

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**SERİN ALKALİ PROTEAZ SENTEZİNİ KONTROL EDEN ASPARTİK ASİT
GRUBU AMİNO ASİTLERİN PROTEAZ ÜRETİMİNE ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Bahar TOSUN ERCAN

KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ANKARA

2007

Her hakkı saklıdır

Prof. Dr.Tunçer zdamar danışmanlığında ve Doç. Dr. Pınar alık eş-danışmanlığında, Bahar Tosun Ercan tarafından hazırlanan bu alışmatarihinde aşığıdaki jüri tarafından Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

İmza

Başkan: Prof. Dr. Timur DOĞU, ODTÜ

Üye: Prof. Dr. Hale HAPOĞLU, Ankara Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Güzide ÇALIK GARCIA, Ankara Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Tunçer H. ÖZDAMAR, Ankara Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Pınar ÇALIK, ODTÜ

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Ülkü MEHMETOĞLU
Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

SERİN ALKALİ PROTEAZ SENTEZİNİ KONTROL EDEN ASPARTİK ASİT GRUBU AMİNO ASİTLERİN PROTEAZ ÜRETİMİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Bahar TOSUN ERCAN

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof.Dr.Tunçer H. ÖZDAMAR
Eş Danışman : Prof.Dr.Pınar ÇALIK

Serin Alkali Proteaz (SAP) üretiminde *subC* içeren plasmid pHV1431 taşıyan rekombinant *Bacillus licheniformis* ile SAP sentezini kontrol eden aspartik asit grubu amino asitlerin –aspartik asit (Asp), asparajin (Asn), izolözin (Ile), lizin (Lys), treonin (Thr), metionin (Met)- SAP üretimine etkisinin belirlenmesi amacıyla farklı ekleme zamanlarında ve $C_{AA}=0-15$ mM derişim aralığında etkileri incelenmiştir. Bu amino asitlerden Asp, Asn, Ile, Thr, Lys sırasıyla $t_e=0$ ekleme anında $C_{Asp}=7.5$ mM derişiminde 1.35 kat, $t_e=18$ ekleme anında $C_{Asn}=5.0$ mM derişiminde 1.38 kat, $t_e=18$ ekleme anında $C_{Ile}=15$ mM derişiminde 1.25 kat, $t_e=18$ ekleme anında $C_{Thr}=7.5$ mM derişiminde 1.32 kat, $t_e=0$ ekleme anında $C_{Lys}=2.5$ mM derişiminde 1.12 kat attırırken, metionin (Met) ise üretimi inhibe etmiştir. Diğer taraftan farklı rekombinant türleri ile de birer set deney yapılmış, rekombinant *B.subtilis* ile $t_e=0$ ekleme anında üç farklı derişimde (2.5, 5.0, 7.5 mM), rekombinant *B.amyloliquefaciens* ve rekombinant *B.sphaericus* ile de $t_e=0$ 'da ve her biri $C_{AA}=2.5$ mM derişimde aspartik asit grubu amino asitlerin etkisi incelenmiş; bunun sonucunda rekombinant *B.subtilis*'de Asp 1.28 kat, Asn 1.25 kat, Thr 1.30 kat, Lys 1.67 kat, Met 1.41 kat üretimi arttırmış; Ile ise inhibe etmiştir. Rekombinant *B.amyloliquefaciens*'de ise Asp üretimi 1.35 kat, Asn 1.25 kat arttırmış; Thr, Ile, ve Lys ise inhibe etmiştir. Rekombinant *B.sphaericus*'da ise Asp üretimi 1.35, Thr 1.28 kat, Lys 1.26, Ile ise 1.22 kat arttırmış; Asn ise üretimi inhibe etmiştir. Programın ikinci aşamasında ise rekombinant *B.licheniformis* ile optimum derişimleri belli olan aspartik asit grubu amino asitlerin SAP verimine ve seçimliliğine, ürün ve yan ürün dağılımlarına etkisi incelenmiş ve her amino asit için üç farklı derişimde metabolik yolizi analizi yapılmıştır. Metabolik yolizi analizinin sonucunda SAP üretiminde optimum ekleme anında ve optimum derişimde eklenen Asp, Asn, Thr, Ile, Lys'nin SAP üretimini arttırarak üretimde bir darboğaz olmaktan çıktığı belirlenmiş, bu çalışmadan sonra yapılacak çalışmalarda mikroorganizmalarda regülasyon mekanizmaları dikkate alınarak genetik modifikasyon yapılması durumunda üretimin daha fazla arttırabileceği sonucuna ulaşılmıştır.

2007, 148 sayfa

Anahtar Kelimeler: Serin alkali proteaz üretimi, rekombinant *Bacillus*, kontrol eden amino asitler, amino asitler, metabolik yolizi mühendisliği.

ABSTRACT

Master Thesis

INVESTIGATION OF EFFECTS ON PROTEASE PRODUCTION WHICH ASPARTIC ACID GROUP AMINO ACID CONTROL OF SYNTHESIS ON SERINE ALKALINE PROTEASE

Bahar TOSUN ERCAN

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemical Engineering

Supervisor: Professor Dr. Tunçer H. ÖZDAMAR
Co Supervisor: Professor Dr. Pınar ÇALIK

The effects of concentration and addition of aspartic acid group amino acids on serine alkaline protease (SAP) production in order to determine the controlling amino acids of SAP synthesis were investigated by using recombinant *Bacillus licheniformis* carrying subC gene encoding SAP enzyme. SAP activity was increased in each enriched bioprocess medium containing 7.5 mM aspartic acid (Asp), 5.0 mM asparagine (Asn), 15 mM isoleucine (Ile), 7.5 mM threonine (Thr), 2.5 mM lysine (Lys), respectively, 1.35, 1.38, 1.25, 1.32, 1.12 fold. Methionine was inhibited the production of SAP synthesis. The effects of aspartic acid group amino acids on SAP production with the other recombinant *Bacillus* species (*r-B.subtilis*, *r-B.sphaericus*, *r-B.amyloliquefaciens*) was investigated. With *r-B.subtilis*; SAP activity was increased in each enriched bioprocess medium containing Asp, Asn, Thr, Lys, Met respectively 1.28, 1.25, 1.30, 1.67, 1.41 fold but Ile inhibited the production of SAP synthesis. With *r-B.sphaericus*; SAP activity increased in each enriched bioprocess medium containing Asp, Thr, Lys, Ile respectively, 1.35, 1.28, 1.26, 1.22 but Asn was inhibited the SAP production. With *r-B.amyloliquefaciens* SAP activity increased in each enriched bioprocess medium containing Asp, Asn respectively 1.35, 1.25 fold but Ile, Lys, Thr inhibited the SAP production. Thereafter, the mass-flux balance based stoichiometric model for the bioreaction network that includes 236 reactions and 183 metabolites were developed; and then solved using the extracellular concentration data together with the batch-bioreactor medium concentration measurements. Results of the metabolic pathway analysis; aspartic acid group amino acids were bottleneck of the SAP production.

2007, 148 pages

Key Words: Serine alkaline protease production, recombinant *Bacillus*, controlling amino acids, intracellular metabolites, amino acids, metabolic pathway analysis.

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Serin alkali proteaz enzimi üretimi içinde yer alan bu çalışma Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği (Proses ve Reaktör Tasarımı) Anabilim Dalında, Biyokimyasal ve Kimyasal Reaksiyon Mühendisliği Araştırma Grubunda yürütülmekte olan, süren enzim üretim araştırmalarının bir bölümünü oluşturmuştur.

1998 bahar döneminde Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği programını tamamlayıp mezun olduktan sonra aynı yıl güz döneminde özel öğrenci olarak Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Yüksek Lisans programına başlayıp, 1999 yılı bahar döneminde Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Yüksek Lisans programına geçiş yaptım. Bu dönemden başlayarak bir yandan derslerimi tamamlarken bir yandan da geniş bir kaynak araştırması yaparak ve kaynakları inceleyerek tez projemin temellerini oluşturmaya başladım. Derslerimi tamamladıktan sonra, laboratuvarlarda yürümekte olan diğer lisansüstü çalışmalara etkin olarak katıldım. Bu aşamada sistemlerin ve cihazların kullanımı ile ilgili tecrübe kazanarak, laboratuvarlara uyumumu geliştirdikten ve deneysel programımla ilgili alt yapıyı oluşturduktan sonra tez projem kapsamındaki deneylerime büyük bir istekle başladım. Ancak 2000 yılı Mayıs ayında geçirdiğim rahatsızlık ve ameliyat nedeniyle Yüksek Lisans araştırmalarıma yaklaşık bir sene ara vermek zorunda kaldım. Mayıs 2001 yılında tekrar döndüğüm ve kaldığım yerden başladığım Yüksek Lisans araştırmalarımı, hastalığımın tekrar nüksetmesi sonucu Eylül 2001 'de kaydımı sildirerek bırakmak zorunda kaldım. 2005 yılında çıkan bir kanunun verdiği hak (af) ile araştırma programımın sonunda bıraktığım Yüksek Lisans tez çalışmalarına tekrar başladım.

Bu zorlu maraton boyunca bana destek olan ve yarım kalan Yüksek Lisans eğitimime büyük bir özveri göstererek tekrar başlamamı sağlayan, Ankara Üniversitesi'ne geldiğimde ilk görüşmemde ve tekrar başlamak için geldiğimde beni içtenlikle karşılayan; yüksek lisans çalışmalarım süresince ilgi ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen danışman hocam sayın Prof.Dr. Tunçer H. Özdamar ve eş-danışman hocam sayın Prof. Dr. Pınar Çalık'a (ODTÜ) teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Yüksek Lisans çalışmalarım süresince her konuda destek ve bilgilerini sunmaktan çekinmeyen hocalarım Sayın Prof. Dr. Güzide Çalık'a ve Sayın Prof. Dr. Serpil Takaç'a teşekkür ederim.

Yüksek lisans öğrenimimin 1.evresinde (2001 sonuna kadar) birlikte hayatımızın en güzel, emek dolu, zorlu günlerini geçirdiğimiz, her şeyi paylaştığımız yüzü gibi kalbi de güzel olan sevgili arkadaşım KYM Nur Pehlivan'a, sevgi ve ilgilerini her zaman hissettiğim, hep yanımda olan şimdi her biri farklı yerlerde olan arkadaşlarım Dr.İlknur Şenver Özçelik'e (TÜBİTAK), Dr.Sema Elmas Salgın'a (Cumhuriyet Üniv), KYM Emine Kavdır'a ve KYM Arzu Bayram'a içtenlikle teşekkür ederim.

Hayatım boyunca bana doğruyu gösteren, haksızlıklara karşı mücadele etmenin, okumanın, çalışkanlığın ve dürüstlüğün insan hayatındaki en büyük erdemler olduğunu öğreten ve bana maddi manevi her türlü desteği sağlayan, sevgili babam emekli öğretmen Nejat Tosun'a; her zamanki pozitifliğiyle bana yaşama gücü veren, yüksek

lisans çalışmalarımın gece sabaha kadar süren deney aşamalarında dahi bana eşlik eden, hayattaki en iyi arkadaşım canım annem Eczacı Sabriye Tosun'a özel olarak teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca benim her türlü maddi manevi ihtiyacımı karşılayan, ikinci annelerim sevgili anneannem ve teyzeme, bu süre zarfında bana her eşin gösteremeyeceği bir anlayış, sabır ve sevgiyle yaklaşan en büyük destekçim, hayat arkadaşım, can yoldaşım Ziraat Mühendisi Veli Ercan'a teşekkür ederim.

Son olarak, çocukluğumdan itibaren hiç tanımama rağmen ailem tarafından anlatılan başarılarının etkisiyle büyüdüğüm, okumamda, mühendislik mesleğini seçmemde ve yüksek lisans eğitimimi tamamlamamdaki en büyük etken merhum dedem Makine Yüksek Mühendisi Albay Bali Ersever'i de rahmetle anıyorum.

Bahar Tosun Ercan

Ankara, Ekim 2007

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ	vii
KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2.KURAMSAL TEMELLER.....	7
2.1 Mikroorganizmalar: Mikrobiyoreaktörler.....	7
2.1.1 Hücrelerin yapısı	8
2.1.1.1 Prokaryotik hücreler	9
2.1.1.2 Ökaryotik hücreler	11
2.2 Hücre Yapısında Bulunan Bileşenler	13
2.2.1 Nükleik asitler	13
2.2.2 Amino asitler	15
2.2.3 Proteinler	18
2.2.4 Enzimler	21
2.2.4.1 Enzim aktivitesi	21
2.2.4.2 Enzimatik tepkimenin kinetiği.....	22
2.2.4.3 Enzim inhibisyonu.....	24
2.2.4.4 Proteolitik enzimler.....	25
2.3 Taşınım Mekanizmaları	28
2.3.1 Serbest yayınma	28
2.3.2 Kolaylaştırılmış yayınma.....	29
2.3.3 Aktif taşınım	30
2.4 <i>Bacillus</i> ve Özellikleri	31
2.4.1 <i>Bacillus</i> ’ların sınıflandırılması.....	32
2.5 Hücre içi Tepkimeler	34
2.5.1 Katabolik tepkimeler	34
2.5.2 Anabolik tepkimeler	36
2.6 Biyotepkime Sisteminin Analizi	36
2.6.1 <i>B.licheniformis</i> biyokimyası	37
2.7 SAP Sentezinde Darboğaz Oluşturan Aspartik Asit Grubu Amino Asitler.....	48
2.7.1 Aspartik asit grubu amino asitlerin biyosentezi ve regülasyonu	50
2.7.1.1 Ortak yolizi ve regülasyonu	50
2.7.1.2 Lizin biyosentezi ve regülasyonu	55
2.7.1.3 Treonin ve metionin biyosentezi ve regülasyonu.....	62
2.7.1.4 Asparajin biyosentezi ve regülasyonu	66
2.8 Metabolik Yolizi Tepkime Hız Analizi.....	68
2.8.1 Metabolik akı analizi.....	68
2.8.2 Metabolik yolizi analizi.....	69
2.8.2.1 Metabolik yolizlerinin tanımlanması.....	69
2.8.2.2 Matematik model	69

2.8.2.3 Matematik modelin çözümü.....	71
2.9 Enzim Üretimine Amino Asit Etkisi.....	72
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	74
3.1 Mikroorganizmalar.....	74
3.2 Rekombinant <i>Bacillus</i> Türleri ile SAP Üretimi.....	75
3.2.1 Mikrobank (mikroorganizma saklama sistemi).....	75
3.2.2 Katı çoğalma ortamı	75
3.2.3 Ön sıvı çoğalma ortamı.....	76
3.2.4 Biyodönüşüm ortamı.....	77
3.2.5 Analitik yöntemler	78
3.2.5.1 Mikroorganizma derişimi.....	78
3.2.5.2 Serin alkali proteaz enziminin aktivitesi.....	78
3.2.5.3 DNS yöntemi ile glkkoz tayini.....	79
3.2.5.4 Amino asitlerin analizi	79
3.3 Metabolik Akı Analizi İçin Optimizasyon Programı.....	80
4. ARAşTIRMA BULGULARI.....	81
4.1 <i>R-B.licheniformis</i> ile Aspartik Asit Grubu Amino Asitlerin Eklenmesinin SAP Üretimine Etkisi	81
4.1.1 Aspartik asit etkisi	81
4.1.2 Asparajin etkisi	81
4.1.3 Treonin etkisi.....	85
4.1.4 İzolözin etkisi.....	89
4.1.5 Lizin etkisi.....	91
4.1.6 Metionin etkisi.....	93
4.2 <i>R-B.subtilis</i> ile Aspartik Asit Grubu Amino Asitlerin Eklenmesinin SAP Üretimine Etkisi	95
4.2.1 Aspartik asit etkisi	95
4.2.2 Asparajin etkisi	97
4.2.3 Treonin etkisi.....	97
4.2.4 İzolözin etkisi.....	100
4.2.5 Lizin etkisi.....	100
4.2.6 Metionin etkisi.....	102
4.3 <i>R-B.sphaericus</i> ve <i>R-B .amyloliquefaciens</i> ile Aspartik Asit Grubu Amino Asitlerin Eklenmesinin SAP Üretimine Etkisi	105
4.4 <i>R-B.licheniformis</i> ile Aspartik Asit Grubu Amino Asit Destekli Proseslerde Ürün ve Yan Ürün Dağılımı	108
4.5 Amino Asit Eklenmesinin Metabolik Yolizi Tepkime Hızlarına Etkisi.....	130
5. TARTIşMA ve SONUÇLAR.....	145
KAYNAKLAR	139
EKLER.....	142
EK 1. Mikroorganizma Derişimi Kalibrasyonu.....	143
EK 2. Serin Alkali Proteaz (SAP) Aktivitesi Kalibrasyonu	144
EK 3. DNS Yöntemi İçin İndirgenmiş Şeker Derişimi Kalibrasyonu	145
EK 4. DNS Yöntemi ile Toplam İndirgenmiş Şeker Tayini İçin Reaktif Hazırlanması.....	146
EK 5. Amino asitlerin kalma süreleri.....	147
ÖZGEÇMİş.....	148

SİMGELER DİZİNİ

A	SAP aktivitesi, U/cm ³
C _{AA}	Amino asit derişimi, kg/m ³
C _{AA}	Birim hücre başına amino asit derişimi,g/gx
C _G	Glukoz derişimi, kg/m ³
C _{S0}	Başlangıç substrat derişimi, kg/m ³
C _X	Mikroorganizma derişimi, g/l
N	Karıştırma hızı, dk ⁻¹
Q _o	Hacimsel gaz akış hızı, m ³
Q _o /V	Birim hacme gönderilen gaz hızı, vvm=m ³ /m ³ /dk
t	Kalma süresi, s veya st
T	Sıcaklık, °C veya K
V	Biyodönüşüm ortamı, hacmi, m ³
V _R	Biyoreaktör hacmi, m ³
μ	Spesifik çoğalma hızı, st ⁻¹
μ _{max}	Maksimum spesifik çoğalma hızı, st ⁻¹
λ	Dalga boyu, nm

KISALTMALAR DİZİNİ

Ac	Asetik asit	DHF	7,8 dihidrofolat
AcAc	Aseto asetikasit	Disoval	2,3-dihidroksiizovalerat
AacAc	Amino-aseto-asetat	DMV	2,3-dihidroksiizovalerat
AcAcCoA	Aseto-asetil-CoA	Dqui	3-dehidroquinat
	N-asetil-L-2amino-		
AcAKM	6ketopimelat	Dshik	3-dehidrosişikimat
AcCoA	Asetil-CoA	Dttp	2-deoksiTTP
AcDAP	N-asetil-L,L diaminopimelat	E4P	Eritroz-4fosfat
AcGlu	N-asetil glutamat	F10THF	N10-formil-THF
AcGluP	N-asetil glutamil-P	F6P	Fruktoz-6-fosfat
AcGluSa	N-asetil glutamat-semialdehit	FA	Fatty asitleri
AcHbut	2-aseto 2-hidroksibütirat	fAcAc	Fumarilasetoasetat
Acorn	Asetil ornitin	FADH	Flavin adenindinükleotit
AcrCoA	AkrililCoA	Fglu	N-forminolglutamat
ADP	Adenosin-5 difosfat	FKV	N-forminolglutamat
AdipADP	3-oxoadipat	FTHF	N-formilkynurenin
AdipCoA	3-oxoadipil-CoA	Fum	Fumarat
ADPHep	ADP-D-gliserol-Dmonoheptaz	G1P	Glukoz-1-fosfat
AEL	3-oxoadipat-enol-lakton	G6P	Glukoz-6-fosfat
Ala	L-alanin	GDP	Guanosin-1-difosfat
Amp	Adenozin5-monofosfat	GL3P	Gliserol-5fosfat
Anth	Antranilat	Glc	Glukoz
Arg	L-Arginin	Gln	L-Glutamin
Asn	L-Asparajin	Glu	L-Glutamat
Asp	L-Aspartik asit	Gluc	Glukonat
AspgP	4-Aspergil-P	Gluc6P	Glukonat-6-fosfat
AspP	Aspartil-P	GlucCoA	Glukonil-koenzimA
AspSa	Aspartat semialdehit	GluCoA	Glutaril-CoA
ATP	Adenozin5-trifosfat	GluP	L-Glutamil-P
CaP	Karbomilfosfat	GluSa	Glu-5-semialdehit
Cat	Katekhol	Glx	Glikolat
CDP	Sistidin5-difosfat	Gly	L-Glisin
CDPEtN	CDP-etanolamin	GMP	Guanosin-5-monofosfat
	3-karboksi-3-		
ChisoCap	hidroksiizokaproat	GTP	Guanosin-5-trifosfat
Chor	Korismat	H2S	Hidrojensülfid
Cit	Sitrat	HBCoA	3-hidroksi bütiril-koenzimA
Citr	Sitrulin	Hcys	Homosistein
CisAc	Cis-akonilat	Hgen	Homojentsat
CMP	Sistidin5-monofosfat	HIBCoA	-hidroksibütiril-koenzimA
	CMP-3deoksiD-		
CMPKDO	mannooktulosonat	HIbut	Hidroksiizobütirat
CO2	Karbondioksit	HisP	L-histidinol-P
	1-/2-karboksifenilamino)-1-		
CrotCoA	dehidroksibüloz 5-P	Oval	2-oxometil valerat
CTP	Sistidin-5-trifosfat	Orn	L-Ornitin
	O-(1-karboksivinil)-3-P		
CV3Pshik	şikimat	HMGCoA	Metil glutakonil koenzimA
Cys	L-Sistein	HPP	4-hidroksifenilpiruvat
Cyn	L-Sistatinyonin	HPPyr	4,4 hidroksifenilpiruvat

Hisl	L-Histidinol	Hprop	3-hidroksipropiyanat
His	L-Histidin	HpropCoA	3-hidroksipropiyonil koenzimA
DAP	Diaminopimelat	Hpyr3P	3P-hidroksi piruvat
Datp	2-deoksiATP		Homoserin
DC	L,2,3, dihidropikolinste	HserP	O-fosfo-L-homoserin
Dctp	2-deoksiCTP	IACp	İmidazol asetol-P
	7P-2dehidro-3-deoksi-		
DDDH7P	darabinoheptonat	IbutCoA	İzobütil koenzimA
Dgtp	2-deoksiGTP	Icit	İzositrat
Ipropmal	4-imidazanol5-propiyanat	IGP	İndolgliserolfosfat
IMP	Inosinmonofosfat	Ile	L-İzolözin
IValCoA	İzovalerat koenzimA	Iprop	4-imidazanol-5-propiyanat
KisoAsp	-ketoizoaspartat	Shik	Şikimat
KV	L-Kynurenin	Shik5P	mat 5-fosfat
Kval	Ketovalin	Succ	Suksanat
L5C	L-1-pirolin 5-karboksilat	Trp	L-Triptofan
Lac	Laktik asit	Tyr	L-Tirozin
Leu	L-Lözin	Ucar	Urokarat
Lys	L-Lizin	UDP	Uridin 5-difosfat
mAcAc	4-maleyasetat	UDPGlc	UDP-glukoz
MacCoA	2-metilasetoasetil koenzim A	UDPNAG	UDP-N-astilglukozamin
MACoA	Metilakrilil-koenzim A	UDPNAM	UDP-N-asetilmuramikasit
Mal	1- Malik asit	UMP	Uridin 5-difosfat
MalSa	Makonat semialdehit	UTP	Uridin 5-trifosfat
Man	Mannoz	Val	L-Valin
Man6P	Mannoz 6 fosfat	BGSC	Bacillus Genetic Stock Center
MCCoA	-metilkrotonil koenzimA	BSA	Bovin Serum albumin
Mdap	mezo-diaminopimelat	DNA	Deoksiribonükleik asit
Met	L-Metionin	DNS	Dinitrosalisilik asit
MetBCoA	2-metil bütiril koenzimA	EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
			Deutsche Sammlung von
MeTHF	N5-N10 metinil-THF	DSM	Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
			International Union of
MetTHF	N5-N10 metilen-THF	IUPAC	Pure and Applied Chemistry
	2-metil 3-hidroksi bütiril		
MhbCoA	koenzimA	KH	Kuru hücre
Muc	Cis-mukonat	NP	Nötral proteaz
mMalSa	Metilmalonat semialdehit	PITC	Fenilizostiyosinat
mMalCoA	Metil malonilkoenzimA	SAP	Serin alkali proteaz
MTHF	N5 metil-THF	SC	Subtilisin Carlsberg
	Nikotinamidadenin		
NADH	dinükleotit	SN	Subtilisin novo
	Nikotinamidadenin		
NADPH	dinükleotitfosfat	TCA	Trikloroasetik asit
NH3	Amonyak	TEA	Trietilamin
OA	Okzalik asit	Pi	İnorganik ortofosfat
OAcSer	O-asetil serin	Ppi	İnorganik pirofosfat
Obut	2-oxobütirat	PRAIC	5-fosforiboz 4-karboksi amid5amino
P5C	L-1-pirolin 5-karboksilaz	PRAnth	N-(5-fosforibozilantranilat)
PEP	Fosfofenolpiruvat	PRbFAP	Fosforibozilformimino-AICAR-P
PG3	Gliserat 3-fosfat	PRFAP	Fosforibozilformimino-AICAR-P
Phe	L-Fenil alanin	pRib-ATP	Fosforibozil-ATP
PhePyr	Fenilpiruvat	pRib-AMP	Fosforibozil-AMP

PropCoA	Propiyonil-CoA
Prep	Prepanat
PropCoA	L-Pirolin
PRPP	5-fosfo-D-ribozilpirofosfat
Pyr	Pirüvik asit
R5P	Ribüloz 5-fosfat
Rib5P	Riboz 5-fosfat
S7P	Sedoheptülaz-7-fosfat
Ser	L-Serin
SucCoA	Suksinat koenzimA
Xyl5P	Ksiloz 5-fosfat
Tet	L,2,3,4,5 tetrahidropikolinat
T3P	Trioz 3-fosfat
THF	Tetrahidrofolat
Thr	L-Treonin

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Hücrelerin sınıflandırılması	7
Şekil 2.2. Bakteri hücresi	10
Şekil 2.3. Bakterilerin üç farklı formu	10
Şekil 2.4. Ökaryotik hücre	13
Şekil 2.5. DNA ve RNA yapısı	14
Şekil 2.6. DNA'nın birincil yapısı	15
Şekil 2.7. DNA'nın ikincil yapısı	15
Şekil 2.8. Serbest yayınma	29
Şekil 2.9. Kolaylaştırılmış yayınma	30
Şekil 2.10. Aktif taşınım	31
Şekil 2.11. Aspartik asit grubu aminoasitler	49
Şekil 2.12. Aspartat semialdehit biyosentezi	51
Şekil 2.13. Lizin biyosentezi	56
Şekil 2.14. Metionin ve treonin biyosentezi	63
Şekil 2.15. SAP için metabolik yol izi	70
Şekil 4.1 a. <i>R-Bacillus licheniformis</i> ile hücre derişiminin kalma süresi ile değişimine aspartik asit derişiminin etkisi	83
Şekil 4.1 b. <i>R-Bacillus licheniformis</i> ile hücre derişiminin kalma süresi ile değişimine aspartik asit derişiminin etkisi	83
Şekil 4.2.c. <i>R-Bacillus licheniformis</i> ile hücre derişiminin kalma süresi ile değişimine aspartik asit derişiminin etkisi	84
Şekil 4.2.a. <i>R-Bacillus licheniformis</i> ile SAP aktivitesinin kalma süresi ile değişimine aspartik asit derişiminin etkisi	84
Şekil 4.2.b. <i>R-Bacillus licheniformis</i> ile SAP aktivitesinin kalma süresi ile değişimine aspartik asit derişiminin etkisi	84
Şekil 4.2.c. <i>R-Bacillus licheniformis</i> ile SAP aktivitesinin kalma süresi ile değişimine aspartik asit derişiminin etkisi	84
Şekil 4.3.a. <i>R-Bacillus licheniformis</i> ile hücre derişiminin kalma süresi ile değişimine asparajin derişiminin etkisi	86
Şekil 4.3.b. <i>R-Bacillus licheniformis</i> ile hücre derişiminin kalma süresi ile değişimine asparajin derişiminin etkisi	86
Şekil 4.3.c. <i>R-Bacillus licheniformis</i> ile hücre derişiminin kalma süresi ile değişimine asparajin derişiminin etkisi	86
Şekil 4.4.a. <i>R-Bacillus licheniformis</i> ile SAP aktivitesinin kalma süresi ile değişimine asparajin derişiminin etkisi	87
Şekil 4.4.b. <i>R-Bacillus licheniformis</i> ile SAP aktivitesinin kalma süresi ile değişimine asparajin derişiminin etkisi	87
Şekil 4.4.c. <i>R-Bacillus licheniformis</i> ile SAP aktivitesinin kalma süresi ile değişimine asparajin derişiminin etkisi	87
Şekil 4.5.a. <i>R-Bacillus licheniformis</i> ile hücre derişiminin kalma süresi ile değişimine Treonin derişiminin etkisi	88
Şekil 4.5 b. <i>R-Bacillus licheniformis</i> ile hücre derişiminin kalma süresi ile değişimine Treonin derişiminin etkisi	88
Şekil 4.6. a. <i>R-Bacillus licheniformis</i> ile SAP aktivitesinin kalma süresi ile değişimine treonin derişiminin etkisi	89

Şekil 4.6. b. <i>R-Bacillus licheniformis</i> ile SAP aktivitesinin kalma süresi ile değişimine treonin derişiminin etkisi	89
Şekil 4.7 a. <i>R-Bacillus licheniformis</i> ile hücre derişiminin kalma süresi ile değişimine izolözin derişiminin etkisi.....	90
Şekil 4.7 b. <i>R-Bacillus licheniformis</i> ile hücre derişiminin kalma süresi ile değişimine izolözin derişiminin etkisi.....	90
Şekil 4.8. a. <i>R-Bacillus licheniformis</i> ile SAP aktivitesinin kalma süresi ile değişimine izolözin derişiminin etkisi.....	90
Şekil 4.8. b. <i>R-Bacillus licheniformis</i> ile SAP aktivitesinin kalma süresi ile değişimine izolözin derişiminin etkisi.....	90
Şekil 4.9. a. <i>R-Bacillus licheniformis</i> ile hücre derişiminin kalma süresi ile değişimine lizin derişiminin etkisi	92
Şekil 4.9. b. <i>R-Bacillus licheniformis</i> ile hücre derişiminin kalma süresi ile değişimine lizin derişiminin etkisi	92
Şekil 4.10. a. <i>R-Bacillus licheniformis</i> ile SAP aktivitesinin kalma süresi ile değişimine lizin derişiminin etkisi	92
Şekil 4.10. b. <i>R-Bacillus licheniformis</i> ile SAP aktivitesinin kalma süresi ile değişimine lizin derişiminin etkisi	92
Şekil 4.11. <i>R-Bacillus licheniformis</i> ile hücre derişiminin kalma süresi ile değişimine metionin derişiminin etkisi	94
Şekil 4.12. <i>R-Bacillus licheniformis</i> ile SAP aktivitesinin kalma süresi ile değişimine metionin derişiminin etkisi	94
Şekil 4.13. <i>R-Bacillus subtilis</i> ile hücre derişiminin kalma süresi ile değişimine aspartik asit derişiminin etkisi	96
Şekil 4.14. <i>R-Bacillus subtilis</i> ile SAP aktivitesinin kalma süresi ile değişimine aspartik asit derişiminin etkisi	96
Şekil 4.15. <i>R-Bacillus subtilis</i> ile hücre derişiminin kalma süresi ile değişimine asparajin derişiminin etkisi	98
Şekil 4.16. <i>R-Bacillus subtilis</i> ile SAP aktivitesinin kalma süresi ile değişimine asparajin derişiminin etkisi	98
Şekil 4.17. <i>R-Bacillus subtilis</i> ile hücre derişiminin kalma süresi ile değişimine treonin derişiminin etkisi	99
Şekil 4.18. <i>R-Bacillus subtilis</i> ile SAP aktivitesinin kalma süresi ile değişimine treonin derişiminin etkisi	99
Şekil 4.19. <i>R-Bacillus subtilis</i> ile hücre derişiminin kalma süresi ile değişimine izolözin derişiminin etkisi.....	101
Şekil 4.20. <i>R-Bacillus subtilis</i> ile SAP aktivitesinin kalma süresi ile değişimine izolözin derişiminin etkisi.....	101
Şekil 4.21. <i>R-Bacillus subtilis</i> ile hücre derişiminin kalma süresi ile değişimine lizin derişiminin etkisi	103
Şekil 4.22. <i>R-Bacillus subtilis</i> ile SAP aktivitesinin kalma süresi ile değişimine lizin derişiminin etkisi	103
Şekil 4.23. <i>R-Bacillus subtilis</i> ile hücre derişiminin kalma süresi ile değişimine metionin derişiminin etkisi	104
Şekil 4.24. <i>R-Bacillus subtilis</i> ile SAP aktivitesinin kalma süresi ile değişimine metionin derişiminin etkisi	104
Şekil 4.25. <i>R-Bacillus sphaericus</i> ile hücre derişiminin kalma süresi ile değişimine aspartik asit grubu amino asitlerin etkisi	106

Şekil 4.26. R- <i>Bacillus sphaericus</i> ile SAP aktivitesinin kalma süresi ile değişimine aspartik asit grubu amino asitlerin etkisi	106
Şekil 4.27. R- <i>Bacillus amyloliquafaciens</i> ile hücre derişiminin kalma süresi ile değişimine aspartik asit grubu amino asitlerin etkisi	108
Şekil 4.28. R- <i>Bacillus amyloliquafaciens</i> ile SAP aktivitesinin kalma süresi ile değişimine aspartik asit grubu amino asitlerin etkisi	108
Şekil 4.29. a. R- <i>Bacillus licheniformis</i> ile hücre derişiminin kalma süresi ile değişimine aspartik asit grubu amino asit derişimlerinin etkisi	109
Şekil 4.29. b. R- <i>Bacillus licheniformis</i> ile hücre derişiminin kalma süresi ile değişimine aspartik asit grubu amino asit derişimlerinin etkisi (Ile, Asp, Met)	109
Şekil 4.30. a. R- <i>Bacillus licheniformis</i> ile SAP aktivitesinin kalma süresi ile değişimine aspartik asit grubu amino asit derişimlerinin etkisi (Asn, Lys, Thr)	109
Şekil 4.30. b. R- <i>Bacillus licheniformis</i> ile SAP aktivitesinin kalma süresi ile değişimine aspartik asit grubu amino asit derişimlerinin etkisi (Ile, Asp, Met)	109
Şekil 4.31 a. R- <i>Bacillus licheniformis</i> ile başlangıç glukoz derişiminin kalma süresi ile değişimine üretim ortamına eklenen aspartik asit grubu amino asitlerin etkisi (Asn, Lys, Thr)	111
Şekil 4.31 b. R- <i>Bacillus licheniformis</i> ile başlangıç glukoz derişiminin kalma süresi ile değişimine üretim ortamına eklenen aspartik asit grubu amino asitlerin etkisi (Ile, Asp, Met).....	111
Şekil 4.32. R- <i>Bacillus licheniformis</i> ile üretim ortamına eklenen aspartik asit grubu amino asitlerin derişimlerinin kalma süresi ile değişimi	111

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Endüstriyel enzim üreten kuruluşlar	3
Çizelge 2.1. Serin alkali proteaz enziminin amino asit bileşimi	27
Çizelge 2.2. <i>Bacillus licheniformis</i> 'in metabolik yolizi tepkimeleri.....	38
Çizelge 2.3. <i>B.subtilis</i> 'deki aspartokinaz enzimleri	52
Çizelge 2.4. Lizin yolizinde yer alan enzimler	59
Çizelge 2.5. Treonin ve Metionin yolizinde yer alan enzimler	67
Çizelge 3.1. Rekombinant <i>Bacillus</i> türleri için katı çoğalma ortamı	76
Çizelge 3.2. Rekombinant <i>Bacillus</i> türleri için ön sıvı çoğalma ortamı	76
Çizelge 3.3. Rekombinant <i>Bacillus</i> türleri için referans üretim ortamı	77
Çizelge 4.1. <i>R-B.licheniformis</i> ile aspartik asit eklenen proste hücre dışı amino asit derişimlerinin kalma süresi ile değişimi	112
Çizelge 4.2. <i>R-B.licheniformis</i> ile asparajin eklenen proste hücre dışı amino asit derişimlerinin kalma süresi ile değişimi	113
Çizelge 4.3. <i>R-B.licheniformis</i> ile treonin eklenen proste hücre dışı amino asit derişimlerinin kalma süresi ile değişimi	116
Çizelge 4.4. <i>R-B.licheniformis</i> ile izolözin eklenen proste hücre dışı amino asit derişimlerinin kalma süresi ile değişimi	117
Çizelge 4.5. <i>R-B.licheniformis</i> ile lizin eklenen proste hücre dışı amino asit derişimlerinin kalma süresi ile değişimi	118
Çizelge 4.6. <i>R-B.licheniformis</i> ile metionin eklenen proste hücre dışı amino asit derişimlerinin kalma süresi ile değişimi	119
Çizelge 4.7. <i>R-B.licheniformis</i> ile referans ortamda hücre dışı amino asit derişimlerinin kalma süresi ile değişimi	120
Çizelge 4.8 Asp eklenen SAP üretim prosesinde hücreiçi tepkime akıları.....	123
Çizelge 4.9 Asn eklenen SAP üretim prosesinde hücreiçi tepkime akıları.....	125
Çizelge 4.10 Thr eklenen SAP üretim prosesinde hücreiçi tepkime akıları	127
Çizelge 4.11 Ile eklenen SAP üretim prosesinde hücreiçi tepkime akıları	129
Çizelge 4.12 Lys eklenen SAP üretim prosesinde hücreiçi tepkime akıları	131
Çizelge 4.13 Met eklenen SAP üretim prosesinde hücreiçi tepkime akıları.....	133
Çizelge 5.1 Aspartik asit grubu amino asitlerin <i>r-B.licheniformis</i> ile enzim üretimine etkisi.....	135
Çizelge 5.2 Aspartik asit grubu amino asitlerin <i>r-Bacillus</i> türü mikroorganizmalar ile enzim üretimine etkisi	135

1. GİRİŞ

“Serin Alkali Proteaz (SAP) setezini kontrol eden aspartik asit grubu amino asitlerin proteaz üretimine etkisinin araştırılması” konulu yüksek lisans çalışmasında serin alkali proteaz geni (*subC*), pHV1431 plasmidi taşıyan rekombinant *Bacillus* türü mikroorganizma tarafından gerçekleştirilen, SAP sentezini kontrol eden aspartik asit grubu amino asitler belirlenerek bunların SAP üretimine etkisi araştırılmış, SAP üretimini arttıran amino asitler belirlendikten sonra bu amino asitlerin SAP üretiminde darboğaz oluşturup oluşturmadığının araştırılması programlanmıştır.

Biyoteknolojik ürünler olan biyomoleküller –mikrobiyal, bitki doku veya hayvan doku-hücreleri, enzimler veya diğer biyolojik sistemler kullanılarak, hücre içinde veya hücre dışında biyokimyasal tepkime yolları izlenerek üretilirler. Biyoteknolojik proseslerde biyomolekülleri üreten sektörler ürünü kullanan sektör temel alınarak aşağıdaki gibi gruplanırlar:

1. Farmasotik Hammaddeler Sektörü
2. Biyokimyasal Temel Maddeler Sektörler Grubu
3. Enzim Üretim Sektörü
- 4 . Klasik Fermantasyon Ürünleri Sektörler Grubu
5. Hayvancılık, Ormancılık, Tarım Sektörleri İçin Biyoteknolojik Ürünler Üreten Sektörler
6. Biyoteknolojik Proseslerle Atık Arıtımı ve Enerji Üretimi

şeklinde gruplanmaktadır. Uluslararası Standart Sanayi Sınıflaması (ISIC) 241 ve 242 grup numaraları, tanımlanan sanayi ürünlerini kapsamaktadır.

Biyomoleküllerden, Proteolitik enzimler peptit bağlarını hidrolize eden enzimlerdir; katalizleme biçimine bağlı olarak peptidazlar ve proteazlar olmak üzere ikiye ayrılırlar. Peptidazlar ancak uç amino asitleri veya dipeptitleri hidroliz edebildiğinden ikincil öneme sahiptir. Proteazlar ise fizikokimyasal ve katalitik özellikleri dikkate alındığında kompleks enzimlerdir. Proteazları sınıflandırmak ve sistematik olarak adlandırmak zor olduğundan, üretildiği kaynak ve katalitik mekanizma dikkate alınarak adlandırılırlar (Kalisz 1988).

Proteazlar biyokatalitik mekanizmaları temel alınarak gruplandırılmış ve,

- *serin proteazlar (E.C.3.4.21),
- *sistein (tiyol) proteazlar (E.C.3.4.22),
- *aspartik (karboksil) proteazlar (3.4.23),
- *metallo (nötral) proteazlar (E.C.3.4.24),

olmak üzere dört gruba ayrılmıştır (Frost and Moss 1987). Proteaz enzimleri Hücreiçi ve hücre dışı olarak üretilirler; bitki, hayvan ve mikroorganizma hücrelerinin metabolik ve regülasyon proseslerinde önemli işlevleri bulunur. Hücre dışı proteazlar hücrenin bulunduğu ortamdaki büyük polipeptit bağlarını –örneğin proteinleri- hidroliz tepkimesi ile parçalayarak hücre içine taşınabilecek küçük molekülü ürünlere dönüştürürler (Frost and Moss 1987).

Serin proteaz enzimlerinin aktif konumlarında serin grupları bulunmaktadır. Birçok substrata karşı spesifik olarak aktif olan serin proteaz enzimlerinin genellikle molekül ağırlıkları küçüktür (18.5-35 kDa), optimum pH değerleri yaklaşık pH=10 izoelektrik noktaları ise yaklaşık pI=9 dolayındadır (Frost and Moss 1987, Kalisz 1988). Mikrobiyal serin proteazlar içinde serin alkali proteazlar katkı maddesi olarak deterjan endüstrisinde, gıda endüstrisinde (et, içecek, süt, vd.), deri sanayinde, fotoğraf endüstrisinde (filmden gümüşün geri kazanımı), büyük öneme sahiptir. Yalnız deterjan endüstrisinde kullanılan miktar toplam mikrobiyal enzim üretiminin %35'ini oluşturmaktadır (Kirk and Othmer 1983, Kalisz 1988).

Ticari önemi olan enzimlerin toplam üretiminin %60'ını proteazlar oluşturmaktadır.

Bunlar içinde bakteriyel proteazların üretimi yaklaşık 500 ton/yıl ve birim fiyatı 120\$/kg'dır. Endüstriyel enzim üretiminin büyük kısmı Avrupa'da yapılmaktadır. Üretim kapasitesi açısından önemli kuruluşlar sırasıyla Novo Industri A/S (Danimarka), Gistbrocades (Hollanda), Miles Laboratories (USA), ve Hansen (Danimarka)'dır (Çizelge 1.1) (Kirk and Othmer 1983, Frost and Moss 1987, Kalisz 1988)

Serin alkali proteazlar içinde ticari adı "Subtilisin Carlsberg" (SC) olan enzim Carlsberg Laboratory'de (1947) bulunmuş; 1960'da endüstriyel üretimine başlanmıştır. "Subtilisin Novo" (SN) ise ikincil ticari öneme sahiptir. "Subtilisin Carlsberg"ın *Bacillus licheniformis*, Subtilisin Novo'nun ise *Bacillus amyloliquefaciens* ile üretildiği bilinmektedir. Bu enzimler peptit bağlarının çoğunu ve bazı ester bağlarını hidrolize ederler. Bu iki ticari alkali proteaz enziminin yapısı incelenmiş ve protein yapılarında 58 amino asit dizininin farklı olduğu belirlenmiştir. SC ve SN enzimlerinin molekül ağırlıkları 27.5 kDa, optimum sıcaklıkları 60°C, optimum pH'ları ise 10 civarındadır. Sistein gruplarını içermeyen bu iki enzimin aktif konumlarının serin (221), histidin (64), aspartik asit (32) grupları tarafından oluşturulduğu bildirilmiştir (Çalık 1998).

Çizelge 1.1. Endüstriyel enzim üreten kuruluşlar

KURULUŞ	SATIŞ PAYI%
Novo Industri A/S (Danimarka)	40
Gist-brocades (Hollanda)	20
Miles Labarotiries	10
Hansen (Danimarka)	5
Sanofi (Fransa)	5
Finish Sugar (Finlandiya)	5
Diğerleri	15

Endüstriyel enzimler mikroorganizmalardan olduğu gibi bitki ve hayvan dokularından da izole edilebilirler. Hayvan doku kaynaklı enzimler, hayvanların pankreas, mide, karaciğer vd organlarından; bitki doku kaynaklı enzimler, bitkilerin tohumlarından, meyvelerinden, sap ve diğer bölümlerinden elde edilirler. Mikroorganizmaların biyokimyasal farklılıkları, ortam tasarımı ile enzim derişiminin kolayca arttırılabilmesi mikroorganizmaları hayvan ve bitki doku kaynaklı enzimlere seçimli yapmaktadır. Mikrobiyal hücrelerin:

- *kısa proses süreleri,
- *pahalı olmayan üretim ortamları,
- *farklı mikroorganizmalarda farklı proteinlerin aynı tepkimeleri katalizlemesi ve
- *mikroorganizma izolasyonunun basit olması ve değişik optimum pH, sıcaklık ve kararlılığa sahip olması gibi üstünlükleri vardır.

Rekombinant DNA teknolojisinin gelişimi ile genetik bilginin bir organizmadan diğer organizmaya aktarılmasıyla mikroorganizmaların üretim potansiyellerinin arttırılması mümkün olmuştur. *Bacilli* serin alkali proteaz üretebilen bakteri grubudur. *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* ve *Bacillus amyloliquefaciens* türleri serin alkali proteaz üretimi için potansiyel bakterilerdir. *Bacillus* türü bakteri, toksik olmayan hücre duvarına sahip, tek membranı olan, ürettiği proteinleri (enzimleri) hücre dışına aktarılabilen, patojen olmayan mikroorganizmalardır (Frost 1987). *Bacillus* türleri - değeri \$700-800 milyon olan- diğer endüstriyel enzimler, antibiyotikler ve insektisidlerin üretimi için de kullanılabilmektedir. Bunun yanında *Bacillus* türleri yiyeceklerde tat geliştirilmesinde kullanılan nükleotid ve nükleosit üretiminde ve amino asit üretiminde de kullanılmaktadır. *Bacillus* türlerinin kullanıldığı, hızla gelişen özgün başka bir alan da moleküler genetik araştırmalardır; genlerin ekspres edilmelerinde konak hücre olarak kullanılmaktadırlar. Alkali proteaz üretimine ilişkin olarak süreli yayın literatüründe farklı mikroorganizmalar için ortam tasarımları yapılmış ve yarı-tanımlanmış ortamlar verilmiştir. Fakat farklı yayınlarda aynı tür mikroorganizma için yapılan ortam tasarımında dahi üretim ortamı bileşen ve derişimleri birbirinden farklılık

göstermektedir. Literatürde Hanlon *et al.* (1981) yaptıkları çalışmada kısıtlı karbon ve azot kaynakları kullanıldığında *Bacillus licheniformis*'in üstel çoğalması sırasında basitrasin ve proteaz üretiminin sporlanma ile ilgisini; Hanlon *et al.* 1982'de yaptıkları ikinci çalışmada ise *Bacillus licheniformis* tarafından gerçekleştirilen basitrasin ve proteaz üretimi üzerine Glukoz, amonyum ve magnezyum derişiminin etkisini; Frankena *et al.*(1985) sürekli kültürde *Bacillus licheniformis*'in çoğalma ve hücre dışı enzim üretimini; 1986'da yaptıkları ikinci çalışmada Glukoz kısıtlaması dışındaki kısıtlamaların *Bacillus licheniformis*'in çoğalma ve hücre dışı enzim üretimine etkisini; Moon and Parulekar (1991,1993) sürekli ve kesikli işletimde alkali proteaz üretimi için karbon ve enerji kaynaklarının etkilerini; Hübner *et al* (1993) *Bacillus licheniformis* ile kompleks bir ortamda kesikli ve yarı kesikli işletimlerde alkali proteaz üretimini araştırmışlardır. Çalık vd (1999) *Bacillus licheniformis* ile SAP üretim prosesinde Hücreiçi tepkimelerin önce biyokimyasını inceleyerek tepkime yolizini belirlemişler; sonra kütle korunum temelli 105 metabolitin yer aldığı 147 tepkimeden oluşan matematik model kurulmuştur. Matematik model bir optimizasyon yaklaşımı yapılarak çözülmüş ve biyoproses süresince değişik kalma süreleri için metabolik yolizi analizi yapılarak tepkime hızlarındaki değişimler incelenmiştir. Çalık vd (1999) *Bacillus licheniformis* tarafından üretilen SAP enziminin metabolik yolizi analizlerinde oksijen aktarımının etkisini incelemişlerdir. Çalık vd (2000) oksijen aktarımının regülasyon etkisini araştırmışlar ve SAP üretimini arttırmak amacıyla dinamik biyoreaktör işletimi için bir oksijen aktarım stratejisi geliştirmişlerdir. Literatürde SAP enziminin yapıtaşları olan amino asitlerin SAP üretimine etkisi ve bunun da ötesinde üretim sırasında hücre içi metabolitlerin derişimlerinin değişimi ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır. Biyoteknolojik prosesler için metabolik yolizi analizi (MYA) son on yılda uygulanabilmekte ve bulguları prosesin geliştirilmesi amacıyla çok yararlı sonuçlar vermektedir. Yöntem hücre içi reaksiyonların hız/akı dağılımlarının belirlenmesine dayanmaktadır. Çalık vd (1999)'nin yaptığı çalışmada SAP enzimi için *Bacillus licheniformis* ile metabolik yolizi üzerindeki tepkimeler araştırılmış ve SAP sentezinde hücreiçi amino asit akılarının büyük önem taşıdığı bildirilmiştir. Özellikle SAP yapısındaki amino asitlerin %26'sını oluşturan aspartik asit grubu amino asitlerin akı değerlerinin biyoproses süresince düşük olduğu belirlenmiş ve bu amino asitler düzenleyici özelliğe sahip olduğu için de SAP sentezinde darboğaz oluşturma

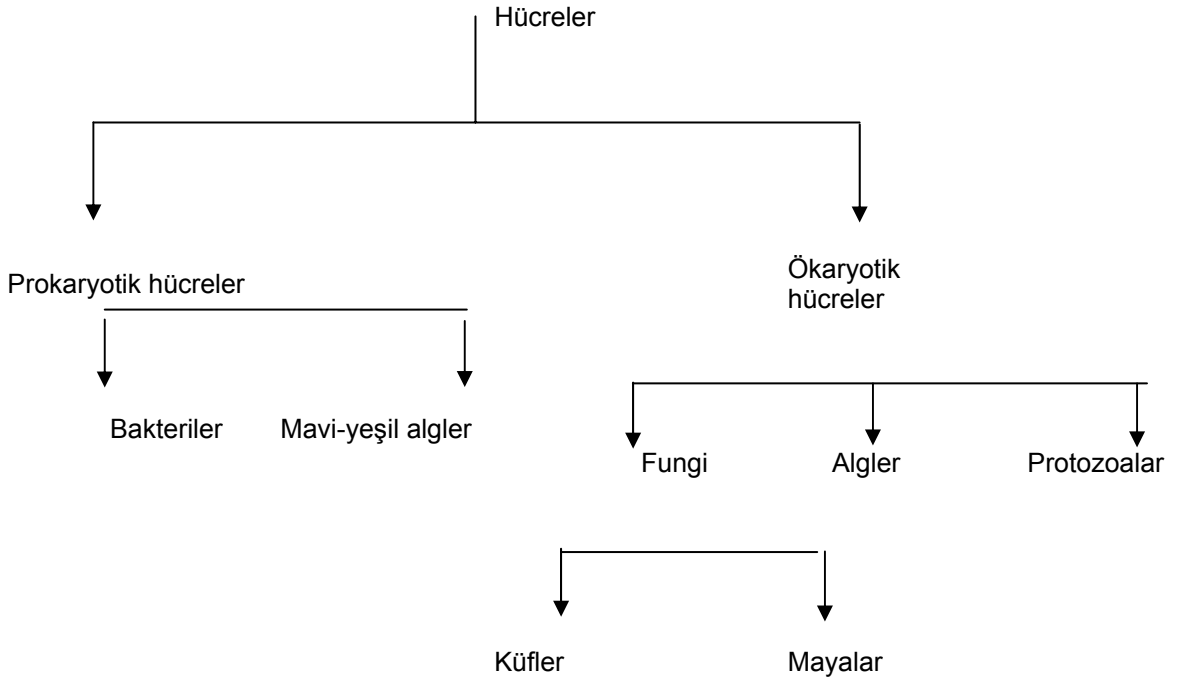
olasılığının diğer amino asitlere göre daha yüksek olması gerektiği düşünülmüştür. Bu amino asitlerin SAP üretim ortamına eklenmesi, hücre içi metabolizmayı ve akı dağılımını etkilemekte, bu da SAP üretim hızına yansımaktadır.

Bu yüksek lisans çalışmasında, SAP üretiminden sorumlu *subC* geni içeren plasmid pHV1431 taşıyan rekombinant *Bacillus* türleri konak hücre olarak kullanılarak SAP sentezini kontrol eden aspartik asit grubu amino asitler belirlenerek, bu amino asitlerin SAP verim ve seçimliliğine, ürün ve yan ürün dağılımlarına etkisi araştırılmış; metabolik yolizi analizi yapılarak tepkime hızlarındaki değişimler incelenmiştir.

2.KURAMSAL TEMELLER

2.1 Mikroorganizmalar: Mikrobiyoreaktörler

Hücreler bütün canlı organizmalarda yer alan en küçük yapısal ve fonksiyonel birimdir. Biyokimyasal reaksiyonlar canlı hücrelerde meydana gelir. Hücreler çıplak gözle görülemeyecek kadar küçük olup bunların çok ince yapıları elektron mikroskobu yardımı ile belirlenebilmektedir. Hücreler, önce gelişme, sonra bölünerek çoğalma ve bölünmeden sonra kısa süreli dinlenme, eksik metabolik maddelerini tamamlama gibi süreçlerden geçerler. Organizmalar fiziksel şekil ve yapı, enerji ve besin ihtiyaçları, çoğalma ve üretme-salgılama hızları, üreme yöntemleri ve hareket etme vasıtaları ve kabiliyetleri arasındaki farklara göre prokaryotlar ve ökaryotlar olmak üzere iki ana gruba ayrılır. Şekil 2.1'de hücrelerin sınıflandırılması verilmiştir (Bailey and Ollis 1986).



Şekil 2.1 Hücrelerin sınıflandırılması

2.1.1 Hücreslerin yapısı

Metabolizma yani biyokimyasal reaksiyonlar dizisinin iyi anlaşılabilmesi için hücrenin yapısı, organelleri ve biyokimyasal reaksiyonların hücrenin hangi bölümlerinde meydana geldiğinin bilinmesi gerekmektedir.

Prokaryotik hücreler (tek hücreliler) yapısal olarak, oldukça basit ve ökaryotik hücrelere kıyasla daha küçük hücrelerdir. Bu hücrelerin yaşamsal olayları için farklılaşmış organelleri yoktur. Ökaryot hücreler ise organelleriyle yapısal özellikler gösteren, çekirdeği bir zarla stoplazmadan ayrılmış hücrelerdir. Bu hücreler belirtildiği gibi kendi aralarında farklılıklar gösterse de yapılarında üç ana bölüm yer almaktadır. Bunlar 1.Hücre zarı 2. Stoplazma 3. Çekirdek.

Hücre zarı; özel bir protoplazma yapısında olan ve hücreye şeklini veren, hücrenin biçimini koruyan ve ayrıca hücreyi diğer hücrelerden ayıran ince bir yapıdır. Ayrıca, dışarıdan alınan uygun besinlerle, salgıların stoplazmaya girmesini ve hücre içinde oluşan metabolizma ürünlerinin de dışarıya çıkmasını sağlar.

Stoplazma; çekirdek ile zar arasındaki kısım olup içerisinde kolloidal özellikte stoplazma sıvısı ile çeşitli proteinler ve enzimler bulunur. Stoplazma içerisinde hücrenin organelleri dağılmış durumdadır.

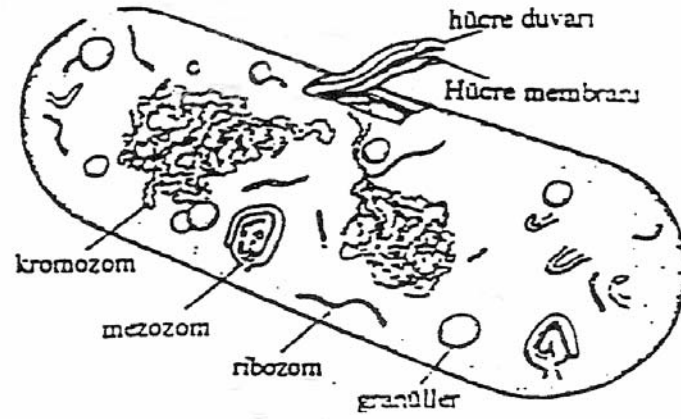
Çekirdek; her hücrede hücre şekline ve büyüklüğüne uygun biçimde olan ve stoplazma ile sarılı durumda bulunan hücrenin en önemli organelidir. Çekirdeğin çevresi bir zar ile çevrili olup bu zar aracılığı ile stoplazmadan sürekli olarak madde alışverişi olmaktadır (Pekin 1980, Bailey and Ollis 1986).

2.1.1.1 Prokaryotik hücreler

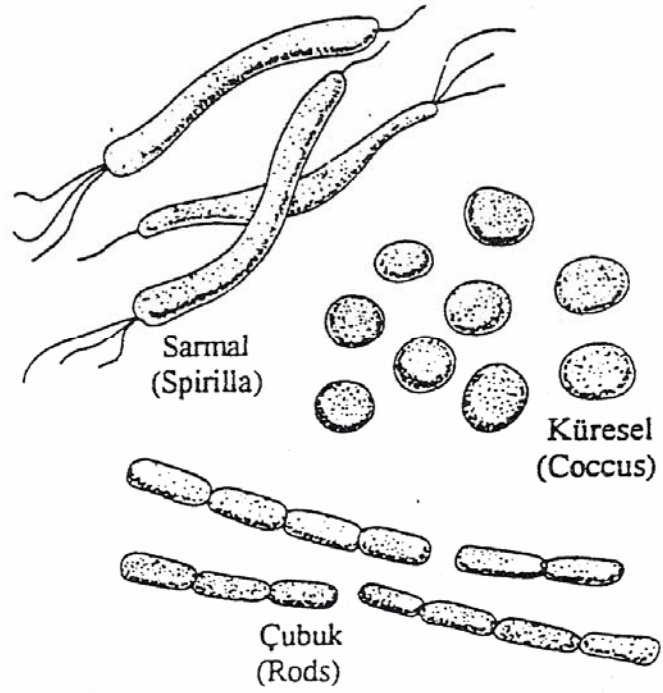
Prokaryotik hücreler küçük ve basit hücrelerdir; zarla çevrili çekirdek içermezler. Prokaryotik hücreler genellikle yalnız bulunurlar ve diğer hücreler ile birleşmezler. Bu gruptaki hücreler küresel, spiral ve çubuk biçiminde olabilirler. Boyutları 0.5-3 µm mertebesinde. Prokaryotik hücreler yaklaşık 20 dakikada bir bölünerek iki yavru hücre oluştururlar; biyokimyasal olarak zengindirler ve birçok karbon kaynağını kullanabilirler. Bu ve diğer özellikleri prokaryotik hücrelerin geniş bir çevreye adapte olmalarını sağlar. Prokaryotik bir hücre yaklaşık 200 Å kalınlıkta gözenekli hücre duvarı tarafından sarılmıştır. Bu duvar hücrenin bütünlüğünü korur ve ona yapısal olarak dayanıklılık verir. Hücre duvarının altında yaklaşık 70 Å kalınlığında hücre zarı vardır. Plazma zarı olarak da adlandırılan bu zar tüm hücrelerde bulunur. Hücre zarı karbon ve enerji kaynaklarının hücreye taşınımını, stoplazmaya geçmesini ve hücre içinde oluşan metabolik ürünlerinin de hücre dışına aktarımını sağlar. Hücrelerin temel kontrol birimi çekirdektir ve tüm genetik bilgi bu birimde saklanır. Prokaryotik hücrelerin stoplazmalarında protein ve RNA'lardan oluşan ribozomlar bulunur. Bu birimde protein sentezi gerçekleşir. Stoplazma, çekirdek ile zar arasını dolduran ve hücre organellerini tutan sıvı maddedir. Bazı prokaryotlarda plazma zarı belli yerlerden hücre içine doğru uzayıp katlanarak zar yüzeyini arttırır. Bu katlanmalara mezozom denir. Mezozomun solunum ve hücre bölünmesi gibi hücresel etkinliklere katıldığı düşünülmektedir (Bailey and Ollis 1986).

Bakteriler

Bakterilerin tam olarak tanımlanması güçtür; prokaryotlar grubunda, tek hücreli ve bölünen mikroorganizmalar şeklinde tanımlanabilirler. Bakteriler dış taraftan sert bir hücre duvarı ile çevrilirler; türlerinin çoğunun hücre duvarının dış yüzeyi kapsül veya slime-layer olarak adlandırılan yapışkan, jelatinimsi bir tabaka ile kaplanmıştır. Tipik bakteri hücresi şekil 2.2'de gösterilmiştir. Basit bakteriler spor, kamçı ve kapsül içermezler. 0.5-2.0 mikron uzunluk ve 0.2-4.0 mikron çapındadırlar. İnce ipliksi bir ağ şeklinde görünen çekirdeği doğrudan doğruya sitoplazma ile sınırlanmış olan bakteriler şekil 2.3'de görülen üç temel morfolojik şekilde bulunabilirler.



Şekil 2.2. Bakteri hücresi



Şekil 2.3. Bakterilerin üç farklı formu

a) Çubuk (rod): Genel olarak 0.5-4.0 μm uzunluk ve 0.5-4.0 μm genişliktedir. *Bacillus* bu gruba girmektedir.

b) Küresel (coccus): Çapları 0.5-4 μm arasında değişmektedir.

c) Sarmal (spirilli): Yaklaşık 1 μm uzunluk ve 0.5 μm genişliktedir.

Bakteriler tür ve çevresel koşullara göre tek, ikili, kümeli ya da uzun zincirli gruplar halinde bulunabilirler. Hücre zarı besinlere karşı yarı geçirgen özellikte olup, kuru hücre ağırlığının yaklaşık %5-10'unu oluşturur. Bu zar başlıca %50 protein, %28 yağ, %15-20 karbonhidrat içeren çift katmanlı bir yapı gösterir. Gram-pozitif bakterilerin hücre zarında aromatik ve kükürt içeren amino asitler, arginin ve pirolin bulunmaz. Gram-negatif hücrelerin zarları ise lipidce daha zengindir. Hücre zarında elektron aktaran ve oksidatif fosfatlanmayı sağlayan enzimler bulunmaktadır.

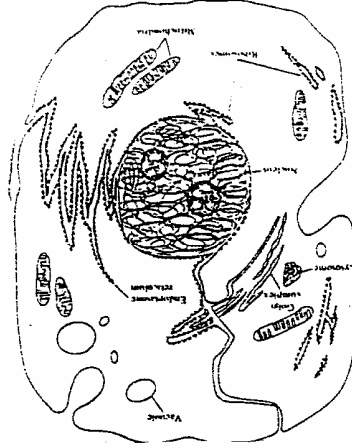
Bakteri hücrelerinde; endoplazmik retikulum, mitokondria, golgi kompleksi bulunmaz. Çubuk ve sarmal yapıda olanların bir ya da her iki ucunda bazen de tüm yüzeyinde hareket etmeye yarayan kamçı bulunur. Bu kamçıların boyları genellikle bakteri boyunun bir kaç katına ulaşır.

Bazı bakteriler stoplazmalarında spor yapma ve bulundurma potansiyeline sahiptirler. Bu tip bakteriler yüksek ve düşük sıcaklık, kuraklık, osmoz ve kimyasal etkilere karşı dirençlidirler. Çevre koşullarının uygun olmadığı durumlarda spor yapabilen bakteriler güç dış etkenlere karşı türünü koruyabilmek için "spor" oluştururlar. Spor, uygun besi yerinde ve çevre koşullarında bulunduğu zaman kendini koruyan korteksinden kurtularak yaşamsal faaliyetlerine geri döner. *Bacillus*, spor yapan bakterilerdendir. Bu bakterilerin sporları havada ve toprakta bulunmaktadır (Bailey and Ollis 1986).

2.1.1.2 Ökaryotik hücreler

Ökaryotik hücreler prokaryotik hücelere oranla daha komplekstir. Tüm yüksek organizmaların hücreleri bu sınıfa girer. Bunun yanında tek hücreli mikroorganizmaların da önemli bir grubu ökaryotik hücrelerdir. Şekil 2.3'de ökaryotik bir hücre şematik olarak gösterilmiştir. Ökaryotik hücre stoplazması, hücrenin aktivitelerini yürütmek için özel yapılara ve fonksiyonlara sahip olan çok sayıda organelle sahiptir. Ökaryotik hücreler, prokaryotik hücrelerde de bulunabilen benzer bir zar ile çevrilmiştir. Bu zarın dış yüzeyinde hücre duvarı olabilir. Bu dış örtünün yapısı hücre türüne bağlıdır. Örneğin yüksek organizmalar olan hayvan hücreleri ince bir hücre duvarına sahiptir. Bu duvarın özel yapışkan özellikleri, karaciğer gibi özel amaç için kullanılan dokuları ve organları oluşturmak için benzer hücreleri tutucu olması önemlidir. Hücre zarından başlayıp hücre içinde çekirdek zarına kadar uzanan kompleks ince membran kanallar sistemi olan endoplazmik retikulum besin maddelerinin hücre içine alınmasında işlev yapar. Golgi kompleksinin görevi ise oluşan metabolik ürünleri hücre dışına transfer etmektir. Bu hücrelerde çekirdek gözenekli bir membran ile sarılmıştır. Proteinlerin sentezinin gerçekleştiği biyokimyasal tepkime konumları olan ribozomlar, çoğunlukla endoplazmik retikulum yüzeyine gömülmüş olarak bulunurlar. Ökaryotik hücrelerde bulunan ribozomlar prokaryotik hücrelerdekinden daha büyüktür. Çekirdeğin temel işlevlerinden biri ribozomlardaki katalitik aktivitelerin denetimidir. Hücrenin temel aktivitesini ve kalıtımını sağlayan "kromatin" maddesidir. Bunun içerisinde çeşitli proteinler, DNA ve kalıtsal moleküller yani genler bulunur. Her hücre için özgün karakterler DNA molekülünde şifrelenmiştir. Çekirdeğin içerisinde ayrıca küre şeklinde bir çekirdekçik bulunmaktadır. Bunun içerisinde vakuoller ve birçok granül biçiminde parçacıklar vardır. Bunlar, RNA içerdikleri halde genellikle DNA içermezler.

Çekirdek membranlar tarafından sarılmış birkaç iç bölgeden biridir. Bu membran kaplı bölgeler organeller olarak bilinir. Mitokondri hücrenin aktivitesi için gerekli enerjiyi üretir. Bunlar, enerji üretme prosesinde oksijen kullanan bütün ökaryotik hücrelerde bulunurlar. Lizozomlar ve vakuoller şekil 2.4'de gösterilen diğer organellerdir. Genelde, bunlar kimyasal reaksiyonları ya da belirli kimyasal bileşenleri sitoplazmadan izole etmede görev yaparlar (Bailey and Ollis 1986).



Şekil 2.4. Ökaryotik hücre.

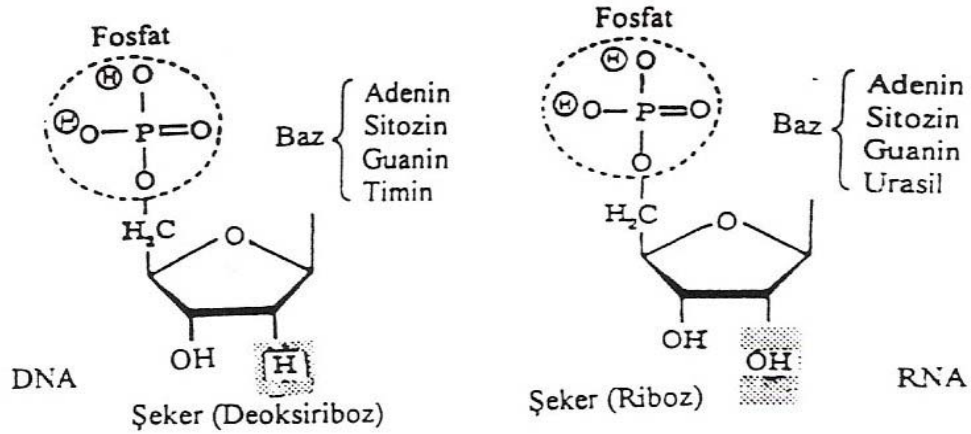
2.2 Hücre Yapısında Bulunan Bileşenler

Hücrenin istenilen ürünü üretebilmesi ve yaşamsal fonksiyonlarını devam ettirebilmesi için hücre yapısında bazı temel bileşenlerin bulunması gerekir. Bunlar; a) Nükleik asitler b) Amino asitler c) Proteinler/Enzimler d) Diğer bileşikler (Lipidler, Karbonhidratlar).

2.2.1 Nükleik asitler

Nükleik asitler, yaşam bilgilerini içeren, bunları saklayan ve proteine dönüştürülmesini sağlayan biyopolimerlerdir. Nükleik asitler nükleotid adı verilen milyonlarca monomerin fosfodiester bağı ile birbirine bağlanmasıyla oluşan uzun polinükleotid zincirlerdir. Nükleik asit monomerleri -nükleotidler- üç temel birimden meydana gelmiştir. Bunlar bir şeker, bir azotlu baz ve bir fosforik asittir.

Deoksiribonükleik asit (DNA) ve ribonükleik asit (RNA) olmak üzere iki tür nükleik asit vardır. Bunlar yapılarındaki şekerle adlandırılırlar. DNA'da deoksiriboz, RNA'da ise riboz şekeri bulunur (Şekil 2.5). Nükleik asitlerin fosfat kısmı, fosforik asidin diesteri şeklindedir. Bu yapı nükleik asitleri zincirlerin 3'-5' yerlerinden birbirine bağlar. (Lewin 1998).



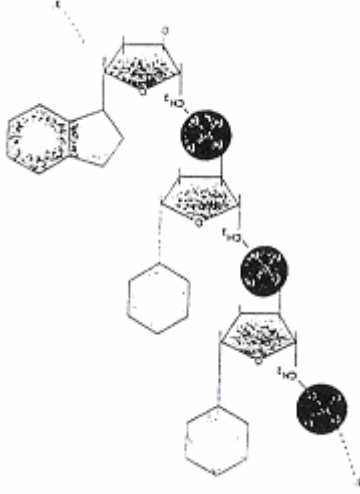
Şekil 2.5 DNA ve RNA yapısı.

Azotlu bazlar, N içeren halka şeklindeki bazlardır. Nükleotidlerde bulunan azotlu bazlar pürin ve pirimidin bazları olarak iki gruba ayrılır. DNA'da urasil içeren nükleotid, RNA'da ise timin bazını içeren nükleotid bulunmaz.

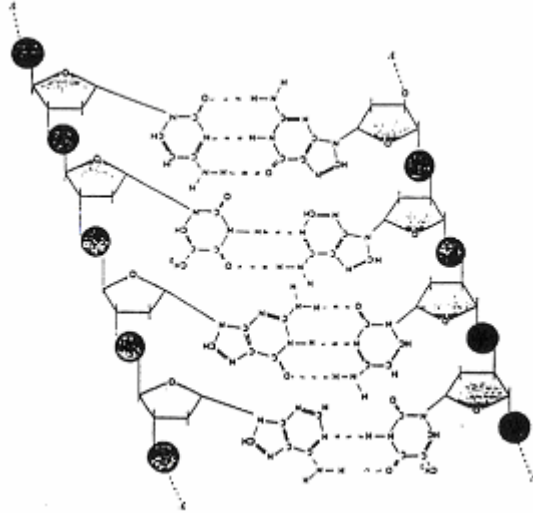
a) Pirimidin bazları: Pirimidin, 1,3-diazindir yani 6'lı halkasının 1- ve 3- yerlerinde iki azot bulunur. Bunun türevleri timin (T), sitozin (C) ve urasil (U) dir.

b) Pürin bazları: Pürin halkası, imidazol ve pirimidin halkalarının kaynaşmasıyla oluşmuştur. Bunun türevleri adenin (A) ve guanin (G) dir.

Nükleik asitlerin primer (birincil) yapısı, milyonlarca nükleotidin 5'-3' yerlerinden fosfodiester bağı ile birbirine bağlanmasıyla oluşan uzun zincir yapısıdır. Nükleik asitlerin birincil yapısı Şekil 2.6'da gösterilmiştir. Nükleik asitlerin ikincil (sekonder) yapıları; uygun pirimidin ve pürin bazlarının hidrojen bağlarıyla birbirine bağlanarak eşleşmesiyle oluşur. Birbiriyle eşleşen bazlar; A=T ; A=U ; G≡C Eşleşen bazların açık formülleri şekil 2.7'de gösterilmiştir (Lewin 1998).



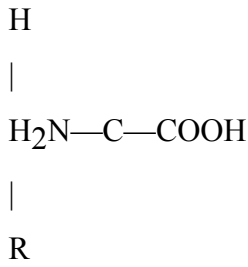
Şekil 2.6 DNA'nın birincil yapısı



Şekil 2.7 DNA'nın ikincil yapısı

2.2.2 Amino asitler

Poliipeptitlerin ve dolayısıyla proteinlerin yapı taşları olan amino asitler peptid bağlarıyla bağlanarak, DNA yapısına göre belirlenen dizinde ve uzunlukta dallanmış biyopolimer zincirleri oluştururlar. Proteinleri oluşturan yirmi temel amino asit α yapısındadır ve bunlar α karbon atomuna bağlı bir amino grubu, bir karboksil grubu ve amino asiti simgeleyen bir R grubundan oluşur. Yapıdaki bu R grubunun her amino asite göre farklılık göstermesi nedeniyle, yirmi amino asit arasında kimyasal boyut, elektrik yükü ve çözünürlük, hidrojen bağlama kapasitesi ve kimyasal reaktivite açısından farklar meydana gelir. R grubunu takip eden karbon sayısı birden fazla ise -NH₂ grubunun bağlandığı yer α, β, γ şeklinde olabilmektedir. α amino asitlerin genel formülü aşağıdaki gibidir.



Proteinlerin yapı taşları olan α amino asit yapısındaki yirmi amino asit DNA üzerinde kodlanmıştır; özgün amino asit kodonları transkripsiyon sırasında karşılık gelen amino asitin protein dizininde yerini almasını sağlarlar. Amino asitler R gruplarının özelliklerine göre sınıflandırılırlar. Bunların en önemlisi R gruplarının polaritesine göre yapılan sınıflandırmadır. Buna göre amino asitler ;

1. Polar olmayan (nonpolar), alifatik R grubuna sahip amino asitler: Bu gruptaki amino asitlerin R grupları nonpolar ve hidrofobiktir. Bu gruba giren amino asitlerden alanin, valin, lözin ve izolözin birbirinden farklı olan yapılarıyla protein sentezinde hidrofobik etkileşimlerde önemli rol oynarlar. Glisin amino asit yapısı bakımından basit bir yapıya sahiptir, bu özelliği sayesinde, protein yapısına katıldığında diğer amino asitlere nazaran kimyasal yapıda daha fazla bir esneklik sağlar. Prolin ise tam tersi bir kimyasal yapıya sahiptir. Yapısındaki ikinci amino grubu nedeniyle protein yapısına katıldığında kimyasal esnekliği azaltır.

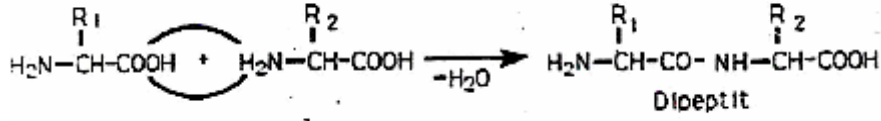
2. Aromatik R grubuna sahip amino asitler: Fenil alanin, tirozin ve triptofan yapılarında aromatik grup içerirler. Bu gruplar aynı zamanda nonpolar ve hidrofobik özellik de gösterirler. Bütün hepsinde aromatik grubu bir yerden bir yere aktarmak oldukça güçtür. Tirozinin yapısındaki hidroksil grubu hidrojen aktivitelere etki eden önemli bir fonksiyonel gruptur. Tirozin ve triptofan fenil alanine göre daha polar bir yapıya sahiptirler. Bunun nedeni, tirozinin hidroksil grubu ve triptofanın indol halkasında bulunan azot atomudur.

3. Polar, yüksüz R grubuna sahip amino asitler: Bu gruptaki amino asitlerin suda çözünürlükleri nonpolar amino asitlere göre daha fazladır. R grupları su ile hidrojen bağı yapabilen yüksüz polar fonksiyonel gruplar içerir. Bu gruptaki amino asitler serin, treonin, sistein, metionin, asparajin ve glutamindir. Bu amino asitlerden serin, treonin ve tirozinin polaritesi, hidroksil gruplarından asparajin ve glutaminin amid gruplarından sisteinin ise sülfidril grubundan kaynaklanır. Asparajin ve glutamin, aspartat ve glutamik asidin amidasyonu ile sentezlenirler ve her ikisi de asit ve bazla kolayca hidrolizlenirler. Ayrıca iki sistein molekülü birbirlerine disülfid köprüsüyle bağlanarak sistin adı verilen dimerik amino asiti oluştururlar. Bu yapıda bulunan disülfid köprüsü birçok protein yapısında bulunur ve molekülün kararlılığının artmasına neden olur.

4. Negatif yüklü R grubuna sahip amino asitler: Bu grupta yer alan iki amino asit aspartat ve glutamik asitin yapılarında tamamen iyonize olmuş ve böylece pH=7.0'de negatif yüklenmiş ikinci bir karboksil grubu bulunmaktadır.

5. Pozitif yüklü R grubuna sahip amino asitler: Bu gruptaki amino asitler pH=7.0'de net bir pozitif yüke sahiptirler ve bunlar alifatik zincirinde ϵ pozisyonunda bulunan ikinci bir amino grubuna, histidin ise imidazol grubuna sahiptir.

İki amino asit arasında bir amino asitin karboksil ($-\text{COOH}$) grubunun diğer amino asitin amino grubuna bağlanması sonucu yapıdan bir su molekülünün ayrılmasıyla oluşan bağa peptid bağı, bu bağlanma sonucunda oluşan yapıya ise dipeptit adı verilir.



Oluşan dipeptitin amino veya karboksil grubuna başka bir amino asit bağlanmasıyla tripeptitler meydana gelir. Bu olay böyle devam ederse 3-10 kadar amino asitin birleşmesiyle oluşan yapıya oligopeptit adı verilir. Proteinlerde ise amino asitler yüzlerce olabilir. Bu yapılara da polipeptit adı verilir.

Peptitlerin yapısındaki amino asitler belirli bir sıraya göre dizilmeleri sonucu peptitlerin primer yapıları meydana gelir. Her polipeptit zinciri, belirli bir molekül ağırlığına, kimyasal bileşime, sıralı amino asit yapı bloklarına ve üç boyutlu yapıya sahiptir (Lehninger *et al.* 1993).

2.2.3 Proteinler

Proteinler, hücrelerde en çok bulunan ve yaşamsal olarak en önemli biyopolimerlerdir. Hücrenin kuru ağırlığının %50'sinden fazlasını proteinler oluşturur. Proteinler yapısındaki çok sayıdaki polipeptit zincirinden oluşur. Molekül ağırlıkları çok büyük biyopolimerler olan proteinlerin birçok biyolojik görevi vardır. Bu görevleri şu şekilde özetleyebiliriz:

a) Taşıyıcı proteinler: Proteinlerin önemli görevlerinden biridir. Taşıyıcı proteinlerin önemlilerinden olan kandaki proteinler, bir organdaki özel molekülleri veya iyonları başka bir organa taşırlar.

b) Depolayıcı proteinler: Proteinlerin de depo görevleri vardır. Bitkilerde zein, gliadin, insanlarda ferritin, sütte kazein depolayıcı görev yapan proteinlerdir.

c) Kontraktil proteinler: Proteinler organizmanın hareket fonksiyonunda da önemlidir. Kasların büyük bir kısmı miyosin ve aktin olarak isimlendirilen kontraktil proteinlerden oluşur.

d) Yapısal proteinler: Proteinler organizmaların yapılarında da temel birim olarak görev yaparlar. Örneğin hücre zarı ve hücre duvarının yapısında birçok protein bulunmaktadır.

e) Koruyucu proteinler: Proteinler koruyucu olarak da görev yaparlar. Antikorlar, fibrinojen gibi birçok koruyucu madde protein yapısındadır.

f) Düzenleyici proteinler: Metabolik reaksiyonların dengeli bir şekilde devamını kontrol altında bulunduran bir kısım hormonlar protein yapısındadır.

g) Enzimler: Çeşitli biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen binlerce enzim de protein yapısındadır.

Proteinler yapılarına göre basit ve birleşik olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar.

1.Basit proteinler: Yapılarında yalnızca L- α -amino asitleri içeren bunun dışında herhangi bir kimyasal bileşik içermeyen proteinlerdir. Basit proteinler kendi aralarında altı gruba ayrılmışlardır. a) Albuminler b) Globülinler c) Glutenler d) Prolaminler e) Albüminoidler f)Histonlar g) Protaminler

2. Birleşik proteinler: Yapılarında amino asitler yanında başka kimyasal bileşikler de içeren proteinlerdir. Birleşik proteinlerin amino asitler dışında kalan bölümleri prostetik gruplar olarak adlandırılır. Yapılarında bulunan bu prostetik gruplara göre birleşik proteinler sınıflandırılır. Bunlar a) Nükleoproteinler b) Fosfoproteinler c) Glikoproteinler d) Kromoproteinler e) Lipoproteinler f) Metaloproteinler

Proteinler çözünürlüklerine veya moleküler yapılarına göre de sınıflandırılabilirler. Suda çözünen proteinler, küresel (globular) proteinlerdir. Yumurta akı proteinleri (albuminler) ve kimi kan serumu proteinleri (globülinler) bu sınıfa girerler. Küresel proteinlerde polipeptit zincirleri küre şeklinde sıkı olarak sarılmışlardır.

Suda çözünmeyenler ise ipliksi (fibrous) proteinlerdir. İpliksi proteinler, tek bir eksen boyunca paralel yerleşmiş uzun iplik veya şerit şeklindeki polipeptit zincirlerinden oluşur. Boynuz, tırnak, saç, tüy gibi organların temel proteini olan keratin, deri ve bağ dokularını oluşturan kollagen bu sınıfa girerler. Bir protein molekülü birbirini tamamlayan dört yapının sonucu olarak oluşur ve bu yapıları ile belirginleşir.

1. Proteinlerin birincil yapısı: Belirli bir tür ve yapıda amino asitlerin belirgin bir sıraya göre peptit bağları oluşturarak dizilmesi ve bu zincirin bazı noktalarda dallanarak yan zincirler oluşturabilmesi sonunda proteinlerin birincil yapısı oluşur.

2. Proteinlerin ikincil yapısı: Kükürt ya da hidrojen bağları ile peptit zincirinin helozonlaşması ya da katlanması sonunda proteinlerin ikincil yapıları oluşmaktadır. İkincil yapıya üç şekilde rastlanmaktadır.

a) Kıvrımlı yaprak düzeni: Polipeptit zincirleri N-terminal uçlarından başlayarak birbirine paralel aynı doğrultuda uzanarak ve zincirlerin peptit bağları arasında hidrojen bağları oluşturarak kıvrımlı yaprak düzenini oluştururlar.

b) Yaprak düzeni: Bir polipeptit zinciri komşu bir polipeptit zincirine antiparalel olarak uzanırsa ve peptit bağları arasında hidrojen bağları oluşturursa proteinlerin yaprak düzeni meydana gelir.

c) Tripl heliks düzeni: Tripl heliks yapısında C=O ve NH grupları belirli aralıklarla karşı karşıya gelerek aynı zincir içerisinde hidrojen bağlarını oluştururlar.

3. Proteinlerin üçüncül (tersiyer) yapıları: Uzun polipeptit zincirinin üç boyutta, birbiri üzerine kıvrılıp, katlanmasıyla meydana gelir. Böylece küresel proteinlerin sıkıca sarılmış küresel yapısı ortaya çıkar.

4. Proteinlerin dördüncül yapısı: Birincil, ikincil, üçüncül yapıyı içeren polipeptit birimleri (monomerler) birleşerek dördüncü yapıyı oluştururlar. Kuaterner yapıya en güzel örnek hemoglobin molekülüdür. Kuaterner yapı enzim aktiviteleri üzerinde etkin olmaktadır (Bailey and Ollis 1986, Lehninger *et al* 1993).

2.2.4 Enzimler

Enzimler, protein yapısında olan ve biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen katalizörlerdir. Enzimler en geniş protein sınıfını oluştururlar. Reaksiyon hızını, bir değişikliğe uğramadan ve dengeyi etkilemeden artırırlar. Katalitik etkinlikleri kimyasal katalizörlerinkinden çok daha fazladır. Biyokatalitik işlevlerinde spesifiktirler. Enzimlerle reaksiyon veren substratlar enzimin herhangi yerine değil, aktif konumlara bağlanır. Her enzim özgün aktif konumlara sahiptir. Tepkimenin katalizlenmesinde bu serin, histidin ve aspartik asit grupları bulunmakta, proteinlerin hidrolizinde bu gruplar kullanılmaktadır. Bazı enzimler ise katalitik aktivite göstermek için protein yapısında olmayan, "kofaktör" adı verilen moleküllere ihtiyaç duyarlar (Çalık 1998).

2.2.4.1 Enzim aktivitesi

Enzimlerin katalitik etkinliği "aktiviteleri" ile tanımlanmaktadır. Enzim aktivitesi enzimin yapısı dışında pH'a, sıcaklığa, basınç ve gerilimlere, kimyasal bileşenlere, ışık, ses ve iyonizasyon radyasyonuna bağlıdır. Bu nedenle aktivite tanımının belli koşullarda yapılması gerekir. Enzimlerin aktiviteleri genellikle katalizledikleri tepkimenin "başlangıç hızları" tayin edilerek bulunur. İki türlü aktivite tanımı yapılmaktadır. Enzim aktivitesi:

1. Birim zamanda bir mol aktif enzim tarafından ürüne dönüştürülen substratın mol sayısı (turn-over sayısı) veya

2. Dakikada 1 µmol substratı ürüne dönüştüren miligram enzim miktarı (enzim ünitesi) olarak tanımlanmaktadır (Aiba *et al.* 1973).

Molekül içi kuvvetler arasındaki denge, enzimlerin bütünlüğü ve kararlılığı açısından çok önemlidir. Çevredeki herhangi bir değişiklik enzimin yapısındaki ve kararlılığındaki dengeyi tayin eder yani kararlı veya denatüre (bozunmuş) olmasını sağlar. Doğal enzimler sadece kendi çevrelerinde kararlıdır. Denatürasyon veya inaktivasyon koşullarında enzimlerin yapıları değişir ve bunun sonunda enzimler inaktif hale gelirler. Çevre etkili denatürasyon değişik fiziksel, kimyasal, biyolojik bozucu bileşiklerin etkisiyle meydana gelir (Schmid 1979, Bailey and Ollis 1986).

Enzim aktivitesi;

*pH

*sıcaklık

*mekanik kuvvetler –basınç ve kesme gerilimleri (hidrodinamik kuvvetler), hidrostatik basınç, ara yüzey gerilimi-

*ışık, ses ve iyonizasyon radyasyonu,

*kimyasal bileşenler (alkol, üre, hidrojen peroksit, vd)

*biyolojik etkenler

gibi faktörlerden etkilenir.

2.2.4.2 Enzimatik tepkimenin kinetiği

Enzim, substrat derişimleri arasındaki ilişkiyi, en basit şekilde açıklayan model Michaelis-Menten Modeli'dir.

Tek substratlı bir tepkimede ürün oluşumu Michaelis-Menten Modeli'ne göre substrat ve enzimin oluşturduğu aktif bir kompleks üzerinden yürür. Bu mekanizma katalizörün rejenerasyonunu da içermektedir.



Michaelis-Menten Kinetiğinin temel varsayımları aşağıda verilmiştir :

1. Enzim katalizördür,
2. Enzim ile substrat, enzim-substrat kompleksini oluşturmak için hızla tepkimeye girerler,
3. Tek bir substrat için tek bir enzim-substrat kompleksi oluşur. Oluşan enzim-substrat kompleksi bir sonraki basamakta ürünü ve serbest enzimi oluşturur,
4. Enzim ile substratın enzim-substrat kompleksi oluşum tepkimesi denge tepkimesidir,
5. Enzim-substrat kompleksinin enzim ve substrata parçalanması, kompleksin ardışık tepkimeyle ürüne ve enzime parçalanmasından daha hızlı bir tepkime,dir,
6. Substrat derişimi enzim derişiminden çok yüksektir. Bu nedenle enzim-substrat kompleksi oluşumu substrat derişimini değıştirmez,
7. Tüm tepkime hızını enzim-substrat kompleksinden enzim+ürün oluşum tepkimesi olan ardışık ikinci tepkime kısıtlar (Bayram 2002).

Ürün oluşumu için tepkime hızı yazılırsa,

$$r_U = -r_S = k_U C_{ES} \quad (2.1)$$

$$r_G = r_{\max} C_S / (K_M + C_S) = -dC_S/dt \quad (2.2)$$

Burada K_M , MM sabitidir ve aşağıdaki gibi tanımlanır:

$$K_M = (k_2 + k_0) / k_1 \quad (2.3)$$

Denklem (2.2) doğrusallaştırılır ve düzenlenirse; $1/r$ 'ye karşı $1/C_S$ grafiğe geçirildiğinde ordinatı kesen nokta $1/r_{\max}$ 'ı, eğim ise $K_M/r_{\max}$ 'ı verir. Tepkime hız denklemi (2.2) kesikli biyoreaktör için kütle korunum denklemi ile birleştirilir, sınır koşullar belirlenip integrali alınırsa denklem (2.4) elde edilir.

$$r_{\max} t = (C_{SO} - C_S) + K_M \ln(C_{SO}/C_S) \quad (2.4)$$

2.2.4.3 Enzim inhibisyonu

Enzimlerle kompleks oluşturarak tepkime hızını azaltan bileşiklere *inhibitör* adı verilir. Tepkime hızının ortamda bulunan bir madde tarafından azalmasına ise *inhibisyon* denir. İnhibitörün enzime bağlanma durumuna göre inhibisyon termodinamik açıdan iki ana sınıfa ayrılır. Bunlar:

*Tersinir inhibisyon ve

*Tersinmez inhibisyonudur.

Tersinmez inhibisyon da kendi içinde alt gruplara ayrılır. Bunlar:

*Yarışmalı inhibisyon

*Yarışmasız inhibisyon

*Sınırlı yarışmalı inhibisyon ve

*Karışık inhibisyonudur (Aiba *et al.* 1973).

2.2.4.4 Proteolitik enzimler

Proteolitik enzimler deterjan katkı maddeleri olarak büyük miktarlarda tüketimleri nedeniyle en önemli endüstriyel enzimlerdir. Peptit bağlarını hidrolize eden proteolitik enzimler tepkimeleri katalizleme biçimine bağlı olarak peptidazlar ve proteazlar olmak üzere ikiye ayrılırlar. Peptidazlar ancak uç amino asitleri uzaklaştırabildiği veya dipeptitleri hidrolizleyebildiğinden ikincil öneme sahiptir. Proteazlar ise fizikokimyasal ve katalitik özellikleri dikkate alındığında kompleks enzimlerdir. Proteazlar, proteinleri peptitler veya amino asitler gibi daha küçük parçalara hidrolizleyen enzimlerdir. Mikrobiyal proteazlar, aktivitelerinin maksimum olduğu pH aralığına bağlı olarak üç gruba ayrılırlar; asit, nötral ve alkali proteazlar.

Birçok bakteri ve mantarda proteazları üretme potansiyeli bulunur. Ancak enzim endüstrisinde, gram-pozitif bakteri türlerinden *Bacillus* türleri, proteazları sentezleyen kaynaklar olarak kullanılırlar.

Proteazlar biyokatalizleme mekanizmaları dikkate alındığında dört gruba ayrılırlar.

Bunlar; serin proteazlar, sistein (tiyol) proteazlar, aspartik (karboksil) proteazlar ve metallo (nötral) proteazlardır (Çalık 1998).

Serin proteazlar

Mikrobiyal ve hayvan kaynaklı proteolitik enzimlerin en yaygın grubu serin proteazlardır. Serin proteazlar prokaryotik ve ökaryotik organizmalarda yer alırlar. Serin proteaz enzimlerinin aktif konumlarında, tepkimenin katalizlenmesinde kullanılan serin grupları bulunur. Birçok substrata karşı spesifik olarak aktif olan serin proteaz enzimlerinin molekül ağırlıkları küçüktür (18.5-35 kDa; 1 Dalton $1.67 \cdot 10^{-24}$ g). Serin proteazlar genellikle nötral ve alkali pH'larda aktiftirler. Optimum pH'ları 7-11 arasındadır. Bir çoğunun izoelektrik noktası pI=4.4-6.2 arasındadır (Çalık 1998).

Serin alkali proteazlar

Alkali proteazlar, protein zinciri üzerindeki tirozin, fenilalanin ve lözin gibi aromatik ve hidrofobik gruplara karşı spesifiktirler. Çeşitli bakteri, fungi ve maya türlerinin alkali proteaz üretme potansiyeli vardır. Bu enzimler, diizopropilflorofosfat (DFP) ve bir patates inhibitörüne karşı hassastırlar. Optimum pH değerleri yaklaşık pH=10'dur. Molekül ağırlıkları 15-30 kDa arasında; izoelektrik noktaları ise pI=9 dolayındadır.

Serin alkali proteaz (SAP; EC 3.4.21.14) endüstriyel enzimlerin en önemlilerindendir. Deterjan endüstrisinde kullanılan SAP, toplam enzim üretiminin %35'ini oluşturmaktadır. SAP, ayrıca gıda endüstrisinde, deri sanayinde ve fotoğraf endüstrisinde kullanılmaktadır (Çalık 1998).

SAP'ın yapısı

SAP enzimi endüstride *B.subtilis*, *B.amyloliquefaciens* ve *B.licheniformis* tarafından üretilmektedir. *B.licheniformis*'in ürettiği SAP enzimi 274 amino asitten oluşmakta ve yapısında sistein bulunmamaktadır. SAP enziminin sentezini sağlayan SAP geni (*SubC*) 1588 bp'den oluşmaktadır (Çalık 1998). *Bacillus licheniformis*'in ürettiği SAP enziminin amino asit bileşimi çizelge 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Serin alkali proteaz enziminin amino asit bileşimi (Çalık 1998)

Amino asit	Amino asit sayısı	Amino asit bileşimi (%)
Alanin (C ₃ H ₇ NO ₂)	40	14.59
Arginin (C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂)	4	1.459
Asparajin(C ₄ H ₈ N ₂ O ₈)	18	6.569
Aspartik asit (C ₄ H ₇ NO ₄)	9	3.284
Sistein (C ₄ H ₈ O ₂ NS)		0.000
Glutamin (C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃)	7	2.554
Glutamik asit (C ₅ H ₉ NO ₄)	5	1.824
Glisin (C ₂ H ₅ NO ₂)	35	12.773
Histidin (C ₆ H ₉ N ₃ O ₂)	5	1.824
İzolözin (C ₆ H ₁₃ NO ₂)	10	3.649
Lözin (C ₆ H ₁₃ NO ₂)	16	5.389
Lizin (C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂)		3.284
Metionin (C ₅ H ₁₁ O ₂ NS)	5	1.824
Lözin (C ₆ H ₁₃ NO ₂)	16	5.389
Fenilalanin (C ₉ H ₁₁ NO ₂)	4	1.459
Pirolin (C ₅ H ₉ NO ₂)	10	3.649
Serin (C ₃ H ₇ NO ₃)	32	11.678
Treonin (C ₄ H ₉ NO ₃)	20	7.299
Triptofan (C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂)	1	0.365
Tirozin (C ₉ H ₁₁ NO ₃)	13	4.744
Valin (C ₅ H ₁₁ NO ₂)	31	11.313
Toplam amino asit sayısı	274	100

2.3 Taşınım Mekanizmaları

Metabolizma substratlarının, ürünlerin ve yan ürünlerin hücre içine ve hücre dışına taşınmaları, hücrenin çoğalabilmesi, istenen ürünleri üretebilmesi ve fonksiyonlarını yerine getirebilmesi için önemlidir. Hücreler içinde çeşitli proteinlerin yerleşik olduğu plazma membranlar ile çevrilidir. Bu membranlar, bazı maddelerin geçişini kolaylaştırırken bazılarının da geçişini engeller. Örneğin iyonlar ve çeşitli metabolitler gibi hidrofilik maddelere karşı geçirgen değildir. Membranın bu özelliği seçici geçirgenlik olarak adlandırılmıştır. Hücre içindeki tepkimelerin gerçekleşebilmesi için girdilerin hücreye taşınımı, ürünlerin ve hücre içinde istenmeyen, gerekenden fazla derişimde bulunan maddelerin hücre dışına aktarımı gereklidir.

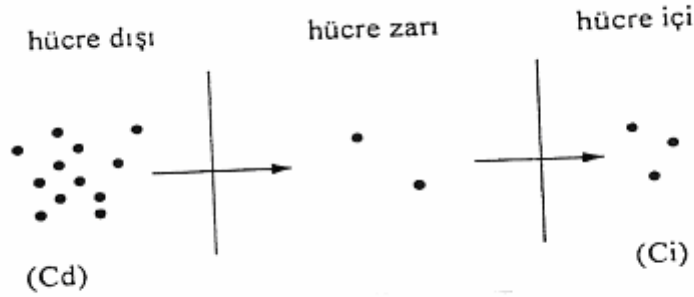
Maddelerin hücre-dışı veya hücre-içi membranlardan geçişlerinin olduğu mekanizmalar, taşınım mekanizmaları olarak adlandırılır. Stoplazmik membran, hücre-içi ve hücre-dışı ortam arasında önemli bir duvar olduğundan bu membrandan taşınım üzerinde durulmuştur. Üç farklı taşınım mekanizması vardır: (Erincin 1998).

1. Serbest yayınma
2. Kolaylaştırılmış yayınma
3. Aktif taşınım (Erincin 1998).

2.3.1 Serbest yayınma

Bir maddenin serbest yayınma ile membrandan taşınımı üç basamaktan oluşur. 1. Maddenin hücre-dışı ortamdan membran fazına taşınımı 2. Lipid membran boyunca moleküler yayınma 3. Lipid membran fazından stoplazmaya taşınım. Serbest yayınmada taşınım hızı ve net akı, membrandan geçen maddenin derişim gradyenti ile doğru orantılıdır. Eğer membran maddeye karşı geçirgense ve membranın bir tarafındaki derişimi diğer taraftan yüksekse, madde azalan derişim gradyeni ile doğru orantılıdır.

Eğer membran maddeye karşı geçirgense ve membranın bir tarafındaki derişimi diğer taraftan yüksekse, madde azalan derişim farkı ne kadar fazla ise yürütücü kuvvet sağlayabilir. Yürütücü kuvvete aldırış etmeksizin geçirgen membranlar boyunca pasif yayınma sadece, taşınım prosesi için serbest enerjideki değişiminin negatif olduğu yönde kendiliğinden meydana gelir. Serbest yayınma şekil 2.8'de gösterilmiştir (Erincin 1998).



Şekil 2.8. Serbest yayınma

2.3.2 Kolaylaştırılmış yayınma

Hücre zarının yapısından dolayı her kimyasal ve biyokimyasal madde aynı kolaylıkla difüzlenememektedir. Genellikle zardaki gözeneklerden ötürü, küçük moleküllerin yayınması kolay olduğu halde daha büyük moleküllerinki daha güç olmaktadır. Ancak pek çok metabolit kolaylaştırılmış yayınma ile hücre zarından daha kolay ve hızlı difüzlenebilmektedir.

Kolaylaştırılmış yayınma, enerji gerektirmeyen mekanizmalarla bir bileşimin, taşıyıcı proteinler yardımıyla membrandan geçişinin yer aldığı proseslerdir

.Kolaylaştırılmış yayınmada, difüzlenen madde hücre zarından bir taşıyıcı molekül ile birleşir ve zarın içinde kolaylıkla taşınarak öteki ucta taşıyıcıdan ayrılır. Stoplazmik membranda çok sayıda bulunan, permeazlar ve taşıyıcı proteinler olarak bilinen bu moleküller, substratlarına membranların dış yüzeyinde bağlanır ve membranda taşıyıcı-substrat kompleksinin ayrıldığı iç yüzeye geçişlerini sağlayarak, substrat hücre içine bırakır.

Kolaylaştırılmış yayınmada, substratın yüksek derişimden düşük derişime azalan derişim gradyeni boyunca taşınması açısından serbest yayınmaya benzerdir. Ancak serbest yayınmaya kıyasla daha hızlı bir prosestir. Bileşik, ancak uygun boş bir taşıyıcı olduğunda membrana girebilir. Substrat spesifik taşınım mekanizması olan kolaylaştırılmış yayınmada ökaryotik mikroorganizmalar için genel, ancak bakteriler/prokaryotlar için az rastlanan taşınım mekanizmasıdır. Fungide/ökaryotlarda bu mekanizmayla taşınan en önemli maddeler glukoz ve diğer şekerlerdir. Prokaryotlarda ise bu maddeler diğer mekanizmalarla taşınır. Şekil 2.9 'da kolaylaştırılmış yayınmada görülmektedir (Erincin 1998).

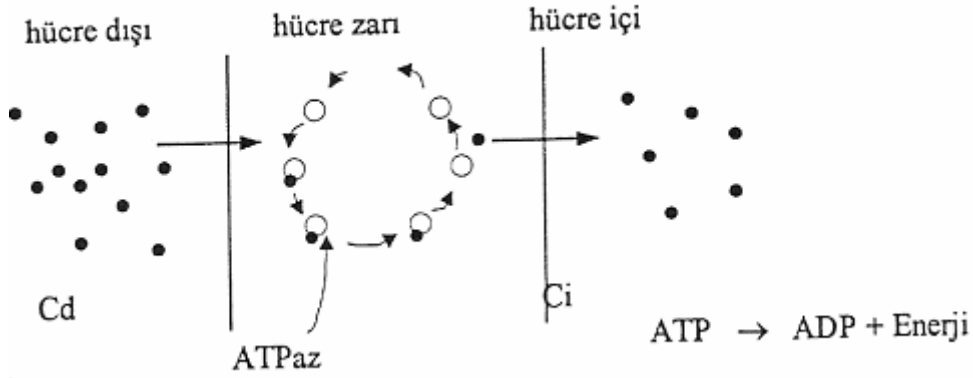


Şekil 2.9 Kolaylaştırılmış yayınmada

2.3.3 Aktif taşınım

Aktif taşınım, moleküllerin derişim gradyenleri veya iyonların elektrokimyasal gradyenler oluşturarak membrandan taşınımının gerçekleştiği proseslerdir.

.Aktif taşınım, taşınım prosesinde taşıyıcı proteinlerin rol oynaması açısından kolaylaştırılmış difüzyona benzer. Ancak kolaylaştırılmış difüzyonun tersine, taşınım derişim gradyeninin artan yönünde olabilir. Aktif taşınım serbest enerji tüketimi gerektiren bir prosestir. Taşınım prosesi için gereken enerji, ATP molekülündeki yüksek enerjili fosfat bağlarının parçalanması ile veya proteinin yüzeyindeki taşıyıcı olarak kendiliğinden yürüyen, azalan derişim gradyenine göre hareket eden ikinci bir maddenin eşanlı taşınımına bağlanabilir. İkincil aktif taşınım sistemleri, glukoz ve diğer şekerler için ve nötral amino asitler için belli dokularda bulunurlar. Glukoz, serbest ve kolaylaştırılmış yayınma dışında Na^+ iyonları yardımı ile aktif taşınmaya da uğramaktadır. Bakterilerde ise glukoz, enzimler yardımı ile glukoz 6 fosfata dönüştürülerek aktif taşınması gerçekleştirilir. Bu taşınma için gerekli enerji $\text{ATP} \rightarrow \text{ADP}$ dönüşmesinden sağlanır. Şekil 2.10'da aktif taşınmanın bir şeması görölmektedir (Erincin 1998).



Şekil 2.10 Aktif taşınım

2.4 *Bacillus* ve Özellikleri

Bacillus'lar spor oluşturan, büyük, hareketli ve gram pozitif bakteri türleridir. *Bacillus*

0.3-2.2 µm çapında ve 1.2-7.0 µm uzunluğunda ve morfolojik olarak çubuk şeklindedir. Hemen hemen tüm proseslerde rerler. Bu tür bakteriler toksik olmayan hücre duvarına sahiptir ve ürettiği proteinleri hücre dışına aktarırlar. Aynı zamanda *Bacillus* türü bakteriler patojen özellik göstermezler.

Bacillus'lar evre koşullarının kötü olduğu koşullarda dış etkenlere karşı korunabilmek için spor üretilirler. Sporlar uygun besi yerinde ve evre koşullarında faaliyet gösterirler. Bunların metabolizması, şiddetli solunum, şiddetli fermentasyon, ya da hem solunum hem de fermentasyon ile organik substratların dissimilasyonunu sağlar. Moleküler oksijen, solunum metabolizmasında terminal elektron alıcı olarak görev yapar. Bu bazı türlerde azot ile yer değiştirebilir. *Bacillus* sporları havada ve toprakta bulunmaktadır.

Bacillus türleri endüstriyel önemi yüksek ürünler üretmektedir. Bunlar farklı karbon kaynakları kullanarak, çok yüksek pH ve sıcaklıklarda kararlılığı yüksek ürünler üretebilirler. Aynı zamanda diğer mikroorganizmalara nazaran daha kolay genetik olarak izole edilebilirler. Ürettikleri rnleri hücre dışına salgılama kapasiteleride yüksektir. Başlıca ürettikleri ürünler antibiyotikler, vitaminler, enzimler, nkleosidler, haşarat ilaçları ve diğer biyokimyasallardır.

Bacillus'ların çoğalması için gerekli maksimum sıcaklık 25'den 75 °C'a kadar, minimum sıcaklık ise -5'den 45° C'a kadar değişmektedir. pH aralığı ise 7.5-8'den 2'ye kadar değişir (Kalender 1999).

2.4.1 *Bacillus*'ların sınıflandırılması

Bacillus'ların sınıflandırılmasında temel özellik, fenotip özellikleridir. *Bacillus*'lar bu özelliklerine göre 6 sınıfa ayrılırlar.

a) 1.Grup (*B.polymyxa* grubu)

Bu sınıf *B. polymyxa* tarafından simgelenir. Bütün türler tam anaerobtur ve oksijen yokluğunda kuvvetli olarak çoğalırlar. Bunların sporları elipsoidal şekildedir ve ana hücreyi terkederler. Bu grubun üyeleri oldukça kompleks besin ihtiyaçlarına sahiptirler ve hiçbiri prototrop değildir. Bunlar değişik şekerlerden asit üretirler.

b) 2. Grup (*B. subtilis* grubu)

B. subtilis bu grubu en iyi temsil edendir. Bu gruptaki bütün türler şekerlerden asit üretirler. Çoğu oksijen yokluğunda, eğer nitrat mevcutsa, en azından zayıf olarak kötü bir şekilde çoğalır ve anaerobik koşullar altında sadece glukozu kullanabilir. *B. subtilis* genellikle bir aerob olarak kabul edilmesine rağmen, sıkı anaerobik koşullar altında yavaş olarak çoğalabilir ve sporlaşabilir. Bundan dolayı bu bakterilerin grubu, gerçek fakültatif anaeroblar olan 1. grup strainler ve sıkı aeroblar olan 3. ve 4. gruplar arasında, bir ara gruptur. Bu bakterilerin hepsi ana hücreyi terketmeyen oval sporlar üretirler.

c) 3. Grup (*B. brevis* grubu)

Bu grubun üyeleri az olarak tanımlanmıştır. Bu grubu temsil eden *B. brevis*, taksonomik olarak heterojendir. Bu gruptaki bakteriler sıkı aerobtur ve şekerlerden asit üretmezler. Bunlar ana hücreyi terkeden elipsoidal sporlar meydana getirirler. Çoğu türleri oksidatif bir metabolizmaya sahiptir ve pepton ortamlarında alkaline bir reaksiyon meydana getirirler.

d) 4. grup (*B. sphaericus* grubu)

Bu gruptaki bütün türler, ana hücreyi terkedeabilen küresel sporlar meydana getirir. "*B. aminovarians*" haricinde, bu bakterilerin hücre duvarları diğer bütün *Bacillus* üyelerinde olduğu gibi meso-A2pm içermez. Ancak, lizin ve ornitin içerirler. Bu bakteriler sıkı aerobtur, fakat şekerlerden asit üretme kabiliyetleri kısıtlıdır. Bunlar çoğu durumlarda karbon ya da enerji kaynağı olarak şekerleri kullanmazlar ve glutamat gibi asetat ya da amino asitleri tercih ederler.

e) 5. ve 6. gruplar (Termofiller)

Termofilik *Bacillus*'lar fizyolojik ve morfolojik olarak heterojendirler. Fizyolojileri, *B.coagulans* gibi laktik fermantasyonlu fakültatif anaeroblardan, *B.thercloacae* gibi şekerler üzerinde etkisiz sıkı aeroblara kadar değişir. Bu termofilik türlerin hepsi optimum olarak $>50^{\circ}\text{C}$ 'de çoğalır. Bunların çoğu ana hücreyi terkeden oval sporlar üretir. 6.grubu oluşturan bazı termofilik, asidofilik türler, nadir yağ asitleri de içerirler. (Kalender 1999).

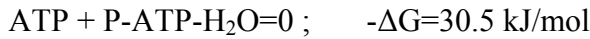
2.5 Hücreiçi Tepkimeler

Hücre içinde çok sayıda enzim katalitik tepkime oluşmaktadır; işlevsel olarak organize olan çok sayıdaki ardışık tepkime dizilerine yolizleri denir. Bu tepkimeler girdilerin hücreye taşınımı, girdilerin biyokimyasal tepkimelerle tepkime yolizi üzerindeki diğer metabolitlere ve ara-ürünlere dönüşümü ile enerji seviyesinin değişimi, temel ara-ürünlerden amino asit ve nükleik asitlerin makromoleküllere polimerizasyonu ile oluşan –sırasıyla- protein ile DNA ve RNA sentezini içerir. Hücre içindeki moleküllerin daha küçük moleküllere parçalanması, enerji elde edilmesi ya da hücre çoğalması için gereken biyokimyasal maddelerin oluşturulabilmesi amacıyla karbon kaynağının parçalanması ve bu sırada serbest enerji oluşum tepkimelerine katabolizma; küçük moleküllerden enerji kullanımıyla büyük moleküllerin ve daha sonra –proteinler ve nükleik asitler dahil olmak üzere- makromoleküllerin oluşum tepkimelerine anabolizma denir. Hücre içinde meydana gelen anabolizma ve katabolizma tepkimelerinin tümüne metabolizma denir. Bu tepkimelerde yer alan bileşiklere metabolit; hücre içinde oluşan tepkimelerin oluşturdukları tepkime yolizlerine ise metabolik yolizi denir. Canlılar:

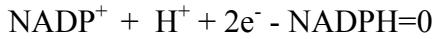
1. Molekül ve iyonların aktif taşınımı
2. Küçük moleküllerden makromoleküllerin ve diğer biyomoleküllerin hücre içinde sentezi ve

3. Hareket fonksiyonlarının yerine getirilmesi için enerjiye ihtiyaç duyarlar.

Substratlar, stoplazmaya transfer edildikten sonra, 1000'den fazla biyokimyasal tepkimeyle hücreiçi bileşiklere ve metabolik ürünlere dönüştürülür. Oluşan hücreiçi bileşenler molekül ağırlıkları ve fonksiyonları açısından birbirinden çok farklıdır. Genellikle hücrenin %90'ı protein, RNA, DNA, lipid ve karbonhidratlardan oluşmaktadır. Substratlardan makromoleküllerin oluşumu anabolik tepkimelerle oluşur. Substratlar önce amino asit ve nükleotitler gibi ana yapı taşlarına dönüşür; polimerizasyon tepkimeleriyle amino asitlerden proteinler, nükleotitlerden de DNA ve RNA sentezlenir. Anabolik tepkimeler dışarıdan enerji gereksinimi duyan tepkimelerdir. Enerji ATP'deki yüksek enerjili fosfat bağının kopmasıyla veya NADPH koenziminin indirgenmesiyle sağlanır. ATP'deki yüksek enerjili fosfat bağının indirgenmesiyle büyük miktarda enerji açığa çıkar.



NADPH, NADP⁺ya oksitlendiğinde iki elektron açığa çıkar; bu elektronlar hücre içinde diğer bileşiklere transfer edilerek bu bileşikler indirgenir.



ATP ve NADPH substratın daha düşük enerjili diğer maddelere dönüştüğü katabolik tepkimelerle oluşur (Bayram 2002).

2.5.1 Katabolik tepkimeler

Hücre çoğalmasında en çok kullanılan enerji kaynağı şekerlerdir. Şekerler CO₂, laktik asit, asetik asit ve etanol gibi metabolik ürünlere dönüşür ve bu dönüşüm sırasında ATP, NADPH ve NADH oluşumu gerçekleşir. NADH da NADPH gibi bir kofaktördür; ancak NADH oksidatif fosforilasyon gibi katabolik tepkimelerde kullanılırken, NADPH

anabolik tepkimelerde kullanılır. Şekerlerin çoğunun hücreye transferiyle G6P veya F6P'ta oluşur ve sırasıyla glikoliz yolizine ve TCA döngüsüne girerek katabolize olurlar. Glikolizde oluşan piruvat TCA çevriminde tamamen su ve karbondioksite dönüşebilir. Herbir mol piruvat oksidasyonuna karşılık TCA çevriminde bir mol ATP dört mol NADH ve bir mol de FADH₂ oluşur. Piruvatın oksidasyonu sırasında kullanılan NAD⁺ ve FAD⁺, NADH ve FADH₂'den rejenere edilir. NADH ve FADH₂ solunum zincirinde oluşur ve serbest oksijen içeren bu oksidasyon prosesi bu nedenle sadece aerobik mikroorganizmalarda gerçekleşir (Bayram 2002).

2.5.2 Anabolik tepkimeler

Hücrenin büyük bir bölümünü oluşturan makromoleküllerin oluşumu için amino asitlerin sentezi ile ardışık polimerizasyon tepkimelerinin gerçekleşmesi gerekir. Biyosentez ve polimerizasyon tepkimeleri anabolik tepkimeler olarak bilinir. Hücrede üretilen toplam enerjinin yaklaşık %70'i protein sentezi için kullanılmaktadır. Protein sentezi yüksek miktarda serbest enerjiye gereksinim duyar (Çalık 1998).

Mikroorganizmalar gereksinimleri olan bu enerjiyi, ortamda bulunan bileşiklerin kimyasal depolarında depolanmış enerjiyi kullanarak sağlar. Karbon kaynağı olarak seçilen bileşik –örneğin glukoz, sakkaroz, organik asit vd- metabolizmaya özgün bir biyokimyasal yolizinden girerek katabolik tepkimelerle küçük moleküllu ara ürünlere veya yan ürünlere dönüştürülmesiyle eşanlı olarak enerji, ATP, NADH, NADPH üretilir. Kullanılan karbon kaynağının özelliklerine ve biyoreaktör işletim koşullarına bağlı olarak hücreiçi merkezi döngü ve metabolik yolizindeki katabolizma tepkimeleri, enerji üretim tepkimeleri ve hızları belirlenir (Çalık 1998).

2.6 Biyotepkime Sisteminin Analizi

Biyotepkime sisteminin analizi, ortam tasarımının, biyoreaktör işletim parametrelerinin ve teorik kapasitenin belirlenmesine bağlı olarak yapılan metabolik yolizi mühendisliği

tekniklerinin kullanılmasıyla gerçekleştirilir. Bu analiz serin alkali proteaz üretimindeki hız kısıtlayıcı basamakları yani darboğazları ortaya çıkarmak için yapılmaktadır (Çalık vd 2000).

2.6.1 *B.licheniformis* biyokimyası ve hücreiçi tepkimeler

Karbon kaynağının *B.licheniformis*'te biyokimyasal tepkimeler üzerinden akışını belirlemek için alternatif girdilerden başlayarak, metabolik yolizini oluşturan mikroorganizma çoğalması mikroorganizmanın yaşamı, ara ürünler, ürün ve yan ürünlerin oluşumu için temel metabolik yolizi tepkimeleri bulunmuş ve çizelge 2.2'de verilmiştir.

Bacillus türlerinde glikoliz yolizi karbon metabolizmasının ana yolizlerinden biridir. Fosfo fenolpiruvat-şeker fosfo transferaz enzim sistemi (PTS) *Bacillus* türlerinde glukoz (R1), fruktoz (R5) ve mannoz (R6) taşınımını gerçekleştirir. Glikoliz yolizinin temel enzimatik tepkimeleri denklem sistemine konmuştur. Birçok glikolitik enzim tersinir tepkimeleri de katalizlemektedir. Ancak bunlardan birincisi fosfofruktakinaz enzimi R8 tepkimesinin tersini katalizleyememekte, bu enzim yerine tersinir tepkime fruktoz-1.6-bifosfat enzimi tarafından gerçekleştirilmekte ve tersinir tepkime yerine R9 tepkimesi oluşmaktadır. Tersinir tepkimenin geri tepkimesini katalizleyen ve R2 tepkimesini katalizlemeyen PTS enzim sisteminin yerine tersinir tepkime R2 tepkimesini glukoz-6-fosfotaz katalizlemektedir.

Pentoz fosfat yolizi üç farklı tepkime grubu tarafından katalizlenmektedir. Bunlar;

- a) İçdönüşüm tepkimeleriyle (R21-30)
- b) Doğrudan glukozdan (R19,R20)
- c) Glukoz-6-fosfattan R17 ve R18 tepkimeleriyle gerçekleşir. Karbon metabolizmasında yer alan diğer ana yolizi de TCA döngüsüdür. TCA döngüsü enzimleri sitrat sentaz, akonitaz, izositrat dehidrojenaz, piruvat dehidrojenaz kompleksi, 2-okzoglutarat dehidrojenaz kompleksi, süksinat kinaz, fumaraz ve malat dehidrojenaz enzimleri

Çizelge 2.2 *R-B.licheniformis* için metabolik yolizi tepkimeleri (Çalık 1998).

Bölüm 1.01 Glikoliz ve Glukoneogensiz Yolizi

1. $\text{Glc} + \text{PEP} \rightarrow \text{G6P} + \text{Pyr}$
2. $\text{Frc} + \text{PEP} \rightarrow \text{F6P} + \text{Pyr}$
3. $\text{G6P} \rightarrow \text{F6P}$
4. $\text{F6P} \rightarrow \text{G6P}$
5. $\text{F6P} + \text{ATP} \rightarrow 2 \text{T3P} + \text{ADP}$
6. $2 \text{T3P} \rightarrow \text{F6P} + \text{Pi}$
7. $\text{T3P} + \text{ADP} + \text{Pi} \rightarrow \text{PG3} + \text{ATP} + \text{NADH}$
8. $\text{PG3} + \text{ATP} + \text{NADH} \rightarrow \text{T3P} + \text{ADP} + \text{Pi}$
9. $\text{PG3} \rightarrow \text{PEP}$
10. $\text{PEP} \rightarrow \text{PG3}$
11. $\text{PEP} + \text{ADP} \rightarrow \text{Pyr} + \text{ATP}$
12. $\text{Pyr} + 2 \text{ATP} \rightarrow \text{PEP} + 2 \text{ADP}$
13. $\text{Pyr} \rightarrow \text{AcCoA} + \text{CO}_2 + \text{NADH}$

Bölüm 1.02 Pentoz Fosfat Yolizi

14. $\text{G6P} \rightarrow \text{Gluc6P} + \text{NADPH}$
15. $\text{Gluc6P} \rightarrow \text{R5P} + \text{CO}_2 + \text{NADPH}$
16. $\text{R5P} \rightarrow \text{Xyl5P}$
17. $\text{Xyl5P} \rightarrow \text{R5P}$
18. $\text{R5P} \rightarrow \text{Rib5P}$
19. $\text{Rib5P} \rightarrow \text{R5P}$
20. $\text{Xyl5P} + \text{Rib5P} \rightarrow \text{S7P} + \text{T3P}$
21. $\text{S7P} + \text{T3P} \rightarrow \text{Xyl5P} + \text{Rib5P}$
22. $\text{Xyl5P} + \text{E4P} \rightarrow \text{F6P} + \text{T3P}$
23. $\text{F6P} + \text{T3P} \rightarrow \text{Xyl5P} + \text{E4P}$
24. $\text{T3P} + \text{S7P} \rightarrow \text{F6P} + \text{E4P}$
25. $\text{F6P} + \text{E4P} \rightarrow \text{T3P} + \text{S7P}$

Glikoliz yolizinden ayrılan tepkimeler

26. $\text{Pyr} + \text{NADH} \rightarrow \text{Lac}$
27. $\text{Lac} \rightarrow \text{Pyr} + \text{NADH}$
28. $\text{AcCoA} + \text{ADP} + \text{Pi} \rightarrow \text{Ac} + \text{ATP}$
29. $\text{Ac} + \text{ATP} \rightarrow \text{AcCoA} + \text{ADP} + \text{Pi}$

Anapleoritik Tepkimeler

30. $\text{Mal} \rightarrow \text{Pyr} + \text{CO}_2 + \text{NADPH}$
31. $\text{OA} \rightarrow \text{Pyr} + \text{CO}_2$
32. $\text{Pyr} + \text{CO}_2 \rightarrow \text{OA}$

TCA Döngüsü

33. $\text{AcCoA} + \text{OA} \rightarrow \text{Cit}$
34. $\text{Cit} \rightarrow \text{ICit}$
35. $\text{ICit} \rightarrow \alpha\text{KG} + \text{CO}_2 + \text{NADPH}$
36. $\alpha\text{KG} \rightarrow \text{SucCoA} + \text{CO}_2 + \text{NADH}$
37. $\text{SucCoA} + \text{Pi} + \text{ADP} \rightarrow \text{Suc} + \text{ATP}$
38. $\text{Suc} + \text{ATP} \rightarrow \text{SucCoA} + \text{ADP} + \text{Pi}$
39. $\text{Suc} \rightarrow \text{Fum} + \text{FADH}_2$
40. $\text{Fum} \rightarrow \text{Mal}$
41. $\text{Mal} \rightarrow \text{OA} + \text{NADH}$
42. $\text{ICit} \rightarrow \text{Glx} + \text{Suc}$
43. $\text{Glx} + \text{AcCoA} \rightarrow \text{Mal}$

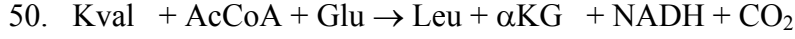
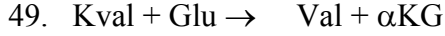
Serin Grubu Amino Asitlerin Biyosentezi

44. $\text{PG3} + \text{Glu} \rightarrow \text{Ser} + \alpha\text{KG} + \text{NADH} + \text{Pi}$
45. $\text{Ser} + \text{THF} \rightarrow \text{Gly} + \text{MetTHF}$
46. $\text{Ser} + \text{AcCoA} + \text{H}_2\text{S} \rightarrow \text{Cys} + \text{Ac}$

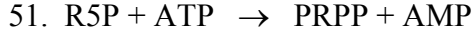
Alanin Grubu Amino Asitlerin Biyosentezi

47. $\text{Pyr} + \text{Glu} \rightarrow \text{Ala} + \alpha\text{KG}$

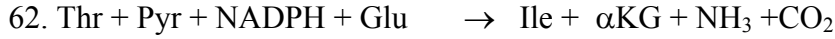
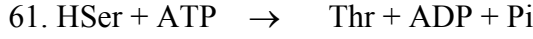
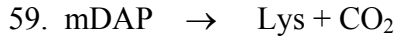
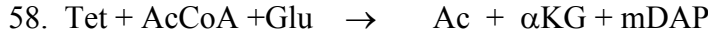
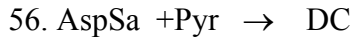
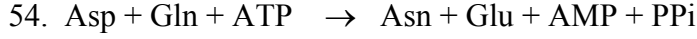
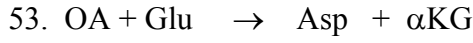
Cizelge 2.2 *R-B.licheniformis* için metabolik yolizi tepkimeleri (Çalık 1998) (devam)



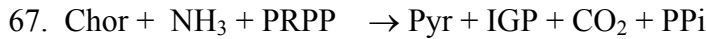
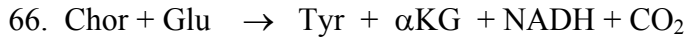
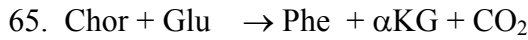
Histidin Biyosentezi



Aspartik Asit Grubu Amino Asitlerin Biyosentezi

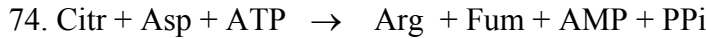
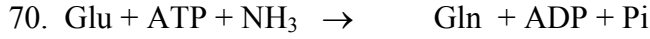


(a) Aromatik Amino Asitlerin Biyosentezi

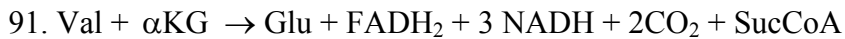
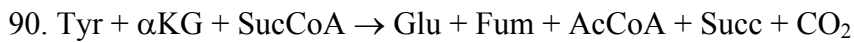
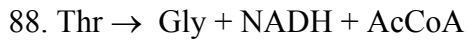
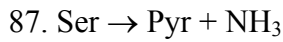
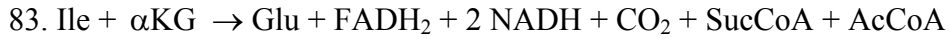
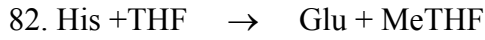
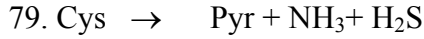
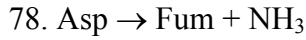
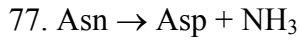
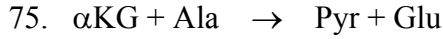


a.

b. Glutamik Asit Grubu Amino Asitlerin Biyosentezi



Amino Asitlerin Katabolizması



c.

d. Nükleotidlerin Biyosentezi

92. $\text{PRPP} + 2 \text{Gln} + \text{Asp} + \text{CO}_2 + \text{Gly} + 4 \text{ATP} + \text{F10THF} \rightarrow$
 $2 \text{Glu} + \text{PPi} + 4 \text{ADP} + 4 \text{Pi} + \text{THF} + \text{PRAIC} + \text{Fum}$
93. $\text{PRAIC} + \text{F10THF} \rightarrow \text{IMP} + \text{THF}$
94. $\text{IMP} + \text{Gln} + \text{ATP} \rightarrow \text{NADH} + \text{GMP} + \text{Glu} + \text{AMP} + \text{PPi}$
95. $\text{GMP} + \text{ATP} \rightarrow \text{GDP} + \text{ADP}$
96. $\text{ATP} + \text{GDP} \rightarrow \text{ADP} + \text{GTP}$
97. $\text{GTP} + \text{ADP} \rightarrow \text{ATP} + \text{GDP}$
98. $\text{NADPH} + \text{ATP} \rightarrow \text{dATP}$
99. $\text{NADPH} + \text{GDP} + \text{ATP} \rightarrow \text{ADP} + \text{dGTP}$
100. $\text{IMP} + \text{GTP} + \text{Asp} \rightarrow \text{GDP} + \text{Pi} + \text{Fum} + \text{AMP}$
101. $\text{AMP} + \text{ATP} \rightarrow 2 \text{ADP}$
102. $\text{PRPP} + \text{Asp} + \text{CaP} \rightarrow \text{UMP} + \text{NADH} + \text{PPi} + \text{Pi} + \text{CO}_2$
103. $\text{UMP} + \text{ATP} \rightarrow \text{UDP} + \text{ADP}$
104. $\text{UDP} + \text{ATP} \rightarrow \text{ADP} + \text{UTP}$
105. $\text{UTP} + \text{NH}_3 + \text{ATP} \rightarrow \text{CTP} + \text{ADP} + \text{Pi}$
106. $\text{ATP} + \text{NADPH} + \text{CDP} \rightarrow \text{dCTP} + \text{ADP}$
107. $\text{CDP} + \text{ATP} \rightarrow \text{CTP} + \text{ADP}$
108. $\text{CTP} + \text{ADP} \rightarrow \text{CDP} + \text{ATP}$
109. $\text{UDP} + \text{MetTHF} + 2 \text{ATP} + \text{NADPH} \rightarrow \text{dTTP} + \text{DHF} + 2 \text{ADP} + \text{PPi}$

e. Kofaktörlerin Biyosentezi

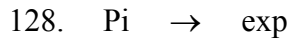
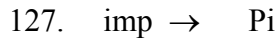
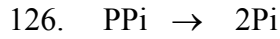
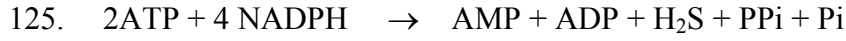
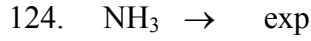
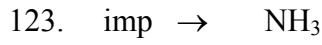
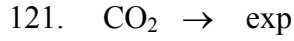
110. $\text{DHF} + \text{NADPH} \rightarrow \text{THF}$
111. $\text{MetTHF} + \text{CO}_2 + \text{NH}_3 + \text{NADH} \rightarrow \text{Gly} + \text{THF}$
112. $\text{MetTHF} + \text{NADPH} \rightarrow \text{MTHF}$
113. $\text{MetTHF} \rightarrow \text{MeTHF} + \text{NADPH}$
114. $\text{MeTHF} \rightarrow \text{F10THF}$
115. $\text{Gly} + \text{THF} \rightarrow \text{MetTHF} + \text{NH}_3 + \text{NADH} + \text{CO}_2$
116. $\text{NADH} \rightarrow \text{NADPH}$
- 117.



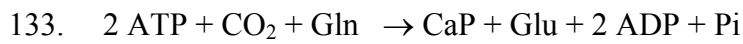
Elektron Taşınım Sistemi



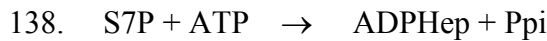
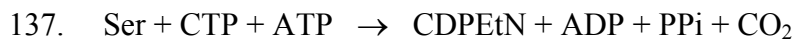
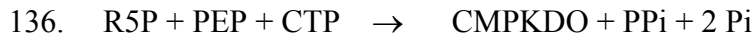
Taşınım Tepkimeleri



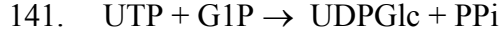
Yağ Asitlerinin ve Fosfolipidlerin Biyosentezi



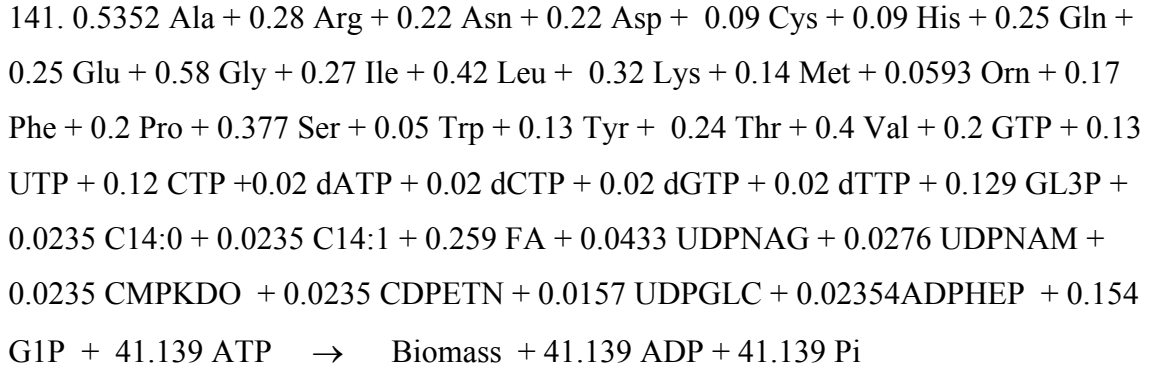
Biyokütle Bileşenleri



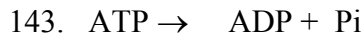
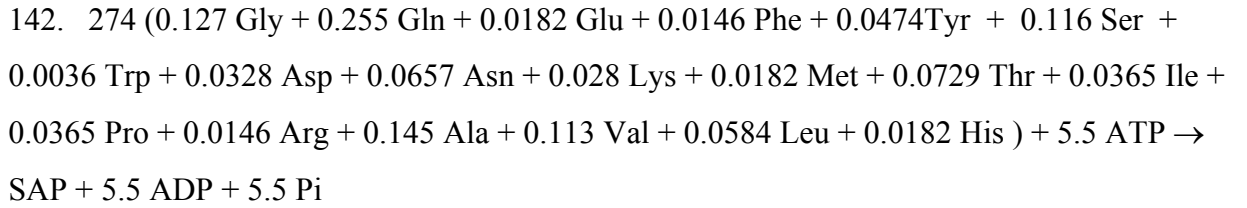
Cizelge 2.2 *R-B.licheniformis* için metabolik yolizi tepkimeleri (Çalık 1998) (devam)



Hücre sentezi



SAP Sentezi



Bacillus (R37-45) türlerinde belirlenmiştir. Gliksolat şöntünde yer alan tepkimeler izositrat liyaz (R46) ve malat sentaz (R47) tarafından katalizlenen tepkimeler de tepkime denklem sisteminde yer almaktadır. Anapleorotik enzimler, malik enzim (R35) *Bacillus* türlerinde belirlenmiştir. Diğer anapleorotik yolizi enzimi okzalasetat dekarboksilaz (R36) enziminin katalizlediği tepkime de tepkime denklem sisteminde bulunmaktadır. TCA döngüsünde yer alan tepkimelerin tersinir tepkimeleri MYM analizinde denklem sisteminin çözümünde çözümsüzlük (singüler noktalar) verdiğinden tepkime denklem sistemine alınmamıştır. Asetat kinaz fosfoetiltransferaz

(R33,R34) ve laktat dehidrojenaz (R31,R32) enzimlerinin katalizledikleri tepkimeler sistemde yer almaktadır. Amino asitlerin sentezlenme yolları literatürde *B.licheniformis* için bulunmaktadır. Bu nedenle *B.subtilis* yollarının *B.licheniformis* için geçerli olduğu varsayılmıştır. Amino asitlerden serin biyosentezi 3-fosfo gliserat'tan çıkılarak (r48) gerçekleşmektedir, bu yolu gram pozitif bakteriler için karakteristiktir. Serin hidroksimetil transferaz enzimiyle glisin, glisin de yine aynı enzimle serine dönüşür. *B.subtilis*'te sistein sentezi sırasında görev alan ATP sülfürilaz ve adenozin-5'-fosfosülfat kinaz enzimleri ile sülfatı sülfid ve sülfüre dönüştüren enzimlerde mevcuttur ve R50 tepkimesiyle gösterilmiştir. Alanin piruvattan transaminasyon tepkimesiyle (R51) üretilir. Valin oluşumu için R53 tepkimesi ile Lözin oluşumu için de R54 tepkimesi, *B.subtilis* için belirlenmiştir. Histidin sekiz ardışık tepkimeyle, ATP ve fosforibozilpirofosfat (PRPP) girdi olarak kullanılarak üretilmektedir. Tepkime sistemindeki bu sekiz tepkime toplanarak iki tepkimeye indirgenmiştir. Diaminopimelat, asparajin, lizin, treonin, metionin, izolözin ve aspartik asit protein sentezi için aspartat yolunda (R57-67) üretilmektedir. *B.subtilis* aromatik amino asitlerden tirozin, triptofan ortak girdi olan korozimattan üretilmektedir. (R68-72) Glutamat, α -KG'tan, glutaminde (R74)'de glutamattan üretilmektedir. Bunun yanında bu iki amino asit diğer amino asitlerin üretiminde de yer almaktadır. Prolin R75 tepkimesiyle, arjinine R78 tepkimesiyle glutamattan çıkılarak üretilmekte, ara bileşik olarak prolidin biyosentezinde glutamat- γ -semialdehit, Arg biyosentezinde ise ornitin (R76) yer almaktadır. *Bacillus sp.* Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, His, Ile, Orn, Pro, Thr ve Val'i azot kaynağı, Ala, Arg, Glu, Gln, His ve Pro'ü karbon kaynağı olarak kullanabilirler. Arg (R80) ve Pro (R90) Δ -pirolin-5-karboksilat aracılığıyla, Histidin (R86) transformasyon tepkimesiyle Glu'ya dönüşür. Thr (R92) Gly'e, Gly'de (R85) serine dönüşebilir. Glu, α -KG'a dönüşerek karbon metabolizmasına geri dönerken, Gln ve Glu'da birbirlerine dönüşebilirler. Ala (R79), Ser (R91) ve Cys (R83), piruvata dönüşerek karbon metabolizmasına girerler. L-asparajinaz enzimiyle Asn, Asp ve NH₃'e (R81) dönüşürken, Asp, fumarat ve NH₃'e (R82) dönüşür. İzolözin ve valin, SucCoA'ya (R87,R95), Leu'de Glu ve AcCoA'ya (R88) dönüşür. Aromatik amino asitlerin katabolizması Phe'nin Thr'ye transformasyonu (Rs9) dışında *B.subtilis*'te sistematik olarak araştırılmamıştır. Bu nedenle bu amino asitlerin transformasyon tepkimeleri

tepkime sistemine katılmamıştır. Bunun yanında bu amino asitlerin katabolizma tepkimelerinin aşağıdaki gibi olduğu düşünülmektedir;

Triptofanaz: $\text{Trp} \rightarrow \text{Indol} + \text{Pyr} + \text{NH}_3$

Tirozin fenol liyaz: $\text{Tyr} \rightarrow \text{Fenol} + \text{Pyr} + \text{NH}_3$

Lizin ve Metiyonin katabolizması içinde yine sistematik bir araştırma literatürde bulunmamaktadır. Bununla beraber *B.subtilis*'te kadoverin sentezinde görev yapan cadA geninin kodladığı lizin dekarboksilaz enzimi izole edilmiştir. Lizin katabolizması yüksek organizmalarda ve *Streptomyces lipmanii*'de aminoadipik semialdehit üzerinden gerçekleşmekle beraber bu yolizinin bakterilerde geçerli olup olmadığı henüz bilinmemektedir. Met'nin degradasyonu ile ilgili de literatürde bilgi bulunmamaktadır. Bu nedenle bu iki amino asitin katabolizma tepkimeleri tepkime sistemine katılmamıştır. Amino asitlerin hücreye taşınımı aktif taşınım ile olduğu halde serbest yayınma ile gerçekleştiği varsayılmıştır.

NADPH ve NADH (R127,R128) birbirine dönüştüren nikotinamid nükleotid transhidrojenaz enziminin birçok gram pozitif bakteride bulunması nedeniyle *B.licheniformis*'de bulunduğu varsayılmıştır.

ATP'nin yaşam fonksiyonları için (maintenance) kullanımı metabolik yolizi mühendisliği analizi ile ilgili diğer yayınlarda da olduğu gibi tepkime sisteminde ADP'ye (R147) dönüşümü olarak verilmiştir.

CO₂, NH₃ (NH₄⁺ formda) ve fosfatın hücreye biyoproses ortamına taşınımları (R131-R138)'da tepkime sisteminde yer almaktadır ve taşınım mekanizmaları serbest yayınma olarak kabul edilmiştir. P/O oranı-elektron taşınım sisteminde- iki olarak kabul edilmiştir. (R129,R130) SAP enziminin kimyasal bileşimi formüle edilirken *B.licheniformis*'in ürettiği SAP enziminin tam amino asit bileşimi kullanılmıştır. (R146) SAP enziminin hücre dışına taşınım prosesinin karmaşık olması ve bu konuda yeterli ve tam bilginin literatürde bulunmaması nedeniyle SAP enziminin taşınımında pasif difüzyonla gerçekleştiği varsayılmıştır. Nükleotillerin (R96-R113), yağ asitlerinin, fosfolipidlerin ve lipidlerin , kofaktörlerin (R121-128) hücre bileşenlerinin (R139-R144) biyosentezde tepkime sistemine katılmıştır. *B.licheniformis* ve *B.subtilis*'in kimyasal bileşimleri bilinmediğinden R145 hücre oluşum tepkimesinde *E.coli* bileşimi kullanılmış ve kalma süresiyle değişmediği varsayılmıştır. Bunun *B.subtilis*'in DNA, RNA ve hücre içi bileşiklerden amino asitlerin hücre içi değişimlerinin de *E.coli*'ninkinden çok farklı olmadığı bildirilmiştir (Çalık 1998).

2.7 SAP Sentezinde Darboğaz Oluşturan Aspartik Asit Grubu Amino Asitler

B.licheniformis tarafından üretilen SAP üretimi üzerinde yapılan MYM analizi sonuçlarına göre SAP sentezinde hücre içi amino asit akılarının büyük rol oynadığı görülmüştür. Özellikle SAP yapısındaki amino asitlerin %26'sını oluşturan aspartik asit grubu amino asitlerin akı değerlerinin biyoproses süresince düşük olduğu belirlenmiş ve bu amino asitlere diğer amino asitlere kıyasla daha fazla ihtiyaç duyulduğu ve ayrıca düzenleyici özelliğe sahip oldukları için de SAP sentezinde bir darboğaz oluşturabileceği düşünülmüştür (Çalık vd 2000).

Diaminopimelat, lizin, metiyonin ve treonin aspartik asitten üretilirler ve bu nedenle aspartik asit grubu amino asitler olarak bilinirler. Bunların biyosentezi birçok koldan oluşur ve son ürünler oluşuncaya kadar birçok ara ürün meydana gelir (Şekil 2.11). Aspartik asit grubu amino asitlerin biyosentez mekanizması bakteriyel, fizyoloji ve biyokimyasal olarak diğer amino asitlerin biyosentez mekanizmalarından farklılık gösterir ve bazı avantajları vardır. Bunlardan birincisi, yolizindeki bütün amino asitlerin

oluşturduğu proteinler bilinmektedir. Diğer bir özellik ise ökaryot ve prokaryot hücrelerdeki biyosentez mekanizmaları arasındaki farklar bilinmektedir.

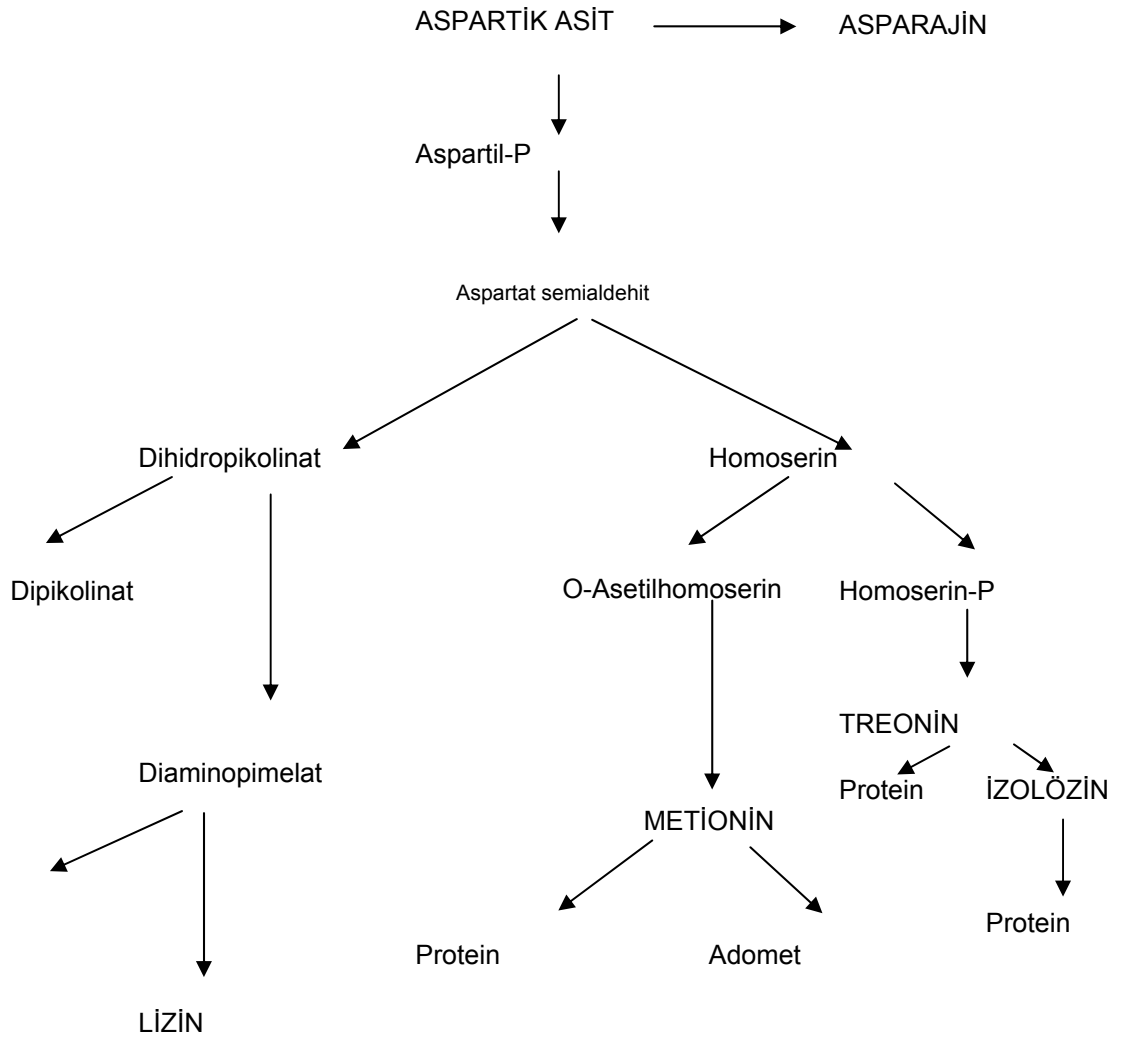
Aspartat yolizinin çoğalmadaki en büyük görevi, protein sentezi için gerekli amino asitleri sentezlemesidir. Bunun yanında, yolizi diğer önemli bir ürün olan mezo-diaminopimelatı üretmektedir. Bu bileşik özellikle *Bacillus*'larda lizin oluşumu için bir ara ürün olup, hücre duvarındaki peptiglosan oluşumu içinde gereklidir. Diamino pimelat biyosentezinin devam edebilmesi için protein amino asitlerinin hücre dışı kaynaklardan sentezlenmesi gerekir. Bu şartlar altında, diğer amino asit sentezleri fonksiyonel değildir ve amino asitlerin son ürün represyonuna ve feedback inhibisyonuna uğrarlar. Aspartat'dan diaminopimelat oluşumundaki kontrol basamağı diğer amino asit biyosentezlerindeki kontrol basamağından da farklıdır.

Aspartat yolizi aynı zamanda sporlanma evresinde de kritik rol oynar. *B.subtilis*'desporlanma süresince, az miktardaki protein sentezindeki amino asitler protein turnover sayısı ile belirlenir. Diğer yandan, aspartat yolizindeki iki ürün *B.subtilis*'in sporlanma hücreleriyle belirlenen turnover sayısından yararlanılarak belirlenmez. Bunlardan birisi, dipokilant, kuru hücre ağırlığının %10'u spordur, diğeride mezo-diaminopimelattır, spor korteksinin peptiglosanının bir bileşimidir. Aspartatdan mezo-diaminopimelat oluşumundaki reaksiyon zinciri sporlanma boyunca bu bileşiklerin sentezlenmesine izin verecek şekilde kalır (Paulus 1993).

2.7.1 Aspartik asit grubu amino asitlerin biyosentezi ve regülasyonu

2.7.1.1 Ortak yolizi ve regülasyonu

Aspartat yolizindeki bütün ürünlerin biyosentezinde ilk reaksiyon ortaktır. Birincisi aspartik asitin β -karboksil grubuna ATP'nin fosfatının aktarılmasıdır. Bu reaksiyon aspartokinaz enzimiyle katalizlenir. Diğer reaksiyon ise, NADPH'daki β -aspartil fosfatın asil fosfata indirgenmesi ve aspartat semialdehit dehidrojenaz enziminin



Şekil 2.11 Aspartik asit grubu amino asitler

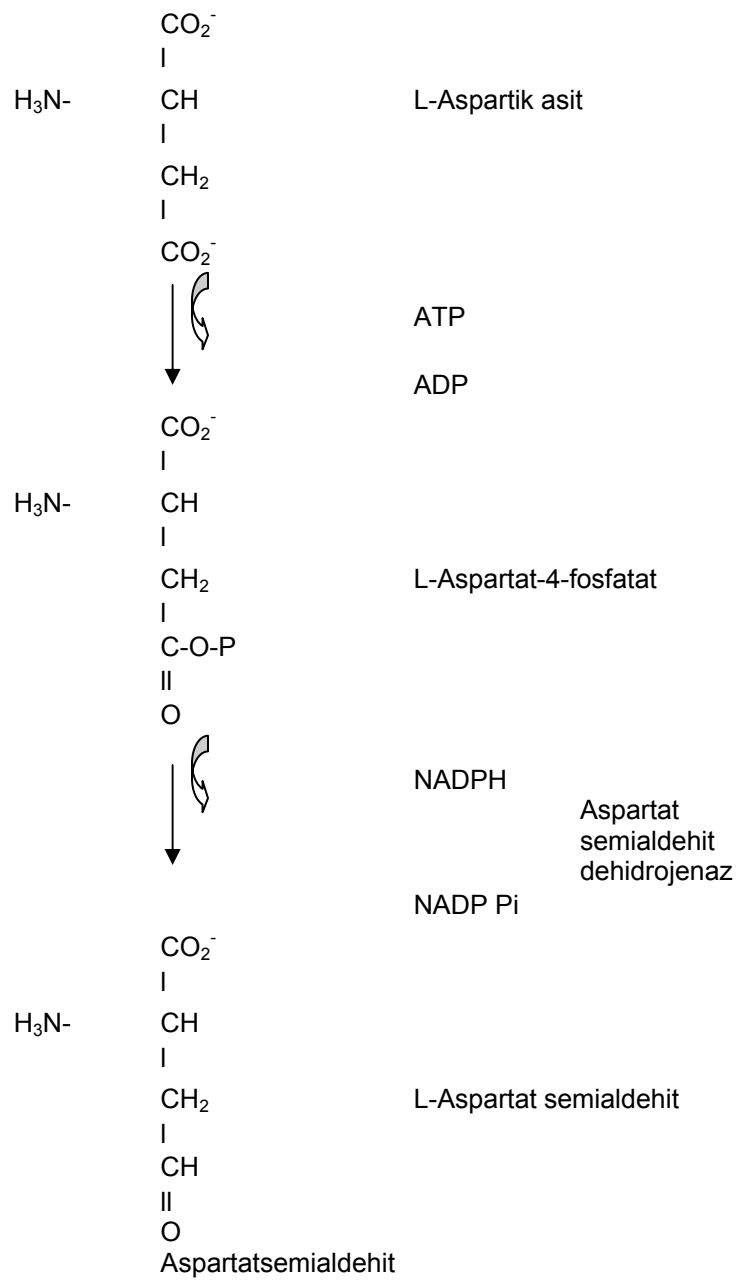
katalizlemesiyle L-aspartat semialdehide dönüşmesidir (Şekil 2.12). Bu reaksiyon kimyasal olarak glikoliz yolizindeki 3-fosfo gliserat kinaz ve gliseraldehit -3-fosfat dehidrojenazın katalizlediği reaksiyonlarla analogdur. Aspartattan başlayarak diğer amino asitlerin biyosentezi aspartokinaz enzimiyle düzenlenir ve aspartat yolizinde bu enzim feedback kontrollu olarak reaksiyonları düzenler (Paulus 1993).

Aspartokinaz enzimleri

Aspartokinaz enzimleri ilk defa 1971 yılında *B.subtilis*'de belirlendi. *B.subtilis*'deki üç aspartokinaz enzimi *E.coli*'deki aspartokinaz enzimlerine benzer. Ancak feedback kontrol mekanizmaları birbirinden farklıdır. *B.subtilis*'deki 3 farklı aspartokinaz enziminin genel özellikleri Çizelge 2.4'de verilmiştir (Paulus 1993).

Aspartokinaz I

Aspartokinaz I enzimi yalnızca büyüklük bakımından değil, aktivitesiyle de diğer aspartokinazlardan ayrılır. Diğer amino asitlere nazaran hücre duvarının yapısında bulunan mezo-diaminopimelat tarafından daha fazla kontrol edilir. Dahası, salgılanma miktarı hücre dışı amino asit miktarından etkilenmez, hücreler durgunluk fazına ulaştığında aspartokinaz I'in salgılanması maksimuma ulaşır ve bu seviyede sabit kalır. aspartokinaz I'in bu özellikleri onun sporlanma ve çoğalma boyunca mezo-diaminopimelat sentezinde ve sporlanma süresince de dipikolinat sentezinde başlatıcı rol üstlenmesine neden olur. Diğer aspartokinaz enzimleri ise bu esnada aspartokinaz I seviyesinde salgılanmaz. Aspartokinaz I mezo-diaminopimelat ile yarışmasız inhibisyona uğrar, aspartat substrat olarak davranır. İnhibisyon eğrileri hiperbol şeklindedir. Mezo-diaminopimelatın miktarı ve aspartatın doygunluk sabiti (Km) inhibitörden etkilenmez. Bu özelliklere göre Aspartokinaz I V tipi allosterik sistemlere girer. Enzim yüksek pH aralığında aktiftir ve monovalent katyonlarla iki kat uyarılır.



Şekil 2.12 Aspartat semialdehit biyosentezi

Çizelge 2.3. *B.subtilis*'deki aspartokinaz enzimleri

Özellikler	Aspartokinaz I	Aspartokinaz II	Aspartokinaz III
Yapısal gen	<i>dapG</i>	lysC	?
M.A.	250000	122900	120000
Alt birim M.A.	42900	43700alfa,17700beta	?
Feedback inhibitörleri	Mezo-diaminopimelat	L-Lizin	L-Treonin ve L-lizin ^a
İnhibisyon kinetiği ^b	Yarışmasız	Yarışmasız	Yarışmalı
Ki (feedback inhibitörleri için)	0.025 ^c	0.1	0.15 ^d
İnhibisyon eğrisinin şekli	Hiperbolik	Hiperbolik	Sigmoid
Monovalent katyon ihtiyacı	Özgül değil	K ⁺ ve NH ₄ ⁺	K ⁺ ve NH ₄ ⁺
Km (aspartat için) ^e	3	1	17
pH aralığı	6.0-9.5	?	6.6-8.2
Enzim sentezindeki eş gerileticiler	Bilinmiyor	L-Lizin	L-Treonin
Doygunluk fazında enzim seviyelerinde değişim	Değişim yok	Azalma var	Azalma var

a) Bu iki enzimin tek başlarına fizyolojik konsantrasyonlarında inhibisyona neden olurlar.

b) Bu inhibisyonlar da substrat aspartattır.

c) Bu değer pH=8.0'de belirlenmiştir.

d) Bu değer treonin ve lizinin eş molar konsantrasyonlarında farklılık gösterir.

e) Bu değerler 1 mM ATP için hesaplanmıştır.

Aspartokinaz I hiçbir büyüklükte saflaştırılmaz ve yapısında protein yapısına benzediğine dair bir bilgi yoktur. Diğer kompleks proteinlere göre büyük bir molekül ağırlığına sahiptir (>250000). Gerçekten aspartokinaz I geni klonlanıp deşifre edildiğinde, polipeptit zincirinin Aspartokinaz II'deki büyük alt birimle (404 amino asit, Mr=42900) aynı büyüklükte olduğu gözlenir.

İki farklı aspartokinaz I mutanlığı belirlenmiştir. Birincisi sıcaklığa duyarlı mutant ve buna termofil aspartokinaz adı verilmiştir. Diğer tip aspartokinaz I ise mezo-diaminopimelat ile feedback inhibisyona uğramaktadır. Bu inhibisyona uğrayan ikinci tip aspartokinaz I enziminin geni izole edilmiş ancak mutasyonun genetik olarak haritası çıkarılmamıştır (Paulus 1993).

Aspartokinaz II

B.subtilis ekstraktından saflaştırılan ilk ürün lizine duyarlı aspartokinaz II enzimidir. Aspartokinaz II'nin aktivitesi ve sentezi lizin tarafından düzenlenir. Enzim aktivitesi doygunluk fazına ulaşıldığında veya bu ana kadar gerçekleşen glukoz tüketimi süresince azalır. Aspartokinaz II'nin görevi, lizin sentezinde başlatıcı olarak yer almasıdır. Aspartokinaz II'nin aspartata kıyasla lizinle inhibisyonu yarışmasız inhibisyonudur. İnhibisyon eğrileri hem lizin varlığında hem lizin yokluğunda hiperbol şeklindedir. Aspartokinaz I'de olduğu gibi, aspartokinaz II'de allosterik V sistemözellikleri gösterir. Lizinin analogu, S-(2-aminoetil)-L-sistein lizine göre daha zayıf bir inhibitördür ($K_i=1\text{mM}$). Lizine bağlı diğer amino asitlerden, ornitin, lizin ve mezo-diaminopimelat, treonin aktivitesi üzerine etkili değildir. Aspartokinaz II aktivitesi, Aspartokinaz I'e benzemez, K^+ ve NH_4^+ iyonlarının miktarına da bağlıdır.

Aspartokinaz II'nin moleküler ağırlığı 120000 civarındadır ve birbirinden farklı eş molar miktarda 2 alt birime ayrılmıştır. α ve β olarak adlandırılan bu alt birimlerin moleküler ağırlıkları 43000 ve 17000'dir. Bu alt birimler $\beta\alpha\alpha\beta$ yapısındadır (Paulus 1993).

Aspartokinaz III

Aspartokinaz III zengin ortamda çoğalma boyunca, doygunluk evresi boyunca ve sporlanma süresince gözlenmez ve aktivitesi treonin ile belirlenir. Aspartokinaz III'de aspartokinaz II gibi amino asitlerin biyosentezinde başlatıcı olarak görev yapar.

Aspartokinaz III treonin ve lizin ile feedback inhibisyona uğrar. Treonin ve lizin fizyolojik konsantrasyonlarının ($\leq 1\text{mM}$) aspartokinaz aktivitesi üzerine az bir etkisi vardır, ancak birlikte düşük konsantrasyonlarda bile enzimi inhibe ederler. Diğer aspartokinaz enzimlerinin feedback inhibisyonlarından farklı olarak, aspartokinaz III treonin+lizinle substrat olan aspartata göre yarışmalı inhibisyona uğrar. Aspartat için K_m değeri inhibitör miktarıyla birlikte artar. Nonpolar aspartokinaz III'ün aktivitesi kompleks ortamda yani yüksek nonpolar amino asit derişimlerinde (Metionin, lözin, fenilalanin) azalır. Bunun nedeninin nonpolar amino asitlerde özgül bağlanma yerlerinin olmasıdır. Aspartokinaz III'de aspartokinaz II'de olduğu gibi aktivitesi K^+ ve NH_4^+ iyonlarından etkilenir, Na^+ iyonundan ise etkilenmez.

Aspartokinaz III *B.subtilis*'den aspartokinaz II saflaştırıldıktan sonra elde edilir ve moleküler ağırlığı 120000 civarındadır (Paulus 1993).

Aspartat semi aldehit dehidrojenaz

Bu enzim aspartat yolizindeki ikinci basamaktaki reaksiyonu katalizler. *B.subtilis*'de yer alan bu enzim üzerinde çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Çoğalma şartlarının ve metabolitlerin aspartat semi aldehit aktivitesi üzerine etkisi birçok *Bacillus* tipi üzerinde araştırılmıştır. *B.cereus*'da, enzim miktarı sporlanma süresince aspartokinaz I, dihidropikolinat sentaz, dihidropikolinat redüktaz'la birlikte paralel olarak gider. *B.brevis*'de, üstel fazın sonunda sporlanmanın artmasıyla aktivite 3 kat azalır. Ayrıca *B.brevis*'deki aspartat semialdehit dehidrojenaz enzimlerinden farklılık gösterir, amino

asitlerle inhibisyona uğrar. 5mM treonin veya lözinle enzim aktivitesi %50 oranında azalır. Aspartat semialdehit dehidrojenaz *B.sphaericus*'daki amino asitlerle ne belirlenir ne de inhibisyona uğrar. Öbür yandan *B.megaterium*'daki enzimin miktarı metionin ile %40 oranında azalır (Paulus 1993).

2.7.1.2 Lizin biyosentezi ve regülasyonu

A. Lizin biyosentezinin biyokimyası

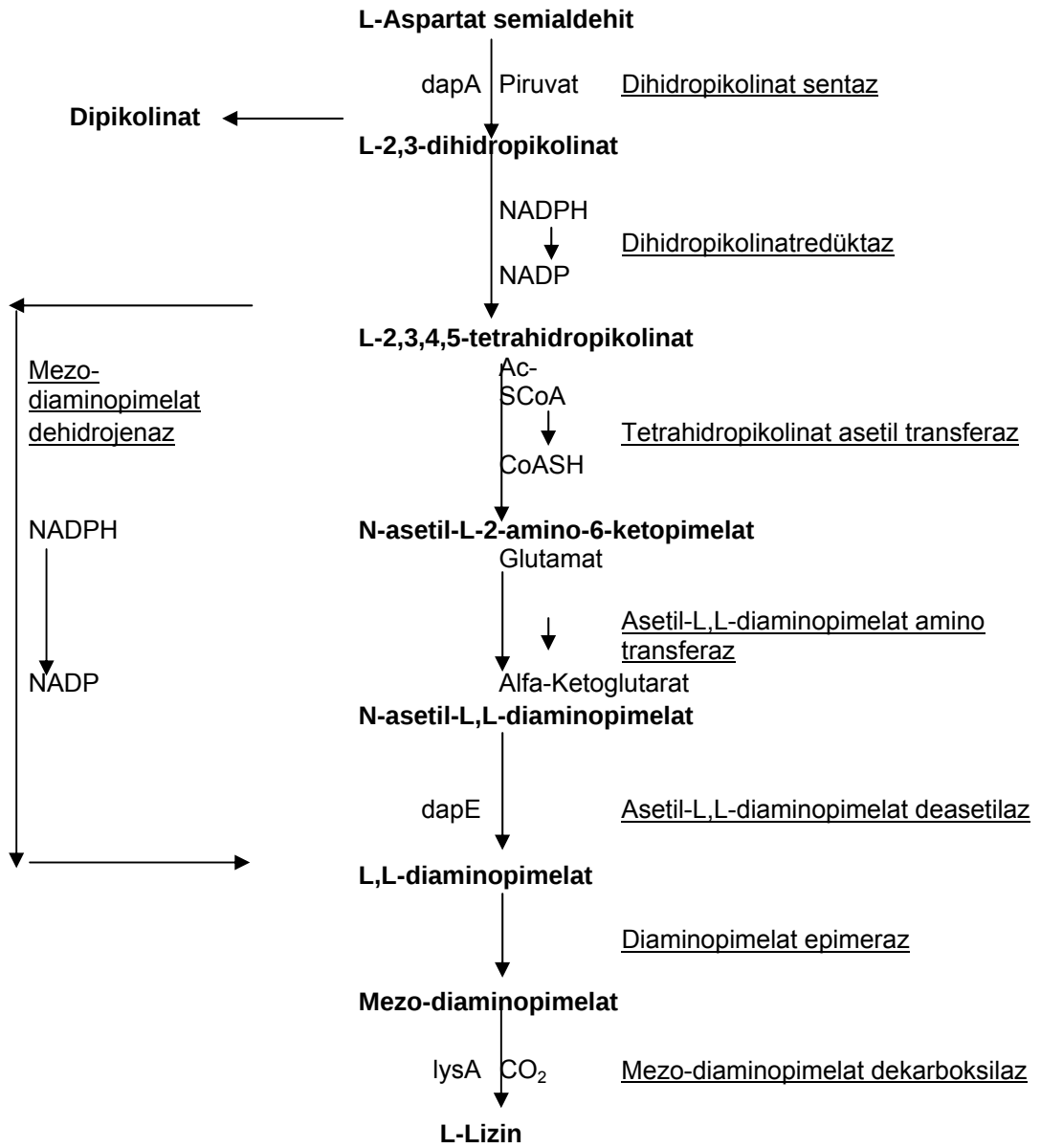
Lizin biyosentezinde kullanılan iki farklı yolizi bulunmaktadır. Bu iki metabolik yolizinde farklı ara ürünler üzerinden gidilerek lizin üretimi gerçekleştirilir. İki yolizinden biri olan α -aminodipat yolizinde asetil CoA ve okzalasetat üzerinden lizin biyosentezi gerçekleşir. Aynı zamanda bu yolizi yüksek fungilerde görülür. Diğer yolizi olan diaminopimelat yolizinde ise farklı ara ürünler piruvat ve aspartattan yola çıkılarak lizin sentezi gerçekleştirilir. Bu yolizi daha çok bakteri hücrelerinde gerçekleşir.

B. Diaminopimelat yolizi

Şekil 2.13'den de anlaşılacağı gibi aspartat ve piruvat ara ürünleri üzerinden gidilerek lizin sentezi gerçekleşir.

1.2.3-dihidropikolinat oluşumu

Bu bileşiğin oluşumunda aspartat ve piruvat bu sentezde başlatıcı görevi üstlenirler. Aspartat β -semialdehit ve piruvat arasında dihidropikolinat sentetaz enziminin katalizlediği kondenzasyon tepkimesi meydana gelir ve bu reaksiyon sonucu 2,3-dihidropikolinik asit oluşur. Piruvattaki β -karbonları ve L-aspartat- β semialdehitteki γ karbon atomları arasında gerçekleşen kondenzasyon reaksiyonları aldol tipi kondenzasyon reaksiyonlarıdır. Dehidrasyon ürünleri Δ^3 -2-oxo-6-aminopimelat, açık



Şekil 2.13 Lizin biyosentezi

zincir yapısındaki 2,3-dihidropikolinat, halkanın kapanmasıyla dehidre olurlar ve 2,3-dihidropikolinata dönüşürler.

2. L-2,3,4,5-tetrahidropikolinat oluşumu

2,3-dihidropikolinat, dihidropikolinat redüktaz enzimiyle katalizlenerek, L-2,3,4,5-tetrahidropikolinata dönüşür. Bu esnada kofaktör olarak NADPH kullanılır.

3. N-asetil-L-2-amino-6-ketopimelat oluşumu

L-2,3,4,5-tetrahidropikolinat'ın amino gruplarının süksinillenmesi sonucu N-asetil-L-2-amino-6-ketopimelat oluşur. Bu reaksiyon ATP ve süksinat varlığında gerçekleşir.

4. N-asetil-L,L-diaminopimelat oluşumu

N-asetil-L-2-amino-6-ketopimelat asetil-L,L-diaminopimelat amino transferaz enziminin katalizlediği transaminasyon tepkimesiyle N-asetil-L,L-diaminopimelat'ı oluşturur.

5. L,L-diaminopimelat oluşumu

Diamino pimelat yolizinin son basamağında N-asetil-L,L-diaminopimelat asetil -L,L-diaminopimelat deasetilaz enziminin katalizlemesiyle L,L-diaminopimelata dönüşür.

6. Mezo-diaminopimelat oluşumu

L,L-diaminopimelat, diaminopimelat epimeraz enziminin katalizlediği epimerizasyon tepkimesiyle mezo-diaminopimelatı oluşturur.

7. Lizin oluşumu

Diaminopimelat dekarboksilaz enziminin katalizlediği dekarboksilasyon tepkimesiyle mezo-diaminopimelat lizine dönüşür. D-amino asitlerin dekarboksilasyonu D-konfigürasyonundaki asimetric karbon atomundan CO₂ uzaklaştırılmasıyla meydana gelir (Pekin 1980, Paulus 1993).

Dihidropikolinat sentaz

Aspartat semi aldehitten lizin ve mDAP oluşumunun gerçekleştiği yolizinde aspartat semi aldehyt ve piruvatın birleşip L,2,3-dihidropikolinat oluşturduğu reaksiyonu bu enzim katalizler. *B.subtilis*'de dihidropikolinat sentaz enziminin seviyesi ortamdaki lizin miktarından etkilenmez. Ancak sporlanma süresince meydana gelen dipokilinat üretimi nedeniyle salgılanma miktarı 2 ya da 3 kat artar. Dipokolinat sentezi bu enzimin salgılanma miktarının artmasıyla artar. Sporlanma süresince bu enzimin miktarındaki artış yeni RNA sentezlenmesine de neden olur.

Bu enzimin özellikleri Çizelge 2.5'de verilmiştir. Bu enzim spor hücrelerinden pH=7.4 olduğunda saflaştırılır. İnhibisyon eğrileri sigmoid şeklindedir ve aspartat semialdehytin Km değeri düşüktür. *B.licheniformis*'de yer alan dihidropikolinat sentazın ise kararlı olduğu pH aralığı farklıdır. Enzimin saflaştırılması pH=8.5 olduğu durumda yapılır. Aspartat semialdehyt için Km değeri yüksektir ve inhibisyon eğrileri de hiperbol şeklindedir. Optimum enzim aktivitesi pH=9.5 olduğunda gözlenir ve kararlılık pH=10'nun üzerine çıktığında sağlanır. Son ürünlerden lizin, mDAP ve dipikolinat enzim üzerine inhibitör etkisi yapmaz. Dihidropikolinat sentaz enzimi lizin ile feedback inhibisyona uğrar. Sporlanma süresince meydana gelen diaminopimelat ve dipikolinat sentezindeki feedback kontrol yüksek hücre içi lizin konsantrasyonlarında da gerçekleşir. Molekül ağırlığı 124000 ve alt birimlerinin molekül ağırlığı ise 3000'dir (Paulus1993).

Çizelge 2.4 Lizin yolizinde yer alan enzimler

Özellikler	<i>B.subtilis</i>	<i>B.licheniformis</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>B.cereus</i>	<i>B.sphaericus</i>	<i>B.subtilis</i>
Enzim	Dihidropikolinat sentaz	Dihidropikolinat sentaz	Dihidropikolinatredüktaz	Dihidropikolinatredüktaz	Mezo-diaminopimelat dehidrojenaz	Mezo-diaminopimelat dekarboksilaz
Yapısal gen	dapA	?	?	?	?	lysA
M.A.	124000	110000	74000	155000	80000	105000
AltbirimM.A.	32000	28000	18500	?	40000	48900
Km(substratıçin)	3mM(aspartatsemial dehit), 1mM piruvat	5.5mM(aspartatsemialdehit), 2.5mM piruvat	0.77mM(dihidropikolinat)	0.062mM(dihidropikolinat)	0.24mM(alfaketopimelat)0.2mM(NADPH), 12.5 mM NH ₄ ⁺	1mM(me zodiaminopimelat) mM (pidoksalfosfat)
pH aralığı	8.0-10.5	Optimum 8.6	5.0-7.5	6.0-9.0	6.5-9.0	7.5-9.0
Feedback inhibitörleri	Bilinmiyor	Bilinmiyor	Dipikolinat	Dipikolinat	Mezo-diaminopimelat	L-Lizin
İnhibisyon kinetiğı			Yarışmasız	Yarışmasız	Yarışmalı olmayan	Yarışmalı
Ki (feedback inhibitörleri için)			0.3	0.09	1.67 (%90 inhibisyon)	1.5
Diğer inhibitörler veya aktivatörler	Bilinmiyor	Bilinmiyor	1,10-fenantirolin (Ki=0.05 mM)	1,10-Fenantirolinle inhibe olmaz	Bilinmiyor	L-Lizin
Enzim sentezindeki eş gerileticiler	Bilinmiyor	Bilinmiyor	?	?	?	azalır
Doygunluk fazında enzim seviyesindeki değışim	Artar	Artar	?	?		

Dihidropikolinat redüktaz

Dihidropikolinat redüktaz *B.subtilis*'in sporlanmış hücrelerinden izole edilmiştir, özellikleri Çizelge 2.4'de verilmiştir. Dihidropikolinat redüktaz pH=6.0 olduğunda en etkin durumdadır. Düşük konsantrasyonlarda "chelator" lar 1,10-fenantirolin ve dipikolinatla inhibe olurlar. İnhibisyon dipikolinatların fizyolojik konsantrasyonlarında meydana gelir ve dihidropikolinata göre yarışmasız, NADPH'a göre yarışmalı inhibisyon gerçekleşir. İnhibisyon eğrileri sigmoid şeklindedir. Dihidropikolinat redüktazın dipikolinatla inhibisyona uğramasıyla sporlanmış hücrelerde bir düzenleyici etki meydana gelir. Diaminopimelattan dipikolinat oluşumu spor oluşumundan sonra başlar. Diaminopimelat ve lizin bu enzimi inhibe etmezler. Bu enzimin moleküler ağırlığı 74000'dir (Paulus 1993).

Tetrahidropikolinat asetil transferaz, N-asetil-L,L-diaminopimelat amino tranferaz, N-asetil-L,L-diaminopimelat deoksilaz ve diamino pimelat epimeraz

Bu enzimler mezo-diaminopimelat sentezinde epimeraz yolizinde yer alan dört reaksiyonu katalizler. *B.subtilis* üzerinde bu enzimlerle ilgili çalışma pek bulunmamaktadır. Yalnızca N-asetil-L,L-diaminopimelat deoksilaz'ın yapısal geni *dapE* belirlenmiştir. Bu enzim T=37°C'de sabit tutulduğunda enzimin salgılanma seviyesinde dolayısıyla da N-asetil-L,L-diaminopimelat miktarında düşüş olmaktadır. Ancak sıcaklık bu değerde tutulmadığında enzimin lizin içinde parçalandığı belirlenmiştir.

B.megaterium'dan izole edilen diaminopimelat epimeraz enzimi, mdap sentezindeki son basamağı katalizler. Bu enzimin aktivitesi ortama eklenen tiol bileşiklerine bağlıdır. L,L-diaminopimelatın mdap'a dönüşmesinde meydana gelen epimerizasyon tepkimesinin denge sabitinin değeri 2'dir (Paulus 1993).

Mezo-diaminopimelat dehidrojenaz

Bu enzim önce *B.sphaericus*'da sonra diğer bakterilerde belirlenmiştir. Bu enzim mdap sentezindeki 4 reaksiyon yerine gerçekleşen tek reaksiyonu katalizler. Bu enzimin özellikleri Çizelge 2.5'de verilmiştir. mdap dehidrojenaz aktivitesi lizinden etkilenmez, fakat mdap, L-L-amino-6-ketopimelatın indirgenme tepkimesini inhibe eder. İnhibisyon tepkimesi tersinirdir. Allosterik değildir. Moleküler ağırlığı 80000'dir, 1 mol NADPH başına 40000 Da alt birimden oluşmuştur (Paulus 1993).

Mezo-diaminopimelat dekarboksilaz

Lizin sentezindeki son basamakta, pridoksal fosfata bağlı olarak gerçekleşen mdap'ın dekarboksilasyon reaksiyonu diaminopimelat dekarboksilaz enzimiyle katalizlenir. mdap dekarboksilaz enzimi lizin tarafından feedback regülasyonla kontrol edilir. Salgılanma miktarı çoğalmada lizin miktarıyla %50 azalır ve zengin ortamda %90'dan fazlası azalır. Özellikleri Çizelge 2.5'de verilmiştir. Enzim yüksek pH'larda çok etkilidir ve lizinle substratın mdap olduğu durumda yarışmalı inhibisyona uğrar. Bu enzimin lizinle inhibisyonu bu amino asitin fizyolojik konsantrasyonlarında gerçekleşir ve mdap'dan lizin oluşumunu düzenler. Jel filtrasyon ile ayrılan bu enzimin moleküler ağırlığı 105000'dir (Paulus 1993).

Dipikolinat sentaz

2,6-dipikolinat yalnızca birkaç bakteri tarafından ve bakteriyel sporlanmanın olduğu kısa bir evrede sentezlenir. Bu çoğalma hücrelerinin metabolizmasında temel bir bileşik değildir, ancak yokluğunda sıcaklığa duyarlı sporlar oluşur. Dihidropikolinattan dipikolinat sentezi lizin biyosentezinde tek basamaktan meydana gelir ve dipikolinat sentaz enzimiyle katalizlenir.

Bu enzim üzerinde kararsızlığı nedeniyle çok fazla çalışma yapılmamıştır. Çünkü saflaştırma çalışmaları başarısızlıkla sonuçlanmıştır. *B.subtilis*'de bu enzimin salgılanma miktarı ihmal edilecek boyuttadır ancak sporlanmanın başlamasından 4 saat sonra enzim miktarı da 2 katına çıkar ve dolayısıyla ortamdaki dipikolinat miktarı da artar (Paulus 1993)

2.7.1.3 Treonin ve metionin oluşumu ve regülasyonu

Aspartat yolizindeki diğer büyük kollardan birisi aspartat semialdehitin treonin ve metionine dönüşmesidir (Şekil 2.14). Ara ürün homoserindir, treonin ve metionin üretiminin başlatıcısıdır. Aspartat semi aldehitten homoserin oluşmasını treonin kontrol eder. Metionin ise yalnızca homoserinin metionine ve S-adenozilmetiyonine dönüşmesini düzenler.

Her iki amino asit için ortak bir tepkime vardır bu da homoserin oluşumudur.

1.Homoserin oluşumu;

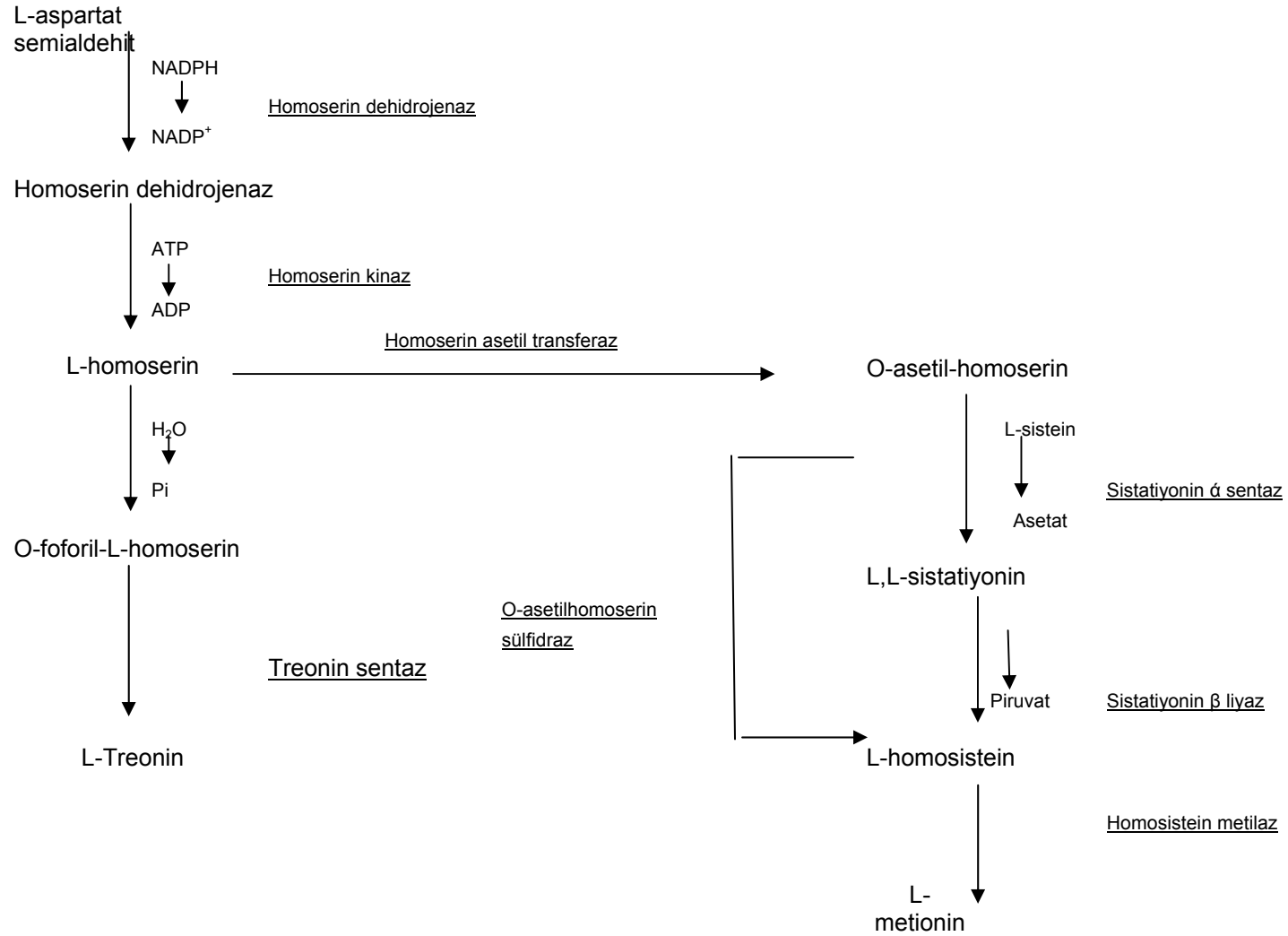
Aspartat- β -semialdehit, homoserin dehidrojenaz enzimiyle ve NADH koenzimi ile katalizlenerek homoserine indirgenir.

2. O-fosforil-L-homoserin oluşumu

Homoserin ATP varlığında homoserin kinaz enzimiyle fosfatlanarak O-fosforil-L-homoserin oluşturur.

3. Treonin oluşumu

Oluşan son bileşik O-fosforil-L-homoserin treonin sentaz enzimiyle treonini oluşturur.



Şekil 2.14 Treonin ve metionin biyosentezi

Reaksiyonun mekanizması yani, bu dönüşümde pridoksal fosfat önce, enzim kompleksiyle bir schiff bazı oluşturur. bundan sonra, fosfat grubunun etkinleştirdiği β -H ayrılır, oluşan karbonyonun tautomerleşme dönüşümleri sonunda fosfat molekülden ayrılır. ve molekülün ucunda bir çift bağ oluşur ve buna su katılarak hidroksi bileşiği yani treoninin enzim kompleksinin schiff bazı meydana gelir. Bunun hidroliziyle treonin ve enzim kompleksi oluşur (Tüzün 1980, Paulus 1993).

Homoserin dehidrojenaz

Aspartat semialdehitin NADPH'a bağlı olarak homoserine indirgenmesi ve dolayısıyla treonin ve metionine dönüşmesi reaksiyonunu bu enzim katalizler. *B.subtilis* ve diğer gram pozitif bakteriler tek bir homoserin dehidrojenaz enzimine sahiptirler. Bu enzim henüz *B.subtilis*'den izole edilememiştir. Özellikleri Çizelge 2.6'da verilmiştir. Homoserin dehidrojenaz enzimi treonin ile inhibisyona uğrar. 0.5mM treonin ile %50 inhibisyona uğrar. Miktarı üstel çoğalma fazında sabit kalır fakat ortama metionin, treonin, ile veya bunların hepsi aynı anda ilave edildiğinde miktarında 1.5 kat azalma meydana gelir (Paulus 1993).

Homoserin kinaz ve treonin sentaz

Homoserinden treonin oluşumu sırasında meydana gelen iki tepkimeyi katalizleyen bu enzimlerle ilgili *B.subtilis* üzerinde fazla bir çalışma yoktur. Homoserin kinaz, ilk reaksiyonu yani ATP'ye bağlı olarak homoserini homoserin fosfata dönüştürür. Treonin sentezinde homoserin kinazın katalizlediği bu tepkime feedback kontrollu olarak meydana gelir. Bu enzim homoserinin doygunluk konsantrasyonlarında treonin ile inhibisyona uğrar. Treonin sentaz *B.subtilis*'deki pridoksal fosfata bağlı olarak homoserin fosfatın treonine dönüşümünü katalizler. Bu enzim düşük konsantrasyonlardaki sulfat, fosfat ve sistein ile inhibe olur. Bu enzim aynı zamanda treoninden izolözin oluşumundaki ilk ara ürün olan α -ketobütratın treoninden veya homoserin fosfattan oluşum tepkimesini de katalizler (Paulus 1993).

Metionin oluşumu ve regülasyonu

Metionin; biyosentez mekanizması Şekil 2.14'de verilmiştir.

1. O-asetil-L-homoserin oluşumu

Homoserin homoserin asetil transferaz enziminin katalizlediği reaksiyonuyla O-asetil-L-homoserin meydana gelir.

2. L,L-sistatyonin oluşumu

Sistein ve homoserin sistatyonin γ -sentaz enziminin katalizlemesiyle oluşan reaksiyonda tiyoeter bağı ile birbirine bağlanarak sistatyonini oluştururlar.

3. Homosistein oluşması

Sistatyonin, sistatyonin β -liyaz enziminin katalizlediği reaksiyonla piruvata ve homosisteine ayrışır.

4. Metionin oluşumu

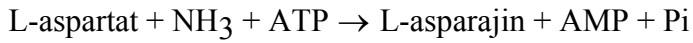
Homosistein N⁵-metil-tetrahidrofolat koenzimi ve homosistein metilaz enziminin etkisiyle S-metillenerek metionini meydana getirir.

Homoserin asetil transferaz

Metionin biyosentezinde, homoserin homoserin asetil transferaz enziminin katalizlediği alkilizasyon tepkimesiyle O-suksinil homoserine dönüşür. *E.coli*'deki homoserin asetil transferaz enzimleri birbirine benzemektedir. Feedback kontrollü olarak metionin ve S-adenozilmetiyonine ile inhibe olurlar. *B.subtilis*'deki bu enzim üzerinde yeterli çalışma bulunmamaktadır. Ancak *B.polymxa*'dan izole edilen homoserin asetil transferaz ile katalitik ve kontrol mekanizmaları benzerlik gösterir. Çizelge 2.6'da özellikleri verilmiştir. homoserin transferaz enzimi çoğalma esnasında metionin ve S-adenozil metionin ile yarışmalı inhibisyona uğrar. Etiyonde aynı enzimi metionin kadar inhibe eder. İnhibisyon eğrileri hiperbol şeklindedir. Bu enzim Zn^{+2} iyonlarıyla da inhibisyona uğrar. Moleküler ağırlığı 40000'dir (Tüzün 1980, Paulus 1993).

2.7.1.4 Asparajin biyosentezi ve regülasyonu

Bakterilerde asparajin sentezi asparajin sentetaz enziminin katalizlediği reaksiyonla aspartattan meydana gelir. Tepkime;



Asparajin sentetaz enzimi *Lactobacillus casei* ve *Streptococcus bovis*'den izole edilmiştir. İki mikroorganizmadan saflaştırılan enzimler birbirlerine benzer özellikler göstermektedirler. Mn^{2+} kofaktör olarak bu enzimler üzerinde en etkili metal iyonudur. Bunu yanında Mg^{2+} 'da oldukça etkilidir. Enzimler reaksiyon ürünü asparajin ile inhibe olurlar,substrat,aspartat'dır(Paulus1993)

Çizelge 2.6 Treonin ve Metionin yolizinde yer alan enzimler

Özellikler	<i>B.subtilis</i>	<i>B.flavum</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>B.flavum</i>	<i>B.polymxa</i>	<i>B.flavum</i>	<i>B.subtilis</i>
Enzim	Homoserindehidrojenaz	Homoserindehidrojenaz	Homoserinkinaz	Homoserinkinaz	Homoserin asetiltransferaz	Homoserin asetiltransferaz	Treoninsentaz
Yapısal gen	<i>hom</i>	hom	<i>thrB</i>	<i>thrB</i>	? ^a	?	<i>thrC</i>
M.A.	?	250000	?	?	40000	?	90000-45000
AltbirimM.A.	47400	46100 ^b	33500	33500	40000	?	47100
Km(substratıçin)	?	0.2 (aspartatsemialdehit)	?	?	0.8 (L-homoserin)0.8 asetilCoA)	2.8(L-homoserin),0.05 (asetilCoA)	0.025 (homoserinfosfat)
pH optimum	?	6	?	?	7.8	8	?
Feedback inhibitörleri	L-Treonin	L-Treonin,L-İzolözin	L-Treonin	L-Treonin	L-Metionin,S-adenozil-L-metionin	S-adenozil L-Metionin, -L-metionin	Bilinmiyor
İnhibisyon kinetiği	Yarışmalı	Karışık(Thr), Yarışmalı (Ile)	?	?	Yarışmalı	Yarışmasız	
Ki (feedback inhibitörleri için)	0.5 mM	0.06mM(Thr),5mM(Ile)	10 mM	10 mM	0.35mM(metionin)2mM(S-adenozilmetiyoninde)6mM (Sadenozilmetiyonin)0.1mM(metioninde)	0.25mM(S-adenozilmetiyonin)5mM(metionin)	Pi(Ki=0.5mM), SO ₄ ²⁻ (Ki=1mM)
Diğer inhibitörler veya aktivatörler	Bilinmiyor	Bilinmiyor	Bilinmiyor	Bilinmiyor	Zn ⁺²	Sistein ve diğer tiyoller	Bilinmiyor
Enzim sentezindeki eş gerileticiler	Metionin,treonin,izolözin	Metionin	Bilinmiyor	Bilinmiyor	Metionin	Metionin	Bilinmiyor

a)Bu özellik üzerinde henüz çalışılmamıştır.

b)Buözellikler*C.glutamicum*içinbelirlenmiştir.

2.8 Metabolik Yolizi Tepkime Hız Analizi

2.8.1 Metabolik yolizi analizi

Metabolik akıların biyoreaktör de çoğalma, ürün ve yan ürün oluşumu sürecindeki dağılımının araştırılması, bugüne kadar bilinmeyenlerin oluşturduğu kara-kutu olan serin alkali proteaz (SAP) üretiminde, biyoprosesin geliştirilebilmesi için hücreiçi sırları açıklayabilecektir. Bu bilgi verimi ve seçimliliği etkileyen biyoreaktör işletme parametreleri araştırılırken ve metabolik mühendisliğin uygulanması için SAP sentezinde metabolik yolizi üzerinde hız kısıtlayıcı basamakların belirlenmesinde kullanılabilir. SAP ile ilgili (Çalık vd, 1998)'nin yaptığı çalışma literatürde bir proteaz enzimiyle veya bir enzimle ve daha geniş olarak da proteinle ilgili olarak yapılan ilk metabolik yolizi mühendisliği (MYM) çalışmasıdır. Bu amaçla SAP üretiminde *B.licheniformis* için önce metabolik yolizi üzerindeki glikoliz ve glikoneogenesis, nükleik asit üretim, hücre sentez, pentoz fosfat yolizi, TCA döngüsü ve glikolat yolizi, aspartik asit, glutamik asit, serin, aromatik asit grubu amino asitleri, histidin üretim yolizi ve SAP sentez tepkimeleri araştırılmıştır.

İkinci aşamada metabolik yolizi üzerindeki belirlenen tüm tepkimelerin stokiyometrik denklemleri dikkate alınarak her bir bileşen için oluşturulan kütle korunum temelli, hız denklemlerinden oluşan matematik model kurulmuştur. MYM analiziyle çok iyi tanımlanmış kesikli-biyoreaktör işletim koşullarında SAP üretiminde *B.licheniformis* için hücreiçi akı dağılımları belirlenmiş ve bundan yararlanılarak potansiyel metabolik darboğazlar bulunmuştur (Çalık vd 2000).

2.8.2 Metabolik akı analizi

2.8.2.1 Metabolik yolizlerinin tanımlanması

Biyoreaktör ortamında kullanılan karbon kaynağının *B.licheniformis*'te biyokimyasal tepkimeler üzerinden akışını belirlemek için girdilerden başlayarak, metabolik yolizini oluşturan her bir tepkime için kaynak araştırması yapılarak metabolik yolizi tepkimeleri belirlenmiştir. Her bir tepkime için tepkime stokiyometrik denklemleri yapılmış ve metabolik yolizlerindeki metabolitler belirlenmiştir. Yolizlerindeki kesişme ve dallanma noktalarındaki bileşikler dikkate alınarak yolizindeki tepkimelerin sayısı bazı tepkimelerin hızları eşit kabul edilip tepkimeler toplanarak hücreiçi biyokimyasal tepkime sisteminin boyutu $n=147$ olarak minimize edilmiştir. Mikroorganizma çoğalması, mikroorganizmanın yaşamı, ara ürünler, ürün ve yan ürünlerin oluşumu için verilen tepkime sisteminin metabolik yolizi haritası da Şekil 2.15'de verilmiştir (Çalık vd 2000).

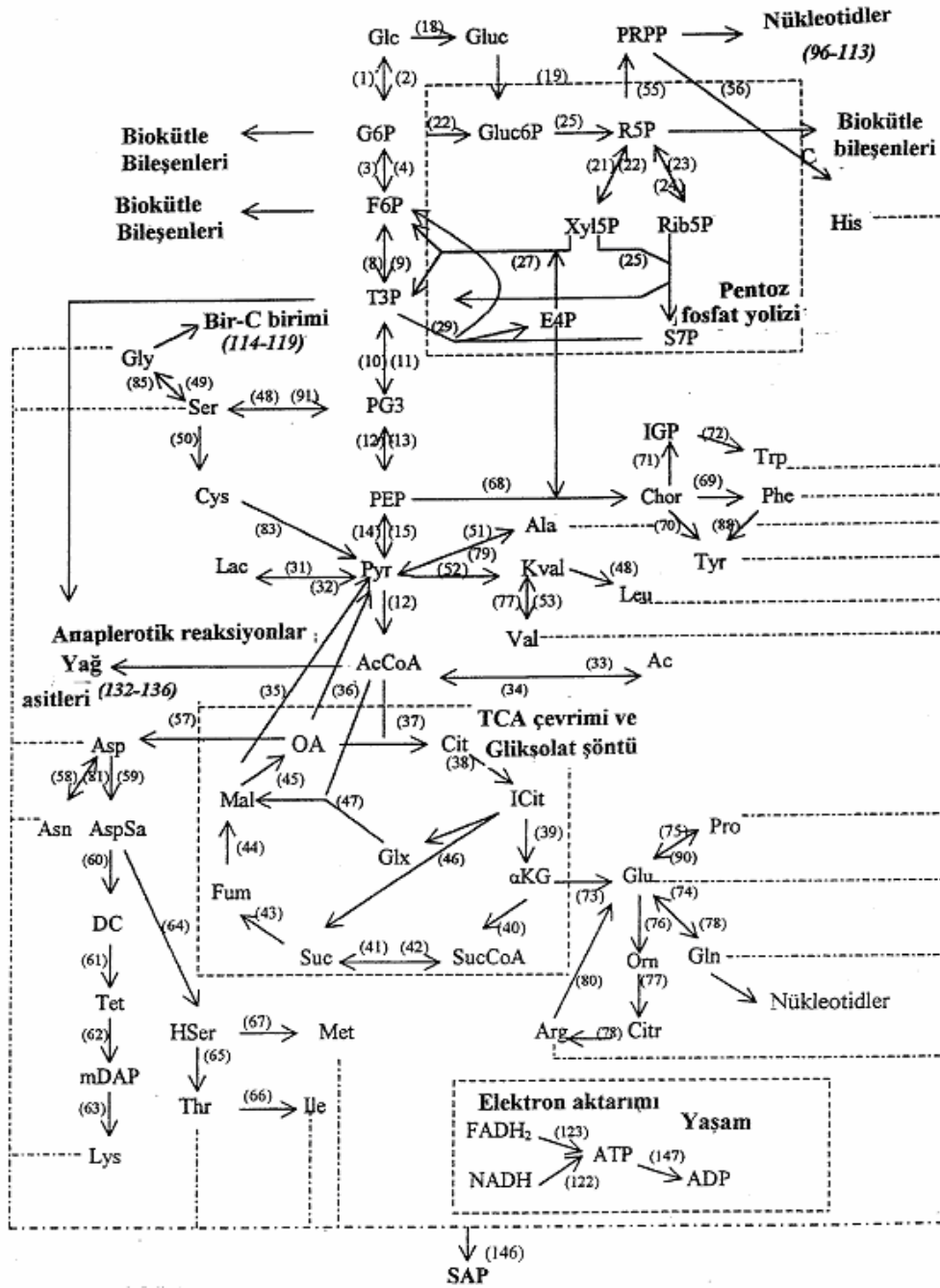
2.8.2.2 Matematik model

Tepkime ağındaki metabolik bileşiğin birikim hızı, bileşiği üreten tüm tepkimeler ile bileşiği tüketen tepkimelerin cebirsel toplamına eşitlenerek metabolik yolizindeki bileşik sayısına ($m=105$) eşit sayıda kütle korunum temelli stokiyometrik denklemlerden oluşan matematik model kurulmuştur. Bu şekilde kurulan denklem

sistemi matris notasyonu ile:

$$\mathbf{A} \cdot \mathbf{r}(t) = \mathbf{c}(t) \quad (2.5)$$

vektör diferansiyel denklemiyle tanımlanır. Burada; $\mathbf{A}$, metabolik tepkime sisteminin $m \times n$ stokiyometrik katsayılar matrisi, $\mathbf{r}(t)$, $n \times 1$ tepkime hız (akı) vektörü ve $\mathbf{c}(t)$ ise



Şekil 2.15 SAP için metabolik yolizi

metabolik bileşikler için $m \times 1$ birikim hız vektörüdür.

$$\mathbf{c}(t) = \mathbf{c}_1(t) + \mathbf{c}_2(t) \quad (2.6)$$

$\mathbf{c}_1(t)$ ve $\mathbf{c}_2(t)$ sırasıyla hücre dışı ve hücre içi metabolit birikim vektörleridir. Hücre dışı metabolitlerin birikim ve tüketim hızı, kalma süresi derişim değışimi eğrilerinden iki derişim arasındaki eğimden bulunmuştur. MYM analizinin yapıldığı evrede, hücre içinde yaklaşık yatışkın koşul varsayımı yapılmış ve böylece $\mathbf{c}_2(t)=0$ olduğundan, denklem indirgenmiştir (Çalık vd 2000).

$$\mathbf{c}(t) = \mathbf{c}_2(t) \quad (2.7)$$

2.8.2.3 Matematik modelin çözümü

Lineer bir optimizasyon programıyla amaç fonksiyonu Z:

$$Z = \sum \alpha_i r_i \quad (2.8)$$

i- bileşigi için α_i stokiyometrik katsayıları ile r_i hızlarının çarpımının lineer toplamı olarak tanımlanan denklem 2.8, hücre içinde SAP üretim hızı (R_{146}) ile SAP'ın hücre dışına aktarım hızının ($dC_{SAP}/dt/C_X$) farkı olarak tanımlanan iki fonksiyonu minimize edilerek denklem sistemi çözülmüştür. Matematik modelin değişkenleri olan tepkime akıları $\text{mmol g}^{-1} \text{KHst}^{-1}$ olarak tanımlanmıştır. Hücre oluşum akısı $r_X (\text{gKHg}^{-1} \text{KHst}^{-1})$; birim reaktör başına hücre oluşum hızının C_X değerine bölünmesiyle $r_X = m$ olarak elde edilir (Çalık vd 2000).

2.9 Enzim Üretimine Amino Asit Etkisi

Çalık ve Özdamar (1999) karbon kaynağı olarak sitrik asit kullanarak SAP üretim prosesi için *Bacillus licheniformis* (DSM 1969)'in kütle akı dengesi esasına dayanan stokiyometrik temelli matematik modeli kurmuşlardır. Model 147 tepkime içermekte ve yaklaşık yataşkın koşulda olduğu varsayılan 105 metabolit bulunmaktadır. *Bacillus licheniformis* ile SAP birikim hızının minimum olduğu varsayılarak modelin çözümünden metabolik akı dağılımı elde edilmiştir. Akı dağılımı haritaları, hücrelerin biyoproses süresince TCA döngüsünü tamamladığını, glikoneogenesis yolizi, pentoz fosfat yolizi ve Anapleorotik tepkimeleri kullandığını, glikoliz yolizinin ise etkin olmadığını göstermiştir. Yolizindeki sapmalar ve biyoproses periyotlarına bağlı olan metabolik tepkimeler sunulmuş; sonuçlar Hücre içi amino asit akılarının SAP fermantasyon prosesinde önemli rol oynadığını göstermiştir. **Park et al. (1995)** yarı kesikli işletiminde, amino asit derişiminin kontrolü ile *Bacillus brevis*'in α -amilaz üretimini arttırmayı amaçlamışlardır. Asparajin ve izolözinle zenginleştirilmiş azot kaynağı kullanmak suretiyle amino asit derişimini 5 mM'da kontrol ederek, maksimum rekombinant protein (α -amilaz) verimi ve spesifik aktiviteyi sırasıyla 5.14 kU/ml ve 0.77 kU/mgkuru hücre iken 12.01 kU/ml ve 2.64 kU/mgkuru hücre olarak elde etmişlerdir. Ortamdaki L-amino asit derişimini kontrol etmek için 2-20 mM derişim aralığında maya ekstraktı ve polipepton karışımı kullanılmış ve amino asit derişimleri biotek analiz sistemiyle offline olarak ölçülmüştür. L-amino asit derişimleri belirtilen aralıkta düşük seviyede (≈ 2 mM) kontrol edildiğinde α -amilaz'ın aktivitesi kontrolsüz kesikli işletimle karşılaştırıldığında sadece 1.3 kat artmış ve amonyum iyonunun ortamda biriktiği görülmüştür. Amino asit derişimleri yüksek seviyede (≈ 20 mM) kontrol edildiğinde ise düşük kontrol seviyesine göre hücre derişiminin arttığı ancak buna karşılık daha az α -amilaz üretildiği belirlenmiştir. Amonyum inhibisyonunu önlemek ve α -amilaz üretimini arttırmak için biyoproses ortamına 5 mM derişiminde sistein, glutamik asit, glisin, histidin, asparajin, lizin, metionin ve izolözin eklenmiş; bunlardan asparajin ve izolözinin aktiviteyi arttırdığı bulunmuştur. Bu iki amino asitin ortama eklenmesiyle enzim üretimi ve spesifik aktivite sırasıyla 2.9 ve 5.1 kat arttırılmıştır.

Parulekar et al. (1993) karbon kaynağı olarak glukoz ve/veya nişasta içeren tanımlanmış ortamları kullanarak kesikli, yarı-kesikli ve sürekli işletimlerde *Bacillus subtilis* TN106(pAT5)'in çoğalmasını ve α -amilaz aktivitesine ve spesifik α -amilaz aktivitesine etkisi incelenmiştir. Buna göre biyoproses ortamında arginin başlangıç derişimi azaldıkça hücre oluşumu da azalmakta, arginin başlangıç derişiminin artmasıyla ise glukoz tüketimi artmaktadır. Ancak biyoproseste α -amilaz üretimini artmasıyla birlikte karbon kaynağı olarak nişastayla glukozun yerine α -amilaz kullanılması hücre oluşumunu yavaşlatmış ve spesifik aktiviteyi arttırmıştır. Bu çalışmada incelenen arginin derişimlerinde, en yüksek yığın α -amilaz aktivitesi ara derişimde (0.56 g/l) elde edilirken, düşük arginin derişiminde (0.11 g/l) hücre çoğalmasının, yüksek arginin derişiminde (1.11 g/l) ise spesifik aktivitenin düşük olduğu bulunmuştur. Sabit besleme hızında yapılan yarı kesikli deneylerde düşük hacimsel besleme hızında ve biyoproses ortamına beslenen nişastanın düşük derişimlerinde α -amilaz üretiminin arttığı görülmüştür. Sürekli işletimde ise prosesin ilerleyen periyotlarında rekombinant hücrenin plasmidini koruması için ortamda antibiyotik derişiminin kontrol edilmesi gerekirken, bütün kesikli ve yarı kesikli deneylerde α -amilaz üretiminin hücre çoğalmasıyla ters orantılı olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle yığının α -amilaz aktivitesini arttırmak için birinci basamakta ise α -amilaz üretimini arttırmak emciyle iki basamakta biyoreaktör işletim stratejisini uygulamışlardır. Diğer taraftan rekombinant mikroorganizma kullanılarak (*r-B.licheniformis*) yapılan çalışmada pH=7.25 ve onun biraz altında pH=7.10 ile, hafifi asitik bölgede pH=6.80 den başlayarak yapılan pH kontrollü ve pH kontrolsüz işletimlerde en uygun başlangıç pH değerinin pH=7.10 olduğu ancak biyoreaktör işletim sisteminin ise her pH'da kontrolsüz işletim türü olması gerektiği bulunmuştur. $pH_o=7$, 7.25, 7.5 kontrolsüz pH şartlarında Hücre içi akı değerleri iki farklı periyotta ($0 < t < 20$ h- $20 < t < 43$) incelenmiş çoğalma fazında glikoliz ve TCA yolizi akılarının pH_o değeri arttıkça arttığı, SAP üretim fazında ise $pH_o=7.5$ ve 7 değerlerinde sırasıyla minimum ve maksimum değerlerine ulaştığı bulunmuştur. Bunun yanında TCA, amino asit ve SAP sentez akısı $pH_o=7.25$ değerinde maksimum değerine ulaşmıştır. Ayrıca yine aynı çalışmada pH değeri arttıkça toplam amino asit derişiminin genel olarak azaldığı, kalma süresi arttıkça salınım gösterdiği bulunmuştur (Çalık vd 2002).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Mikroorganizmalar

Bu araştırmada, United States Department of Agriculture, Northern Regional Research Center (NRRL), *Bacillus* Genetic Stock Center (BGSC) ve Deutsche Sammlung Von Mikroorganismen Und Zellkulturen GmbH (DSMZ)'den dondurularak kurutulmuş olarak getirilen mikroorganizmalar kullanılmıştır. Aşağıda tür adları ve numaraları verilen mikroorganizmalar -48°C'da derin dondurucuda saklanmıştır.

- 1.DSM 1969 *Bacillus licheniformis*
- 2.NRRL B-11380 *Bacillus amyloliquefaciens*
- 3.BGSC-1A751 *Bacillus subtilis*
- 4.NRRL NRS-732 *Bacillus sphaericus*

Mikroorganizmalar, % 0.5 pepton, %1.5 soytripton, 0.001 kg/m³ MnSO₄.2H₂O bileşimindeki -su içinde hazırlanan ve 121°C ve 1.2 atm'de doymuş buharla 20 dk süreyle sterillenen- V=0.5 ml çözeltide 30°C'da 30 dk çalkalanarak canlandırılmış ve canlandırma ortamında 30 dk bekleyen hücreler canlandırma ortamına ilaveten 15 kg/m³ katı agar içeren ortamlara steril koşullarda aktarılmıştır. Katı agar ortamlar aşağıdaki yöntemle hazırlanmıştır.

1. Yukarıda bileşimi verilen ortamlar, homojen hale gelinceye kadar manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak kaynatılmıştır.
 2. Ortam berrak hale geldiğinde, daha önceden hazırlanmış mikrobiyolojik hava filtreli tüplerin her birine 6 ml konulmuş ve sterillemiştir.
- Tüpler sterilizasyon işleminden sonra eğilerek, agarın donması beklenmiştir; eğik agar tüpleri 4°C'da korunmuşlardır.

Yukarıdaki gibi hazırlanan katı ortamlara mikroorganizma öze ile steril koşullarda

aktarıldıktan sonra 30°C’da 18 saat inkübatörle çoğaltılmıştır. Mikroorganizmaların yaşlanmalarını ve zamanla aktivitelerini kaybetmelerini önlemek için katı ortamda çoğaltılmış aktif mikroorganizmalar mikrobanka aktarılarak -20°C’da saklanmıştır.

3.2 Rekombinant *Bacillus* Türleri ile SAP Üretimi

3.2.1 Mikrobank (mikroorganizma saklama sistemi)

1.8 cm³ hacimli 25 adet kimyasal reaksiyondan geçirilmiş mikroorganizmaları tutucu özellikte porlu yapıya sahip seramik boncuk ve mikroorganizmaların kolayca homojen olarak boncuklara yapışmasını sağlayan Cryoprezervatif sıvı içeren şişelere (PRO-LAB, MicrobankTS) katı ortamda çoğaltılmış aktif mikroorganizma aktarılmış, bir süre çalkalandıktan sonra şişedeki gliserol atılmış, mikroorganizmaların gözenekli boncuklara adsorpsiyonu sağlanmıştır. Şişeler 20°C’da saklanmıştır.

3.2.2 Katı çoğalma ortamı

Rekombinant *Bacillus* türleri ile yapılan SAP üretim deneylerinde kullanılan katı çoğalma ortamının bileşimi çizelge 3.1’de verilmiştir (Çalık 1998). Bileşimi çizelge 3.1.’de verilen katı çoğalma ortamındaki azokazein diğer bileşenlerden ayrı olarak sterillemiştir. Sterilizasyon işleminden sonra, rekombinant *Bacillus* türleri için mikroorganizmaların taşıdıkları plasmidleri koruyabilmeleri için ortama 7 mg/cm³ kloramfenikol eklenmiş; 30 cm³ ortam petri kabına boşaltılmıştır. Petrideki ortam donduktan sonra mikrobanktan alınan boncuk ile steril koşullarda mikroorganizma aktarılmış 30°C’da 44 st inkübatörde çoğaltılmıştır. Hücreler çoğaldıktan sonra 4°C’da saklanmıştır.

3.2.3 Ön sıvı çoğalma ortamı

Mikroorganizma çoğalması ve enzim üretiminde kullanılan ön sıvı ortamın bileşimi çizelge 3.2’de verilmiştir (Çalık 1998). Ön sıvı ortam 7 mg/cm³ kloramfenikol içermektedir. Katı ortamda çoğalmalarını tamamlayan hücreler, VR=150 cm³ hacimli mikrobiyolojik hava filtreli kesikli biyoreaktör de bulunan bileşimi çizelge 3.2’de verilen V=30 cm³ hacimli ön sıvı ortama öze ile steril koşullarda aktarılmış ve 37°C, karıştırma hızı N=200 dk⁻¹ olan orbital karışmalı inkübatörde (Gallenkamp) çoğaltılmışlardır.

Çizelge 3.1. Rekombinant *Bacillus* türleri için katı çoğalma ortamı

Bileşen	Derişim, kg/m ³
MnSO ₄ .2H ₂ O	10.10 ⁻³
Agar	30
Pepton	5
Azokazein	4

Çizelge 3.2. Rekombinant *Bacillus* türleri için ön sıvı çoğalma ortamı

Bileşen	Derişim, kg/m ³
Soyton	15.0
Pepton	5
CaCl ₂	0.1
Na ₂ HPO ₄	0.25
MnSO ₄ .2H ₂ O	0.001

3.2.4 Üretim ortamı

Ön sıvı çoğalma ortamında periyodunu tamamlayan mikroorganizmalar 1:10 aşılama oranı kullanılarak, 0.04 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ tampon çözeltisinde hazırlanan ve $7\text{mg}/\text{cm}^3$ kloramfenikol içeren üretim ortamlarına aktarılmıştır. Bileşenleri ve bileşimleri Çalık (1998) tarafından belirlenmiş olan referans ortam çizelge 3.3.'de verilmiştir.

Çizelge 3.3. Rekombinant *Bacillus* türleri için referans üretim ortamı

Bileşen	Derişim, kg/m^3
Glukoz	8.0
$(\text{NH}_4)\text{PO}_4$	4.714
KH_2PO_4	2.0
CaCl_2	0.2

3.2.5 Analitik yöntemler

SAP üretim prosesi süresince önce mikroorganizma çoğalmış daha sonra da enzim üretmiştir. Laboratuvar ölçekli biyoreaktörlerde gerçekleştirilen biyoproses süresince farklı kalma sürelerinde alınan örneklerin önce mikroorganizma derişimleri ölçülmüş, daha sonra biyoreaktör üretim ortamı 10 dk süreyle 11500 dk^{-1} de ultrasantrifüj cihazı (Sorvall RC28S) ile santrifüjlenerek hücreler ayrılmıştır. Hücre dışı analizlerin yapıldığı bu ortamlardan mikroorganizmalar uzaklaştırılıp sıvı faz 0.45 mm gözenekli filtreden süzildükten sonra SAP enziminin aktivitesi – üretim ortamından alınan örnekler kullanılarak- ve derişimi, sıvı ortamdaki amino asit ve organik asitlerin hücre dışı derişimleri belirlenmiştir.

3.2.5.1 Mikroorganizma derişimi

Mikroorganizma derişimi turbidimetrik olarak UV-spektrofotometrede (UV 160 A Shimadzu) absorbans ölçümüyle belirlenmiştir. Referans çözelti olarak mikroorganizma içermeyen enzim üretim ortamı kullanılmıştır. Belli derişimde hücre içeren ortam için 200-800 nm arasında yapılan dalgaboyu taraması sonucu en uygun dalgaboyu olarak nm’de hazırlanan kalibrasyon doğrusu kullanılmıştır (Ek 1).

3.2.5.2 Serin alkali proteaz enziminin aktivitesi

Üretilen SAP enziminin aktivitesi, kazeinin enzimatik hidrolizi sonucunda açığa çıkan hidrolizatların absorbansının spektrofotometrik olarak ölçülmesiyle belirlenmiştir. Enzimatik aktivite “U/cm³” olarak tanımlanmıştır. 1U (= 1 unite) birim zamanda açığa çıkan 4nmol tirozin miktarı olarak tanımlanmıştır (Çalık 1998, Çalık vd 1998). Enzim aktivitesini belirlemek amacıyla, borat tamponunda (pH=10) hazırlanmış %0.5 derişimdeki kazein kullanılmıştır. Mikroorganizmasından ayrılmış enzim içeren sıvı biyoreaktör üretim ortamı, bu çözeltinin 2 cm³’ü ile 1 cm³ borat tamponunda seyreltilerek, 37°C sıcaklıkta, 105 dk⁻¹ karıştırma hızıyla 20 dk tepkimeye sokulmuştur. Tepkime 2 cm³ %10 (a/h) triklorik asit (TCA) eklenmesiyle durdurulmuştur. Çözelti 15 dk tuz-buz banyosunda bekletildikten sonra 4°C’da, 11500g’de, 10 dk süreyle ultrasantrifüj cihazı ile santrifüjlenmiş ve üstte kalan sıvının absorbansı $\lambda=275$ nm dalga boyunda UV-spektrofotometrede ölçölmüş; Çalık (1998) tarafından SAP aktivitesinin hesaplanabilmesi için hazırlanan absorbans-aktivite kalibrasyon eğrisi ile enzim aktivitesi hesaplanmıştır (Ek 2). Enzim aktivitesinin birimi “U/cm³” olarak tanımlanmıştır.

3.2.5.3 DNS yöntemi ile glukoz tayini

Mikroorganizmanın tüketmediği indirgenmiş şekerler –glukoz, fruktoz- tayini DNS (dinitrosalisilikasit) yöntemi ile yapılmıştır (Miller 1959) Bunun için önce çeşitli derişimlerde glukoz içeren ortamlar kullanılarak indirgenmiş şeker kalibrasyon eğrileri hazırlanmıştır. Kalibrasyon eğrisinin hazırlanmasında ve örneklerin analizinde kullanılan yöntem aşağıda verilmiştir.

1. Sıvı ortam içinde hazırlanan farklı derişimlerdeki glukoz ve fruktoz içeren ortamlardan 1 cm³ alınarak üzerine 3 cm³ DNS çözeltisi eklenmiştir.
2. Karışım 5 dk kaynayan su banyosunda tutulduktan sonra 5 dk tuz-buz banyosunda bekletilmiştir.
3. Bu işlemlerden sonra UV-spektrofotometre sıfır ayarı indirgenmiş şeker içermeyen ve aynı basamaklardan geçen çözelti ile yapılmış; çözeltilerin absorbanları en uygun dalga boyu olarak seçilen 550 nm’de ölçülmüştür. Oluşturulan kalibrasyon eğrisi Ek 3’de, DNS çözeltisi hazırlama yöntemi ise Ek 4’de verilmiştir.

3.2.5.4 Amino asitlerin analizi

SAP enzimi üretiminde fermentasyon ortamına mikroorganizma tarafından salgılanan amino asitlerin belirlenmesi için ters faz yöntemi ile ayırma yapan yüksek basınç sıvı kromatografi temelli Amino Asit Analiz Sistemi (Waters, AAAS) kullanılmıştır. Amino asit analizi için kolon öncesi türevlendirme gerektiren PİCOTAG yöntemi kullanılmıştır (Cohen 1983). Waters tarafından geliştirilmiş ve 32 amino asitten oluşan karışımın analizine yönelik olan “Picofree Gradient Yöntemi” ile amino asit analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemde serbest amino asitler birinci basamakta fenilizotiyosiyanat (PITC) ile tepkimeye sokularak feniltiyokarbomil amino asit (PTC-AA) türevleri elde edilmiştir. İkinci basamakta elde edilen amino asit türevleri AAAS’ne enjekte edilmiştir. Elde edilen kromatogramlardan amino asit derişimleri, derişimi bilinen amino asit standartlarıyla elde edilen alanlar yardımı ile bulunmuştur (Ek 5). Amino asitlerin analizlenmesi için belirlenen analiz koşulları aşağıda verilmiştir.

Kolon	: Amino asit analiz kolonu (Nova-Pak C18, Milipore)
Kolon boyutu	: 3.9 mmx30 cm
Sistem	: Ters faz sıvı kromatografi
Hareketli faz akış hızı	: 1 cm ³ /dk
Kolon sıcaklığı	: 38°C
Dedektör	: UV/VIS (Hg lambası)
Dalga boyu	: 254 nm
Duyarlılık	: 0.05 AUFS
Enjeksiyon hacmi	: 4 µl
Analiz süresi	: 20 dk

3.3 Metabolik Akı Analizi İçin Optimizasyon Programı

B.licheniformis için Çizelge 2.2’de verilen 143 denklemden oluşan, metabolik bileşikler toplamı 105 olan biokimyasal tepkime sistemi için kurulan matematik model:

$$A \cdot r(t) = c(t) \quad (3.1)$$

vektör diferansiyel denklem şeklinde tanımlanarak amaç fonksiyon Z:

$$Z = \alpha_i r_i \quad (3.2)$$

Burada α_i , hızların (r_i) stokiyometrik katsayılarıdır. Denklem-3.1’nin çözümü GAMS 2.25 (General Algebraic Modelling System, GAMS Development Corp., Washington DC) paket programıyla yapılmıştır. R_i (mmol g⁻¹ KH st⁻¹) hızlarının lineer kombinasyonu olarak tanımlanmıştır. Hücre oluşum akısı r_x (g KH.g⁻¹KHst⁻¹) birim reaktör hacimi başına hücre oluşum hızının C_x ’e bölünmesiyle $r_x = \mu$ olarak elde edilir. Denklem sisteminin çözümsüzlüğü (singularity) bazı tepkimelerin birleştirilmesi veya çıkarılmasıyla yok edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

“Aspartik asit grubu amino asitlerin serin alkali proteaz (SAP) üretimine etkisinin araştırılması” konulu bu yüksek lisans araştırmasında, pHV1431::*subC* taşıyan *r-B.licheniformis*, *r-B.subtilis*, *r-B.amyloliquafaciens* ve *r-B.sphaericus* ile SAP enziminin hücreiçi üretimini kontrol eden aspartik asit grubu amino asitler, aspartik asit (Asp), asparajin (Asn), lizin (Lys), izolözin (Ile), treonin (Thr) ve metioninin (Met) SAP verim ve seçimliliğine etkileri, mikrobiyolojik hava-filtreli laboratuvar ölçekli kesikli biyoreaktörlerde, $V=33 \text{ cm}^3$, $T=37^\circ\text{C}$, $N=200 \text{ dk}^{-1}$ işletme koşullarında araştırılmıştır. Bu amaçla *r-B.licheniformis* ile karbon ve azot kaynağı içeren üretim ortamlarına üç farklı ekleme anı $t_e=0 \text{ st}$, $t_e=18 \text{ st}$ ve $t_e=24\text{st}$ ’ta bir-kez; $C_{AA}=0, 2.5, 5.0, 7.5, 10, 15 \text{ mM}$ derişimlerde, tek amino asit Asp, Asn, Lys, Ile, Thr ve daha düşük derişimlerde $C_{Met}=0.004, 0.04, 0.4, 0.6, 1.5 \text{ mM}$ Met eklenerek deneyler gerçekleştirilmiş, sonuçlar amino asit eklenmeyen referans ortamla kıyaslanmıştır.

R-B. subtilis ile karbon ve azot kaynağı içeren üretim ortamlarına $t_e=0 \text{ st}$ ekleme anında $C_{AA}=0, 2.5, 5.0, 7.5, 10, 15 \text{ mM}$ derişimlerde tek amino asit Asp, Asn, Lys, Ile, Thr ve daha düşük derişimlerde $C_{Met}=0.004, 0.04, 0.4, \text{ mM}$ Met eklenerek deneyler gerçekleştirilmiş ve yine sonuçlar amino asit içermeyen referans ortamla kıyaslanmıştır.

R-B.amyloliquafaciens ve *r-B.sphaericus* ile de yine aynı koşullarda üretim ortamlarına $t_e=0 \text{ st}$ ekleme anında $C_{AA}=2.5 \text{ mM}$ amino asit derişiminde (tek derişimde) aspartik asit grubu amino asitler (Asp, Asn, Lys, Ile, Thr) eklenmiş, sonuçlar amino asit içermeyen referans ortamla kıyaslanmıştır.

Son olarak hem sonuçların tekrarlanabilirliğini göstermek hem de *r-B.licheniformis* tarafından üretilen SAP enziminin verim ve seçimliliğine, ürün ve yan-ürün dağılımlarına etkisini göstermek amacıyla, biyoproses süresince değişik kalma süreleri için metabolik akı analizi yapılarak hücreiçi tepkime hızlarındaki derişimler incelenmiştir.

4.1 *R-Bacillus licheniformis* ile SAP Üretimine Aspartik Asit Grubu Amino Asitlerin Etkisi

4.1.1 Aspartik asit etkisi

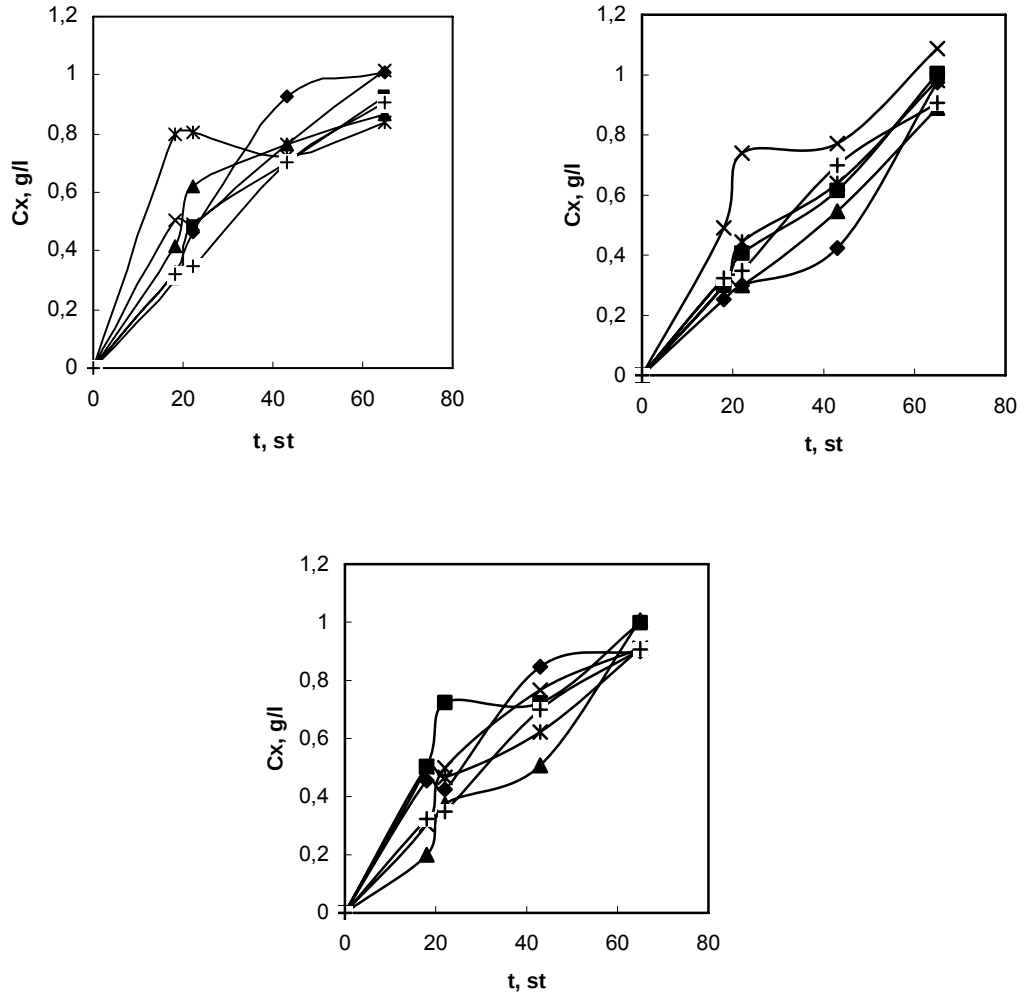
Aspartik asit grubu amino asitlerden aspartik asitin *r-B. licheniformis* ile SAP üretimine etkisini araştırmak amacıyla, üç farklı ekleme zamanı $t_e=0$ st, $t_e=18$ st, ve $t_e=24$ st'ta üretim ortamlarına, $C_{Asp}=0, 2.5, 5.0, 7.5, 10, 15$ mM derişimlerde Asp eklenerek yapılan deneylerde $t=65$ st proses süresince mikroorganizma derişiminin kalma süresiyle değişimi şekil 4.1 a, b, c'de, SAP aktivitesinin değişimi ise şekil 4.2 (a, b, c)'de verilmiştir.

R-B. licheniformis ile incelenen Asp derişimlerinde mikroorganizma derişimi kalma süresiyle artmış, maksimum hücre derişimine $t=65$ st 'ta ulaşılmıştır. En yüksek hücre derişimi $t=18$ st'ta ortama eklenen ve $C_{Asp}=10$ mM derişiminde Asp içeren proste gözlenmiştir. Proses süresince hücrelerde topaklanma gözlendiğinden eğrilerde sapma belirlenmiştir.

Şekil 4.2 a, b, c'de ise Asp'in SAP aktivitesine etkisi görölmektedir. Proses süresince, $t_e=18$ ve $t_e=24$ st Asp eklenen proseslerde aktivite fazla değişmemekle birlikte, $t_e=0$ st'ta eklenen proste $C_{Asp}=7.5$ mM olan ortamın aktivitesinin, amino asit eklenmeyen referans ortam aktivitesinden 1.35 kat fazla olduğu gözlenmiştir.

4.1.2 Asparajin etkisi

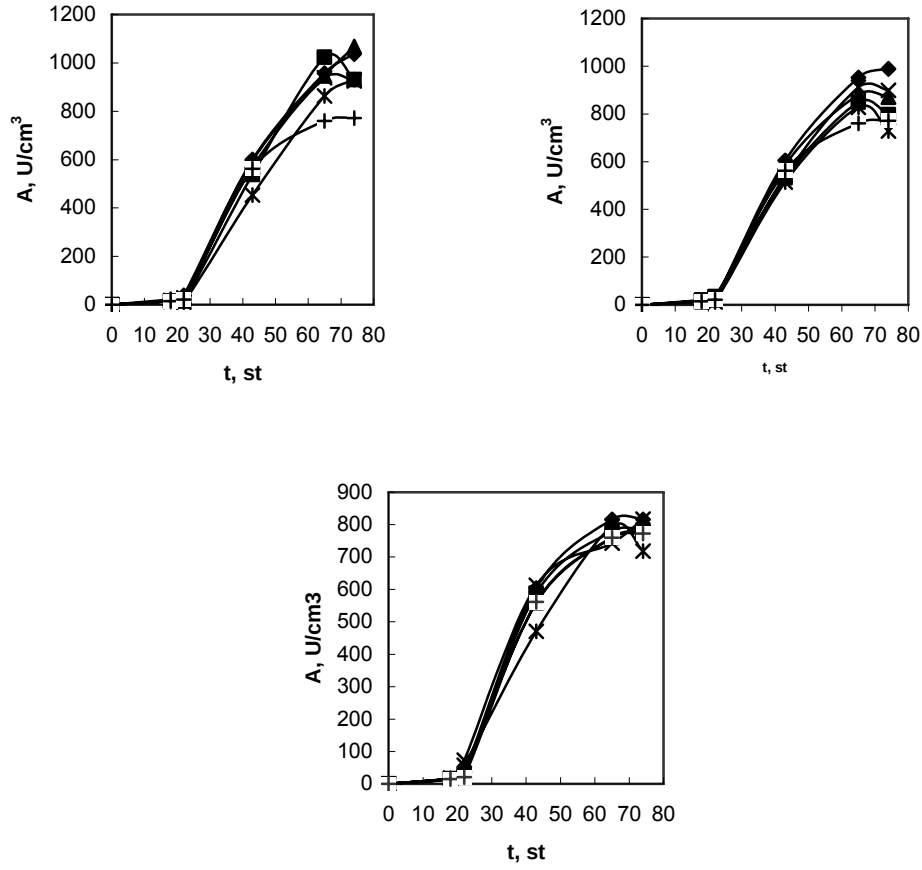
R-B. licheniformis ile SAP üretimine aspartik asit grubu amino asitlerden Asn etkisini göstermek amacıyla, üretim ortamına üç farklı ekleme zamanı $t_e=0$ st, $t_e=18$ st ve $t_e=24$ st'ta $C_{Asn}=0, 2.5, 5.0, 7.5, 10, 15$ mM derişimlerde Asn eklenmiş, proses süresince ($t=65$ st) Asn derişiminin kalma süresiyle değişiminin mikroorganizma derişimine ve SAP aktivitesine etkisi sırasıyla şekil 4.3 a, b, c ve şekil 4.4 a, b, c'de verilmiştir.



Şekil 4.1 a. *R-Bacillus licheniformis* ile hücre derişiminin kalma süresi ile değişimine aspartik asit derişiminin etkisi. $V=33 \text{ cm}^3$, $N=200 \text{ dk}^{-1}$, $C_{\text{Asp}}(\text{mM})$: $t_e=0 \text{ st}$: (+) ref, (♦) 2.5, (■) 5.0, (▲) 7.5, (x) 10, (*) 15,

b. *R-Bacillus licheniformis* ile hücre derişiminin kalma süresi ile değişimine aspartik asit derişiminin etkisi. $V=33 \text{ cm}^3$, $N=200 \text{ dk}^{-1}$, $C_{\text{Asp}}(\text{mM})$: $t_e=18 \text{ st}$: (+) ref, (♦) 2.5, (■) 5.0, (▲) 7.5, (x) 10, (*) 15,

c. *R-Bacillus licheniformis* ile hücre derişiminin kalma süresi ile değişimine aspartik asit derişiminin etkisi. $V=33 \text{ cm}^3$, $N=200 \text{ dk}^{-1}$, $C_{\text{Asp}}(\text{mM})$: $t_e=24 \text{ st}$: (+) ref, (♦) 2.5, (■) 5.0, (▲) 7.5, (x) 10, (*) 15,



Şekil 4.2. a. *R-Bacillus licheniformis* ile SAP aktivitesinin kalma süresi ile değişimine aspartik asit derişiminin etkisi. $V=33 \text{ cm}^3$, $N=200 \text{ dk}^{-1}$, $C_{\text{Asp}}(\text{mM})$: $t_e=0 \text{ st}$: (+) ref, (♦) 2.5, (■) 5.0, (▲) 7.5, (x) 10, (*) 15,
b. *R-Bacillus licheniformis* ile SAP aktivitesinin kalma süresi ile değişimine aspartik asit derişiminin etkisi. $V=33 \text{ cm}^3$, $N=200 \text{ dk}^{-1}$, $C_{\text{Asp}}(\text{mM})$: $t_e=18 \text{ st}$: (+) ref, (♦) 2.5, (■) 5.0, (▲) 7.5, (x) 10, (*) 15,
c. *R-Bacillus licheniformis* ile SAP aktivitesinin kalma süresi ile değişimine aspartik asit derişiminin etkisi. $V=33 \text{ cm}^3$, $N=200 \text{ dk}^{-1}$, $C_{\text{Asp}}(\text{mM})$: $t_e=24 \text{ st}$: (+) ref, (♦) 2.5, (■) 5.0, (▲) 7.5, (x) 10, (*) 15

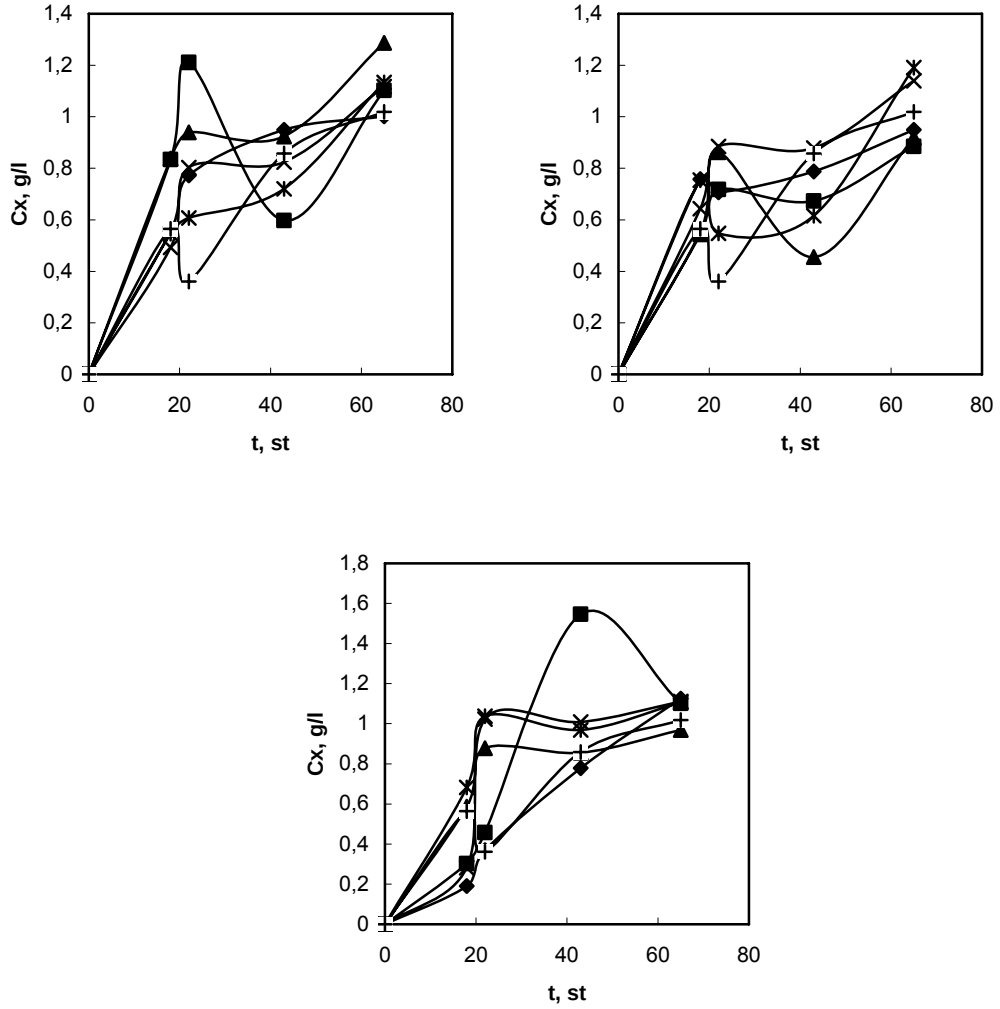
Asn'in SAP aktivitesine etkisinin incelendiği deneyde en uygun ekleme zamanlarının başlangıç anı $t_e=0$ ile SAP üretiminin başladığı $t_e=18$ st olduğu belirlenmiştir. $t_e=24$ st'ta olumlu sonuç alınamadığı için sonraki deneylerde sadece $t_e=0$ st ve $t_e=18$ st'larda ekleme yapılması kararlaştırılmıştır.

Şekil 4.3. a, b, c'de verildiği gibi Asn eklenen üretim ortamlarında mikroorganizma derişimi kalma süresiyle birlikte artmış, $t=43$ st'ta azalma göstermiş, $t=65$ st'ta tekrar artma gözlenmekle birlikte çok fazla bir değişim olmamıştır. Maksimum hücre derişimine $t_e=0$ st'ta 5.0 mM Asn eklenen proseste ulaşılmıştır.

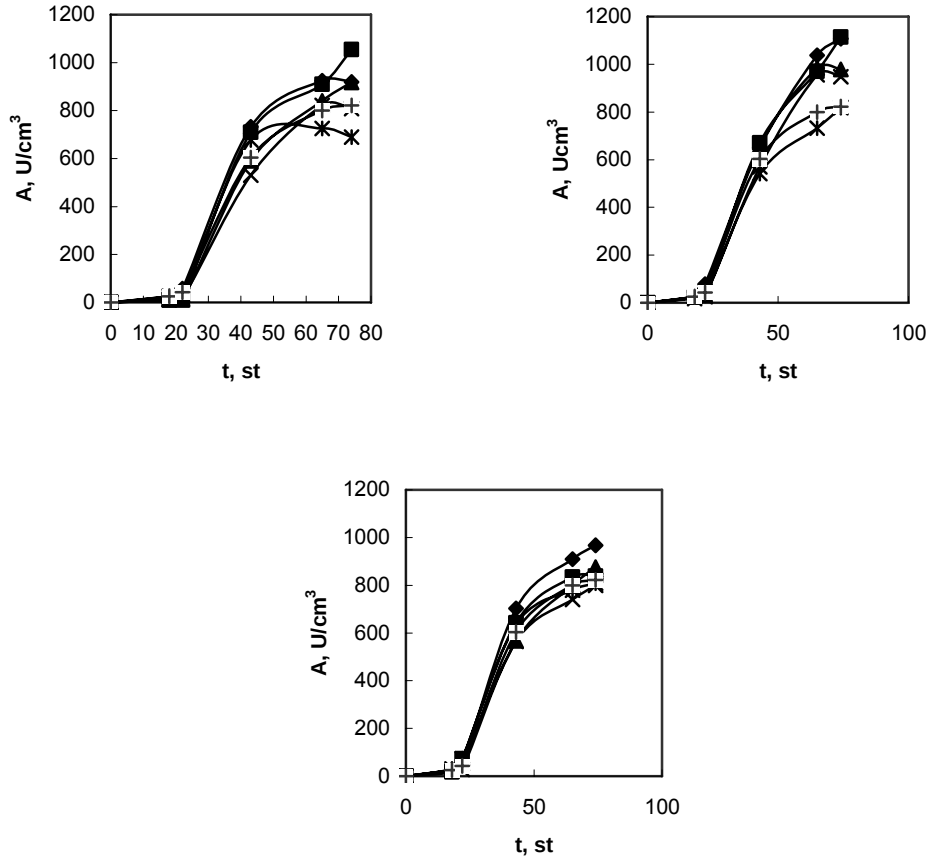
Şekil 4.4. a, b, c'de Asn'in SAP aktivitesine etkisi görülmektedir. Proses süresince $t_e=0$ ve $t_e=18$ st'ta referans ortamda elde edilenin üzerinde aktivite elde edilmiştir. *R-B.licheniformis* için incelenen Asn derişimlerinde SAP aktivitesi $t=18$ st'tan sonra artmaya başlamış ve $t=65$ st'a kadar devam etmiştir. Maksimum aktiviteye $t=65$ st'ta $t_e=18$ st'ta eklenen $C_{Asn}=5.0$ mM Asn içeren proseste $A=928$ U/cm³ olarak ulaşılmış; referansa kıyasla aktivitede 1.38 kat artış elde edilmiştir. Proses süresince tüm ekleme anlarında $C_{Asn}=15$ mM olan derişimlerde aktivitede artış gözlenmemiş, üretim inhibe olmuştur.

4.1.3 Treonin etkisi

Aspartik asit grubu amino asitlerden Thr'nin SAP aktivitesi üzerine etkisini araştırmak amacıyla, $t_e=0$ st ve $t_e=18$ st ekleme zamanlarında üretim ortamına $C_{Thr}=0, 2.5, 5.0, 7.5, 10, 15$ mM derişimlerinde eklenerek proses süresince ($t=65$ st) incelenen Thr derişiminin mikroorganizma derişimine etkisi şekil 4.5 a, b ve SAP aktivitesine etkisi şekil 4.6 a, b'de gösterilmiştir.



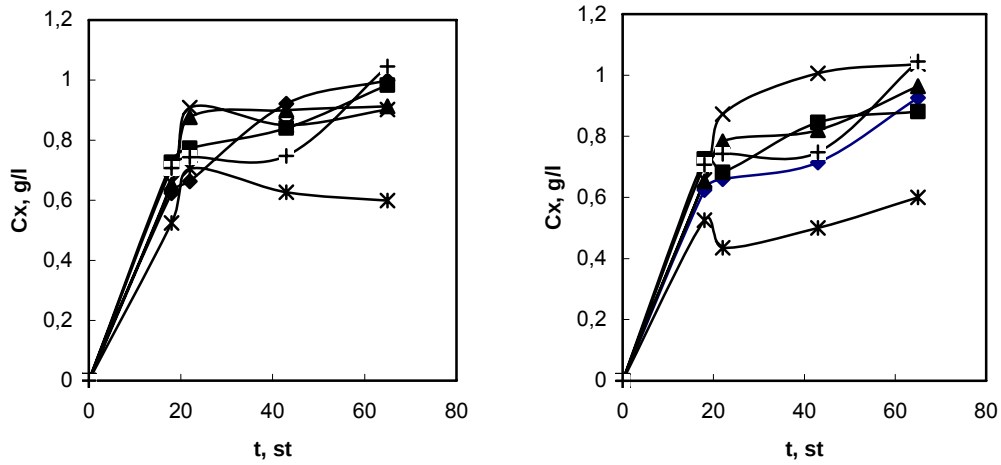
Şekil 4.3. a. *R-Bacillus licheniformis* ile hücre derişiminin kalma süresi ile değişimine asparajin derişiminin etkisi. $V=33 \text{ cm}^3$, $N=200 \text{ dk}^{-1}$, $C_{Asn}(\text{mM})$: $t_e=0 \text{ st}$: (+) ref, (◆) 2.5, (■) 5.0, (▲) 7.5, (x) 10, (*) 15,
b. *R-Bacillus licheniformis* ile hücre derişiminin kalma süresi ile değişimine asparajin derişiminin etkisi. $V=33 \text{ cm}^3$, $N=200 \text{ dk}^{-1}$, $C_{Asn}(\text{mM})$: $t_e=18 \text{ st}$: (+) ref, (◆) 2.5, (■) 5.0, (▲) 7.5, (x) 10, (*) 15,
c. *R-Bacillus licheniformis* ile hücre derişiminin kalma süresi ile değişimine asparajin derişiminin etkisi. $V=33 \text{ cm}^3$, $N=200 \text{ dk}^{-1}$, $C_{Asn}(\text{mM})$: $t_e=24 \text{ st}$: (+) ref, (◆) 2.5, (■) 5.0, (▲) 7.5, (x) 10, (*) 15



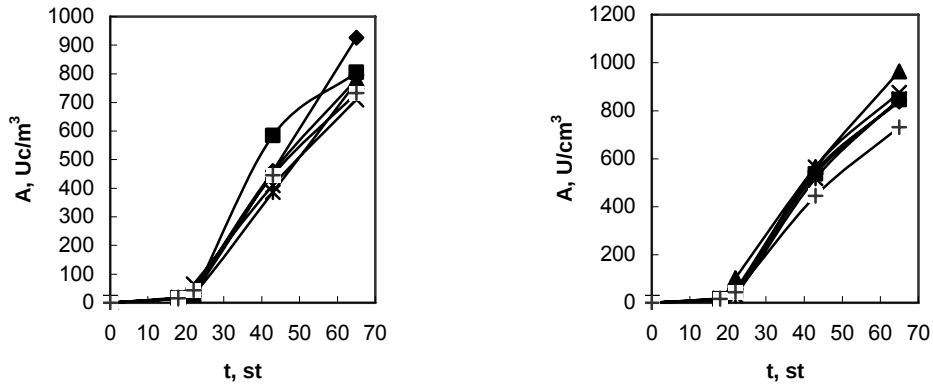
Şekil 4.4. a. *R-Bacillus licheniformis* ile SAP aktivitesinin kalma süresi ile değişimine asparajın derişiminin etkisi. $V=33 \text{ cm}^3$, $N=200 \text{ dk}^{-1}$, $C_{\text{Asn}}(\text{mM})$: $t_e=0 \text{ st}$: (+) ref, (♦) 2.5, (■) 5.0, (▲) 7.5, (x) 10, (*) 15,
b. *R-Bacillus licheniformis* ile SAP aktivitesinin kalma süresi ile değişimine asparajın derişiminin etkisi. $V=33 \text{ cm}^3$, $N=200 \text{ dk}^{-1}$, $C_{\text{Asn}}(\text{mM})$: $t_e=18 \text{ st}$: (+) ref, (♦) 2.5, (■) 5.0, (▲) 7.5, (x) 10, (*) 15,
c. *R-Bacillus licheniformis* ile SAP aktivitesinin kalma süresi ile değişimine asparajın derişiminin etkisi. $V=33 \text{ cm}^3$, $N=200 \text{ dk}^{-1}$, $C_{\text{Asn}}(\text{mM})$: $t_e=24 \text{ st}$: (+) ref, (♦) 2.5, (■) 5.0, (▲) 7.5, (x) 10, (*) 15

R-B.licheniformis derişiminin kalma süresiyle değişimi incelendiğinde mikroorganizmanın yaklaşık $t=22$ st'ta üstel çoğalma fazını tamamlayıp durgunluk fazına geçtiği, maksimum hücre derişimine referans ortam derişiminde ulaşıldığı gözlenmiştir.

şekil 4.6. a, b'da görüldüğü gibi SAP aktivitesi $t=18$ st'tan itibaren kalma süresiyle birlikte artmış; maksimum aktiviteye $t=65$ st'ta, $t_e=18$ st'ta eklenen $C_{Thr}=7.5$ mM derişiminde ulaşılmış, bu değerin referans ortamın aktivite değerinden 1.32 kat fazla olduğu gözlenmiştir.



şekil 4.5. a. *R-Bacillus licheniformis* ile hücre derişiminin kalma süresi ile değişimine treonin derişiminin etkisi. $V=33$ cm³, $N=200$ dk⁻¹, C_{Thr} (mM): $t_e=0$ st: (+) ref, (♦) 2.5, (■) 5.0, (▲) 7.5, (x) 10, (*) 15, b. *R-Bacillus licheniformis* ile hücre derişiminin kalma süresi ile değişimine treonin derişiminin etkisi. $V=33$ cm³, $N=200$ dk⁻¹, C_{Thr} (mM): $t_e=18$ st: (+) ref, (♦) 2.5, (■) 5.0, (▲) 7.5, (x) 10, (*) 15

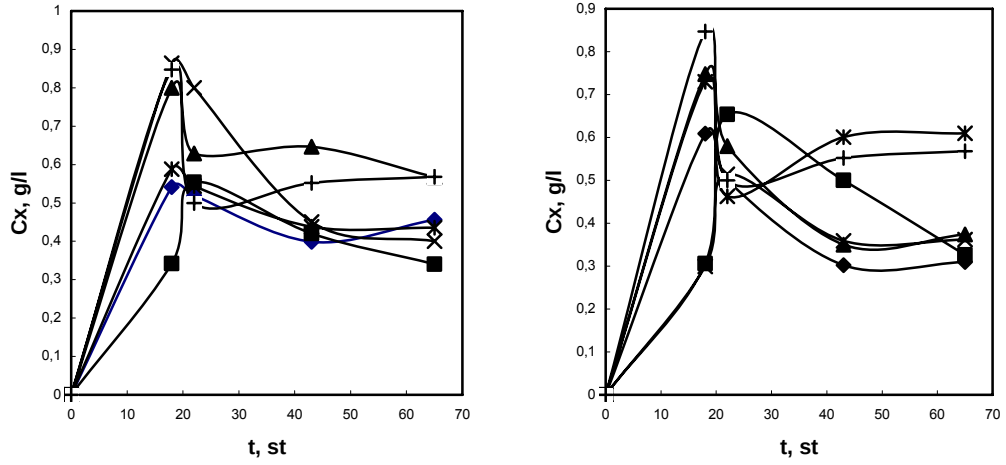


Şekil 4.6. a. *R-Bacillus licheniformis* ile SAP aktivitesinin kalma süresi ile değişimine treonin derişiminin etkisi. $V=33 \text{ cm}^3$, $N=200 \text{ dk}^{-1}$, $C_{\text{Thr}}(\text{mM})$: $t_e=0$ st: (+) ref, (♦) 2.5, (■) 5.0, (▲) 7.5, (x) 10, (*) 15,
b. *R-Bacillus licheniformis* ile SAP aktivitesinin kalma süresi ile değişimine treonin derişiminin etkisi. $V=33 \text{ cm}^3$, $N=200 \text{ dk}^{-1}$, $C_{\text{Thr}}(\text{mM})$: $t_e=18$ st: (+) ref, (♦) 2.5, (■) 5.0, (▲) 7.5, (x) 10, (*) 15

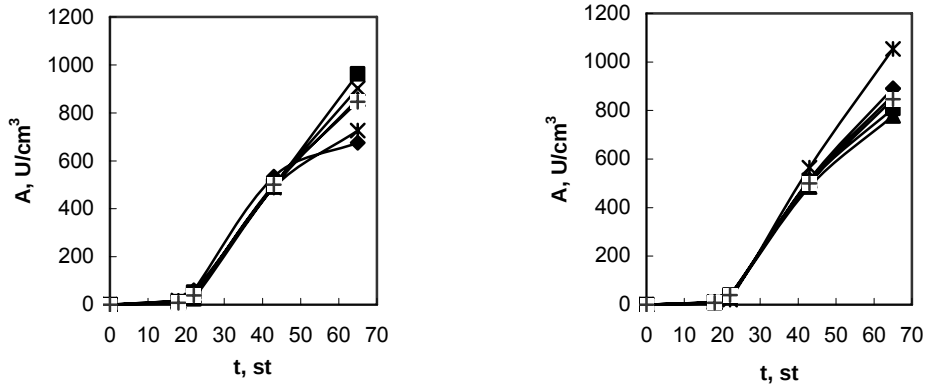
4.1.4 İzolözin etkisi

R-B.licheniformis ile SAP üretimine Ile'nin etkisini araştırmak amacıyla $t_e=0$ st, $t_e=18$ st ekleme anlarında ortama $C_{\text{Ile}}=0, 2.5, 5.0, 7.5, 10, 15$ mM derişimlerinde Ile eklenerek, proses süresince ($t=65$ st) Ile derişiminin mikroorganizma derişiminin kalma süresiyle değişimine etkisi şekil 4.7 (a, b), SAP aktivitesine etkisi ise şekil 4.8 (a, b)'de verilmiştir.

Mikroorganizma derişiminin kalma süresiyle değişimi incelendiğinde Ile eklenen üretim ortamlarında mikroorganizmaların yaklaşık $t=18$ st'ta üstel çoğalma fazını tamamlayıp durgunluk fazına geçtiği belirlenmiş, ancak hücrelerde topaklanma olduğundan eğrilerde sapmalar gözlenmiştir. Maksimum hücre derişimine $t=18$ st'ta ortama eklenen $C_{\text{Ile}}=10$ mM eklenen proseste ulaşılmıştır.



Şekil 4.7 a. *R-Bacillus licheniformis* ile hücre derişiminin kalma süresi ile değişimine izolözin derişiminin etkisi. $V=33 \text{ cm}^3$, $N=200 \text{ dk}^{-1}$, $C_{\text{Ile}}(\text{mM})$: $t_e=0$ st: (+) ref, (♦) 2.5, (■) 5.0, (▲) 7.5, (x) 10, (*) 15,
b. *R-Bacillus licheniformis* ile hücre derişiminin kalma süresi ile değişimine izolözin derişiminin etkisi. $V=33 \text{ cm}^3$, $N=200 \text{ dk}^{-1}$, $C_{\text{Ile}}(\text{mM})$: $t_e=18$ st: (+) ref, (♦) 2.5, (■) 5.0, (▲) 7.5, (x) 10, (*) 15



Şekil 4.8. a. *R-Bacillus licheniformis* ile SAP aktivitesinin kalma süresi ile değişimine izolözin derişiminin etkisi. $V=33 \text{ cm}^3$, $N=200 \text{ dk}^{-1}$, $C_{\text{Ile}}(\text{mM})$: $t_e=0$ st: (+) ref, (♦) 2.5, (■) 5.0, (▲) 7.5, (x) 10, (*) 15,
b. *R-Bacillus licheniformis* ile SAP aktivitesinin kalma süresi ile değişimine izolözin derişiminin etkisi. $V=33 \text{ cm}^3$, $N=200 \text{ dk}^{-1}$, $C_{\text{Ile}}(\text{mM})$: $t_e=18$ st: (+) ref, (♦) 2.5, (■) 5.0, (▲) 7.5, (x) 10, (*) 15

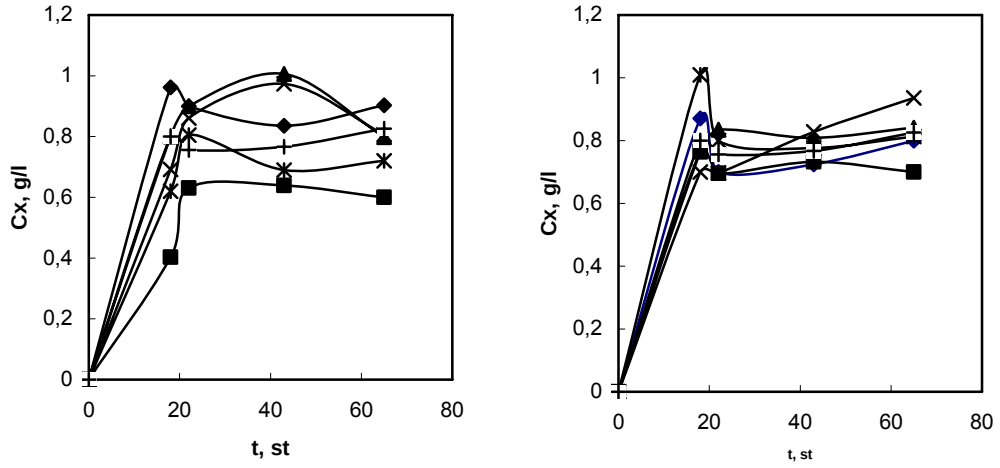
Şekil 4.8 a, b’de görüldüğü gibi SAP aktivitesi $t=18$ st’tan itibaren kalma süresiyle birlikte artmış, maksimum aktiviteye $t=74$ st’ta $t_e=18$ st’ta ortama eklenen $C_{Ile}=15$ mM derişiminde 1053 U/cm^3 olarak ulaşılmış, bu değerin aynı saatte ölçülen referans ortamın aktivitesinden 1.25 kat fazla olduğu gözlenmiştir.

4.1.5 Lizin etkisi

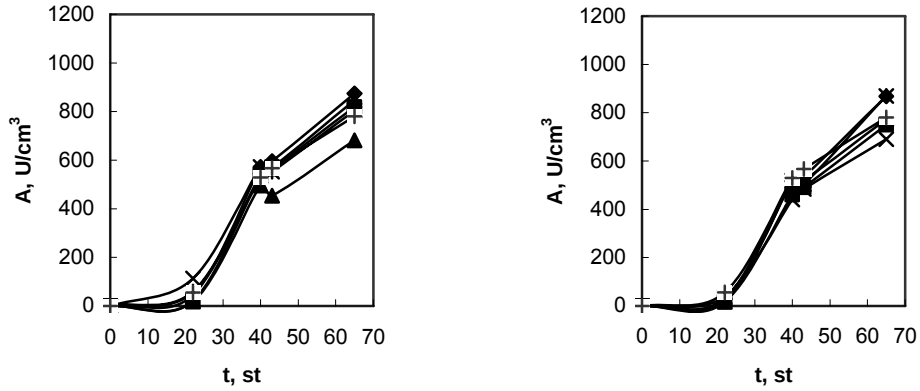
Aspartik asit grubu amino asitlerden Lys’nin SAP aktivitesi üzerine etkisini araştırmak amacıyla, $t_e=0$ st ve $t_e=18$ st ekleme zamanlarında üretim ortamına $C_{Lys}=0, 2.5, 5.0, 7.5, 10, 15$ mM derişimlerinde Lys eklenerek proses süresince ($t=70$ st) incelenen Lys derişiminin mikroorganizma değışimine etkisi şekil 4.9 (a, b)’de ve SAP aktivitesine etkisi şekil 4.10 (a, b)’de verilmiştir.

R-B.licheniformis derişiminin kalma süresiyle değışimi incelendiğinde mikroorganizmaların yaklaşık $t=22$ st’ta üstel çoğalma fazını tamamlayıp, durgunluk fazına geçtiğı belirlenmiş, maksimum hücre derişimine ise $t=43$ st’ta $t_e=0$ st’ta ortama eklenen $C_{Lys}=7.5$ mM derişiminde ulaşılmıştır.

Şekil 4.10 a, b’da görüldüğü gibi SAP aktivitesi $t=18$ st’tan itibaren kalma süresiyle birlikte artmış, $t=65$ st’ta maksimum seviyeye ulaşmıştır. Maksimum aktiviteye $t=65$ st’ta $t_e=0$ anında $C_{Lys}=2.5$ mM derişiminin eklendiğı ortamda ulaşılmış, bu aktivite değerin referans ortamın aktivite değerinden 1.12 kat fazla olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.9. a. *R-Bacillus licheniformis* ile hücre derişiminin kalma süresi ile değişimine lizin derişiminin etkisi. $V=33 \text{ cm}^3$, $N=200 \text{ dk}^{-1}$, $C_{Lys}(\text{mM})$: $t_e=0 \text{ st}$: (+) ref, (♦) 2.5, (■) 5.0, (▲) 7.5, (x) 10, (*) 15,
b. *R-Bacillus licheniformis* ile hücre derişiminin kalma süresi ile değişimine lizin derişiminin etkisi. $V=33 \text{ cm}^3$, $N=200 \text{ dk}^{-1}$, $C_{Lys}(\text{mM})$: $t_e=18 \text{ st}$: (+) ref, (♦) 2.5, (■) 5.0, (▲) 7.5, (x) 10, (*) 15



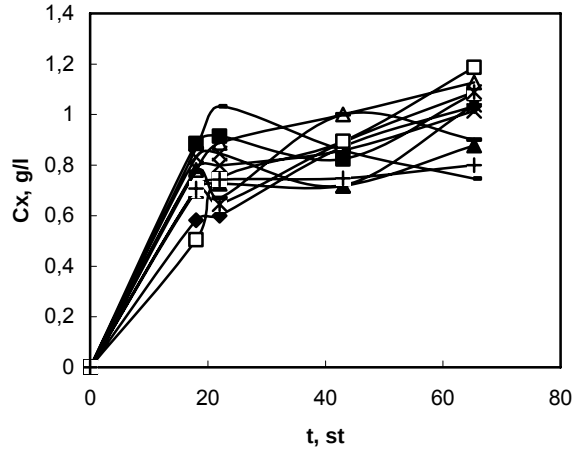
Şekil 4.10. a. *R-Bacillus licheniformis* ile SAP aktivitesinin kalma süresi ile değişimine lizin derişiminin etkisi. $V=33 \text{ cm}^3$, $N=200 \text{ dk}^{-1}$, $C_{Lys}(\text{mM})$: $t_e=0 \text{ st}$: (+) ref, (♦) 2.5, (■) 5.0, (▲) 7.5, (x) 10, (*) 15 ,
b. *R-Bacillus licheniformis* ile SAP aktivitesinin kalma süresi ile değişimine lizin derişiminin etkisi. $V=33 \text{ cm}^3$, $N=200 \text{ dk}^{-1}$, $C_{Lys}(\text{mM})$: $t_e=18 \text{ st}$: (+) ref, (♦) 2.5, (■) 5.0, (▲) 7.5, (x) 10, (*) 15

4.1.6 Metionin etkisi

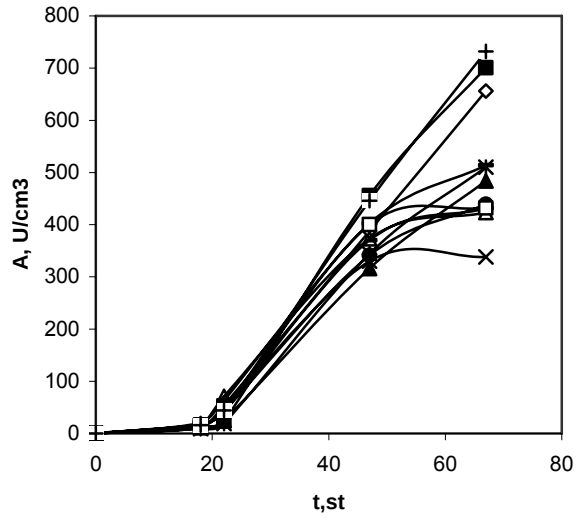
R-B.licheniformis ile SAP üretimine aspartik asit grubu amino asitlerden biri olan metioninin etkisi başlangıçta üretim ortamına $C_{Met}=0, 0.004, 0.04, 0.08, 0.6, 1.5, 2.5, 5.0, 7.5, 10, 15$ mM derişimlerinde Met eklenerek incelenmiş, proses süresince ($t=65$ st) mikroorganizma derişiminin kalma süresiyle değişimi şekil 4.11’de, SAP aktivitesinin değişimi ise şekil 4.12 ’de verilmiştir. Yüksek derişimlerde Met’nin SAP üretimini inhibe ettiği bilindiği için daha düşük derişimlerdeki Met’nin SAP aktivitesi üzerine etkisi araştırılmıştır.

Şekil 4.11’de gösterildiği gibi biyoproses ortamında Met derişiminin azalmasıyla mikroorganizma derişimlerinde artış görölmektedir. Prosesin üstel çoğalma fazında mikroorganizma derişimleri $t=22$ st’a kadar hızla çoğalmış, $t=22$ st’tan sonra durgunluk fazına ulaşmıştır.

Şekil 4.12’de ise Met’nin SAP aktivitesine etkisi verilmiştir. Biyodönüşüm ortamlarında Met derişimi arttıkça aktivitede azalma görölmektedir. Proses süresince Met içeren proseslerde Met’nin SAP üretimini inhibe ettiği, en fazla inhibisyonun $C_{Met}=0.6$ mM Met içeren proseste gerçekteştii gözlenmiştir.



Şekil 4.11. *R-Bacillus licheniformis* ile hücre derişiminin kalma süresi ile değişimine metionin derişiminin etkisi. $V=33 \text{ cm}^3$, $N=200 \text{ dk}^{-1}$, $C_{\text{Met}}(\text{mM})$: $t_e=0$ st: (+) ref, (◇) 0.004, (■) 0.04, (▲) 0.08, (x) 1.5, (*) 2.5 (Δ) 5.0, (-) 7.5, (⌒) 10, 15, (□)



Şekil 4.12. *R-Bacillus licheniformis* ile SAP aktivitesinin kalma süresi ile değişimine metionin derişiminin etkisi. $V=33 \text{ cm}^3$, $N=200 \text{ dk}^{-1}$, $C_{\text{Met}}(\text{mM})$: $t_e=0$ st: (+) ref, (◇) 0.004, (■) 0.04, (▲) 0.08, (x) 1.5, (*) 2.5 (Δ) 5.0, (-) 7.5, (⌒) 10, 15 (□)

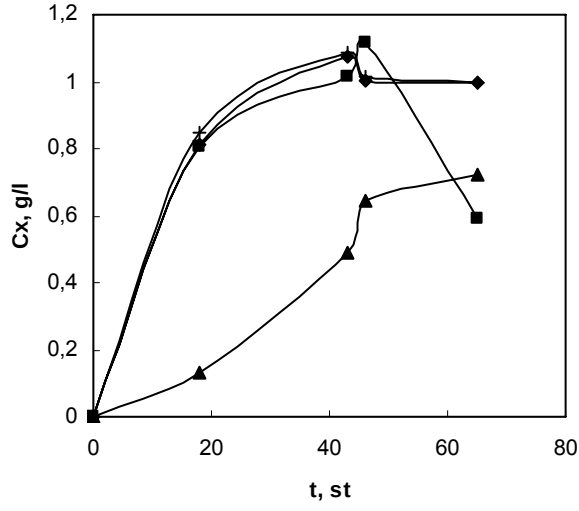
4.2 *R-B. subtilis* ile SAP Üretimine Aspartik Asit Grubu Amino Asitlerin Etkisi

4.2.1 Aspartik asit etkisi

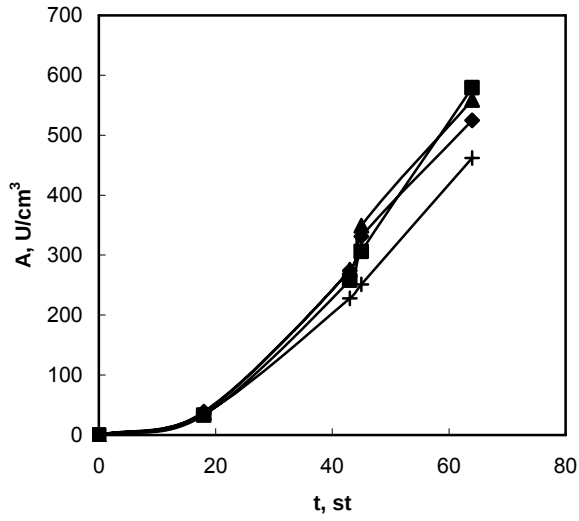
pHV1431::*subC* taşıyan *r-Bacillus subtilis* ile SAP aktivitesi üzerine aspartik asit grubu amino asitlerden Asp'in etkisini araştırmak amacıyla, $t_e=0$ anında üretim ortamına $C_{Asp}=0, 2.5, 5.0, 7.5$ mM derişimlerinde eklenerek, Asp derişiminin mikroorganizma derişimine etkisi şekil 4.13 ve SAP aktivitesine etkisi şekil 4.14'de gösterilmiştir.

R-B.subtilis derişiminin kalma süresiyle değişimi incelendiğinde mikroorganizmanın yaklaşık $t=43$ st'ta üstel çoğalma fazına ulaştığı, maksimum hücre derişimine $C_{Asp}=5.0$ mM derişiminde ulaşıldığı gözlenmiştir.

Şekil 4.14.'de görüldüğü gibi SAP aktivitesi $t=18$ st'tan itibaren kalma süresiyle birlikte artmış, maksimum aktivite değerine $t=65$ st'ta $C_{Asp}=5.0$ mM olduğu derişimde ulaşılmış, bu aktivite değerinin amino asit eklenmeyen referans ortam aktivite değerinden 1.25 kat fazla olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.13. *R-Bacillus subtilis* ile hücre derişiminin kalma süresi ile değişimine aspartik asit derişiminin etkisi. $V=33 \text{ cm}^3$, $N=200 \text{ dk}^{-1}$, $C_{Asp}(\text{mM})$: $t_e=0$ st (+) ref, (♦) 2.5; (■) 5.0; (▲) 7.5



Şekil 4.14. *R-Bacillus subtilis* ile SAP aktivitesinin kalma süresi ile değişimine aspartik asit derişiminin etkisi. $V=33 \text{ cm}^3$, $N=200 \text{ dk}^{-1}$, $C_{Asp}(\text{mM})$: $t_e=0$ st (+) ref, (♦) 2.5; (■) 5.0; (▲) 7.5

4.2.2 Asparajin etkisi

Aspartik asit grubu amino asitlerden Asn'nin SAP aktivitesi üzerine etkisini araştırmak amacıyla, $t_e=0$ anında üretim ortamına $C_{Asn}=0, 2.5, 5.0, 7.5$ mM derişimlerinde eklenerek proses süresince ($t=65$ st) incelenen Asn derişiminin mikroorganizma derişimine etkisi şekil 4.15 ve SAP aktivitesine etkisi şekil 4.16'da gösterilmiştir.

pHV1431::*subC* taşıyan *r-B.subtilis* derişiminin kalma süresiyle değişimi incelendiğinde mikroorganizmanın yaklaşık $t=43$ st'tan itibaren üstel çoğalma fazına ulaşıp durgunluk fazına geçtiği gözlenmiştir. Maksimum hücre derişimine $C_{Asn}=5.0$ mM olduğu ortamda ulaşılmıştır.

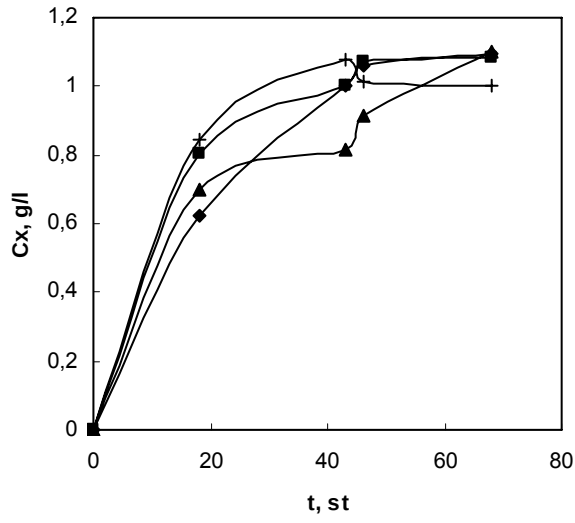
Şekil 4.16'da görüldüğü gibi SAP aktivitesi $t=18$ st'tan itibaren kalma süresiyle birlikte artmış, maksimum aktiviteye $t=65$ st'ta $C_{Asn}=5.0$ mM derişiminde ulaşılmış, bu aktivite değerinin referans ortamın aktivite değerinden 1.28 kat fazla olduğu gözlenmiştir.

4.2.3 Treonin etkisi

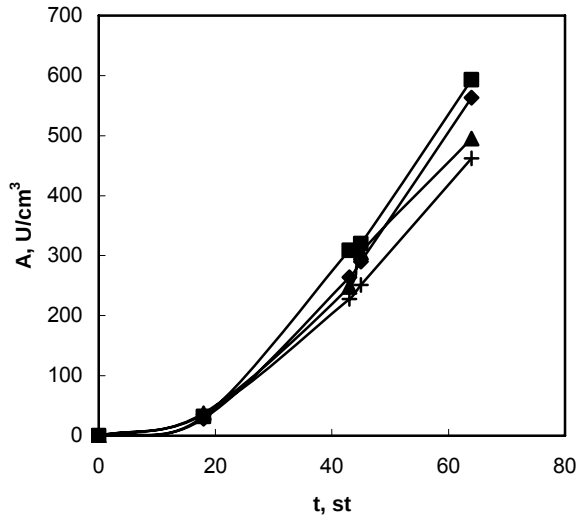
Aspartik asit grubu amino asitlerden Thr'nin pHV1431::*subC* taşıyan *r-B.subtilis*'te SAP üretimine etkisini araştırmak amacıyla, $t_e=0$ anında üretim ortamına $C_{Thr}=0, 2.5, 5.0, 7.5, 10$ mM derişimlerinde Thr eklenerek yapılan deneylerde hücre derişiminin proses süresince değişimi şekil 4.17, SAP aktivitesinin değişimi ise şekil 4.18'de verilmiştir.

R-B. subtilis ile incelenen Thr derişimlerinde mikroorganizma derişimi kalma süresiyle artmış, $t=18$ st'ta üstel çoğalma fazına ulaşmıştır. Maksimum hücre derişimine $C_{Thr}=2.5$ mM eklenen proseste ulaşılmıştır.

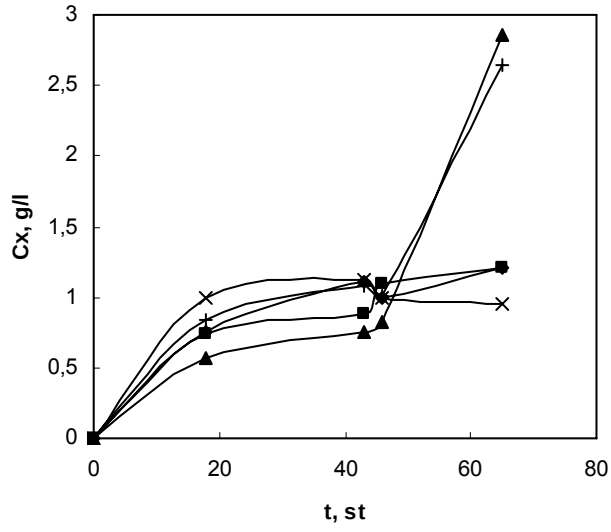
Şekil 4.18'de ise Thr'nin SAP aktivitesine etkisi görülmektedir. Proses süresince aktivite $t=18$ st'tan itibaren artmış, maksimum aktiviteye $t=65$ st'ta $C_{Thr}=7.5$ mM



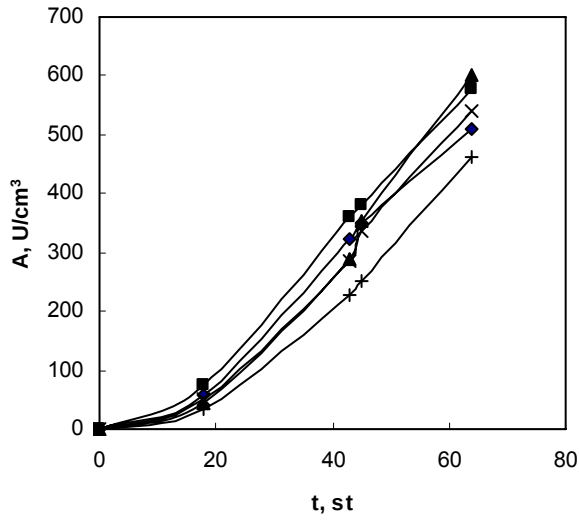
Şekil 4.15. *R-Bacillus subtilis* ile hücre derişiminin kalma süresi ile değişimine asparajın derişiminin etkisi. $V=33 \text{ cm}^3$, $N=200 \text{ dk}^{-1}$, $C_{\text{Asn}}(\text{mM})$: $t_e=0$ st (+) ref, (♦) 2.5; (■) 5.0; (▲) 7.5



Şekil 4.16. *R-Bacillus subtilis* ile SAP aktivitesinin kalma süresi ile değişimine asparajın derişiminin etkisi. $V=33 \text{ cm}^3$, $N=200 \text{ dk}^{-1}$, $C_{\text{Asn}}(\text{mM})$: $t_e=0$ st (+) ref, (♦) 2.5; (■) 5.0; (▲) 7.5



Şekil 4.17. *R-Bacillus subtilis* ile hücre derişiminin kalma süresi ile değişimine treonin derişiminin etkisi. $V=33 \text{ cm}^3$, $N=200 \text{ dk}^{-1}$, $C_{\text{Thr}}(\text{mM})$: $t_e=0 \text{ st}$ (+) ref, (◆) 2.5; (■) 5.0; (▲) 7.5, (x) 10



Şekil 4.18. *R-Bacillus subtilis* ile SAP aktivitesinin kalma süresi ile değişimine treonin derişiminin etkisi. $V=33 \text{ cm}^3$, $N=200 \text{ dk}^{-1}$, $C_{\text{Thr}} (\text{mM})$: $t_e=0 \text{ st}$ (+) ref, (◆) 2.5; (■) 5.0; (▲) 7.5, (x) 10

derişiminde Thr eklenen proste ulaşılmış, elde edilen bu aktivite değerinin amino asit eklenmeyen referans ortamın aktivite değerinden yaklaşık 1.30 kat fazla olduğu gözlenmiştir. Thr eklenen tüm proseslerde SAP aktivitesinin Thr eklenmeyen referans ortamın aktivite değerinden fazla olduğu belirlenmiştir.

4.2.4 İzölözün etkisi

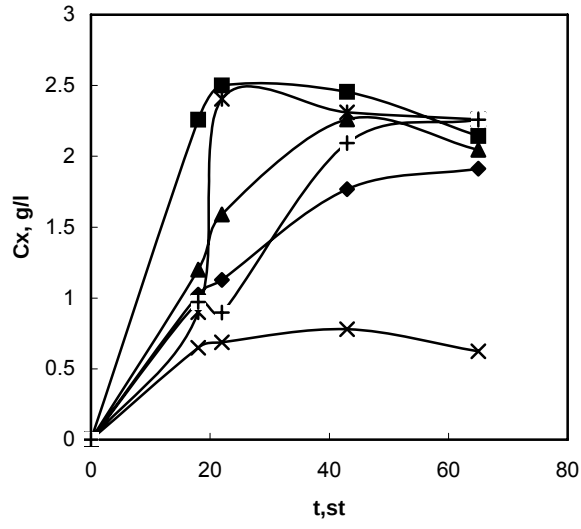
Aspartik asit grubu amino asitlerden Ile'nin *r-B. subtilis* ile SAP üretimine etkisini araştırmak amacıyla $t_e=0$ anında üretim ortamına $C_{Ile}=5.0, 7.5, 10, 15$ mM derişimlerde Ile eklenerek yapılan deneylerde proses süresince ($t=65$ st) mikroorganizma derişiminin kalma süresiyle değişimi şekil 4.19'da, SAP aktivitesinin değişimi ise şekil 4.20'de verilmiştir.

Şekil 4.19'da gösterildiği gibi biyoproses ortamında *r-B. subtilis* ile hücre derişiminin kalma süresiyle değişimi incelendiğinde mikroorganizmanın yaklaşık $t=18$ st'tan itibaren üstel çoğalma fazına ulaşıp durgunluk fazına geçtiği, maksimum hücre derişimine ise $C_{Ile}=7.5$ mM olan ortamda ulaşıldığı gözlenmiştir.

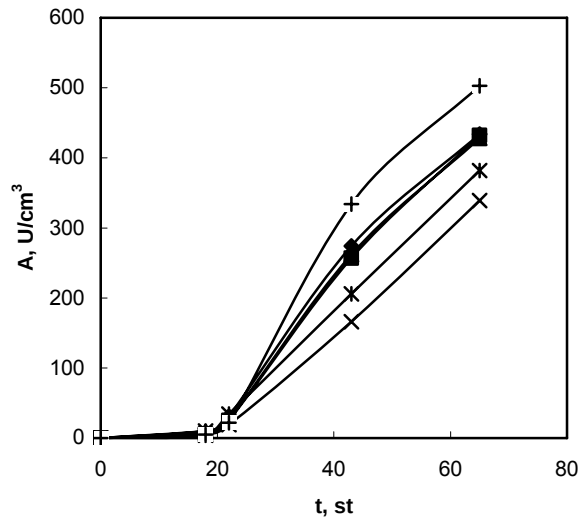
Şekil 4.20'de olduğu gibi proses süresince SAP aktivitesi kalma süresiyle $t=22$ st'tan itibaren artmaya başlamış, ancak Ile eklenen bütün biyoproses ortamlarında aktivitenin hiç Ile eklenmeyen referans ortam aktivitesinden düşük olduğu, SAP üretimini inhibe ettiği gözlenmiştir.

4.2.5 Lizin etkisi

R-B.subtilis ile SAP üretimine Lys'nin etkisini araştırmak amacıyla $t_e=0$ ekleme anında biyodönüşüm ortamına $C_{Lys}= 0, 2.5, 5.0, 7.5$ mM derişimlerde Lys eklenmiş, proses süresince ($t=65$) Lys derişiminin mikroorganizma derişiminin kalma süresiyle değişimine etkisi şekil 4.21, SAP aktivitesine etkisi ise şekil 4.22'de verilmiştir.



Şekil 4.19. R-*Bacillus subtilis* ile hücre derişiminin kalma süresi ile değişimine izolözin derişiminin etkisi. $V=33 \text{ cm}^3$, $N=200 \text{ dk}^{-1}$, $C_{IIe}(\text{mM})$: $t_e=0 \text{ st}$ (+) ref, (♦) 5.0; (■) 7.5; (▲) 10, (×) 15, (*) 20



Şekil 4.20. R-*Bacillus subtilis* ile SAP aktivitesinin kalma süresi ile değişimine izolözin derişiminin etkisi. $V=33 \text{ cm}^3$, $N=200 \text{ dk}^{-1}$, $C_{IIe}(\text{mM})$: $t_e=0 \text{ st}$ (+) ref, (♦) 5.0; (■) 7.5; (▲) 10, (×) 15, (*) 20

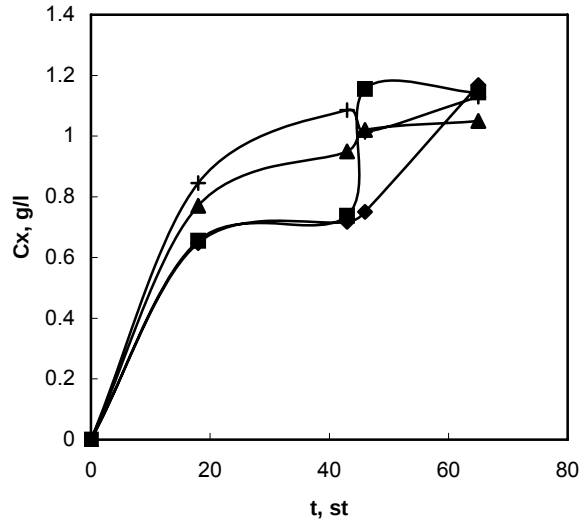
Mikroorganizma derişiminin kalma süresiyle değişimi incelendiğinde Lys eklenen üretim ortamlarında mikroorganizmaların yaklaşık $t=18$ st'ta üstel çoğalma fazını tamamlayıp durgunluk fazına geçtiği belirlenmiş, maksimum hücre derişimine $C_{Lys}=5$ mM eklenen proseste ulaşıldığı belirlenmiştir.

şekil 4.22'de görüldüğü gibi SAP aktivitesi $t=18$ st'tan itibaren kalma süresiyle birlikte artmış, maksimum aktiviteye $t=65$ st'ta $C_{Lys}=2.5$ mM ulaşılmış, bu değerin amino asit eklenmeyen referans ortamın aktivite değerinden 1.67 kat fazla olduğu gözlenmiştir.

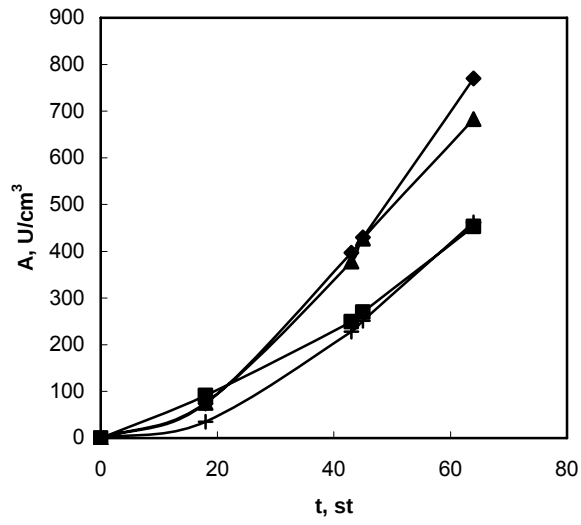
4.2.6 Metionin etkisi

Aspartik asit grubu amino asitlerden Met'nin *r-B. subtilis* ile SAP üretimine etkisini araştırmak amacıyla $t_e=0$ anında üretim ortamına $C_{Met}=0.004, 0.04, 0.6, 1.5, 2.5$ mM derişimlerinde Met eklenerek yapılan deneylerde proses süresince ($t=65$ st) mikroorganizma derişiminin kalma süresiyle değişimi şekil 4.23'de, SAP aktivitesinin değişimi ise şekil 4.24'de verilmiştir.

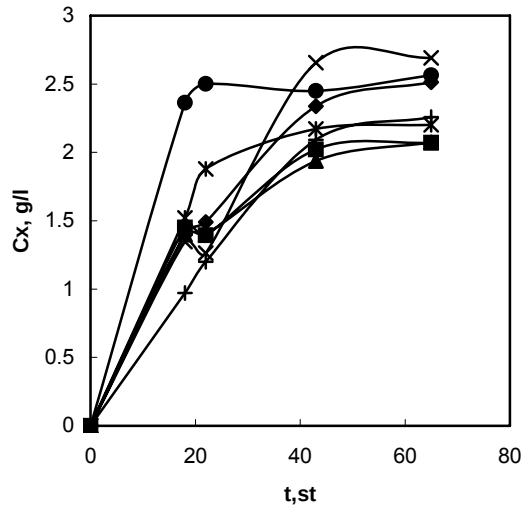
r-B. subtilis ile incelenen Met derişimlerinde mikroorganizma derişimi kalma süresiyle artmış, $t=18$ st'ta üstel çoğalma fazına ulaşmıştır. Maksimum hücre derişimine $C_{Met}=0.6$ mM eklenen proseste ulaşılmış, ancak hücreler durgunluk fazında topaklanma oluşturduğundan derişimlerde düşme oluşmuş gibi gözükmetedir. şekil 4.24'de görüldüğü gibi Met'nin SAP aktivitesine etkisi incelenmiş, proses süresince aktivite $t=18$ st'tan itibaren artmış; maksimum aktiviteye $t=65$ st'ta $C_{Met}=0.004$ mM Met eklenen proseste ulaşılmış, bu aktivite değerinin amino asit eklenmeyen referans ortamın aktivite değerinden 1.41 kat fazla olduğu bulunmuştur.



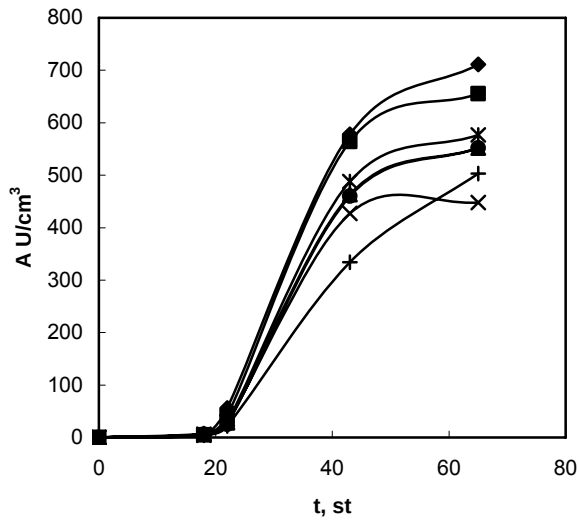
Şekil 4.21. *R-Bacillus subtilis* ile hücre derişiminin kalma süresi ile değişimine lizin derişiminin etkisi. $V=33 \text{ cm}^3$, $N=200 \text{ dk}^{-1}$, $C_{\text{Lys}}(\text{mM})$: $t_e=0 \text{ st}$ (+) ref, (♦) 2.5, (■) 5.0, (▲) 7.5



Şekil 4.22. *R-Bacillus subtilis* ile SAP aktivitesinin kalma süresi ile değişimine lizin derişiminin etkisi. $V=33 \text{ cm}^3$, $N=200 \text{ dk}^{-1}$, $C_{\text{Lys}}(\text{mM})$: $t_e=0 \text{ st}$ (+) ref, (♦) 2.5, (■) 5.0, 7.5 (▲)



Şekil 4.23. *R-Bacillus subtilis* ile hücre derişiminin kalma süresi ile değişimine metionin derişiminin etkisi. $V=33 \text{ cm}^3$, $N=200 \text{ dk}^{-1}$, $C_{\text{Met}}(\text{mM})$: $t_e=0$ st (+) ref, (♦) 0.004, (■) 0.04, (▲) 0.08, (×) 0.6, (*) 1.5, (●) 2.5.



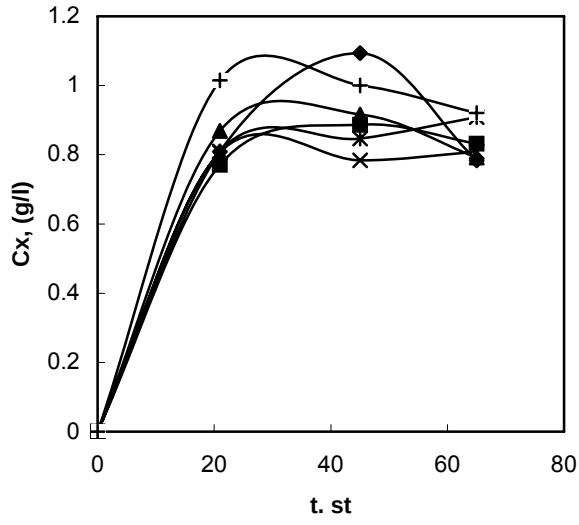
Şekil 4.24. *R-Bacillus subtilis* ile SAP aktivitesinin kalma süresi ile değişimine metionin derişiminin etkisi. $V=33 \text{ cm}^3$, $N=200 \text{ dk}^{-1}$, $C_{\text{Met}}(\text{mM})$: $t_e=0$ st (+) ref, (♦) 0.004, (■) 0.04, (▲) 0.08, (×) 0.6, (*) 1.5, (●) 2.5.

4.3 *R-Bacillus sphaericus* ve *R-Bacillus amyloliquefaciens* ile SAP Üretimine Aspartik Asit Grubu Amino Asitlerin Etkisi

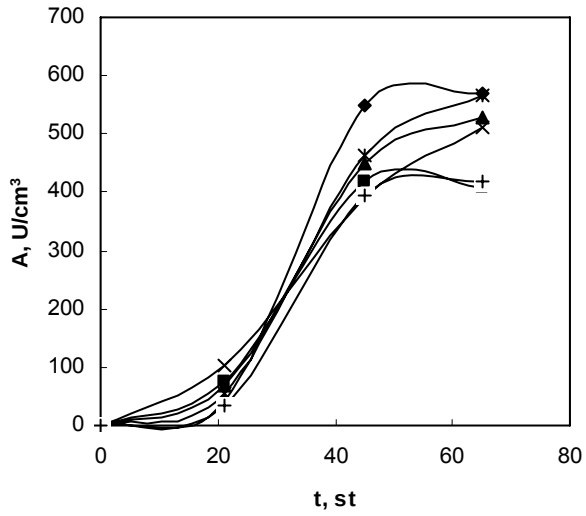
Aspartik asit grubu amino asitlerin *r-B.sphaericus* ve *r-B.amyloliquafaciens* ile SAP üretimine etkisini araştırmak amacıyla $t_e=0$ ekleme anında ve $C_{AA}=2.5$ mM amino asit derişiminde üretim ortamlarına Asp, Asn, Thr, Ile, Lys eklenerek yapılan deneylerde proses süresince ($t=65$ st) mikroorganizma derişiminin kalma süresiyle değişimi – sırasıyla- Şekil 4.25 ve 4.27 ‘de, SAP aktivitesine değişimi ise şekil 4.26 ve 4.28’de verilmiştir.

r-B.sphaericus ve *r-B.amyloliquafaciens* ile incelenen aspartik asit grubu amino asitlerin eklendiği ortamlarda mikroorganizma derişimi kalma süresiyle artmış, maksimum hücre derişimine $t=45$ st’ta ulaşılmıştır. En yüksek hücre derişimleri *r-B.sphaericus* ile Asp eklenen proste $C_X=1.1$ g/l olarak, *r-B.amyloliquafaciens* ile Thr eklenen proste $C_X=1.3$ g/l olarak bulunmuştur. Proses süresince hücrelerde topaklanma görüldüğünden eğrilerde sapma gözlenmiştir.

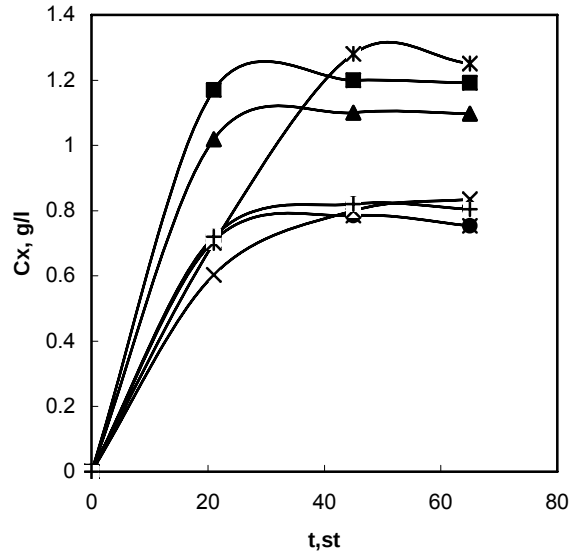
Şekil 4.26’da *r-B.sphaericus* ile aspartik asit grubu amino asitlerin SAP aktivitesine etkisi görülmektedir. Proses süresince aktivite kalma süresiyle artmış; Asn eklenen ortam hariç Asp, Asn, Thr, Ile, Lys eklenen proseslerde aktivite değeri referans ortam aktivite değerinden sırasıyla 1.35, 1.26, 1.22, 1.35 kat fazla bulunmuştur. Şekil 4.28’de ise *r-B.amyloliquafaciens* ile aspartik asit grubu amino asitlerin SAP aktivitesine etkisi görülmektedir. Ile, Lys, Thr eklenen eklenen proseslerde üretimin inhibe olduğu, aktivite değerlerinin referans ortam aktivite değerinden düşük olduğu bulunmuştur. Asp ve Asn eklenen proseslerde ise aktivite değerinin referans ortam aktivite değerinden sırasıyla 1.35 ve 1.25 kat fazla olduğu gözlenmiştir.



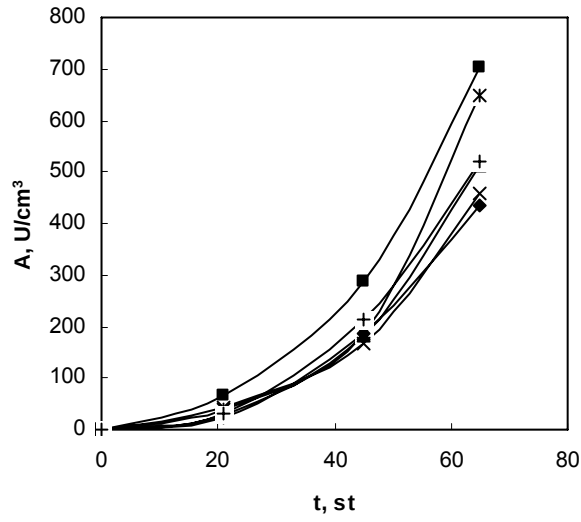
Şekil 4.25. *R-Bacillus sphaericus* ile hücre derişiminin kalma süresi ile değişimine aspartik asit grubu amino asitlerin etkisi. $V=33 \text{ cm}^3$, $N=200 \text{ dk}^{-1}$, $C_{AA}(2.5 \text{ mM})$: $t_e=0 \text{ st}$ (+) ref, (♦) Asp, (■) Asn, (▲) Ile, (x) Lys, (*) Thr.



Şekil 4.26. *R-Bacillus sphaericus* ile SAP aktivitesinin kalma süresi ile değişimine aspartik asit grubu amino asitlerin etkisi. $V=33 \text{ cm}^3$, $N=200 \text{ dk}^{-1}$, $C_{AA}(2.5 \text{ mM})$: $t_e=0 \text{ st}$ (+) ref, (♦) Asp, (■) Asn, (▲) Ile, (x) Lys, (*) Thr.



Şekil 4.27. *R-Bacillus amyloliquafaciens* ile hücre derişiminin kalma süresi ile değişimine aspartik asit grubu amino asitlerin etkisi. $V=33 \text{ cm}^3$, $N=200 \text{ dk}^{-1}$, $C_{AA}(2.5 \text{ mM})$: $t_e=0 \text{ st}$ (+) ref, (●) Asp, (x) Asn, (▲) Ile, (■) Lys, (*) Thr



Şekil 4.28. *R-Bacillus amyloliquafaciens* ile SAP aktivitesinin kalma süresi ile değişimine aspartik asit grubu amino asitlerin etkisi. $V=33 \text{ cm}^3$, $N=200 \text{ dk}^{-1}$, $C_{AA}(2.5 \text{ mM})$: $t_e=0 \text{ st}$ (+) ref, (■) Asp; (*) Asn; (▲) Ile, (◆) Lys, (x) Thr

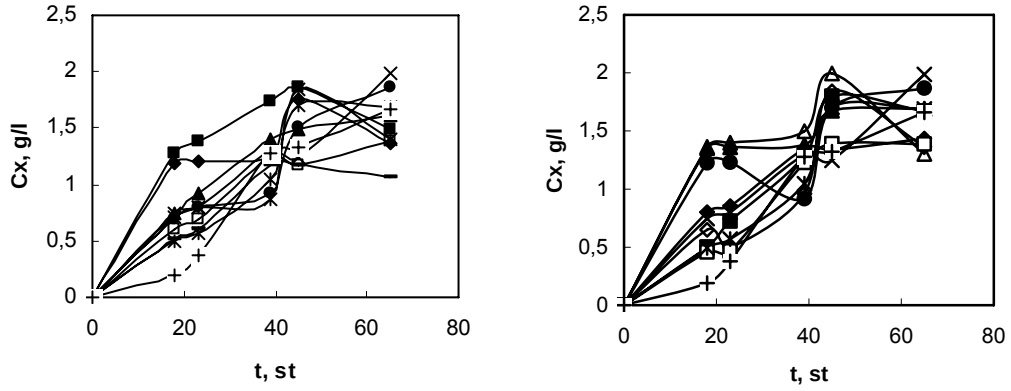
4.4 *R-Bacillus licheniformis* ile Aspartik Asit Grubu Amino Asit Destekli Proseslerde Ürün ve Yan Ürün Dağılımları

R-B.licheniformis ile aspartik asit grubu amino asitlerin farklı ekleme zamanlarında SAP üretimine etkisinin incelendiği deneyler sonunda hem sonuçların tekrarlanabilirliğini göstermek hem de optimum sayıda analiz yapmak amacıyla her amino asit için belirlenen en uygun ekleme zamanında ve belirlenen üç derişimde bir set deney yapılmıştır.

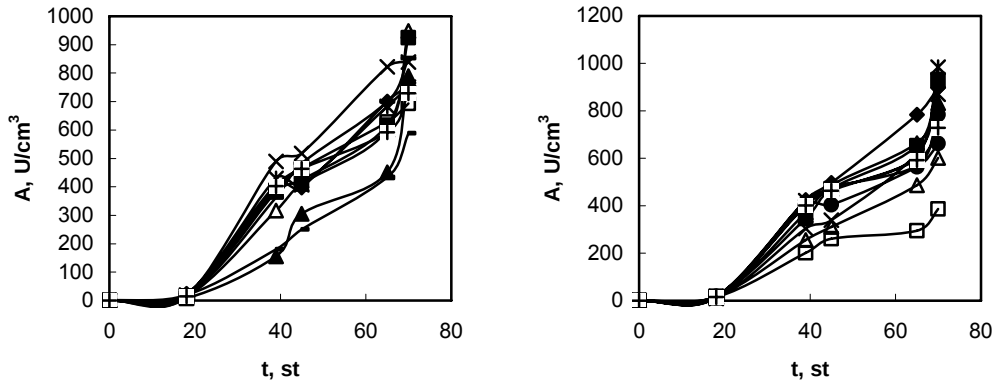
Bu deney süresince üretim ortamına eklenen glukoz derişiminin kalma süresi ile değişimi incelenmiş; genel olarak tüm ortamlarda glukoz tüketim hızının $t=0-18$ st'ta yüksek, SAP üretim fazında ($t=18-65$ st) düşük olduğu bulunmuştur. Şekil 4.31 (a, b)'de görüldüğü gibi aspartik asit grubu amino asitlerin eklendiği üretim ortamlarındaki glukozun proses sonunda %93-97'si hatta tamamının tüketildiği, optimum derişimdeki amino asit içeren proseslerde ise glukozun tamamının tüketildiği bulunmuştur.

Şekil 4.29 a, b'de gösterildiği gibi aspartik asit grubu amino asitlerin eklendiği üretim ortamlarında mikroorganizma derişimi $t=20$ st'tan sonra genel olarak üstel çoğalma fazını tamamlayıp durgunluk fazına geçmiştir. Maksimum hücre derişimine $t=45$ st'ta $C_{Met} = 0.04$ mM olan ortamda $C_X=1.994$ g/l olarak ulaşılmıştır. Proses süresince hücrelerde topaklanma olduğundan eğrilerde sapma gözlenmiştir.

Şekil 4.30 a, b'de görüldüğü gibi SAP aktivitesi glukozun kısıtlayıcı seviyelere inmesiyle $t=18$ st'tan itibaren artmaya başlamış, en yüksek aktivite $C_{A_{sh}}=2.5$ mM derişiminde Asp eklenen proste $t=65$ st'ta $A=1006$ U/cm³ olarak bulunmuştur. Referans prosese göre optimum ekleme anları, derişimler ve artış miktarı Çizelge 5.1'de verilmiştir. Bu deneyde bulunan sonuçların daha önce yapılan deneylerle aynı olması sonuçların tekrarlanabilirliğini de göstermiştir.



Şekil 4.29. a. *R-Bacillus licheniformis* ile hücre derişiminin kalma süresi ile değişimine aspartik asit (♦) grubu amino asit derişimlerinin etkisi (Asn, Lys, Thr). $V=33 \text{ cm}^3$, $N=200 \text{ dk}^{-1}$, $t_e=0 \text{ st}$: (+) ref, Asn (mM); 2.5, (■) 5.0, (▲) 7.5, Lys (mM); (x) 2.5, (*) 5.0 (●) 7.5, Thr (mM); (□) 5.0, (-) 7.5, (◇)10, b. *R-Bacillus licheniformis* ile hücre derişiminin kalma süresi ile değişimine aspartik asit grubu amino asit derişimlerinin etkisi (Ile, Asp, Met). $V=33 \text{ cm}^3$, $N=200 \text{ dk}^{-1}$, $t_e=0 \text{ st}$: Ile (mM); (♦) 10 (■) 15, (▲) 20, Asp (mM); (x) 2.5, (*) 5.0 (●) 7.5 mM, Met (mM) (◇)0.004, (Δ) 0.04, (□) 0.4

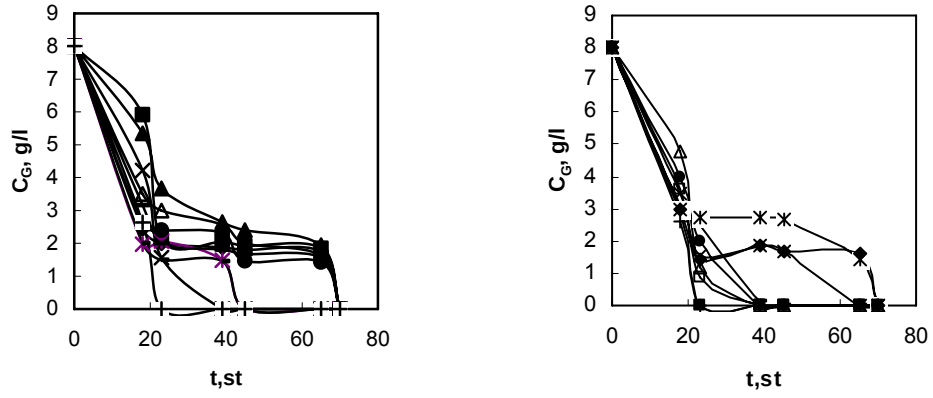


Şekil 4.30. a. *R-Bacillus licheniformis* ile SAP aktivitesinin kalma süresi ile değişimine aspartik asit grubu amino asit derişimlerinin etkisi (Asn, Lys, Thr). $V=33 \text{ cm}^3$, $N=200 \text{ dk}^{-1}$, $t_e=0 \text{ st}$: (+) ref, Asn (mM); (Δ) 2.5, (■) 5.0, (▲) 7.5, Lys (mM); (x) 2.5, (*) 5.0 (♦) 7.5, Thr (mM); (□) 5.0, (-) 7.5, (◇)10, b. *R-Bacillus licheniformis* ile SAP aktivitesinin kalma süresi ile değişimine aspartik asit grubu amino asit derişimlerinin etkisi (Ile, Asp, Met). $V=33 \text{ cm}^3$, $N=200 \text{ dk}^{-1}$, $t_e=0 \text{ st}$: Ile (mM); (♦) 10 (■) 15, (▲) 20, Asp (mM); (x) 2.5, (*) 5.0 (●) 7.5 mM, Met (mM) (●)0.004, (Δ) 0.04, (□)0.4

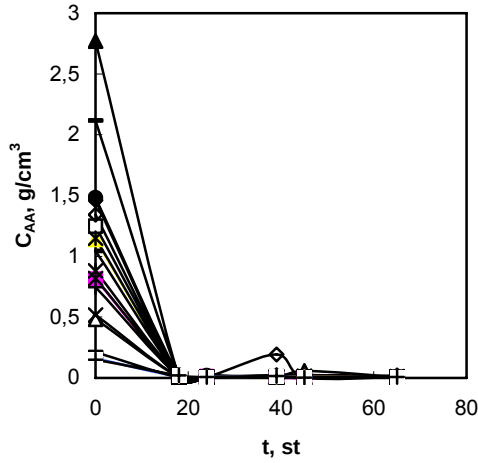
R-B.licheniformis ile aspartik asit grubu amino asitlerin SAP üretimine etkisinin incelendiği deneyde üretim ortamına başlangıçta eklenen amino asit derişimlerinin proses süresince kalma süresiyle değişimleri Şekil 4.32’de gösterilmiştir. İncelenen derişim aralıklarında prosesin $t=20$ st’ine kadar tüm proseslerde, üretim ortamına eklenen amino asitler hızla tüketilirken, tüketim hızı tüm ortamlarda referans ortamdaki toplam amino asit tüketim hızından fazladır.

R-B.licheniformis ile Asp derişiminin SAP üretimine etkisinin incelendiği deney de proses süresince amino asit derişimleri Çizelge 4.1’de verilmiştir. Çizelge 4.1’e göre proses süresince $C_{Asp}=2.5$ mM Asp eklenen proseste Gln, Ser, Gly, Arg, Thr, Ala, Tyr, Ile görülmemiş, $C_{Asp}=5.0$ mM Asp eklenen proseste Gln, Asn, Ser, Gly, Tyr, $C_{Asp}=7.5$ mM Asp eklenen proseste ise Gln, Asn, Ala, Tyr, Ile proses süresince ortamda gözlenmemiştir. Proses süresince Glu $C_{Asp}=2.5$ ve 5.0 mM içeren proseste $0.0003-0.0004$ kg/m³ derişimde gözlenirken, $C_{Asp}=7.5$ mM Asp içeren proseste ve referans ortamda gözlenmemiştir. Ala ise referans ortamda ve $C_{Asp}=2.5$ ve 7.5 mM derişimlerinde gözlenirken, $C_{Asp}=5.0$ mM derişiminde gözlenmemiştir. Pro ise $C_{Asp}=7.5$ mM ortamda $t=18$ st’ta $0.001-0.01$ kg/m³ miktarda gözlenmiştir. Lys derişimi ise maksimum aktivitenin gözlendiği 7.5 mM Asp içeren proseste referans ortama göre düşük olarak belirlenmiştir. Proses süresince toplam amino asit derişimleri referans prosese göre düşük gözlenmiştir.

Çizelge 4.2’de *r-B.licheniformis* ile Asn eklenen proseste üretim ortamında ölçülen amino asit derişimleri verilmiştir. Buna göre $C_{Asn}=2.5$ mM eklenen proseste Gln ve Tyr; $C_{Asn}=5.0$ mM eklenen proseste Ser, Thr, Tyr, Leu ve Trp; $C_{Asn}=7.5$ mM eklenen proseste ise Glu, Ser, Thr, Ala, Tyr, Ile ve Leu gözlenmemiştir. Buna göre $C_{Asn}=2.5$ mM eklenen proseste Gln ve Tyr; $C_{Asn}=5.0$ mM eklenen proseste Ser, Thr, Tyr, Leu ve Trp; $C_{Asn}=7.5$ mM eklenen proseste ise Glu, Ser, Thr, Ala, Tyr, Ile ve Leu gözlenmemiştir. Ile referans ortamda hiç gözlenmezken, $C_{Asn}=2.5$ mM eklenen proses te gözlenmiştir.



Şekil 4.31 a. *R-Bacillus licheniformis* ile başlangıç glukoz derişiminin kalma süresi ile değişimine üretim ortamına eklenen aspartik asit grubu amino asitlerin etkisi (Asn, Lys, Thr). $V=33 \text{ cm}^3$, $N=200 \text{ dk}^{-1}$: $t_e=0 \text{ st}$: (+) ref, Asn (mM) (♦) 2.5, (■) 5.0, (▲) 7.5, Lys (mM) (x) 2.5, (*) 5.0 (□) 7.5, Thr (mM) (Δ) 5.0, (-) 7.5, (◇) 10 ,
b. *R-Bacillus licheniformis* ile başlangıç glukoz derişiminin kalma süresi ile değişimine üretim ortamına eklenen aspartik asit grubu amino asitlerin etkisi (Ile, Asp, Met). $V=33 \text{ cm}^3$, $N=200 \text{ dk}^{-1}$: $t_e=0 \text{ st}$: Ile (mM); (♦) 10 (˘) 15, (▲) 20, Asp (mM); (x) 2.5, (*) 5.0 (●) 7.5 mM, Met (mM) (●) 0.004, (Δ) 0.04, (□) 0.4



Şekil 4.32 *R-Bacillus licheniformis* ile üretim ortamına eklenen aspartik asit grubu amino asitlerin derişimlerinin kalma süresi ile değişimi. $V=33 \text{ cm}^3$, $N=200 \text{ dk}^{-1}$: $t_e=0 \text{ st}$: (+) ref, Asn (mM) (Δ) 2.5, (■) 5.0, (▲) 7.5, Lys (mM) (x) 2.5, (*) 5.0 (□) 7.5, Thr (mM) (+) 5.0, (-) 7.5, (◇) 10, Ile (mM); (♦) 10 (˘) 15, (▲) 20, Asp (mM); (x) 2.5, (*) 5.0 (●) 7.5 mM, Met (mM) (+) 0.004, (˘) 0.04, (♦) 0.4

Çizelge 4.1. R-*B.licheniformis* ile aspartik asit eklenen proste üretilen hücre dışı amino asit derişimlerinin kalma süresi ile değışimi

[illegible]

Çizelge 4.2. *R-B.licheniformis* ile asparajın eklenen proseste üretilen hücre dışı amino asit derişimlerinin kalma süresi ile değışimi

$C_{Asn}=2.5 \text{ mM}$						$C_{Asn}=5.0 \text{ mM}$					$C_{Asn}=7.5 \text{ mM}$				
	18	24	39	45	65	18	24	39	45	65	18	24	39	45	65
Asp	0,0003	0,0005	0,0004	0,0004	0,0000	0,0002	0,0007	0,0000	0,0002	0,0000	0,0003	0,0002	0,0000	0,0004	0,0000
Glu	0,0000	0,0004	0,0000	0,0000	0,0007	0,0000	0,0008	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Gln	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0008	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0011	0,0000	0,0000	0,0000
Asn	0,0000	0,0000	0,0007	0,0000	0,0006	0,0007	0,0007	0,0000	0,0000	0,0008	0,0000	0,0003	0,0000	0,0000	0,0007
Ser	0,0009	0,0000	0,0006	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Gly	0,0018	0,0000	0,0013	0,0000	0,0000	0,0000	0,0014	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0028	0,0000	0,0000	0,0000
His	0,0000	0,0000	0,0021	0,0000	0,0000	0,0016	0,0006	0,0000	0,0000	0,0000	0,0008	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Arg	0,0000	0,0000	0,0000	0,0012	0,0000	0,0000	0,0016	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0012	0,0000	0,0000	0,0000
Thr	0,0000	0,0000	0,0026	0,0011	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Ala	0,0000	0,0015	0,0018	0,0000	0,0000	0,0000	0,0016	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Pro	0,0004	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0012	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0012	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Tyr	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Val	0,0006	0,0029	0,0003	0,0016	0,0016	0,0006	0,0014	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0008	0,0000	0,0000	0,0020
Met	0,0003	0,0008	0,0007	0,0004	0,0018	0,0004	0,0005	0,0000	0,0002	0,0000	0,0026	0,0011	0,0000	0,0004	0,0000
Cys	0,0001	0,0004	0,0000	0,0028	0,0016	0,0001	0,0006	0,0000	0,0000	0,0005	0,0000	0,0006	0,0000	0,0051	0,0017
Ile	0,0000	0,0000	0,0013	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Leu	0,0000	0,0002	0,0000	0,0014	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Orn	0,0000	0,0000	0,0010	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0004	0,0000	0,0001	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Lys	0,0000	0,0000	0,0004	0,0003	0,0003	0,0001	0,0020	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0001	0,0000	0,0001	0,0002
Trp	0,0000	0,0000	0,0011	0,0482	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0004	0,0000
Phe	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0006	0,0000	0,0000	0,0006	0,0000	0,0005	0,0000	0,0000	0,0000

Maksimum aktivitenin belirlendiği 5.0 mM Asn içeren ortamda Ile, Thr ve Met derişimi referans ortama göre düşük olarak belirlenmiştir. Üç farklı derişimde Asn eklenen üç proseste toplam amino asit derişiminin ise SAP aktivitesinin maksimum olduğu $t=65$ st'ta referans ortamdaki toplam amino asit derişiminden fazla olduğu gözlenmiştir.

R-B.licheniformis ile üç farklı derişimde (5.0, 7.5, 10) Thr etkisinin SAP aktivitesine etkisinin incelendiği üretim ortamında hücre dışına aktarılan amino asitler de belirlenmiş ve derişimleri Çizelge 4.3'de verilmiştir. Buna göre $C_{Thr}=5.0$ mM içeren proseste hücre dışında Glu, Gln, Asn $C_{Thr}=7.5$ mM içeren proseste Glu, Gln, His, Ala $C_{Thr}=10$ mM derişimlerinde $0.0002-0.0009$ kg/m³ aralığında gözlenmiştir. Tyr derişimi referans ortamda hiç gözlenmezken her üç proseste de proses boyunca gözlenmiş ve derişim aralığı $0.0015-0.0039$ kg/m³ olarak belirlenmiştir. Thr derişimi ise referans ortamda sadece $t=39$ saatte 0.0011 kg/m³ olarak belirlenmiş, aktivitenin maksimum olduğu $C_{Thr}=7.5$ mM olan ortamda ise en yüksek derişimde gözlenmiştir.

Çizelge 4.4'de *r-B.licheniformis* tarafından Ile eklenen proseste üretilen hücre dışı amino asit derişimleri verilmiştir. Buna göre $C_{Ile}=10$ mM içeren proseste Glu, Gln, Ser, Ala, Leu, $C_{Ile}=15$ mM içeren proseste Ser, Tyr, Leu, Thr, $C_{Ile}=20$ mM içeren proseste Glu, Ala, Pro, Tyr, Leu proses boyunca gözlenmemiştir. Glu referans ortamda ve $C_{Ile}=10-20$ mM olan ortamlarda gözlenmezken, sadece $C_{Ile}=15$ mM maksimum aktivitenin gözlendiği ortamda $0.0004-0.0007$ kg/m³ olarak belirlenmiştir. Gln referans ortamda ve $C_{Ile}=10$ mM olan ortamda hiç gözlenmezken, $C_{Ile}=15-20$ mM olan ortamda sadece $t=18$ st'ta gözlenmiştir. Asn referans ortamda hiç gözlenmezken $C_{Ile}=10$ mM olan ortamda $0.0002-0.0011$ kg/m³ olarak değişmiş, $C_{Ile}=15-20$ mM derişiminde ise sadece $t=65$ st'ta gözlenmiştir. Ser referans ortamda 18-24 saatleri arasında gözlenirken $C_{Ile}=15-20$ mM olan derişimlerde hiç gözlenmemiş, sadece 20 mM derişiminde $t=24$ st'ta gözlenmiştir. Val derişimi referans prosese oranla maksimum aktivitenin ulaşıldığı $C_{Ile}=15$ mM eklenen proseste yüksek bulunmuş, tüm proseslerde $t=65$ st'ta ortamda gözlenmiş ve derişimi $0.0024-0.0016$ kg/m³ aralığında değişmiştir. Leu referans ortamda gözlenirken, her üç proseste de gözlenmemiştir. Ile ise referans ortamda hiç gözlenmezken, her üç proseste derişimi $0.0003-0.0009$ kg/m³ aralığında değişmiş ve

her üç proste $t=65$ st'ta gözlenmemiştir. Toplam amino asit derişimi ise $C_{Ile}=15-20$ mM derişimlerinde $t=65$ st'ta referans proste nazaran düşükken, $C_{Ile}=10$ mM'da daha yüksek olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.5'de üç farklı derişimde (2.5, 5.0, 7.5) Lys eklenen proste proses süresince amino asit derişimleri belirlenmiştir. Proses süresince $C_{Lys}=2.5$ mM olan ortamda Glu, Ser, Gly, Ala, Pro, Ile, $C_{Lys}=5.0$ mM olan ortamda Gln, Ile, $C_{Lys}=7.5$ mM olan ortamda Gln, Gly ortamda gözlenmemiştir. Asn referans ortamda proses süresince gözlenmezken, aktivite değerlerinin maksimum olduğu $t=65$ st'ta üç proste da belirlenmiştir. Gly derişimi referans ortamda sadece $t=24$ st'ta gözlenirken $C_{Asn}=2.5-7.5$ mM olan ortamlarda gözlenmemiştir. Ala ve Pro maksimum aktivitenin elde edildiği optimum derişim olan $C_{Lys}=2.5$ mM ortamda bulunmamaktadır. Referans ortamda Ala bulunmamasına rağmen Pro sadece 18 ve 24 saatlerde belirlenmiştir. Proses süresince referans ortamda gözlenmeyen Tyr, Lys eklenen her üç proste da bulunmuştur. Val derişimi $t=65$ st'ta referans ortamda görünmezken, her üç proste de $0.0012-0.0026$ kg/m³ olarak belirlenmiştir. Met ise maksimum aktivitenin elde edildiği 2.5 mM ortamda $t=65$ st'ta bulunmazken, referans ortam ve $C_{Lys}=5-7.5$ mM olan ortamlarda belirlenmiştir. *r-B.licheniformis* tarafından $C_{Met}=0.4$, 0.04, 0.0004 mM derişimlerde eklenen proste üretilen hücre dışı amino asit derişimleri Çizelge 4.6'da verilmiştir. Buna göre $C_{Met}=0.4$ mM içeren proste Thr, Tyr, Ile, $C_{Met}=0.04$ mM içeren proste Gln, Ser, Gly, Ile, Leu, Trp, $C_{Met}=0.004$ mM içeren proste ise Gln, Ser, Ala, Pro, Tyr, Ile, Leu gözlenmemiştir. Tüm proseslerde Glu $0.0003-0.0006$ kg/m³ arasında gözlenirken, referans ortamda hiç gözlenmemiştir. Diğer yandan Asn proses boyunca referans ortamda hücre dışında hiç gözlenmezken, üç proste $0.0004-0.0001$ kg/m³ derişiminde gözlenmiş, $C_{Met}=0.4$ ve $C_{Met}=0.04$ mM içeren proseslerde sadece $t=65$ st'ta gözlenmiştir. Derişimi maksimum aktivitenin görüldüğü 15 mM Ile içeren ortamda referans ortama göre düşük olarak belirlenmiştir. Lys Toplam amino asit derişimleri her üç proste da proses boyunca farklılıklar göstermiş, ancak bütün ortamların toplam amino asit derişiminin $t=65$ st'ta referans ortam toplam amino asit derişiminden düşük olduğu belirlenmiştir. Ile hem referans ortamda hem de her üç proste gözlenmemiştir.

Çizelge 4.3. R-*B.licheniformis* ile treonin eklenen proste üretilen hücre dışı amino asit derişimlerinin kalma süresi ile değişimi

[illegible]

Çizelge 4.4. R-*B.licheniformis* ile izolözin eklenen prosteite üretilen hücre dışı amino asit derişimlerinin kalma süresi ile değışimi

C _{Ile} =10 mM						C _{Ile} =15 mM					C _{Ile} =20mM				
	18	24	39	45	65	18	24	39	45	65	18	24	39	45	65
Asp	0,0000	0,0006	0,0000	0,0000	0,0009	0,0000	0,0007	0,0006	0,0005	0,0000	0,0000	0,0004	0,0003	0,0000	0,0007
Glu	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0004	0,0000	0,0000	0,0000	0,0007	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Gln	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0009	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0005	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Asn	0,0000	0,0008	0,0002	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0011	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0011
Ser	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0007	0,0000	0,0000	0,0000
Gly	0,0000	0,0008	0,0000	0,0000	0,0014	0,0003	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0011	0,0004	0,0000	0,0000	0,0000
His	0,0000	0,0007	0,0000	0,0000	0,0017	0,0003	0,0007	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0009	0,0000	0,0000	0,0000
Arg	0,0000	0,0007	0,0000	0,0000	0,0000	0,0005	0,0016	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0025	0,0013	0,0000	0,0000
Thr	0,0005	0,0000	0,0270	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0020	0,0000	0,0000	0,0000	0,0009	0,0000	0,0000
Ala	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0002	0,0016	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Pro	0,0000	0,0013	0,0012	0,0000	0,0000	0,0002	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Tyr	0,0000	0,0000	0,0039	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Val	0,0000	0,0019	0,0000	0,0000	0,0024	0,0000	0,0131	0,0017	0,0015	0,0016	0,0000	0,0021	0,0021	0,0000	0,0016
Met	0,0034	0,0002	0,0001	0,0000	0,0000	0,0000	0,0002	0,0002	0,0000	0,0000	0,0003	0,0002	0,0002	0,0000	0,0000
Cys	0,0004	0,0005	0,0017	0,0000	0,0136	0,0004	0,0008	0,0000	0,0000	0,0019	0,0000	0,0007	0,0000	0,0000	0,0019
Ile	0,0000	0,0004	0,0010	0,0000	0,0000	0,0005	0,0010	0,0009	0,0007	0,0000	0,0000	0,0008	0,0006	0,0003	0,0000
Leu	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Orn	0,0001	0,0007	0,0000	0,0000	0,0000	0,0014	0,0007	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0001	0,0000	0,0000	0,0000
Lys	0,0001	0,0020	0,0006	0,0000	0,0003	0,0011	0,0000	0,0003	0,0002	0,0001	0,0033	0,0000	0,0004	0,0001	0,0001
Trp	0,0001	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0214	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0023	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Phe	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0046	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

Çizelge 4.5 R-*B.licheniformis* ile lizin eklenen proste üretilen hücre dışı amino asit derişimlerinin kalma süresi ile değişimi

C _{Lys} =2.5 mM						C _{Lys} =5.0 mM					C _{Lys} =7.5 mM				
	18	24	39	45	65	18	24	39	45	65	18	24	39	45	65
Asp	0,0003	0,0004	0,0005	0,0004	0,0000	0,0003	0,0008	0,0004	0,0004	0,0000	0,0000	0,0005	0,0002	0,0001	0,0000
Glu	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0004	0,0000	0,0000	0,0007	0,0003	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Gln	0,0000	0,0012	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Asn	0,0000	0,0007	0,0000	0,0000	0,0010	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0005	0,0000	0,0005	0,0000	0,0000	0,0011
Ser	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0005	0,0000	0,0000	0,0000	0,0010	0,0007	0,0000	0,0000
Gly	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0017	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
His	0,0008	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0006	0,0018	0,0000	0,0000	0,0000	0,0010	0,0017	0,0000	0,0000	0,0000
Arg	0,0000	0,0020	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0014	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Thr	0,0000	0,0000	0,0000	0,0015	0,0000	0,0000	0,0000	0,0018	0,0010	0,0000	0,0000	0,0000	0,0001	0,0004	0,0000
Ala	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0008	0,0000	0,0000	0,0000	0,0010	0,0008	0,0000	0,0000
Pro	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0004	0,0000	0,0000	0,0000	0,0019	0,0003	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Tyr	0,0000	0,0000	0,0000	0,0020	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0021	0,0000	0,0000	0,0023	0,0000	0,0000
Val	0,0000	0,0014	0,0000	0,0014	0,0026	0,0000	0,0000	0,0010	0,0014	0,0012	0,0000	0,0007	0,0000	0,0130	0,0017
Met	0,0026	0,0004	0,0032	0,0000	0,0000	0,0000	0,0003	0,0001	0,0000	0,0004	0,0033	0,0002	0,0000	0,0002	0,0012
Cys	0,0005	0,0006	0,0000	0,0005	0,0019	0,0005	0,0003	0,0002	0,0004	0,0021	0,0004	0,0001	0,0000	0,0040	0,0005
Ile	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0025	0,0000	0,0000	0,0015	0,0000
Leu	0,0000	0,0009	0,0000	0,0040	0,0000	0,0006	0,0002	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0021	0,0009	0,0000
Orn	0,0000	0,0001	0,0016	0,0000	0,0000	0,0004	0,0011	0,0000	0,0000	0,0000	0,0006	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Lys	0,0000	0,0002	0,0000	0,0002	0,0020	0,0033	0,0004	0,0000	0,0004	0,0001	0,0002	0,0001	0,0003	0,0001	0,0004
Trp	0,0000	0,0000	0,0031	0,0027	0,0000	0,0014	0,0000	0,0000	0,0014	0,0000	0,0000	0,0001	0,0007	0,0003	0,0000
Phe	0,0000	0,0000	0,0000	0,0036	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0006	0,0000	0,0000

Çizelge 4.6. R-*B.licheniformis* ile metionin eklenen prosteite üretilen hücre dışı amino asit derişimlerinin kalma süresi ile değişimi

[illegible]

Çizelge 4.7. R-*B.licheniformis* ile referans ortam tarafından üretilen hücre dışı amino asit derişimlerinin kalma süresi ile değışimi

Ref					
	18	24	39	45	65
Asp	0,0000	0,0003	0,0004	0,0000	0,0000
Glu	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Gln	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Asn	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Ser	0,0012	0,0009	0,0000	0,0000	0,0000
Gly	0,0000	0,0018	0,0000	0,0000	0,0000
His	0,0005	0,0009	0,0000	0,0000	0,0000
Arg	0,0155	0,0020	0,0020	0,0000	0,0000
Thr	0,0000	0,0000	0,0011	0,0000	0,0000
Ala	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Pro	0,0009	0,0004	0,0000	0,0000	0,0000
Tyr	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Val	0,0000	0,0006	0,0020	0,0000	0,0000
Met	0,0003	0,0003	0,0005	0,0020	0,0022
Cys	0,0004	0,0001	0,0038	0,0000	0,0013
Ile	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Leu	0,0001	0,0000	0,0045	0,0000	0,0050
Orn	0,0005	0,0000	0,0000	0,0004	0,0000
Lys	0,0007	0,0000	0,0002	0,0005	0,0005
Trp	0,0002	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Phe	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

4.5. Amino Asit Eklenmesinin Metabolik Yolizi Tepkime Hızlarına Etkisi

Çalık (1998) ‘daha sonra Çalık ve Özdamar’ın (1999) *Bacillus licheniformis* için geliştirdiği hücreiçi tepkime sistemini tanımlayan (Bölüm 2.6.1) 149 tepkimeden oluşan 109 metabolit içeren model bu araştırmada kullanılmıştır. Ancak, amaç doğrultusunda fruktoz ve maltoz tüketim tepkimeleri çıkarılmış ve 143 tepkimeden 105 bileşikten oluşan modifiye edilmiş hücreiçi tepkime sistemi Çizelge 2.2’de verilmiştir:

105 bileşiğin yer aldığı tepkime sistemi için, 105 kütle korunum denklemlerinden oluşan 2.5-denklemleri yapısındaki vektör diferansiyel denklemin tanımladığı matematik model belirlenen iki karakteristik kalma süresindeki veriler kullanılarak çözülmüştür.

Aspartik asit grubu amino asitlerin proteaz üretimine etkisinin araştırıldığı çalışmada son olarak amino asitlerin metabolik yolizine etkisini araştırmak amacıyla, belirlenen iki karakteristik kalma süresi $t=21$ st ve $t=42$ st için, üç farklı derişiminde amino asit eklenerek yapılan deney verileri kullanılarak hücreiçi tepkime akıları hesaplanmış, glikoliz yolizi (R1-R13), TCA döngüsü (R33-R43), pentoz fosfat yolizi akıları (R14-R25), aspartik asit grubu amino asit sentez (R53-R63) akıları incelenmiş, amino asit eklenmesinin bu tepkime akılarına etkileri sırasıyla verilmiştir.

Çizelge 4.8’de görüldüğü gibi farklı derişimlerde Asp eklenen üç SAP üretim prosesinde aspartik asit grubu amino asitlerin toplam biyosentez akı değerleri $t=21$ st’ta Asp eklemesi olmayan referans prosesin toplam akı değerlerine göre artmış; ancak $t=42$ st’ta üç derişimde de referans prosesin toplam akı değerlerine göre düşük bulunmuştur. $t=42$ st’ta her üç proseste de Lys yolizi akılarının (R56, R57, R58, R59) düşük olduğu, HSer’den Thr üretilen dallanma noktasında (R60-R61) ise akıların yüksek olduğu belirlenmiştir. Maksimum aktivitenin belirlendiği 7.5 mM Asp içeren proseste $t=42$ st’ta toplam akı değerlerinin referans prosesin toplam akı değerlerine göre en düşük seviyede olduğu bulunmuştur. Aynı zamanda $t=42$ st’ta Maksimum aktivitenin gözlemlendiği 7.5 mM Asp içeren proseste Lys yolizi akıları (R56, R57, R58, R59) düşük olarak

belirlenmiş, HSer'den Thr ve Met üretilen dallanma noktasında akı değerleri (R60-R61-R62-R63) yüksek bulunmuştur.

Çizelge 4.8'de görüldüğü gibi Asp eklenen proseslerde $t=21$ st'ta TCA döngüsü akıları (R33-R43), referans ortamdaki akılara göre düşük bulunurken, $t=42$ st'ta tüm proseslerde referans ortamda daha yüksek hesaplanmıştır.

Çizelge 4.8'de görüldüğü gibi yine tüm proseslerde glikoliz yolizinde $t=42$ st'ta akı değerleri (R1-R13), referans ortam akı değerlerinden yüksek olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.8'de görüldüğü gibi $t=42$ st'ta, SAP üretim akıları incelendiğinde, maksimum aktivitenin gözlemlendiği 7.5 mM Asp içeren ortamın akısının referans ortamdakine göre en yüksek seviyede olduğu belirlenmiştir.

SAP üretiminde biyoreaktör üretim ortamına eklenen üç farklı Asn derişiminde, çizelge 4.9'da görüldüğü gibi, Asp yolizi biyosentez toplam akıları referans prosesin toplam akı değerlerine göre artış göstermiştir. Maksimum aktivitenin gözlemlendiği $C_{Asn}=5.0$ mM olan üretim ortamında DC'dan başlayan Lys yolizi tepkime akıları (R56, R57, R58, R59) referans prosese göre yüksek; buna karşın Asp ve AspSa sentez akıları (R53-R55) ve HSer'den başlayan Thr ve Met akı değerleri R61, R62, R63 ise düşük bulunmuştur. Bu sonuç, DC'dan başlayarak Lys yolizinin aktif olduğunu, Ile, Thr, Met akılarının düşük olmasının ise Lys yolizinden bu gruba yönlenmenin aktif olmadığını sadece Lys yolizinin aktif olduğunu doğrular.

Çizelge 4.9'da görüldüğü gibi başlangıçta Asn eklenen proseslerde TCA döngüsü içinde yer alan bileşenlerin sentez akıları (R33-R43), referans prosese göre düşük olmasına rağmen kalma süresi arttıkça akılarda artış meydana gelmiş ve $t=42$ st'ta tüm ortamlarda TCA döngüsü akıları referans prosese göre yüksek olarak belirlenmiştir. Tüm proseslerde TCA döngüsü tamamlanmış, genellikle Asn derişimi arttıkça akılarda artma gözlenmiş, en yüksek akı dağılımına maksimum aktivitenin gözlemlendiği ortamda ulaşılmıştır.

Çizelge 4.8 Asp eklenen SAP üretim prosesinde hücreiçi tepkime akılar

Tepkime No: R#	Ref	Ref	C _{Asp} =2.5 mM		C _{Asp} =5.0 mM		C _{Asp} =7.5 mM	
	t= 21st	t=42st	t= 21st	t=42st	t= 21st	t=42st	t= 21st	t=42st
<i>b) Glikoliz Yolizi Akı Değerleri</i>								
1	8.579	0.100	3.289	0.625	0.666	0.366	3.971	0.131
2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
3	8.579	0.083	3.289	0.501	0.000	0.000	3.971	0.046
4	0.000	0.000	0.000	0.000	0.256	0.000	0.000	0.000
5	8.576	0.083	60.695	0.545	0.324	0.218	3.938	0.085
6	0.000	0.000	58.06	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
7	17.149	0.160	5.266	1.122	0.887	0.556	7.863	0.195
8	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
9	17.135	0.143	4.603	1.042	0.871	0.421	7.784	0.164
10	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
11	8.544	0.000	0.000	0.328	0.000	0.000	3.747	0.000
12	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
13	17.003	0.000	3.595	1.437	0.000	0.000	7.722	0.273
<i>c) Pentoz Fosfat Yolizi Akı Değerleri</i>								
14	0.000	0.017	0.000	0.124	0.922	0.366	0.000	0.085
15	0.000	0.017	0.000	0.124	0.922	0.366	0.000	0.085
16	0.000	0.000	0.000	0.044	0.580	0.218	0.000	0.039
17	0.003	0.000	0.654	0.000	0.000	0.000	0.033	0.000
18	0.002	0.011	0.001	0.044	0.341	0.122	0.000	0.039
19	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
20	0.002	0.011	0.001	0.044	0.341	0.122	0.000	0.028
21	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
22	0.000	0.000	0.000	0.000	0.239	0.095	0.000	0.011
23	0.004	0.011	0.656	0.000	0.000	0.000	0.033	0.000
24	0.002	0.011	0.001	0.044	0.341	0.122	0.000	0.028
25	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>d) TCA Döngüsü Akı Değerleri</i>								
33	16.999	0.050	5.180	0.856	0.300	0.018	7.652	0.147
34	16.999	0.050	5.180	0.856	0.300	0.018	7.652	0.147
35	16.999	0.050	5.180	0.249	0.005	0.002	7.532	0.000
36	16.944	0.045	5.170	0.230	0.000	0.000	7.470	0.000
37	16.944	0.032	6.091	0.230	0.000	0.510	7.470	0.000
38	0.000	0.000	0.000	0.000	0.098	0.000	0.000	0.000
39	16.944	0.045	6.091	0.837	0.295	0.526	7.589	0.147
40	16.990	0.061	6.093	0.844	0.397	0.527	7.602	0.154
41	0.000	0.061	6.093	1.451	0.692	0.542	7.721	0.301
42	0.000	0.000	0.000	0.607	0.295	0.016	0.120	0.147
43	0.000	0.000	0.000	0.607	0.295	0.016	0.120	0.147
<i>2) Aspartik Asit Grubu Amino Asitleri Akı Değerleri</i>								
53	0.069	0.051	1.000	0.066	0.392	0.016	0.700	0.028
54	0.005	0.003	0.005	0.014	0.004	0.002	0.013	0.004
55	0.016	0.045	0.947	0.037	0.382	0.012	0.039	0.017
56	0.006	0.038	0.003	0.007	0.372	0.000	0.000	3.44E-4
57	0.006	0.038	0.003	0.007	0.372	0.000	0.000	3.44E-4
58	0.006	0.038	0.003	0.007	0.372	0.000	0.000	3.44E-4
59	0.006	0.038	0.003	0.007	0.372	0.000	0.000	3.44E-4
60	0.011	0.007	0.945	0.031	0.010	0.012	0.039	0.017
61	0.009	0.006	0.942	0.023	0.008	0.011	0.021	0.015
62	0.003	0.001	0.924	0.008	0.003	0.001	0.007	0.002
63	0.002	0.001	0.002	0.007	0.002	0.001	0.018	0.002
<i>SAP akı değerleri</i>								
142	0.0003	0.000145	0.0003	0.00008	0.0002	0.0001	0.714	0.0002

Çizelge 4.9'da görüldüğü gibi glikoliz yolizi akıları (R1-R13), da TCA çevrimi akılarında görüldüğü gibi başlangıçta Asn eklenen proseslerde referans prosese göre düşük olarak belirlenmiş ancak proses ilerledikçe Asn içeren ortamların akıları referans prosese göre yüksek olarak belirlenmiştir. Aktivitenin en yüksek olduğu ortam için elde edilen akı dağılımı da referans prosese göre daha yüksek değerine ulaşmıştır.

Çizelge 4.9'de görüldüğü gibi Asn eklenen proseslerde pentoz fosfat yolizi akıları (R14-R25), referans prosese göre hücre içi tepkime hızlarının hesaplandığı her iki kalma süresinde yüksek bulunmuş, ancak her üç proseste da akı dağılımlarının t=42 st'ta birbirine yakın olduğu, t=21 st'ta ise 7.5 mM Asn eklenen ortamın akı değerleri yüksek bulunmuştur. Maksimum aktivitenin belirlendiği ortamda ise t=21 st akıları minimumdur.

Çizelge 4.9'da görüldüğü gibi t=42 st'ta, SAP üretim akıları incelendiğinde (R142), maksimum aktivitenin gözleendiği 5.0 mM Asn içeren ortamın akısının referans ortamdakine göre en yüksek seviyede olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.10'da görüldüğü gibi Thr içeren proseslerde t=42 st'ta tüm proseslerde Asp amino asit sentez toplam akıları referans prosese göre yüksek olarak belirlenmiştir. t=42 st'ta Thr eklenen tüm proseslerde Asp, Asn sentez akısı (R53, R54) referans ortam akısına göre yüksek olarak belirlenmiştir. Lys yolizinde yer alan tepkime akıları (R56, R57, R58, R59) t=42 st'ta, diğer proseslerde düşük olarak belirlenmesine karşın, maksimum aktivitenin gözleendiği 7.5 mM Thr içeren proseste referans prosese göre maksimum olarak belirlenmiştir. Thr sentez akısı (R61) t=42 st'ta tüm proseslerde referans prosese göre artmış, Met sentez akısı (R63) ise tüm proseslerde referans prosese göre yüksek olarak belirlenmesine karşın, Thr sentez akısına göre düşük olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.9 Asn eklenen SAP üretim prosesinde hücreiçi tepkime akıları

Tepkime No: R#	Ref	Ref	C _{Asn} =2.5 mM		C _{Asn} =5.0 mM		C _{Asn} =7.5 mM	
	t= 21st	t=42st	t= 21st	t=42st	t= 21st	t=42st	t= 21st	t=42st
<i>Glikoliz Yolizi Akı Değerleri</i>								
1	8.579	0.100	0.525	0.430	2.753	0.616	1.420	0.494
2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
3	8.579	0.083	0.315	0.322	2.753	0.616	0.000	0.399
4	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
5	8.576	0.083	0.391	0.322	2.731	0.555	0.943	0.399
6	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
7	17.149	0.160	0.833	0.674	5.442	0.987	2.357	0.805
8	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
9	17.135	0.143	0.676	0.575	5.415	0.983	2.357	0.651
10	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
11	8.544	0.000	0.000	0.000	2.581	0.000	0.933	0.000
12	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
13	0.000	0.017	0.210	0.107	0.000	0.000	1.420	0.095
<i>Pentoz Fosfat Yolizi Akı Değerleri</i>								
14	0.000	0.017	0.210	0.107	0.000	0.000	1.420	0.095
15	0.000	0.000	0.075	0.000	0.000	0.000	0.943	0.000
16	0.003	0.000	0.000	0.000	0.022	0.061	0.000	0.000
17	0.002	0.011	0.075	0.036	0.009	0.061	0.473	0.039
18	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
19	0.002	0.011	0.075	0.036	0.009	0.061	0.473	0.039
20	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
21	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
22	0.004	0.011	0.000	0.036	0.031	0.122	0.000	0.039
23	0.002	0.011	0.075	0.036	0.009	0.061	0.473	0.039
24	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
25	0.000	0.017	0.210	0.107	0.000	0.000	1.420	0.095
<i>TCA Döngüsü Akı Değerleri</i>								
33	16.999	0.050	0.395	0.395	5.347	0.382	2.785	0.080
34	16.999	0.050	0.395	0.395	5.347	0.382	2.785	0.080
35	16.999	0.050	0.395	0.395	5.347	0.002	0.000	0.078
36	16.944	0.045	0.358	0.358	5.341	0.000	0.000	0.028
37	16.944	0.032	0.358	0.357	5.315	0.000	0.000	0.028
38	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.182	0.000	0.000
39	16.944	0.045	0.358	0.357	5.341	0.380	2.785	0.030
40	16.990	0.061	0.371	0.362	5.368	0.562	2.789	0.048
41	0.000	0.061	0.371	0.000	5.368	0.942	5.575	0.000
42	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.380	2.785	0.002
43	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.380	2.785	0.002
<i>3) Aspartik Asit Grubu Amino Asitleri Akı Değerleri</i>								
53	0.069	0.051	1.000	0.066	0.392	0.016	0.700	0.028
54	0.069	0.051	0.100	0.152	0.021	0.561	0.936	0.211
55	0.005	0.003	0.024	0.009	0.005	0.001	0.002	0.034
56	0.016	0.045	0.053	0.134	0.011	0.558	0.930	0.143
57	0.006	0.038	0.012	0.115	9.98E-04	0.556	9.58E-04	0.076
58	0.006	0.038	0.012	0.115	9.98E-04	0.556	9.58E-04	0.076
59	0.006	0.038	0.012	0.115	9.98E-04	0.556	9.58E-04	0.076
60	0.006	0.038	0.012	0.115	9.98E-04	0.556	9.58E-04	0.076
61	0.011	0.007	0.041	0.020	0.010	0.002	0.929	0.067
62	0.009	0.006	0.041	0.017	0.009	0.002	0.927	0.057
63	0.003	0.001	0.014	0.006	0.003	7.20E-04	0.001	0.019
<i>SAP akı değerleri</i>								
142	0.0003	0.000145	0.001	0.0004	0.299	0.0007	0.0001	0.0002

Çizelge 4.10'da görüldüğü gibi TCA döngüsü akıları (R33-R43) Thr içeren tüm proseslerde t=21 st'ta referans prosese göre düşükken, t=42 st'ta 5.0 ve 7.5 mM içeren proseslerde yüksektir. 2.5 mM içeren proseste ise düşük olarak belirlenmiştir. t=42 st'ta maksimum aktivitenin gözlemlendiği 7.5 mM Thr içeren proseste maksimum olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.10'da görüldüğü gibi glikoliz yolizi akıları (R1-R13) t=21 st'ta tüm proseslerde referans prosese göre düşük olarak belirlenmiş, t=42 st'ta ise tüm proseslerde yüksek olduğu gözlenmiştir. t=42 st'ta maksimum aktivitenin gözlemlendiği 7.5 mM Thr içeren proseste artış maksimum seviyeye ulaşmıştır.

Çizelge 4.10'da görüldüğü gibi Thr içeren tüm proseslerde pentoz fosfat yolizi akıları (R14-R25) her iki kalma süresinde (t=21, t=42) referans prosese göre yüksek olarak belirlenmiş, maksimum aktivitenin gözlemlendiği 7.5 mM Thr içeren proseste ise artış minimum olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.10'da görüldüğü gibi t=42 st'ta, SAP üretim akıları incelendiğinde (R142), maksimum aktivitenin gözlemlendiği 7.5 mM Thr içeren ortamın akısının referans ortamdakine göre en yüksek seviyede olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.11'de görüldüğü gibi Ile eklenen proseslerde referans prosese göre Asp yolizi sentez toplam akıları her iki kalma süresinde de yüksek olarak belirlenmiş, yalnızca maksimum aktivitenin gözlemlendiği 15 mM Ile içeren proseste t=42 st'ta akı değerleri referans prosese göre düşük olarak belirlenmiştir. HSer'den Ile yolizinde tepkime akıları (R60, R61, R62, R63) Ile eklenen tüm proseslerde her iki kalma süresinde referans proses akılarına göre yüksek olarak belirlenmiştir. Yine her üç proseste Asn (R54) sentez akıları referans prosese göre yüksek olarak belirlenmiştir. Maksimum aktivitenin gözlemlendiği 15 mM Ile içeren proseste t=42 st'ta Lys yolizi akıları (R55, R56, R57, R58, R59) referans prosese göre düşük gözlenirken, HSer'den başlayan Met, Ile, Thr sentez akıları (R60, R61, R62, R63) yüksek olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.10 Thr eklenen SAP üretim prosesinde hücreiçi tepkime akıları

Tepkime No: R#	Ref	Ref	C _{Thr} =5.0 mM		C _{Thr} =7.5 mM		C _{Thr} =10 mM	
	t= 21st	t=42st	t= 21st	t=42st	t= 21st	t=42st	t= 21st	t=42st
<i>Glikoliz Yolizi Akı Değerleri</i>								
1	8.579	0.100	4.030	0.438	0.725	0.997	1.278	2.000
2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
3	8.579	0.083	2.940	0.028	0.000	0.997	1.278	2.000
4	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
5	8.576	0.083	2.940	0.267	0.389	0.897	1.220	1.924
6	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
7	17.149	0.160	6.240	0.652	1.017	1.695	2.387	3.821
8	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
9	17.135	0.143	5.491	0.557	0.916	1.630	2.315	3.651
10	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
11	8.544	0.000	0.000	0.025	0.000	0.434	0.922	1.463
12	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
13	17.003	0.000	5.409	0.086	1.786	0.000	2.089	1.821
<i>Pentoz Fosfat Yolizi Akı Değerleri</i>								
14	0.000	0.017	1.091	0.410	0.725	0.000	0.000	0.000
15	0.000	0.017	1.091	0.410	0.725	0.000	0.000	0.000
16	0.000	0.000	0.000	0.239	0.389	0.000	0.000	0.000
17	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.100	0.058	0.076
18	0.002	0.011	0.365	0.143	0.242	0.000	0.000	0.009
19	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
20	0.002	0.011	0.365	0.143	0.242	0.000	0.000	0.009
21	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
22	0.000	0.000	0.000	0.096	0.147	0.000	0.000	0.000
23	0.004	0.011	0.365	0.000	0.000	0.100	0.058	0.085
24	0.002	0.011	0.365	0.143	0.242	0.000	0.000	0.009
25	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>TCA Döngüsü Akı Değerleri</i>								
33	16.999	0.050	6.132	0.030	0.948	0.532	2.123	1.204
34	16.999	0.050	6.132	0.030	0.948	0.532	2.123	1.204
35	16.999	0.050	6.132	0.030	0.012	0.000	2.123	1.204
36	16.944	0.045	6.120	0.000	0.000	0.065	2.159	1.160
37	16.944	0.032	6.120	0.000	0.000	0.016	2.127	1.160
38	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
39	16.944	0.045	6.120	0.000	0.936	0.628	2.159	1.160
40	16.990	0.061	6.125	0.010	0.939	0.812	2.248	1.171
41	0.000	0.061	6.125	0.010	1.875	1.344	2.248	0.000
42	0.000	0.000	0.000	0.000	0.936	0.532	0.000	0.000
43	0.000	0.000	0.000	0.000	0.936	0.532	0.000	0.000
<i>Aspartik Asit Grubu Amino Asitleri Akı Değerleri</i>								
53	0.069	0.051	0.023	0.110	0.023	1.125	0.126	0.140
54	0.005	0.003	0.005	0.021	0.003	0.019	0.015	0.034
55	0.016	0.045	0.010	0.068	0.016	0.994	0.048	0.077
56	0.006	0.038	0.003	0.011	0.002	0.955	0.003	0.017
57	0.006	0.038	0.003	0.011	0.002	0.955	0.003	0.017
58	0.006	0.038	0.003	0.011	0.002	0.955	0.003	0.017
59	0.006	0.038	0.003	0.011	0.002	0.955	0.003	0.017
60	0.011	0.007	0.008	0.057	0.014	0.040	0.045	0.060
61	0.009	0.006	0.006	0.051	0.013	0.035	0.030	0.051
62	0.003	0.001	0.004	0.028	0.003	0.009	0.009	0.018
63	0.002	0.001	0.002	0.006	0.001	0.005	0.015	0.009
<i>SAP akı değerleri</i>								
142	0.0003	0.000145	0.0003	0.001	0.0002	0.0002	0.0009	0.0001

Çizelge 4.11’de görüldüğü gibi Ile eklenen proste t=42 st’ta yalnızca 10 mM Ile içeren proste TCA sentez akıları (R33-R43) referans proste göre düşük olarak gözlenmiş, diğer ortamlarda ise yüksek olarak belirlenmiştir. TCA döngüsü tüm proseslerde tamamlanırken, maksimum aktivitenin gözlendiği 15 mM Ile içeren proste t=42 st’ta sentez akıları referans artama göre maksimum değerine ulaşmıştır.

Çizelge 4.11’de görüldüğü gibi Ile eklenen tüm proseslerde glikoliz yolizi sentez akıları (R1-R13) t=21 st’ta referans proste göre düşük olarak gözlenirken, t=42 st’ta 15 ve 20 mM Ile içeren proseslerde akı değerleri referans proste göre yüksek olarak belirlenmiş, 10mM içeren proste ise referans proses akı değerlerine yakın olduğu bulunmuştur. Maksimum aktivitenin gözlendiği proste glikoliz yolizi akıları t=42 st’ta en yüksek değerine ulaşmıştır.

Çizelge 4.11’de görüldüğü gibi Ile eklenen proseslerde pentoz fosfat yolizi tepkime akıları (R14-R25) t=21 st’ta amino asit içeren her üç proste de referans proses akılarına göre yüksek olarak belirlenmiş, t=42 st’ta ise yalnızca 10 mM Ile içeren proste akı değerleri referans ortam akı değerlerine göre düşük olarak belirlenmiştir. Maksimum aktivitenin gözlendiği 15 mm Ile içeren proste pentoz fosfat yolizi akıları her iki kalma süresinde de maksimum seviyeye ulaşmıştır.

Çizelge 4.11’de görüldüğü gibi t=42 st’ta, SAP üretim akıları incelendiğinde (R142), maksimum aktivitenin gözlendiği 15 mM Ile içeren ortamın akısının referans ortamdakine göre en yüksek seviyede olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.12’de görüldüğü gibi Lys eklenen tüm proseslerde Asp grubu amino asitlerin sentez akıları maksimum aktivitenin gözlendiği 2.5 mM Lys eklenen proste her iki kalma süresinde de referans proste göre düşük olarak belirlenirken, 5 mM Lys içeren proste her iki kalma süresinde de yüksek olarak belirlenmiş, 7.5 mM Lys içeren proste ise t=21 st’ta yüksek iken t=42 st’ta düşük olarak belirlenmiştir. Maksimum aktivitenin gözlendiği 2.5 mM Lys içeren proste t=42 st’ta Asn ve Ile sentez akıları

Çizelge 4.11 İle eklenen SAP üretim prosesinde hücreiçi tepkime akıları

Tepkime No: R#	Ref	Ref	C _{İle} =10 mM		C _{İle} =15 mM		C _{İle} =20 mM	
	t= 21st	t=42st	t= 21st	t=42st	t= 21st	t=42st	t= 21st	t=42st
<i>Glikoliz Yolizi Akı Değerleri</i>								
1	8.579	0.100	0.886	0.075	2.703	2.486	1.077	1.077
2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
3	8.579	0.083	0.886	0.071	2.703	0.000	1.077	0.752
4	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
5	8.576	0.083	0.880	0.071	2.639	1.613	1.052	0.943
6	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
7	17.149	0.160	1.753	0.138	5.231	4.029	2.098	1.987
8	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
9	17.135	0.143	1.722	0.125	5.156	3.977	2.050	1.951
10	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
11	8.544	0.000	0.815	0.037	2.236	1.356	0.912	0.834
12	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
13	17.003	0.000	0.000	0.004	4.950	3.804	1.262	0.000
<i>Pentoz Fosfat Yolizi Akı Değerleri</i>								
14	0.069	0.051	0.774	0.011	5.024	3.845	1.608	0.621
15	0.005	0.003	0.774	0.011	5.024	3.845	1.608	0.621
16	0.016	0.045	0.774	0.011	5.024	3.845	1.608	0.000
17	0.006	0.038	0.760	0.004	5.007	3.836	1.601	0.000
18	0.006	0.038	0.760	0.011	4.948	3.805	1.601	0.000
19	0.006	0.038	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
20	0.006	0.038	0.760	0.011	5.007	3.836	1.601	0.621
21	0.011	0.007	0.764	0.013	5.070	3.870	1.601	0.639
22	0.009	0.006	0.000	0.013	5.070	3.870	1.601	0.000
23	0.003	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.621
24	0.002	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.621
25	0.069	0.051	0.774	0.011	5.024	3.845	1.608	0.621
<i>TCA Döngüsü Akı Değerleri</i>								
33	0.069	0.051	0.774	0.011	5.024	3.845	1.608	0.621
34	0.005	0.003	0.774	0.011	5.024	3.845	1.608	0.621
35	0.016	0.045	0.774	0.011	5.024	3.845	1.608	0.000
36	0.006	0.038	0.760	0.004	5.007	3.836	1.601	0.000
37	0.006	0.038	0.760	0.011	4.948	3.805	1.601	0.000
38	0.006	0.038	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
39	0.006	0.038	0.760	0.011	5.007	3.836	1.601	0.621
40	0.011	0.007	0.764	0.013	5.070	3.870	1.601	0.639
41	0.009	0.006	0.000	0.013	5.070	3.870	1.601	0.000
42	0.003	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.621
43	0.002	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.621
<i>Aspartik Asit Grubu Amino Asitleri Akı Değerleri</i>								
53	0.069	0.051	0.041	0.048	0.047	0.025	0.370	1.280
54	0.005	0.003	0.010	0.004	0.011	0.006	0.008	0.006
55	0.016	0.045	0.022	0.041	0.027	0.013	0.359	1.252
56	0.006	0.038	0.004	0.002	0.007	0.003	0.345	1.236
57	0.006	0.038	0.004	0.002	0.007	0.003	0.345	1.236
58	0.006	0.038	0.004	0.002	0.007	0.003	0.345	1.236
59	0.006	0.038	0.004	0.002	0.007	0.003	0.345	1.236
60	0.011	0.007	0.018	0.039	0.020	0.010	0.014	0.016
61	0.009	0.006	0.018	0.038	0.017	0.008	0.011	0.014
62	0.003	0.001	0.006	0.003	0.005	0.004	0.002	0.004
63	0.002	0.001	5.65E-04	0.001	0.003	0.002	0.003	0.002
<i>SAP akı değerleri</i>								
142	0.0003	0.000145	0.0006	0.0002	0.0006	0.00034	0.0004	0.0003

(R54, R62) sıfır olarak belirlenmiş, buna karşılık HSer, Thr, Met sentez akıları (R60, R61, R63) ise referans prosese göre yüksek olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.12’de görüldüğü gibi Lys eklenen proseslerde TCA yolizi sentez akıları (R33-R43) $t=21$ st’da referans prosese göre düşük olarak gözlenirken, $t=42$ st’da maksimum aktivitenin gözlendiği 2.5 mM Lys içeren proseste düşük olarak gözlenmiştir.

Çizelge 4.12’de görüldüğü gibi Lys eklenen tüm proseslerde glikoliz yolizi akıları (R1-R13) $t=21$ st’da referans prosese göre düşük olarak belirlenmiş, $t=42$ st’da ise maksimum aktivitenin gözlendiği 2.5 mM Lys içeren ortamda düşük, diğer iki ortamda yüksek olarak belirlenmiştir. Maksimum aktivitenin belirlendiği 2.5 mM Lys içeren proseste glikoliz yolizi akılarının çoğunluğu $t=42$ st’da sıfır olarak belirlenmiş diğer akılarda çok düşük kalmıştır.

Çizelge 4.12’de görüldüğü gibi Lys eklenen tüm proseslerde pentoz fosfat yolizi akıları (R14-R25) $t=21$ st’da referans prosese göre 7.5 mM Lys eklenen ortam haricinde yüksek olarak belirlenmiş, $t=42$ st’da ise aktivitenin 2.5 mM ve 7.5 mM Lys içeren proseslerde düşük 5.0 mM Lys içeren proseste ise yüksek olarak belirlenmiştir. Maksimum aktivitenin belirlendiği 2.5 mM Lys içeren proseste pentoz fosfat yolizi inaktiftir.

Çizelge 4.12’de görüldüğü gibi $t=42$ st’da, SAP üretim akıları incelendiğinde (R142), maksimum aktivitenin gözlendiği 2.5 mM Lys içeren ortamın akısının referans ortamdakine göre en yüksek seviyede olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.13’de görüldüğü gibi Met içeren proseslerde Asp grubu amino asitlerin sentez akıları en fazla inhibisyonun meydana geldiği 0.4 mM Met içeren proseste referans prosese göre artış göstermiş, diğer iki ortamda ise $t=21$ st’da artış gözlenmesine rağmen $t=42$ st’da ise düşüş gözlenmiştir. Asn sentez akısı (R54) $t=42$ st’da en az inhibisyonun

Çizelge 4.12 Lys eklenen SAP üretim prosesinde hücre içi tepkime akıları

Tepkime No: R#	Ref	Ref	C _{Lys} =2.5mM		C _{Lys} =5.0 mM		C _{Lys} =7.5 mM	
	t= 21st	t=42st	t= 21st	t=42st	t= 21st	t=42st	t= 21st	t=42st
<i>i) Glikoliz Yolizi Akı Değerleri</i>								
1	8.579	0.100	1.420	0.000	0.995	0.172	0.204	0.477
2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
3	8.579	0.083	0.000	0.000	0.664	0.172	0.204	0.437
4	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
5	8.576	0.083	0.943	0.000	0.603	0.143	3.611	0.454
6	0.000	0.000	0.000	4.23E-04	0.000	0.000	3.408	0.000
7	17.149	0.160	2.358	0.000	1.147	0.284	0.403	0.910
8	0.000	0.000	0.000	8.46E-04	0.000	0.000	0.000	0.000
9	17.135	0.143	2.350	8.46E-04	1.117	0.250	0.393	0.864
10	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
11	8.544	0.000	0.923	0.000	0.000	0.018	0.182	0.351
12	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
13	17.003	0.000	2.350	0.002	0.000	0.000	0.252	0.000
<i>Pentoz Fosfat Yolizi Akı Değerleri</i>								
14	0.000	0.017	1.420	0.000	0.331	0.000	0.000	0.040
15	0.000	0.017	1.420	0.000	0.331	0.000	0.000	0.040
16	0.000	0.000	0.943	0.000	0.000	0.000	0.000	0.018
17	0.003	0.000	0.000	0.000	0.061	0.029	0.001	0.000
18	0.002	0.011	0.473	0.000	0.000	4.136E-4	0.001	0.018
19	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
20	0.002	0.011	0.473	0.000	0.000	4.136E-4	0.001	0.018
21	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
22	0.000	0.000	0.470	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
23	0.004	0.011	0.000	0.000	0.061	0.030	0.002	0.000
24	0.002	0.011	0.473	0.000	0.000	4.136E-4	0.001	0.018
25	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>TCA Döngüsü Akı Değerleri</i>								
33	0.069	0.051	2.360	0.025	0.698	0.095	0.291	0.276
34	0.005	0.003	2.360	0.025	0.698	0.095	0.291	0.276
35	0.016	0.045	2.36	0.012	0.698	0.003	0.291	0.276
36	0.006	0.038	2.364	0.012	1.078	0.000	0.285	0.255
37	0.006	0.038	2.366	0.013	1.028	0.000	0.285	0.368
38	0.006	0.038	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
39	0.006	0.038	2.366	0.028	1.078	0.092	0.285	0.368
40	0.011	0.007	2.367	0.034	1.518	0.093	0.286	0.375
41	0.009	0.006	2.367	0.047	1.518	0.185	0.286	0.000
42	0.003	0.001	0.000	0.013	0.000	0.092	0.000	0.000
43	0.002	0.001	0.000	0.013	0.000	0.092	0.000	0.000
<i>Aspartik Asit Grubu Amino Asitleri Akı Değerleri</i>								
53	0.069	0.051	0.006	0.022	0.428	0.150	0.059	0.061
54	0.005	0.003	3.24E-04	0.000	0.009	0.002	0.003	0.014
55	0.016	0.045	0.006	0.018	0.027	0.146	0.055	0.032
56	0.006	0.038	0.000	0.003	0.011	0.140	0.043	0.007
57	0.006	0.038	0.000	0.003	0.011	0.140	0.043	0.007
58	0.006	0.038	0.000	0.003	0.011	0.140	0.043	0.007
59	0.006	0.038	0.000	0.003	0.011	0.140	0.043	0.007
60	0.011	0.007	0.006	0.015	0.016	0.005	0.012	0.024
61	0.009	0.006	0.003	0.010	0.015	0.005	0.010	0.021
62	0.003	0.001	2.80E-04	0.000	0.005	0.001	0.006	0.005
63	0.002	0.001	0.003	0.005	0.002	0.000	0.001	0.004
<i>SAP akı değerleri</i>								
142	0.0003	0.000145	0.0003	0.0004	0.0005	0.0001	0.0002	0.0001

gözlendiği 0.004 mM Met içeren proste belirlenmiş, yine diğer bir dallanma noktası olan Thr, Met, Ile tepkime akıları (R60, R61, R62, R63) referans proseye göre yüksek seviyede gözlenmiştir. En fazla inhibisyonun meydana geldiği 0.4 mM Met içeren proste sadece HSer, Thr, Ile, Met akıları (R60, R61, R62, R63) referans proseye göre artış göstermiştir.

Çizelge 4.13’de görüldüğü gibi glikoliz yolizi (R1-R13) ve TCA döngüsü akıları (R33-R43) t=21 st’ta tüm proseslerde referans proseye göre düşük olarak belirlenmiş, t=42 st’ta ise tüm proseslerde yüksek olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.13’de görüldüğü gibi Met içeren tüm proseslerde Pentoz fosfat yolizi akıları (R14-R25), en az inhibisyonun gözlendiği -0.04mM Met içeren ortam haricinde- her iki kalma süresinde de referans proseye göre yüksek olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.13’de görüldüğü gibi t=42 st’ta, SAP üretim akıları incelendiğinde (R142), en az inhibisyonun gözlendiği 0.004 mM Met içeren prosesin akısının referans ortamdakine göre en yüksek seviyede olduğu belirlenmiştir. Diğer iki proste ise SAP akıları (R142) referans proseye göre düşüktür.

Çizelge 4.13 Met eklenen SAP üretim prosesinde hücreiçi tepkime akıları

Tepkime No: R#	Ref	Ref	C _{Met} =0.004 mM		C _{Met} =0.04 mM		C _{Met} =0.4 mM	
	t= 21st	t=42st	t= 21st	t=42st	t= 21st	t=42st	t= 21st	t=42st
<i>Glikoliz Yolizi Akı Değerleri</i>								
1	8.579	0.100	0.102	2.415	2.415	0.187	0.669	5.421
2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
3	8.579	0.083	0.000	2.415	2.415	0.000	0.000	2.716
4	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
5	8.576	0.083	0.066	2.357	2.410	0.119	0.443	3.618
6	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
7	17.149	0.16	0.166	4.664	4.820	0.292	1.107	8.136
8	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
9	17.135	0.143	0.159	4.585	4.809	0.281	1.081	7.225
10	0.000	0.000	0.000	0.000	4.809	0.000	0.000	0.000
11	8.544	0.000	0.054	1.955	2.382	0.068	0.410	0.000
12	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
13	17.003	0.000	0.000	3.351	4.006	0.000	0.546	6.269
<i>Pentoz Fosfat Yolizi Akı Değerleri</i>								
14	0.000	0.017	0.102	0.000	0.000	0.187	0.669	2.705
15	0.000	0.017	0.102	0.000	0.000	0.187	0.669	2.705
16	0.000	0.000	0.066	0.000	0.000	0.119	0.443	0.902
17	0.003	0.000	0.000	0.058	0.005	0.000	0.000	0.000
18	0.002	0.011	0.034	0.025	0.001	0.066	0.222	0.902
19	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
20	0.002	0.011	0.034	0.025	0.001	0.066	0.222	0.902
21	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.221	0.000
22	0.000	0.000	0.032	0.000	0.000	0.053	0.221	0.000
23	0.004	0.011	0.000	0.083	0.005	0.000	0.000	0.000
24	0.002	0.011	0.034	0.025	0.001	0.066	0.222	0.902
25	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>TCA Döngüsü Akı Değerleri</i>								
33	0.069	0.051	0.050	4.423	4.002	0.135	0.546	7.170
34	0.005	0.003	0.050	4.423	4.002	0.135	0.546	7.170
35	0.016	0.045	0.003	4.423	3.210	0.135	0.000	7.17
36	0.006	0.038	0.000	4.407	3.208	0.132	0.000	7.167
37	0.006	0.038	0.000	5.324	3.208	0.122	0.000	7.185
38	0.006	0.038	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
39	0.006	0.038	0.047	5.387	4.000	0.132	0.546	7.185
40	0.011	0.007	0.208	5.449	4.002	0.143	0.549	7.185
41	0.009	0.006	0.000	5.449	4.794	0.143	1.095	7.185
42	0.003	0.001	0.047	0.000	0.792	0.000	0.546	0.000
43	0.002	0.001	0.047	0.000	0.792	0.000	0.546	0.000
<i>Aspartik Asit Grubu Amino Asitleri Akı Değerleri</i>								
53	0.069	0.051	0.169	1.027	0.791	0.008	0.549	0.016
54	0.005	0.003	0.000486	0.012	0.002	0.002	0.000	0.000
55	0.016	0.045	0.008	1.009	0.788	0.005	0.546	0.014
56	0.006	0.038	0.003	1.009	0.785	0.001	0.535	7.76E-04
57	0.006	0.038	0.003	0.006	0.785	0.001	0.535	7.76E-04
58	0.006	0.038	0.003	0.006	0.785	0.001	0.535	7.76E-04
59	0.006	0.038	0.003	0.006	0.785	0.001	0.535	7.76E-04
60	0.011	0.007	0.005	1.003	0.003	0.003	0.011	0.013
61	0.009	0.006	0.00081	1.000	9.94E-04	0.003	0.000	0.008
62	0.003	0.001	0.00027	0.986	9.34E-04	9.90E-04	6.70E-04	0.002
63	0.002	0.001	0.004	0.003	0.002	4.95E-04	0.011	0.005
<i>SAP akı değerleri</i>								
142	0.0003	0.000145	0.00003	0.000004	0.00001	0.0001	0.00007	0.0001

5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Rekombinant *Bacillus licheniformis* ile serin alkali proteaz enzimi için biyoproses geliştirilmesi amacıyla yapılan araştırmalar sonunda (Çalık vd 2000) aspartik asit grubu amino asitlerin hücre içinde hız kısıtlayıcı basamak (darboğaz) oluşturabileceğinin ileri sürülmesiyle hücre içi kısıtlamaların belirlenebilmesi için “Aspartik asit grubu amino asitlerin serin alkali proteaz (SAP) enzimine üretimine etkisinin araştırılması” konulu yüksek lisans araştırmasında SAP geni (*subC*) pHV1431 plasmidi taşıyan rekombinant *Bacillus* türü mikroorganizmalar kullanılarak, SAP üretimini arttıran aspartik asit grubu amino asitlerin belirlenmesi ve bunların metabolik yolizine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu nedenle araştırmaların ilk aşamasında *r-B.licheniformis*, *r-B.subtilis*, *r-B.amyloliquefaciens*, *r-B.sphaericus* (pHV1431::*subC*) ile serin alkali proteaz enziminin hücre içi üretimini kontrol eden aspartik asit grubu amino asitlerin farklı ekleme zamanlarında ve $C_{AA}=0-15$ mM derişim aralığında araştırılmış ve SAP üretimini arttıran amino asitlerin optimum ekleme zamanları ve derişimleri belirlenmiştir. Sonuçların hem tekrarlanabilirliğini göstermek hem de iki farklı kalma süresi için metabolik yolizi analizinin yapılması için üç farklı derişimde aspartik asit grubu amino asitlerin SAP aktivitesine, ürün ve yan-ürün dağılımlarına ve metabolik yolizi akılarına etkisi araştırılmıştır.

Çalık vd tarafından SAP verim ve seçimliliğini arttırmak amacıyla metabolik yolizi analizi yapılarak elde edilen araştırma sonuçlarında, SAP sentezinde hücre içi amino asit akılarının büyük önem taşıdığı belirtilmiş, SAP yapısının %26’sını oluşturan aspartik asit grubu amino asitlerin akı değerlerinin biyoproses süresince düşük olduğu belirlenmiş ve bu amino asitlerin diğer amino asitlere göre daha fazla darboğaz oluşturabileceği düşünülmüştür. Bu nedenle ilk olarak aspartik asit grubu amino asitlerin SAP üretimine etkisi araştırılmış, bu amaçla *r-B.licheniformis* (pHV1431::*subC*) ile optimum derişimde karbon kaynağı (glukoz) ve azot kaynağı ((NH_2) HPO_4) içeren üretim ortamlarına farklı ekleme zamanlarında (t=0 st, 18 st, 24 st) $C_{AA}= 0-15$ mM derişimde amino asit eklenerek SAP aktivitesinin proses süresince

değişimi incelenmiş, sonuçlar amino asit içermeyen referans prosesle karşılaştırılmıştır. Deneyler sonunda hem sonuçların tekrarlanabilirliğini göstermek hem de optimum sayıda analiz yapmak amacıyla her amino asit için belirlenen en uygun ekleme anında ve belirlenen üç derişimde bir set deney daha yapılarak üretim ortamına eklenen amino asitlerin substrat tüketimine, mikroorganizma çoğalmasına, SAP üretimine ve hücre dışı amino asit dağılımlarına etkisi araştırılmış ve iki kalma süresi belirlenerek (t=21 st, 42 st) metabolik yolizi analizi yapılmıştır. Yapılan deneyler sonunda Met dışındaki bütün amino asitlerin SAP üretimini arttırdığı Met ise düşük derişimlerde dahi üretimi inhibe ettiği belirlenmiştir. Aspartik asit grubu amino asitlerin optimum ekleme anları, derişimleri ve aktiviteye etkisi Çizelge 5.1’de verilmiştir.

Diğer taraftan farklı rekombinant *Bacillus* türleriyle de (*B.amyloliquefaciens*, *B.sphaericus*, *B.subtilis*) birer set deney yapılmış ve aspartik asit grubu amino asitlerin mikroorganizma türüne bağlı olarak enzim üretimine etkisi Çizelge 5.2’de verilmiştir.

Çizelge 5.1 Aspartik asit grubu amino asitlerin *r-B.licheniformis* ile enzim üretimine etkisi

Amino asit	Asp	Asn	Thr	Lys	Ile	Met
Optimum ekleme anı, sn	0	18	18	0	18	-
Optimum derişim, mM	7.5	5.0	7.5	2.5	15	-
Aktivite değeri, U/cm ³	1067	1114	964	874	1053	-
Aktivite artış miktarı	1.35	1.38	1.32	1.12	1.25	Azalma

Çizelge 5.2 Aspartik asit grubu amino asitlerin *r-Bacillus* türü mikroorganizmalar ile enzim üretimine etkisi

Mikrorganizma	Asp	Asn	Thr	Lys	Ile	Met
<i>r-B.licheniformis</i>	1.35	1.38	1.32	1.12	1.25	azalma
<i>r-B.subtilis</i>	1.28	1.25	1.30	1.67	azalma	1.41
<i>r-B.amyloliquafaciens</i>	1.35	1.25	azalma	azalma	azalma	-
<i>r-B.sphaericus</i>	1.35	azalma	1.26	1.22	1.35	-

Çizelge 5.2’de görüldüğü gibi farklı *r-Bacillus* türlerinde farklı amino asitlerin aktiviteyi olumlu ya da olumsuz farklı oranlarda etkilediği, bunun sebebinin de mikroorganizmaların regülasyon mekanizmalarının birbirinden farklı olmasından ileri geldiği belirlenmiştir.

Aspartik asit grubu amino asitlerin regülasyon mekanizmaları incelendiğinde ise bu amino asitlerin hücre içi biyosentez ve katabolizma tepkimelerini katalizleyen enzimler ile üretim ortamına amino asit eklendiği koşullarda metabolik yolları üzerinde meydana gelen inhibisyonların doğrudan ilişkisi olabileceği düşünülmüştür. Bu regülasyonlar her mikroorganizma için farklılık göstermekle birlikte incelenen amino asit derişim aralığı da önemlidir.

Maksimum aktivitenin gözleendiği optimum derişimde (7.5 mM) Asp eklenen prosesin hücre içi Asp grubu amino asit biyosentez akıları incelendiğinde Lys yolizi akılarının referans prosese göre düşük olması (R55, R56, R57, R58, R59) diğer dallanma noktasındaki HSer, Thr, Ile, Met (R60, R61, R62, R63) akılarının ise yüksek olması sonucu, ortama eklenen Asp tarafından Lys yolizinde yer alan dihidropikolinat sentaz enziminin inhibisyona uğradığı ve Lys yolizini inaktif duruma getirdiği belirlenmiştir. Literatürde dihidropikolinat sentaz enziminin hangi amino asitler tarafından inhibisyona uğradığı bilinmemektedir.

Maksimum aktivitenin gözleendiği optimum derişimde (5.0 mM) Asn eklenen proseste hücre içi Asp grubu amino asit biyosentez akıları incelendiğinde Lys yolizi akılarının (R55, R56, R57, R58, R59) referans prosese göre yüksek olması ve Thr, Ile, Met (R61, R62, R63) akılarının ise düşük olması sonucu, homoserin dehidrojenaz enziminin inhibisyona uğradığı ve Thr, Met, Ile üretiminin inaktif hale geldiği belirlenmiştir. Ayrıca hücre dışı amino asit derişimleri incelendiğinde hücre dışında Thr, Met ve Ile derişimlerinin düşük olması bu amino asitlerin mikroorganizma tarafından hücre içine alınıp kullanıldığını göstermiştir. Literatürde homoserin dehidrojenaz enziminin Met, Ile, Thr tarafından inhibisyona uğradığı halde Asn tarafından herhangi bir inhibisyona uğradığı belirtilmemiştir.

Diğer taraftan maksimum aktivitenin gözlemlendiği optimum derişimde (7.5 mM) Thr eklenen proste Asp grubu amino asitlerin biyosentez akılarının hepsinde referans proste göre artış gözlenmesi sonucunda tüm yolizleri üzerindeki enzimlerin herhangi bir inhibisyona uğramadığı anlaşılmıştır. Literatürde Thr eklendiğinde homoserin dehidrojenaz, aspartokinaz III ve homoserin kinaz enzimlerinin inhibisyona uğradığı verilmesine rağmen, bu çalışmada böyle bir inhibisyon etkisinin görülmemesinin proste eklenen amino asitin optimum derişimde olmasının da etkili olduğu sonucuna varılmıştır.

Maksimum aktivitenin gözlemlendiği optimum derişimde (15 mM) Ile eklenen proste dihidropikolinat sentaz enziminin inhibisyona uğradığı Lys yolizi akılarının (R55, R56, R57, R58, R59) referans proste göre düşük olmasından ve diğer dallanma noktası akılarının HSer, Met, Ile, Thr (R60, R61, R62, R63) yüksek olmasından anlaşılmıştır. Ayrıca hücre dışında Lys derişiminin referans ortama göre düşük olması bu amino asitin hücre dışından mikroorganizma tarafından alınarak kullanıldığını göstermiştir. Literatürde dihidropikolinat sentaz enziminin hangi amino asitler tarafından inhibisyona uğradığı ile ilgili herhangi bir bilgi bulunmamaktadır.

Aspartat semialdehitten çıkılarak dihidropikolinat sentezlenmesi ve Lys oluşumu regülasyon basamakları incelendiğinde optimum derişimde Lys (2.5 mM) eklenmesi sonucunda Lys yolizinin akı değerlerinin (R55, R56, R57, R58, R59) düşük olması, diğer dallanma noktası olan HSer, Thr, Met akılarının (R60, R61, R63) yüksek olması, Ile sentez akısının (R62) ise sıfır olması Lys yolizindeki dihidropikolinat sentaz enziminin inhibe olduğu ve bundan dolayı Thr ve Met dallanmasının aktif hale geldiğini göstermiştir. Hücre dışı amino asit derişimleri incelendiğinde Thr derişiminin referans ortama göre yüksek olması bu amino asitin mikroorganizma tarafından hücre içinde üretildiğini göstermiştir. Diğer yandan Ile biyosentez akısının sıfır olması sonucunda treonin sentaz enziminin de inhibisyona uğradığı ve hücreiçi üretiminin gerçekleşmediği sonucuna ulaşılmış ve bu amino asitin hücre dışı derişimleri incelendiğinde de ortamda hiç bulunmadığı ve mikroorganizma tarafından kullanıldığı belirlenmiştir. Literatürde dihidropikolinat sentaz enzimini inhibe eden amino asitler bilinmemektedir.

Homoserin üzerinden Met ve Thr sentez regülasyonu incelendiğinde ortama Met ilave edildiğinde en fazla inhibisyonun gözleendiği proseste ($C_{Met}=0.4$ mM) Lys yolizinin akı değerlerinin (R55, R56, R57, R58, R59) düşük , HSer, Thr, Met (R60, R61, R63) akılarının ise referans proses akılarına göre yüksek olduğu belirlenmiş ve bu sonuçlarla birlikte lizin yolizi üzerindeki dihidropikolinat sentaz enziminin inhibe olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca hücre dışında Lys derişiminin düşük olduğu belirlenmiş ve bu amino asitin hücre içine alınarak kullanıldığı görülmüştür. Literatürde dihidropikolinat sentaz enzimini inhibe eden amino asitler belirtilmemiştir. Ayrıca metionin yapısında bulunan kükürt bileşenin SAP üretimini inhibisyona uğrattığı belirlenmiştir.

Metabolik yolizi analizinin sonucunda SAP üretiminde ortama optimum ekleme anında ve optimum derişimde eklenen Asp, Asn, Thr, Ile, Lys'nin SAP üretimini arttırarak üretimde bir darboğaz olmaktan çıktığı belirlenmiş, bu çalışmadan sonra yapılacak çalışmalarda mikroorganizmalarda regülasyon mekanizmaları dikkate alınarak genetik modifikasyon yapılması durumunda üretimin daha fazla arttırabileceği sonucuna ulaşılmıştır.

KAYNAKLAR

- Aiba, S., Humphrey, A.E. and Miles, N.F. 1973.** Biochemical Engineering, Academic
- Bailey, J.E., and Ollis, D.F. 1986.** Biochemical Engineering Fundamentals, 2nd Edition, Mc Graw Hill, New York.
- Bayram, A. 2002.** Serin Alkali Proteaz Enziminin Hücreiçi Üretimini Kontrol Eden Alanin-ve Serin- rubu Amino Asitlerin Enzim Üretimine Etkisi. Yüksek Lisans Tezi, F.B.E., Ankara Üniversitesi, Ankara.
- Cohen, A. 1983.** The PICO. TAG system: A new Method t o Analyze Primary and Secondary Amino Acids with one Picomole Sensivity, Bio Techniques, sep/oct, 273-274.
- Çalık, P. 1998.** Serin Alkali Proteaz Üretimi İçin Biyoproses Geliştirilmesi. Doktora Tezi, F.E.B., Ankara Üniversitesi, Ankara.
- Çalık, P., G., Takaç, S. And Özdamar, T.H. 1999.** Metabolic Flux Analysis for Serine Alkaline Protease Fermentation by *Bacillus licheniformis*: use of citric acid as the carbon source. Enzyme Microb. Technol., 23:451-461.
- Çalık and Özdamar. 1999.** Mass Flux Balance-Based Model and Metabolic Pathway Engineering Analysis for Serine Alkaline Protease Synthesis by *Bacillus licheniformis*. Enzyme and Microbial Technology, 24, 621-635.
- Çalık, P., Takaç, S., Çalık, G., Özdamar, T. H. 2000.** Serine Alkaline Protease Overproduction Capacity of *Bacillus licheniformis*. Enzyme and Microbial Technology, 26:45-60.
- Çalık, P., Çalık, G., Özdamar, T.H. 2000.** Oxygen Transfer Strategy and its Regulation Effects in Serine Alkaline Protease by *Bacillus licheniformis*. Biotechnol.Bioeng., 69:301-311.
- Erincin, H. 1998.** Hidrojen İyonu Değişimi ve Kontrolünün Alkali Proteaz Üretim Etkisinin Reaksiyon Mühendisliği Prensipleriyle İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, F.B.E., Ankara Üniversitesi, Ankara.
- Frankena, J., Verseveld, H.W. and Stouthamer, A. H. 1985.** A Continous Culture Study of The Bioenergetic Aspects of Growth and Production of Exocellular Protease in *Bacillus licheniformis*. Appl. Microbial. Biotechnol., 22:169-176.
- Frankena, J., Koningstein, G.M., Verseveld, H.W. and Stouthmer, A.H. 1986.** Effect of Different Limitations in Chemostat Cultures on Growth and Production of Exocellular Protease by *licheniformis*. Appl. Microbial. Biotechnol., 24:106-112

- Frost, G.M., and Moss, A.D. 1987.** Production of Enzymes by Fermentation. Rehm, N.J., Reed, G., (Eds), Vol 7a, VCH, Weinheim, Germany, Pp:65-213.
- Greenberg, D.M. 1972.** Metabolic Pathways, 3rd Edition, Vol.III, Academic Pres, New York.
- Hanlon, G.W. And Hodges, N.A., 1981.** Bacitracin and protease production in relation to sporulation during exponential growth of *Bacillus licheniformis* on poorly utilised carbon and nitrogen sources, J, Bacteriol., 147, 427-431.
- Hanlon, G.W. And Hodges, N.A. and Russell, A.D., 1982.** The influence of glucose, ammonium and magnesium availability on the production of protease and bacitracin by *Bacillus licheniformis*, J. Gen. Microbiol., 128, 845-851.
- Hübner, U., Bock, U. And Schügerl, K., 1993.** Production of alkaline serine protease subtilisin Carlsberg by *Bacillus licheniformis* on complex medium in a stirred tank reactor , Appl. Microbiol. Biotechnol., 40, 182-188.
- Kalisz, H.M. 1988.** Microbial Proteinase. Advanced in Biochemical Engineering/Biotechnology, Fiecher, A., (Editor), Springer-Verlang, Berlin.
- Kalender, N. 1 999.** Biyoteknolojik Üretim İçin Rekombinant Mikroorganizma Geliştirilmesi, Yüksek Lisans Semineri, Ankara Üniversitesi, Ankara.
- Lehninger, A.L. 1979.** Biochemistry, 2nd Edition, Worth Publisher Inc., p:71-93, New York, NY.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L., and Cox M.M. 1993.** Principles of Biochemistry, 2nd Edition, Worth Publisher Inc, New York, NY.
- Lewin, B. 1997.** Genes VI, Oxford University Press, Oxford.
- Miller, G.L. 1959.** Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Analytical Chemistry, 31:p. 426-428.
- Mark, F.M. and Othmer, D.F. 1983.** Encyclopedia of Chemical Technology, 3rd Edition, John Wiley and Sons Inc. Pres, New York, Pp:173-219.
- Moon, S.H. and Parulekar, S.J. 1991.** A Parametric Study of Protease Production in Batch and Fed-Batch Cultures of *Bacillus firmus*. Biotechnol. Bioeng., 41: 43-54
- Paulus, H., 1993.** Biosynthesis of Aspartate Family of Amino acids. In: Sonenshein A.L., Hoch J.A., Lorich R, editors. *Bacillus subtilis* and Other Gram-positive Bacteria: Biochemistry Physiology, and Molecular Genetics. Washington, DC: American Society for Microbiology. 237-267.

Priest, F.G. 1993. Extracellular Enzyme Synthesis in the Genus *Bacillus*, *Bacteriol. Rev* 41: 711-753

Stryer, L. 1995. Biochemistry, 4th Edition, W.H. Freeman and Company, New York.

Tüzün, C. 1992. Biyokimya, 2. Baskı, Palme Yayınları, Ankara.

Watson, J.D., Gilman, M., Witkowski, J. And Zoller, M. 1992. Recombinant DNA, 2nd Edition, Scientific American Books, W.H. Freeman and Co.

Wright, C.P., Whitney, G.K., Daugulis, A.J. and White, B.N. 1992. Enhancement and Regulation of Extracellular Protein Production by *Bacillus brevis* 47 Through Manipulation of Cell Culture Conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, 40(1):46-52

E K L E R

EK 1 Mikroorganizma Derişimi Kalibrasyonu

EK 2 Serin Alkali Proteaz (SAP) Aktivitesi Kalibrasyonu

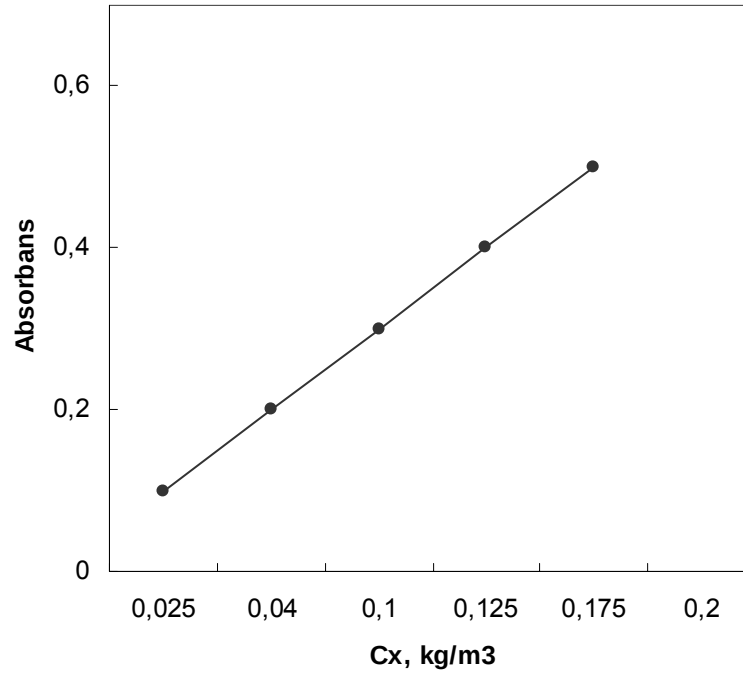
EK 3 DNS Yöntemi İçin İndirgenmiş Şeker Derişimi Kalibrasyonu

EK 4 DNS Yöntemi ile Toplam İndirgenmiş Şeker Tayini İçin Reaktif

Hazırlanması

EK 5 Amino asitlerin kalma süreleri

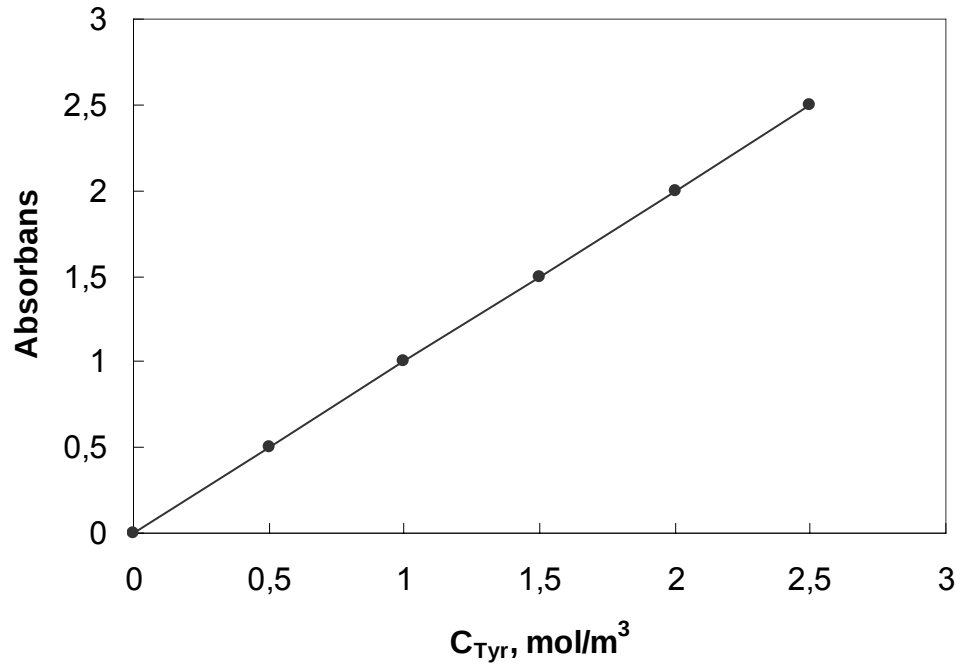
EK 1 Mikroorganizma Derişimi Kalibrasyonu



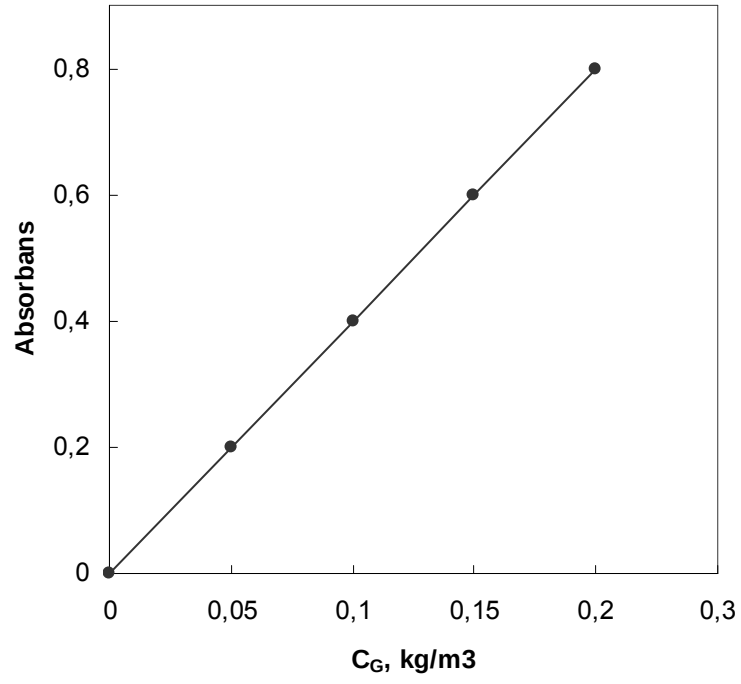
EK 2 Serin Alkali Proteaz (SAP) Aktivitesi Kalibrasyonu

SAP aktivitesi, enzimin kazein ile enzimatik hidrolizi sonunda açığa çıkan hidrolizatların absorbansının ölçülmesi ile belirlenmektedir. Enzimatik hidrolizi sonunda açığa çıkan hidrolizatlar arasında en fazla tirozin derişiminin olduğu ve diğer ürünlerin ise bunun yanında ihmal edilebilir derişimlere sahip olduğu varsayımı ile farklı derişimlerde hazırlanan tirozin çözeltilerine karşı 275 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri okunmuştur. Elde edilen veriler şekilde gösterilmiş ve SAP aktivitesi denklem (E.1)'de tanımlanmıştır.

$$A = \frac{(E_{\text{gim}} \times \text{Absorbans}) \mu\text{mol/ml} \times S_f}{20\text{dk}} \times \frac{10^3}{1\mu\text{mol}} \times \frac{1\text{U}}{4\text{nmol/dk}} \quad (\text{E.1})$$



EK 3 DNS Yöntemi İçin İndirgenmiş Şeker Derişimi Kalibrasyonu



EK 4 DNS Yöntemi ile Toplam İndirgenmiş Şeker Tayini İçin Reaktif Hazırlanması

1. a) 880 cm^3 %1 (W/v)'lik DNS çözeltisi hazırlanır.
8.8 gr dinitrosalisilik asit (DNS) tartılarak 880 cm^3 damıtık suda çözülür.
- b) 225 g ROCHELLE tuzu (sodyum potasyum tartarat çözeltiye eklenerek karıştırılır.
- c) Bu çözeltiye 300 cm^3 %4.5 NaOH çözeltisi eklenir.
%4.5 NaOH çözeltisi, 13.5 gr NaOH 300 cm^3 damıtık suda çözülerek hazırlanır.
2. a) 22 cm^3 %10 NaOH çözeltisi hazırlanır.
gr NaOH 22 cm^3 damıtık suda çözülür.
- b) Çözeltiye 10 gr kristalize fenol katılır ve karışıma 100 cm^3 damıtık su ilave edilir.
- c) Bu alkali fenol karışımından 60 cm^3 alınarak 6.9 gr NaHCO_3 ile karıştırılır.

Birinci basamaktan elde edilen DNS-alkali çözeltisine ikinci basamakta elde edilen çözelti eklenerek ROCHELLE tuzu çözülünceye kadar karıştırılır. Hazırlanan çözelti koyu renkli bir şişede saklanır ve hazırlandıktan 48 saat sonra kullanılır.

EK 5 Amino asitlerin kalma süreleri

Amino asit	Kalma süresi	Alan
Asparajin	3.4	391760
Aspartik asit	3.717	335777
Glutamik asit	4.567	642293
Serin	6.733	667187
Glisin	7.267	506892
Histidin	7.783	671482
Arginin	8.050	584854
Triyonin	8.450	525722
Alanin	8.733	1037038
Pirolin	9.017	797203
Tirozin	10.750	687203
Valin	11.500	979836
Metionin	11.800	641708
Sistein	12.017	692907
İzolözin	12.783	441157
Lözin	12.883	396279
Fenilalanin	13.050	643453
Triptofan	13.130	1071105
Ornitin	13.367	666594
Lizin	13.567	434495

ÖZGEÇMİŞ

Adı soyadı : Bahar TOSUN ERCAN

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Tarihi : 30/03/1976

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu :

Lise : Edremit Lisesi(1993)

Lisans : Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği (1998)

Yüksek Lisans :Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı
(2007)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl :

Yıldız Döküm A.Ş. 2002

Ünlü&Kubilay Boya A.Ş. 2005 (Halen devam ediyor)