ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

RİBOFLAVİN ÜRETEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN PZR TABANLI YAKLAŞIMLA TARANMASI

Sama Ghanim Yaqoob SULTAN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2022

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

RİBOFLAVİN ÜRETEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN PZR TABANLI YAKLAŞIMLA TARANMASI

Sama Ghanim Yaqoob SULTAN

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Özlem OSMANAĞAOĞLU

Eş Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Harun ÖNLÜ

Riboflavin (B2 vitamini) bitki ve mikrobiyal kaynaklı suda çözünen bir vitamindir ve insan salğı üzerinde önemli etkileri vardır. B2 vitamini insan vucudunda çeşitli fizyolojik işlevlere sahip temel mikro besinlerlnden biridir ve vücütta eksikliği çeşitli hastalıkların ortaya çıkmasına neden olur. Laktik asit bakterileri (LAB) gıda endüstürisi ve insan salığı için önemli bir mikroorganizma grubudur ayrıca uzun yıllarıdır fermente gıdalırın üretiminde starter kültür olarak kullanlıdıkları için güvenli kabul edilmektedirler. LAB'ın bazı suşlarının riboflavin üretiği bilinmektedir. Bu çalışmada, laktik asit bakterileri grubundan insan kaynaklı üç farklı *weissella confusa* suşunun riboflavin üretim miktarları araştırlmıştır. Bu amaç doğrultusunda ilk olarak suşların riboflavin sentezi için gerekli olan *ribD* ve *ribF* genlerinin varlığı spesifik primerler kullanılarak PZR yöntemi ile taranmıştır. Gen bölgelerinin varlığı doğrulandıktan sonra suşların riboflavin üretim miktarları HPLC cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan suşlardan 24 nolu izolatın 0.93 ng/ul,26 nolu izolatın 0.87ng/ul ve 28 nolu izolatın ise 0.30 ng/ul riboflavin üretim kapasitesine sahip olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak çalışmada kullanılan suşların vitamin B2 üretim yeteneğine sahip oldukları belirlenmiştir.

Ağustos 2022, 44 sayfa
Anahtar Kelimeler: Laktik asit bakterileri, Riboflavin,HPLC, *ribD, ribF*

ABSTRACT

Master Thesis

SCREENİNG OF RİBOFLAVİN PRODUCİNG LACİC ACİD BACTERİA BY PCR-BASED APPROACH

Sama Ghanim Yaqoob SULTAN

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Özlem OSMANAGAOGLU

Co-Suprervisior: Assist. Prof. Dr.Harun ÖNLÜ

Riboflavin is a water-soluble vitamin, which is produced by all plants and most microorganisms and has a significant effects on human health , Vitamin B2 is a fundamental micronutrient that performs numerous physiological functions in the human body and its deficiency leads to a host of health disorders**.** (LAB) are an important group of microorganisms used in the food industry and health benefits**,** they have also been considered as safe because they have been used as a starter culture for many years in the production of fermented foods. Some of LAB strains are known to produce riboflavin**.** In this study, three different human originated from a group of lactic acid bacteria *weissella confusa* strains riboflavin production quantities were investigated. For this purpose, the presence of the *ribD* and *ribF* genes which are required for the riboflavin synthesis were first scanned using the PCR method using specific primers. After verifying the presence of the gene regions, riboflavin production quantities of the strains were determined using the HPLC device. İt has been determined that isolate number 24 had 0.93 ng/ul 24 and isolate number 26 had 0.87ng/ul and isolate number 28 had 0.30 ng/ul riboflavin production capacity. As a result, the strains used in the study were determined to have a vitamin B2 production capability.

August 2022, 44 pages

Key Words: Lactic acid bacteria, Riboflavin,HPLC, *ribD, ribF*

TEŞEKKÜRLER

Yüksek lisans sürecim boyunca her aşamasında beni yönlendiren, bana uzun zaman ayıran, bilgi birikimini benden esirgemeyen, bilgisine hayran olduğum , yoğun çalışma temposunda bile her zaman vakit ayırabilen ve hiçbir sorumu cevapsız bırakmayan değerli danışman hocam **Prof.Dr.Özlem OSMANAĞAOĞLU'na**

Tez çalışmam boyunca bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, araştırmamın tamamlanması için her türlü olanağı sağlayan ve laboratuvar imkanlarını sonuna kadar kullanmama izin veren, bilgi ve deneyimleri ile her zaman yol göstererek bana çok şey kazandıran, değerli ikinci danışman hocam **Dr. Öğr. Üyesi Harun ÖNLÜ'ye**

Tez çalışmamda bilgi ve yönlendirmeleri ile katkıda bulunan sayın **Prof. Dr.Haluk HAMAMCI'ya**

Son olarak sonsuz bir sabırla hiç bir konuda desteklerini esirgemeyen, varlıklarıyla güç bulduğum her zaman yanımda olan değerli **ailem'e**…

SONSUZ TEŞEKKÜRLER…

Sama Ghanim Yaqoob SULTAN
Ankara, Ağustos 2022

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI

ETİK ..... **i**

ÖZET ..... **ii**

ABSTRACT ..... **iii**

TEŞEKKÜRLER ..... **iv**

SİMGELER DİZİNİ ..... **vii**

ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **viii**

ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **ix**

1. GİRİŞ **1**

2. KAYNAK ÖZETLERİ **3**

2.1 Riboflavin, Önem ve Yapısı **3**

2.2 Riboflavin Üretimi **4**

2.3 Mikrobiyal Riboflavin Üretimi **5**

2.4 Endüstriyel Riboflavin Üretimi, Sentetik ve Mikrobial Fermantasyon Karşılaştırması **6**

2.5 Hücre Dışı Bakteriyel Fizyolojide Riboflavin **6**

2.6 Bakteriyel Riboflavin Biyosentez Yolu **7**

2.7 RBP Genlerinin Transkripsiyon Organizasyonuna Genel Bakış **8**

2.8 RBP Genlerinin Regülasyonu **9**

2.9 Riboflavin Taşıyıcılar **10**

3. MATERYAL ve YÖNTEM **12**

3.1 Materyal **12**

3.1.1 Bakteriyel suşları ve geliştirme koşulları: **12**

3.1.2 Tampon ve çözeltiler **13**

3.1.3 Çözelti ve malzemelerin sitrilizasyonu **13**

3.1.3 Moleküler markörler **13**

3.2 Yöntem **13**

3.2.1 Bakteri kültülerin aktifleştirilmesi ve kültürlerin safllığının kontrol edilmesi..... ..... **13**

3.2.2 Genomik DNA izolasyonu **13**

3.2.3 Agaroz jel elektroforezi **14**

3.2.4 Riboflavin biyosentez genleri için Touch Down polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) tabanlı tarama…… 14
3.2.5 Riboflavin üretim miktarlarının HPLC ile belirlenmesi 16
4. ARAŞTIRMA BULGULARI 19
4.1 Bakteri Kültürlerin Aktifleştirilmesi 19
4.2 Genomik DNA İzolasyonu 19
4.3 Riboflavin Üretiminden Sorumlu Genlerin PZR ile Taranması 20
4.4 Riboflavin Üretim Miktarlarının HPLC ile Analiz Sonucu 21
5. TARTIŞMA ve SONUÇ 25
KAYNAKLAR 27
EKLER 36
EK 1 Bakteri Kültür Ortamlarinin Gelşimi için Kullanilan Besiyeri 37
EK 2 Tampon ve Çözeltiler 38
EK 3 Moleküler markörler 40
EK 4 Örneklere ait HPLC kromatogramları detayli şekilde verilmiştir 41
ÖZGEÇMİŞ 44

SİMGELER DİZİNİ

°C	Santigrat (Celcius) derece
g	Gram
L	Litre
M	Molarite
Mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
pH	Hidrojen konsantrasyonu logaritması
ppm	Milyonda bir kısım
rpm	Dakikada devir sayısı sn Saniye
UV	Ultra viyole
V	Volt
µL	Mikrolitre
µm	Mikromolar
%	Yüzde

Kısaltmalar

bp	Baz pair (baz çifti)
ECF	Energy coupling factor
F primer	Forward primer, ileri primer
FMN	Flavin mononüklütid
FAD	Flavin adenin dinüklütid
GTP	Guanosine-5'-triphosphate
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi High-performance liquid chromatography
PZR	polimeraz zincir reaksiyonu
PCR	Polymerase chain reaction
RF	Riboflavin
RBP	Riboflavin biyosentz yolu
R primer	Reverse primer geri primer
TD PZR	Touch down polimeraz zincir reaksiyonu
TGE	Tripton Glukoz Yeast Ekstrakt

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Riboflavin ve flavinden türetilmiş kofaktörlerin kimyasal yapısı 4
Şekil 2.2 Baterilerde Riboflavin biyosentez yolu (Thakur vd. 2016). 8
Şekil 2.3 Baktrilerde Riboflavin biyosentez yolu (RBP) ve bilinen riboflavin taşıyıcıları 11
Şekil 3.1 Riboflavin assay medium 12
Şekil 4.1 *W. confuse* suşlarına ait DNA jel görüntüsü 20
Şekil 4.2 TD PZR elde edilen sonuçlara ait jel görüntüleri 20
Şekil4.4 Riboflavin standart kromatogramı 22
Şekil 4.5 Riboflavin standart kalibrasyon eğrisi 22
Şekil 4.6 24 numaralı örnekteki HPLC kromatogramı 23
Şekil 4.7 26 numaralı örnekteki HPLC kromatogramı 23
Şekil 4.8 28 numaralı örnekteki HPLC kromatogramı 24

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge3.1 Çalışmada kullanılan PZR primerleri belirlenmiştir.....15
Çizelge 4.1 Çalışmada kullanılan suşlar 19
Çizegle 4.2 örneklerin riboflavin üretim miktarları 21

1. GİRİŞ

Riboflavin (B2 vitamini) suda çözünen bir vitamindir ve temel olarak, flavin adenin dinükleotid (FAD) ve flavin mononükleotid (FMN) koenzimlerinin entegre bir bileşeni olarak bulunur. Flavo koenzimler, ilk olarak 1879 yılında Blyth tarafından sütten sarı bir madde olarak izole edilmiş ve laktokrom olarak adlandırmıştır, hücrede çeşitli redoks reaksiyonlarına katılırlar (Northrop-Clewes ve Thurnham 2012, Rychen vd. 2018). 1927 yılında B vitamini kompleksi olarak adlandırılan bu molekülün iki farklı bileşeni içerdiği bilinmektedir: B1(thiamine) vitamini ve B2 vitamini (riboflavin) (Revuelta vd. 2017) .

Birçok bitki ve bakterinin aksine insanlar riboflavin vitaminini sentezleyememeleri sebebiyle, insanlar için riboflavin kaynağı:bağırsak mikroflorasında bulunanm mikroorganizmalar ve diyet ile tüketilen besinlerdir (Hill 1997, Wrong 1981). Birçok ülkede riboflavin yetersizliği sebebiyle insanlarda belirtileri arasında boğaz, oral ve mukoz membranların ödemi, hiperemya bulunanarboflavinoz hastalığı görülmektedir (Blanck vd. 2002, O'brien vd. 2001). Riboflavin, AIDS hastalığı sonucu ortaya çıkabilen nükleozid analog indüksiyonluBtipi laktik asidoz tedavisinde kullanılmaktadır (Dalton ve Rahimi 2001).

Riboflavin, endüstriyel olarak riboz dan kimyasal sentez yolu ile üretilmektedir (Kurth 1996). Laktik asit bakterilerinin B grubu vitamin sentezleyebilme yetenekleri son yıllarda bu bakterilerin (LAB) kullanılmasına yönelik ilgiyi arttımıştır . Bu sayede fermente ve biyozenginleştirilmiş gıdalar üretilebileceği düşünülmektedir (Capozzi vd. 2011, de Lourdes Samaniego-Vaesken vd. 2012, Laiño vd. 2013). LAB uzun yıllardır fermente gıdaların üretiminde başlangıç kültürleri olarak kullanılımaları nedeniyle güvenli kabul edilirler. Bu bağlamda, sağlık açısından önemli bileşikler üreten suşların tanımlanması ve izole edilmesi büyüleyici bir alandır (Capozzi vd. 2012). Mikrobiyal sentez ekonomik açıdan kimyasal prosesden daha avantajlı olduğu için, ayrıca yenilenebilir kaynakların kullanımı çevre dostu bir yaklaşım ortaya koyması sebebi ile daha avantajlıdır (van Loon vd. 1996).

Bu çalışmada riboflavin biyosentez genlerini barındıran laktik asit bakterilerinin taranması ve ardından izolatların riboflavin üretim miktarlarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Riboflavin üreten laktik asit bakterileri, gelecekte riboflavin bakımından zenginleştirilmiş fermente gıdaların üretilmesinde potansiyel role sahip olacaktır.

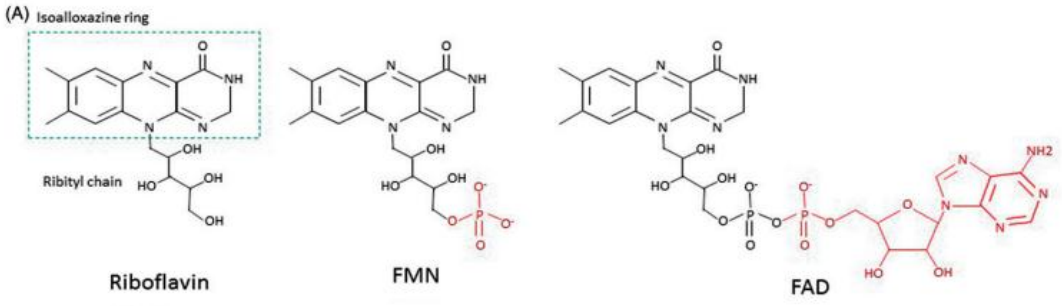
2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Riboflavin, Önem ve Yapısı

Riboflavin insan vücudunun çeşitli fizyolojik işlevlere sahip temel mikro besinlerinden biridir, bu sebeple Dünya Sağlık Örgütü tarafından riboflavin ,insan vucut gelişim ve beslenme durumunu değerlendirmek için kullanılan altı ana göstergeden biri olarak sınıflandırılmıştır (Zhang vd. 2021). Riboflavin, yumurta sarısı, süt ve ciğer gibi çeşitili besinlerde bulunur,ticari olarak sentezlenen ve çeşitli gıdaürünlerininFortifikasyonunda, ekmek ve kahvaltı gevreği gibi ürünlerde kullanılmaktadır. Riboflavin sarı renge sahip olması neden ile tıbbi tanımlama ve gıdalarda renklendirici olarak da kullanılır (Institute of Medicine Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference vd. 1998).

Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar neticesinde, riboflavinin demir metabolizmasını ve emilimini etkilediği, çinko ve demiralımını arttırabildiği görülmüştür (Agte vd. 1998). Riboflavinin insan vucudunda emilimi sınırlıdır bu nedenle iyi bir şekilde depolanamaz. Riboflavin yetersizliği arboflavinosise (riboflavin yetersizilği) neden olur, bu hastalık ağız ve mukoza membranlarında ödem ve deri hastalıkları ile sonuçlanır. Riboflavinin diyet ile alınımı arboflavinosisi öneler, yüksek miktarda vucuda alındığı durumunda idrar ile atılır ve depolanmaz bu sebeple riboflavin toksititeye sebep olmaz (Buehler 2011). Riboflavin takviyesinin nörodejeneratif koşulların ilerleyişi ile mücadele edebildiği yapılan çalışmalr sonucu kanıtlanmıştır((Foley vd. 2014). Riboflavin eksikliğinin anemi riskiyle ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Shi vd. 2014). Ayrıca migren tedavisinde etkili olduğu bulunmuştur (Schetzek vd. 2013, Sherwood ve Goldman 2014). Riboflavin B6 ve B9 vitaminlerinin aktif formlarına, triptofanın niasine dönüştürülmesini destekler. Riboflavinin önerilen tüketim miktarı insanlar yaş ve cinsiyet ile değişmektedir, bebekler için 0.3 - 0.4 mg/gün, çocuklar için 0.5 - 0.9 mg/gün, yetişkin erkekler için günde 1.3 mg ve yetişkin kadınlar için günde 1.1 mg dır (Averianova vd. 2020, Revuelta vd. 2016).

Riboflavin ismi riboz benzeri ribitol yan zincirin varlığından, Flavus kelimesi ise Latinicede sarı anlamına gelen kelimeden türetilmiştir (LeBlanc vd. 2010). Yapısı N10 konumunda ribytil yan zincirine sahip izoallokazin halkasıdır. (Beztsinna vd. 2016, Edwards 2014). Flavinler ışığa duyarlı ancak ısıya karşı stabildir (Edwards 2014). Aktif şekileri fosforlu türevi olan Flavin mononüklotid ve adeninli türevi olan flavin adenin dinüklotitdir. Flavinler oksitlenmiş, tek elektron azaltılmış veya iki elektron düşürülmüş üç redoks formu arasında geçiş yapabimektedir. Bu da tek elektron ve iki elektron aktarım reaksiyonlarının yanı sıra iki elektronun tek bir bağışçıdan iki farklı tek elektron kabul edene dallanmasından oluşan elektron çatallama süreçleri reaksiyonlarına aracılık etmesine olanak tanır.(Abbas ve Sibirny 2011, Beztsinna vd. 2016, Buckel ve Thauer 2018, Haase vd. 2014).



Şekil 2.1 Riboflavin ve flavinden türetilmiş kofaktörlerin kimyasal yapısı (García-Angulo 2017)

2.2 Riboflavin Üretimi

Birçok mikroorganizma riboflavin'i sentezleyebilir örneğin *Candida famata*, *Clostridium acetobutylicum* ve *Lactobacillus fermentum* bakterileri B2 vitaminini yüksek miktarlarda üretebilirler (Demain 1972). Riboflavin üretimi kimyasal sentez, yarı kimyasal sentez ve mikrobial fermantasyon olmak üzere başlıca üç şekilde gerçekleştirilir. Mikrobiyal fermantasyon yöntemi, geleneksel mikrobiyal fermantasyon veya genetik mühendisiliği yöntemi kullanılarak özel olarak geliştirilen mikroorganizmalrın fermantasyonu ile elde edilmektedir (Zhang vd. 2021). Endüstriyel riboflavin üretimi için kullanılan mikroorganizmalar *Ashbya gossypii* (Kato ve Park

2012) ve *Bacillus subtilis* ‘dir (Schallmey vd. 2004). Genetik mühendisliği yolu ile geliştirilen mikroorganizmalara ise *Corynebacterium ammoniagenes* (Koizumi vd. 2000) *Candida famata* (Dmytruk vd. 2014), *Eremothecium ashbyi* (Sengupta vd. 2012) ve *Escherichia coli* örnek verilebilir (Lin vd. 2014, Liu vd. 2016).

2.3 Mikrobiyal Riboflavin Üretimi

Riboflavinin mikrobiyal fermantasyon ile üretilmesi için çeşitli riboflavin üreticisi mikroorganizmalar kullanılmaktadır. Bunlar arasında, *Bacillus subtilis*, *Candida famata* ve *Ashbya gossypii* gibi mikroorganizmalar büyük ölçekli riboflavin biyosentezi için kullanılmaktadır (Stahmann vd. 2000). Riboflavin üretimindeki ilk ticari fermentasyon işlemleri 1940 yılında *Clostridium acetobutylicum* (Perlman 1979) ve iki doğal riboflavin üreticisi *Eremothecium ashbyi* ve *Ashbya gossypii* kullanılarak gerçekleştirlmiştir (Perlman 1979, Wickerham vd. 1946). Candida türleri iyi bir Riboflavin üreticisidir (Demain 1972).

Mikrobiyal fermantasyon yöntemi, uzun süreli ve düşük verimli olması nedeniyle kimyasal sentezle kıyaslandığında büyük dezavantajlara sahipti. Ancak genetik mühendisliği teknolojilerinin ilerlemesi ile birlikte özel olarak geliştirlen bakteriler (örneğin, *Bacillus subtilis* ve *Corynebacterium ammoniagenes)* sayesinde riboflavin üretiminde başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Revuelta vd. 2017).

A.gossypii riboflavin'de daha fazla riboflavin üretimi elde etmek icin metabolik mühendisliğ yöntem ile gerçekleşmiştir (Jiménez vd. 2005). *B.subtilis* in yüksek seviyede riboflavin üretimi purin analoglarına ve riboflavinin toksik analoğı olan roseoflavine maruz bırakılması ile yada genetic mühendisliği yöntemleri kullanılarak başarılmıştır (Perkins vd. 1991a, Perkins vd. 1999). *L.lactis* te bu iki yaklaşımda başarılı bir şekilde kullanılmıştır ve riboflavin eksikliği olan ratlarda bu yüksek üreticisi suşun kullanılabileceği gösrterilmiştir (Burgess vd. 2004).

2.4 Endüstriyel Riboflavin Üretimi, Sentetik ve Mikrobial Fermantasyon Karşılaştırması

Kimyasal yollarla riboflavin üretimi D-glikoz veya D-riboz ile başlar, glikoz ilk adımda arabonata oksitlenir ardından ribonata epimerleştirilir ve ribonolaktona dönüştürülür. Bir sonraki adımda amalgam kullanılarak D-ribose rediksiyonu gerçekleşir. Xylidine eklendikten sonra ribitilksiidin ve anilin türevi birlikte fenillazo-ribitylxylidin oluşturulur. Reaksiyonun son adımı fenillazo-ribitilksiidinin bir sikloyoğuşmasıdır ve buda neticede bir ürün olarak riboflavin verendir (Wolf vd. 1983). Kimyasal sentezin dezavantajları; organik çözücüler gerektirir ve mikrobiyal prosese kıyasla yüzde yirmibeş daha fazla enerji gerektirir maksimum yüzde altmış verimi vardır 12 substrat kullanır ve çok fazla atık üretir (Alosta 2007).

Riboflavin sentezi hakkında yapılan araştırmalar sonucu artan bilgiler B2 vitaminin üretimi hakkında farklı yaklaşımlar geliştirilmesine imkan sağladı (Survase vd. 2006). Bu yöntemler riboflavin sentez yolunun önemli adımlarını sınırlayan veya istenmeyen reaksiyonlarını katalizeeden enzimleri kodlayan genlerin aşırı ekspresyonunun engelenmesi ile başarılmıştır (Stahmann vd. 2000). Genetik mühendisliği ve mutajenler kullnılarak geliştirilen Riboflavin üreticisi suşlar genetik açısından şaşırtıcı olabilmektedir. Örneğin *B.subtilis* birkaç antimikrobiyal direnç geni taşır ve bu sebeple birçok ilaca karşı direnç yayılması riski taşır (Additives vd. 2018). Mikrobiyal fermantasyon yönteminin en önemli dezavantajı son ürünün saflığıdır. Bu yöntemle üretilen riboflavin vitaminin yüzde sekseni saf vitamindir çok rafine etmeden yalnızca hayvan yeminde kullanıma uygundur. saflaştırma maliyetinin işletme maliyetlerinin yüzde kırkını aşabileceğini bildirmiştir (THE UNITED KINGDOM COMPETITION 2001).

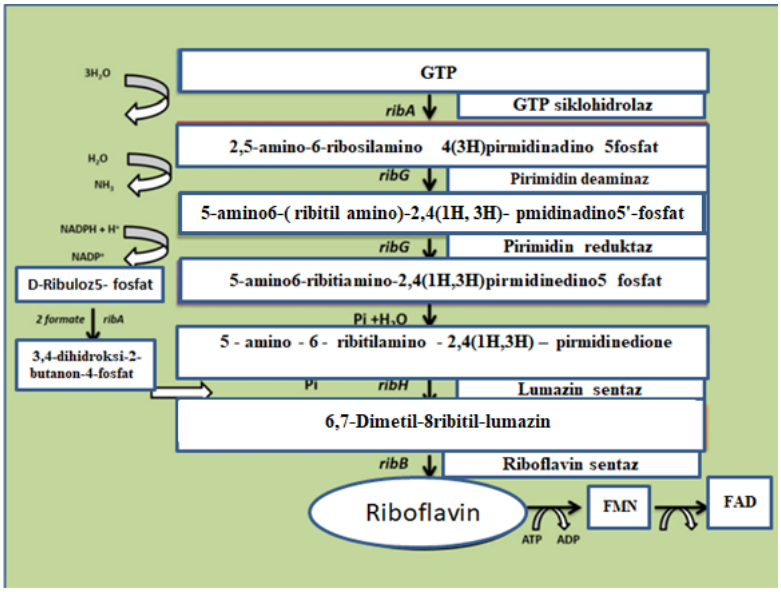
2.5 Hücre Dışı Bakteriyel Fizyolojide Riboflavin

Riboflavin redoks aktif bir bileşendir. Bu bileşen metalleri şelatlama ve hücre dışı elektron transferini (Brutinel ve Gralnick 2012, E. Marsili vd. 2008, Newman ve Kolter 2000) kolaylaştırmak için elektronlara mekik rolü görmesini sağlamaktadır. Hücre dışı

Electron transfer hakkında çalışmalar yoğun şekilde Shewanella ve Geobacter türler üzerinde arştırlmıştır . *Shewanella* türleri flavin üreten ve hücre dışı elektron akseptörler için elektron şelatlama görevi görür(Enrico Marsili vd. 2008). İnsan bağırsaında *Fecalibacterium prausnitzi* elektronları oksijene transfer etmek için sistein veya glutatiton'dan dışhücresel riboflavin ve thiol grupları kullanır (Khan vd. 2012).

2.6 Bakteriyel Riboflavin Biyosentez Yolu

Riboflavin biyosentetik yolu *B. subtilis* ve *E.coli* bakterlerinde detaylı bir şekilde incelenmiştir. (Bacher vd. 2000, Perkins ve Pero 2001). *B.subtilis*'in riboflavin biyosentez genleri sekanslanmış ve tek bir operon Rib(GBAH) şeklinde dizildiği görülmüştür (Mironov 1989, Perkins vd. 1991b, Sorokin vd. 1993) . Riboflavin'in guanozin trifosfat (GTP) ve D-ribulose 5-fosfat öncülerinden mikrobiyal biyosentezi yedi enzimatik adımdan oluşumaktadır (Bacher vd. 2000). Riboflavin Biyosentz yolunun GTP'ye bağımlı kolunun ilk adımı *E.*coli'de *ribA* tarafından kodlanır. *B.subtilis'*de de aynı şekilde *ribA* tarafından kodlanmaktadır ancak burada *ribA*, ribulose 5- fosfat'tan 3,4 dihidroksi- 2- butanone 4- fosfat yapılandırmasında katalize eden bir çift işlevli enzim olarak görev yapar (Richter vd. 1993). İkinci ve üçüncü enzimatik adımlar operonun ilk geni olan *ribG* ile kodlanan iki işlevli enzim tarafından kontrol edilir bu adımlar yapının pirimidin halkasının deaminasyonu ve daha sonra ribosil yan zincirinin redüksiyonunu içerir (Richter vd. 1997). Riboflavin biyosentezinde sondan bir önceki adım, *ribH* geni tarafından kodlanan lumazin sentaz enzimi trafından katalize edilir (Perkins vd. 1999). Son adımı ise rib operonun ikinci geni tarafından kodlanan Riboflavin sentaz enzimi ile kontrol edilir Riboflavin sentezinde dört geninin transkripsyonu operonun 5' ucunda yer alan regyülasyon bölgesi ve rib P1 promotoru tarafından kontrol edilir, operonun *ribA* ve *ribH*'deki son iki genleri de promotor rib P2 ve regyülasyon bölge RFN'den transkriplenir (Perkins vd. 1999).



Şekil 2.2 Baterilerde Riboflavin biyosentez yolu (Thakur vd. 2016)

2.7 RBP Genlerinin Transkripsiyon Organizasyonuna Genel Bakış

Rib genleri Gram-pozitif bakterilerde tek bir operon halinde kümelenmiştir, Gram-Negatif bakterilerde rib genleri kromozomun çevresinde dağılırlar (Vitreschak vd. 2002). Bakterilerde rib operonun da *ribD*'nin deaminasyon ve redüksiyon işlevleri ayrı genlerde kodlanabilir; büylece *ribD* ve *ribG* isimleri deaminasyon ve redüksiyon için sırasıyla önerilmiştir (Jankowitsch vd. 2012). *B.subtilis'* de Rib operonun transkriptik regülasyonu operonun 5'ucundan itibaren transkriptlenmiş mRNA regyülasyon bölgesi aracılığıyla gerçekleşir. Bu mRNA bölgesi korunmuş ve beş gövde ilmeği ve tek kök saptan oluşan özel bir ikincil yapıya (RFN) katlanması öngörülmektedir (Gelfand vd. 1999, Vitreschak vd. 2002). Riboflavin biyosentez yolu genlerine sahip operonlar da riboflavin biyosenteziyle direkt alakalı olmayan genler içerebilimektedirler, global regülatörler nrdR ve nubB, çeşitli türlerdeki riboflavin biyosentz yolu ile ile genetik olarak ilişkili bulunmuştur ve sırasıyla, nükleotid redüksiyonu ve diğer genlerin transkriptik baskıcılarını ve bakteriybel antiterminatör kompleksinin bir faktörünü kodlandırırlar (Brutinel vd. 2013, García Angulo vd. 2013, McKethan ve Spiro 2013, Vitreschak vd. 2002).

2.8 RBP Genlerinin Regülasyonu

Gram negatif bakterilerde riboflavin biyosentez genleri translasyon başlatma seviyesinde regüle edilir, gram pozitif bakterilerde transport genleri ve riboflavin metabolizması regülasyonu transkripsiyon atenüasyonu gerçeklşir (Vitreschak vd. 2002). RFN elementi, riboflavin biyosentezi ve transport ile yer alan genlerin eubacterial operon'larında yaygın ve yüksek oranda korunumlu bir RNA yapısal elementidir (Gelfand vd. 1999, Gusarov, Kreneva, Podcharniaev, vd. 1997, Vitreschak vd. 2002).

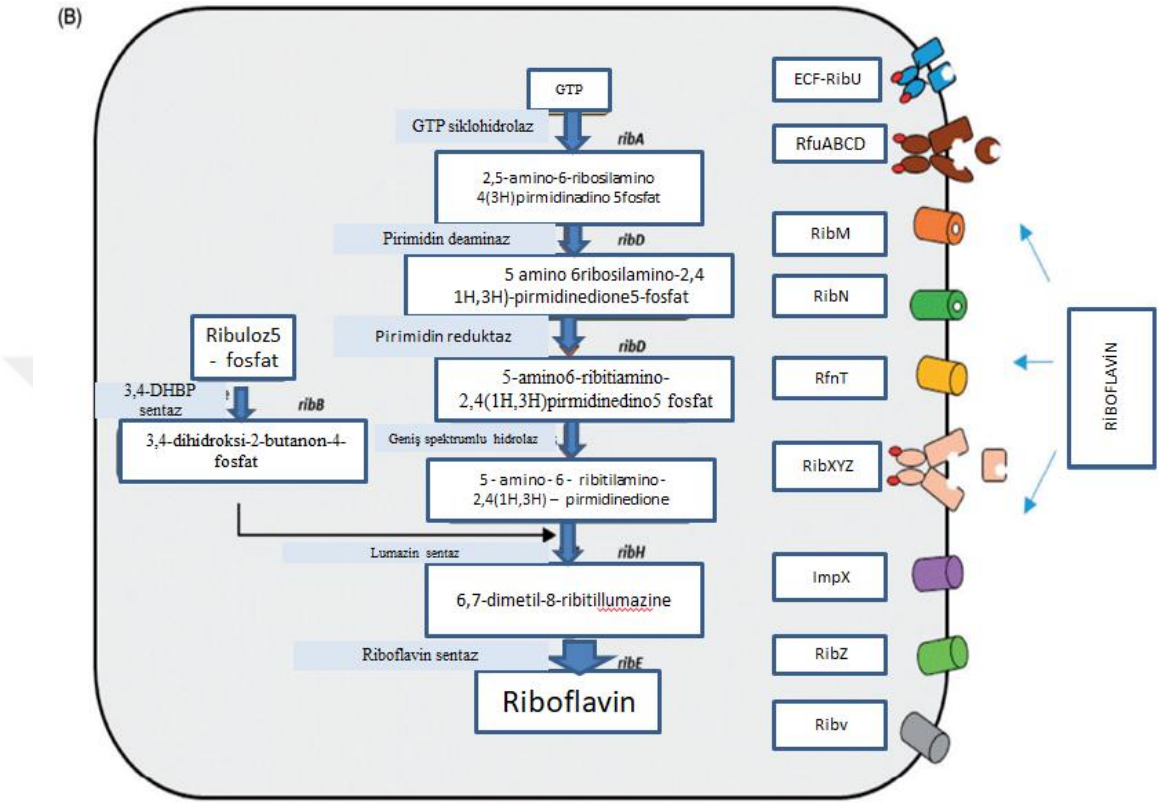
RNA Riboswich'ler genellikle belirli prokaryotik mRNA'ların 5' ucunda trranslasyon olmamış bölgelerinde bulunur. Aptamer alanı ve bir ifade platform olmak üzere iki bilişenden oluşur . Her bir aptamer etki alanı, küçük molekül metabolit tanır ve bu metabolit bağlanması aptamer ve ifade alanlarında konformasyon değişikliklerini tetikler ve aşağı akış genlerinin kontrolünü sağlar (Breaker 2018, Mandal ve Breaker 2004). Flavin mononükleotid algılamalı riboswitch'ler Riboflavin temel koenzimlerin flavin mononükleotid (FMN) ve flavin adenine dinükleotid (FAD) öncüsüdür (Perkins ve Pero 1993). İn-vitro'da transkripsiyonu sonlandırma için FMN'nin düşük mikromolar konsantrasyonunda bulunması yeterlidir. FMN aracılı transkripsiyon sonlandırma, rfn bölgesindeki çeşitli nokta mutasyonları bu etkiyi kaldırdığı için bozulmamış rfn-kutusun'a bağlıdır. Rib lideri RNA'daki, FMN'ye karşılık olarak, ancak riboflavin'e tepki olarak olmaması konformasyon değişikliği RNA ve ribonuclease H (RNAse H) inceleme ile tamamlayıcı oligonükleotidlerin kullanımıyla sergilendi (Mironov vd. 2002). Bazı LAB suşları da dahil olmak üzere birçok Gram-pozitif bakterinde riboflavin sentezi, yedi enzimatik adımda guanosin-5'-trifosfat ve D-ribulose-5'- fosfat yoğuşması yoluyla gerçekleşir. Bu yol, *rib*A, *rib*G, *ribB* ve *ribH* adı verilen dört protein tarafından katalize edilir ve kodlama genleri, (rib) GBAH operonunu oluşturur (Thakur vd. 2016). Rib operonu *B.subtilis* genetik haritasında 209 de yer alır ve ekspresyonu *ribC* ile regüle edilir (BRESLER vd. 1973). Olası bir represör bağlanma kalan 294 bp'lik alanı kapsar promotör ve *ribG* arasında kalan bölgesinin içinde yer alır (Mironov 1989) ve bu 2,5-diamino-6-(ribosylamino)-4 (3H)-pyrimidinone 5'-phosphat molekülünü 5-amino6-(ribtiylamino)-2,4(1H, 3H)-pyrimidinedione 5'-phosphata dönüştüren enzimi

kodlar(Nielsen vd. 1986). İki işlevli bir flavokinaz FAD sentetaz sentezini kodlayan gen *ribC* rib operonunun düzenlemesinde de yer almaktadır. Ayrıca FMN ve/veya FAD'ın yarıdımcı repressor olarak görev yaptığını öne sürülmüştür (Gusarov, Kreneva, Rybak, vd. 1997, Mack vd. 1998). Çalışmalar Tüm bakterilerin RBP genleri FMN riboswitch düzenlemesi altında olmadığını göstermiştir. Bazı bakterilerde demir seviyeleri ile riboflavin sağlama yollarının ifadesi arasında net bir bağlantı kurulmuştur. Methanotrophic bakerisi Methylocystis'te flavin salglanması demir yokluğunda arttırdığı görülmüştür (Balasubramanian vd. 2010).

2.9 Riboflavin Taşıyıcılar

Bakteriler riboflavini elde etmek için biyosentez yolunu veya hücre içine riboflavin alım sistemini kulanır. Bugüne kadar bakterilerde, enerji bağlantı faktörü sistemi -*ribU*, RfuABCD ve *ribXYZ*'dir, Bunlar ATP bağlama kaseti taşıyıcı ailesinin üyeleri ve RfnT, PnuC/*RibM*, *ribN*, *RibZ* ve *RibV* taşıyıcıları olmak üzere dokuz riboflavin transport sistemi tanımlanmıştır (Burgess vd. 2006, Winkler vd. 2002)**.** *Lactobacillus lactis*'te RF transferinden *ribU* geni sorumludur. *ribU* geni içindeki silinmeler veya riboflavin analoğu olan toksik roseoflavin ve FMN, taşıma proteininin sentezini bastırarak riboflavin transfer sürecini ortadan kaldırır. Riboflavin aktarımı bir enerji kaynağı olmadığında meydana gelir ve bu büyük ihtimalle dahili ve harici RF dengelenmesi ile değiş tokuş mekanizması aracılığıyla hareket eder (Burgess vd. 2006)**.** Enerji bağlantı faktörü (ECF) taşıyıcılar, farklı S bileşenleriyle birlikte işlev görebilen modülden oluşur, *ribU*, flavinleri bağlayan ve aktarım aracı ailesinin enerji bağlama faktörü (ECF) üyesinin substrata özgü (S) bileşenini içerir(Duurkens vd. 2007, Zhang vd. 2010). *RibU*'nun moleküler dinamikleri ve kristal yapı çalışmaları son olarak, bu proteinin altı transmembran segmentine sahip olduğunu belirlenmiştir. *ribU* 'nun hücre dışı riboflavin için geçit olarak işlev görüren kısmı ise TM5 ile TM6 arasındaki döngüdür (Song vd. 2013, Zhang vd. 2010). PnuX olarak da bilinen *ribM*, Actinobacteria *Corynebacterium glutamicum* içindeki riboflavin ve roseoflavin (analog toksik bir riboflavin) hucre içi almına aracılık eden PnuC nikotinamide riboside taşıyıcıların bir paraloğudur(Vogl vd. 2007)

Escherichia coli'den YeeO'da ve *S.oneidensis* te Bfe belirli flavin salgılanmasında yer alan iki protein bulunmuştur . (Kotloski ve Gralnick 2013, McAnulty ve Wood 2014)



Şekil 2.3 Baktrilerde Riboflavin biyosentez yolu (RBP) ve bilinen riboflavin taşıyıcıları (García-Angulo 2017)

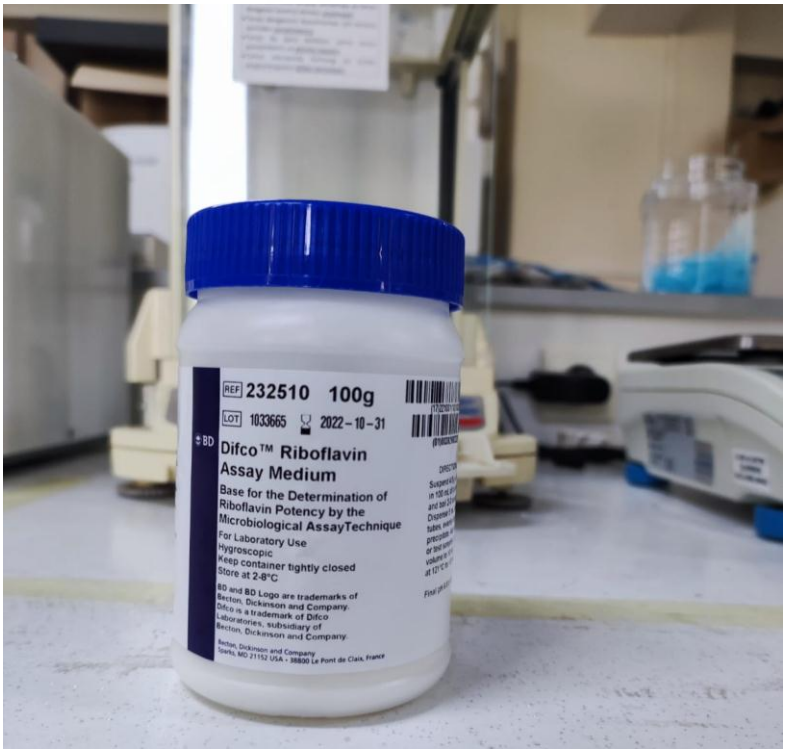
3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Bakteriyel suşları ve geliştirme koşulları

Bu çalışmada kullanılan laktik asit bakterileri, daha önceki çalışmalarıda anne sütünden izole edilen, Ankara Üniversitesi Fen fakültesi Biyoloji Bölümü Bikrobiyal Genetik Laboratuvarı kültür koleksiyonunda mevcut bulunan ve literatür taraması sonucu riboflavin üreticisi olduğu varsayılan suşlar arasından seçilmiştir**.**

Bu çalışmada üç farklı *Weissella confuse* izolatı kullanılmıştır. Suşlar TGE besiyerinde 37°C'de 24 saat geliştirilmiştir. Suşları riboflavin üretim miktarlarının belirlenmesi için riboflavin assay medium (Difco, France) kullanılmıştır. Besi bileşenlerine ait kimyasal bileşenler **EK-1'** de belirtilmiştir.



Şekil 3.1 Riboflavin assay medium

3.1.2 Tampon ve çözeltiler

Çalışmada kullanılan tampon ve çözeltilerin hazırlanıması **EK 2'de** verilmiştir.

1.1.3 Çözelti ve malzemelerin sitrilizasyonu

Çalışma süresince kullanılan tüm malzemelerin sterilizasyonu için otoklav kullanılmıştır 121°C'de 15 dakika.

3.1.3 Moleküler markörler

Çalışmada kullanılan markörler **EK-3' de** verilmiştir.

3.2 Yöntem

3.2.1 Bakteri kültülerin aktifleştirilmesi ve kültürlerin safllığının kontrol edilmesi

Daha önce %50 gliserol içerisinde -80 ° C'de saklanan tüm suşlar, bu çalışma için TGE ortamında 37°C'de 24 saat geliştirilmiştir. 24 saatlik inkübasyonun ardından her bir izolatan numuneler alınarak metilen mavisi ile boyanmış ve ışık mikroskobunda saflıkları kontrol edilmiştir. Saf olduğu doğrulana suşlar çalışmanın ilerleyen aşamalarında kullanılmıştır.

3.2.2 Genomik DNA izolasyonu

TGE sıvı besiyerinde 18 saat 37°C' de geliştirilen aktif bakteri kültürlerinden steril mikrosantrifuj tüplerine 1000 µL olacak şekilde örnek eklenmiş ve 1 dakika 13200 rpm de santrifüjlenmiştir. Süpernatant kısmı uzaklaştırılmış ve pelletin üzerine 1 ml aktif kültür eklenip santrifüj işlemi tekrarlanmıştır. Süpernatant uzaklaştırılmış 200 µL spheroblast buffer eklenmiş ve 37°C' de 15 dakika inkübe edilmiştir. Ardından 50 µL lizis buffer-1 ve 50 µL lizis buffer-2 eklenmiştir. Tüpler 65°C' de 5 dakika sıcak su

banyosunda inkübe edillmiştir. İnkübasyonun sonunda 100 µL N3 tamponu örneklere eklenmiş 5 dakika buz da bekletilmiştir. Daha sonra örnekler +4°C' de 15 dakika 13.000 rpm de santrifüjlenmiştir. Bu işlem den sonra süpernatant kısmından 400 µL alınımış ve temiz bir tüpe aktarılmıştır. Tüplerin üzerine 400 µL izopropanol eklenmiş ve oda sıcaklığında 15 dakika bekletilmiştir. Daha sonra örnekler 20 dakika en yüksek devirde 14.000 rpm' de 4 °C de santrifüjlenmiş ve supernatan kımı uzaklaştırlmıştır. Pellet 100 µL %96' lık etanol ile yıkanmıştır. Örnekler oda sıcaklığında 16000 rpm' de 5 dakika santrifüj edilmiştir ve Süpernatant uzaklaştırılmıştır. Pellet %70' lik etil alkol ile yıkanmış, 5 dakika 16000 rpm' de santrifüjlenip süpernatant uzaklaştırılmıştır. Pellet 30 dakika etüvde kurumaya bırakılmıştır. Kuruma işlemi ardından pellet 50 ul DNaz RNaz free steril su ile çözülmüştür. Elde edilen DNAlar -20 °C muhafaza edilmiştir.

3.2.3 Agaroz jel elektroforezi

Agaroz jel elektroforezi için %1' lik jel hazırlanmıştır. Agaroz jel hazırlanması için 0.5 gr agaroz 50 ml 1X TrisBorik asit-EDTA (TBE) elektroforez tamponun içerisinde mikrodalga fırın yardımıyla 2 dakika çözülmüştür. Jelin Sıcaklığı yaklaşık 40°C' ye indirlidikten sonra %4' lük 2 µL Etidyum bromit çözeltisi eklenmiş içerisinde homojen bir karışım haline getirlmiştir. Elektroforez küvetinin tarakları yerleştirildikten sonra hazırlanmış olan jel küvete aktarılmıştır ve 30-40 dakika jelin donması için bekletilmiştir. Elektroforez tankına yüzeyi kapatacak şekilde tampon çözelti 1X TBE ilave edilmiştir. Daha sonra taraklar çıkarılımıştır. -20°C' de saklanan DNA'lar çözdürülmüş ve yükleme boyası eklenerek mikropipet yardımıyla jel kuyucuklarına yüklenmiştir. 120 V'da 15 dakika yürütülen örnekler Canon G11 Jel Görüntüleme cihazına yerleştirilerek UV ışık altında 365 nm dalga boyunda fotoğrafları çekilmiş ve kaydedilmiştir.

3.2.4 Riboflavin biyosentez genleri için Touch Down polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) tabanlı tarama

Touchdown PZR Hedef dışı primer bağlanma işlemini azaltmak ve dolayısıyla PZR spesifikliğini arttırmak için kullanılan bir yöntemdir. Touchdown PCR'de, primer

bağlanma adımı için seçilen sıcaklık, hesaplanan TM değerinden 5°C-10°C daha yüksek bir değere ayarlanır. Sonraki döngülerde, bağlanma sıcaklığı yavaş yavaş azalarak PZR'nin sonunda, bağlanma sıcaklığın hesaplanan TM'nin 2°C-5°C altına iner. PZR'nin erken aşamalarında mispriming en aza indirmek için, Touchdown PZR daima bir sıcak başlatma protokolü ile birlikte gerçekleştirilmelidir(Green ve Sambrook 2018).

Bu çalışmada *Weissella confusa* suşlarında Riboflavin biyosesentezine katılan *ribF* ve *ribD* genlerinin varlığını tespit etmekiçin touchdown PZR gerçekleştirilmiştir. Rib operon bölgesi amplifikasyounda kullanılan primer çiftleri NCBI veri tabanındaki var olan riboflavin gen bölgelerine aitsekanslar baz alınarak primer 3 input programı kullanarak tasarlanmıştır. Gen bölgelerini çoğaltmak için kullanılan primerler çizegle1 de verilmiştir.

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan PZR primerleri belirlenmiştir

Gen Adı	Primer sekansı (5'-3')	Ürün büyüklüğü
Rib F	F' CTTGGGGTGGATATCGCGTA	663 bp
	R' AGCGACGTGAGACAGATTCA	
Rib D	F'TCCACGCTCCTTTGCTAGAT	335 bp
	R' CCAAATTGACGTGGGTTCCA	

Çizelge 3.2 TD PZR çalışma koşulu

Aşama	**döngü**	**Adım**	**Sıcaklık**	**zaman**
1	**1**	**1**	**95** ºC	**3.00 dk.**
2	**13**	**1**	**95** ºC	**0:30 sn.**
		2	**60** ºC	**0:30 sn.**
		3	**72** ºC	**0:30 sn.**
3	**25**	**1**	**95** ºC	**0:30 sn.**
		2	**57** ºC	**0:30 sn.**
		3	**72** ºC	**0:30 sn.**
4	**1**	**1**	**72** ºC	**10 dk.**
5	**1**	**1**	**4.0** ºC	**HOLD**

3.2.5 Riboflavin üretim miktarlarının HPLC ile belirlenmesi

Kromatografi, molekülleri yapısal farklılıklarına göre ayıran analitik bir tekniktir. Kromatografi bir numuneyi sabit faz üzerinde bir sistemde hareket ettirmesine dayanır. Kolonda, Sabit faz ile daha güçlü etkileşimler gerçekleştiren örnek bileşenleri daha

yavaş hareket eder daha zayıf etkileşimlere sahip bileşenlere kıyasla farklı bileşikler kolon boyunca hareket ettikçe birbirinden ayrılabilir(Kupiec 2004).

Riboflavin konsantrasyonunun belirlenmesi amacı ile analizinde aşağıdaki ekipman ve standart ile kimyasal yararlanmıştır

Dedektör: UV dedektör HPLC kullanıldı ve en uygun dalga boyu 270 nm olduğu tespit edildi

Mobil faz: Çalışmada iki farklı mobil faz kullanılmıştır Mobil faz A, 10 ml asetik asit 1 litre damıtılmış su karıştırlması ile hazırlanmıştır . Mobil faz B hazırlanması için (90:10 V/V) oranla, methanol ve mobil faz A karışımı kullanılmıştrı. Hazırlana her iki mobil faz 0.45 µm membran filtreden geçirilmiş ve 10 dakika boyunca sonikasyonla gazdan arındırılmıştır (HAŞİMOĞLU ve Ghodke 2018).

Kolon: Çalışmamızda Zorbex Eclipse XDB-C18 kolon kullanıldı çapı 250 mm x 4.6 mm and 5µm dır . Kolon sıcaklığı 27 C Akış hızı 1.3 ml /dk .

Dedektör: Dedektörün gönderdiği uyartılar Agilent Technologies 1260 DAD WR, G7115A OpenLab Software tarafından kaydedildi.

Vitamin B2: Çalışmada riboflavin standartı olarak Sigma –Aldrich marka %85 saflık oranına sahip ticari riboflavin kullanılmıştır. Standart stok çözeltisi hazirlanmasi için50mg riboflavin 800ml destile suda 1,2ml asetik asit ilavesiyle karıştırılmış ardindan ultrasonik banyoda çözündürülmüş ve 1 L ’ye bidestile su ile tamamlanmıştır . Stok çözeltiden seyreltilerek50,40,30,20,10 ppm’lerde standart çözeltiler hazırlanmıştır (Sıddık vd.). kalibrasyon eğrisi konsantrasyona karşılık pik yükesikliği baz alınarak belirlenmiştir.

Örneklerin HPLC analizi için hazırlanması

Riboflavin assay mediumda 24 saat 37°C'de geliştirilen 10ml aktif bakteri kültürlerinin pH'sı glasiyel asetik asit kullanılarak pH 3 olacak şekilde ayarlanımştır. Ardından 15.000 g'de15 dakika santrifüj gerçekleştirlmiştir. Daha sonra, supernatant 25 ml lik volumetrik flask aktarılmış ve pellet 5.0 ml %2 asetik asit solüsyonuyla yıkanmış ve 15.000g'de 15 dakika santrifüjlenmiştir. Pellet tamamen uzaklaştıldıktan sonra örnekler 0.22 µm membran filtreden geçirlmiş ve HPLC cihazında analiz edilmiştir(Ashoor vd. 1983). Elde edilen değerler önceden hazırlanan standart eğride yerine konarak değerlendirilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 Bakteri Kültürlerin Aktifleştirilmesi

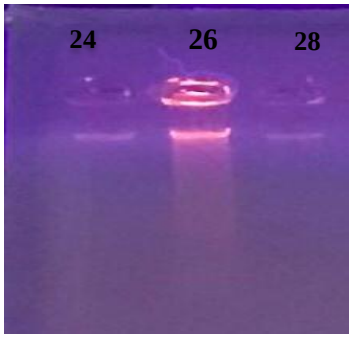
İzolatlar TGE besiyerinde 37 °C'de 24 saat geliştilrmiş ve ardından metilin mavisi ile boyanarak saflıkları control edilmiştir. Çalışmada kullanılan tüm suşlar saf olarak çalışmanın ilerleyan aşamlarında kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan suşlar çizelge 4.1 de verilmiştir .

Çizelge 4.1 Çalışmada kullanılan suşlar

Suş NO	İzolasyon Kaynağı	Bakteri cinsi
24	anne sütü	*Weissella confusa*
26	anne sütü	*Weissella confusa*
28	anne sütü	*Weissella confuse*

4.2 Genomik DNA İzolasyonu

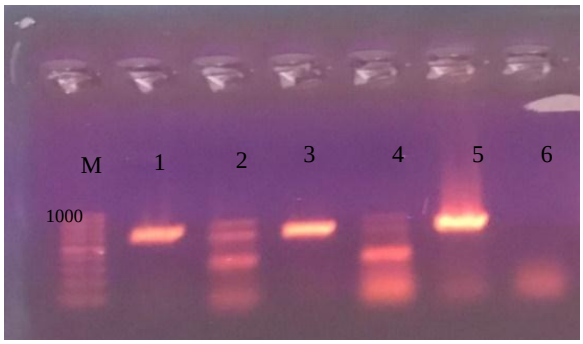
Genomik DNA izalasyonu gerçekleştirilmiş ve ardından agoz jel eletroforez de yürtülmüş analiz edilmiştir.



Şekil 4.1 *W. confuse* suşlarına ait DNA jel görüntüsü

4.3 Riboflavin Üretiminden Sorumlu Genlerin PZR ile Taranması

İzole edilen genomic DNA' lar riboflavin üretiminden sorumlu gen bölgelerinin taranması için tasarlanan spesifik primerlerin yardımı ile PZR cihazında amplifiye edilmiştir. *ribD* geninin çoğaltılması için tasarlanan primerler 335bp'lik bölgeyi, ribF geni için tasarlanan primerler ise 663bp'lik bölgeyi çoğaltacak şekilde dizayn edilmiştir. Yapılan PZR çalışması sonucunda tüm suşlarda *ribF* bölgesinin varlığı tespit edilmiş *ribD* bölgesi ise 24 ve 26 numaralı suşlarda çoğaltılabilmiş 28 numaralı suşta ise çoğaltılamamıştır. Şekil 4.2 PZR çalışmasına ait jel görüntüsü .



Şekil 4.2 TD PZR elde edilen sonuçlara ait jel görüntüleri

M: marker; 1: *W. confusa ribF* (26) ; 2:*W. Confusa ribD*(26) ;3: *W. Confusa ribF* (24); 4: *W. confusa ribD* (24) ;5: *W. Confusa ribF* (28) ; 6:*W. confusa ribD* (28).

4.4 Riboflavin Üretim Miktarlarının HPLC ile Analiz Sonucu

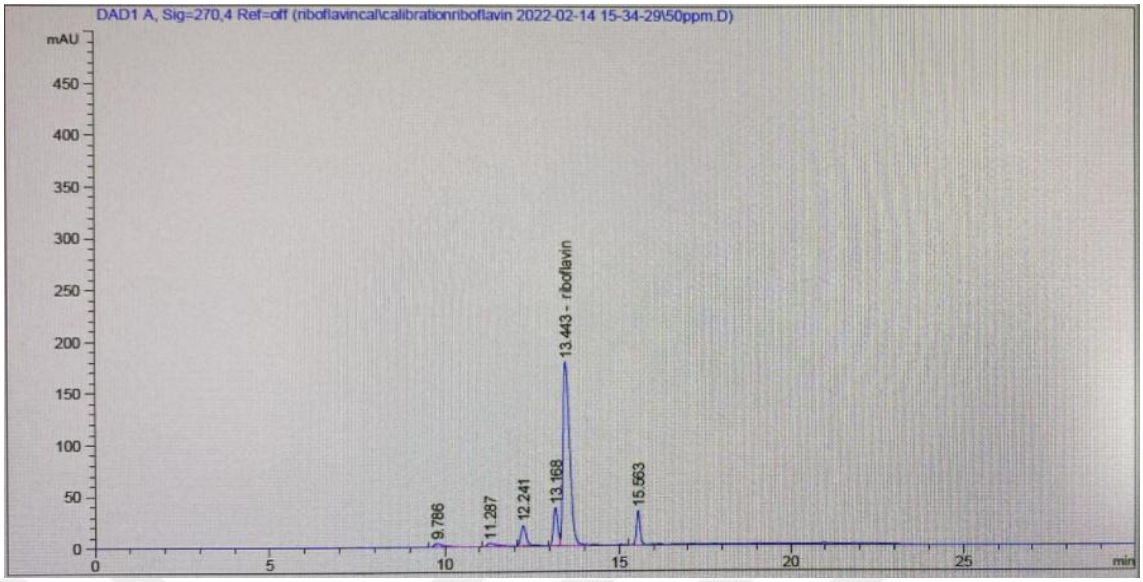
Çalışmada kullanılan suşların vitamin B2 üretim miktarları UV dedektörlü HPLC (Agilent Technologies 1260 Infinity II, United States) kullanılarak belirlenmiştir. Örnekler 20 ul olarak enjekte edilmiş ve riboflavin 30 dakikalik sürede analiz edilmiştir. Elde edilen standart çözeltisi cihazda 270 nm dalga boyunda okunmuş ve elde edilen değerler ile standart kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Oluşturulan riboflavin standart eğrisi Şekil 4.3'te verilmiştir. Standart çözeltinin konsantrasyonları ile pik alan değerleri arasındaki korelasyon katsayısı (r) 0,999 olduğu belirlenmiştir. Riboflavin 13.401 dakikada görülmüştür. Elde edilen pik alanları dikkate alınarak miktar belirleme işlemleri yapılmış ve oluşturulan linear regrasyon eğrisi denkleminden yararlanılmıştır:

$$y = 47.02595x + 6.51566.$$

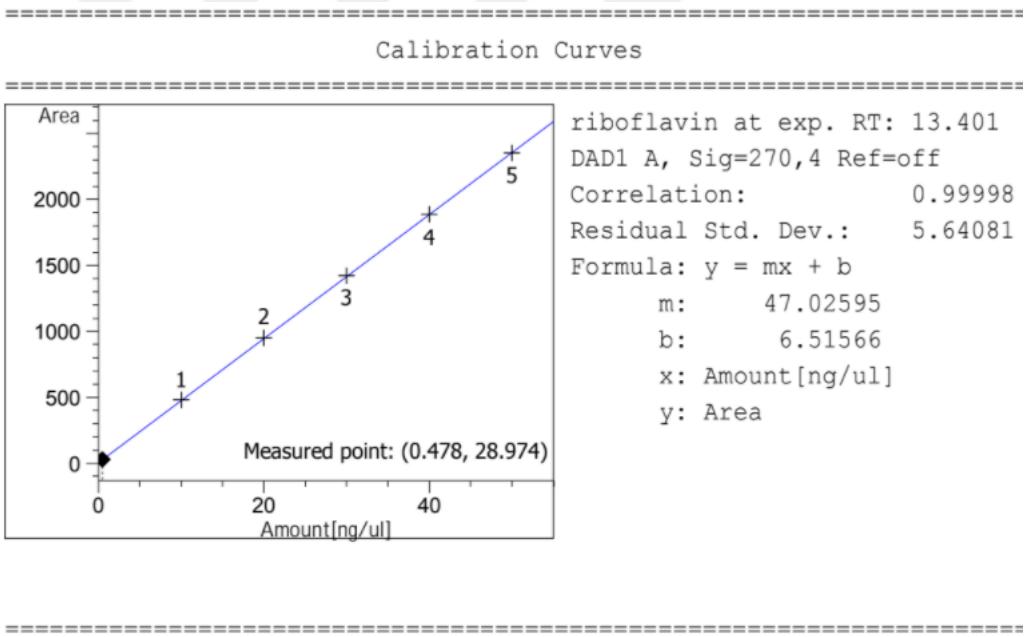
şekil 4.6,4.7.4.8'te numunelere ait vitamin B2 kromatogramları gösterilmiştir . Riboflavin standart kromatogramı şekil 4.4 gösterilmiştir. Riboflavin standart kalibrasyon eğrisi şekil 4.5'te verlmiştir. 24,26,28 numaralı örneklerde belirenen riboflavin üretim miktarı sırasıyla 0.93ng/ul , 0.87ng/ul ve 0.30 ng/ul olarak belirlenmiştir (çizegle 4.2) de . Yapılan HPLC analizleri sonucunda en iyi üretici suşun 24 numaralı suş olduğu tespit edildi.

Çizegle 4.2 örneklerin riboflavin üretim miktarları

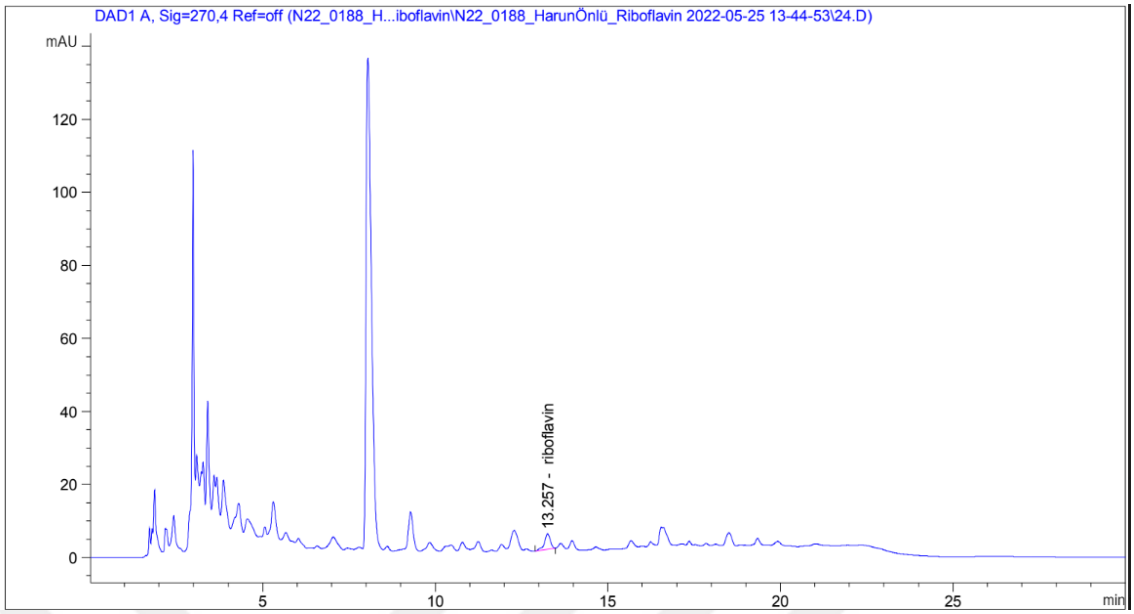
İzolat	Rıboflavin üretim miktarı ng/ul
24 *Weissella confusa* MH6	0.93
26 *Weissella confusa* MH7	0.87
28 *Weissella confuse*	0.30



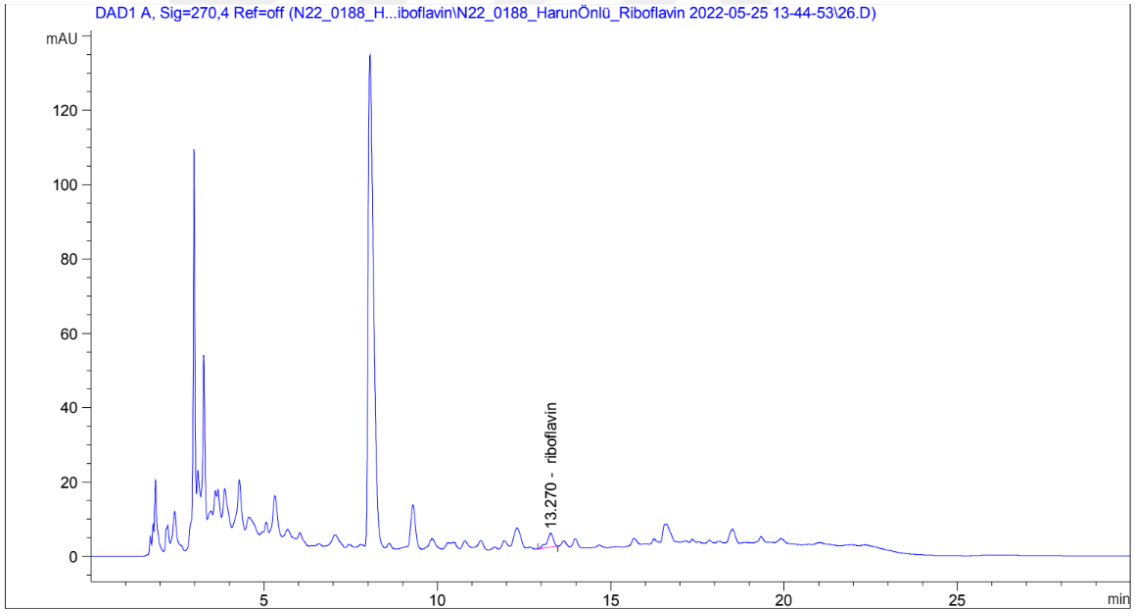
Şekil 4.4 Riboflavin standart kromatogramı



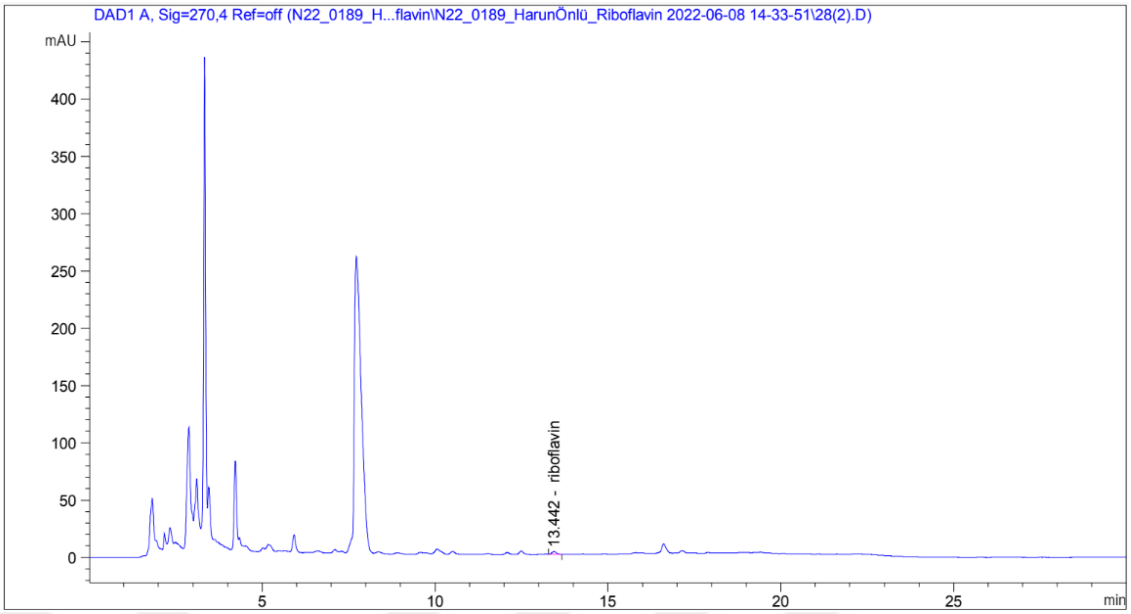
Şekil 4.5 Riboflavin standart kalibrasyon eğrisi



Şekil 4.6 24 numaralı örnekteki HPLC kromatogramı



Şekil 4.7 26 numaralı örnekteki HPLC kromatogramı



Şekil 4.8 28 numaralı örnekteki HPLC kromatogramı

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Günümüzde vitamin ihtiyacı genellikle dengeli bir diyetle yeterince karşılnmaktadır bununla birlikte bazı vitaminlerin yetersiz veya eksik tüketilmesi sağlık açısından olumsuz sonuçların ve bazı hastalıkların ortaya çıkmasına sebep olmaktadır. B2vitamini (riboflavin) flavin mononükleotid (FMN) ve flavin adenin dinükleotid(FAD) koenzimlerinin öncusü olduğu için hücresel metabolizmanın önemli bir bileşenidir(LeBlanc vd. 2011). Riboflavinin ana kaynakları süt ve süt ürünleri , et, yumurta, tahılar ve koyu yeşil sebzelerdir. Bunların yanı sıra bağırsak mikrobyatasıda B2 ihtiyacının karşlanmasına yardmcı olur. B2 vitamin eksikliği anemi ve beyin fonksiyon bozukluğu gibi sorunlara yol açabilir. Laktik asit bakterileri bağırsak mikrobiyatasının önemli üyelerinden biridir ve bazı türlerin B2 vitamin üretim yeteneğine sahiptir. LAB'ların kullnımı daha güvenilir, çvre dostu, ekonomik ve basit olduğu bilinmektedir (Burgess vd. 2009). Ancak Yapılan litaretür taraması sonucunda laktik asit bakterilerinden *Weissella confusa*'ya ait Bazı suşlarının patojen özelliğine sahip olması insan sağlığını tehdit etmektedir bu nedenle patojen etkiye sahıp suşların dikkat ile araşırlıması gerekmektedir.

Bu tez çalışmasında insan kaynaklı laktik asit bakterisi izolatların riboflavin üretim miktarları araştırlmıştır. Bu amaç doğrultusunda genomik DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Daha sonra, spesifik primer kullanılarak *RibF* ve *RibD* genlerinin varlığı TD PZR ile doğrulanmıştır. Yapılan PZR çalışması sonucunda tüm suşlarda *ribF* bölgesinin varlığı tespit edilmiş *ribD* bölgesi ise 24 ve 26 numaralı suşlarda çoğaltılabilmiş 28 numaralı suşta ise çoğaltılamamıştır. 28 numaralı izolatta *rib D* geninin tespit edilememesi primerlerin ilgli gen bölgesine bağlanmamış olma ihtimali söz konusudur.

Yapılan litaretür taraması sonucunda LAB' larda Riboflavin biyosentez yeteneğinin suşa özgü olduğu tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda LAB'ların bazı suşlarında rib operonlarının bazı gen bölgelerinin eksik olduğu tespit edilmiştir. *Lactobacillus plantarum* WCFS1'in sekanslanmış genomunda rib operonunun *rib G* ve *ribB* gen bölgelerinin eksik olduğu görülmüştür (Kleerebezem ve Boekhorst 2003).

Çalışmada kullanılan suşların riboflavin üretim miktarlarin belirlenmesi için riboflavin assay medium içerisinde 37°C'de 24 saat geliştirilen suşların supernatantları riboflavin izolasyonu için kullanılmış ve HPLC cihazında üretim miktarları belirlenmiştir.suşların üretim miktarları 0.93,0.87ve 0.30 ng/ul olarak tepit edilmiştir. Thakur ve ark., tarafından yapılan çalışmada *L. fermentum* KTLF1 suşunun 2.36mg/L ve *L. plantarum* KTLP13 suşunun ise 2.13mg/L riboflavin ürettiği tespit edilmiştir (Thakur ve Tomar 2015). Del valle ve ark. Yapmış oldukları çalışmada soya sütünde B2 vitamini üreticisi 179 laktik asit bakterisinin üretim kapasitelerini araştırmış ve yüksek üretim kapastesine sahip beş adet suşun tespit edildiğini bildirmiştir (del Valle vd. 2014). Bu suşların gıda matrisinde büyümesinin değerlendirilmesi ve düşük riboflavin konsantrasyonun arttırlması için soya sütüne aşlanmıştır. Bu suşlardan yanlızca *L. plantarum* CRL 725 suşun soya sütündeki riboflavin başlangıç konsantrasyonunu 309±9ng/mL den 700 ± 20ng/ml kadar artıradığı görülmüştür. Yapmış oldukları çalışmada riboflavin bakımında zengin ekmek üretmek için yüksek riboflavin üretme kapastesine sahip rezeoflavin dirençli *L.fermentum* mutantlarını kullanmış ve üretim miktarlarını 1mg/L üzerinde olduğunu bildirmişlerdir.(Russo vd. 2014) Mikroorganizmalar riboflavin üretim miktarına göre üç gruba ayrılmaktadır: Zayıf yaklaşık 10 mg/L , orta > 600 mg/L ve güçlü > 10 g/L üretim kabilyetine sahip olanlar(Averianova vd. 2020). Laktik asit bakterileri B2 üretimi oldukça düşük olduğundan genellikle 10 mg/l'den fazla değil RF'nin aşırı üreticisi değildir (Liu vd. 2020).Sonuç olarak bu çalışmada kullanılan *Weissella confusa* izolatlarının riboflavin üretim miktarları değerlendrildiğinde. suşlarının zayıf riboflavin üretim kabilyeti gösterdiği belirlenmiştir.Bu üretim miktarı farklı teknikler kullanılarak geliştirilebilir.

KAYNAKLAR

Abbas, C. A., & Sibirny, A. A. (2011). Genetic control of biosynthesis and transport of riboflavin and flavin nucleotides and construction of robust biotechnological producers. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *75*(2), 321-360.

Additives, E. P. o., Feed, P. o. S. u. i. A., Rychen, G., Aquilina, G., Azimonti, G., Bampidis, V., Bastos, M. d. L., Bories, G., Chesson, A., Flachowsky, G., & Gropp, J. (2018). Safety of vitamin B2 (80%) as riboflavin produced by Bacillus subtilis KCCM- 10445 for all animal species. *EFSA Journal*, *16*(3), e05223.

Agte, V., Paknikar, K., & Chiplonkar, S. (1998). Effect of riboflavin supplementation on zinc and iron absorption and growth performance in mice. *Biological trace element research*, *65*(2), 109-115.

Alosta, H. A. (2007). *Riboflavin production by encapsulated Candida flareri*. Oklahoma State University.

Ashoor, S., Seperich, G., Monte, W., & Welty, J. (1983). HPLC determination of riboflavin in eggs and dairy products. *Journal of Food Science*, *48*(1), 92-94.

Averianova, L. A., Balabanova, L. A., Son, O. M., Podvolotskaya, A. B., & Tekutyeva, L. A. (2020). Production of vitamin B2 (riboflavin) by microorganisms: An overview. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 1172.

Bacher, A., Eberhardt, S., Fischer, M., Kis, K., & Richter, G. (2000). Biosynthesis of vitamin b2 (riboflavin). *Annual review of nutrition*, *20*(1), 153-167.

Balasubramanian, R., Levinson, B. T., & Rosenzweig, A. C. (2010). Secretion of flavins by three species of methanotrophic bacteria. *Applied and environmental microbiology*, *76*(21), 7356-7358.

Beztsinna, N., Solé, M., Taib, N., & Bestel, I. (2016). Bioengineered riboflavin in nanotechnology. *Biomaterials*, *80*, 121-133. https://doi.org/10.1016/j. biomaterials.2015.11.050

Blanck, H. M., Bowman, B. A., Serdula, M. K., Khan, L. K., Kohn, W., Woodruff, B. A., & Group, B. R. I. (2002). Angular stomatitis and riboflavin status among adolescent Bhutanese refugees living in southeastern Nepal. *The American journal of clinical nutrition*, *76*(2), 430-435.

Breaker, R. R. (2018). Riboswitches and translation control. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, *10*(11), a032797.

Bresler, S., SE, B., EA, G., TP, C., & TN, S. (1973). L'operon riboflavine chez bacillus subtilus. v. flavin monocleotide et flavin-adenine dinucleotide,effecteurs de l'operon 'riboflavin.

Brutinel, E. D., Dean, A. M., & Gralnick, J. A. (2013). Description of a riboflavin biosynthetic gene variant prevalent in the phylum Proteobacteria. *Journal of bacteriology*, *195*(24), 5479-5486.

Brutinel, E. D., & Gralnick, J. A. (2012). Shuttling happens: soluble flavin mediators of extracellular electron transfer in Shewanella. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *93*(1), 41-48.

Buckel, W., & Thauer, R. K. (2018). Flavin-based electron bifurcation, a new mechanism of biological energy coupling. *Chemical reviews*, *118*(7), 3862-3886.

Buehler, B. A. (2011). Vitamin B2: riboflavin. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, *16*(2), 88-90.

Burgess, C., O'Connell-Motherway, M., Sybesma, W., Hugenholtz, J., & van Sinderen, D. (2004). Riboflavin production in Lactococcus lactis: potential for in situ production of vitamin-enriched foods. *Applied and environmental microbiology*, *70*(10), 5769-5777. https://doi.org/10.1128/aem.70.10.5769-5777.2004

Burgess, C. M., Slotboom, D. J., Geertsma, E. R., Duurkens, R. H., Poolman, B., & van Sinderen, D. (2006). The riboflavin transporter RibU in Lactococcus lactis: molecular characterization of gene expression and the transport mechanism. *Journal of bacteriology*, *188*(8), 2752-2760.

Burgess, C. M., Smid, E. J., & van Sinderen, D. (2009). Bacterial vitamin B2, B11 and B12 overproduction: an overview. *International journal of food microbiology*, *133*(1-2), 1-7.

Capozzi, V., Menga, V., Digesu, A. M., De Vita, P., van Sinderen, D., Cattivelli, L., Fares, C., & Spano, G. (2011). Biotechnological production of vitamin B2-enriched bread and pasta. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*(14), 8013-8020.

Capozzi, V., Russo, P., Dueñas, M. T., López, P., & Spano, G. (2012). Lactic acid bacteria producing B-group vitamins: a great potential for functional cereals products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *96*(6), 1383-1394.

Dalton, S. D., & Rahimi, A. R. (2001). Emerging role of riboflavin in the treatment of nucleoside analogue-induced type B lactic acidosis. *AIDS patient care and STDs*, *15*(12), 611-614.

De Lourdes Samaniego-Vaesken, M., Alonso-Aperte, E., & Varela-Moreiras, G. (2012). Vitamin food fortification today. *Food & nutrition research*, *56*(1), 5459.

Del Valle, M. J., Laiño, J. E., de Giori, G. S., & LeBlanc, J. (2014). Riboflavin producing lactic acid bacteria as a biotechnological strategy to obtain bio-enriched soymilk. *Food Research International*, *62*, 1015-1019.

Demain, A. L. (1972). Riboflavin oversynthesis. *Annu Rev Microbiol*, *26*, 369-388. https://doi.org/10.1146/annurev.mi.26.100172.002101

Dmytruk, K., Lyzak, O., Yatsyshyn, V., Kluz, M., Sibirny, V., Puchalski, C., & Sibirny, A. (2014). Construction and fed-batch cultivation of Candida famata with enhanced riboflavin production. *Journal of Biotechnology*, *172*, 11-17.

Duurkens, R. H., Tol, M. B., Geertsma, E. R., Permentier, H. P., & Slotboom, D. J. (2007). Flavin binding to the high affinity riboflavin transporter RibU. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(14), 10380-10386.

Edwards, A. M. (2014). Structure and general properties of flavins. *Flavins and Flavoproteins*, 3-13.

Foley, A. R., Menezes, M. P., Pandraud, A., Gonzalez, M. A., Al-Odaib, A., Abrams, A. J., Sugano, K., Yonezawa, A., Manzur, A. Y., & Burns, J. (2014). Treatable childhood neuronopathy caused by mutations in riboflavin transporter RFVT2. *Brain*, *137*(1), 44-56.

García-Angulo, V. A. (2017). Overlapping riboflavin supply pathways in bacteria. *Critical reviews in microbiology*, *43*(2), 196-209.

García Angulo, V. A., Bonomi, H. R., Posadas, D. M., Serer, M. I., Torres, A. G., Zorreguieta, Á., & Goldbaum, F. A. (2013). Identification and characterization of RibN, a novel family of riboflavin transporters from Rhizobium leguminosarum and other proteobacteria. *Journal of bacteriology*, *195*(20), 4611-4619.

Gelfand, M. S., Mironov, A. A., Jomantas, J., Kozlov, Y. I., & Perumov, D. A. (1999). A conserved RNA structure element involved in the regulation of bacterial riboflavin synthesis genes. *Trends in Genetics*, *15*(11), 439-442.

Green, M. R., & Sambrook, J. (2018). Touchdown Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cold Spring Harb Protoc*, *2018*(5). https://doi.org/10.1101/pdb.prot095133

Gusarov, I., Kreneva, R., Podcharniaev, D., IuV, I., Abalakina, E., Stoĭnova, N., Perumov, D., & IuI, K. (1997). Riboflavin biosynthetic genes in Bacillus amyloliquefaciens: primary structure, organization and regulation of activity. *Molekuliarnaia biologiia*, *31*(3), 446-453.

Gusarov, I., Kreneva, R., Rybak, K., Podcherniaev, D., IuV, I., Kolibaba, L., Polanuer, B., IuI, K., & Perumov, D. (1997). Primary structure and functional activity of the Bacillus subtilis ribC gene. *Molekuliarnaia biologiia*, *31*(5), 820-825.

Haase, I., Gräwert, T., Illarionov, B., Bacher, A., & Fischer, M. (2014). Recent advances in riboflavin biosynthesis. *Flavins and Flavoproteins*, 15-40.

Haşimoğlu, A., & Ghodke, S. B. (2018). A novel RP-HPLC method for simultaneous determination of vitamins B 1, B 2, B 3, B 6 and C in oral powder for veterinary consumption. *Marmara Pharmaceutical Journal*, *22*(4).

Hill, M. (1997). Intestinal flora and endogenous vitamin synthesis. *European journal of cancer prevention: the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*, *6*, S43-45.

Institute of Medicine Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference, I., its Panel on Folate, O. B. V., & Choline. (1998). The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health. In *Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B(6), Folate, Vitamin B(12), Pantothenic Acid, Biotin, and Choline*. National Academies Press (US)Copyright © 1998, National Academy of Sciences. https://doi.org/10.17226/6015

Jankowitsch, F., Schwarz, J., Rückert, C., Gust, B., Szczepanowski, R., Blom, J., Pelzer, S., Kalinowski, J., & Mack, M. (2012). Genome sequence of the bacterium Streptomyces davawensis JCM 4913 and heterologous production of the unique antibiotic roseoflavin. *Journal of bacteriology*, *194*(24), 6818-6827.

Jiménez, A., Santos, M. A., Pompejus, M., & Revuelta, J. L. (2005). Metabolic engineering of the purine pathway for riboflavin production in Ashbya gossypii. *Appl Environ Microbiol*, *71*(10), 5743-5751. https://doi.org/10.1128/aem.71.10.5743-5751.2005

Kato, T., & Park, E. Y. (2012). Riboflavin production by Ashbya gossypii. *Biotechnology letters*, *34*(4), 611-618.

Khan, M. T., Duncan, S. H., Stams, A. J., Van Dijl, J. M., Flint, H. J., & Harmsen, H. J. (2012). The gut anaerobe Faecalibacterium prausnitzii uses an extracellular electron shuttle to grow at oxic–anoxic interphases. *The ISME journal*, *6*(8), 1578-1585.

Kleerebezem, M., & Boekhorst, R. (2003). van Kranenburg, D. Molenaar, OP Kuipers, R. *Leer, R. Tarchini, SA Peters, HM Sandbrink, MW Fiers, W. Stiekema, RM Lankhorst, PA Bron, SM Hoffer, MN Groot, R. Kerkhoven, M. de Vries, B. Ursing, WM de Vos, and RJ Siezen*, 1990-1995.

Koizumi, S., Yonetani, Y., Maruyama, A., & Teshiba, S. (2000). Production of riboflavin by metabolically engineered Corynebacterium ammoniagenes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *53*(6), 674-679.

Kotloski, N. J., & Gralnick, J. A. (2013). Flavin electron shuttles dominate extracellular electron transfer by Shewanella oneidensis. *MBio*, *4*(1), e00553-00512.

Kupiec, T. (2004). Quality-control analytical methods: High-performance liquid chromatography. *International journal of pharmaceutical compounding*, *8*, 223-227.

Kurth, R., Paust, J., & Hanlein, W. . (1996). Riboflavin. pp. 521–530. . *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Weinheim, Germany: Wiley-VCH.*

Laiño, J. E., Juarez del Valle, M., Savoy de Giori, G., & LeBlanc, J. G. J. (2013). Development of a high folate concentration yogurt naturally bio-enriched using selected lactic acid bacteria. *LWT - Food Science and Technology*, *54*(1), 1-5. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.05.035

LeBlanc, J., Laiño, J. E., del Valle, M. J., Vannini, V., van Sinderen, D., Taranto, M. P., de Valdez, G. F., de Giori, G. S., & Sesma, F. (2011). B- Group vitamin production by lactic acid bacteria–current knowledge and potential applications. *Journal of applied microbiology*, *111*(6), 1297-1309.

LeBlanc, J. G., Taranto, M. P., Molina, V., & Sesma, F. (2010). B-group vitamins production by probiotic lactic acid bacteria. *Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel applications*, 211-232.

Lin, Z., Xu, Z., Li, Y., Wang, Z., Chen, T., & Zhao, X. (2014). Metabolic engineering of Escherichia coli for the production of riboflavin. *Microbial cell factories*, *13*(1), 1-12.

Liu, S., Hu, W., Wang, Z., & Chen, T. (2020). Production of riboflavin and related cofactors by biotechnological processes. *Microb Cell Fact*, *19*(1), 31. https://doi.org/10.1186/s12934-020-01302-7

Liu, S., Kang, P., Cui, Z., Wang, Z., & Chen, T. (2016). Increased riboflavin production by knockout of 6-phosphofructokinase I and blocking the Entner–Doudoroff pathway in Escherichia coli. *Biotechnology letters*, *38*(8), 1307-1314.

Mack, M., van Loon, A. P., & Hohmann, H.-P. (1998). Regulation of riboflavin biosynthesis in Bacillus subtilis is affected by the activity of the flavokinase/flavin adenine dinucleotide synthetase encoded by ribC. *Journal of bacteriology*, *180*(4), 950-955.

Mandal, M., & Breaker, R. R. (2004). Gene regulation by riboswitches. *Nature reviews Molecular cell biology*, *5*(6), 451-463.

Marsili, E., Baron, D. B., Shikhare, I. D., Coursolle, D., Gralnick, J. A., & Bond, D. R. (2008). Shewanella secretes flavins that mediate extracellular electron transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(10), 3968-3973.

Marsili, E., Baron, D. B., Shikhare, I. D., Coursolle, D., Gralnick, J. A., & Bond, D. R. (2008). Shewanella secretes flavins that mediate extracellular electron transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *105*(10), 3968-3973. https://doi.org/10.1073/pnas.0710525105

McAnulty, M. J., & Wood, T. K. (2014). YeeO from Escherichia coli exports flavins. *Bioengineered*, *5*(6), 386-392.

McKethan, B. L., & Spiro, S. (2013). Cooperative and allosterically controlled nucleotide binding regulates the DNA binding activity of NrdR. *Molecular microbiology*, *90*(2), 278-289.

Mironov, A. S., Gusarov, I., Rafikov, R., Lopez, L. E., Shatalin, K., Kreneva, R. A., Perumov, D. A., & Nudler, E. (2002). Sensing small molecules by nascent RNA: a mechanism to control transcription in bacteria. *Cell*, *111*(5), 747-756.

Mironov, V. (1989). Genes of riboflavin biosynthesis of Bacillus subtilis: complete primary structure and model of organization. Dokl. Akad. Nauk SSSR,

Newman, D. K., & Kolter, R. (2000). A role for excreted quinones in extracellular electron transfer. *Nature*, *405*(6782), 94-97.

Nielsen, P., Neuberger, G., Fujii, I., Bown, D. H., Keller, P. J., Floss, H. G., & Bacher, A. (1986). Biosynthesis of riboflavin. Enzymatic formation of 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine from pentose phosphates. *Journal of Biological Chemistry*, *261*(8), 3661-3669. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)35698-3

Northrop-Clewes, C. A., & Thurnham, D. I. (2012). The discovery and characterization of riboflavin. *Annals of Nutrition and Metabolism*, *61*(3), 224-230.

O'brien, M., Kiely, M., Harrington, K., Robson, P., Strain, J., & Flynn, A. (2001). The North/South Ireland food consumption survey: vitamin intakes in 18–64-year-old adults. *Public health nutrition*, *4*(5a), 1069-1079.

Perkins, J., Pero, J., & Sloma, A. (1991a). European Patent Application No. 0405370.

Perkins, J., Pero, J., & Sloma, A. (1991b). Riboflavin overproducing strains of bacteria. *European patent application*, *405370*, 1991-1901.

Perkins, J., Sloma, A., Hermann, T., Theriault, K., Zachgo, E., Erdenberger, T., Hannett, N., Chatterjee, N., Williams II, V., & Rufo Jr, G. (1999). Genetic engineering of Bacillus subtilis for the commercial production of riboflavin. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *22*(1), 8-18.

Perkins, J. B., & Pero, J. (2001). Vitamin biosynthesis. *Bacillus subtilis and its closest relatives: from genes to cells*, 271-286.

Perkins, J. B., & Pero, J. G. (1993). Biosynthesis of riboflavin, biotin, folic acid, and cobalamin. *Bacillus subtilis and other gram-positive bacteria: Biochemistry, physiology, and molecular genetics*, 319-334.

Perlman, D. (1979). Chapter 16 - Microbial Process for Riboflavin Production. In H. J. Peppler & D. Perlman (Eds.), *Microbial Technology (Second Edition)* (pp. 521-527). Academic Press. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-551501-6.50021-8

Revuelta, J. L., Ledesma-Amaro, R., & Jiménez, A. (2016). Industrial production of vitamin B2 by microbial fermentation. *Industrial biotechnology of vitamins, biopigments, and antioxidants*, 17-40.

Revuelta, J. L., Ledesma-Amaro, R., Lozano-Martinez, P., Díaz-Fernández, D., Buey, R. M., & Jiménez, A. (2017). Bioproduction of riboflavin: a bright yellow history. *J Ind Microbiol Biotechnol*, *44*(4-5), 659-665. https://doi.org/10.1007/s10295-016-1842-7

Richter, G., Fischer, M., Krieger, C., Eberhardt, S., Lüttgen, H., Gerstenschläger, I., & Bacher, A. (1997). Biosynthesis of riboflavin: characterization of the bifunctional deaminase-reductase of Escherichia coli and Bacillus subtilis. *Journal of bacteriology*, *179*(6), 2022-2028.

Richter, G., Ritz, H., Katzenmeier, G., Volk, R., Kohnle, A., Lottspeich, F., Allendorf, D., & Bacher, A. (1993). Biosynthesis of riboflavin: cloning, sequencing, mapping, and expression of the gene coding for GTP cyclohydrolase II in Escherichia coli. *Journal of bacteriology*, *175*(13), 4045-4051.

Russo, P., Capozzi, V., Arena, M. P., Spadaccino, G., Dueñas, M. T., López, P., Fiocco, D., & Spano, G. (2014). Riboflavin-overproducing strains of Lactobacillus fermentum for riboflavin-enriched bread. *Appl Microbiol Biotechnol*, *98*(8), 3691-3700. https://doi.org/10.1007/s00253-013-5484-7

Rychen, G., Aquilina, G., Azimonti, G., Bampidis, V., Bastos, M. d. L., Bories, G., Chesson, A. L., Cocconcelli, P. S., Flachowsky, G., Gropp, J., Kolar, B., Kouba, M., López-Alonso, M., López Puente, S., Mantovani, A., Mayo, B., Ramos, F., Saarela, M., Villa, R. E., . . . Wallace, R. J. (2018). Safety and efficacy of vitamin B2 (riboflavin) produced by Ashbya gossypii ■■■■■ for all animal species based on a dossier submitted by BASF SE. *EFSA Journal*, *16*.

Schallmey, M., Singh, A., & Ward, O. P. (2004). Developments in the use of Bacillus species for industrial production. *Can J Microbiol*, *50*(1), 1-17. https://doi.org/10.1139/w03-076

Schetzek, S., Heinen, F., Kruse, S., Borggraefe, I., Bonfert, M., Gaul, C., Gottschling, S., & Ebinger, F. (2013). Headache in children: update on complementary treatments. *Neuropediatrics*, *44*(01), 025-033.

Sengupta, S., Kaufmann, A., & Chandra, T. (2012). Development of fluorescent reporter tagged RIB gene cassettes for replicative transformation, early expression, and enhanced riboflavin production in Eremothecium ashbyi. *Fungal biology*, *116*(10), 1042-1051.

Sherwood, M., & Goldman, R. D. (2014). Effectiveness of riboflavin in pediatric migraine prevention. *Canadian Family Physician*, *60*(3), 244-246.

Shi, Z., Zhen, S., Wittert, G. A., Yuan, B., Zuo, H., & Taylor, A. W. (2014). Inadequate riboflavin intake and anemia risk in a Chinese population: five-year follow up of the Jiangsu Nutrition Study. *PLoS One*, *9*(2), e88862.

Sıddık, G., AKALIN, S., & DİNKÇİ, N. Bazı Süt Ürünlerindeki Riboflavin Miktarlarının Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, *40*(2).

Song, J., Ji, C., & Zhang, J. Z. (2013). Unveiling the gating mechanism of ECF transporter RibU. *Scientific reports*, *3*(1), 1-7.

Sorokin, A., Zumstein, E., Azevedo, V., Ehrlich, S. D., & Serror, P. (1993). The organization of the Bacillus subtilis 168 chromosome region between the spoVA and serA genetic loci, based on sequence data. *Molecular microbiology*, *10*(2), 385-395.

Stahmann, K. P., Revuelta, J. L., & Seulberger, H. (2000). Three biotechnical processes using Ashbya gossypii, Candida famata, or Bacillus subtilis compete with chemical riboflavin production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *53*(5), 509-516. https://doi.org/10.1007/s002530051649

Survase, S., Bajaj, I., & Singhal, R. (2006). Biotechnological Production of Vitamins. *Food Technology and Biotechnology*, *44*.

Thakur, K., & Tomar, S. (2015). Exploring Indigenous Lactobacillus Species from Diverse Niches for Riboflavin Production. *Journal of Young Pharmacists*, *7*, 122-127. https://doi.org/10.5530/jyp.2015.2.11

Thakur, K., Tomar, S. K., & De, S. (2016). Lactic acid bacteria as a cell factory for riboflavin production. *Microb Biotechnol*, *9*(4), 441-451. https://doi.org/10.1111/1751-7915.12335

The United Kigdom Comptition, C. (2001). BASF and Takeda Chemical Industries Ltd: A Report on the Acquisition by BASF AG of Certain Assets of Takeda Chemical Industries Ltd. In: UK Competition Commission London.

Van Loon, A. P., Hohmann, H.-P., Bretzel, W., Hümbelin, M., & Pfister, M. (1996). Development of a fermentation process for the manufacture of riboflavin. *CHIMIA International Journal for Chemistry*, *50*(9), 410-412.

Vitreschak, A. G., Rodionov, D. A., Mironov, A. A., & Gelfand, M. S. (2002). Regulation of riboflavin biosynthesis and transport genes in bacteria by transcriptional and translational attenuation. *Nucleic acids research*, *30*(14), 3141-3151.

Vogl, C., Grill, S., Schilling, O., Stülke, J. r., Mack, M., & Stolz, J. r. (2007). Characterization of riboflavin (vitamin B2) transport proteins from Bacillus subtilis and Corynebacterium glutamicum. *Journal of bacteriology*, *189*(20), 7367-7375.

Wickerham, L. J., Flickinger, M. H., & Johnston, R. M. (1946). The production of riboflavin by Ashbya gossypii. *Arch Biochem*, *9*, 95-98.

Winkler, W. C., Cohen-Chalamish, S., & Breaker, R. R. (2002). An mRNA structure that controls gene expression by binding FMN. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*(25), 15908-15913.

Wolf, R., Reiff, F., Wittmann, R., & Butzke, J. (1983). Verfahren zur Herstellung von Riboflavin. *Patent EP 0*, *20*(959), B1.

Wrong, O. M. (1981). *The large intestine : its role in mammalian nutrition and homeostasis / O.M. Wrong, C.J. Edmonds, V.S. Chadwick*. MTP.

Zhang, J.-R., Ge, Y.-Y., Liu, P.-H., Wu, D.-T., Liu, H.-Y., Li, H.-B., Corke, H., & Gan, R.-Y. (2021). Biotechnological Strategies of Riboflavin Biosynthesis in Microbes. *Engineering*.

Zhang, P., Wang, J., & Shi, Y. (2010). Structure and mechanism of the S component of a bacterial ECF transporter. *Nature*, *468*(7324), 717-720.

EKLER

EK 1 Bakteri Kültür Ortamlarinin Gelşimi için Kullanilan Besiyeri

EK 2 Tampon ve çözeltiler

EK 3 Moleküler markörler

EK 4 Örneklere ait HPLC kromatogramları detayli şekilde verilmiştir

EK 1 Bakteri Kültür Ortamlarinin Gelşimi için Kullanilan Besiyeri

TGE (Tripton, Glukoz, Maya Ekstraktı) Besiyeri BileĢen Miktar (g/L)

Tripton	10 g /L
Glukoz	10 g/L
Maya ekstraktı	10 g/L
Tween-80	1 g /L
MgSO4.7H2O	0.05 g/L
MnSO4.4H2O	0.05 g/L

EK 2 Tampon ve Çözeltiler

ETİDYUM BROMİT ÇÖZELTİSİ içerik % g

Etidyum bromit	1.0
Distile su	100 ml

bileşnler çözüldükten sonra 0.22 μm çapındaki membran filtreden geçirilmiş ve + 4 °C de stok olarak saklanımıştır.

%1' lik agaroz jel

Agaroz	1 gr
1X TBE	100 Ml bgb
EtBr	4 μm

SPHEROBLAST TAMPONU içerik % g

Sükroz	10
Lizozim	2
RNaz A	0,4

25 mM Tris (pH: 8,4)

25 mM EDTA (pH: 8)

Bu bilesenler çözülerek 0.22 μm çapındaki Sartorius membran filtreden geçirilir ve - 20 °C" de stok olarak saklanır.

N3 TAMPONU İçerik % mL

5 M Sodyum asetat	60
Asetik asit	11,5
Distile su	28,5

Lizis TAMPON 1

% 5 SDS çözeltisi

Lizis TAMPON 2

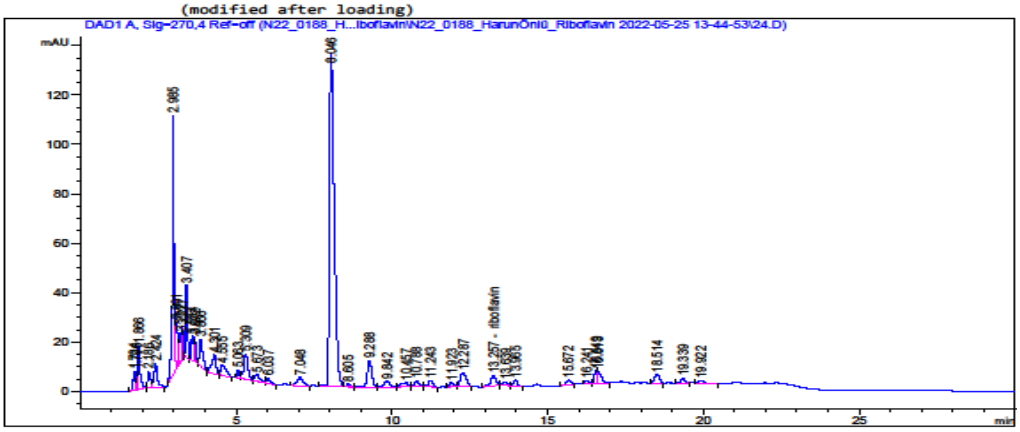
5 M NaCl çözeltisi

EK 3 Moleküler markörler

DNA Analizinde Kullanilan Moleküler Marker Marka: Bio Basic 100-1000bp DNA Marker

EK 4 Örneklere ait HPLC kromatogramları detayli şekilde verilmiştir

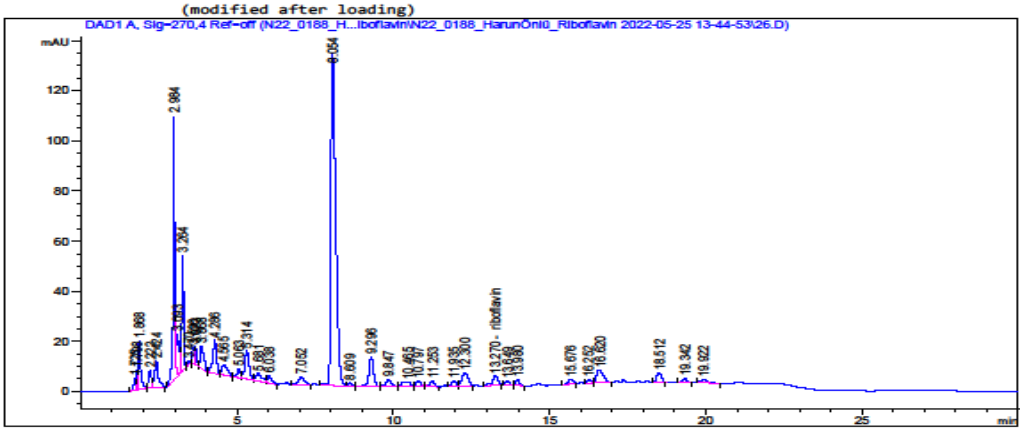
```
Data File C:\Chem32\...ü_Riboflavin\N22_0188_HarunÖnlü_Riboflavin 2022-05-25 13-44-53\24.D
Sample Name: 24

    ==================================================================
    Acq. Operator   : SYSTEM                          Seq. Line :   6
    Acq. Instrument : hplc                             Location :   P1-A-06
    Injection Date  : 25/05/2022 16:46:40                   Inj :   1
                                                     Inj Volume : 20.000 µl
    Acq. Method     : C:\Chem32\1\Data\N22_0188_HarunÖnlü_Riboflavin\N22_0188_HarunÖnlü_
                      Riboflavin 2022-05-25 13-44-53\riboflavinn.M
    Last changed    : 25/05/2022 13:44:49 by SYSTEM
    Analysis Method : C:\Chem32\1\Data\N22_0188_HarunÖnlü_Riboflavin\N22_0188_HarunÖnlü_
                      Riboflavin 2022-05-25 13-44-53\riboflavinn.M (Sequence Method)
    Last changed    : 26/05/2022 11:54:25 by SYSTEM
                      (modified after loading)
```




```
    ==================================================================
                          External Standard Report
    ==================================================================

    Sorted By              :      Signal
    Calib. Data Modified   :      15 February 2022 12:40:23
    Multiplier             :      1.0000
    Dilution               :      1.0000
    Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

    Signal 1: DAD1 A, Sig=270,4 Ref=off

    RetTime  Type     Area     Amt/Area    Amount   Grp   Name
     [min]          [mAU*s]               [ng/ul]
    -------|------|----------|----------|----------|--|------------------
     13.257 BB       50.15481 1.85023e-2 9.27980e-1    riboflavin

    Totals :                              9.27980e-1


    1 Warnings or Errors :

hplc 26/05/2022 11:55:59 SYSTEM                                    Page   1 of 2
```

Data File C:\Chem32\...ü_Riboflavin\N22_0188_HarunÖnlü_Riboflavin 2022-05-25 13-44-53\26.D
Sample Name: 26

Acq. Operator	: SYSTEM	Seq. Line	: 7
Acq. Instrument	: hplc	Location	: P1-A-07
Injection Date	: 25/05/2022 17:22:47	Inj	: 1
		Inj Volume	: 20.000 µl
Acq. Method	: C:\Chem32\1\Data\N22_0188_HarunÖnlü_Riboflavin\N22_0188_HarunÖnlü_Riboflavin 2022-05-25 13-44-53\riboflavinn.M		
Last changed	: 25/05/2022 13:44:49 by SYSTEM		
Analysis Method	: C:\Chem32\1\Data\N22_0188_HarunÖnlü_Riboflavin\N22_0188_HarunÖnlü_Riboflavin 2022-05-25 13-44-53\riboflavinn.M (Sequence Method)		
Last changed	: 26/05/2022 11:54:25 by SYSTEM (modified after loading)		



External Standard Report

Sorted By : Signal
Calib. Data Modified : 15 February 2022 12:40:23
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=270,4 Ref=off

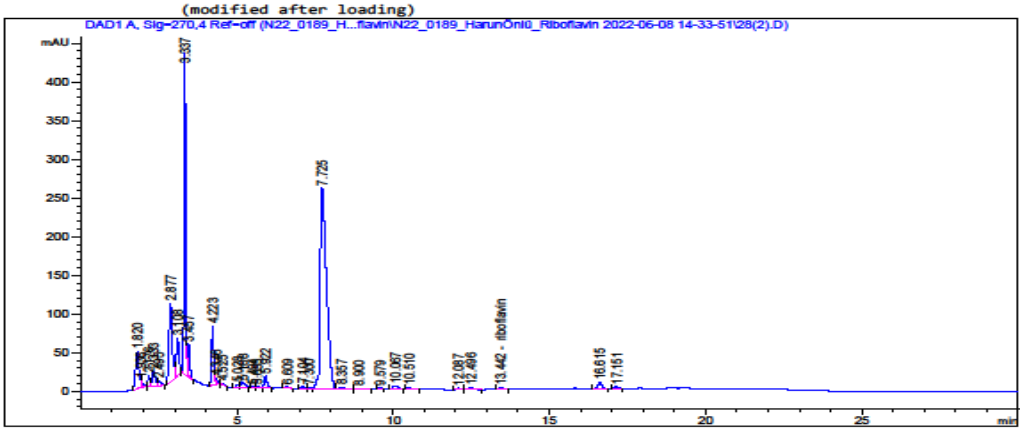
RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [ng/ul]	Grp	Name
13.270	BB	47.27268	1.83339e-2	8.66692e-1		riboflavin

Totals : 8.66692e-1

1 Warnings or Errors :

Data File C:\Chem32\...iboflavin\N22_0189_HarunÖnlü_Riboflavin 2022-06-08 14-33-51\28(2).D
Sample Name: 28(2)

```
Acq. Operator    : SYSTEM                          Seq. Line :   3
Acq. Instrument  : hplc                             Location :   P1-A-03
Injection Date   : 08/06/2022 15:47:18                  Inj :   1
                                                  Inj Volume : 20.000 µl
Acq. Method      : C:\Chem32\1\Data\N22_0189_HarunÖnlü_Riboflavin\N22_0189_HarunÖnlü_
                   Riboflavin 2022-06-08 14-33-51\riboflavinn.M
Last changed     : 25/05/2022 13:44:49 by SYSTEM
Analysis Method  : C:\Chem32\1\Data\N22_0189_HarunÖnlü_Riboflavin\N22_0189_HarunÖnlü_
                   Riboflavin 2022-06-08 14-33-51\riboflavinn.M (Sequence Method)
Last changed     : 08/06/2022 16:41:43 by SYSTEM
                   (modified after loading)
```




```
=============================================================================
                        External Standard Report
=============================================================================

Sorted By             :      Signal
Calib. Data Modified  :      15 February 2022 12:40:23
Multiplier            :      1.0000
Dilution              :      1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=270,4 Ref=off

RetTime  Type     Area      Amt/Area    Amount   Grp   Name
 [min]          [mAU*s]                [ng/ul]
-------|------|----------|----------|----------|--|------------------
 13.442 BB       20.75024 1.45876e-2 3.02696e-1    riboflavin

Totals :                              3.02696e-1


1 Warnings or Errors :
```