miktarı analizi, Gaitonde (1967) tarafından belirtilen ninhidrin metodu modifiye edilerek yapılmıştır. Bunun için öncelikle ninhidrin çözeltisi hazırlanmıştır. Ninhidrin çözeltisi 0.6 M lık 16 ml fosforik asit ile 64 ml glisial asetik asit karıştırılarak üzerine 1 g ninhidrin eklenmesi ile hazırlanmıştır. Öncelikle farklı konsantrasyonlarda (% 0, 2, 4, 6, 8 ve 10) (ağ/hac)

sistein içeren sıvı örnekler kullanılarak standart kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur ($y=0.8365x+0.0805$, $R^2=0.9927$). Daha sonra sıvı besiyeri örneklerinden 50 μl alınarak ependorf tüplerine konulmuştur. Numunelerin üzerine 550 μl ninhidrin çözeltisi eklenerek 80°C de su banyosunda 1 saat bekletilmiştir. Su banyosundan alınan numuneler oda sıcaklığına geldikten sonra 1600 μl glisial asetik asit ilave edilmiştir. Hazırlanan bu numuneler bir UV spektrofotometrede (METAS UV-5100, Shanghai, Çin) 365 nm dalga boyunda kör numune ile sıfırlandıktan sonra 3 tekrarlı şekilde ölçümleri yapılarak standart kalibrasyon eğrisi fonksiyon eşitliği kullanılarak sistein miktarları g/L cinsinden hesaplanmıştır.

2.3 FTIR spektroskopisi analizi

Sistein’in seçilen diğer 2 aminoasit ile ve sulu ortamdaki çeşitli konsantrasyonlardaki çözeltiler arasındaki spektrum farklılıklarını incelemek üzere ATR-FTIR spektroskopisi ile analiz edilmiş ve elde edilen spektrumlar 4 cm^{-1} spektral çözünürlükte 750 cm^{-1} ile 4000 cm^{-1} arasında kaydedilmiştir. Her bir ölçümden önce, boş ATR hücresi ile arka plan ölçümü alınarak kaydedilmiştir (Kogelheide vd., 2016).

3. Bulgular ve Tartışma

3.1 Bakteri izolasyonu

C, D, EM, G, GP, K, MR, SL ve T kaynaklarından (Tablo 1) sırasıyla 38, 27, 34, 23, 19, 41, 22, 13 ve 45 adet olmak üzere toplamda 262 koloni izole edilmiş ve sistein üretiminde kullanılmıştır. Bu kolonilerden sıvı besiyerlerine ekim yapılarak fermentasyon sonunda sistein konsantrasyonu spektrofotometrik yöntemle belirlenmiştir.

Tablo 1. Mikroorganizmaların izole edildiği kaynaklar ve toplandığı bölgeler

Örnek kodu	Kaynak	Kaynağın toplandığı bölge	İzole edilen koloni sayısı
C	Toprak	Marmara	38
D	Toprak	Doğu Anadolu	27
EM	Toprak	İç Anadolu	34
G	Gıda	Çeşitli yöresel peynirler	23
GP	Toprak	Güneydoğu Anadolu	19
K	Toprak	Karadeniz	41
MR	Toprak	Akdeniz	22
SL	Toprak	Marmara	13
T	Toprak	Ege	45

3.2 Spektrofotometrik ölçümler

Tablo 2’de her bir kaynaktan izole edilen mikroorganizma izolatlarının en fazla sistein üreten 15 izolatının sıvı besiyerinde ürettiği sistein miktarları verilmiştir. Tablo 2’de görüldüğü üzere değişen konsantrasyonlarda (0.452’den 1.855 g/L’ye kadar) sistein varlığı tespit edilmiştir. En fazla sistein üreten mikroorganizmaların EM kaynağından izole edilenler olduğu görülmektedir. Ardından SL, K, C ve MR kaynaklarından izole edilen izolatların geldiği anlaşılmaktadır. Bu örneklerin hepsinin farklı bölgelerden toplanan toprak örnekleri olması, toprakta bulunan çoğu

Tablo 2. Farklı kaynaklardan izole edilen mikroorganizma izolatlarının sıvı besiyerinde ürettikleri sistein miktarları (g/L)

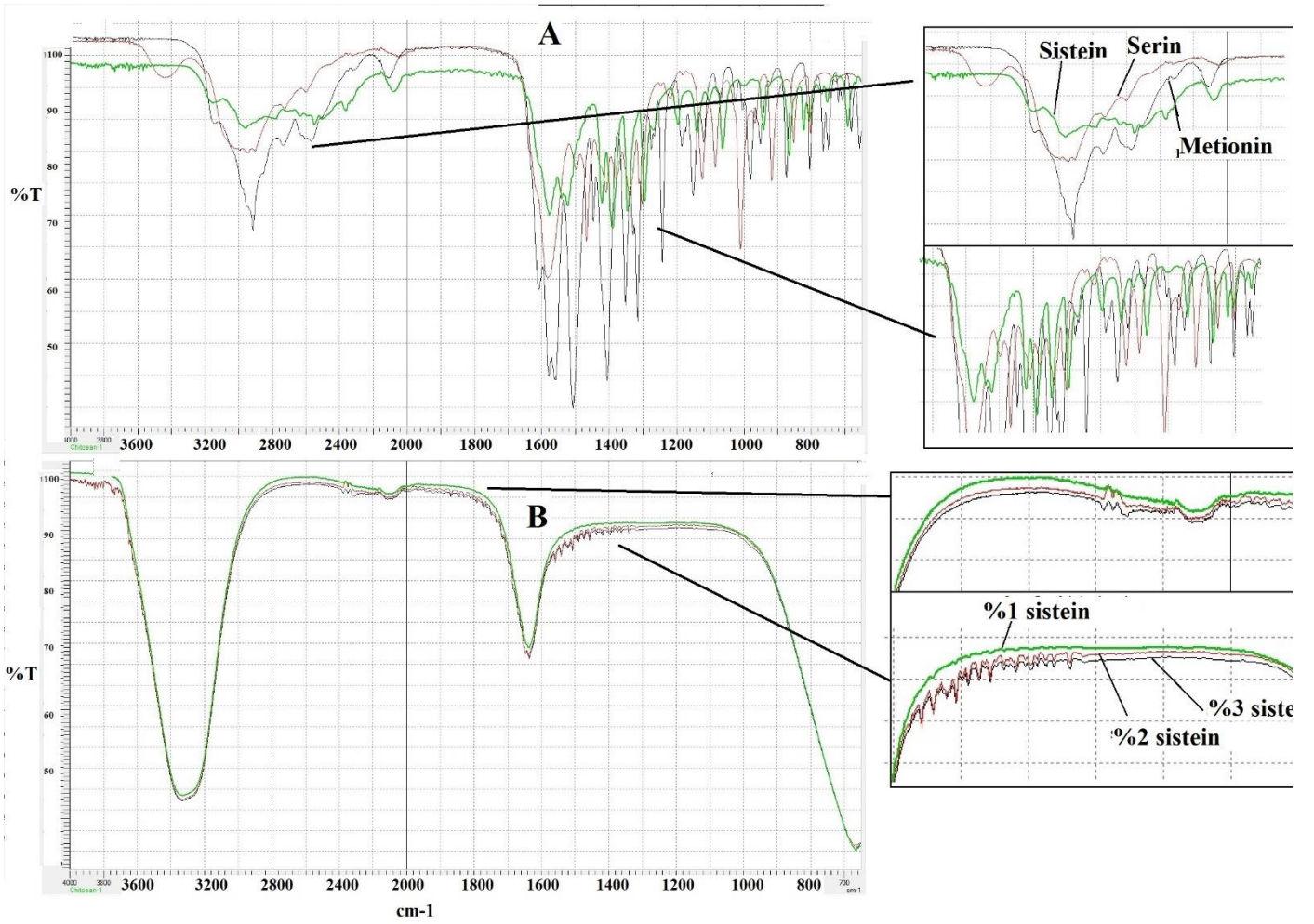
İzolat no	C	D	EM	G	GP	K	MR	SL	T
1	1,029 ± 0,003	0,977 ± 0,006	1,855 ± 0,004	0,913 ± 0,002	0,694 ± 0,006	1,454 ± 0,012	1,258 ± 0,010	1,361 ± 0,004	0,868 ± 0,039
2	1,023 ± 0,012	0,934 ± 0,004	1,284 ± 0,004	0,887 ± 0,010	0,805 ± 0,006	1,001 ± 0,041	0,813 ± 0,011	1,341 ± 0,003	0,772 ± 0,132
3	1,019 ± 0,018	0,880 ± 0,007	1,247 ± 0,006	0,875 ± 0,182	0,754 ± 0,008	0,960 ± 0,002	0,809 ± 0,008	1,331 ± 0,574	0,757 ± 0,035
4	0,978 ± 0,001	0,845 ± 0,005	1,192 ± 0,009	0,812 ± 0,060	0,727 ± 0,012	0,949 ± 0,039	0,759 ± 0,004	1,299 ± 0,006	0,756 ± 0,027
5	0,970 ± 0,002	0,832 ± 0,004	1,157 ± 0,017	0,753 ± 0,018	0,714 ± 0,005	0,944 ± 0,006	0,750 ± 0,009	1,198 ± 0,006	0,752 ± 0,003
6	0,948 ± 0,002	0,831 ± 0,006	1,145 ± 0,005	0,752 ± 0,005	0,700 ± 0,004	0,892 ± 0,016	0,723 ± 0,003	1,064 ± 0,004	0,736 ± 0,007
7	0,947 ± 0,035	0,828 ± 0,004	1,143 ± 0,004	0,730 ± 0,172	0,686 ± 0,008	0,884 ± 0,005	0,705 ± 0,007	1,018 ± 0,006	0,715 ± 0,018
8	0,836 ± 0,003	0,816 ± 0,010	1,132 ± 0,003	0,718 ± 0,024	0,681 ± 0,008	0,846 ± 0,071	0,684 ± 0,005	0,922 ± 0,011	0,708 ± 0,035
9	0,781 ± 0,010	0,785 ± 0,004	1,122 ± 0,007	0,662 ± 0,029	0,633 ± 0,004	0,829 ± 0,027	0,683 ± 0,010	0,909 ± 0,002	0,704 ± 0,013
10	0,770 ± 0,021	0,784 ± 0,005	1,095 ± 0,003	0,623 ± 0,034	0,633 ± 0,008	0,817 ± 0,011	0,670 ± 0,003	0,809 ± 0,007	0,699 ± 0,018
11	0,738 ± 0,030	0,768 ± 0,004	0,995 ± 0,004	0,558 ± 0,043	0,613 ± 0,011	0,816 ± 0,009	0,619 ± 0,008	0,719 ± 0,008	0,697 ± 0,038
12	0,731 ± 0,007	0,761 ± 0,009	0,885 ± 0,009	0,541 ± 0,034	0,584 ± 0,007	0,799 ± 0,056	0,614 ± 0,004	0,667 ± 0,005	0,691 ± 0,021
13	0,723 ± 0,002	0,755 ± 0,057	0,865 ± 0,001	0,461 ± 0,007	0,553 ± 0,003	0,772 ± 0,019	0,598 ± 0,002	0,620 ± 0,008	0,689 ± 0,034
14	0,720 ± 0,085	0,754 ± 0,006	0,852 ± 0,003	0,455 ± 0,008	0,524 ± 0,014	0,753 ± 0,005	0,589 ± 0,009		0,686 ± 0,002
15	0,719 ± 0,003	0,753 ± 0,002	0,804 ± 0,003	0,452 ± 0,028	0,513 ± 0,011	0,751 ± 0,013	0,586 ± 0,004		0,673 ± 0,019

C, D, EM, G, GP, K, MR, SL ve T harfleri farklı bölgelerden toplanan örnekleri ifade etmektedir (Tablo 1)

bakterinin sistein üretme yeteneğine sahip olabileceği sonucuna götürmektedir. Ali, Shakoori, ve Shakoori (2011) yaptıkları bir çalışmada izole ettikleri bakteri izolatlarının 9'unun sistein üretme yeteneğine sahip olduklarını belirtmişlerdir. Elde ettikleri izolatların yaklaşık olarak 2 ile 9 g/L miktarlarında sistein üretebildiklerini ortaya koymuşlardır. Bu çalışmada kullanılan izolatlardan elde edilen sistein miktarları Ali, Shakoori, ve Shakoori (2011) tarafından rapor edilen sonuçlara göre belirgin ölçüde daha azdır. Bunun nedenin izole edilen bakteri türüne ve kullandıkları seçici besiyeri ortamına bağlı olduğu düşünülmektedir. Bu çalışmanın ilerleyen aşamalarında en yüksek sistein üretme yeteneğine sahip 5 türün sistein üretme yeteneğinin en üstün olduğu fermentasyon koşullarının ve besiyeri bileşen kombinasyonlarının belirlenmesi çalışmaları yapılacaktır.

3.3 FTIR karakterizasyonu

Bu çalışmada 400-4000 cm^{-1} dalga boylu kızıl ötesi bölgesi kullanılarak sistein amino asidine ait FTIR spektrumunun seçilen diğer 2 amino asit örneğine (serin ve metionin) ait spektrumlar ile karşılaştırılması yapılarak farklı olan pikler ve bant yoğunlukları tespit edilmeye çalışılmıştır (Şekil 3A). Yapılan karşılaştırmada sisteine ait bantların ve yoğunlukların diğer iki amino aside göre belirgin bir şekilde farklılıklar ortaya koyduğu ve ayrıştırılabildiği görülmüştür. Ayrıca, sisteinin saf sudaki farklı konsantrasyonlarının (%1, 2 ve 3) spektrumları incelendiğinde konsantrasyon artışına bağlı olarak bant yoğunluklarının değiştiği ve özellikle 1300-1500 cm^{-1} bölgesinde bu farklılaşmanın belirgin olduğu görülmüştür (Şekil 3B).



Şekil 1. Sistein'in diğer referans aminoasitler ile FTIR spektrumlarının karşılaştırılması (A) ve saf sudaki sisteinin farklı konsantrasyonlardaki çözeltilerinin spektrumları (B)

4. Sonuç

Bu çalışmada elde edilen veriler incelendiğinde farklı kaynaklardan izole edilen mikroorganizmaların Nutrient Broth besiyerinde farklı sistein üretme kapasitelerine (0.452-1.855 g/L arasında değişen konsantrasyonlarda) sahip oldukları sonucuna varılmıştır. Sıvı besiyeri ortamında oluşan

sisteinin FTIR yöntemi ile hızlı şekilde belirlenip belirlenemeyeceği araştırılmış ve saf su ortamında %1 ile %3 arasında bant yoğunluklarında farklılaşmalar olduğu tespit edilmiştir. İlerleyen dönemlerde sıvı besiyeri ortamında daha düşük sistein konsantrasyonlarının belirlenebilmesi için kemometrik (PCA gibi) analizler yapılarak sonuçların analiz edilmesi çalışmalarının yapılması planlanmaktadır.

Bilgilendirme

Bu çalışma İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi tarafından desteklenmiştir (Proje destek no: İZU-BAP 1000-10).

Kaynaklar

- Abdulkadir, M., ve Waliyu, S. (2012). Screening and Isolation of the Soil Bacteria for Ability to Produce Antibiotics. *European Journal of Applied Sciences*, 4(5), 211–215. <https://doi.org/10.5829/idosi.ejas.2012.4.5.2011>
- Ali, N. M., Shakoori, F. R., ve Shakoori, A. R. (2011). Improvement in cysteine production by local bacterial isolates. *Pakistan Journal of Zoology*.
- Dhillon, G. S., Nagasawa, T., ve Yamada, H. (1987). Microbial process for L-cysteine production. *Enzyme and Microbial Technology*, 9(5), 277–280. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(87\)90003-2](https://doi.org/10.1016/0141-0229(87)90003-2)
- Ermis, E. (2017). Halal status of enzymes used in food industry. *Trends in Food Science and Technology*, 64. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.04.008>
- Fernando, A. (2006). Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food on a request from the Commission related to the use of L-cysteine in foods intended for infants and young children. *The EFSA Journal*, (390), 1–7.
- Gaitonde, M. K. (1967). A spectrophotometric method for the direct determination of cysteine in the presence of other naturally occurring amino acids. *The Biochemical Journal*. <https://doi.org/10.1042/bj1040627>
- Gortner, R. A., ve Hoffman, W. F. (1925). L-CYSTINE. *Organic Syntheses*, 5, 39. <https://doi.org/10.15227/orgsyn.005.0039>
- Güven, K., Matpan Bekler, F., ve Gülen, R. (2018). Thermophilic and Halophilic Microorganisms Isolated from Extreme Environments of Turkey, with Potential Biotechnological Applications, 219–264. https://doi.org/10.1007/978-981-13-0329-6_8
- Hashim, Y., Ismail, N., Jamal, P., Othman, R., ve Salleh, H. (2014). Production of Cysteine: Approaches, Challenges and Potential Solution. *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries*, 3(3), 95–101. <https://doi.org/10.6000/1927-3037.2014.03.03.3>
- Karaali, A., ve Özçelik, B. (1993). Gıda Katkısı Olarak Doğal ve Sentetik Boyalar. *GIDA /THE JOURNAL OF FOOD*.
- Koca, N., Rodriguez-Saona, L. E., Harper, W. J., ve Alvarez, V. B. (2007). Application of Fourier Transform Infrared Spectroscopy for Monitoring Short-Chain Free Fatty Acids in Swiss Cheese. *Journal of Dairy Science*. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0063>
- Kogelheide, F., Kartaschew, K., Strack, M., Baldus, S., Metzler-Nolte, N., Havenith, M., ... Lackmann, J. W. (2016). FTIR spectroscopy of cysteine as a ready-to-use method for the investigation of plasma-induced chemical modifications of macromolecules. *Journal of Physics D: Applied Physics*. <https://doi.org/10.1088/0022-3727/49/8/084004>
- Skoog, D. A., Holler, F. J., ve Crouch, S. R. (2007). *Principles of Instrumental Analysis, Sixth Edition*. Thomson Brooke/Cole. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)84936-3](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)84936-3)
- van de Voort, F. R. (1992). Fourier transform infrared spectroscopy applied to food analysis. *Food Research International*. [https://doi.org/10.1016/0963-9969\(92\)90115-L](https://doi.org/10.1016/0963-9969(92)90115-L)