

***Pseudomonas aureofaciens*'de mcl-PHA'ların Hücre içi
Yıkım Metabolitlerinin Profillenmesi**

Program Kodu: 1001

Proje No: 113 Z 813

Proje Yürütücüsü:
Prof. Dr. Nurdan PAZARLIOĞLU

Araştırmacılar:

Doç.Dr. Hasan ERTAŞ

Doç.Dr. Hatice ARDAĞ AKDOĞAN

Doç.Dr. Yurdanur AKGÜL

Öğr. Gör. Dr. Emre ERDEN ÇAKMAKLI

Danışmanlar:

Bursiyerler:

Gözde (ODABAŞ) BUYURAN

Tuncay AVCI

AĞUSTOS 2019
ANKARA

1. GİRİŞ

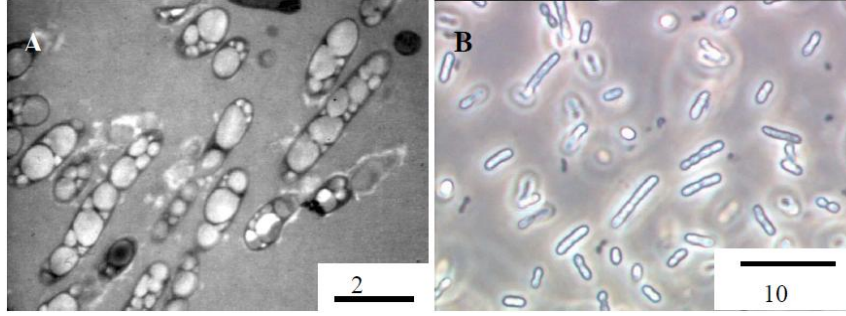
Petrokimya endüstrisinin bir ürünü olan plastikler uzun yıllardan beri evsel, medikal, otomobil, gıda ve elektronik gibi çeşitli alanlarda kullanılan metal ve ahşap gibi çeşitli malzemelerin yerine oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Keshavarz ve Roy, 2010). Petrol bazlı plastiklerin yaygın şekilde kullanımının başlıca sebepleri; plastiklerin dayanıklı ve ucuz olmaları, hammadde fiyatlarının düşük olması, kimyasal yollarla farklı şekil ve sertlik gibi istenilen özelliklerin kolayca kazandırılabilmesidir.

Petrokimya ürünü geleneksel plastiklerin birçok avantajına rağmen doğada parçalanmadan uzun bir süre kalmaları, insanların çevreye karşı olan kaygılarının artması ve ham petrol fiyatlarındaki durdurulamaz yükseliş bilim insanlarını ve resmi kurumları petrol bazlı plastiklere alternatiflerin geliştirilmesine itmiştir (Chanprateep, 2010; Khanna ve Srivastava, 2007). Bu bağlamda plastiklerin sahip olduğu fiziksel ve kimyasal özelliklere de sahip olan, biyolojik olarak parçalanabilen biyobozunur plastiklerin geliştirilmesine olan ilgi her geçen gün giderek artmaktadır. Biyobozunur plastiklere örnek olarak polihidroksialkanoatlar (PHA), alifatik polyesterler, polisakkaritler ve nişasta bazlı polimerler ile bunların kopolimerleri verilebilir (Purwadi, 2006).

1.1 Polihidroksialkanoatlar

Polihidroksialkanoatlar (PHA), çeşitli mikroorganizmalar tarafından stres koşulları altında sentezlenen hidroksialkanoat temelli biyopolimerlerdir. Bu stres koşulları karbon kaynağının aşırısının bulunduğu fakat esansiyel nütrientlerin sınırlandırıldığı koşullardır ve mikroorganizma PHA' yı karbon, enerji ve/veya indirgeyici güç olarak sentezler (Keshavarz ve Roy, 2010; Choi vd., 1998; Madison ve Huisman, 1999; Lee ve Choi, 1999).

PHA mikroorganizmalar tarafından hücre içi granüller halinde depolanır ve yine hücre tarafından sentezlenen depolimerazlar ile kolaylıkla parçalanarak metabolize edilir. Şekil 1.1'de hücre içi PHA granüllerine ilişkin farklı gösterimler verilmektedir (Loo ve Sudesh, 2007).

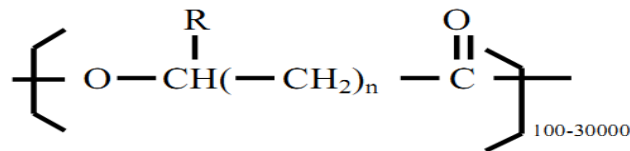


Şekil 1.1 *Wautersia eutropha* H16 suşuna ait PHA granüllerinin Transmission Elektron Mikroskobu (TEM) ve faz kontrast mikroskobu görüntüleri.

PHA'lar doğal üretici organizmalara buldukları çevrede çeşitli avantajlar kazandırmaktadır. Yapılan çalışmalar mikroorganizmanın PHA' ları kullanarak çeşitli ekolojik ortamlarda sınırlı besin şartlarında hayatta kalabilmelerine, hücre hareketleri ve biyolojik azot fiksasyonu için enerji sağlamaya, spor ve kist oluşturmaya, ekzopolisakkarit üretiminin kontrolüne; sıcaklık, soğukluk, ozmotik basınç gibi çeşitli çevresel stres koşullarına dayanabilmelerine yardımcı oldukları belirlenmiştir (Chen, 2010). Aynı zamanda PHA' ların birçok mikroorganizma türü tarafından toprak, göl ve akarsu gibi doğal bir ekosistemde kolaylıkla parçalanabildiğine ilişkin birçok çalışma bulunmaktadır (Boyandin vd., 2012; Margaert vd., 1996; Mukai vd., 1993). Bu çalışmalar PHA'ların bir biyobozunur polimer ailesi olduğunu açıkça göstermektedir.

PHA'lar R-hidroksialkanoik asit monomerlerinden oluşan termoplastik ya da elastomerik özellikteki poliesterlerdir ve her bir monomerinin yapısında bulunan karbon atomu sayısına bağlı olarak üç temel gruba ayrılabilirler (Keshavarz ve Roy, 2010; Lee, ve Choi, 1999; Suriyamongkol vd., 2007). Şekil 1.2'de PHA' ların genel yapısı şematize edilmiştir (Ojumu vd., 2004).

- Kısa yan zincirli PHA'lar (scl); 3-5 karbon atomu,
- Orta yan zincirli PHA'lar (mcl); 6-14 karbon atomu,
- Uzun yan zincirli PHA'lar (lcl); 14'ten daha fazla karbon atomu içerenler



n=1	R= hidrojen	Poli (-3-hidroksi propiyonat)
	Metil	Poli (-3-hidroksibütirat)
	Etil	Poli (-3- hidroksivalerat)
	Propil	Poli (-3-hidroksihegzanoat)
	Pentil	Poli (-3-hidroksioktanoat)
	Nonil	Poli (-3-hidroksidodekanoat)
n=2	R= hidrojen	Poli (-4-hidroksibütirat)
n=3	R= hidrojen	Poli (-5-hidroksivalerat)

Şekil 1.2 Polihidroksialkanoatların genel yapısı.

1.2 Polihidroksialkanoatların Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Hücre içi depo granülü şeklinde sentezlenen ve biriktirilen PHA' lar, yapısında kısa zincirli 3-hidroksi yağ asitlerini içeren ve tekrarlanan hidrofobik birimlerden oluşan uzun biyopolimerlerdir (Yılmaz ve Beyatlı, 2003). Bir PHA zincirinde, bir 3-hidroksi yağ monomerinin karboksil grubu ile bir sonraki monomerin hidroksil grubu ester bağı yapar ve 50 KDa ile 1000 KDa arasında değişen molekül ağırlığına sahiptir polimer oluşur (Madison ve Huisman, 1999).

Polimer yapısındaki monomerin yan zincir uzunluğu PHA' ların termal ve mekanik özelliklerinin belirlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. PHA' lar bu kompozisyon farklılıkları nedeniyle farklı fiziksel özelliklere sahiptir (Khanna ve Srivastava, 2005). Fiziksel özelliklerine bakıldığında kısa yan zincirli (scl) PHA moleküllerinin sert, kırılğan ve yüksek kristallenme derecesine sahip olduğu görülürken diğer yandan orta yan zincirli (mcl) PHA'lar esnektir ve daha düşük kristallenme derecesine, gerilme kuvvetine ve erime noktasına sahiptir (Philip vd., 2007). Bu nedenlerden ötürü scl-PHA'lar termoplastik özellik gösterir ve polipropilen veya polietilen gibi geleneksel plastiklere benzer fiziksel özelliklere sahiptirler, bununla birlikte mcl-PHA'lar ise amorf yapıdadır ve elastomerik özellik gösterirler (Li vd., 2007).

1.3 Polihidroksialkanoatların Kullanım Alanları

Polihidroksialkanoatlar, petrol türevli plastiklerle benzer fiziksel özelliklere sahip oluşu, biyobozunur olması, canlı sistemlerde toksik olmaması ve farklı fermantasyon stratejileri ile istenilen özelliklerde üretilebilmesi sayesinde bir çok alanda hammadde ve biyomateryal olarak kullanım olanağı bulabilmektedir (Lee, 1996; Chen, 2010).

Aşağıda PHA' ların yukarıda bahsi geçen ve diğer kullanım alanları maddeler halinde özetlenmiştir.

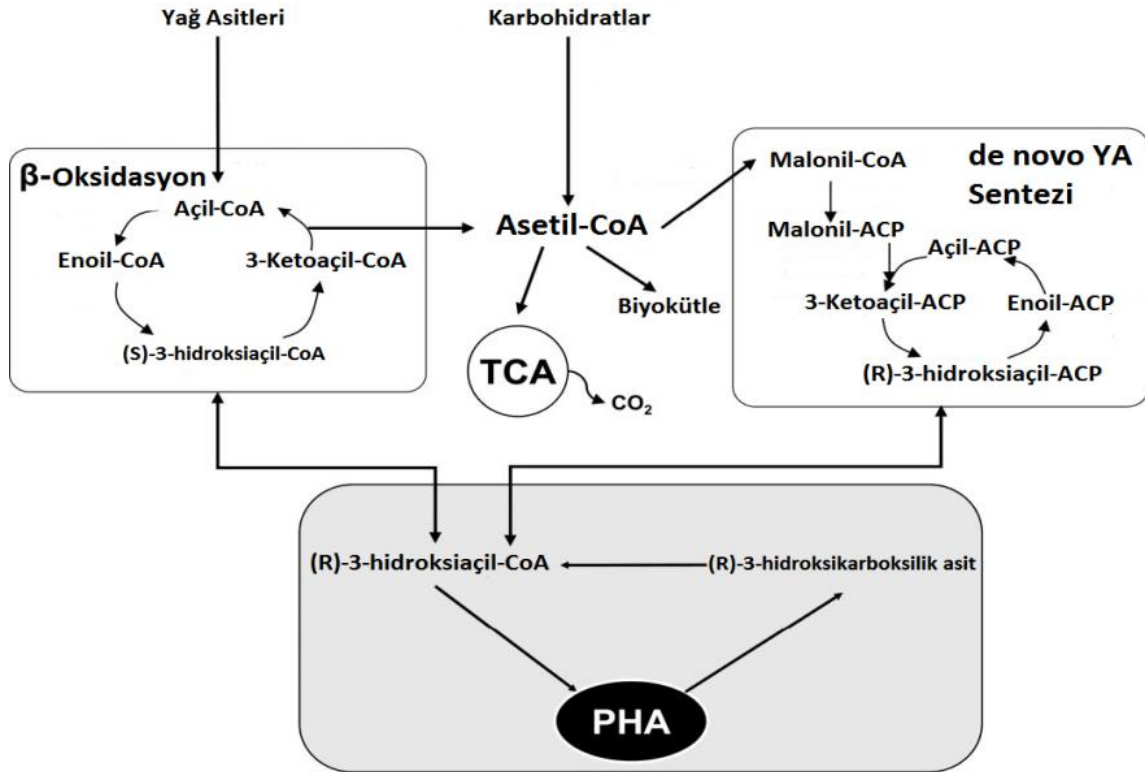
1. Ambalaj filmleri, poşetler, torbalar, çeşitli kaplar üretimi
2. Kontrollü ilaç ve gübre salınımı
3. Tek kullanımlık tıraş bıçağı, bebek bezi, çatal, bıçak, tabak üretimi
4. Şampuan ve meşrubat şişeleri, karton süt kutularının iç yüzey kaplamaları
5. Cerrahi pens, ameliyat ipliği, eldiven, önlük ve maske üretimi
6. Pansuman sargısı üretimi
7. Kemik değiştirilmesi ve cerrahi plakalar üretimi
8. Bitki sulama boruları, bitki yapraklarının kaplanması
9. Kiral bileşenler üretiminde çıkış materyali
10. Piezoelektrik özelliklerinden yararlanılarak kemik büyütülmesi ve tedavisi
11. Kan damarı değiştirilmesi
12. Gıda ürünlerinde nem ve oksijene karşı koruma
13. Gıda ürünlerinde parlaklık sağlama, aroma kaybını önleme.

1.4 Polihidroksialkanoatların Biyosentezi

Mikrobiyal poliesterler ve polihidroksialkanoatlar (PHA'lar) olarak da adlandırılan bu bakteriyel poliesterler, bir karbon kaynağının aşırısının ve bir esansiyel nütrientin de sınırlı bulunmasının yol açtığı dengesiz büyüme koşullarında meydana gelen metabolik stresin sonucu olarak üretilirler.

Polihidroksialkanoatların biyosentezi, mikroorganizmanın ürettiği polimerin monomer kompozisyonuna, kullandığı karbon kaynağının türüne ve konsantrasyonuna bağlıdır.

P.aureofaciens karbon kaynağı olarak karbohidratların yanı sıra alifatik alkanları, açıl alkoller ve yağ asitlerini kullanarak mcl-PHA'ları sentezleyebilmektedir. Karbon kaynağı olarak oktanoik asit kullanıldığında (R)-3-hidroksioktanoik asit (main) ve (R)-3-hidroksiheksanoik asit (minör) ko-poliesterlerini; glukonik asit kullanıldığında (R)-3-hidroksidekanoik asit (main) ve (R)-3-hidroksidodekanoik asit (minör) ko-poliesterlerini üretmektedir (Escapa I.F vd., 2012). Bu durum bu genus türlerinin doğal bir özelliğidir. Bu özellik PHA biyosentezinin yağ asidi de novo biyosentezi ve yağ asidi β -oksidasyonuna bağlı olduğunu göstermektedir (Şekil 1.3).



Şekil 1.3 Pseudomonad'larda PHA biyosentezinde yer alan metabolik yollar.

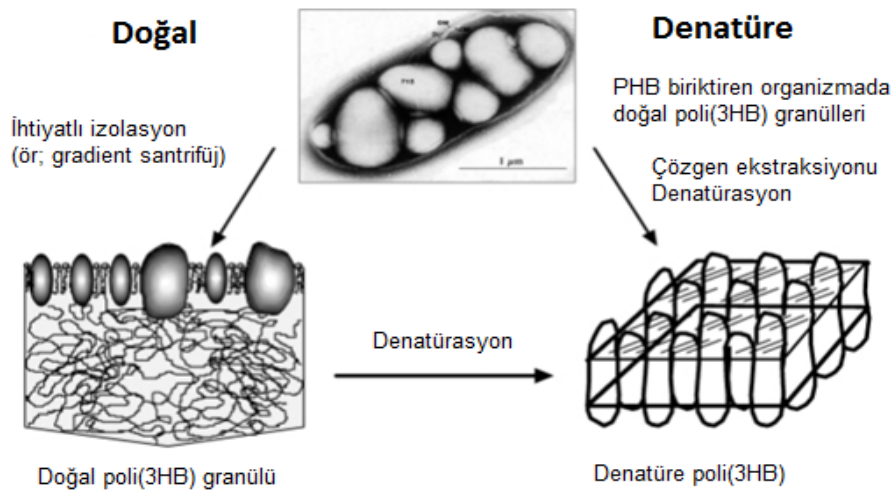
1.5 Polihidroksialkanoatların Degradasyonu

PHA'lar toprak, çamur ve deniz suyu gibi farklı ekosistemlerde yaşayan bakteri ve fungus gibi birçok mikroorganizma tarafından biyolojik olarak H₂O ve CO₂' e kadar parçalanabilmektedir (Santimono vd., 2009). Katı ve sıvı halde bulunan PHA molekülleri bu mikroorganizmalar tarafından salgılanan depolimeraz ya da hidrolaz enzimleri aracılığıyla suda çözünebilir oligomer veya monomere parçalanırlar ve bu parçalanma ürünleri besin kaynağı olarak yada tekrardan PHA' ların biyosentezinde kullanılırlar. Kısa zincir uzunluklu ve orta zincir uzunlukta PHA' ların degradasyonu bunlara spesifik PHA depolimeraz enzimleri ile gerçekleştirilmektedir (Domb vd., 1998; Madison and Huisman, 1999).

PHA'ların, PHA depolimeraz ile enzimatik hidrolizi; iki şekilde gerçekleşmektedir. Bunlardan birincisi ekstraselüler (dışı hücre) PHA degradasyonu, diğeri ise intraselüler (hücre içi) PHA degradasyonudur (Jendrossek ve Handrick, 2002).

1.5.1 Ekstraselüler PHA Degradasyonu

Ekstraselüler PHA degradasyonu; ekstraselüler PHA depolimeraz sentezleyen bir mikroorganizma tarafından, PHA biriktiren bakterilerin ölümü ve hücre lizisi sonrası açığa çıkan PHA'ların kullanımınıdır. Bilindiği gibi PHA hücre içerisinde granüler halde depolanır ve granül içerisindeki PHA poliesterleri amorf haldedirler. Bu granüller fiziksel ve kimyasal strese duyarlı protein ve fosfolipidlerden oluşan yüzey tabakasına sahiptirler. PHA hücreden ekstrakte edildiğinde, granül yüzeyi hasar görmekte ve polimer zincir helikal konformasyona adapte olma eğilimi göstermektedir. Buna bağlı olarak da polimer intraselüler polimerazların etki edemeyeceği kristalize hale gelmektedir (Şekil 1.4) (Amara ve Salem, 2007).



Şekil 1.4 PHA'nın doğal ve denatüre haldeki fiziksel durumu (Jendrossek ve Handrick, 2002).

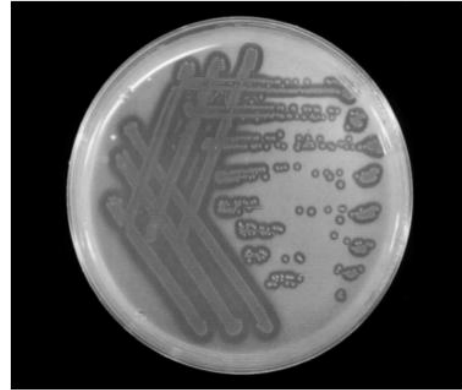
Kristalize haldeki polimerler sadece ekstraselüler PHA depolimerazlar tarafından hidrolizlenmektedir. Mikroorganizmaların PHA' ları ekstraselüler olarak degrade edebileme yeteneği hücre dışına ekstraselüler PHA depolimeraz enzimini salgılayabilmesine bağlıdır ve bu sayede hücre suda çözünemeyen polimeri suda çözünebilir monomer ve/veya oligomere hidrolizleyebilmektedir (Jendrossek ve Handrick, 2002).

Ekstraselüler depolimerazlar üzerine yapılan çalışmalarda genellikle *Paucimonas [Pseudomonas] lemoignei* bakterisi kullanılmıştır ve 7 tane depolimeraz sentezlediği saptanmıştır (PhaZ1-PhaZ7). Bu depolimerazlar amorf PHB'nin hidrolizinde kooperatif etki gösterirler. Kısa zincir uzunluklu ve orta zincir uzunlukta PHA'ların degradasyonu bunlara spesifik PHA depolimeraz enzimleri ile gerçekleştirilmektedir. Günümüzde prokaryotik ve ökaryotik mikroorganizmalardan 80'den fazla ekstraselüler PHA depolimeraz enzimi saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir (Kim vd., 2005).

Ekstraselüler depolimerazlar benzer enzimatik özelliklere sahiptirler benzer. Örneğin; sıcaklık, iyon şiddeti ve pH değişimlerine karşı yüksek stabilite gösterirler . Molekül ağırlıkları diğer depolimerazlara nazaran küçüktür (<70kDa), genellikle tek bir polipeptitten oluşurlar. Alkali pH değerlerinde aktivite gösterirler (pH 7,5-9,8) ve hidrofobik materyallere yüksek afinite göstermelerinden dolayı saflaştırılmalarında hidrofobik etkileşim kromatografisi kullanılır (Jendrossek ve Handrick, 2002).



A



B

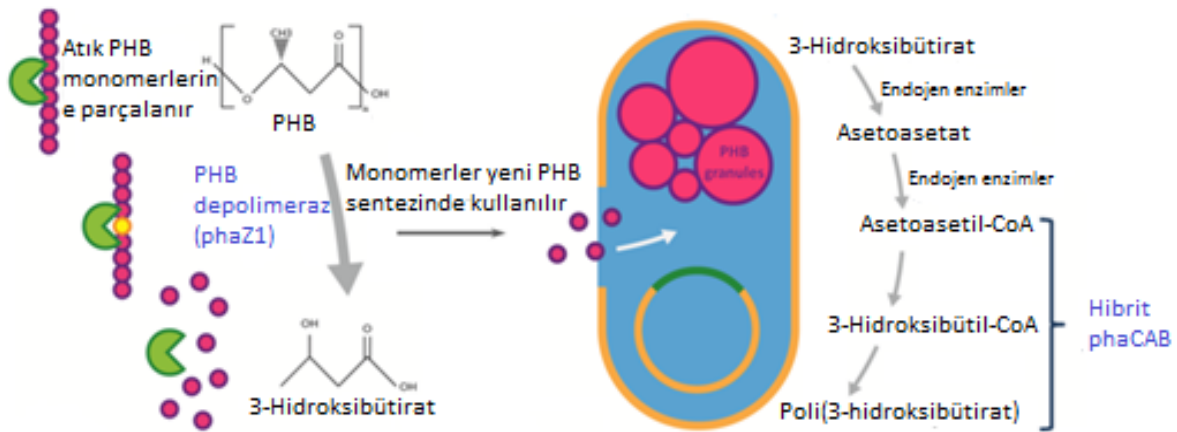
Şekil 1.5 (A) Aerobik arıtma çamurunda P(3HB-3HV) 'nin biyobozunumu. P(3HB-3HV)'den yapılan şişeler yaz süresince (ortalama 20°C) aerobik arıtma çamurunda inkübe edilmişlerdir. Fotoğrafta görülen şişeler 0, 2, 4, 6, 8 ve 10 hafta sonunda çamurdan alınıp fotoğrafları çekilmiştir (Madison ve Huisman, 1999). (B) Karbon kaynağı ve enerji kaynağı olarak poli(3HB) kullanılan ortamda poli(HASCL)-degrade eden bakterinin büyümesi. Şeffaf bölge oluşumu suda çözünemeyen polimerin suda çözünebilir ürünlere ekstraselüler hidrolizini göstermektedir.

PHA biyopolimerlerinin doğada parçalanması polimerin kompozisyonuna, fiziksel yapısına (amorf, kristal), boyutuna ve en önemli olarak da çevre koşullarına bağlıdır. PHB filminin doğadaki bozunma hızı anaerobik çamurda birkaç hafta iken denizel ekosistemlerde ise birkaç yıl sürebilmektedir (Madison ve Huisman, 1999). Canlı sistemlerde ise PHA'lar kan ve dokularda yer alan enzimler tarafından parçalanmaktadır (Keshavarz ve Roy, 2010; Ojumu vd., 2004).

1.5.2 İntraselüler PHA Degradasyonu

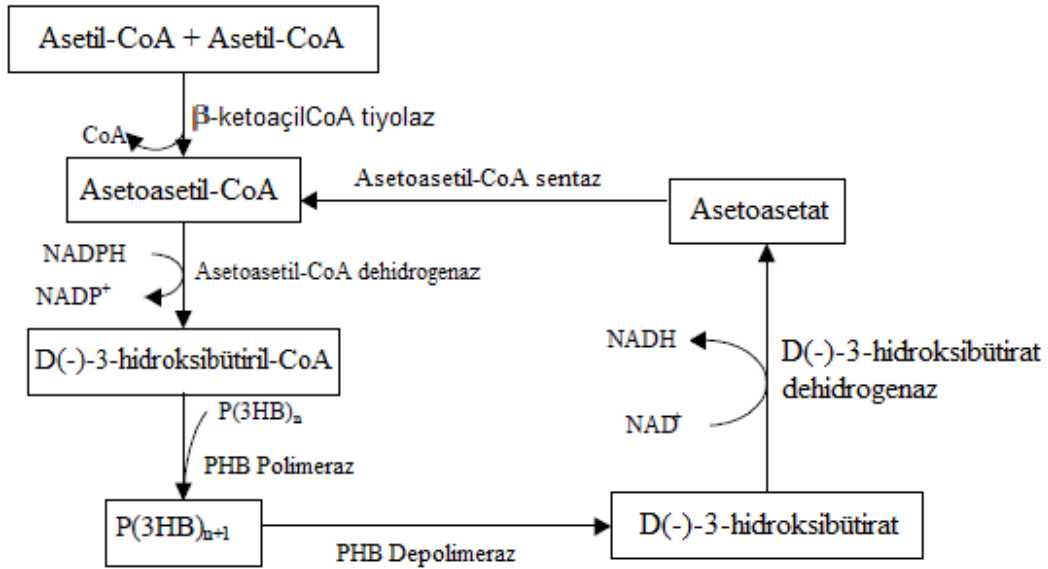
İntraselüler PHA degradasyonu polimerin hücre içerisindeki hidrolizi anlamına gelmektedir ve PHA biriktiren bakterinin kendisi tarafından gerçekleştirilmektedir. İntraselüler PHA degradasyonu buna spesifik olan intraselüler depolimeraz enzimi tarafından katalizlenmektedir. İntraselüler depolimerazlar, hücre içinde hareketli ve kristalize olmayan, sıvı haldeki doğal PHA polimerlerini hidrolizlemektedir. Fakat intraselüler degradasyonunun mekanizması ve regülasyonu tam olarak anlaşılabilmiş değildir.

PHA'ların intraselüler degradasyonu için yapılan çalışmalar sonucunda 3-Hidroksi alkanoatlar (3HA)'ların degradasyonu aydınlatılmıştır (Jendrossek vd., 2002). Şekil 1.6' da 3HA'ların Asetil-CoA'ya parçalanma mekanizması şematize edilmiştir. Şekilden de görüleceği gibi PHA depolimeraz enzimi PHA granülünü 3 HA monomerlerine parçalar ve ardından bir dehidrojenaz enzimi aracılığıyla bu monomerler asetilasetata oksitlenir. Sonrasında β -ketotiyolaz enzimi asetilasetatı Asetil-CoA'ya parçalamaktadır. Oksijenli bir ortamda Asetil-CoA sitrik asit döngüsünde CO₂'ye kadar parçalanmaktadır (Keshavarz ve Roy, 2007; Ojumu vd., 2004).



Şekil 1.6 3HA'ların Asetil-CoA'ya parçalanması (Imperial College, 2016).

Şekil 1.7' de *Ralstonia eutropha*'daki PHB' in biyosentezi ve yıkımı gösterilmektedir. Yıkım basamağında PHB depolimeraz, D(-)-3-hidroksibütirat dehidrogenaz ve asetoasetil-CoA sentaz enzimleri görev almaktadır. Oluşan asetoasetat organizmanın ihtiyacına göre Asetil-CoA' ya dönüştürülerek metabolizmada kullanılabileceği gibi Asetoasetil-CoA sentaz enzimiyle tekrar polimer sentezine de katılabilmektedir (Khanna ve Srivastava, 2005).



Şekil 1.7 *Ralstonia eutropha*'da PHB' in biyosentezi ve yıkımı (Khanna ve Srivastava, 2005).

1.5.3 PHA depolimerazlar (EC 3.1.1.75, EC 3.1.1.76)

PHA depolimerazlar (EC 3.1.1.75, EC 3.1.1.76) mono ve/veya oligomerik hidroksi alkanoat poliesterlerinin hidrolizini katalizlerler. PHA'ların, PHA depolimeraz ile enzimatik hidrolizi; iki şekilde gerçekleşmektedir. Bunlardan birincisi ekstraselüler (dışı hücre) PHA degradasyonu, diğeri ise intraselüler (hücre içi) PHA degradasyonudur. Ekstraselüler PHA degradasyonu; ekstraselüler PHA depolimeraz (e-PHA depolimeraz) sentezleyen bir mikroorganizma tarafından, PHA biriktiren bakterilerin ölümü ve hücre lizisi sonrası açığa çıkan PHA'ların kullanımınıdır. İntraselüler PHA degradasyonu polimerin hücre içerisindeki hidrolizi anlamına gelmektedir ve PHA biriktiren bakterinin kendisi tarafından gerçekleştirilmektedir. İntraselüler PHA degradasyonu buna spesifik olan intraselüler depolimeraz enzimi (i-PHA depolimeraz) tarafından katalizlenmektedir. İntraselüler depolimerazlar, hücre içinde hareketli ve kristalize olmayan, sıvı haldeki doğal PHA polimerlerini hidrolizlemektedir (Papageorgiou vd., 2008).

PHA'lar tamamen amorf yapıda ve yüzeyinde temelde proteinler bulunur. Bu tip PHA'lara doğal PHA'lar olarak adlandırılırlar. PHA granülleri bu yüzey tabakalarını kaybettiklerinde ya da bakteriden hücrenin dışına salındıklarında (liziz yoluyla) hızlıca denatüre olurlar ve parakristalin bir yapı oluşur (denatüre PHA'lar). Denatüre PHA'lar e-PHA depolimerazlar tarafından hidrolizlenirler. i-PHA depolimerazların biyokimyası ve kristal yapısına ilişkin çok az bilgi mevcuttur. Buna karşın 20' den fazla e-PHB depolimeraz enzimi saflaştırılıp, biyokimyasal olarak karakterize edilmiş ve gen seviyesinde karakterize edilmiştir. Çoğu e-PHB depolimeraz üç domainden oluşan serin hidrolaz sınıfına aittir. Bu domainler büyük bir katalitik C-terminal domaini, substrat bağlanan N terminal domaini ve bağlayıcı (linker) domainidir (Papageorgiou vd., 2008).

İki farklı katalitik domain, primer yapıdaki lipaz-box dizisinin GX SXG (X burada herhangi bir amino asidi ifade eder) ortada yada N-terminala yakın olmasına bağlı olarak I veya II olarak adlandırılır. Ayrıca bu zamana kadar üç farklı bağlayıcı domain ve iki farklı substrat bağlayan domain karakterize edilmiştir. Substrat bağlayan domain enzimin biyopolimere adsorpsiyonuna ve hidrojen bağlarını kırılmasına yardımcı olur. e-PHB depolimerazlar yukarıda bahsedilen domain yapılarına göre sınıflandırılmalarına rağmen iki istisna bulunmaktadır. Bunlar *Penicillium funiculosum*'un e-PHB depolimerazı ve *Paucimonas lemoignei*'ye ait phaZ7 PHB depolimerazdır. Bu depolimerazlar tek bir domain içerirler ve diğer depolimerazlarla amino asit homolojisi yoktur. İkisi de aynı biyolojik reaksiyonu katalizlemelerine rağmen *P. funiculosum* depolimeraz parakristaline yapıdaki PHA'yı parçalarken *P. lemoignei* phaZ7 depolimeraz amorf yapıdaki polimeri parçalar. Ayrıca *P. lemoignei* phaZ7 depolimeraz tip I iken *P. funiculosum* depolimeraz tip II depolimeraz sınıfına aittir (Papageorgiou vd., 2008).

P. funiculosum PHB depolimeraz bilinen en küçük e-depolimerazdır ve moleküler ağırlığı 33 kDa' dur (Papageorgiou vd., 2008).

P. fluorescens PHA dehidrogenazlar, EC 3.1.1.76-Poli(3-hidroksikoktanoat) depolimeraz, polihidroksioktanoat(PHO) yapısındaki C-O bağının hidrolizini katalizler. Uzun süreli inkübasyonlarda temel ürün dimerdir. 3-hidroksikoktanoat polimerinin hidrolizinin yanı sıra diğer orta zincir uzunluklu (C6-C12) hidroksialkanoik asitlerin ve kopolimerlerinin hidrolizini de katalizler. Aynı zamanda yağ asitlerinin p-nitrofenil esterlerinin de hidrolizini gerçekleştirir. Poli[(R)-3-hidroksi bütanoik asit] ve poli[(R)-3-hidroksipentanoik asit] gibi kısa zincir uzunluklu polimerlerin hidrolizini katalizleyemez. Poli(3-hidroksioktanoat-co-3-hidroksiheksanoat) (lateks süspansiyon) substrat olarak kullanıldığında temel ürün (R)-3-hidroksioktanoattır (BRENDA, 2016).

1.6 Metabolit Profilleme

Metabolomik; belirli bir zaman diliminde dokularda, hücrelerde ve fizyolojik sıvılarda lipid, karbohidratlar, vitaminler, hormonlar ve diğer hücre bileşenlerinden ortaya çıkan küçük moleküllü metabolitlerin yüksek verimli teknolojiler kullanılarak saptanması, miktarının belirlenmesi ve tanımlanmasıdır (Bren L., 2005). Küçük moleküller peptitler, oligonükleotidler, şekerler, nükleozidler, organik asitler, ketonlar, aldehitler, aminler, amino asitler, lipitler, steroidler, alkaloidler ve ilaçlar, insan, bakteri ürünleri gibi metabolitlerdir ve molekül ağırlıkları 1.500 Da'un altındadır.

Metabolomik; biyoloji, kimya ve matematik içeren multi-disipliner bir bilimdir. Çok değişkenli veri analiz yöntemleriyle birleştirilmiş kromatografi, moleküler spektroskopi ve kütle spektrometresi gibi analitik tekniklere ihtiyaç vardır (German JB. vd., 2005). Metabolom analizlerinde, NMR (Nükleer Manyetik Rezonans), MS (Kütle Spektrometresi), FT-IR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy), HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi), GC (Gaz Kromatografisi), GC-MS (Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi), LC-MS (Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi), CE-MS (Kapiller Elektroferez-Kütle Spektrometresi gibi yüksek verimli analiz yöntemleri kullanılır (Fukui vd., 2014).

2. MATERYAL ve YÖNTEM

2.1 Mikroorganizmalar

Bu proje kapsamında Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, DSMZ, Almanya'dan temin edilen *Pseudomonas aureofaciens* (DSM 6698) mikroorganizması kullanılmıştır. Liyofilize haldeki *P.aureofaciens* suşu nütrient agarda 26°C'de 18 saat boyunca aktive edildi.

2.2 Kimyasallar ve Çözeltiler

Bu çalışma kapsamında analitik saflıkta ya da yüksek saflıkta kimyasallar kullanılmıştır (GC Grade). Kimyasalların temin edildiği firmalar ve çalışmalarda sıklıkla kullanılan çözeltiler aşağıda listelenmektedir:

- Amonyum Dihidrojen Fosfat ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) (Merck)
- Dipotasyum Hidrojen Fosfat (K_2HPO_4) (Merck)
- Magnezyum Sülfat (MgSO_4) (Merck)
- Sodyum Hipoklorit (NaOH) (Sigma)
- Sülfirik asit (H_2SO_4) (Merck)
- Kloroform (Merck)
- Sodyum klorür (NaCl) (Merck)
- Tripton (Sigma)
- Yeast Ekstrakt (Maya Ekstraktı)
- Sodyum Oktanoat (Sigma)
- Hekzan (Merck)
- Sodyum Sitrat (Merck)
- Sudan Black B (Sigma)
- Safranin (Merck)
- 3-Hidroksioktanoat (Sigma)
- 3-Hidroksiheksanoat (Sigma)
- 3-Hidroksidodekanoatnoat (Sigma)
- 3-Hidroksitetradekanoatnoat (Sigma)
- Tridekanoik asit (Sigma)
- Metanol (Merck)
- Metil-Tert-Butil Eter (Merck)
- Hidroklorik Asit (HCl)
- İz element çözeltisi (1,0 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,0 g/L $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,25 g/L $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g/L H_3BO_3 , 0,25 g/L $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,25 g/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g/L NH_4NO_3 , 0,5 g/L $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,01 g/L $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ve 5 ml/L derişik H_2SO_4)

2.3 Cihazlar

Bu çalışmada kullanılan bütün genel laboratuvar cihazları aşağıda listelenmiştir:

- UV Kabin (ESCO Class II BSC)
- Otoklav (HIYARAMA HVE 50)
- Soğutmalı-Çalkalamalı inkübatör (New Brunswick, Innova 40R)
- Spektrofotometre (Perkin Elmer Lambda 35 UV/VIS Spectrophotometer)
- Santrifüj (Hettich Universal 30 RF, Hettich Micro 120, Sigma 16K-L)
- pH metre (HANNA pH 211)
- Isıtmalı karıştırıcı (CHILTERN HS 31)
- Etüv (Heraeus)
- Analitik terazi (AND GR 200)
- Su banyosu (GFL 1083)
- Vorteks (WhirliMixer TM)
- GC-MS (Agilent 7890B GC System Gaz kromatografisi, Agilent 5977E MSD MS dedektör ve DB-5MS kolon)
- HPLC (Thermo Accela) (FABAL)
- LC/Q-TOF/MS Agilent 6550 Series (EGE-MATAL)
- Shimadzu Nexara XR HPLC Sistemi (ARGEFAR)

2.4 Çalkalamalı kültürlerde mcl-PHA üretimi

Çalışma kapsamından *P. aurefaciens*'te mcl-PHA üretiminde, Emre ERDEN ÇAKMAKLI'nın doktora tezinde yapmış olduğu optimizasyon temel alınarak optimum koşullarda üretim gerçekleştirildi (Çakmaklı, 2015).

P. aurefaciens, LB (Luria Broth) ortamında (10 g/L tripton, 5 g/L yeast ekstrakt, 10 g/L NaCl; pH 7,0) 26°C'de 165 rpm'de 9 saat boyunca kültive edildi. Aşı kültüründen Çizelge 2.1' de bileşenleri verilen üretim ortamlarına (pH 7,0) %5'lik inokulasyon yapıldı ve 135 rpm'de inkübe edildi. 6 saatlik periyotlarla 120 saat boyunca kültür ortamından örnek alındı ve +4°C'de 12000 rpm'de 20 dk santrifüjlendi. Hücre pelleti mcl-PHA üretiminin kalitatif ve kantitatif tayininde kullanıldı. Süpernatant ise karbon ve azot kaynağı konsantrasyonunun tayininde kullanıldı. Tüm örnekler - 80°C' de stoklandı.

Çizelge 2.1 Üretim ortamı bileşenleri.

Üretim ortamı bileşenleri	Miktar (g/L)
Sodyum Oktanoat	15
NH ₄ H ₂ PO ₄	1
K ₂ HPO ₄	1.5
Tripton	0.5
MgSO ₄	1.4
Sitrat	1
İz element çözeltisi	1

2.5 Çalkalamalı kültürlerde mcl-PHA yıkımının(degradasyon) teşviki

Doğal üretici *P. aureofaciens* LB ortamında 26°C'de 165 rpm'de 9 saat boyunca kültive edildi ve aşı kültürü hazırlandı. Hazırlanan aşı kültüründen bölüm 2.4' de verilen mcl-PHA üretim ortamına %5'lik aşılama yapılarak hücreler eksponansiyel fazın sonuna kadar (60. saat) 26°C'de 135 rpm'de inkübe edildi. İnkübasyonun ardından kültür ortamı 12000 rpm'de +4°C'de 20 dk santrifüjlendi ve hücre pelleti yıkanarak ortam bileşenleri uzaklaştırıldı. Yıkanan hücre pelleti aseptik koşullarda karbon kaynağı içermeyen taze kültür ortamlarına inokülasyon miktarı %20 olacak şekilde inokule edilerek 26°C'de 135 rpm'de kültivasyona devam edildi. Karbon açlığı koşullarında 6 saatlik periyotlarla 120 saat boyunca kültür ortamından örnek alındı ve +4°C'de 12000 rpm'de 20 dk santrifüjlendi. Hücre pelleti mcl-PHA üretiminin kantitatif tayininde ve metabolit analizinde kullanıldı. Süpernatant ise azot kaynağı konsantrasyonunun tayininde kullanıldı.

2.6 Çalkalamalı kültürlerde mcl-PHA üretiminin teşvik edilmediği koşulun oluşturulması

Doğal üretici *P. aureofaciens* LB ortamında 26°C'de 165 rpm'de 9 saat boyunca kültive edildi ve aşı kültürü hazırlandı. Hazırlanan aşı kültüründen LB ortamlarına %5'lik aşılama yapılarak hücreler 120 saat boyunca 26°C'de 135 rpm'de inkübe edildi. Bu süre zarfında 6 saatlik periyotlarla kültür ortamından örnek alındı ve +4°C'de 12000 rpm'de 20 dk santrifüjlendi. Hücre pelleti kuru kütle, mcl-PHA üretiminin kantitatif tayininde ve metabolit analizinde kullanıldı. Süpernatant ise HPLC analizleri için - 80°C' de stoklandı.

2.7 mcl-PHA'ların Kalitatif Tayini

PHA üretiminin kalitatif tayini için Sudan Black boyama prosedürü kullanıldı. Bu amaçla;

- Bakteri kültüründen bir miktar alınarak 2 kez steril d.H₂O ile yıkama yapıldı, santrifüjlendi ve steril d.H₂O ile tekrar süspense edildi.
- Hücre süspansiyonundan 50 µl alınarak lam üzerine ince bir katman halinde yayıldı ve kurumaya bırakıldı.
- Lam, Sudan Black B (%60'lık etanolde %0,3 w/v) ile 10 dk boyandı.
- d.H₂O ile lam kısa süre yıkandı.
- Lam, %0,5'lik safranin çözeltisi ile 10 sn boyandı ve ardından d.H₂O ile yıkandı ve mikroskop altında incelendi.

2.8 Kuru Kütle Tayini

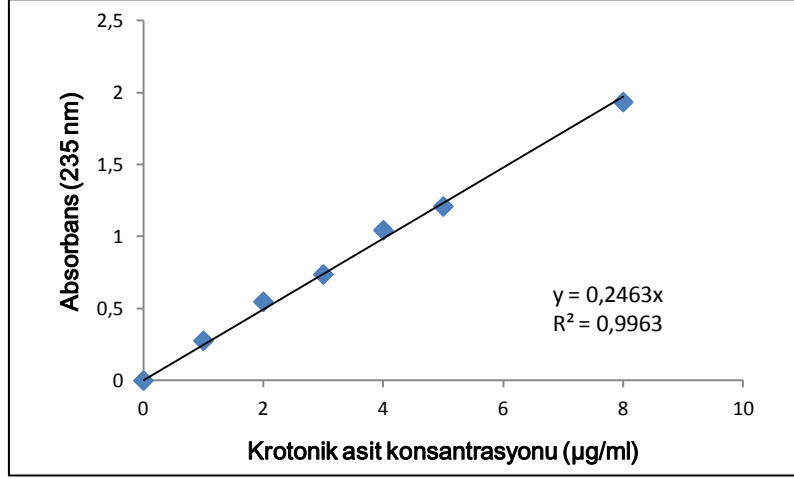
Ortamlardan alınan 5 ml örnek, darası alınmış tüplere aktarıldı. +4°C'de 12000 rpm'de 20 dk santrifüjlendi ve hücre pelleti steril d.H₂O ile yıkandı. Yıkanan hücre pelleti 50°C'de etüvde sabit kütleye kadar kurutuldu ve örneklerdeki kuru kütle miktarı tayin edildi.

2.9 mcl-PHA'ların Kantitatif Tayini

Örneklerdeki PHA miktarının spektrofotometrik tayini aşağıda belirtilen modifiye edilmiş yöntemle göre yapıldı:

1. İnkübasyon sonrasında üretim ortamlarından 1 ml örnek alındı ve 13000 rpm'de 5 dk. santrifüjlendi. Ardından hücre pelleti 1 ml d.H₂O ve 1 ml sodyum hipoklorür (%10-15) ile çözüldü.
2. Karışıma 2 ml kloroform eklendi ve 37 °C'de 300 rpm'de 3 saat inkübe edildi.
3. İnkübasyonun ardından tüpler 4000 rpm'de 20 dk santrifüjlendi.
4. Santrifüj sonrasında hipoklorit fazı uzaklaştırıldı ve ara faza zarar vermeden kloroform fazı yeni bir tüpe aktarıldı.
5. Elde edilen kloroform fazından yeni tüplere 100'er µl alındı ve kloroform uçuncaya kadar 80°C'de etüvde bekletildi.
6. Kloroform uzaklaştırıldıktan sonra tüplere 5'er ml derişik H₂SO₄ eklendi ve 100 °C'de sıcak su banyosunda 20 dk inkübe edildi.
7. İnkübasyon sonunda tüpler su banyosundan alındı ve soğutuldu. Ardından 235 nm'de absorbans ölçüldü.

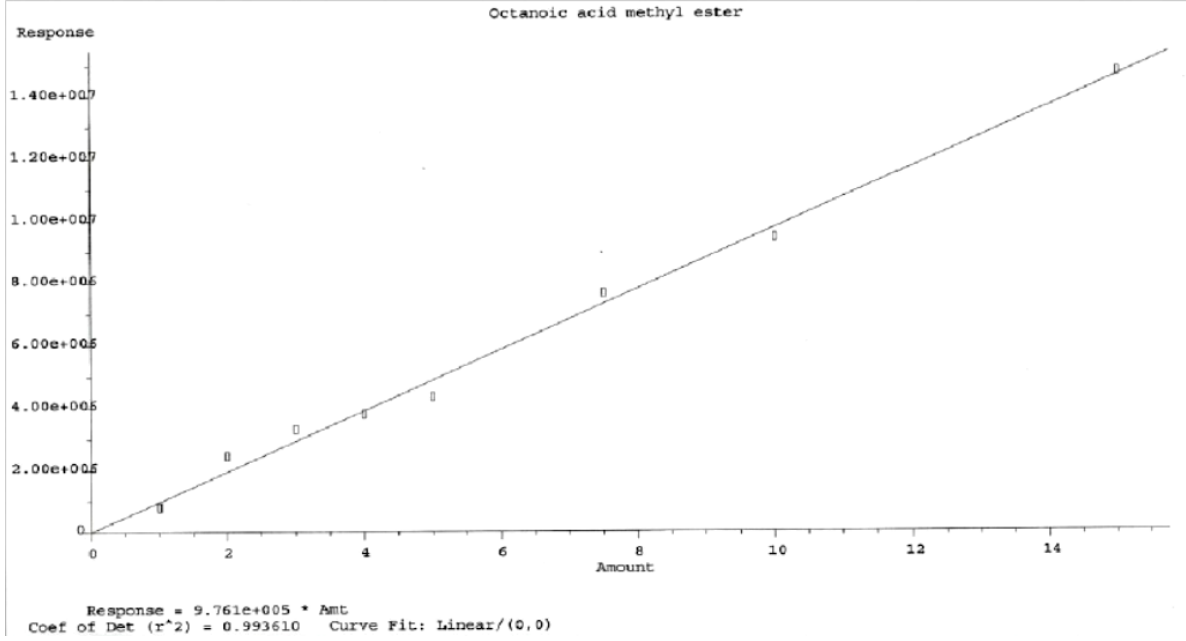
Yukarıdaki yöntemin prensibi hücre içerisindeki PHA'ların ekstraksiyonu ve ardından derişik sülfürik asit ile 3-hidroksi yağ asitlerinin krotonik aside indirgenmesi esasına dayanır. Bu nedenle 1, 2, 3, 4, 5, 8 ve 10 µg/ml standart krotonik asit çözeltileri hazırlandı ve krotonik asit standart grafiği oluşturuldu (Şekil 2.1). Örneklerdeki mcl-PHA miktarları bu standart grafiği kullanılarak hesaplandı.



Şekil 2.1 Krotonik Asit Standart Grafiği

2.10 GC-MS ile karbon kaynağı (Oktanoat) konsantrasyonunun tayini

Üretim ortamına karbon kaynağı olarak eklenen oktanoatın konsantrasyonun belirlenebilmesi için üretim ortamından örnekler alındı ve +4°C'de 12000 rpm'de 20 dk santrifüjlendi. Süpernatant içerisindeki oktanoatın, GC-MS ile analizlenebilmesi için öncelikle türevlendirme işlemi gerçekleştirildi. Bu amaçla, 500 µl örnek üzerine metanol içerisinde hazırlanmış 2500 µl %2 H₂SO₄ çözeltilisi eklendi ve bu karışım 90 dakika boyunca 60°C'de inkübe edildi. İnkübasyonun ardından uçucu metil esterine dönüştürülen oktanoat, 1 ml hekzan ile ekstrakte edildi. Analiz için Agilent 7890B GC System gaz kromatografisi, Agilent 5977E MSD MS dedektör ve DB-5MS kolon (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm film kalınlığı) kapiler kolon kullanıldı. 1 µl örnek enjeksiyonu gerçekleştirildi. Taşıyıcı gaz helyum, sabit akışta akış hızı 1 ml/min, Septum Purge: 3 ml/min, Enjeksiyon sıcaklığı 250°C olarak kullanıldı. Fırın Sıcaklık Programı: 100°C' de 8 dk, Ramp 20°C, 180°C' de 3 dk olarak belirlendi. MS parametleri ise interface sıcaklığı 280°C, Electron Multiplier Voltage 1750 ile 2100 V aralığında kullanıldı ve scan mode m/z 45-500 aralığında çalışıldı. Oktanoik asit metil ester standart grafiğinden (Şekil 2.2) yararlanılarak üretim ortamında arta kalan oktanoat miktarı belirlendi.



Şekil 2.2 Oktanoik asit metil ester standart grafiği

2.11 Berthelot yöntemi ile azot tayini

Örneklerdeki azot miktarını tayin etmek için Berthelot yöntemi kullanıldı (Çizelge 2.2). Değişik konsantrasyonlarda standart NH_4Cl çözeltileri (1-20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) hazırlanarak standart grafiği oluşturuldu (Şekil 2.3) ve oluşturulan standart grafiği kullanılarak örneklerdeki azot miktarı tayin edildi.

Fenol reaktifi : A- 1 g fenol/10 ml distile su
B- 25 mg sodyumnitroprussiyat / 50 ml distile su

A ve B çözeltileri kullanmadan hemen önce eşit hacimde karıştırılarak taze kullanılır.

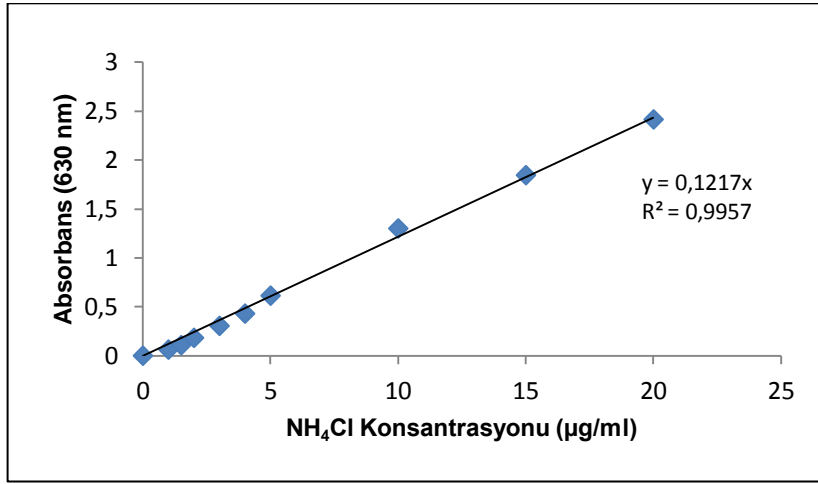
Alkali hipoklorür: A- %5 NaOH
B- litrede 26 g NaOCl bulunan ticari hipoklorür

A ve B eşit hacimde karıştırılır.

Çizelge 2.2 Berthelot Yöntemi

	Kör (ml)	Örnek (ml)
Distile su	2,0	-
Örnek	-	2,0
Fenol reaktifi	0,5	0,5
Alkali hipoklorür çözeltisi	0,5	0,5

55 °C su banyosunda 5 dk inkübe edilir ve 630 nm'de absorbans okunur



Şekil 2.3 NH₄Cl Standart Grafiği

2.12 Üretilen mcl-PHA'nın izolasyonu ve karakterizasyonu

2.12.1 mcl-PHA'nın saflaştırılması

P. aureofaciens hücreleri tarafından optimum koşullarda üretilen mcl-PHA biyopolimerinin saflaştırılması amacıyla Strazzullo ve arkadaşlarından alınan yöntem kullanılmıştır (Strazzullo vd., 2008). Kullanılan yöntemle ilişkin olarak izlenen adımlar aşağıda verilmektedir:

- 1) Kültivasyonun ardından elde edilen hücreler 9000 rpm'de 4 °C'de 10 dk santrifüjlendi.
- 2) 1 g hücre peleti 50 ml saf suda çözüldü.
- 3) Elde edilen karışım 20 dk. boyunca sonikasyona tabi tutuldu.
- 4) Sonikasyonun ardından yaş hücre ağırlığı kadar SDS eklendi ve 50°C'de 1 saat inkübe edildi.
- 5) Inkübasyon işleminin ardından hücre karışımı 121 °C'de 20 dk. otoklavlandı.

6) Otoklavın ardından hücre lizati soğutuldu ve 10000 rpm'de +4 °C'de 30 dk. boyunca santrifüjlendi.

8) Santrifüj işlemi sonucunda elde edilen mcl-PHA peleti liyofilize edildi. Liyofilize edilen ürün +4 °C'de muhafaza edildi.

2.12.2 Spektroskopik analizler (FTIR, ¹³C-NMR ve ¹H-NMR)

FTIR spektrumu "Perkin Elmer Spectrum BX – FTIR spectrophotometer" kullanılarak 400-4000 dalga sayısında (cm⁻¹) tarama yaparak elde edildi.

¹³C-NMR ve ¹H-NMR analizleri için 35 mg mcl-PHA örneği 1 ml CDCl₃'da çözüldü ve 300C'de MERCURY plus-AS 400 model NMR spektrometresi kullanılarak spektrumları alındı.

2.12.3 mcl-PHA'nın termal özelliklerinin belirlenmesi

Saflaştırılan mcl-PHA örneğinin termal gravimetrik özellikleri 60 ml/dk azot gazı altında 10°C-500°C aralığında ısıtılarak (10°C/dk) TGA Q500 (TA instruments, UNAM hizmet alımı) ile belirlendi. Termoanalitik özellikleri ise 30 ml/dk azot gazı altında -60°C ile 200°C aralığında (10°C/dk) DSC 204 (Netzsch, UNAM-hizmet alımı) ile belirlendi.

2.12.4 mcl-PHA'nın molekül ağırlığının belirlenmesi

mcl-PHA'nın molekül ağırlığının belirlenebilmesi jel filtrasyon kromatografisinden (Agilent 1200, UNAM-hizmet alımı) yararlanıldı. Bu amaçla standart polistiren çözeltileri (5.75x10², 1.53x10³, 3.95x10³, 10.21x10³, 29.51x10³, 72.45x10³, 2.05x10⁵, 4.67x10⁵) ve örnek 1 ml THF'de çözüldü. 1ml/dk akış hızı olacak şekilde Zorbax PSM 300-S (6.2x250mm, 5µm) (MW: 3x10³-3x10⁵) kolon ve ELSD dedektör kullanılarak kromatogram alındı. Oluşturulan kalibrasyon eğrisi kullanılarak mcl-PHA'nın molekül büyüklüğü tespit edildi.

2.13 Hücre içi yağ asidi türevli metabolitlerin ekstraksiyonu ve GC-MS ile analizi

Hücre içi mcl-PHA üretiminin (aşırı karbon kaynağı ve sınırlı azot içeren koşullarda) ve degradasyonunun (açlık koşullarında-karbon kaynağı içermeyen ortamlarda) teşvik edildiği koşullarda ilişkin metabolit profillerini oluşturmak amacıyla alınan hücre pelletlerinden metabolitler ekstrakte edildikten sonra türevlendirme işlemi yapılarak uçucu metil esterlerine dönüştürüldü ve GC-MS ile analizlendi. Bu amaçla aşağıdaki yöntemler uygulandı.

2.13.1 Hücre içi yağ asidi türevli metabolitlerin ekstraksiyonu ve türevlendirilmesi

Hücre içerisindeki metabolitlerin ekstraksiyonu Hoffman ve arkadaşları (Hoffman vd., 2008) ve Chao ve arkadaşlarının (Chao vd., 2010) kullandığı yöntemler modifiye edilerek gerçekleştirildi.

1. -80°C' de saklanan 2 ml ortama ait hücre pelleti eritilmeden üzerine 1 ml 3,75 M NaOH (1:1 MeOH/d.H₂O' da hazırlanmış) ve 100 ppm olacak şekilde internal standart olarak tridekanoik asit (hekzanda) eklenerek vidalı kapaklı tüplere transfer edildi. (Not: açlık koşullarında metabolit analizlerinde 5 ml ortama ait hücre pelleti kullanıldı.)

2. Örnekler 80°C'de 30 dk boyunca su banyosunda inkübe edildi. İnkübasyonun 15. dakikasında vorteklenerek inkübasyona devam edildi.

3. Tüplere 2 ml 3,25 M HCl (1:1,18) (Metanol/6 M HCl) eklendi ve 80°C'de 10 dk boyunca su banyosunda inkübe edildi.

4. Tüplere 1,5 ml 1:1 hekzan/metil-tert butil eter eklendi ve 10 dk boyunca yavaşça alt üst edildi.

5. Üst faz yeni bir tüpe aktarılarak üzerine 3 ml 0,3 M NaOH (d.H₂O' da hazırlanmış) eklendi. 5 dk boyunca yavaşça alt üst edildi.

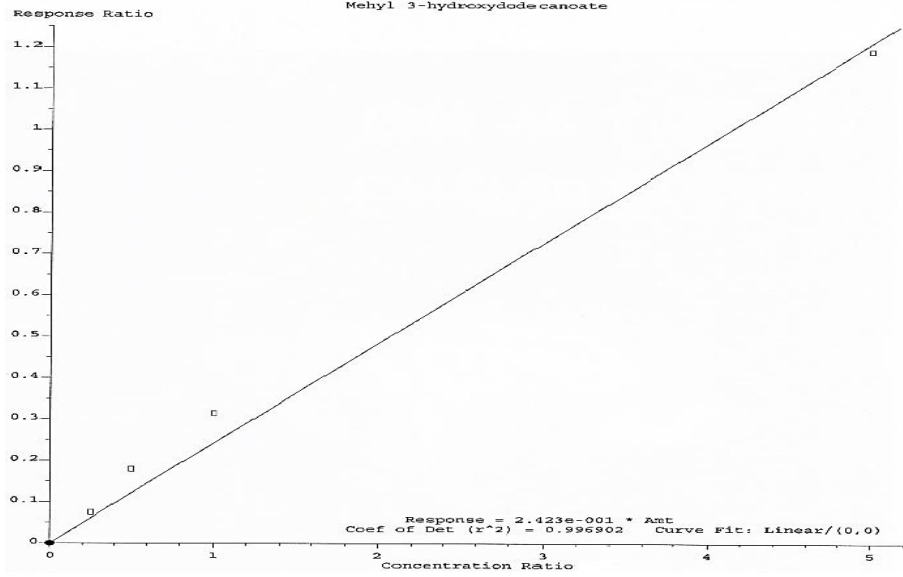
6. Faz ayrımı gözlemlendikten sonra üst faz GC-MS' de analizlendi.

2.13.2 Hücre içi yağ asidi türevli metabolitlerin GC-MS ile analizi

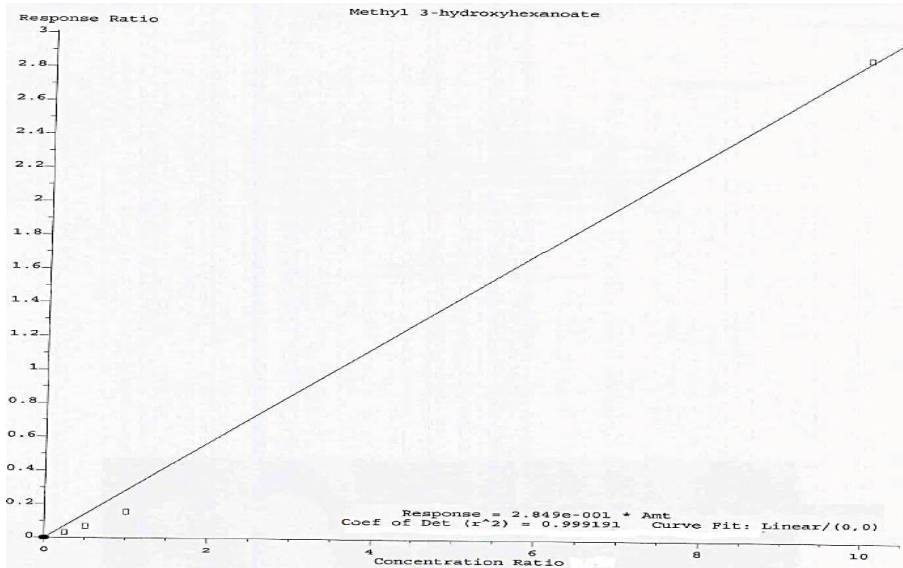
Yağ asidi türevli metabolitleri analizlemek amacıyla literatür taraması yapıldı ve literatürde kullanılan yöntemlerden en verimli belirlenmeye çalışıldı. Bu amaçla Chao ve arkadaşları (Chao vd., 2010), García ve arkadaşları (García vd., 2010) ve Casado ve arkadaşlarının (Casado vd., 1998) kullandığı analiz yöntemleri denendi. Gaz kromatogramları sonucunda en etkin sonuç Casado ve arkadaşlarının (Casado vd., 1998) kullandığı yöntemde alındı ve bu yöntem üzerinde modifikasyonlar yapıldı. Başlangıç sıcaklığı (50-75°C), süresi (1-8-10 dk), Ramp sıcaklığı (8-15-20-30°C), bitiş sıcaklığı (270-275°C) ve süresi (1-7-10 dk) gibi parametreler üzerinde değişiklikler yapılarak analiz için yöntem geliştirildi.

Analiz için Agilent 7890B GC System gaz kromatografisi, Agilent 5977E MSD MS dedektör ve DB-5MS kolon (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm film kalınlığı) kapiler kolon kullanıldı. Cihaza 1 µl örnek enjekte edildi. **Total Flow:** 100 ml/min, taşıyıcı gaz helyum, sabit akışta akış hızı 1,6 ml/min, **Septum Purge:** 3 ml/min, Enjeksiyon sıcaklığı 250°C olarak kullanıldı. **Fırın Sıcaklık Programı:** 50°C' de 8 dk, Ramp 20°C, 275°C' de 10 dk olarak belirlendi. MS parametreleri ise **interface sıcaklığı** 280°C, **Electron Multiplier Voltage** 1750 ile 2100 V aralığında kullanıldı ve **scan mode** m/z 45-500 aralığında çalışıldı.

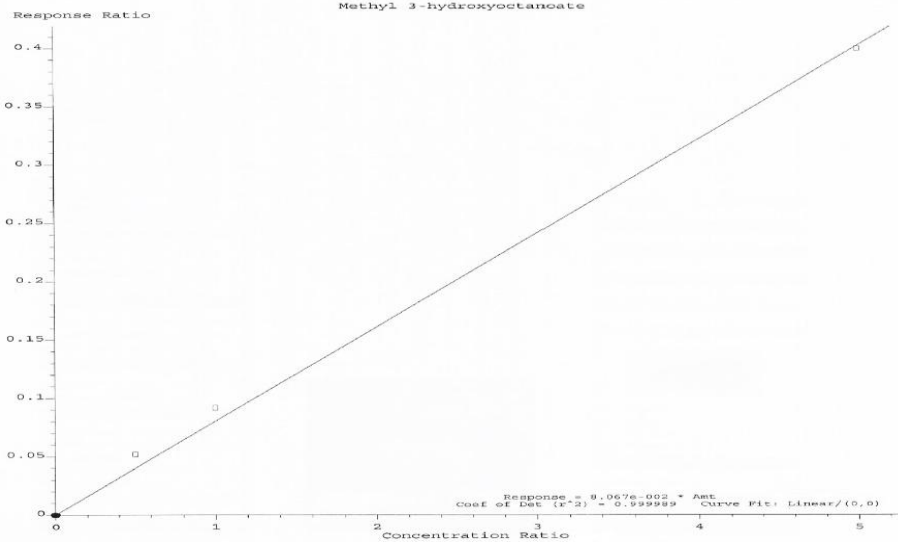
Ayrıca yukarıda bahsedilen türevlendirme ve analiz yöntemi kullanılarak ticari olarak temin edilen yüksek saflıktaki 3-hidroksidodekanoat (Şekil 2.4), 3-hidroksiheksanoat (Şekil 2.5), 3-hidroksioktanoat (Şekil 2.6) ve 3-hidroksitetradekanoat (Şekil 2.7) standart grafikleri oluşturuldu. İlgili standart grafikleri kullanılarak örneklerdeki metabolitler tayin edildi.



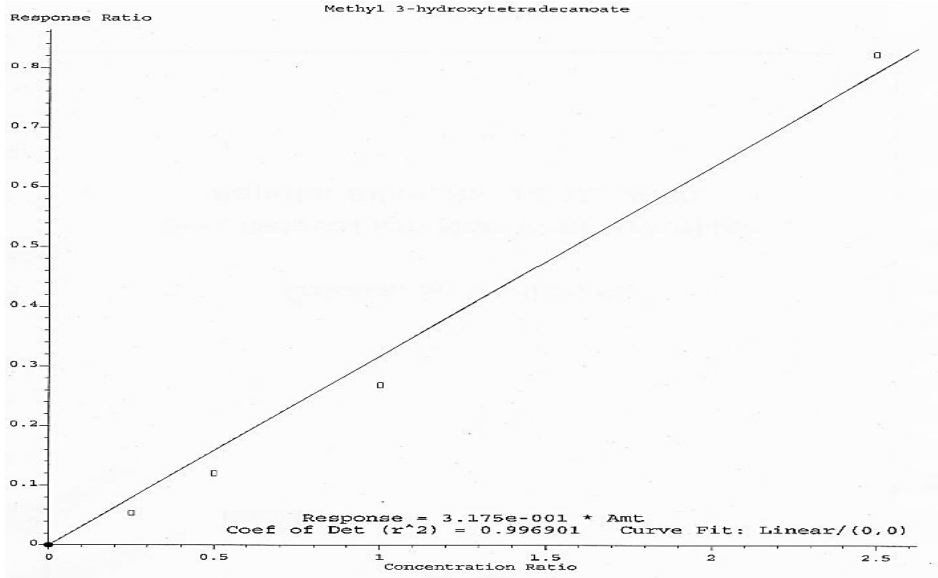
Şekil 2.4 Metil 3-Hidroksidodekanoat Standart Grafiği



Şekil 2.5 Metil 3-Hidroksiheksanoat Standart Grafiği



Şekil 2.6 Metil 3-Hidroksioktanoat Standart Grafiği



Şekil 2.7 Metil 3-Hidroksitetradekanoat Standart Grafiği

2.14 Hücre içi organik asitlerin ekstraksiyonu ve HPLC ile analizi

Aşırı karbon kaynağı içeren ve azot sınırlamalı koşullarda (pozitif kontrol) (C/N oranı yüksek), karbon açlığı koşullarında (karbon kaynağı içermeyen ortamda) ve azot sınırlamasız koşullarda (negatif kontrol) (C/N oranı düşük) metabolit profillerini oluşturmak amacıyla bu 3 farklı ortamdan 6 saatlik periyotlarla alınan hücreler 12000 rpm +4°C'de 20 dk boyunca santrifüjlendikten sonra çok hızlı bir şekilde daha önceden soğutulmuş %0,9 NaCl çözeltisi ile yıkandı ve santrifüjün ardından tüpler -86°C 'de saklandı. Dondurulan hücre pelletlerinden metabolitler ekstrakte edildikten sonra HPLC (Thermo Accela) ile analizlendi.

2.14.1 Hücre İçi Metabolitlerin Ekstraksiyonu

Dondurulmuş hücre pelleti üzerine metanol:kloroform:H₂O (5:2:2) eklendi ve hücre lizisi için tüpler ultrasonik banyoda 10 dk inkübe edildi. Oda sıcaklığında 30 dk inkübasyonun ardından 5000 rpm +4°C' de 10 dk santrifüjlendi ve su fazı HPLC analizi için kullanıldı (Fukui vd., 2013).

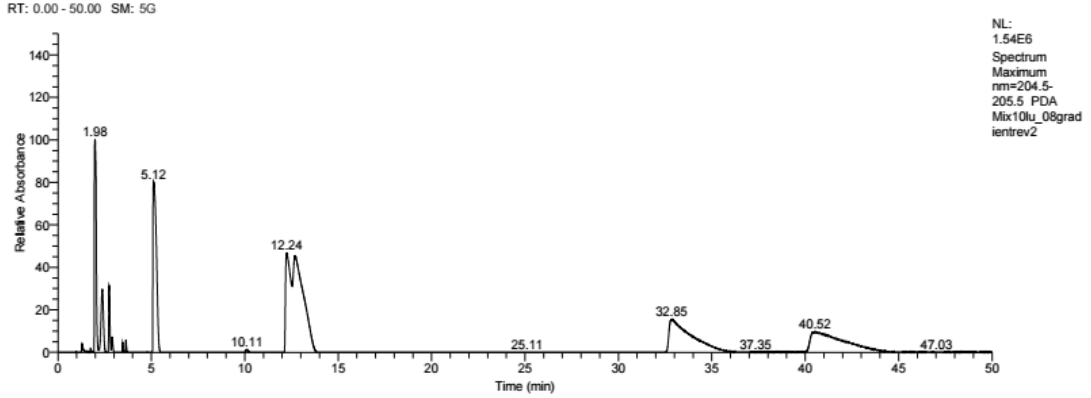
2.14.2 Hücre İçi Organik Asitlerin HPLC ile Analizi

Hücre içi organik asitlerin tayininde 205 nm'ye ayarlanmış PDA dedektör içeren Thermo Accela HPLC sistemi kullanıldı. Hücre lizisinin ardından su fazındaki organik asitler ve standart çözeltiler Acclaim 120 C18 (3µm, 120A, 4.6*150 mm, Dionex Bonded Silica) kolon kullanılarak HPLC (Thermo Accela) ile analizlendi. Analiz için kullanılan enjeksiyon hacmi 10 µl, kolon sıcaklığı 35 °C ve akış hızı 0,8 ml/dk'dır. Örneklerin ve standartların kolondan elüe edilmesi için gradient elüsyondan yararlanıldı (Çizelge 2.3).

Çizelge 2.3 Gradient elüsyon koşulları

Zaman (dk)	H ₃ PO ₄ (pH 2,46) (%)	MeOH (%)	ACN (%)	µl/dk
0.00	90	10	0	1000.0
4.00	89	10	1	1000.0
30.00	89	10	1	1000.0
30.10	90	10	0	1000.0
50.00	90	10	0	1000.0

Sitrik asit, süksinik asit, ketoglutarik asit, malik asit, izovalerik asit, bütirik asit, propiyonik asit, formik asit, valerik asit ve isobütirik asitten belirli konsantrasyonlarda hazırlanan standart çözeltileri yukarıda belirtilen koşullarda analizlendi ve kromatogram elde edildi (Şekil 2.8).



Component Name	Component Type	Sample Type	RT	Area
Sitrik_Asit	Target compound	N/A	2.74	2056946.43
Süksinik_Asit	Target compound	N/A	3.47	255736.01
Isovalerik_Asit	Target compound	N/A	32.85	13857072.43
Ketoglutarik_Asit	Target compound	N/A	2.38	4316300.00
Bütirik_Asit	Target compound	N/A	12.25	12686802.60
Malik_Asit	Target compound	N/A	3.64	346384.91
Propiyonik_Asit	Target compound	N/A	5.12	15926891.23
Isobütirik_Asit	Target compound	N/A	12.69	17935608.84
Formik_Asit	Target compound	N/A	1.98	10392633.46
Valerik_Asit	Target compound	N/A	40.43	3637856.13

Şekil 2.8 Sitrik asit, süksinik asit, izovalerik asit, ketoglutarik asit, bütirik asit, malik asit, propiyonik asit, izobütirik asit, formik asit, valerik asit standartlarına ait kromatogram.

Örneklerin enjeksiyonundan sonra elde edilen piklerin alıkonma zamanları standartların alıkonma zamanları karşılaştırılarak örneklerin tanımlaması yapıldı. Ardından tanımlanan organik asitlerin kantifikasyonu için, konsantrasyonları bilinen standartların pik alanı kullanılarak örneklerdeki organik asit konsantrasyonu hesaplandı.

2.15 Hücre içi amino asitlerin ekstraksiyonu, HPLC ve LC-QTOF-MS ile analizi

2.15.1 Hücre içi amino asitlerin ekstraksiyonu

Aşırı karbon kaynağı içeren ve azot sınırlamalı koşullarda (pozitif kontrol) (C/N oranı yüksek), karbon açlığı koşullarında (karbon kaynağı içermeyen ortamda) ve azot sınırlamasız koşullarda (negatif kontrol) (C/N oranı düşük) metabolit profillerini oluşturmak amacıyla bu 3 farklı ortamdaki 6 saatlik periyotlarla alınan hücreler 12000 rpm +4 °C'de 20 dk boyunca santrifüjlendikten sonra çok hızlı bir şekilde daha önceden soğutulmuş %0,9 NaCl çözeltisi ile yıkandı ve santrifüjün ardından tüpler -86°C 'de saklandı. Dondurulan hücre pelletlerinden metabolitler ekstrakte edildikten sonra analizlendi.

2.15.2 Hücre içi amino asitlerin HPLC ile analizi

Cihaz : Shimadzu Nexara XR HPLC Sistemi

Kolon : Zorbax Eclipse AAA (15 cm x 4.6 mm x 3.5 µm)

Mobil Faz :

A) 40 mm NaH₂PO₄.2H₂O (Su içinde) pH =7.8 5 N NaOH ile ayarlandı

B) Asetonitril : MeOH : Su (45 : 45 : 10)

Akış Hızı : 1.5 mL/dak

Kolon Sıcaklığı : 40°C

FLD Sinyal : 0 – 23 dak Ex: 340 nm Em: 450 nm 23 – 36 dak Ex: 266 nm Em: 305 nm

Enjeksiyon Hacmi : 9 µL

Gradient Programı (Çizelge 2.4) :

Çizelge 2.4 HPLC- Amino asit analizi gradient programı

Dakika	Mobil Faz B (%)
0.00 – 2.85	0
2.85 – 27.00	57
27.00 – 28.50	100
28.50 – 34.50	100
34.50 – 36.00	0

Örnek Hazırlama:

1) 500 µL numune vialine alındı. Üzerine 1 µL SSA eklenerek cihaza enjekte edildi.

SSA Çözeltisi = 2.5 g. 5-Sulfosalicylic acid dihydrate 25 mL suda çözülür.

2) Türevlendirme prosedürü Çizelge 2.5'te gösterilmektedir.

Çizelge 2.5 Amino asit türevlendirme prosedürü

Çözelti	İçerik	Konsantrasyon	Türevlendirme Prosedürü (ml)
Borat tamponu (Diluent)	Borik asit + KOH	0.4 M (100 mL) pH=10.2 (Katı KOH ile ayarlanır)	Diluent : 5 Numune : 3 OPA : 1 FMOC : 1 Su : 64
OPA Çözeltisi	OPA + Diluent	10 mg/mL (1 mL) 10 mg OPA 100 µL MeOH 900 µL Diluent 10 µL 3-MPA	
FMOC Çözeltisi	ACN içinde	2.5 mg/mL (1 mL) 2.5 mg FMOC 1 ml ACN	

2.15.3 Hücre içi amino asitlerin LC-QTOF-MS ile analizi

Dondurulmuş hücre pelleti üzerine metanol:kloroform:H₂O (5:2:2) eklendi ve hücre lizisi için tüpler ultrasonik banyoda 10 dk inkübe edildi. Oda sıcaklığında 30 dk inkübasyonun ardından 5000 rpm +4°C' de 10 dk santrifüjlendi ve su fazı LC/Q-TOF/MS analizi için kullanıldı (Toshiaki Fukui vd., 2013).

LC-QTOF-MS için örnek hazırlama protokolü aşağıda verildiği şekildedir:

Örnek hacmi: 300 µL

Çözgen: (Asetonitril) Hacmi: 700 µL

Karıştırma (Vortex): 3 dk

Santrifüj: 5 dk 4000 rpm

500 µL supernatant LC vialine alınır.

Analiz Parametreleri (Çizelge 2.6 ve 2.7.)de verildiği şekildedir:

Çizelge 2.6 LC-QTOF-MS analiz parametreleri

HPLC Parametreleri		
Mobil Faz	A	B
	Su (40 mM amonyum format, % 3 formik asit)	% 100 Asetonitril
Enjeksiyon Hacmi	10 µL	
Kolon tipi	ZORBAX HILIC PLUS 4.6x100 mm, 3.5 µm	
Akış hızı	0,5 mL/dk	
Kolon sıcaklığı	20°C	
Analiz süresi	13 dk	
QTOF Parametreleri		
İyon Kaynağı	Dual AJS ESI	
İyon Polaritesi	Pozitif	
LC Modu	MS	
Kütle Aralığı (m/z)	50-1000	

Metod: Gradient

Gradient Prosedürü:

Çizelge 2.7 Gradient prosedürü

Zaman (dk)	A [%]	B [%]	Akış hızı (mL/dk)	Max. basınç (bar)
0.00	20	80	0,5	400
2.50	20	80	0,5	400
5.00	70	30	0,5	400
8	70	30	0,5	400
8.10	20	80	0,5	400

2.16 Hücre İçi ve Hücre Dışı Lipaz ve Esteraz Aktivitelerinin Belirlenmesi

Lipaz ve esteraz aktivitesinin belirlenmesi amacıyla PHA yıkımının teşvik edildiği koşuldaki ortamlardan 0-24-48-72-96 ve 120. saatlere ilişkin örnekler alındı. Alınan örnekler 12000 rpm' de 20 dk santrifüjlendi ve süpernatant ile hücre pelletleri ayrıldı.

Standart grafiği oluşturmak amacıyla 0,1 $\mu\text{mol/ml}$ p-nitrofenol stok çözeltisi (pH:7,0 25 mM fosfat tamponunda) hazırlandı. Stok p-nitrofenol çözeltisinden yola çıkılarak 0,02-0,1 $\mu\text{mol/ml}$ arasından bir seri dilüsyonlar yapılarak standart grafiği oluşturuldu. 1 Unite lipaz/esteraz aktivitesi dakikada 1 μmol p-nitrofenolün açığa çıkmasını sağlayan enzim miktarı olarak belirlendi. Hücre dışı aktivite tayini için yıkım ortamlarından alınan örneklerle ilişkin süpernatantlar kullanıldı. Hücre içi aktivite için hücre pelletleri ultra sonikatörde 5 dk boyunca parçalandı. İlgili tayin yöntemi Çizelge 2.8'de ve standart grafiği(Şekil 2.9)'da yer almaktadır.

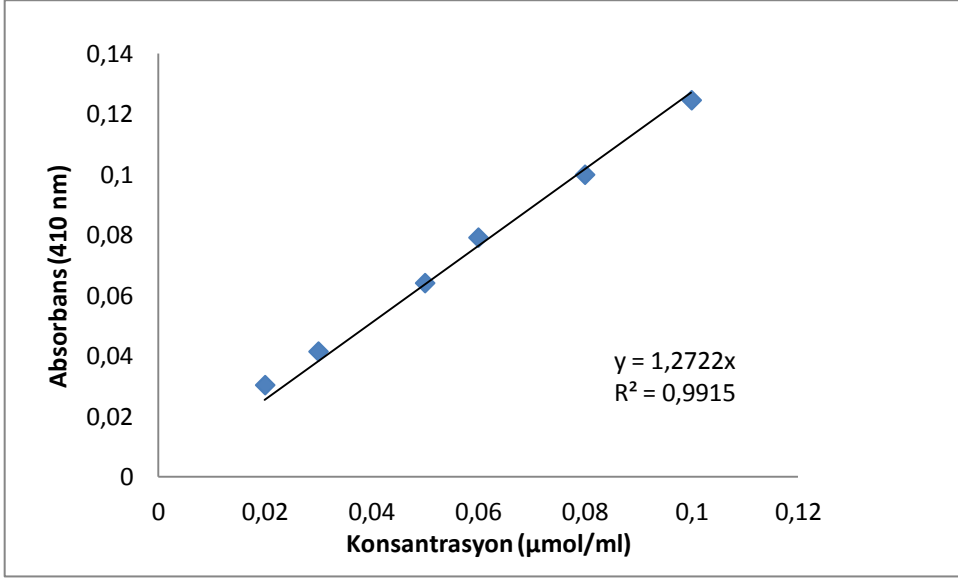
Standart Çözeltisinin Hazırlanışı: %0,2 Triton X-100 içeren 135 ml pH:7,0 25 mM fosfat tamponu 15 ml 2-propanol ile karıştırıldı. Standart çözeltisi istenilen konsantrasyondaki standart çözeltilerinin seyreltilmesinde kullanıldı.

Substrat Çözeltisinin Hazırlanışı: 45 mg p-nitrofenol palmitat/p-nitrofenol asetat 15 ml 15 ml 2-propanol' de çözüldü ve %0,2 Triton X-100 içeren 135 ml pH:7,0 25 mM fosfat tamponu ile karıştırıldı. Lipaz aktivitesi için p-nitrofenol palmitat içeren substrat çözeltisi kullanılırken esteraz aktivitesi için p-nitrofenol palmitat içeren substrat çözeltisi kullanıldı.

Çizelge 2.8 Lipaz/Esteraz aktivite tayin yöntemi

	Kör (ml)	Örnek / Standart (ml)
Tampon	0,1	-
Enzim	-	0,1
Substrat Çözeltisi	2,0	2,0
Standart Çözeltisi	-	2,0

37°C' deki su banyosunda 15 dk inkübe edilir. Ardından 0,15 ml Na_2CO_3 eklenir ve 410 nm'de absorpsiyon okunur.



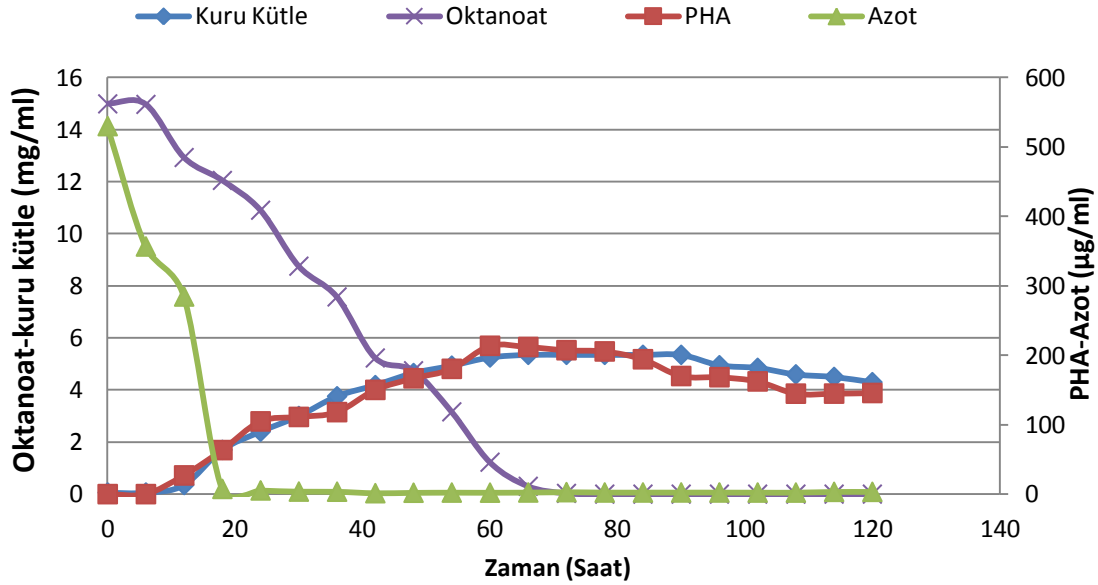
Şekil 2.9 p-nitrofenol standart grafiği

3 BULGULAR ve TARTIŞMA

3.1 *P. aureofaciens*'ten çalkalamalı kültürlerde mcl-PHA üretimi

P. aureofaciens'in hücre içi PHA yıkım mekanizmasını araştırabilmek amacıyla öncelikle hücrenin PHA üretim profilinin detaylı bir şekilde bilinmesi gerekir. PHA üretim profilinden elde edilecek veriler yıkım mekanizmasının yorumlanmasında önemli veri kaynaklarından birini oluşturacaktır. Bu veriler vasıtasıyla hücrenin hangi saat aralığında PHA ürettiğini, ne zaman yıkıma başladığını, üretim ve yıkım sırasında ortamda ne gibi değişiklikler olduğunu görmek mümkün olacaktır.

P. aureofaciens' in PHA üretim profilini belirlemek amacıyla 6 saatlik periyotlar ile 120 saat boyunca örnek alındı ve bu örneklerde kuru kütle ve PHA tayini yapıldı. Aynı zamanda PHA üretiminde en etkin faktörlerden olan karbon ve azot kaynaklarının konsantrasyonundaki değişimi izlendi. Bu analizlerin yanı sıra aynı saatlere ilişkin örneklerin bir kısmı hücre içi metabolitlerin analizleri için -80°C ' de saklandı. Genel PHA üretim profiline ilişkin elde edilen veriler Şekil 3.1'de verilmektedir.



Şekil 3.1 mcl-PHA üretim profili

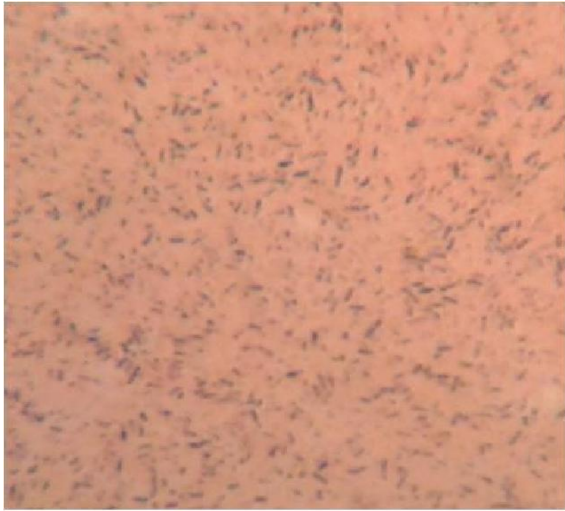
PHA üretim profili incelendiğinde ilk 6 saat boyunca hücrenin lag fazda, 6.-60. saatler arasında logaritmik evrede olduğu, 60. saatten sonra ise stasyoner evreye girdiği görülmektedir. Hücre azot kaynağının büyük bir kısmını lag fazında yaşamsal faaliyetlerini sürdürebilmek amacıyla genetik materyal ve protein sentezi için kullanmaktadır. Azot kaynağı 36. saatten sonra $2-3 \mu\text{g/ml}$ aralığında sabit kalmaktadır. Başlangıçta ortamda 15 g/L

oktanoat varken logaritmik evrede karbon kaynağını hızlı bir şekilde tüketilmiştir. 72. saatteki ortamdaki oktanoat miktarı 0,04 g/L olarak tayin edilmiş ve 72. saatten sonra da tamamen tüketildiği tespit edilmiştir. Ekspansiyel fazın sonunda (60. saatte) maksimum PHA miktarı 213,67 µg/ml'dir. Bu saatten sonra PHA üretimi yerine ortamda karbon kaynağının tükenmesine bağlı olarak mcl-PHA'nın degradasyonu söz konusudur. 60. saatten sonra hücre karbon kaynağı olarak depoladığı mcl-PHA'yı kullanabilmek için PHA yıkım yolağını aktive etmektedir. Hücre 96. saatten sonra ölüm fazına girmiştir ve biyokütlesinde düşüş gözlenmektedir. Elde edilen bu verilerle birlikte hücre içerisinde PHA yıkımın gerçekleştirildiği desteklenmiştir.

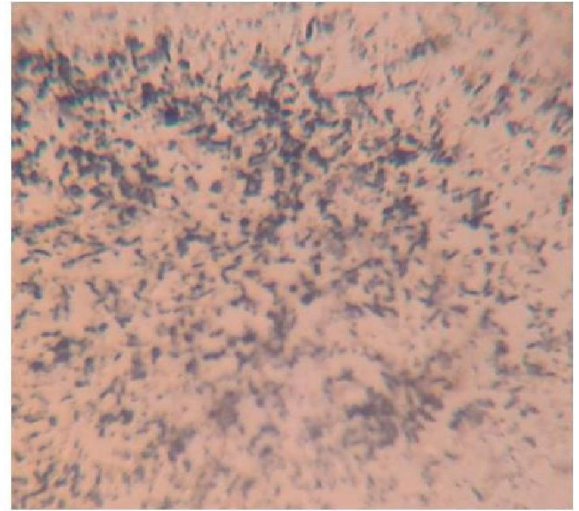
Üretim ortamında (C/N oranı yüksek ortam-pozitif kontrol) arta kalan karbon kaynağının tayini için belirli aralıklarla ortamdaki örnek alındı ve santrifüjlendi. Süpernatant Bölüm 2.10'da bahsedilen protokole göre türevlendirildi ve GC-MS ile analizlendi.

3.2 mcl-PHA'ların Kalitatif Tayini

Üretim ortamlarından alınarak örneklerde mcl-PHA üretimi Sudan Black ile boyama yapılarak kalitatif olarak izlenmiştir (Şekil 3.2). Şekil 3.2'de verilen görüntüler incelendiğinde PHA konsantrasyonunun 60. saatte arttığı net bir şekilde görülmektedir.



(24. saat)



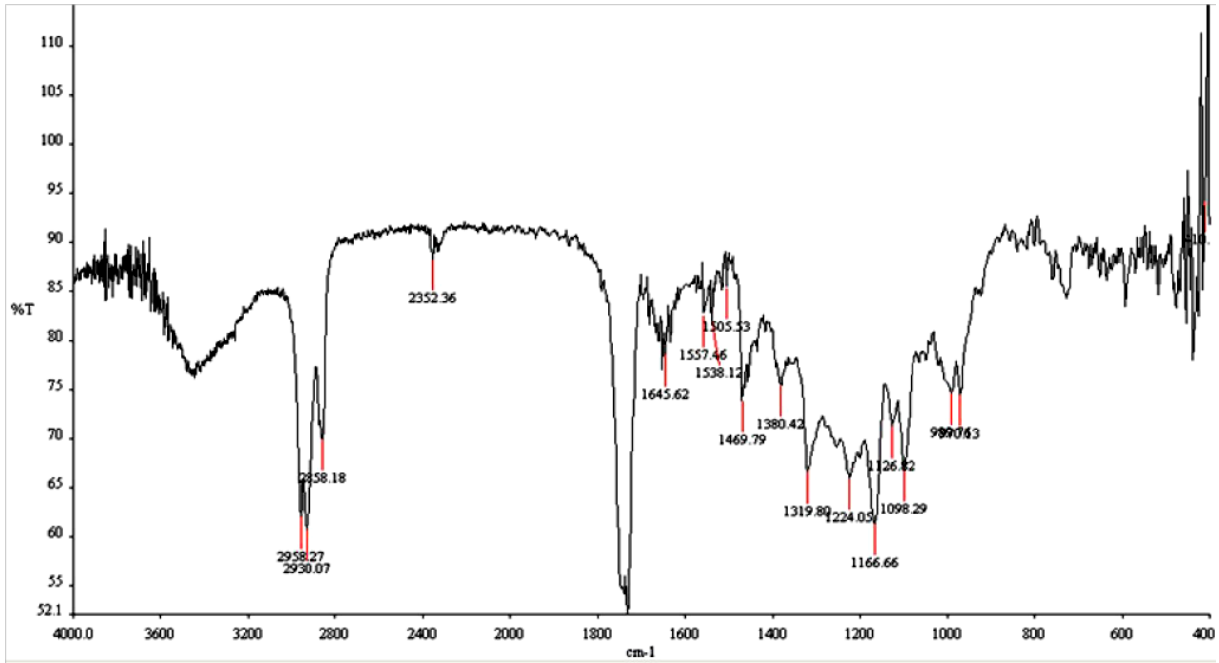
(60. saat)

Şekil 3.2 Üretim ortamından farklı zaman aralıklarında alınan örneklerde PHA'nın kalitatif tayini

3.3 Üretilen mcl-PHA'nın izolasyonu ve karakterizasyonu

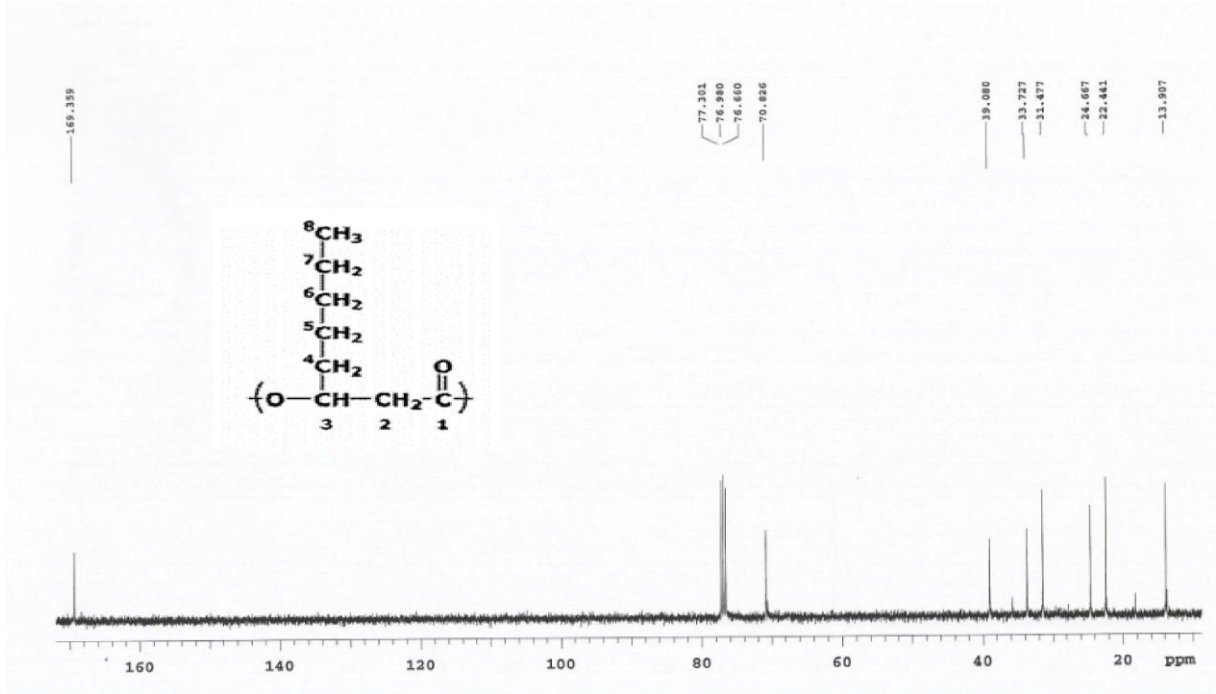
3.3.1 Spektroskopik analizler (FTIR, ¹³C-NMR ve ¹H-NMR)

P. aureofaciens tarafından optimum koşullarda üretim yapılarak saflaştırılan mcl-PHA; FTIR, ¹³C-NMR ve ¹H-NMR ile karakterize edilerek kimyasal yapısı hakkında bilgi edinilmiştir. Saflaştırılan mcl-PHA'ya ait FTIR spektrumu Şekil 3.3'te verilmektedir. Elde edilen spektrum incelendiğinde gözlenen fonksiyonel gruplar 3465 cm⁻¹ (-OH); 2958.27 cm⁻¹, 2930.07 cm⁻¹ ve 2858.18 cm⁻¹ (-CH₃ gerilme); 1743.01 cm⁻¹ (C=O, ester grubunun); 1469.79 cm⁻¹ (δCH₃/äCH₂); 1380,42 cm⁻¹ (δCH₃) ve 1166.66 cm⁻¹ (C-O)'dir.

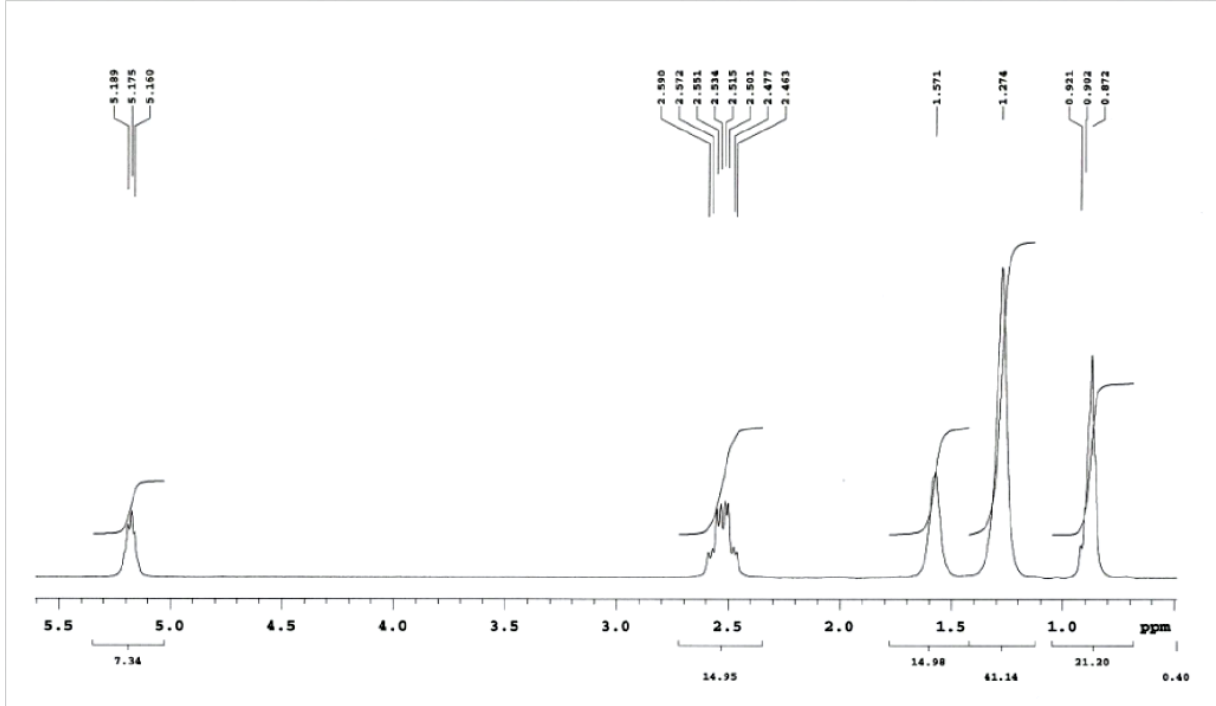


Şekil 3.3 *P. aureofaciens* tarafından üretilen mcl-PHA'a ait FT-IR spektrumu

Safılaştırılan mcl-PHA'ya ait ^{13}C -NMR ve ^1H -NMR spektrumu Şekil 3.4 ve Şekil 3.5'da verilmektedir. Şekil 3.4'te görüldüğü gibi, ^{13}C -NMR spektrumunda sekiz farklı pik gözlenmiştir. C1 (C=O grubu) 169.359 ppm'de; C2 (-CH₂ grubu) 39.08 ppm'de; C3 (-CH grubu) 70.826 ppm'de; C4, C5, C6 ve C7 (-CH₂ grubu) sırasıyla 33.727, 24.667, 31.477 ve 22.441 ppm'de; C8 (-CH₃ grubu) ise 13.907 ppm'de pik vermiştir. Şekil 3.5'te verilen ^1H -NMR spektrumu da bu sonuçları destekler niteliktedir. Spektroskopik karakterizasyon sonucunda elde edilen veriler üretilen biyopolimerde ester bağlarının ve yan zincirde alkil grubunun varlığını göstermektedir. Ayrıca *P. aurefaciens* tarafından üretilen biyopolimerin monomer basına 8C içeren orta zincirli PHA (mcl-PHA) olduğunu ve 3-hidroksioktanoat monomerlerinden oluştuğunu kanıtlamaktadır.



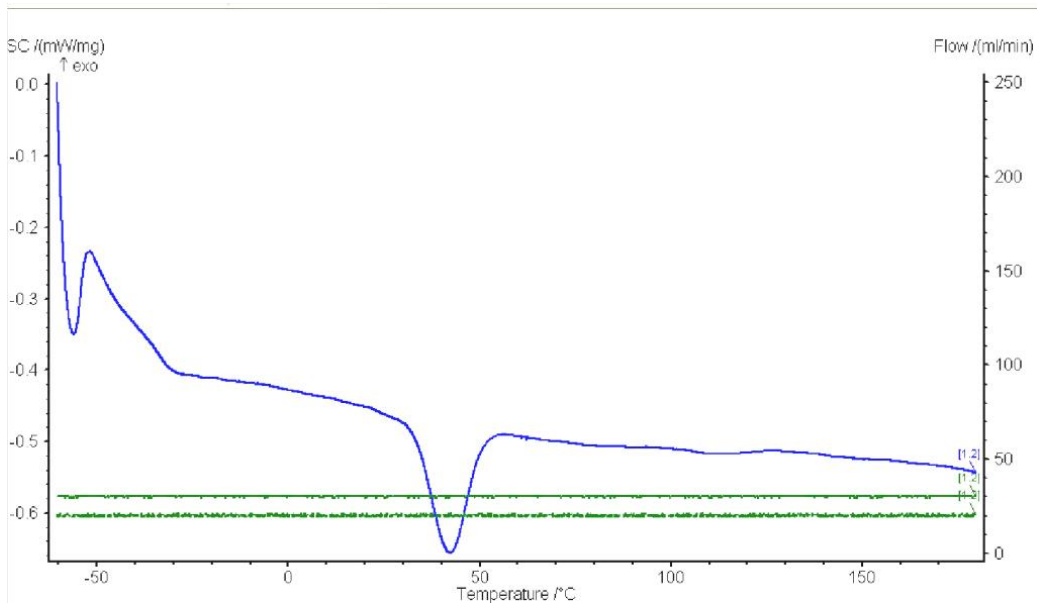
Şekil 3.4 *P. aurefaciens* tarafından üretilen mcl-PHA'a ait ^{13}C -NMR spektrumu



Şekil 3.5 *P. aureofaciens* tarafından üretilen mcl-PHA'a ait ¹H-NMR spektrumu

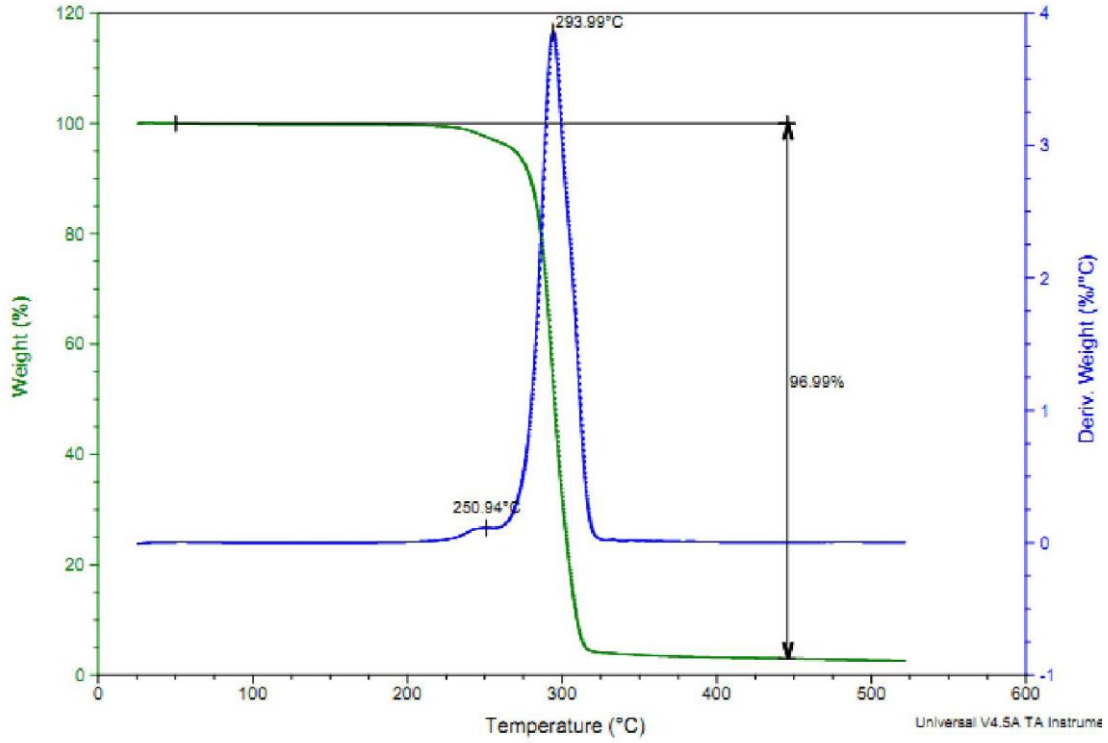
3.3.2 mcl-PHA'nın termal özellikleri

Saflaştırılan mcl-PHA örneğinin termoanalitik özellikleri DSC 204 (Netzsch, UNAM) ile Bölüm 2.12.2'de verilen protokole göre belirlenmiştir. *P. aureofaciens* tarafından üretilen mcl-PHA'nın DSC eğrisi Şekil 3.6'de verilmektedir. DSC eğrisinin verileri değerlendirildiğinde mcl-PHA'nın erime noktası (T_m) "42°C", cam geçiş sıcaklığı (T_g) ise "- 41°C" olarak saptanmıştır. Elde edilen bulgular mevcut literatürlerle karşılaştırıldığında benzer sonuçlarla karşılaşılmaktadır.



Şekil 3.6 *Pseudomonas aureofaciens* tarafından üretilen mcl-PHA'nın DSC eğrisi

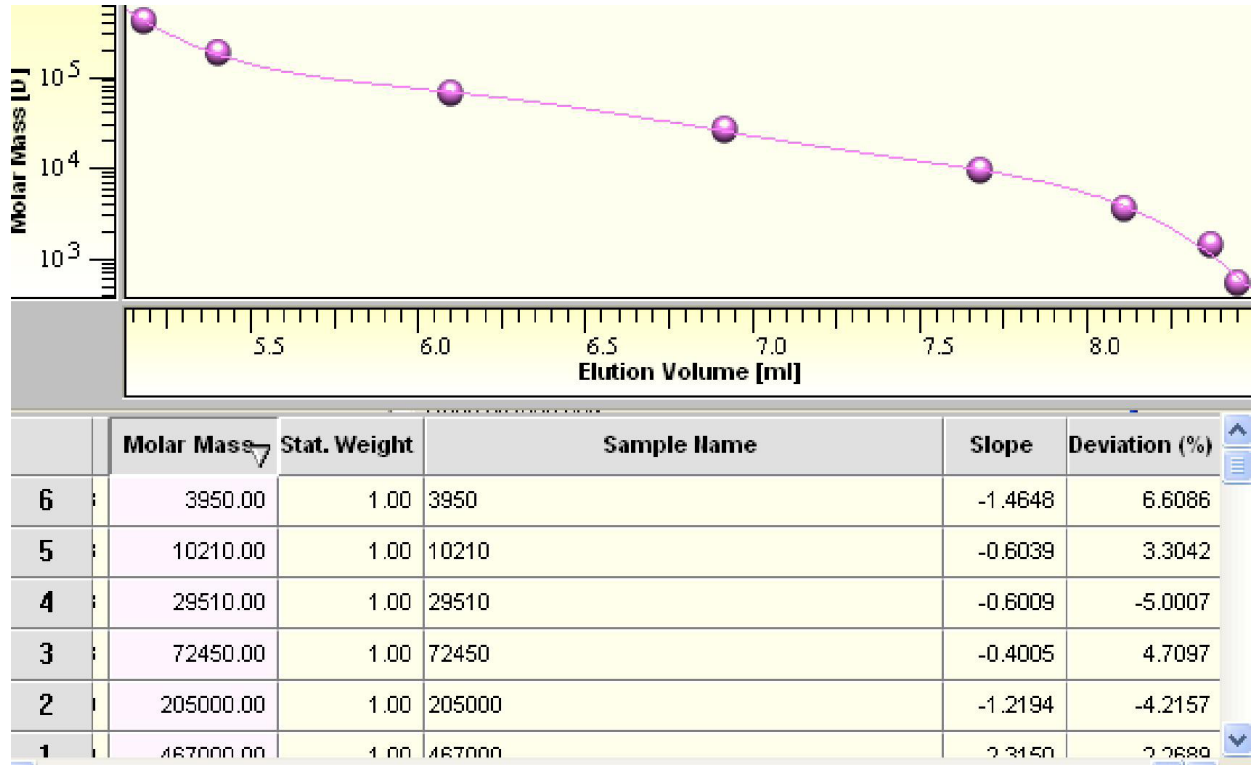
Saflaştırılan mcl-PHA örneğinin termal gravimetrik özellikleri ise TGA Q500 (TA instruments, UNAM) ile Bölüm 2.12.2 'de verilen protokole göre belirlenmiştir. *Pseudomonas aureofaciens* tarafından üretilen mcl-PHA'nın TGA termogramı Şekil 3.7'de verilmektedir. Termogram incelendiğinde mcl-PHA'nın kimyasal yapısının 294°C'de (T_d ; termal degradasyon sıcaklığı) %96'sının tamamen bozunduğu görülmektedir.



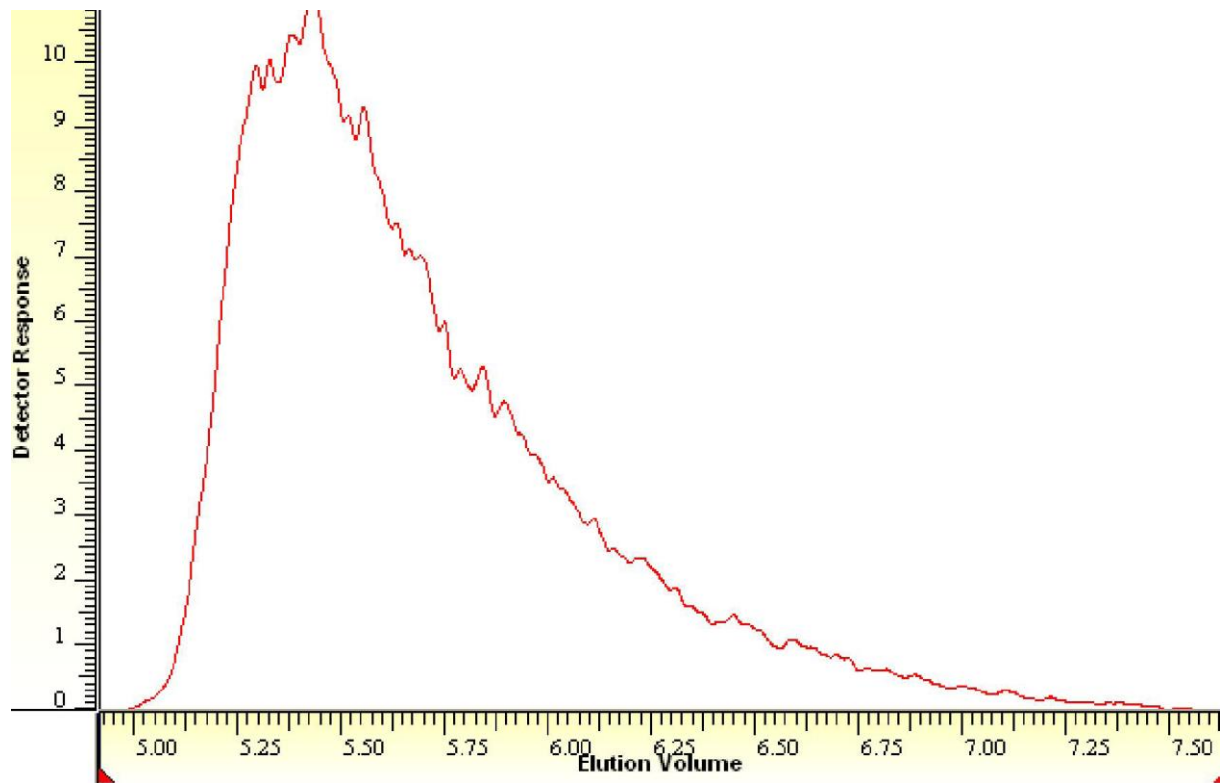
Şekil 3.7 *P. aureofaciens* tarafından üretilen mcl-PHA'nın TGA termogramı

3.3.3 mcl-PHA'nın molekül ağırlığı

Saflaştırılan mcl-PHA'nın molekül ağırlığı jel filtrasyon kromatografisi (Agilent 1200, UNAM) ile belirlendi. Kalibrasyon eğrisi farklı molekül ağırlığına sahip standart polistiren çözeltileri (5.75x10², 1.53x10³, 3.95x10³, 10.21x10³, 29.51x10³, 72.45x10³, 2.05x10⁵, 4.67x10⁵) kullanılarak oluşturuldu (Sekil 3.8) ve elüsyon ELSD dedektör kullanılarak izlendi. *P. aureofaciens* tarafından üretilen mcl-PHA'nın GPC ile analizi sonucu elde edilen elüsyon kromatogramı (Sekil 3.9) değerlendirildiğinde $M_n = 160,55$ kDa; $M_w = 248,70$ kDa ve $M_z = 376,75$ kDa olarak tespit edilmiştir. Polidispersite (M_w/M_n) = 1.5 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.8 GPC polistiren standart grafiği

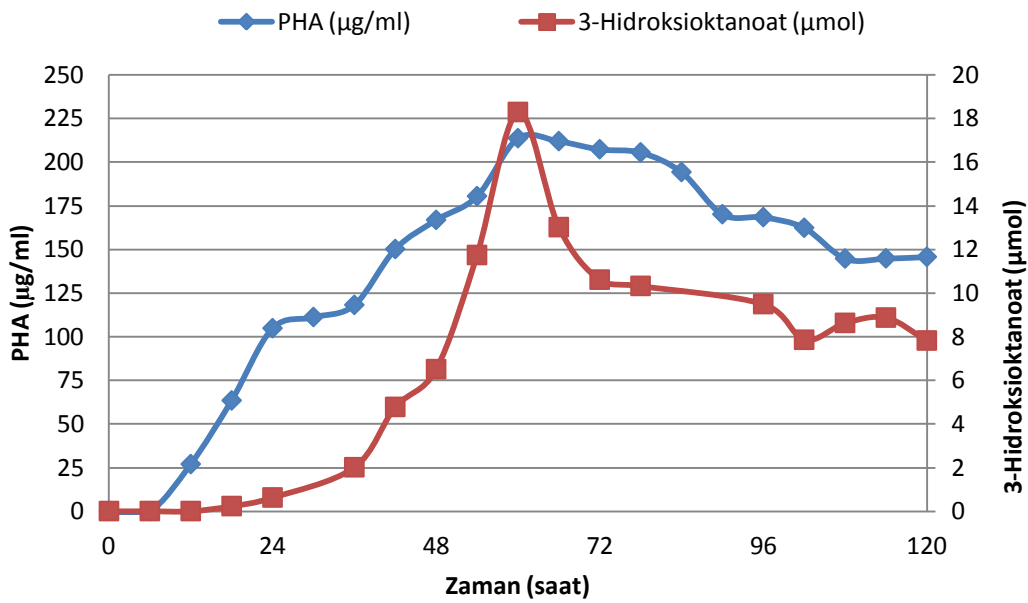


Şekil 3.9 *P. aureofaciens* tarafından üretilen mcl-PHA'nın GPC ile analizi sonucu elde edilen elüsyon kromatogramı

3.4 Hücre içi Metabolitlerin GC-MS ile Analizi

3.4.1 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda gerçekleştirilen metabolit analizleri

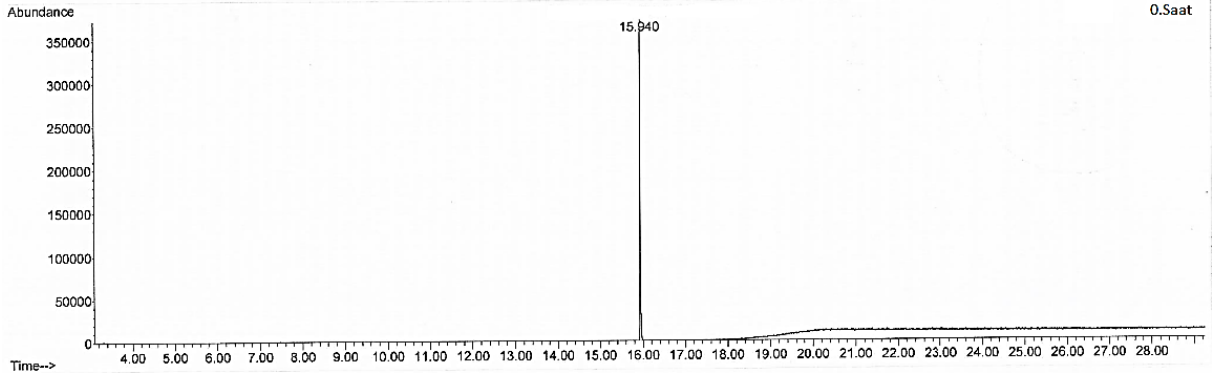
Hücrenin PHA üretim koşullarındaki metabolizmasını incelemek amacıyla 6 saatlik periyotlar boyunca alınan örneklerde Bölüm 2.13' de verilen şekilde metabolit analizleri gerçekleştirildi. PHA üretimi sırasında açığa çıkan 3-Hidroksioktanoatın değişimine ilişkin veriler Şekil 3.10' de yer almaktadır.



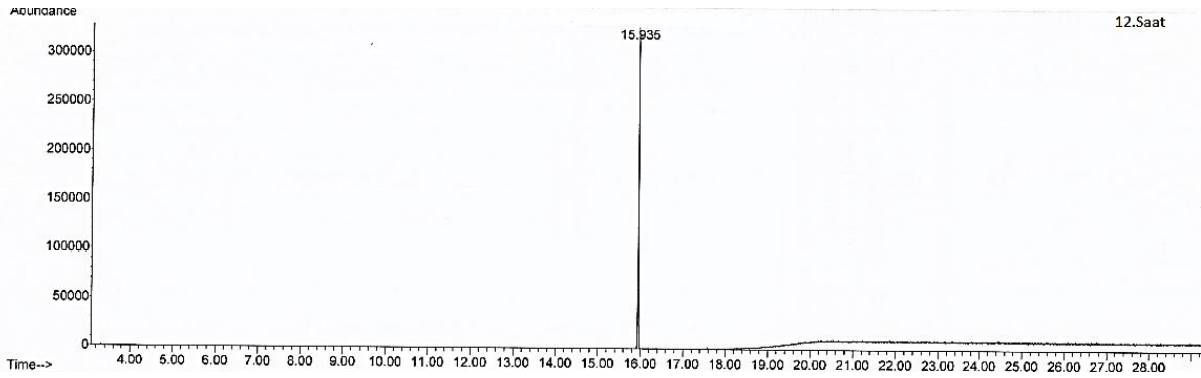
Şekil 3.10 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda PHA ve 3-hidroksioktanoat miktarının değişimi

PHA polimerinin oluşturan 3-hidroksioktanoat monomerlerinin miktarı, 3-hidroksioktanoat standart grafiği kullanılarak hesaplandı ve PHA miktarına paralel bir şekilde değiştiği gözlemlendi. PHA miktarı 60. saatte maksimum değerine ulaşırken, benzer şekilde hücre içerisindeki 3-hidroksioktanoat miktarı da 60. saatte maksimum değerine ulaşmış ve bu değerden sonra azalmaya başlamıştır. Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda elde edilen, PHA miktarı, biyokütle ve azot miktarındaki değişimler bu değerler ile de paralellik göstermektedir ve birbirini desteklemektedir. Tahmin edilebileceği gibi polimer değişimi ve monomer değişimi birbiri içerisinde tutarlılık göstermektedir.

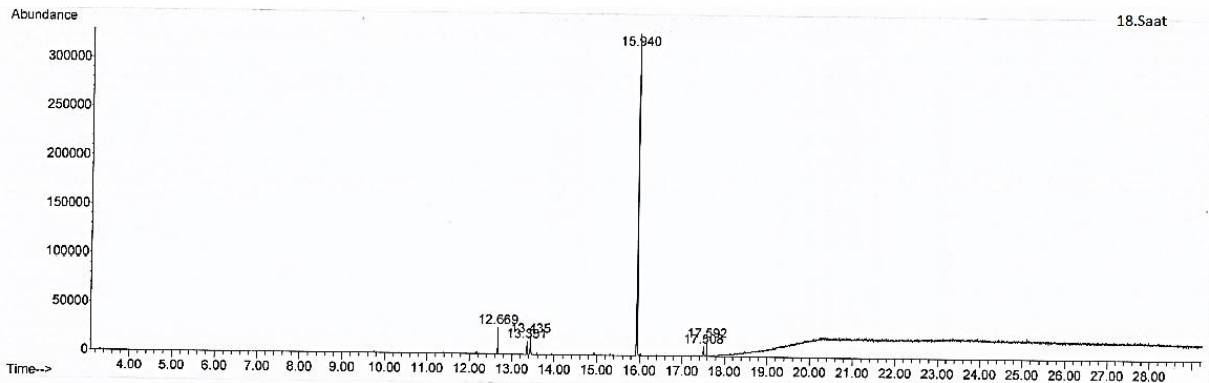
Belirli zaman aralıklarıyla alınan örneklerde gerçekleştirilen metabolit analizleri sonucunda elde edilen gaz kromatogramları Şekil 3.11, Şekil 3.12, Şekil 3.13, Şekil 3.14, Şekil 3.15, Şekil 3.16, Şekil 3.17, Şekil 3.18, Şekil 3.19, Şekil 3.20 ve Şekil 3.21'de verilmektedir.



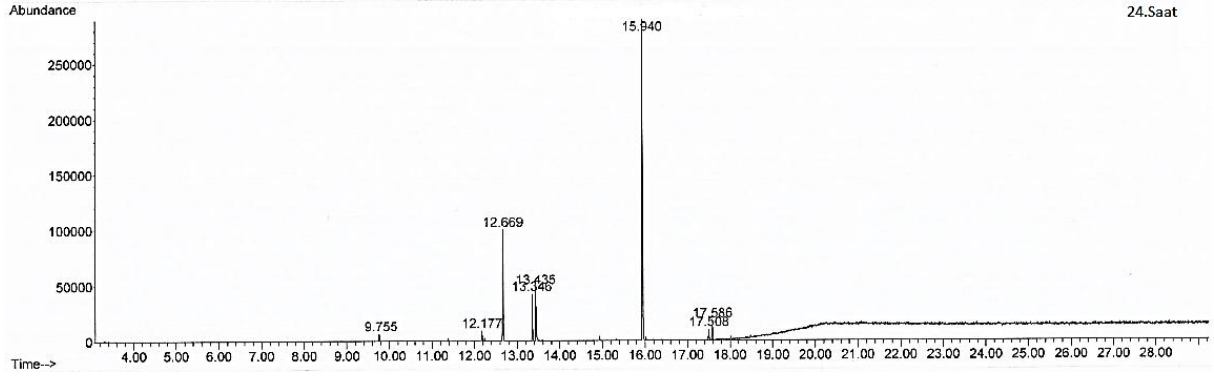
Şekil 3.11 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 0. saate ait gaz kromatogramı



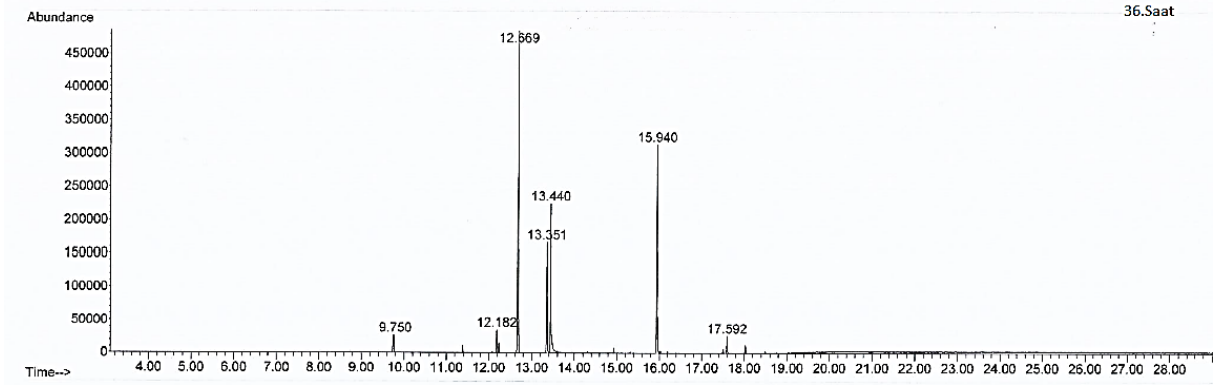
Şekil 3.12 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 12. saate ait gaz kromatogramı



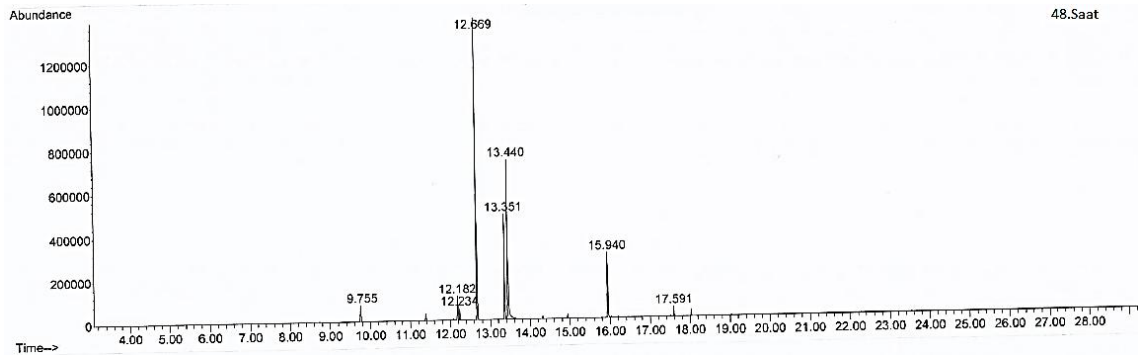
Şekil 3.13 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 18. saate ait gaz kromatogramı



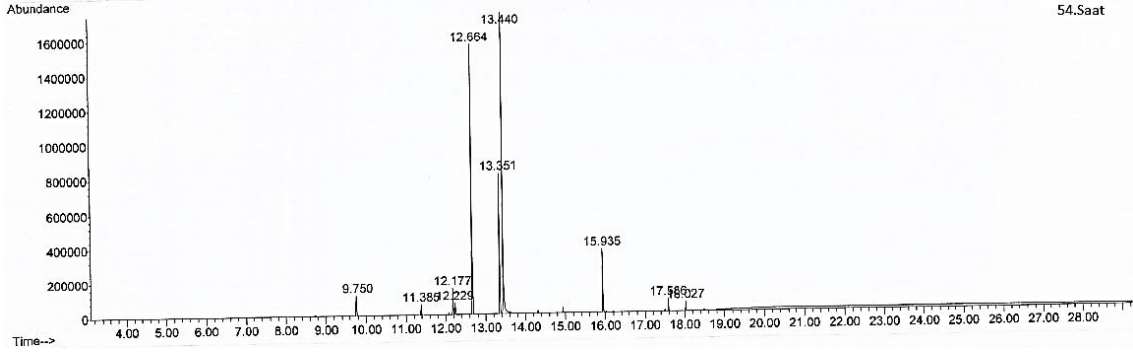
Şekil 3.14 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 24. saate ait gaz kromatogramı



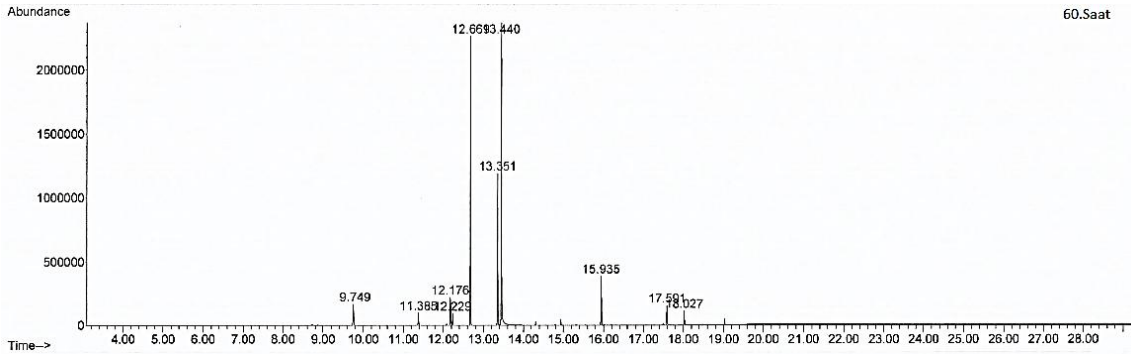
Şekil 3.15 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 36. saate ait gaz kromatogramı



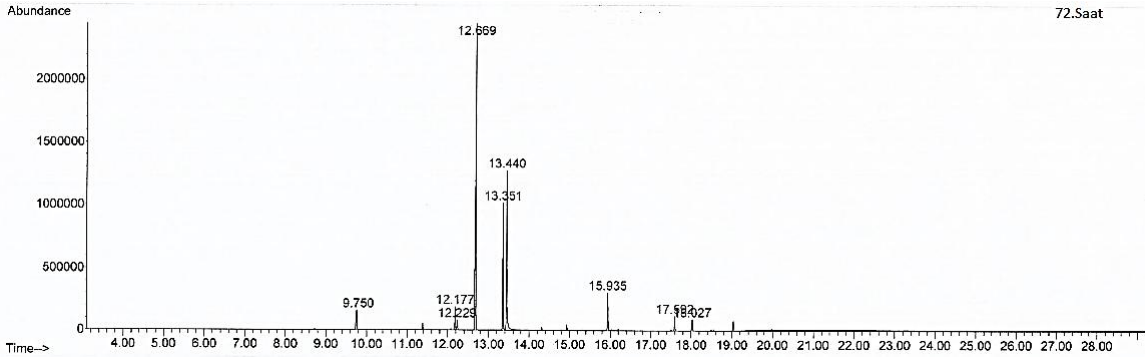
Şekil 3.16 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 48. saate ait gaz kromatogramı



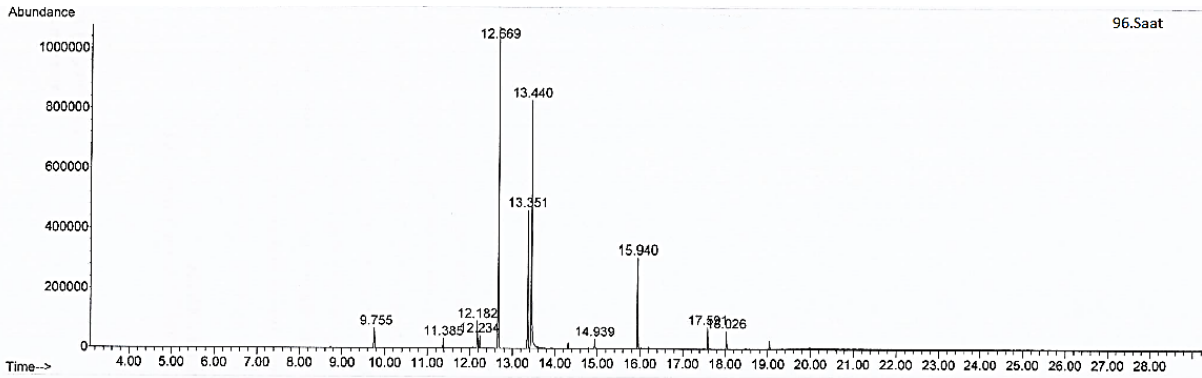
Şekil 3.17 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 54. saate ait gaz kromatogramı



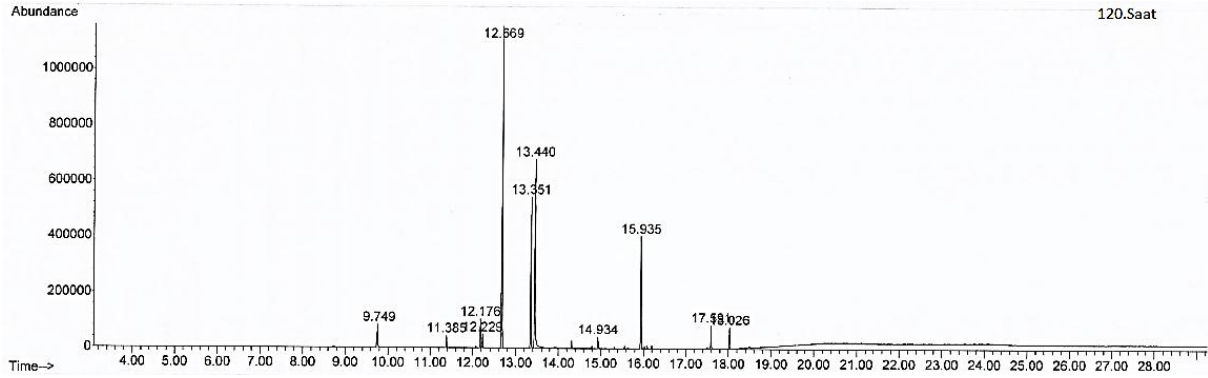
Şekil 3.18 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 60. saate ait gaz kromatogramı



Şekil 3.19 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 72. saate ait gaz kromatogramı



Şekil 3.20 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 96. saate ait gaz kromatogramı



Şekil 3.21 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 120. saate ait gaz kromatogramı

Gaz kromatogramları incelendiğinde 18. saatten sonra, 3-hidroksioktanoat dışında hücre içerisinde çeşitli yağ asidi türevli metabolitlerin varlığına da rastlanmaktadır. Bu metabolitlerin neler olabileceğine ilişkin veriler belirli saat aralığında alınan örnekler için kromatogramlarda ve MS kütüphanesinden (Wiley7Nist05) elde edilen verilerden oluşturulan Çizelge 3.1' de yer almaktadır.

Çizelge 3.1 MS kütüphanesinden elde edilen metabolit profilleri (Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 60. saate ait örnek baz alınmıştır)

Alıkonma Zamanı	Bileşik İsmi	Qual Değeri
9.749	2-Hekzenoik asit, metil ester	95
12.176	Trans-3-oktenoik asit, metil ester	72
12.229	Cis-3-oktenoik asit, metil ester	93
12.669	2-Oktenoik asit, metil ester	93
13.440	3-Hidroksioktanoat, metil ester	97
15.935	Tridekanoik asit, metil ester (İnternal Standart)	98
17.591	Hekzadekanoik asit (Palmitik asit), metil ester	99
18.027	Siklopropan oktenoik asit, 2 heksil	95

Kromatogramlardan da görüleceği gibi 3-hidroksioktanoat miktarı PHA miktarına paralel şekilde artıp azalmaktadır. Kromatogramlarda hekzenoik asit türevli bileşiklere rastlanmıştır fakat diğer 3-hidroksi yağ asitlerinin varlığı tespit edilememiştir.

Trans-3-oktenoik asit, cis-3-oktenoik asit ve 2-oktenoik asidin PHA metabolizmasında oktanoattan 3-hidroksioktanoat ve PHA sentezinde ara metabolitler oldukları düşünülmektedir. Biyosentez ve yıkım mekanizmalarında benzer adımlar üzerinde bir dizi izomerizasyon reaksiyonları ile dönüşümün gerçekleştiği var sayılmaktadır. 15.935 alıkonma zamanında gelen pik tridekanoik aside ait olup, internal standart olarak eklenmiştir. Bu pikten

sonra genel diğer piklerin organizmanın doğal metabolitleri olduğu düşünülmektedir ve bunu doğrulamak amacıyla PHA üretiminin gerçekleşmediği genel bir besi yerinde metabolit profilleri çıkartılmıştır.

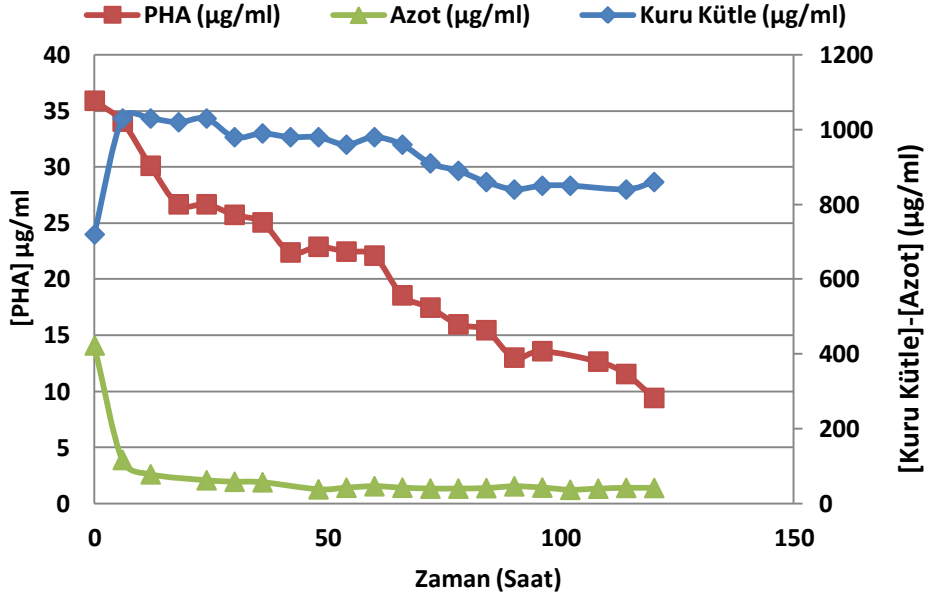
Alınan örneklerde yapılan analizler sonucu elde edilen veriler Çizelge 3.2'de özetlenmiştir.

Çizelge 3.2 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda gerçekleştirilen analizlerde MS kütüphanesinden elde edilen metabolit profilleri

Metabolit/Zaman (Saat)	0	12	18	24	36	48	54	60	72	96	120
Hekzanal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Hekzenoik asit, metil ester	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Oktanal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trans-3-oktenoik asit, metil ester	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Cis-3-oktenoik asit, metil ester	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
2-Oktenoik asit, metil ester	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3-Hidroksioktanoat, metil ester	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tridekanoik asit, metil ester (İnternal Standart)	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9-hekzadekanoik asit, metil ester	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hekzadekanoik asit (Palmitik asit), metil ester	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Siklopropan oktenoik asit, 2 hegzil	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+

3.4.2 Açlık koşullarında *P. aureofaciens'* de mcl-PHA'nın yıkım profilinin oluşturulması

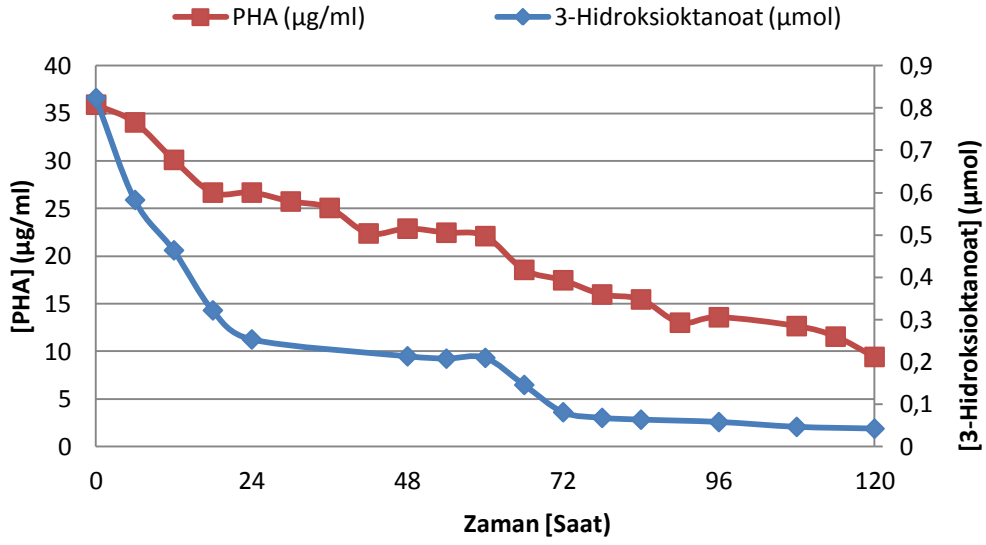
Doğal üretici *P. aureofaciens'* de PHA yıkımının teşviki amacıyla Bölüm 2.5 başlığı altındaki koşullarda üretim yapıldı. Karbon açlığı koşullarında mikroorganizmanın hücre içi mcl-PHA'ları karbon kaynağı olarak kullanması beklendiğinden 6 saatlik periyotlarla 120 saat boyunca kültür ortamından örnek alınarak hücre içi yıkım profilini oluşturmak amacıyla mcl-PHA, kuru kütle ve ortamdaki serbest azot miktarındaki değişimler izlendi. İlgili mcl-PHA yıkım profili Şekil 3.22'de yer almaktadır.



Şekil 3.22 mcl-PHA yıkım profili (açlık koşullarında)

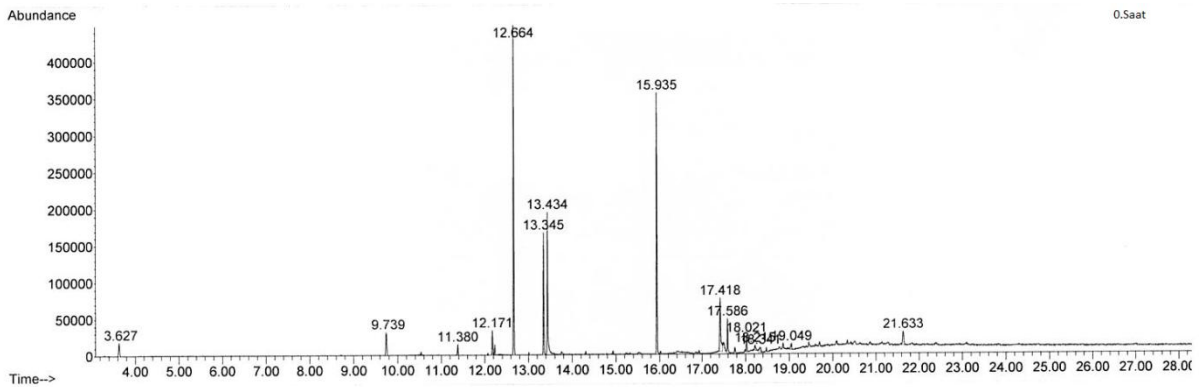
Yapılan analiz sonucunda beklendiği gibi hücre PHA'yı stres koşulları altında, karbon kaynağının bulunmadığı ortamda, yaşamsal faaliyetlerini sürdürebilmek için karbon kaynağı olarak kullanmaktadır. mcl-PHA miktarı 120. saatin sonunda 9 µg/ml' ye kadar düşmektedir. 0 ile 6. saat arasında hücrenin biyokütlesinde küçük bir artış gözlenmektedir. Serbest azot miktarında aynı sürede yüksek miktarda azalmakta ve 30.saatten sonra azalış yavaşlamakta ve 48. saatten sonra yaklaşık olarak sabit kalarak sifıra doğru yaklaşmaktadır. Hücre 0-6 saat aralığında PHA' yı depolimerize ve metabolize etmek için gerekli enzimleri üretmek amacıyla ortamdaki serbest azotu kullanmaktadır. Biyoküttele ise 12. saatten sonra bir azalma gözlenmektedir. Bu azalmanın sebebi ortamdaki karbon kaynağının azlığı ve azot kaynağının yetersizliğidir. 30. saatten sonrada 60. saate kadar sabit biyokütle gözlenmektedir. Hücre aşırı stress koşullarına maruz kaldığı için yaşamsal faaliyetlerini sürdürmekte güçlük çekmektedir ve 60. saatten sonra biyoküttelede yine bir azalma gözlenmektedir ve 90 ile 120. saat aralığında yaklaşık olarak sabit kalmaktadır.

Alınan örneklerde aynı zamanda GC-MS ile genel profile benzer şekilde yıkıma ilişkin metabolit analizi yapıldı. 3-hidroksikoktanoat miktarındaki değişim Şekil 3.23'te yer almaktadır.

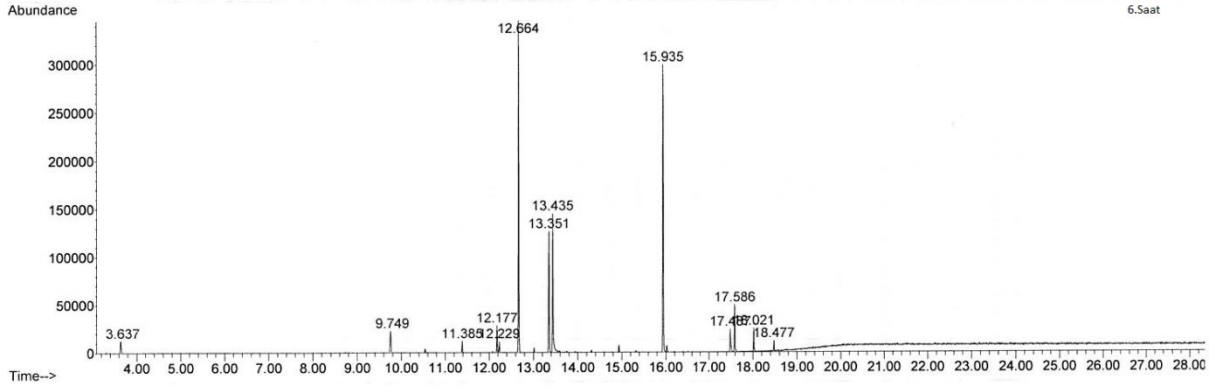


Şekil 3.23 Açlık koşullarına ait PHA ve 3-Hidroksioktanoat miktarının değişimi

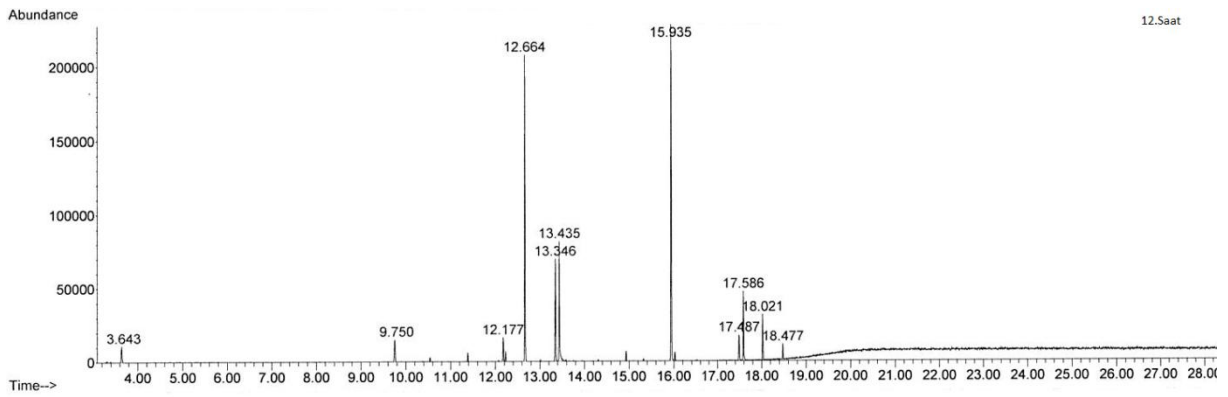
Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullardaki profilde olduğu gibi açlık koşullarına ait profilde de benzer bir durum söz konusudur. PHA miktarındaki değişim beklendiği gibi 3-Hidroksioktanoat miktarındaki değişime paraleldir. Başlangıçtaki PHA miktarının azlığına bağlı olarak ölçülen 3-hidroksi oktanoat miktarı da oldukça az olmaktadır ve kromatogramlarda görülen pikler oldukça küçüktür. Hatta 120.saatte 0,1 µmolün altına düşmektedir. Bundan dolayı 120. saatteki 3-hidroksioktanoat pikinin integrasyon değeri gözükmemektedir. Benzer durum ortamdaki diğer piklerde de gözlenmektedir. İlgili gaz kromatogramları ve MS kütüphanesinden elde edilen diğer metabolitlere ilişkin veriler Şekil 3.24, Şekil 3.25, Şekil 3.26, Şekil 3.27, Şekil 3.28, Şekil 3.29, Şekil 3.30, Şekil 3.31, Şekil 3.32, ve Çizelge 3.3' de yer almaktadır.



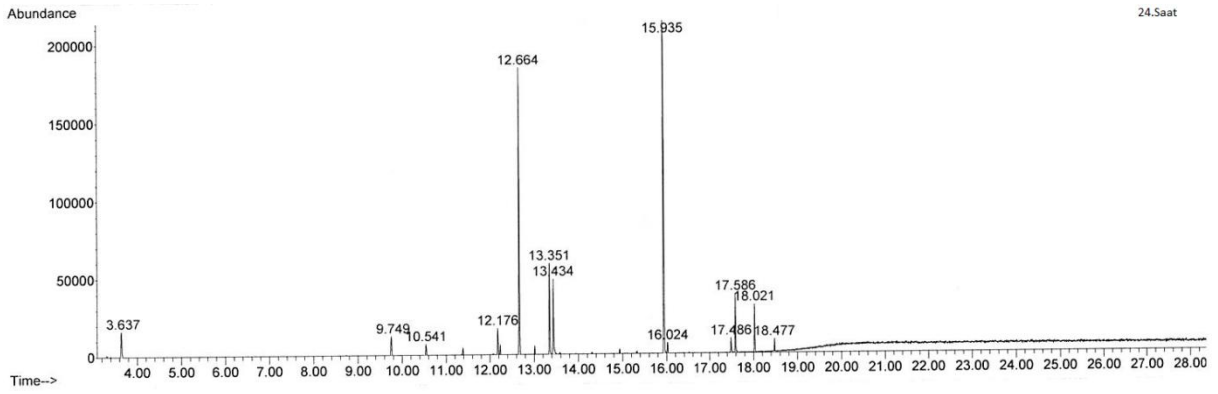
Şekil 3.24 Açlık koşullarına ait 0. saat gaz kromatogramı



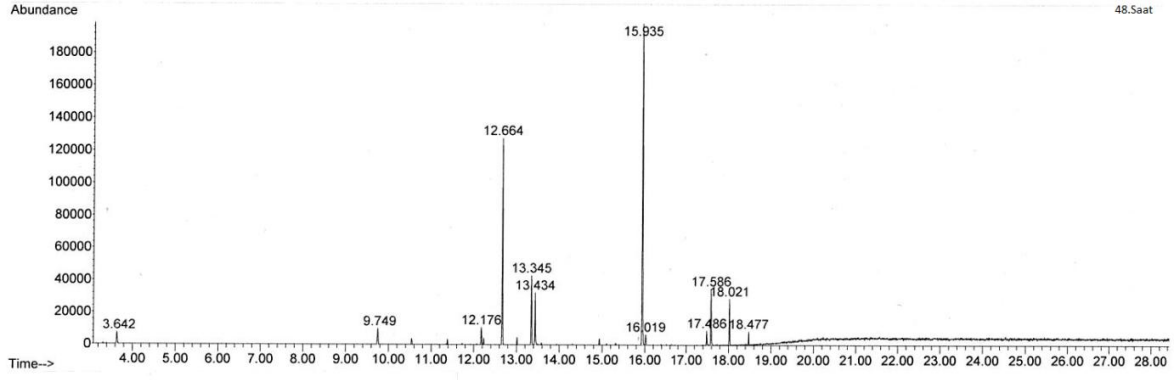
Şekil 3.25 Açlık koşullarına ait 6. saat gaz kromatogramı



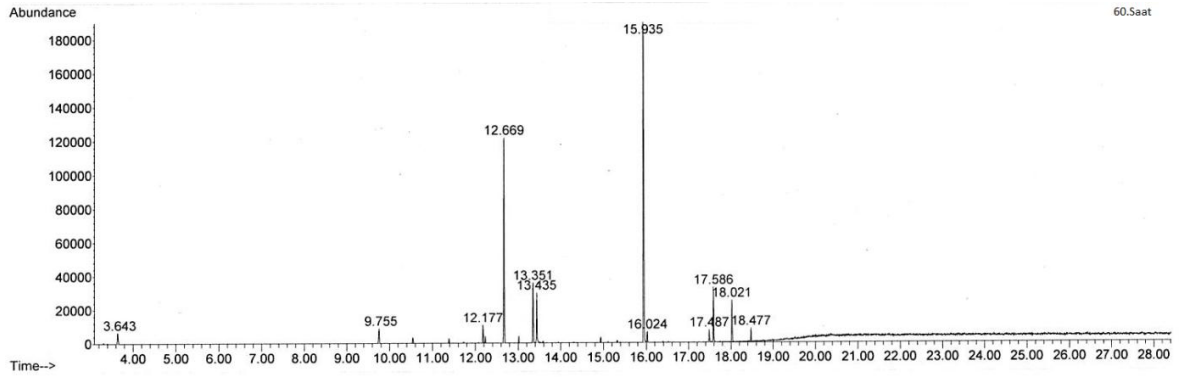
Şekil 3.26 Açlık koşullarına ait 12. saat gaz kromatogramı



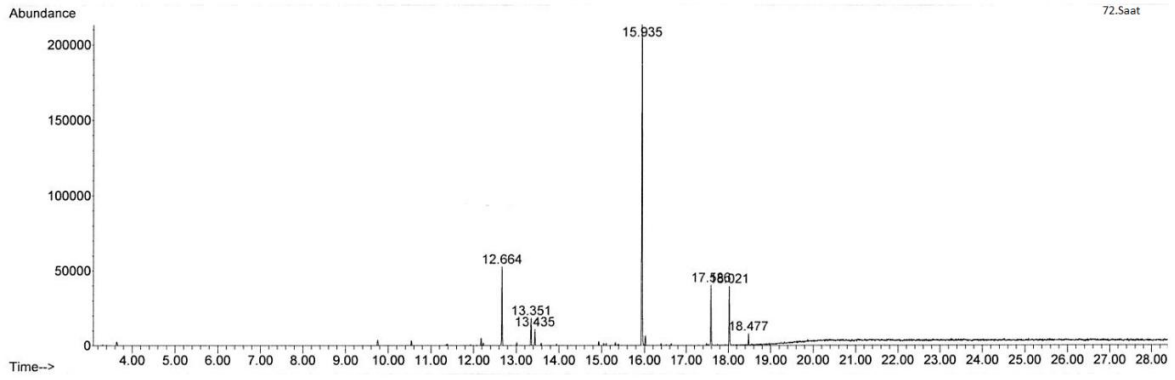
Şekil 3.27 Açlık koşullarına ait 24. saat gaz kromatogramı



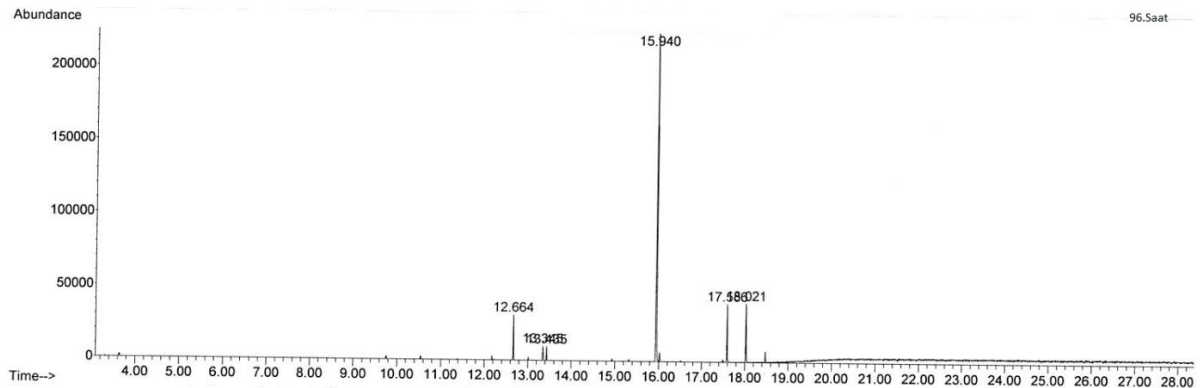
Şekil 3.28 Açlık koşullarına ait 48. saat gaz kromatogramı



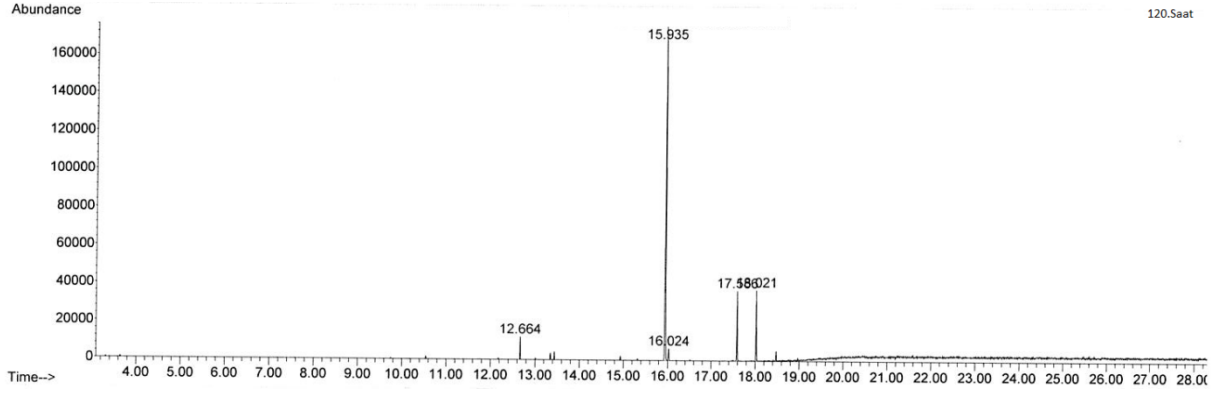
Şekil 3.29 Açlık koşullarına ait 60. saat gaz kromatogramı



Şekil 3.30 Açlık koşullarına ait 72. saat gaz kromatogramı



Şekil 3.31 Açlık koşullarına ait 96. saat gaz kromatogramı



Şekil 3.32 Açlık koşullarına ait 120. saat gaz kromatogramı

Kromatogramlardan da görüleceği gibi 3-hidroksioktanoat miktarı PHA miktarına paralel şekilde azalmaktadır. 60.saattten sonra birçok metabolite ilişkin pikler kaybolmaktadır. Bu saatlerden sonra artık hücrenin kullanabileceği kaynak miktarı oldukça azalmaktadır. Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullardan farklı olarak hekzanal, oktanal gibi bazı aldehit türevli bileşiklerin varlığı gözlenmektedir (Çizelge 3.3). Bunların yıkım ile ilişkisinin olup olmadığı PHA üretimi olmayan ortamdaki metabolitler analizlendikten sonra doğrulanabilecektir.

Çizelge 3.3 MS kütüphanesinden elde edilen metabolit profilleri (Açlık koşullarında 24. saate ait örnek baz alınmıştır)

Alıkonma Zamanı	Bileşik İsmi	Qual Değeri
3.637	Hekzanal	78
9.479	2-hekzenoik asiti, metil ester	87
10.541	Oktanal	72
12.176	Cis-3-oktenoik asit, metil ester	64
12.664	2-oktenoik asit, metil ester	83
13.434	3-hidroksioktanoat, metil ester	95
15.935	Tridekanoik asit, metil ester (İnternal Standart)	98
17.486	9-hekzadekanoik asit, metil ester	58
17.586	Hekzadekanoik asit (Palmitik asit), metil ester	98
18.021	Siklopropan oktanoik asit, 2 hegzil	91

Alınan örneklerde yapılan analizler sonucu elde edilen veriler Çizelge 3.4'de özetlenmiştir.

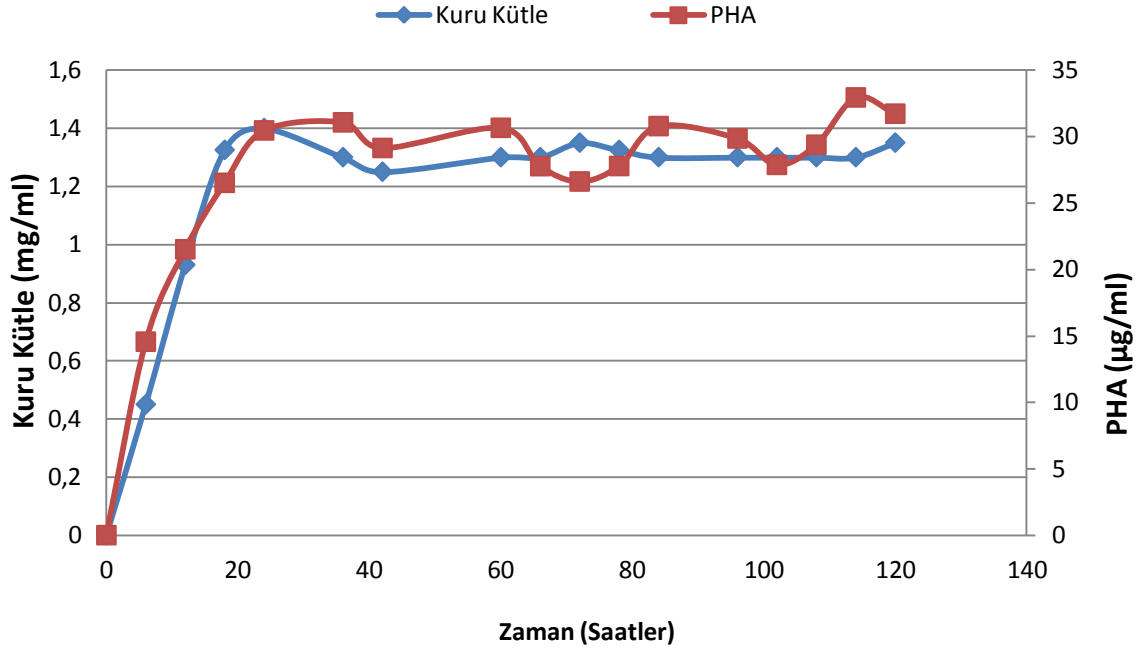
Çizelge 3.4 Açlık koşullarında hücre içi mcl-PHA üretiminin izlendiği analizlerde MS kütüphanesinden elde edilen metabolit profilleri

Metabolit/Zaman (Saat)	0	12	24	48	60	72	96	120
Hekzanal	+	+	+	+	+	-	-	-
2-Hekzenoik asit, metil ester	+	+	+	+	+	-	-	-
Oktanal	-	-	+	-	-	-	-	-
Trans-3-oktenoik asit, metil ester	-	-	-	-	-	-	-	-
Cis-3-oktenoik asit, metil ester	+	+	+	+	+	-	-	-
2-Oktenoik asit, metil ester	+	+	+	+	+	+	+	+
3-Hidroksioktanoat, metil ester	+	+	+	+	+	+	+	+
Tridekanoik asit, metil ester (İnternal Standart)	+	+	+	+	+	+	+	+
9-hekzadekanoik asit, metil ester	+	+	+	+	+	-	-	-
Hekzadekanoik asit (Palmitik asit), metil ester	+	+	+	+	+	+	+	+
Siklopropan oktenoik asit, 2 hekzil	+	+	+	+	+	+	+	+

Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda da olduğu gibi cis-3-oktenoik asit ve 2-oktenoik asit gibi metabolitler gözlenmektedir. Önceden de bahsedildiği gibi bunların PHA metabolizmasıyla ilişkisi olduğu düşünülmektedir. Trans-3-oktenoik asit gözlenmemiştir. Fakat cis türevli izomerinin pikinin yanında oldukça küçük bir pik bulunmakta ve dedeksiyon limitinin altında kaldığı düşünülmektedir. Ayrıca cis-3- oktenoik asit pikinde ufak bir kayma olduğu ve trans izomerinin olması gerektiği yerde geldiği düşünülmektedir. Nitekim Qual değeri de hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullara nazaran düşük gelmiştir (Çizelge 3.3). Örneklerdeki metabolit miktarları azaldıkça dedeksiyonları da bir o kadar zorlaşmaktadır. Ayrıca izomer karakterli bileşiklerin benzer yapılarından dolayı ayrılımları da bir o kadar zordur. İnternal standarttan sonra gelen piklerin ise organizmanın doğal metabolizmasıyla ilişkisi olduğu düşünülmektedir.

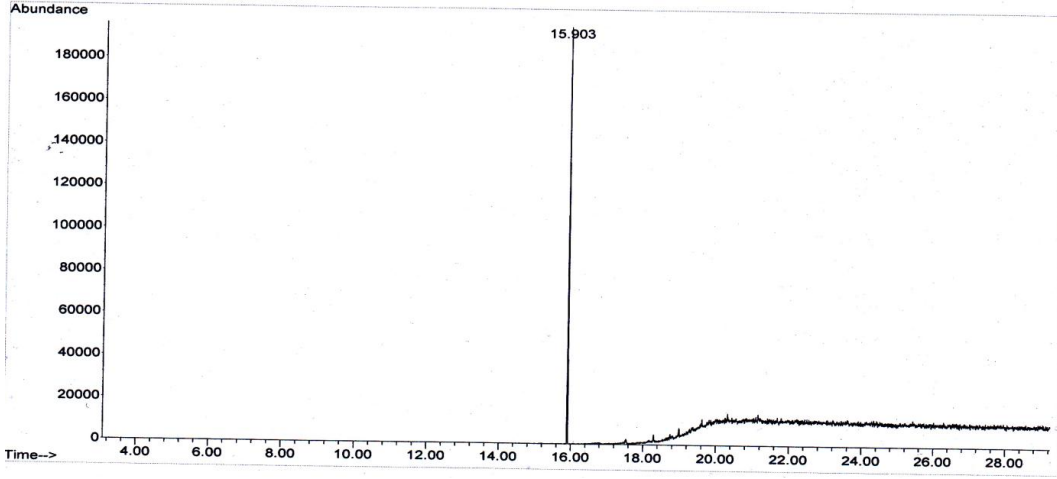
3.4.3 Çalkalamalı kültürlerde mcl-PHA üretiminin teşvik edilmediği koşulun oluşturulması

P. aureofaciens' in PHA üretiminin teşvik edilmediği koşullardaki profilini belirlemek amacıyla LB ortamında yapılan üretimlerden 6 saatlik periyotlar ile 120 saat boyunca örnek alındı ve bu örneklerde kuru kütle ve PHA tayini yapıldı. Yapılan analizlere ilişkin profil Şekil 3.33' te yer almaktadır.

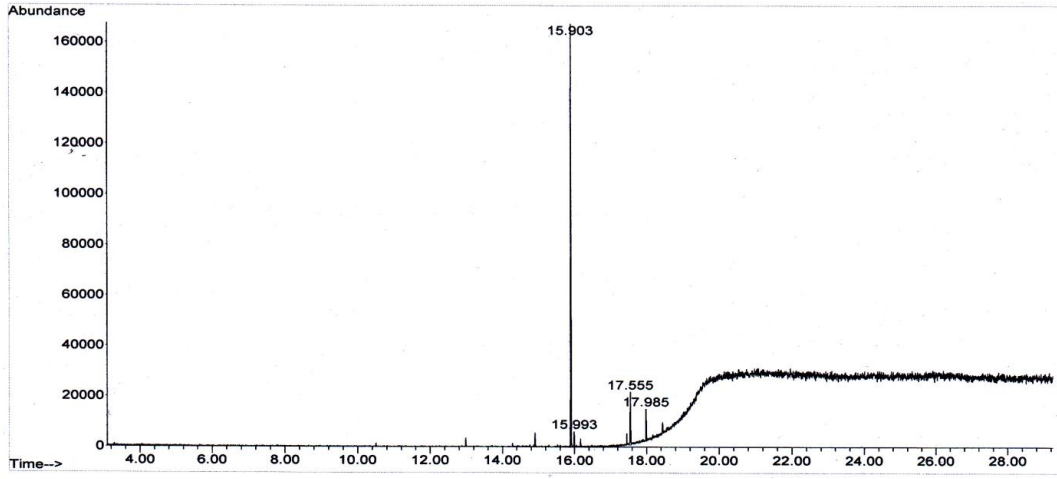


Şekil 3.33 PHA üretiminin teşvik edilmediği koşullardaki mcl-PHA yıkım profili.

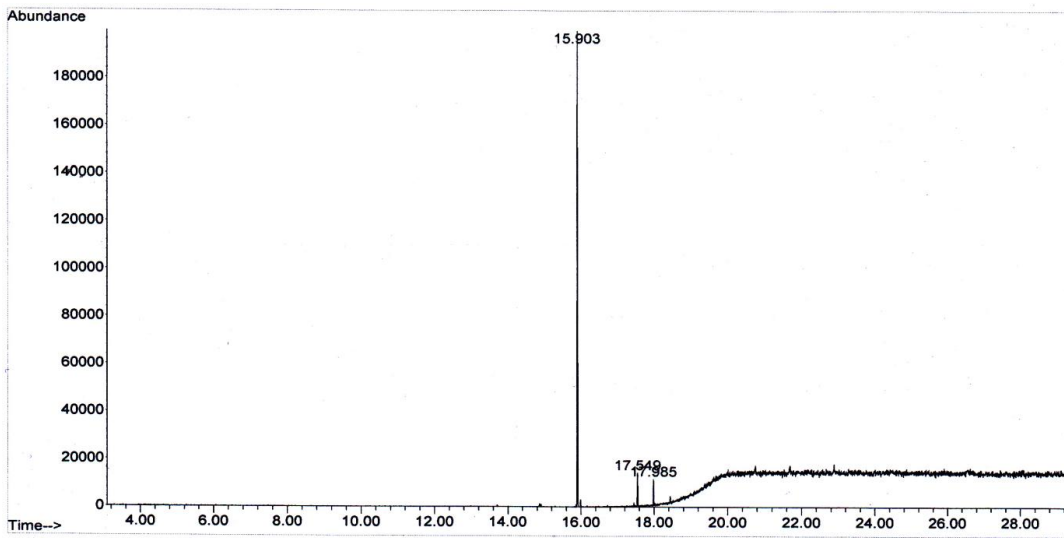
Yapılan analizler sonucunda hücrenin PHA üretiminin teşvik edilmediği koşullarda da düşük seviyede PHA ürettiği fakat hücrenin bu PHA' yı kullanma yolunu tercih etmediği gözlenmektedir. 24. saatten sonra hem kuru kütle hem de PHA miktarının yaklaşık olarak sabit kaldığı gözlenmektedir. Kuru kütle miktarı 24. saatten sonra yaklaşık olarak 1.3 mg/ml değerinde sabit kalırken, PHA miktarı da 30 µg/ml dolaylarında sabit kalmaktadır. Hücrenin PHA' yı kullanmadığı yapılan metabolit analizleriyle de doğrulanmaktadır. Yapılan metabolit analizlerine ilişkin kromatogramlar Şekil 3.34, Şekil 3.35, Şekil 3.36, Şekil 3.37, Şekil 3.38, Şekil 3.39 ve Şekil 3.40' ta yer almaktadır.



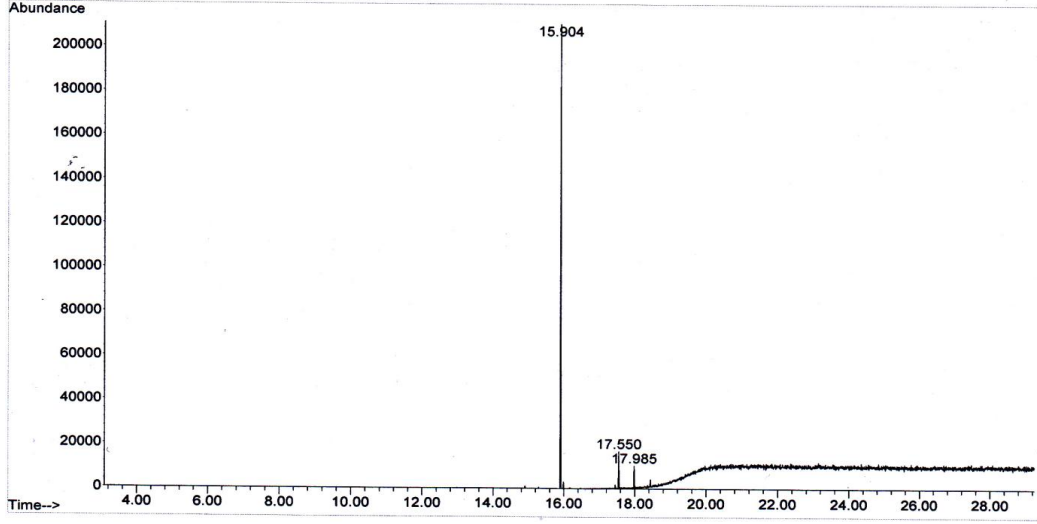
Şekil 3.34 PHA üretiminin teşvik edilmediği koşula ait 0. saat gaz kromatogramı



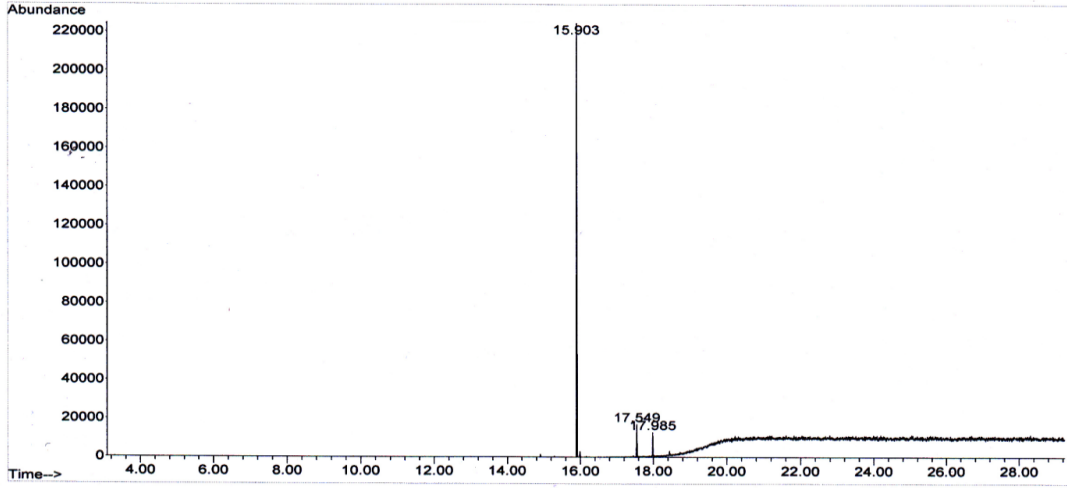
Şekil 3.35 PHA üretiminin teşvik edilmediği koşula ait 24. saat gaz kromatogramı



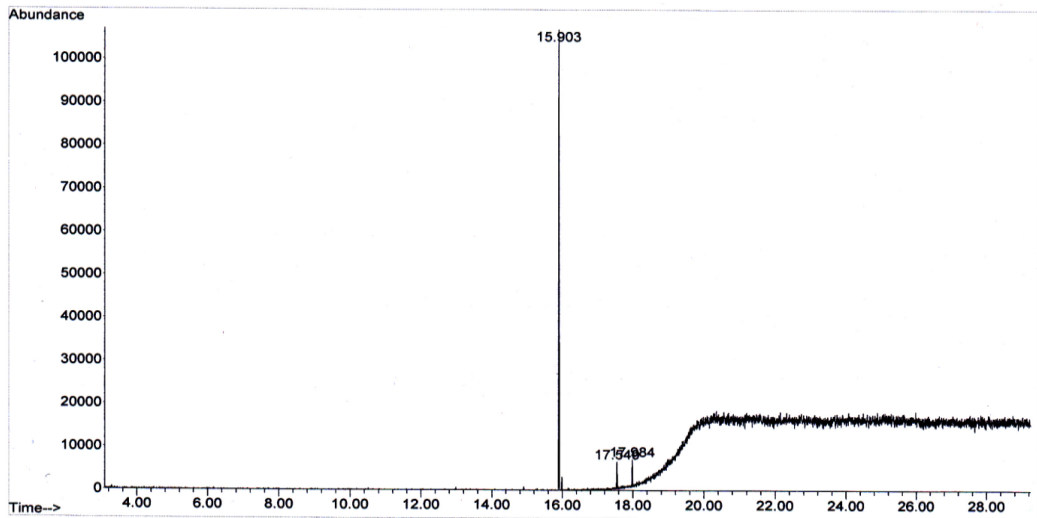
Şekil 3.36 PHA üretiminin teşvik edilmediği koşula ait 54. saat gaz kromatogramı



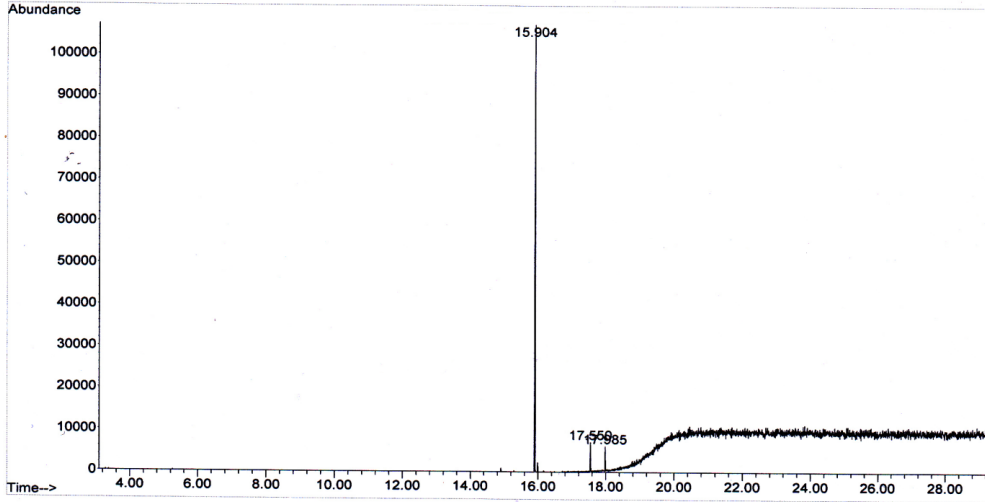
Şekil 3.37 PHA üretiminin teşvik edilmediği koşula ait 60. saat gaz kromatogramı



Şekil 3.38 PHA üretiminin teşvik edilmediği koşula ait 72. saat gaz kromatogramı



Şekil 3.39 PHA üretiminin teşvik edilmediği koşula ait 96. saat gaz kromatogramı



Şekil 3.40 PHA üretiminin teşvik edilmediği koşula ait 120. saat gaz kromatogramı

PHA üretiminin teşvik edilmediği koşulda 72. saate ait örneğe ait MS kütüphanesinden elde edilen metabolit profilleri Çizelge 3.5'de verilmektedir.

Çizelge 3.5 MS kütüphanesinden elde edilen metabolit profilleri (PHA üretiminin teşvik edilmediği koşulda 72. saate ait örnek baz alınmıştır)

Alıkonma Zamanı	Bileşik İsmi	Qual Değeri
15.903	Tridekanoik asit, metil ester (İnternal Standart)	96
17.549	Hekzadekanoik asit (Palmitik asit), metil ester	97
17.985	7-hekzadekanoik asit, metil ester / 9-hekzadekanoik asit, metil ester	58/45

Alınan örneklerde yapılan analizler sonucu elde edilen veriler Çizelge 3.6'de özetlenmiştir.

Çizelge 3.6 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edilmediği koşullarda gerçekleştirilen analizlerde MS kütüphanesinden elde edilen metabolit profilleri

Metabolit/Zaman (Saat)	0	24	54	60	72	96	120
Hekzanal	-	-	-	-	-	-	-
2-Hekzenoik asit, metil ester	-	-	-	-	-	-	-
Oktanal	-	-	-	-	-	-	-
Trans-3-oktenoik asit, metil ester	-	-	-	-	-	-	-
Cis-3-oktenoik asit, metil ester	-	-	-	-	-	-	-
2-Oktenoik asit, metil ester	-	-	-	-	-	-	-
3-Hidroksioktanoat, metil ester	-	-	-	-	-	-	-
Tridekanoik asit, metil ester (İnternal Standart)	+	+	+	+	+	+	+
9-hekzadekanoik asit, metil ester	-	+	+	+	+	+	+
Hekzadekanoik asit (Palmitik asit), metil ester	-	+	+	+	+	+	+
Siklopropan oktanoik asit, 2 heksil	-	-	-	-	-	-	-



Gaz kromatogramları ve MS kütüphanesinden elde edilen veriler incelendiğinde PHA üretiminin teşvik edilmediği koşullarda PHA metabolizmasına ilişkin metabolitler gözlenmemektedir. Hücrenin bu koşullarda ürettiği eser düzeydeki PHA' yı metabolize etmediği düşünülmektedir. Nitekim PHA miktarının tayinindeki değişimler ile bu durum doğrulanmıştır. Şekil 3.33'ten de gözleneceği gibi 24. saatten sonra PHA miktarı sabit kalmakta ve herhangi bir azalma gözlenmemektedir. PHA üretiminin teşvik edilmediği koşullarda PHA üretiminin ve yıkımının, PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarla benzerlik gösteren sadece iki metabolit mevcuttur. Bunlardan birincisi hegzadekanoik asit iken diğeri ise bu yağ asidinin bir türevi olan 9-hegzadekanoik asittir. Bu veriler ise bu iki yağ asidinin hücrenin rutin metaboliti olduğu ve PHA metabolizması ile ilişkili olmadığı sonucunu doğrulamaktadır.

Her üç koşulda alınan örneklerde GC-MS ile belirlenen metabolitler Çizelge 3.7'de bir araya getirilmiştir.

Çizelge 3.7 Farklı üretim koşullarında* GC-MS ile tayin edilen metabolitler

Metabolit/Zaman (Saat)	0			12			18			24			36			48			54			60			72			96			120				
	P	S	N	P	S	N	P	S	N	P	S	N	P	S	N	P	S	N	P	S	N	P	S	N	P	S	N	P	S	N	P	S	N		
Hekzanal	-	+	-	-	+		-			-	+	-	-		-	+		-			-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Hekzenoik asit, metil ester	-	+	-	-	+		-			+	+	-	+		+	+		+			-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
Oktanal	-	-	-		-		-			-	+	-	-		-	-		-			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trans-3-oktenoik asit, metil ester	-	+	-	-	+		-			+	+	-	+		+	+		+			-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
Cis-3-oktenoik asit, metil ester	-	+	-	-	+		-			-	+	-	-		+	+		+			-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-
2-Oktenoik asit, metil ester	-	+	-	-	+		+			+	+	-	+		+	+		+			-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-
3-Hidroksioktanoat, metil ester	-	+	+	-	+		+			+	+	+	+		+	+		+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tridekanoik asit, metil ester (İnternal Standart)	-	+	-	-	+		+			+	+	+	+		+	+		+			+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-
9-hekzadekenoik asit, metil ester	-	+	-	-	+	+	-			-	+	+	-		-	+		-			+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
Hekzadekanoik asit (Palmitik asit), metil ester	-	+	-	-	+		+			+	+	+	+		+	+		+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Siklopropan oktanoik asit, 2 heksil	-	+		-	+		-			-	+	-	-		-	+		+			-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+

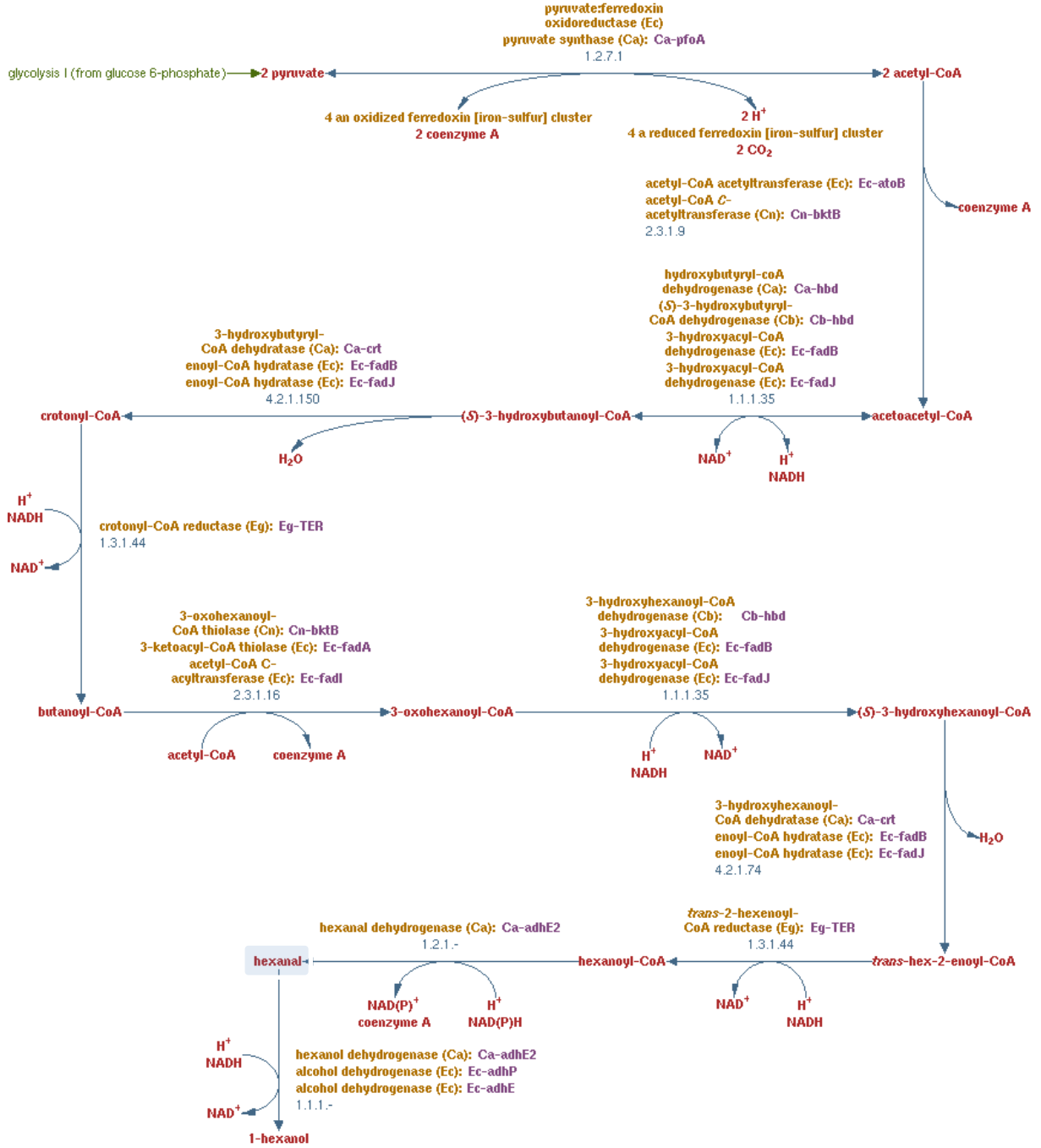
*P: Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda gerçekleştirilen analizlerde MS kütüphanesinden elde edilen metabolit profilleri

S: Açlık koşullarında hücre içi mcl-PHA üretiminin izlendiği analizlerde MS kütüphanesinden elde edilen metabolit profilleri

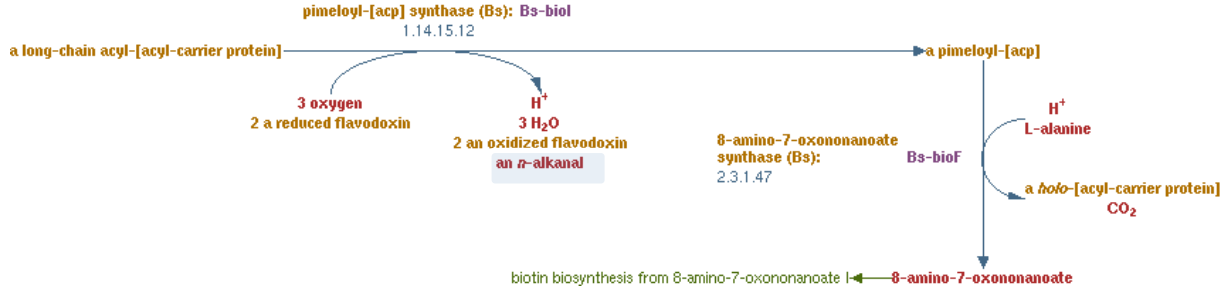
N: Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edilmediği koşullarda gerçekleştirilen analizlerde MS kütüphanesinden elde edilen metabolit profilleri

Çizelge 3.7 de verilen metabolitlerin yer alabildiği metabolik yollar ile ilgili bilgiler BioCyc veri tabanının bir üyesi olan MetaCyc veri tabanı kullanılarak aşağıda verilmektedir:

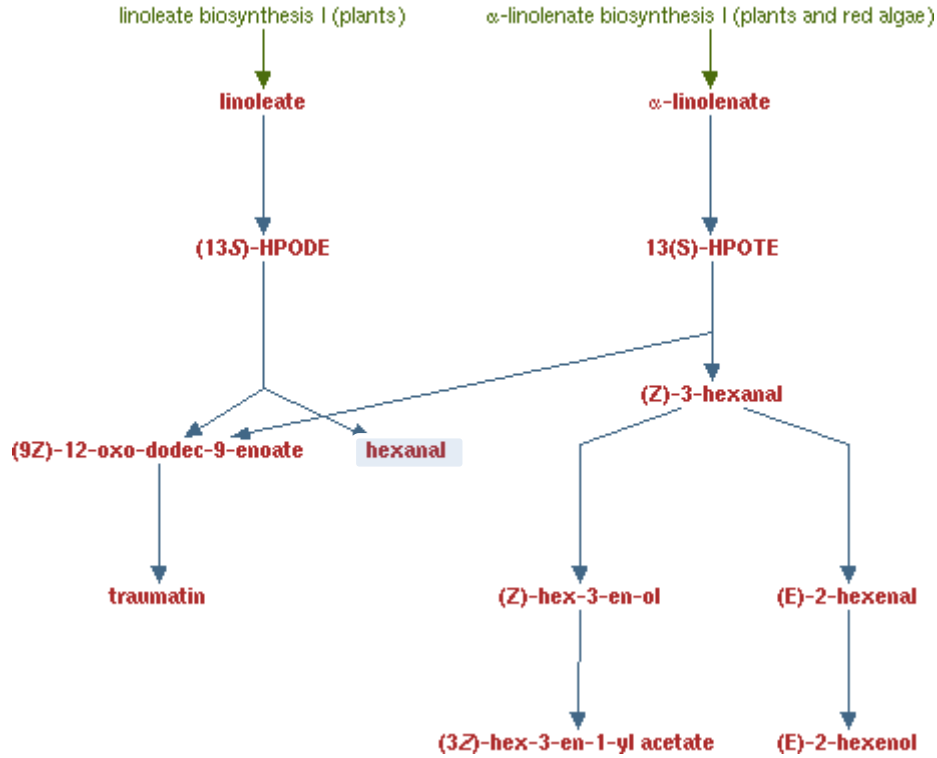
Hekzanal (hexaldehide) piruvat fermentasyonu sırasında Hekzanoil-CoA ve NADP⁺ ve H⁺ varlığında (Şekil 3.41), 8-amino-7-oxonanoat biyosentezinde (Şekil 3.42), traumatin ve (Z)-3-hekzen-1-yl asetat biyosentezinde üretilirken (Şekil 3.43), piruvatın hekzanole fermentasyonunda bir ara ürün olarak (Şekil 3.41) tüketilebilmektedir.



Şekil 3.41 Piruvatın hekzanale fermentasyonu (MetaCyc, 2016)



Şekil 3.42 8-amino-7-okzonanoat biyosentezi (MetaCyc, 2016)

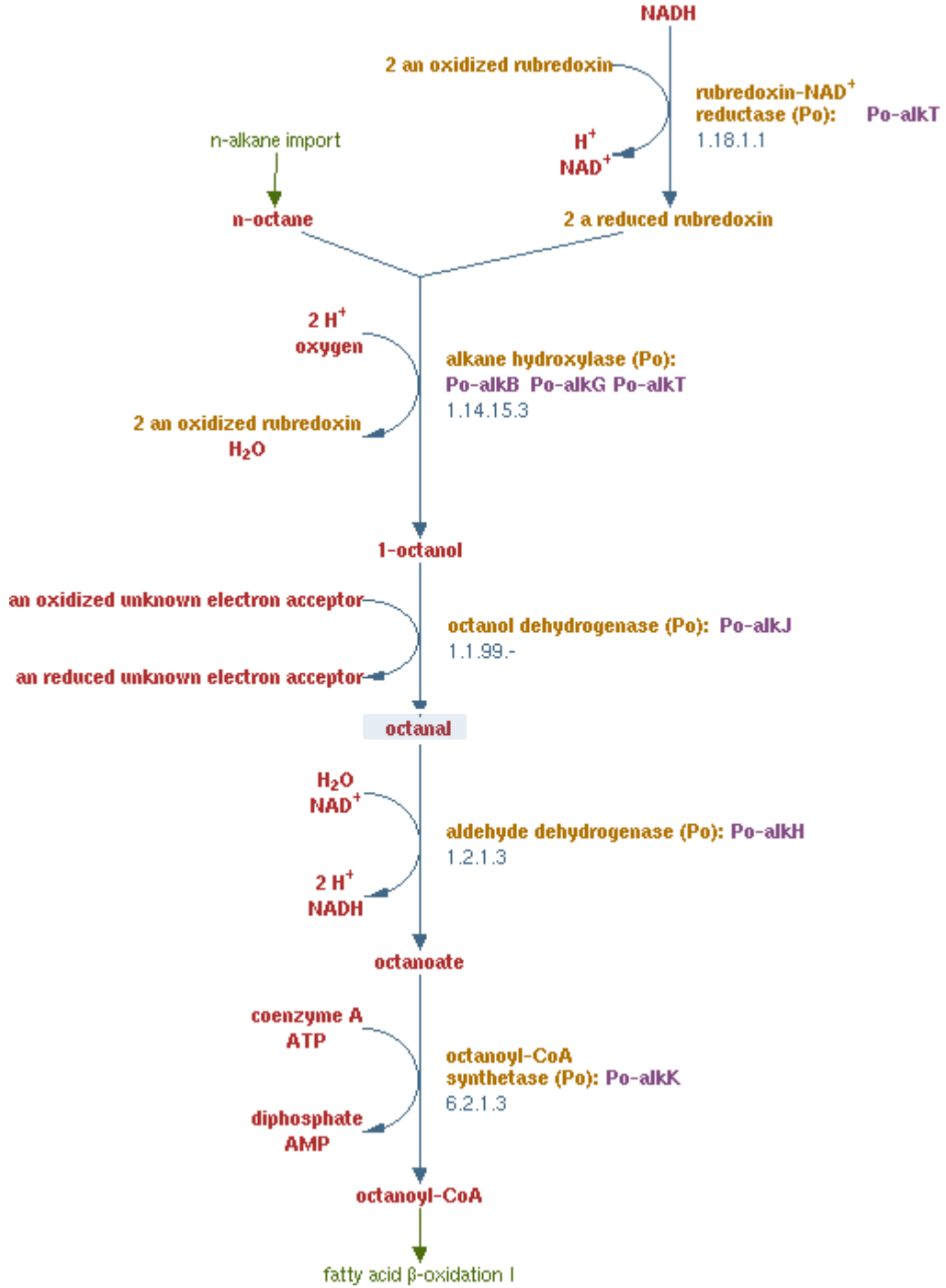


Şekil 3.43 Linoleattan traumatin ve (Z)-3-hekzen-1-yl asetat biyosentezi (MetaCyc, 2016)

trans-2-Hekzenoik asit; asetil-CoA ve malonil-CoA prekürsörlerinden yağ asiti sentazların etkisi ile oluşturulan yağ asitleridir. Spesifik olarak, (R)-3-Hidroksiheksanoik asit ve yağ asiti sentaz arasındaki reaksiyonun ürünüdür.

Oktanal (1-Octaldehide, 1-Octylaldehide, 1-Caprylaldehyde, 1-caprylaldehyde, 1-octylaldehide, 1-octaldehide, 1-octanal, n-octanal) yağ asidi aldehit dehidrogenaz ve alkol dehidrogenaz enzimlerinin bir substratıdır.

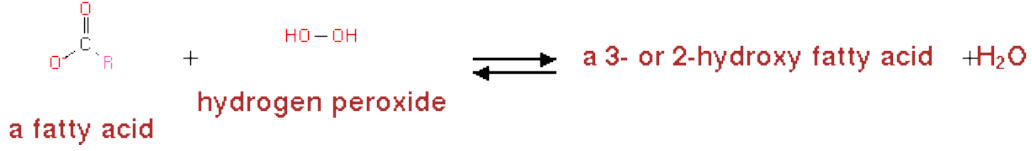
8-amino-7-oxonanoat biyosentezinde üretilirken (Şekil 3.42) oktan oksidasyonu ile tüketilmektedir (Şekil 3.44). 1-oktanolden oktanol dehidrogenaz tarafından katalizlenerek oktanalin üretim adımı tersinirdir.



Şekil 3.44 Oktan oksidasyonu (MetaCyc, 2016)

Oktanal ve hekzanal'in sadece PHA yıkımının teşvik edildiği koşullarda tespit edilmesi bu metabolitlerin PHA degradasyonu ile ilgili yolağın ürünleri olduklarına işaret etmektedir. Oktanalın sadece açlık koşullarında ve sadece 24. saatte tespit edilmesi, Polihidroksioktanoattan, 3-HO-oktanoat oluşumu ve bunun da oktanal üzerinden diğer metabolitlere dönüşümü yıkım yolağının ilk adımlarının bu saatlerde gerçekleştiğini düşündürmektedir.

3-hidroksioktanoat: 3- veya 2- hidroksioktanoik asitlerin oktanoattan aşağıdaki reaksiyon uyarınca bir '*yağ asiti peroksigenaz enzimi*' (EC 1.11.2.4) tarafından katalizlenerek oluştuğu düşünülmektedir.

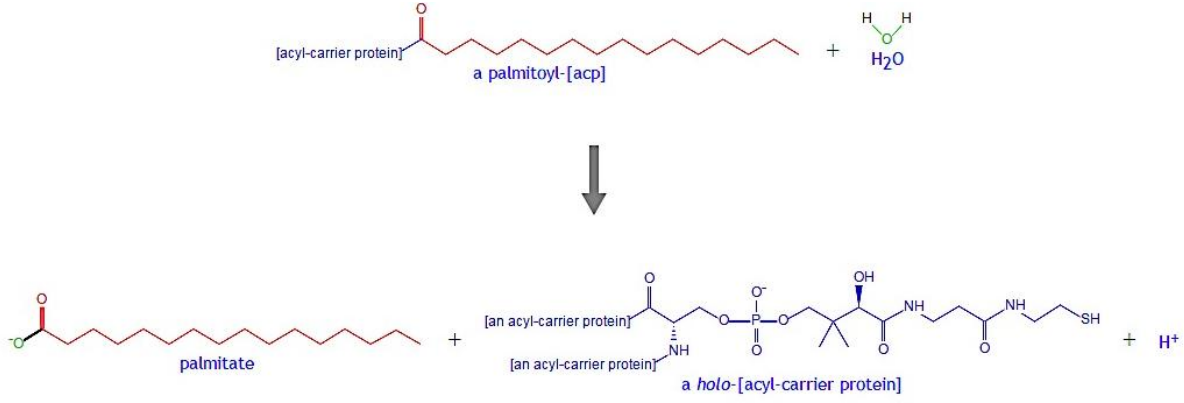


2-oktenoik asit , oktanoatın α -C ve β -C karbonları (C2 ve C3) arasında meydana gelen bir dehidrogenasyon reaksiyonu sonucu oluşabilir fakat metabolizmada bu reaksiyon FAD-bağımlı bir enzim olan açil-CoA dehidrogenaz reaksiyonu ile gerçekleştiğinden (trans ürün oluşur) serbest 2-oktenoik asitin varlığı bu mekanizma üzerinden açıklanamamaktadır.

cis ve trans-3-oktenoik asitler, oktanoatın β -C ve γ -C karbonları (C3 ve C4) arasında meydana gelen bir dehidrogenasyon reaksiyonu sonucu oluşabilir, β -oksidasyonu ile bağlantılı oldukları düşünülmektedir.

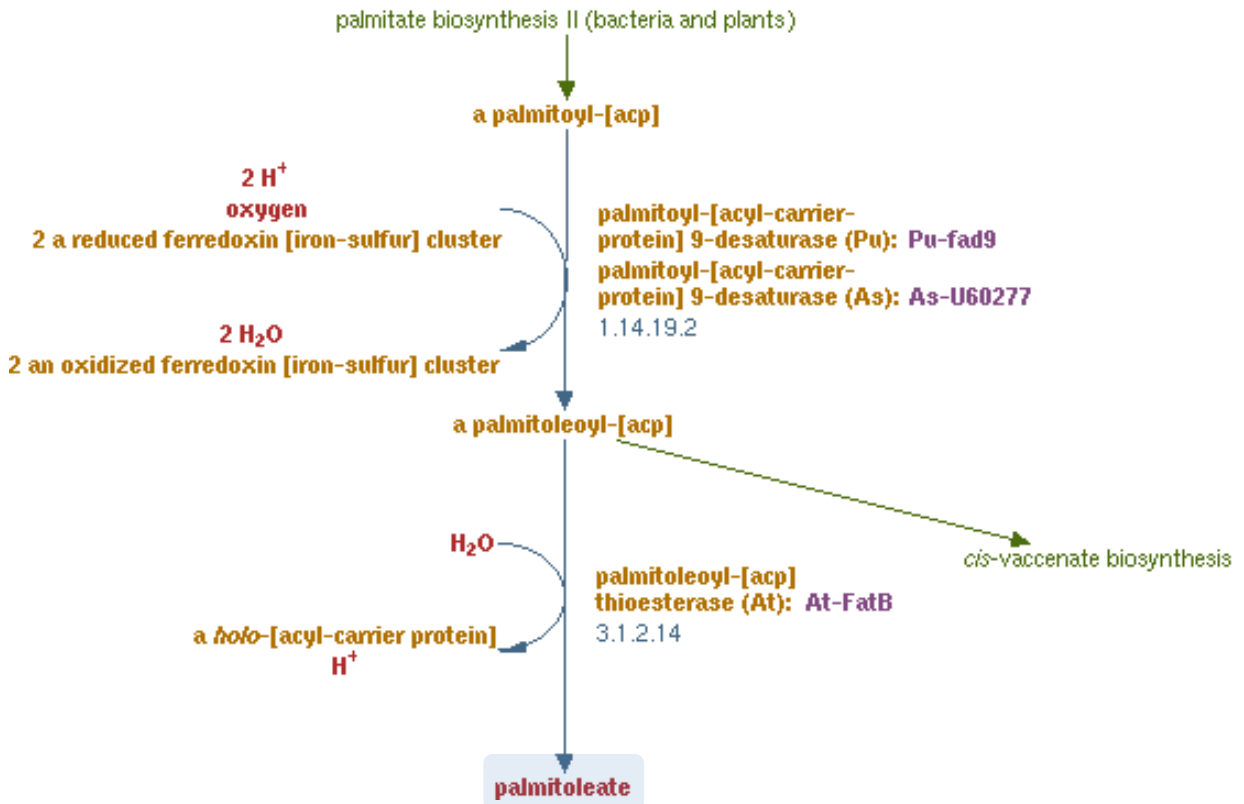
2-oktenoik asit, cis ve trans-3-oktenoik asitler, PHA üretimin hem teşvik edildiği hem de yıkıma yönlendirildiği koşullarda yapılan üretimler esnasında açığa çıkmakta, PHA üretiminin teşvik edilmediği ortamda rastlanılmamaktadır. Her üç koşulun metabolitlerinin karşılaştırılması sonucu karşılaşılan en bariz fark bu metabolitlerde görülmüştür. Üretimin teşvik edildiği koşullarda zamanla görülmeye başlanması ve yıkımın teşvik edildiği koşulların ileri aşamalarında görülmemesi metabolitin PHA sentez yolağı ile ilintili olduğuna işaret etmektedir. Trans-3-oktenoik asitin sadece PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda tespit edilmesi kesin olarak PHA biyosentez yolağının bir ara ürünü olduğunu göstermektedir.

Hekzadekanoik asit(palmitik asit), en yaygın doymuş yağ asitlerindedir. Palmitat biyosentez yolağı ile üretilir (Şekil 3.45). Alkan oksidasyonu, yağ asidi α -oksidasyonu yolakları ile tüketilir. Test edilen her üç koşulda da palmitik asit tayin edilmiştir. Hücre doğasına ait bir metabolit olup, tespit edilen 9-hekzadekanoik asit de bu metabolik yolakla ilintilidir (Şekil 3.46).



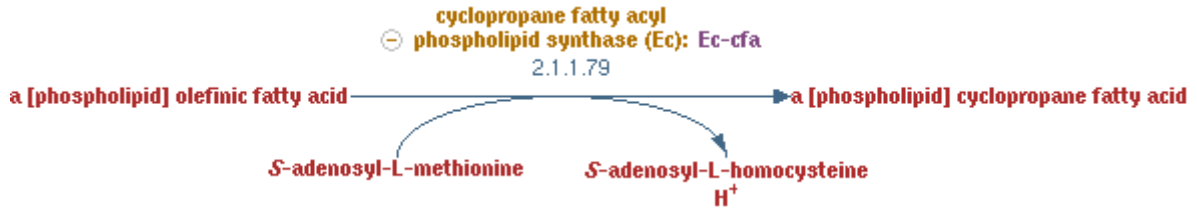
Şekil 3.45 Palmitat biyosentezi (MetaCyc, 2016)

9-Hekzadekenoik asit (palmitoleic acid (16:1Δ9), palmitoleic acid, (9Z)-hexadecenoic acid, cis-9-hexadecenoic acid, (9Z)-hexadecenoate, cis-9-hexadecenoate), bakterilerde yaygın olarak bulunan doymamış bir yağ asidi olup, diğer yağ asitleri gibi nadiren serbest formda bulunur. Palmitoleat, $\Delta 9$ desaturaz enziminin etkisi ile doymuş yağ asidi palmitattan doğrudan oluşturulabilir. Genellikle ya açıl taşıyıcı proteinlerle ya da CoA ile lipitlere inkorpore olur (Şekil 3.46).



Şekil 3.46 Palmitoleat (9-hekzanoik asit) sentezi (MetaCyc, 2016)

Siklopropan oktanoik asit, 2-hekzil: Siklopropan yağ asitleri genel olarak *siklopropan yağ asiti (CFA) sentaz* doymamış yağ asiti zincirlerinin S-Adenozil metiyonini kullanarak metilenasyonu yolu ile fosfolipit çift tabakaların açıl zincirlerinin modifikasyonunu katalizlemesi ile sentezlenirler (Şekil 3.47).



Şekil 3.47 Siklopropan yağ asitleri sentezi (MetaCyc, 2016)

Siklopropan oktanoik asit, 2-hekzil, hücre içi mcl-PHA üretimin teşvik edildiği koşullarda 54. saatten itibaren izlenmeye başlamış ve açlık koşullarında da tespit edilmiştir. Bununla birlikte, hücre içi mcl-PHA üretimin teşvik edilmediği koşullarda gözlenmemiştir. Bu durum, mcl-PHA sentez ve yıkım metabolizmalarının her ikisinin de ara ürünü olabileceğini göstermektedir.

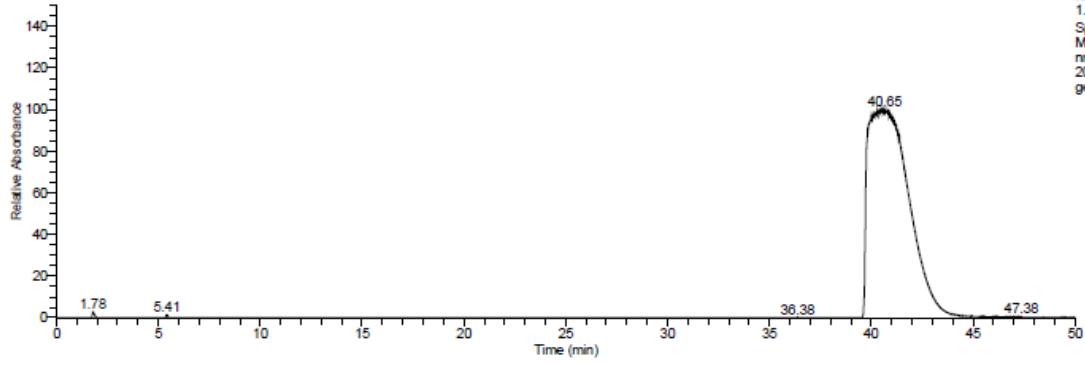
3.5 Hücre İçi Organik Asitlerin HPLC ile Analizi

Aşırı karbon kaynağı içeren ve azot sınırlamalı koşullarda (pozitif kontrol) (C/N oranı yüksek), karbon açlığı koşullarında (karbon kaynağı içermeyen ortamda) ve azot sınırlamasız koşullarda (negatif kontrol) (C/N oranı düşük) metabolit profillerini oluşturmak amacıyla bu 3 farklı ortamdan 6 saatlik periyotlarla alınan hücreler ..'deki yöntemde belirtildiği gibi ekstrakte edildikten sonra HPLC ile analizlendi, analizlere ait kromatogramlar aşağıda verilmiştir.

3.5.1 Aşırı karbon kaynağı içeren ve azot sınırlamalı koşullarda (pozitif kontrol) (C/N oranı yüksek) hücre içi organik asitlerin HPLC ile analizi

Aşırı karbon kaynağı içeren ve azot sınırlamalı koşullarda (pozitif kontrol) (C/N oranı yüksek) hücre içi organik asitlerin HPLC ile Bölüm 2.14'e verilen yöntem ve protokole göre hizmet alımı yolu ile analizlenmiştir. Yapılan metabolit analizlerine ilişkin kromatogramlar Şekil 3.48- Şekil 3.58' de yer almaktadır.

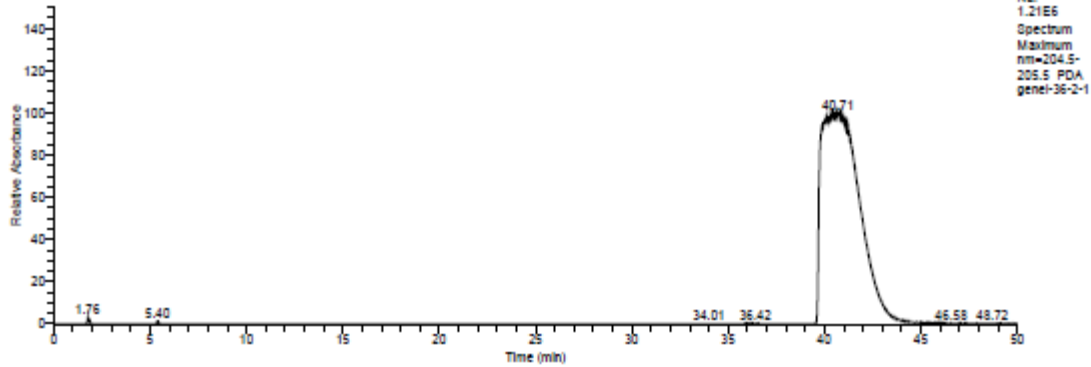
RT: 0.00 - 50.00 SM: 5G



Component Name	Component Type	Sample Type	RT	Area
Sitrik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Süksinik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Isovalerik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Ketoglutarik_Asit	Target compound	N/A	2.35	6040.67
Bütirik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Malik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Propiyonik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Isobütirik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Formik_Asit	Target compound	N/A	1.78	322712.78
Valerik_Asit	Target compound	N/A	40.57	4663175.67

Şekil 3.48 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 12. saate ait HPLC kromatogramı.

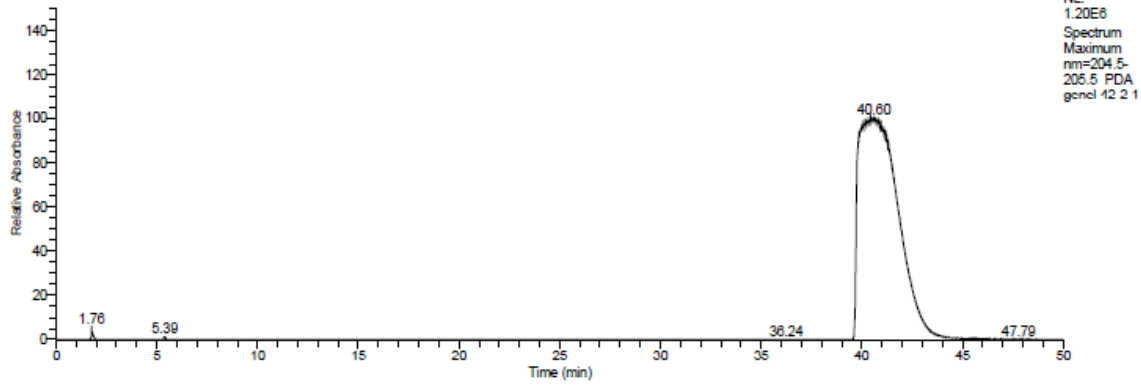
RT: 0.00 - 50.00 SM: 5G



Component Name	Component Type	Sample Type	RT	Area
Sitrik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Süksinik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Isovalerik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Ketoglutarik_Asit	Target compound	N/A	2.37	4087.75
Bütirik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Malik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Propiyonik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Isobütirik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Formik_Asit	Target compound	N/A	1.76	334429.33
Valerik_Asit	Target compound	N/A	40.59	1182007.25

Şekil 3.49 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 36. saate ait HPLC kromatogramı.

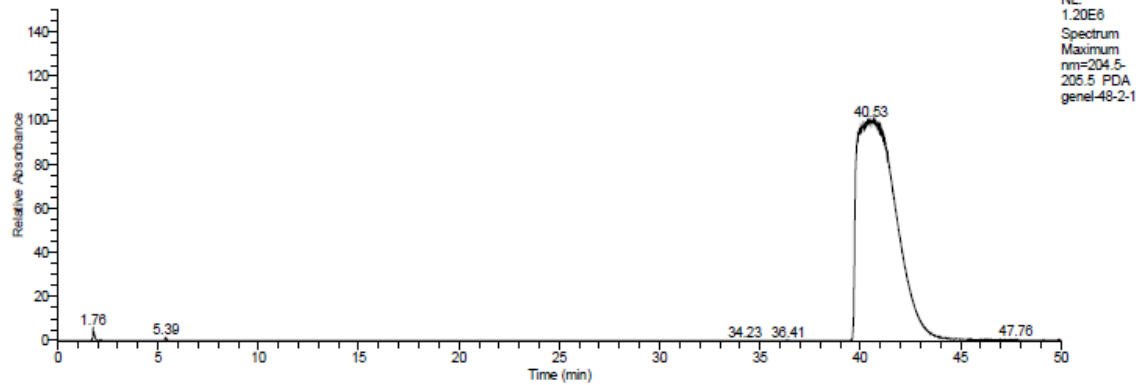
RT: 0.00 - 50.00 SM: 5G



Component Name	Component Type	Sample Type	RT	Area
Sitrik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Süksinik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Isovalerik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Ketoglutarik_Asit	Target compound	N/A	2.37	4890.76
Bütirik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Malik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Propiyonik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Isobütirik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Formik_Asit	Target compound	N/A	1.76	433325.45
Valerik_Asit	Target compound	N/A	40.57	3478591.63

Şekil 3.50 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 42. saate ait HPLC kromatogramı.

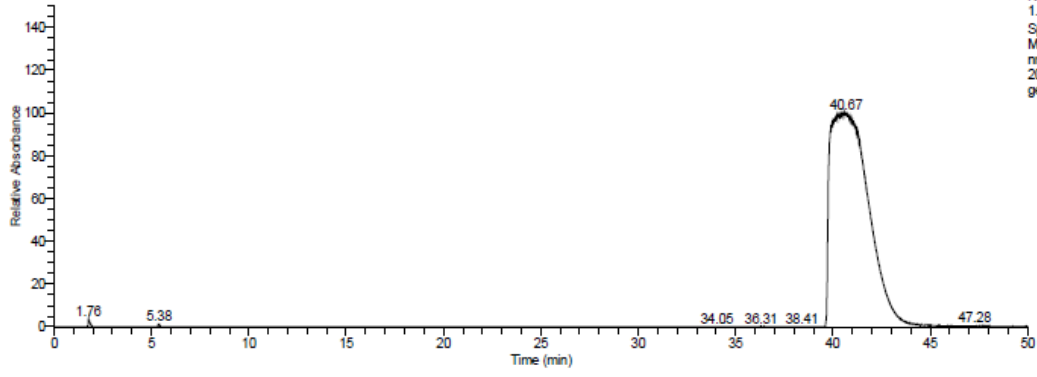
RT: 0.00 - 50.00 SM: 5G



Component Name	Component Type	Sample Type	RT	Area
Sitrik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Süksinik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Isovalerik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Ketoglutarik_Asit	Target compound	N/A	2.34	5749.34
Bütirik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Malik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Propiyonik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Isobütirik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Formik_Asit	Target compound	N/A	1.76	455803.92
Valerik_Asit	Target compound	N/A	40.58	4278511.05

Şekil 3.51 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 48. saate ait HPLC kromatogramı.

RT: 0.00 - 50.00 SM: 5G

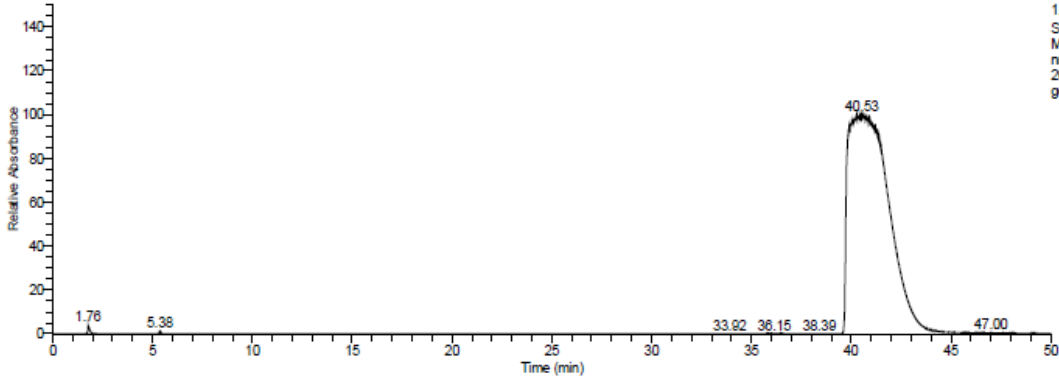


NL:
1.19E6
Spectrum
Maximum
nm=204.5-
206.5 PDA
genel-60-2-1

Component Name	Component Type	Sample Type	RT	Area
Sitrik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Süksinik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Isovalerik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Ketoglutarik_Asit	Target compound	N/A	2.36	3523.00
Bütirik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Malik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Propiyonik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Isobütirik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Formik_Asit	Target compound	N/A	1.76	370169.88
Valerik_Asit	Target compound	N/A	40.61	1963236.92

Şekil 3.52 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 60. saate ait HPLC kromatogramı.

RT: 0.00 - 50.00 SM: 5G

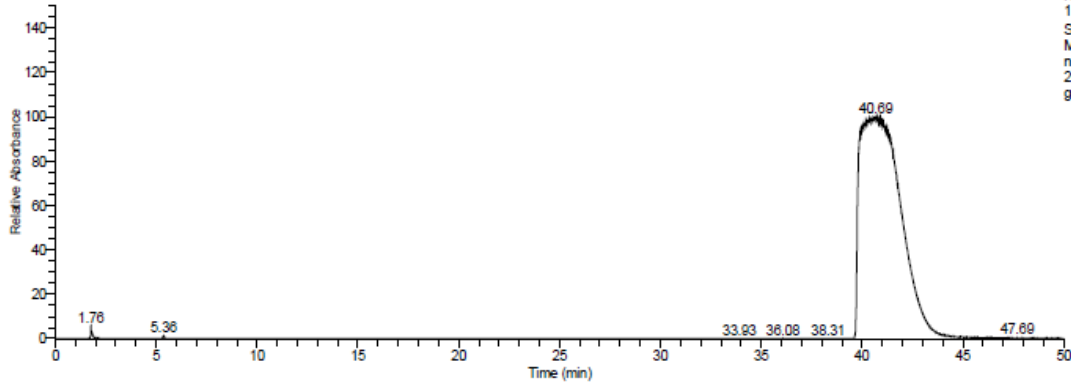


NL:
1.19E6
Spectrum
Maximum
nm=204.5-
206.5 PDA
genel-66-2-1

Component Name	Component Type	Sample Type	RT	Area
Sitrik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Süksinik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Isovalerik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Ketoglutarik_Asit	Target compound	N/A	2.38	3491.60
Bütirik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Malik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Propiyonik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Isobütirik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Formik_Asit	Target compound	N/A	1.76	374277.57
Valerik_Asit	Target compound	N/A	40.58	2010112.16

Şekil 3.53 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 66. saate ait HPLC kromatogramı.

RT: 0.00 - 50.00 SM: 5G

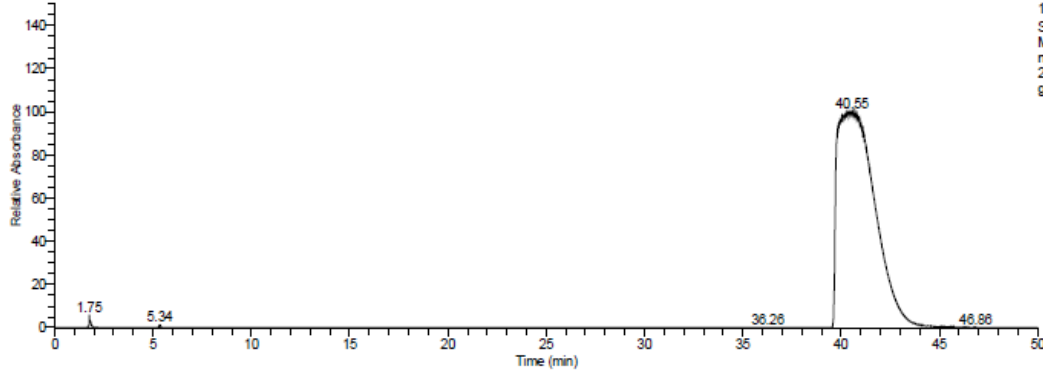


NL:
1.19E8
Spectrum
Maximum
nm=204.5-
205.5 PDA
genel-72-2-1

Component Name	Component Type	Sample Type	RT	Area
Sitrik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Süksinik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Isovalerik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Ketoglutarik_Asit	Target compound	N/A	2.37	1374.79
Bütirik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Malik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Propiyonik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Isobütirik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Formik_Asit	Target compound	N/A	1.76	440921.81
Valerik_Asit	Target compound	N/A	40.61	546684.94

Şekil 3.54 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 72. saate ait HPLC kromatogramı.

RT: 0.00 - 50.00 SM: 5G

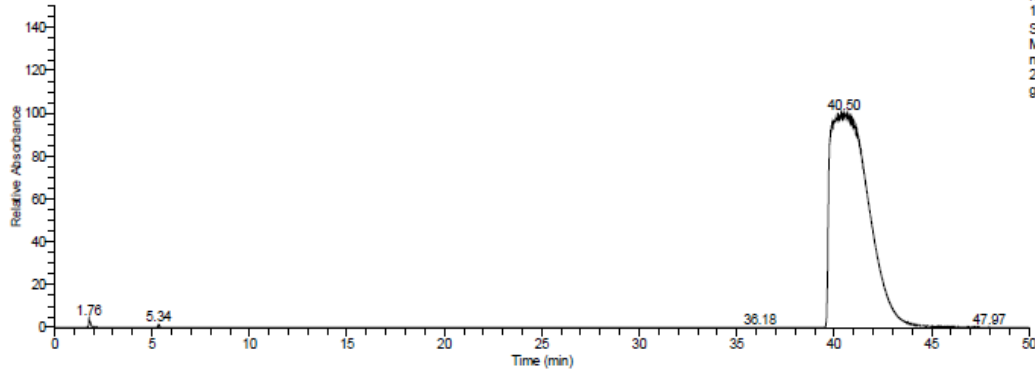


NL:
1.19E8
Spectrum
Maximum
nm=204.5-
205.5 PDA
genel-84-2-1

Component Name	Component Type	Sample Type	RT	Area
Sitrik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Süksinik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Isovalerik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Ketoglutarik_Asit	Target compound	N/A	2.41	2043.41
Bütirik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Malik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Propiyonik_Asit	Target compound	N/A	5.35	170125.62
Isobütirik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Formik_Asit	Target compound	N/A	1.75	442934.91
Valerik_Asit	Target compound	N/A	40.60	695068.91

Şekil 3.55 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 84. saate ait HPLC kromatogramı.

RT: 0.00 - 50.00 SM: 5G

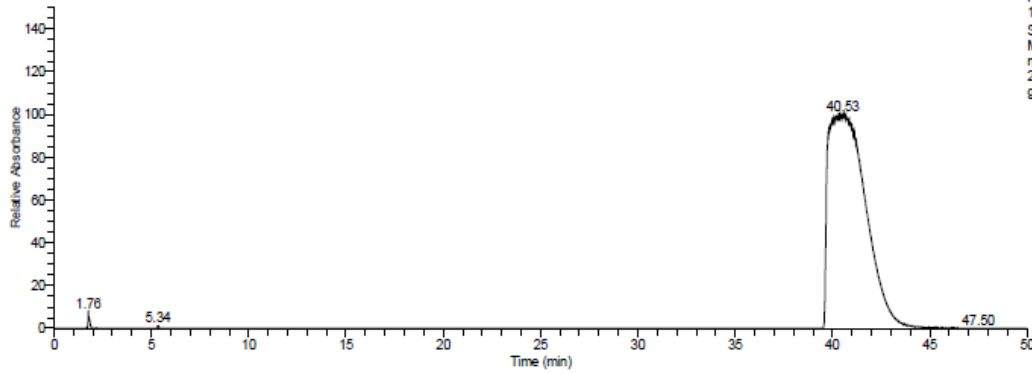


NL:
1.19E8
Spectrum
Maximum
nm=204.5-
205.5 PDA
genel-90-2-1

Component Name	Component Type	Sample Type	RT	Area
Sitrik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Süksinik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Isovalerik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Ketoglutarik_Asit	Target compound	N/A	2.38	4194.10
Bütirik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Malik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Propiyonik_Asit	Target compound	N/A	5.34	167999.41
Isobütirik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Formik_Asit	Target compound	N/A	1.76	374835.69
Valerik_Asit	Target compound	N/A	40.61	1456015.12

Şekil 3.56 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 90. saate ait HPLC kromatogramı.

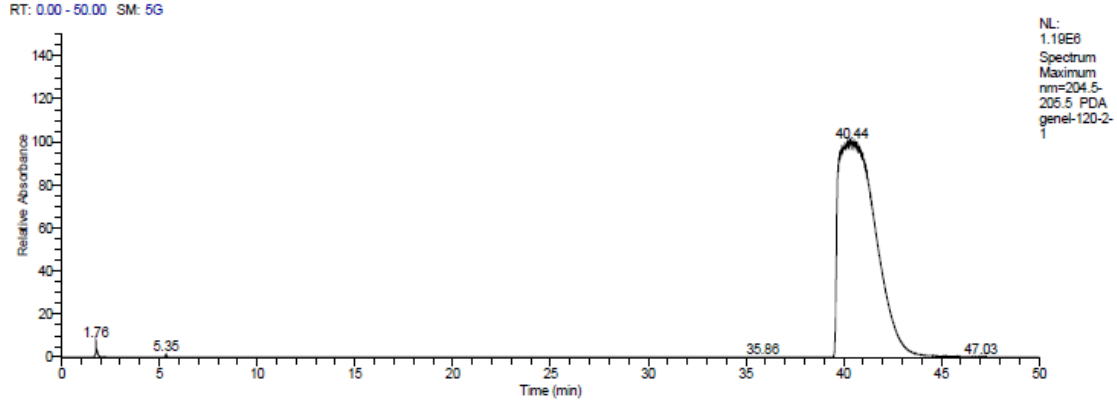
RT: 0.00 - 50.00 SM: 5G



NL:
1.19E8
Spectrum
Maximum
nm=204.5-
205.5 PDA
genel-96-2-1

Component Name	Component Type	Sample Type	RT	Area
Sitrik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Süksinik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Isovalerik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Ketoglutarik_Asit	Target compound	N/A	2.35	7956.78
Bütirik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Malik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Propiyonik_Asit	Target compound	N/A	5.34	161189.44
Isobütirik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Formik_Asit	Target compound	N/A	1.76	559948.23
Valerik_Asit	Target compound	N/A	40.57	4174464.86

Şekil 3.57 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 96. saate ait HPLC kromatogramı.



Component Name	Component Type	Sample Type	RT	Area
Sitrik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Süksinik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Isovalerik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Ketoglutarik_Asit	Target compound	N/A	2.36	4053.64
Bütirik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Malik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Propiyonik_Asit	Target compound	N/A	5.35	153482.23
Isobütirik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Formik_Asit	Target compound	N/A	1.76	478923.23
Valerik_Asit	Target compound	N/A	40.65	879131.91

Şekil 3.58 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 120. saate ait HPLC kromatogramı.

Alınan örneklerde yapılan analizler sonucu elde edilen veriler Çizelge 3.8'de özetlenmiştir.

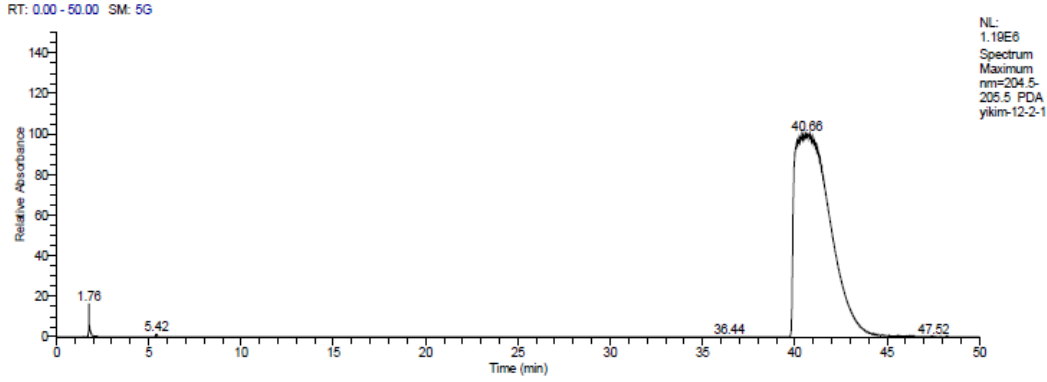
Çizelge 3.8 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda alınan HPLC kromatogramlarının sonuçları

Ketoglutarik asit (mM)	0,0016	0,0011	0,0013	0,0015	0,0009	0,0009	0,0005	0,0001	0,0011	0,0021	0,0011
Formik asit (mM)	10,8682	11,2628	14,5934	15,3504	12,4665	12,6048	14,8492	14,917	12,6236	18,8578	16,129
Valerik asit (mM)	153,8217	38,9902	114,7464	141,1329	64,7602	66,3065	18,0332	22,9279	48,0289	137,7008	28,9995
Isobütirik asit (mM)	0	0	0		0	0	0	1,3279	1,3113	1,2582	1,198

Hücre içi mcl- PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda alınan HPLC kromatogramları kantitatif olarak değerlendirildiğinde ketoglutarik asit (okzoglutarik asit) formik asit, valerik asit (pentanoik asit) ve izo bütirik asit tayin edilebilmiş, standart olarak verilen diğer organik asitler tayin aralıklarının altında kalmaları nedeni ile örneklerde tespit edilememiştir.

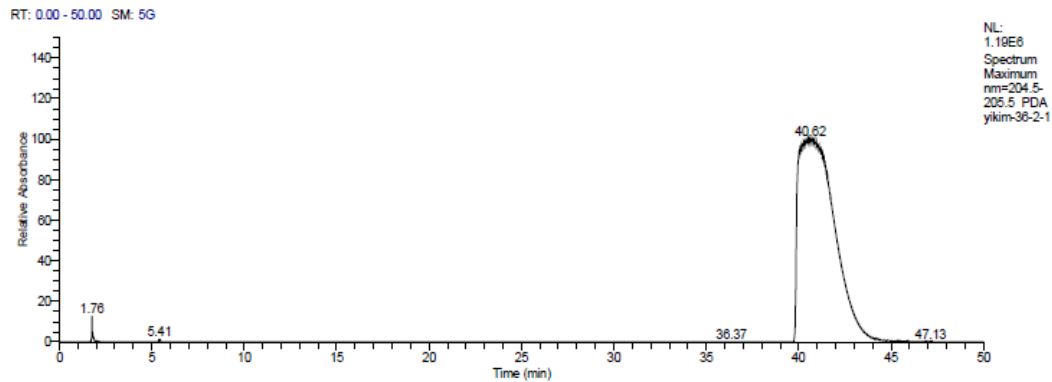
3.5.2 Karbon açlığı koşullarında (karbon kaynağı içermeyen ortamda) hücre içi organik asitlerin HPLC ile analizi

Karbon açlığı koşullarında (karbon kaynağı içermeyen ortamda) hücre içi organik asitlerin HPLC ile Bölüm 2.14'e verilen yöntem ve protokole göre analizlenmiştir. Yapılan metabolit analizlerine ilişkin kromatogramlar Şekil 3.59 - Şekil 3.69' da yer almaktadır.



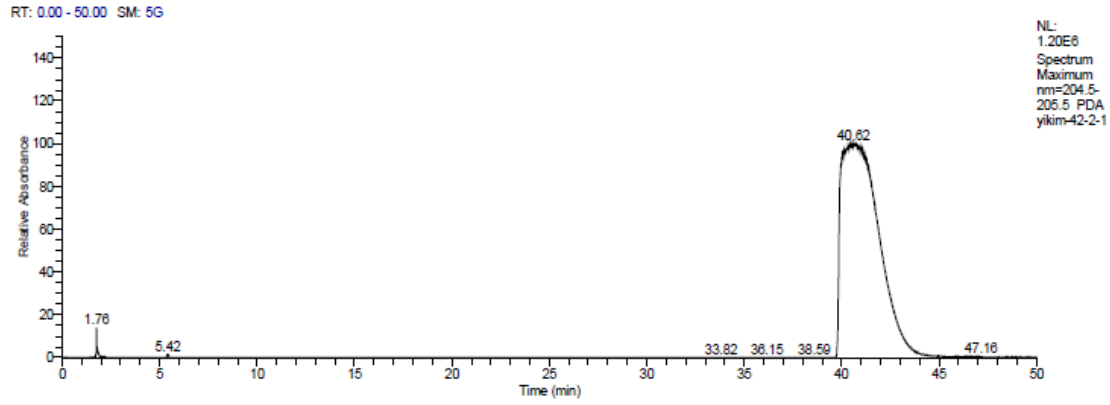
Component Name	Component Type	Sample Type	RT	Area
Sitrik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Süksinik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Isovalerik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Ketoglutarik_Asit	Target compound	N/A	2.38	1084.07
Bütiirik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Malik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Propiyonik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Isobütiirik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Formik_Asit	Target compound	N/A	1.76	736774.55
Valerik_Asit	Target compound	N/A	40.60	7450859.14

Şekil 3.59 Açlık koşullarında 12. saate ait HPLC kromatogramı.



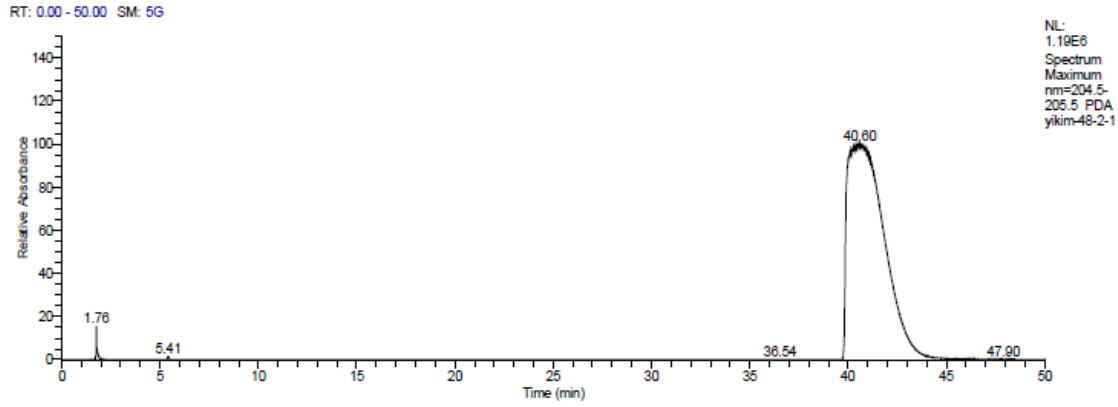
Component Name	Component Type	Sample Type	RT	Area
Sitrik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Süksinik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Isovalerik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Ketoglutarik_Asit	Target compound	N/A	2.39	480.34
Bütiirik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Malik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Propiyonik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Isobütiirik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Formik_Asit	Target compound	N/A	1.98	68254.71
Valerik_Asit	Target compound	N/A	40.63	3163313.82

Şekil 3.60 Açlık koşullarında 36. saate ait HPLC kromatogramı.



Component Name	Component Type	Sample Type	RT	Area
Sitrik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Süksinik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Isovalerik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Ketoglutarik_Asit	Target compound	N/A	2.36	3013.16
Bütirik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Malik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Propiyonik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Isobütirik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Fornik_Asit	Target compound	N/A	1.98	82148.24
Valerik_Asit	Target compound	N/A	40.60	522351.13

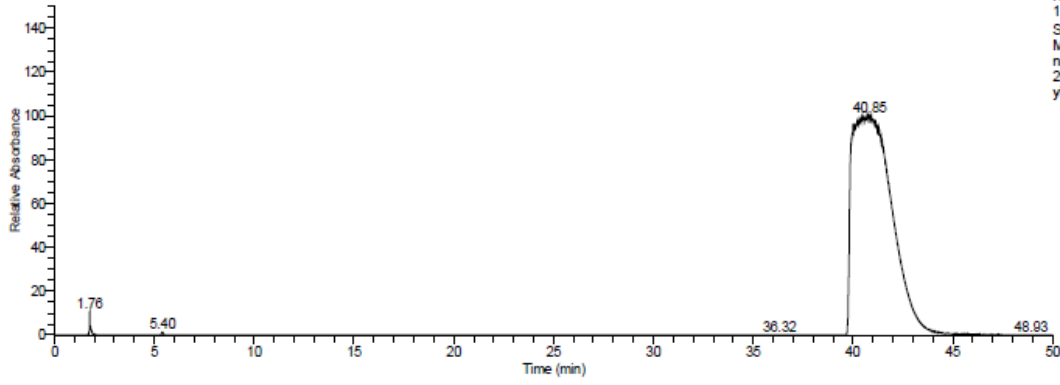
Şekil 3.61 Açlık koşullarında 42. saate ait HPLC kromatogramı.



Component Name	Component Type	Sample Type	RT	Area
Sitrik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Süksinik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Isovalerik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Ketoglutarik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Bütirik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Malik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Propiyonik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Isobütirik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Fornik_Asit	Target compound	N/A	1.98	71503.57
Valerik_Asit	Target compound	N/A	40.55	6818704.37

Şekil 3.62 Açlık koşullarında 48. saate ait HPLC kromatogramı.

RT: 0.00 - 50.00 SM: 5G

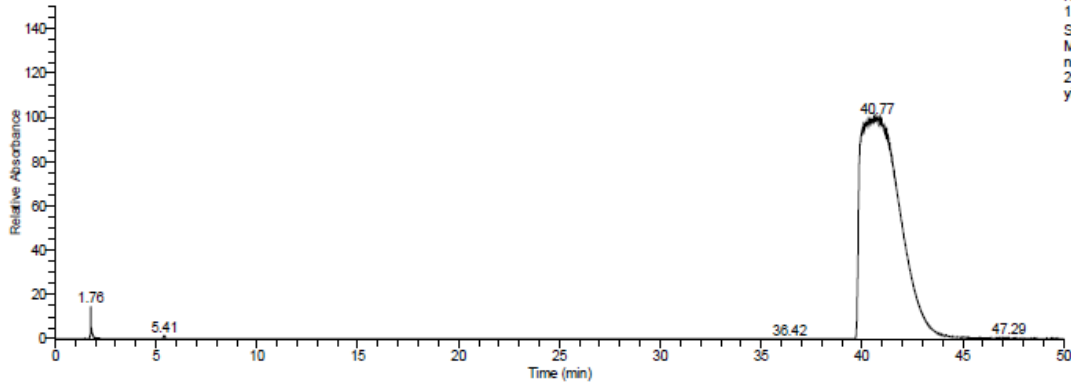


NL:
1.20E8
Spectrum
Maximum
nm=204.5-
205.5 PDA
yikim-80-2-1

Component Name	Component Type	Sample Type	RT	Area
Sitrik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Süksinik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Isovalerik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Ketoglutarik_Asit	Target compound	N/A	2.38	1454.62
Bütirik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Malik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Propiyonik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Isobütirik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Formik_Asit	Target compound	N/A	1.76	552955.86
Valerik_Asit	Target compound	N/A	40.61	609759.79

Şekil 3.63 Açlık koşullarında 60. saate ait HPLC kromatogramı.

RT: 0.00 - 50.00 SM: 5G

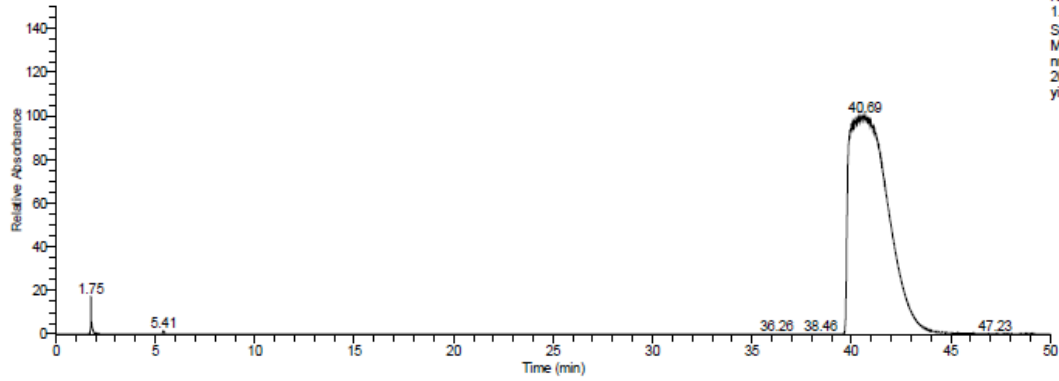


NL:
1.20E8
Spectrum
Maximum
nm=204.5-
205.5 PDA
yikim-86-2-1

Component Name	Component Type	Sample Type	RT	Area
Sitrik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Süksinik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Isovalerik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Ketoglutarik_Asit	Target compound	N/A	2.36	4459.73
Bütirik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Malik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Propiyonik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Isobütirik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Formik_Asit	Target compound	N/A	1.98	94417.03
Valerik_Asit	Target compound	N/A	40.64	1248994.75

Şekil 3.64 Açlık koşullarında 66. saate ait HPLC kromatogramı.

RT: 0.00 - 50.00 SM: 5G

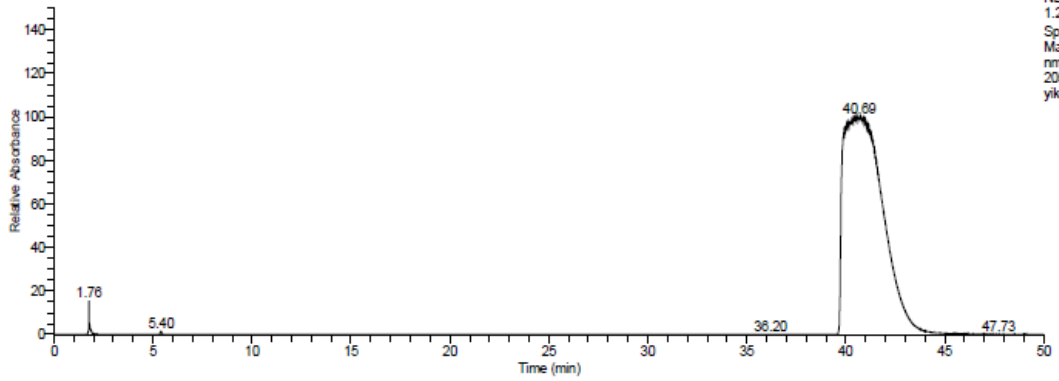


NL:
1.20E6
Spectrum
Maximum
nm=204.5-
205.5 PDA
ykim-72-2-1

Component Name	Component Type	Sample Type	RT	Area
Sitrik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Süksinik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Isovalerik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Ketoglutarik_Asit	Target compound	N/A	2.38	1061.30
Bütirik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Malik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Propiyonik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Isobütirik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Formik_Asit	Target compound	N/A	1.98	76772.03
Valerik_Asit	Target compound	N/A	40.60	521318.01

Şekil 3.65 Açlık koşullarında 72. saate ait HPLC kromatogramı.

RT: 0.00 - 50.00 SM: 5G

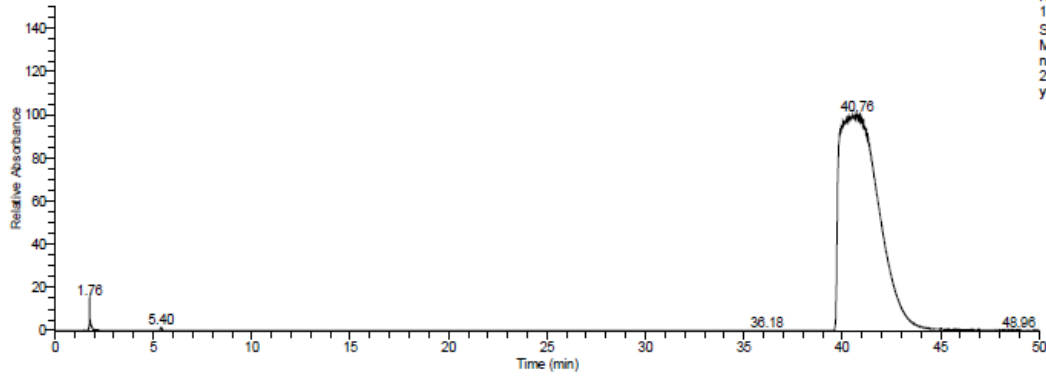


NL:
1.20E6
Spectrum
Maximum
nm=204.5-
205.5 PDA
ykim-84-2-1

Component Name	Component Type	Sample Type	RT	Area
Sitrik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Süksinik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Isovalerik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Ketoglutarik_Asit	Target compound	N/A	2.38	385.14
Bütirik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Malik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Propiyonik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Isobütirik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Formik_Asit	Target compound	N/A	1.97	78496.08
Valerik_Asit	Target compound	N/A	40.60	476470.32

Şekil 3.66 Açlık koşullarında 84. saate ait HPLC kromatogramı.

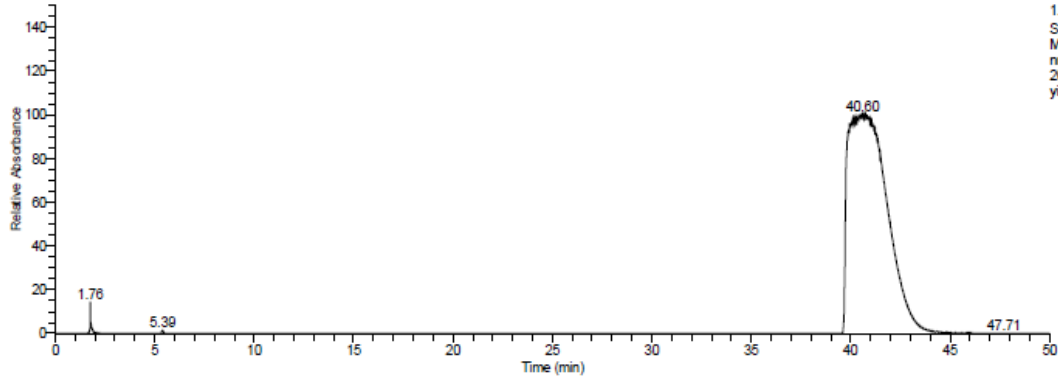
RT: 0.00 - 50.00 SM: 5G



Component Name	Component Type	Sample Type	RT	Area
Sitrik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Süksinik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Isovalerik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Ketoglutarik_Asit	Target compound	N/A	2.37	929.90
Bütirik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Malik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Propiyonik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Isobütirik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Formik_Asit	Target compound	N/A	1.76	699243.08
Valerik_Asit	Target compound	N/A	40.62	883434.01

Şekil 3.67 Açlık koşullarında 90. saate ait HPLC kromatogramı.

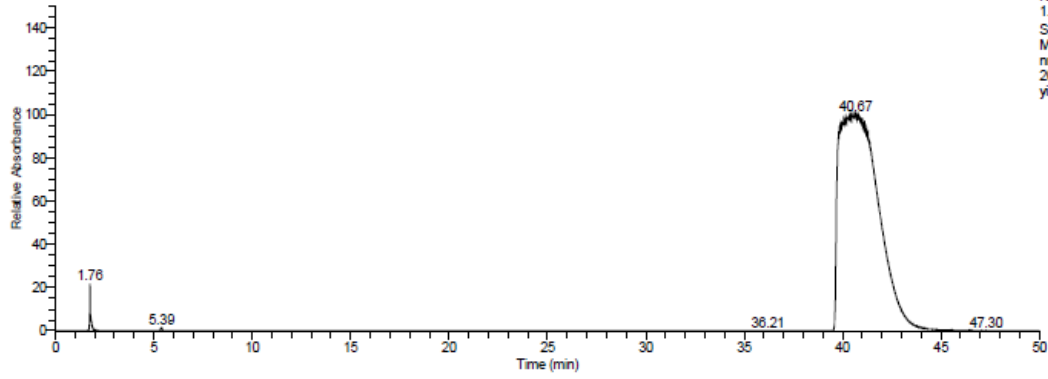
RT: 0.00 - 50.00 SM: 5G



Component Name	Component Type	Sample Type	RT	Area
Sitrik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Süksinik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Isovalerik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Ketoglutarik_Asit	Target compound	N/A	2.38	1384.79
Bütirik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Malik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Propiyonik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Isobütirik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Formik_Asit	Target compound	N/A	1.99	60591.92
Valerik_Asit	Target compound	N/A	40.60	5675168.89

Şekil 3.68 Açlık koşullarında 96. saate ait HPLC kromatogramı.

RT: 0.00 - 50.00 SM: 5G



NL:
1.20E8
Spectrum
Maximum
nm=204.5-
205.5 PDA
yikim-120-2-1

Component Name	Component Type	Sample Type	RT	Area
Sitrik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Süksinik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Isovalerik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Ketoglutarik_Asit	Target compound	N/A	2.38	580.65
Bütirik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Malik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Propiyonik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Isobütirik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Formik_Asit	Target compound	N/A	1.76	953916.01
Valerik_Asit	Target compound	N/A	40.59	3259695.05

Şekil 3.69 Açlık koşullarında 120. saate ait HPLC kromatogramı.

Alınan örneklerde yapılan analizler sonucu elde edilen veriler Çizelge 3.9'da özetlenmiştir.

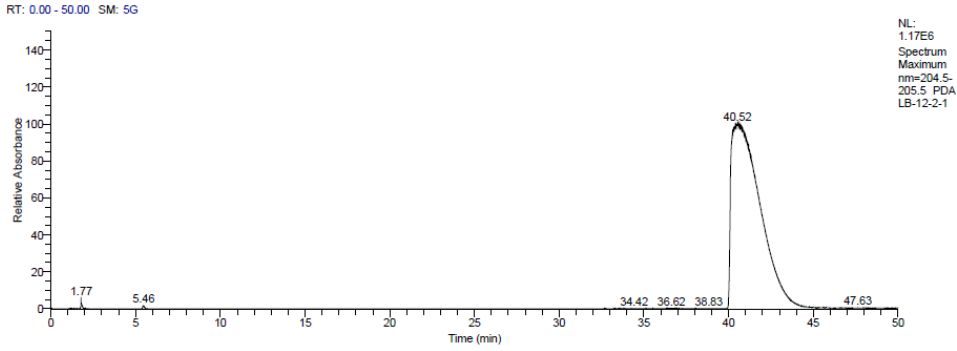
Çizelge 3.9 Karbon açlığı koşullarında (karbon kaynağı içermeyen ortamda) hücre içi organik asitlerin HPLC ile analizi ile elde edilen sonuçlar

Bileşik/h	12	36	42	48	60	66	72	84	90	96	120
Ketoglutarik asit (mM)	0,0003	0,0001	0,0008	0	0,0004	0,0012	0,0003	0,0001	0,0002	0,0004	0,0002
Formik asit (mM)	24,8129	2,2987	2,7666	2,4081	18,6223	3,1797	2,5855	2,6436	23,5489	2,0406	32,1257
Valerik asit (mM)	245,7775	104,3465	17,2305	224,9249	20,1138	41,1999	17,1964	15,7171	29,1414	187,2037	107,5058

Karbon açlığı koşullarında (karbon kaynağı içermeyen ortamda) alınan HPLC kromatogramları kantitatif olarak değerlendirildiğinde ketoglutarik asit (okzoglutarik asit), formik asit ve valerik asit (pentanoik asit) tayin edilebilmiş, standart olarak verilen diğer organik asitler tayin aralıklarının altında kalmaları nedeni ile örneklerde tespit edilememiştir.

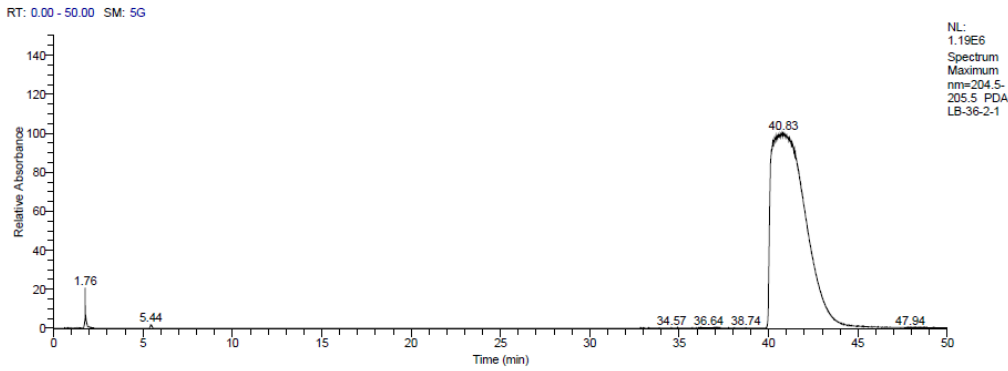
3.5.3 Azot sınırlamasız koşullarda (negatif kontrol) (C/N oranı düşük) hücre içi organik asitlerin HPLC ile analizi

Aşırı karbon kaynağı içeren ve azot sınırlamalı koşullarda (pozitif kontrol) (C/N oranı yüksek) hücre içi organik asitlerin HPLC ile Bölüm 2.14'e verilen yöntem ve protokole göre hizmet alımı yolu ile analizlenmiştir. Yapılan metabolit analizlerine ilişkin kromatogramlar Şekil 3.70- Şekil 3.79' da yer almaktadır.



Component Name	Component Type	Sample Type	RT	Area
Sitrik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Süksinik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Isovalerik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Ketoglutarik_Asit	Target compound	N/A	2.35	6308.35
Bütirik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Malik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Propiyonik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Isobütirik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Formik_Asit	Target compound	N/A	1.98	45761.70
Valerik_Asit	Target compound	N/A	40.56	38810228.27

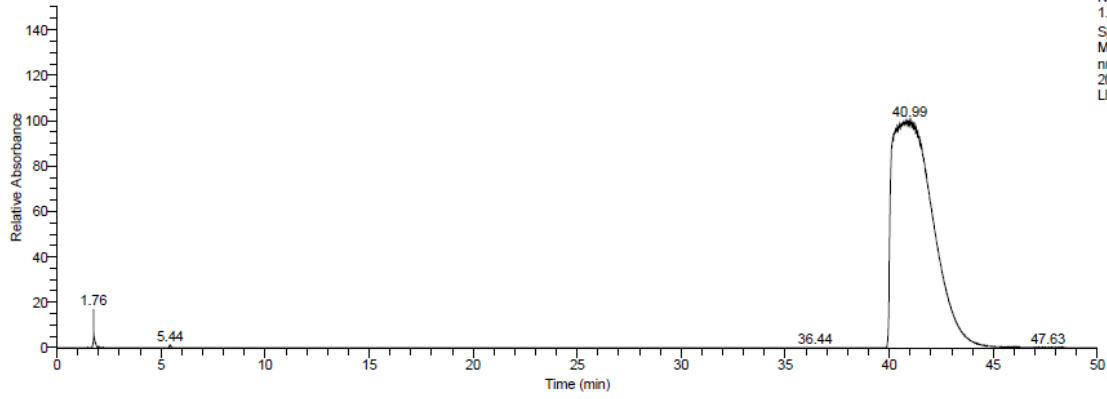
Şekil 3.70 PHA üretiminin teşvik edilmediği koşullarda 12. saate ait HPLC kromatogramı.



Component Name	Component Type	Sample Type	RT	Area
Sitrik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Süksinik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Isovalerik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Ketoglutarik_Asit	Target compound	N/A	2.37	2794.46
Bütirik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Malik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Propiyonik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Isobütirik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Formik_Asit	Target compound	N/A	1.98	114493.98
Valerik_Asit	Target compound	N/A	40.62	1547851.96

Şekil 3.71 PHA üretiminin teşvik edilmediği koşullarda 36. saate ait HPLC kromatogramı.

RT: 0.00 - 50.00 SM: 5G

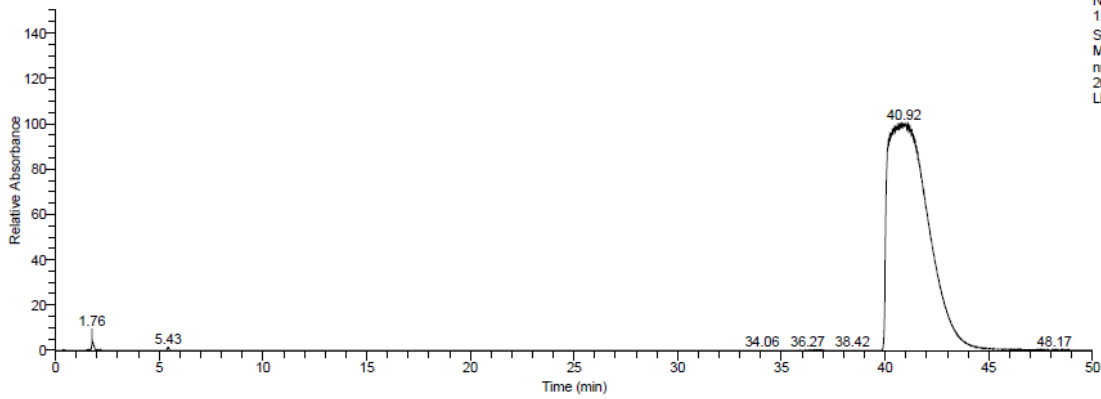


NL:
1.20E6
Spectrum
Maximum
nm=204.5-
205.5 PDA
LB-42-2-1

Component Name	Component Type	Sample Type	RT	Area
Sitrik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Süksinik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Isovalerik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Ketoglutarik_Asit	Target compound	N/A	2.40	2588.67
Bütirik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Malik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Propiyonik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Isobütirik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Formik_Asit	Target compound	N/A	1.76	682039.45
Valerik_Asit	Target compound	N/A	40.59	1644868.09

Şekil 3.72 PHA üretiminin teşvik edilmediği koşullarda 42. saate ait HPLC kromatogramı.

RT: 0.00 - 50.00 SM: 5G

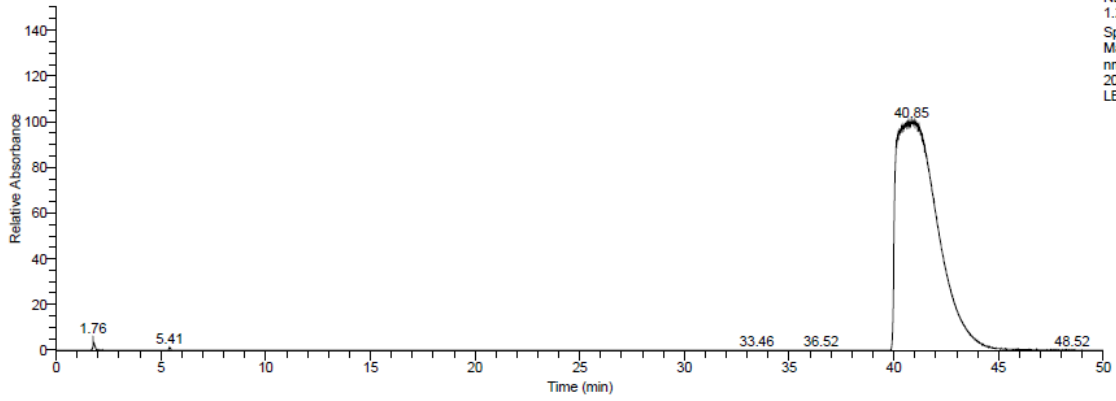


NL:
1.20E6
Spectrum
Maximum
nm=204.5-
205.5 PDA
LB-60-2-1

Component Name	Component Type	Sample Type	RT	Area
Sitrik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Süksinik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Isovalerik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Ketoglutarik_Asit	Target compound	N/A	2.38	2343.04
Bütirik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Malik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Propiyonik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Isobütirik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Formik_Asit	Target compound	N/A	1.76	508844.39
Valerik_Asit	Target compound	N/A	40.59	3532576.57

Şekil 3.73 PHA üretiminin teşvik edilmediği koşullarda 60. saate ait HPLC kromatogramı.

RT: 0.00 - 50.00 SM: 5G

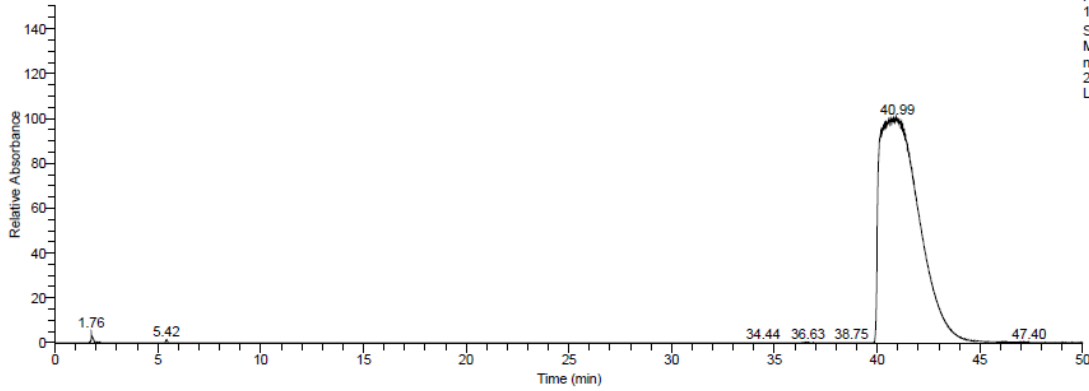


NL:
1.20E6
Spectrum
Maximum
nm=204.5-
205.5 PDA
LB-66-2-1

Component Name	Component Type	Sample Type	RT	Area
Sitrik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Süksinik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Isovalerik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Ketoglutarik_Asit	Target compound	N/A	2.35	5832.25
Bütirik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Malik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Propiyonik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Isobütirik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Formik_Asit	Target compound	N/A	2.01	43548.99
Valerik_Asit	Target compound	N/A	40.60	1686357.76

Şekil 3.74 PHA üretiminin teşvik edilmediği koşullarda 66. saate ait HPLC kromatogramı.

RT: 0.00 - 50.00 SM: 5G

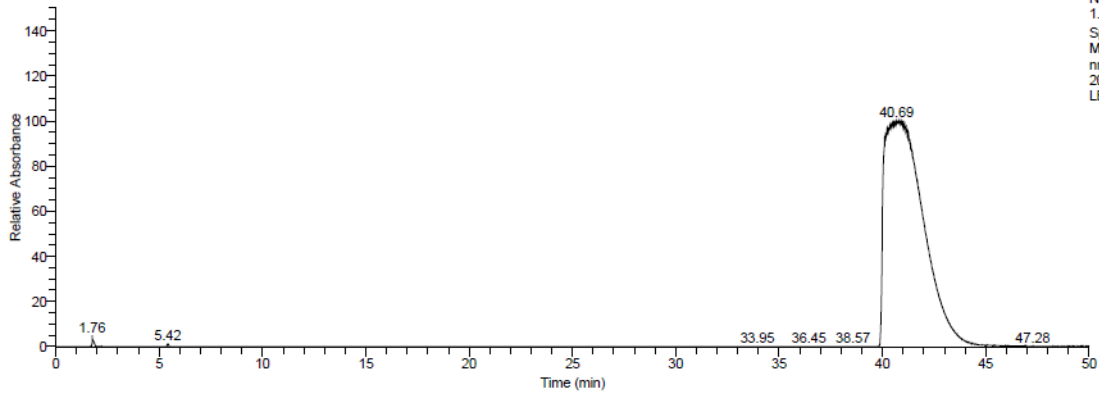


NL:
1.20E6
Spectrum
Maximum
nm=204.5-
205.5 PDA
LB-72-2-1

Component Name	Component Type	Sample Type	RT	Area
Sitrik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Süksinik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Isovalerik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Ketoglutarik_Asit	Target compound	N/A	2.36	2257.23
Bütirik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Malik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Propiyonik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Isobütirik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Formik_Asit	Target compound	N/A	1.76	380439.80
Valerik_Asit	Target compound	N/A	40.61	2907863.60

Şekil 3.75 PHA üretiminin teşvik edilmediği koşullarda 72. saate ait HPLC kromatogramı.

RT: 0.00 - 50.00 SM: 5G

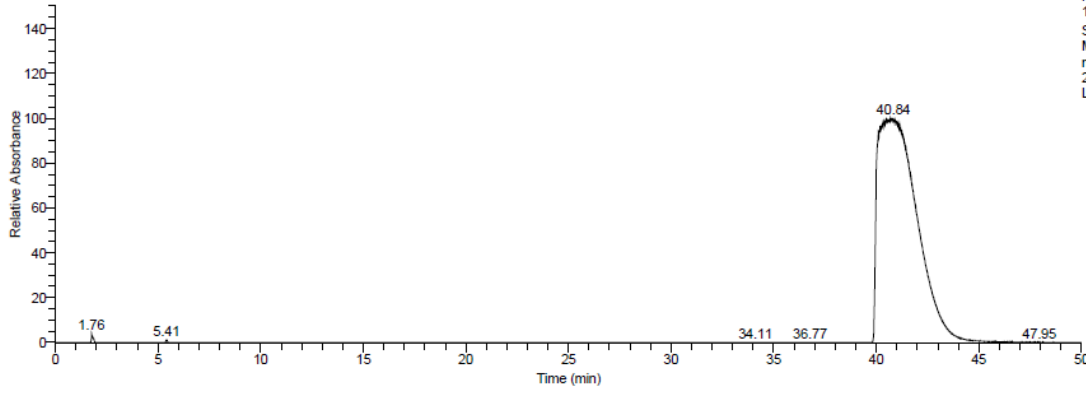


NL:
1.20E6
Spectrum
Maximum
nm=204.5-
205.5 PDA
LB-84-2-1

Component Name	Component Type	Sample Type	RT	Area
Sitrik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Süksinik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Isovalerik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Ketoglutarik_Asit	Target compound	N/A	2.38	4036.68
Bütirik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Malik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Propiyonik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Isobütirik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Formik_Asit	Target compound	N/A	1.76	356797.96
Valerik_Asit	Target compound	N/A	40.59	1104247.61

Şekil 3.76 PHA üretiminin teşvik edilmediği koşullarda 84. saate ait HPLC kromatogramı.

RT: 0.00 - 50.00 SM: 5G

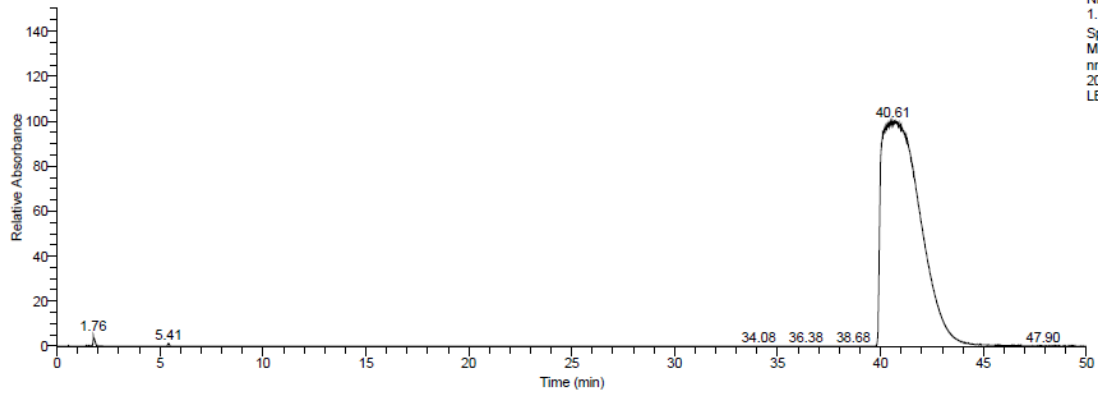


NL:
1.20E6
Spectrum
Maximum
nm=204.5-
205.5 PDA
LB-90-2-1

Component Name	Component Type	Sample Type	RT	Area
Sitrik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Süksinik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Isovalerik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Ketoglutarik_Asit	Target compound	N/A	2.39	1412.72
Bütirik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Malik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Propiyonik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Isobütirik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Formik_Asit	Target compound	N/A	1.76	395422.36
Valerik_Asit	Target compound	N/A	40.63	1183284.84

Şekil 3.77 PHA üretiminin teşvik edilmediği koşullarda 90. saate ait HPLC kromatogramı.

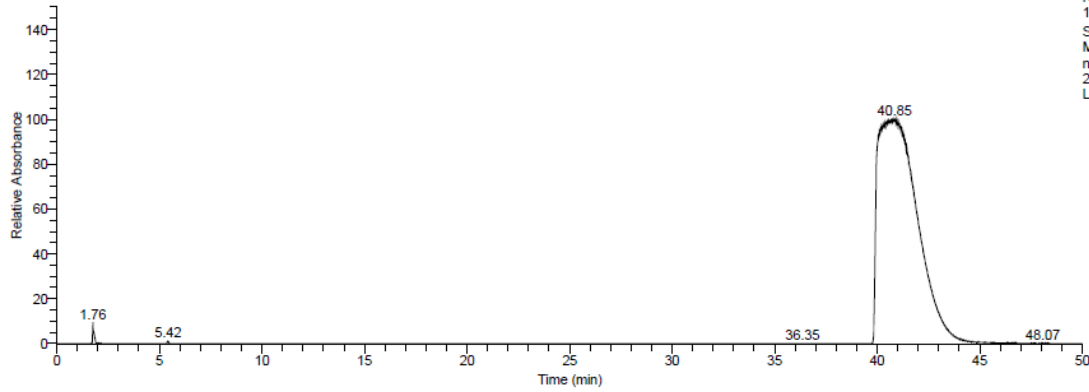
RT: 0.00 - 50.00 SM: 5G



Component Name	Component Type	Sample Type	RT	Area
Sitrik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Süksinik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Isovalerik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Ketoglutarik_Asit	Target compound	N/A	2.35	5210.58
Bütirik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Malik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Propiyonik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Isobütirik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Formik_Asit	Target compound	N/A	1.76	411470.28
Valerik_Asit	Target compound	N/A	40.60	3290778.79

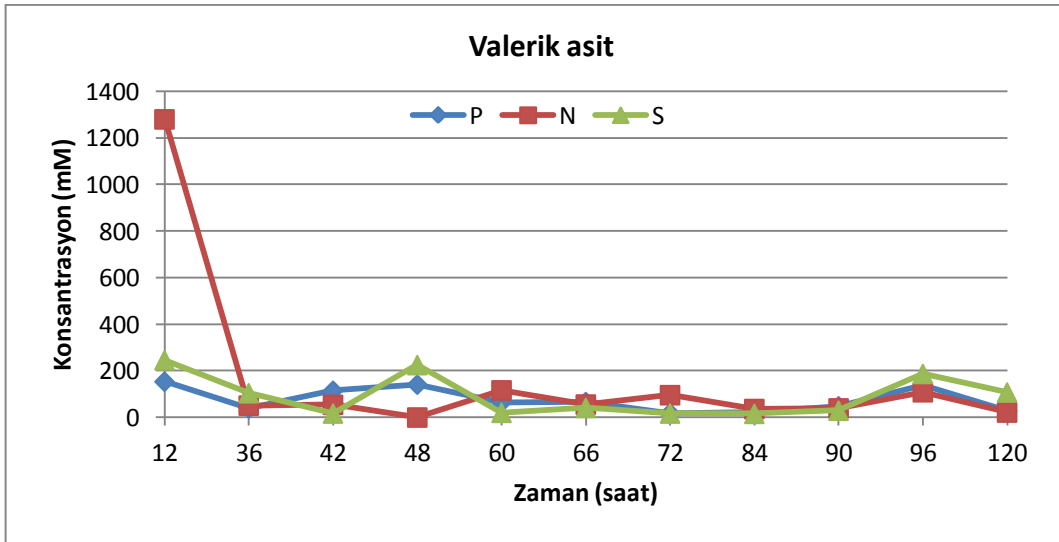
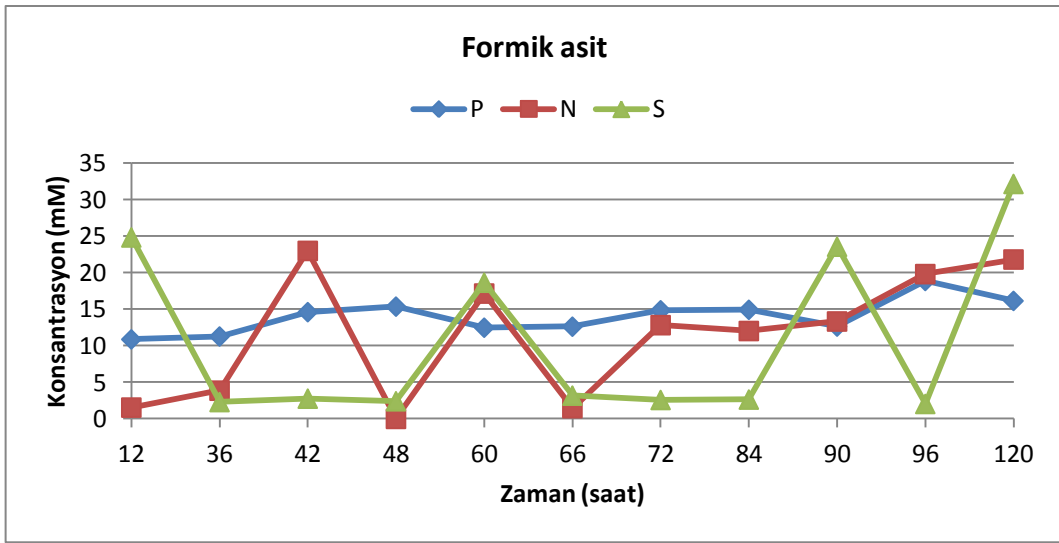
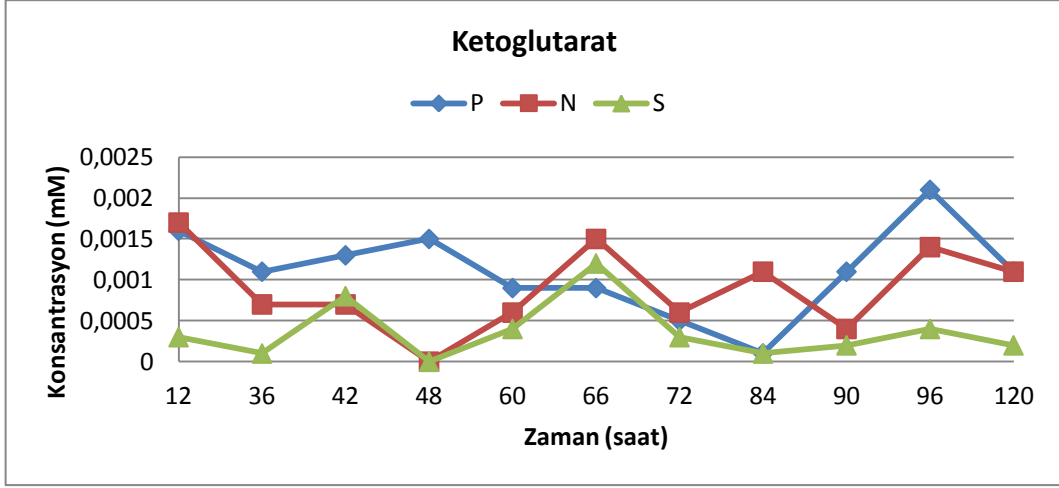
Şekil 3.78 PHA üretiminin teşvik edilmediği koşullarda 96. saate ait HPLC kromatogramı.

RT: 0.00 - 50.00 SM: 5G



Component Name	Component Type	Sample Type	RT	Area
Sitrik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Süksinik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Isovalerik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Ketoglutarik_Asit	Target compound	N/A	2.35	4234.75
Bütirik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Malik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Propiyonik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Isobütirik_Asit	Target compound	N/A	N/A	N/A
Formik_Asit	Target compound	N/A	1.76	647068.04
Valerik_Asit	Target compound	N/A	40.61	650624.86

Şekil 3.79 PHA üretiminin teşvik edilmediği koşullarda 120. saate ait HPLC kromatogramı.



Şekil 3.80 Farklı üretim koşullarında* HPLC ile tayin edilen organik asitlerin zamanla değişim profili

- * P: Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullar
 S: Açlık koşullarında hücre içi mcl-PHA üretiminin izlendiği koşullar
 N: Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edilmediği koşullar

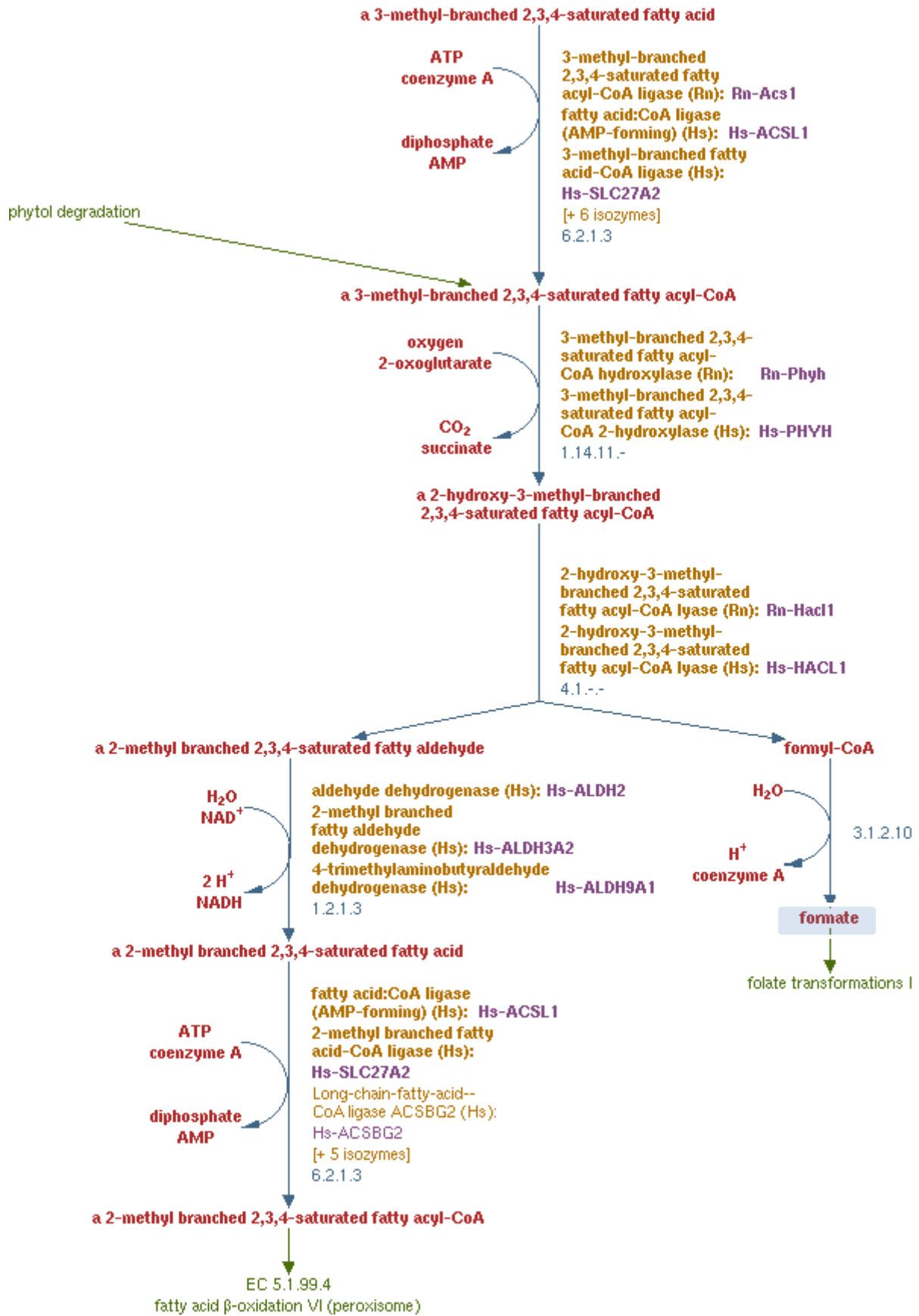
PHA üretiminin teşvik edilmediği koşullarda alınan HPLC kromatogramları kantitatif olarak değerlendirildiğinde ketoglutarik asit (okzoglutarik asit), formik asit ve valerik asit (pentanoik asit) tayin edilebilmiş, standart olarak verilen diğer organik asitler tayin aralıklarının altında kalmaları nedeni ile örneklerde tespit edilememiştir. Alınan örneklerde yapılan analizler sonucu elde edilen veriler Şekil 3.80’de verilmiş, Çizelge 3.10’da özetlenmiştir. Tespit edilen organik asitlerin miktarları analizlenebilen aralıklarda değişkenlik göstermektedir.

Çizelge 3.10 PHA üretiminin teşvik edilmediği koşullarda (negatif kontrol) (C/N oranı düşük) hücre içi organik asitlerin HPLC ile analizi

Bileşik/h	12	36	42	60	66	72	84	90	96	120
Ketoglutarik asit (mM)	0,0017	0,0007	0,0007	0,0006	0,0015	0,0006	0,0011	0,0004	0,0014	0,0011
Formik asit (mM)	1,5411	3,8559	22,9695	17,1367	1,4666	12,8123	12,0161	13,3169	19,7962	21,7918
Valerik asit (mM)	1280,2121	51,0581	54,2584	116,5272	55,627	95,9202	36,4252	39,0324	108,5511	21,4618

α -ketoglutarik asit(2-oxopentanedioate; Pentanedioic acid, 2-oxoglutaric acid; 2-oxopentanedionate), glutarik asitin keton türevi olup, glutamatin deaminasyonu ile üretilen izositrattan sonra Süksinil-CoA’dan önce gelen sitrat çevriminin bir ara ürünüdür.

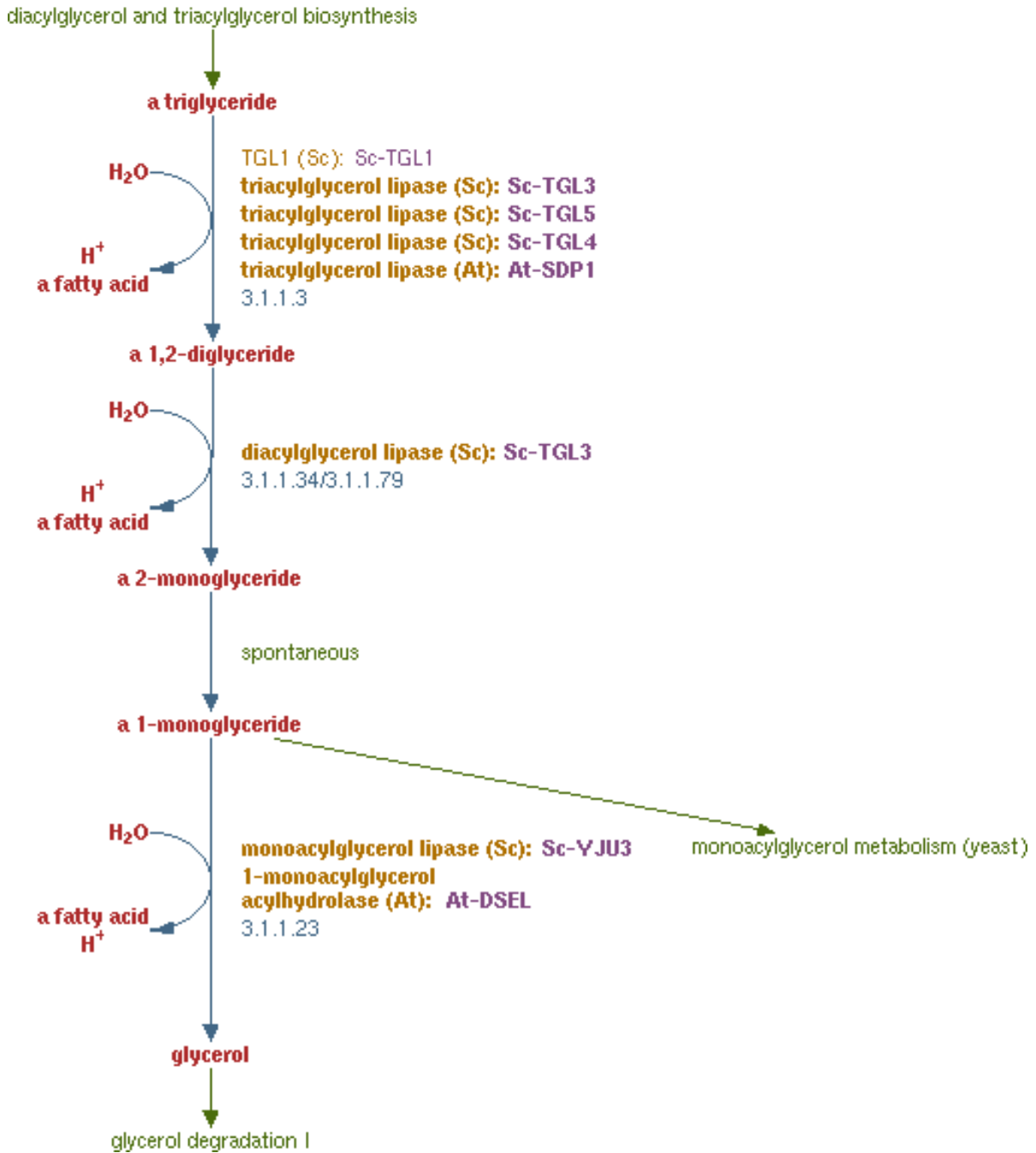
Amino asit sentezi için de bir çıkış maddesi olup, Glutamin sentetaz ile glutamattan glutaminin sentezi gerçekleşebilir. α -ketoglutarat, metabolik yollarda en önemli azot taşıyıcılardan birisidir. Amino asitlerin amino grupları transaminasyonla α -ketoglutarata bağlanırlar. α -ketoglutarat anapletorik reaksiyonlara girerek, glutamin, histidin, lizin biyosentezi sırasında üretilebildiği gibi süksinil-CoA’nın dekarboksilasyonu (Şekil 3.81), amonyağın asimilasyonu gibi pek çok reaksiyonlarda tüketilmektedir. Hücre içi bu dinamikler nedeni ile oldukça düşük konsantrasyonlarda, dalgalanmalı bir profil göstermektedir (Şekil 3.80).



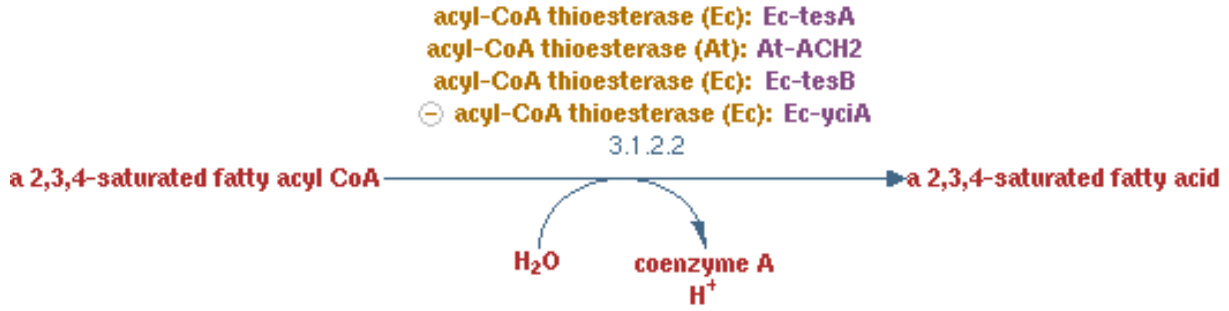
Şekil 3.82 Yağ asidi α-oksidasyonu ile format üretim yolağı (MetaCyc, 2016).

Valerik asit (valerianic acid, pentanoic acid, valerate) bir karboksilik asit olmakla beraber aynı zamanda kısa zincirli yağ asidi olarak da sınıflandırılmaktadır.

Pentanoat, alkan oksidasyonu, yağ asidi α -oksidasyonu sırasında tüketilebilmekte yine alkan oksidasyonu, yağ asidi α -oksidasyonu, triaçilgliserol yıkımı (Şekil 3.83) ve açıl-CoA hidrolizi sırasında üretilmektedir (Şekil 3.84). Her üç koşulda da en yüksek konsantrasyonlarda tayin edilen bir metabolittir.



Şekil 3.83 Triaçilgliserol yıkımı (MetaCyc, 2016).



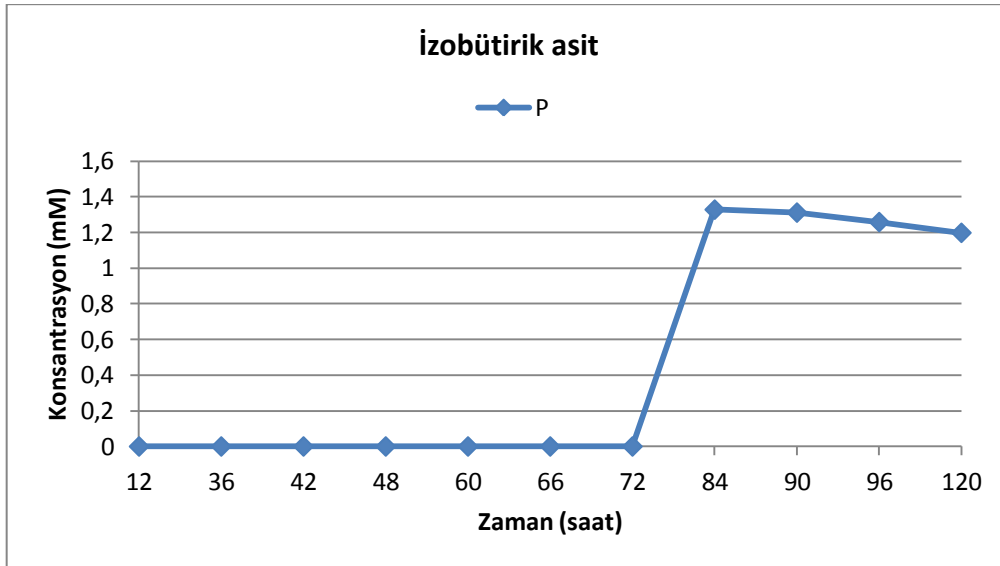
Şekil 3.84 Açıl-CoA hidrolizi ile doymuş yağ asiti üretimi (MetaCyc, 2016).

İzobütirik asit, L-Leu yıkımı, sırasında üretilen bir metabolittir. ATP harcanarak 2-metilpropanoil fosfata dönüşebilmektedir (Şekil 3.85).



Şekil 3.85 İzobütirik asit sentezi (MetaCyc, 2016).

İzobütirat sadece mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda tespit edilebilmiştir (Şekil 3.85). Bu durum, özellikle mcl-PHA üretiminin en yüksek düzeye ulaştığından itibaren görülmeye başlanması da dikkate alındığında izobütiratın, hücre içi mcl-PHA sentezinin bir ara metaboliti olduğunun işaretidir.

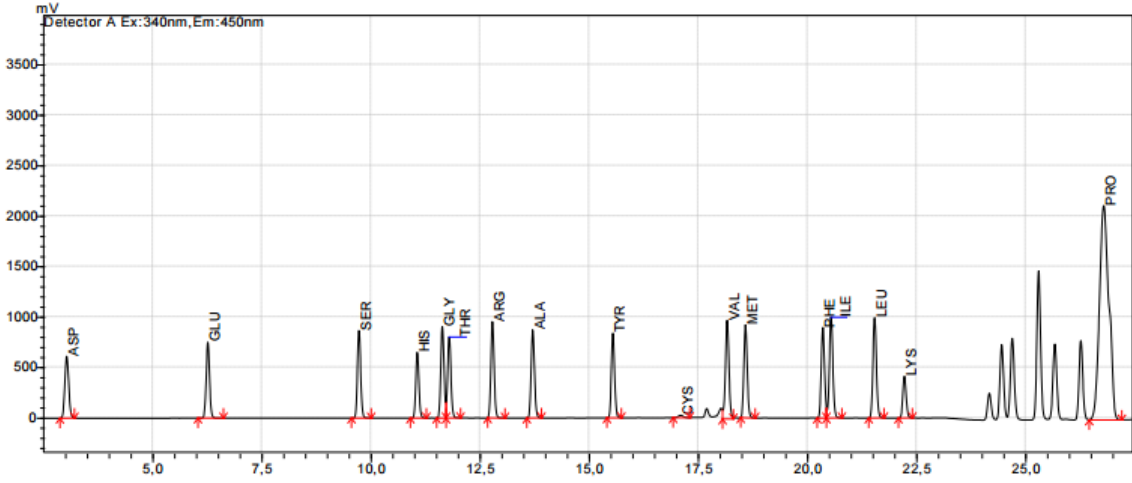


Şekil 3.86 mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda izobütirat konsantrasyonunun zamanla değişimi

3.6 Hücre İçi Amino Asitlerin Analizi

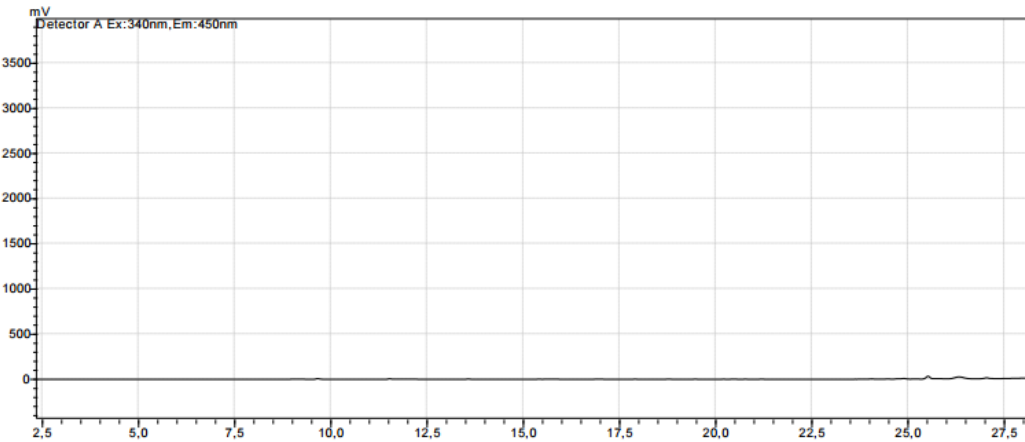
3.6.1 Hücre İçi Amino Asitlerin HPLC ile Analizi

Her üç koşulda hücre içi amino asit profilleri HPLC ile hizmet alımı yolu ile Bölüm 2.15.2’te verilen yöntem ve protokollere göre analizlendi. Şekil 3.87’de amino asit standartlarının HPLC kromatogramı verilmektedir.



Şekil. 3.87 Amino asit standartlarının HPLC kromatogramı

Hazırlanan örneklerde yapılan analizler sonucu HPLC kromatogramlarında herhangi bir pike rastlanmadı. Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 36. saate ait kromatogram örnek olarak Şekil 3.88’de verilmektedir. Cihaz duyarlık sınırlarının altında kalma olasılığı dikkate alınarak örneklerin Ege Üniversitesi Merkezi Test ve Analiz Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi’nde yeni hizmete giren LC-QTOF-MS cihazı ile analizlenmesine karar verildi.



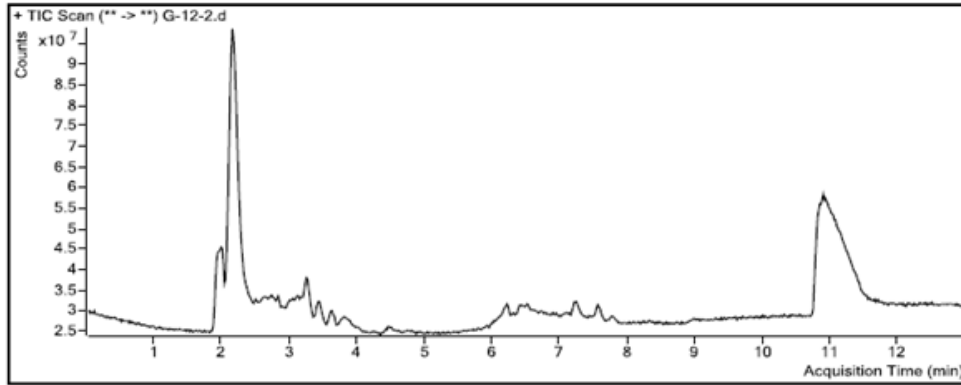
Şekil. 3.88 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 36. saate ait HPLC kromatogramı

3.6.2 Hücre İçi Amino Asitlerin LC/Q-TOF /MS ile Analizi

Aşırı karbon kaynağı içeren ve azot sınırlamalı koşullarda, karbon açlığı koşullarında (karbon kaynağı içermeyen ortamda) ve azot sınırlamasız koşullarda (C/N oranı düşük) hücre içi amino asitlerin analizi Bölüm 2.15.3'te verilen yöntem ve protokole göre LC/Q-TOF/MS ile yapıldı. HPLC analizlerinin aksine amino asitlerde türevlendirme yapılmaksızın analizler gerçekleştirildi, 17 farklı L-amino asit içeren karışım standart olarak kullanıldı.

3.6.2.1 Aşırı karbon kaynağı içeren ve azot sınırlamalı koşullarda (pozitif kontrol) (C/N oranı yüksek) hücre içi amino asitlerin LC/Q-TOF /MS ile analizi

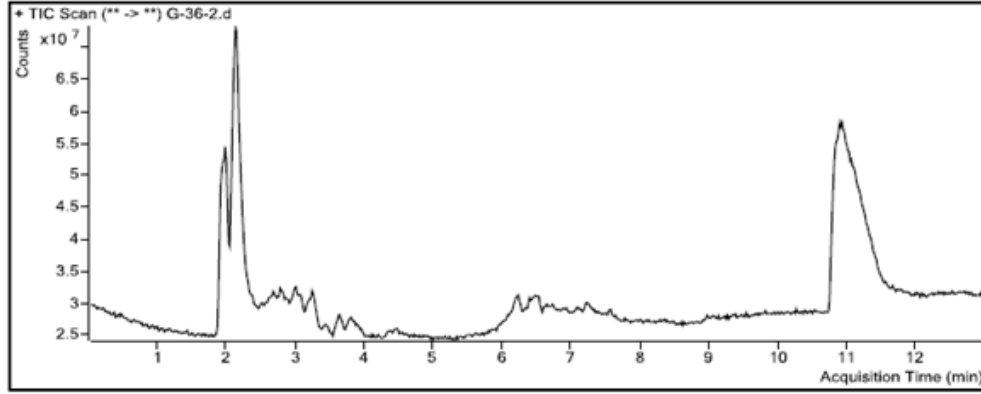
Aşırı karbon kaynağı içeren ve azot sınırlamalı koşullarda (pozitif kontrol) (C/N oranı yüksek) hücre içi amino asitlerin analizi öncesi L-Tyr, L-Ala, L-Glu, L-Leu, L-Thr, L-Ile, L-Met, L-Pro, L-His, L-Arg ve L-Val amino asitleri ile metod geliştirildi ve kalibrasyon grafikleri çizildi. Örneklerin Bölüm 2.15.3'te verilen protokole göre kantitatif analizi gerçekleştirildi ve Şekil 3.89 ile Şekil 3.99'da verilen kromatogramlar elde edildi.



Quantitation Results

Compound	RT	Response	Conc
L-Tyrosine	5.099	10446	0.6224
L-Alanine	5.962	5606	0.0000
L-Glutamic acid	5.996	2889	0.0000
L-Leucine	6.228	6703	0.7713
L-Threonine	6.610	51722	1.4000
L-Isoleucine	6.610	258335	0.8155
L-Methionine	6.643	3483	0.7912
L-Proline	7.008	53686	0.0000
L-Histidine	7.224	2951	0.0000
L-Arginine	7.407	47867	0.0000
L-Valine	7.573	12058940	54.5168

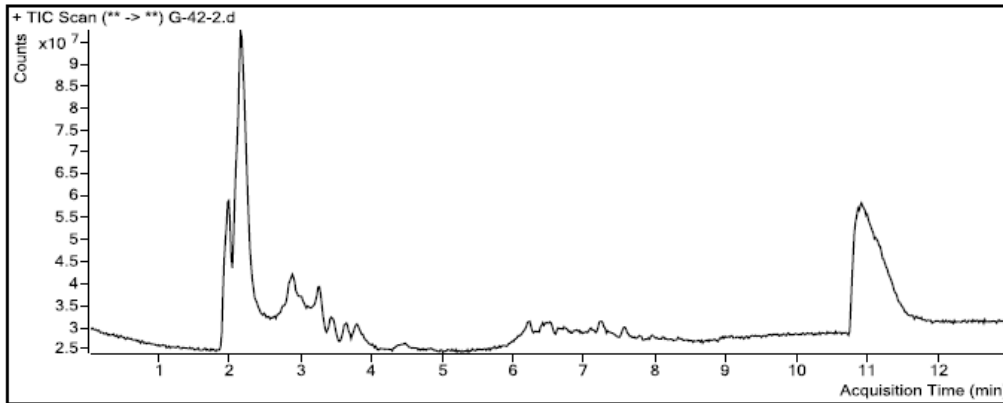
Şekil 3.89 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 12. saate ait LC/Q-TOF/MS kromatogramı ve tayin edilen amino asit konsantrasyonları



Quantitation Results

Compound	RT	Response	Conc
L-Phenylalanine	4.964	19347	0.5202
L-Tyrosine	5.080	18307	0.6260
L-Isoleucine	5.395	32290	0.6600
L-Methionine	6.491	7058	0.7930
L-Threonine	6.623	15435	0.6767
L-Glutamic acid	6.839	40602	0.8277
L-Proline	6.989	99007	0.0000
L-Arginine	7.420	36516	0.0000
L-Histidine	7.437	28501	0.0000
L-Valine	7.570	4227199	16.3218

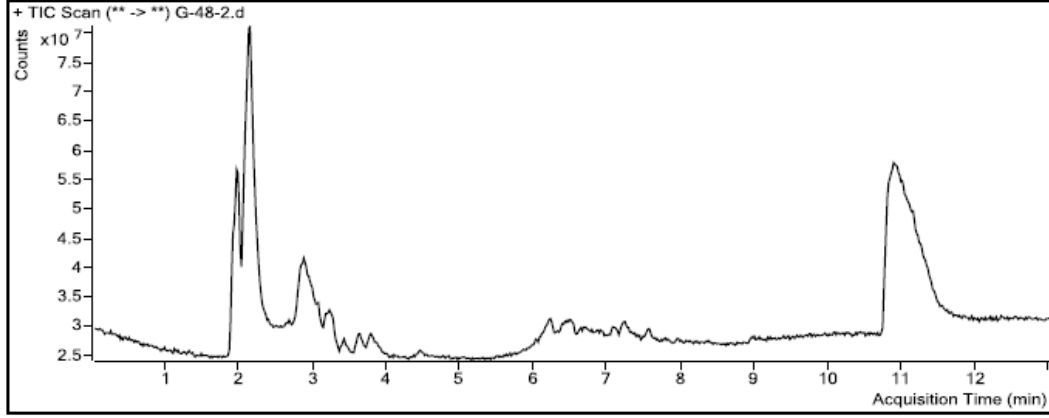
Şekil 3.90 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 36. saate ait LC/Q-TOF/MS kromatogramı ve tayin edilen amino asit konsantrasyonları.



Quantitation Results

Compound	RT	Response	Conc
L-Phenylalanine	4.960	37188	0.5260
L-Tyrosine	5.109	21753	0.6276
L-Glutamic acid	6.055	4027	0.0000
L-Threonine	6.619	47909	1.3240
L-Isoleucine	6.619	280379	0.8307
L-Methionine	6.702	2258	0.7906
L-Proline	7.001	99753	0.0000
L-Arginine	7.383	69171	0.0000
L-Histidine	7.400	24040	0.0000
L-Valine	7.566	7127868	30.4682

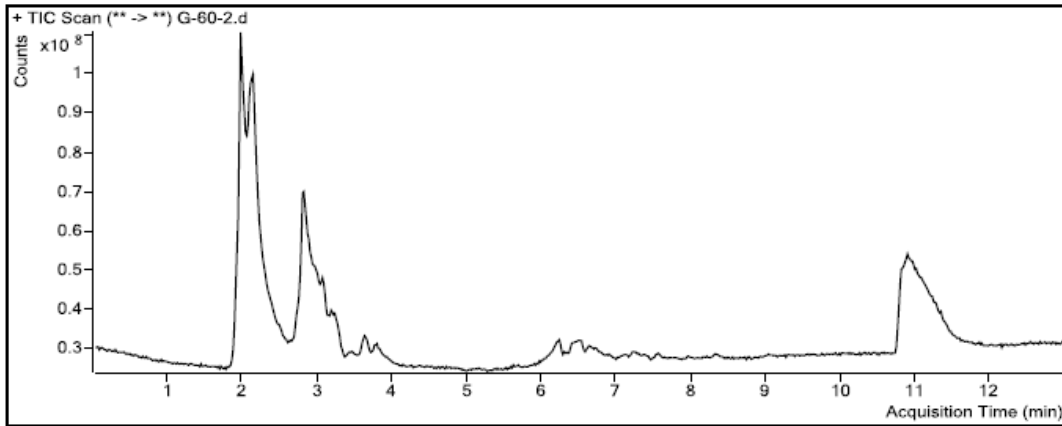
Şekil 3.91 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 42. saate ait LC/Q-TOF/MS kromatogramı ve tayin edilen amino asit konsantrasyonları.



Quantitation Results

Compound	RT	Response	Conc
L-Phenylalanine	4.929	24033	0.5217
L-Tyrosine	5.045	21294	0.6274
L-Glutamic acid	5.875	1261	0.0000
L-Isoleucine	6.605	224451	0.7922
L-Threonine	6.622	15013	0.6683
L-Proline	7.004	61880	0.0000
L-Histidine	7.369	17307	0.0000
L-Arginine	7.385	40682	0.0000
L-Valine	7.568	5850104	24.2367

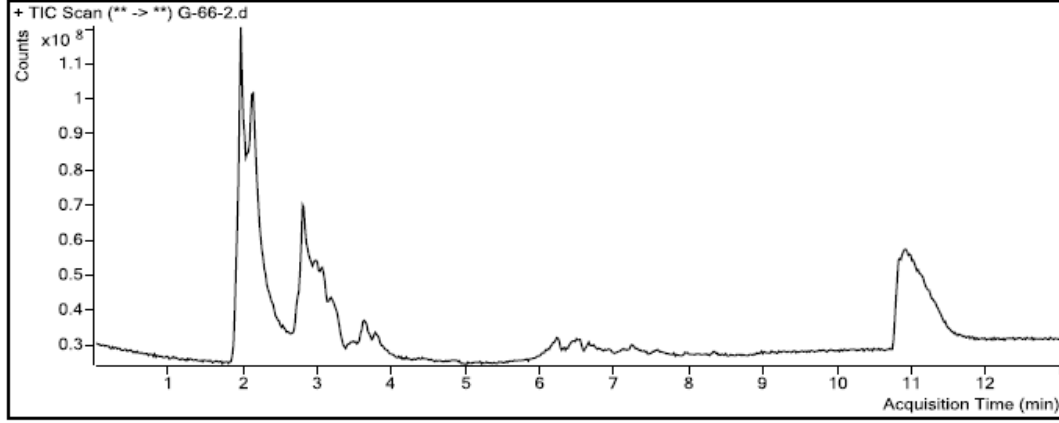
Şekil 3.92 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 48. saate ait LC/Q-TOF/MS kromatogramı ve tayin edilen amino asit konsantrasyonları.



Quantitation Results

Compound	RT	Response	Conc
L-Phenylalanine	4.933	37175	0.5260
L-Glutamic acid	5.929	158946	5.1604
L-Isoleucine	6.593	223900	0.7919
L-Alanine	6.626	26233	0.0000
L-Threonine	6.626	16537	0.6987
L-Proline	7.008	130961	0.0000
L-Arginine	7.390	74613	0.0000
L-Histidine	7.407	17815	0.0000
L-Valine	7.573	2859226	9.6503

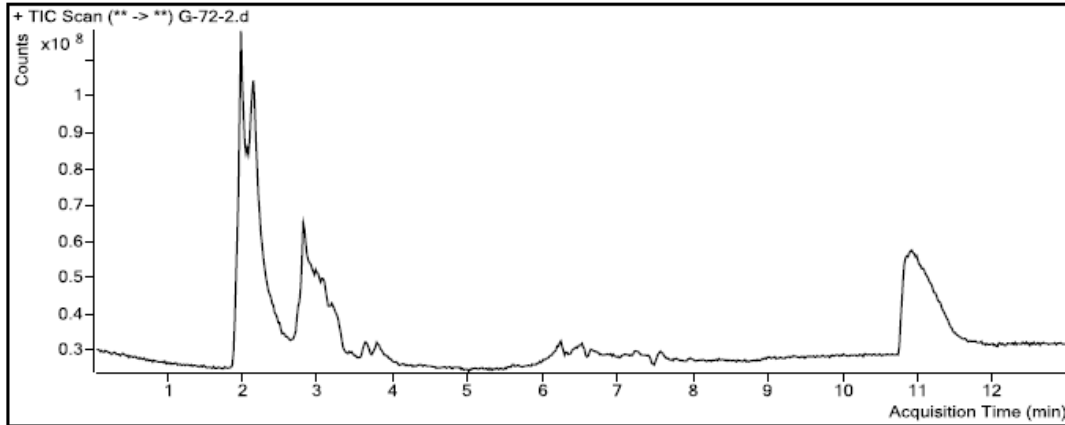
Şekil 3.93 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 60. saate ait LC/Q-TOF/MS kromatogramı ve tayin edilen amino asit konsantrasyonları.



Quantitation Results

Compound	RT	Response	Conc
L-Phenylalanine	4.916	102770	0.5472
L-Tyrosine	5.049	90699	0.6594
L-Leucine	5.431	105108	0.8520
L-Isoleucine	5.431	88063	0.6984
L-Glutamic acid	5.779	8128	0.0000
L-Threonine	6.642	26560	0.8984
L-Alanine	6.858	6926	0.0000
L-Proline	7.024	241587	0.0000
L-Histidine	7.389	93338	0.0000
L-Arginine	7.389	88666	0.0000
L-Valine	7.572	2864160	9.6744

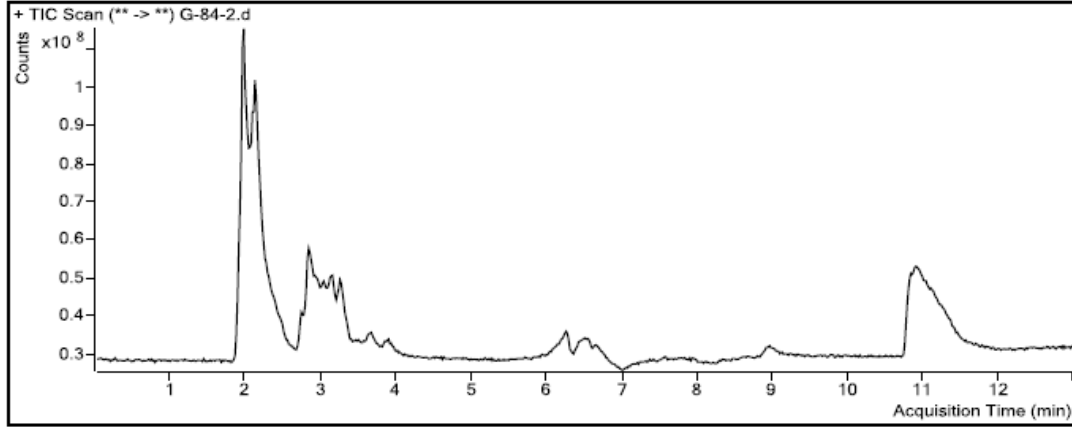
Şekil 3.94 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 66. saate ait LC/Q-TOF/MS kromatogramı ve tayin edilen amino asit konsantrasyonları.



Quantitation Results

Compound	RT	Response	Conc
L-Tyrosine	5.364	34336	0.6334
L-Glutamic acid	5.862	96260	2.8654
L-Isoleucine	6.609	195144	0.7721
L-Threonine	6.642	16590	0.6997
L-Methionine	6.642	7195	0.7930
L-Proline	7.007	85348	0.0000
L-Histidine	7.389	15132	0.0000
L-Arginine	7.389	62856	0.0000
L-Valine	7.571	6510959	27.4596

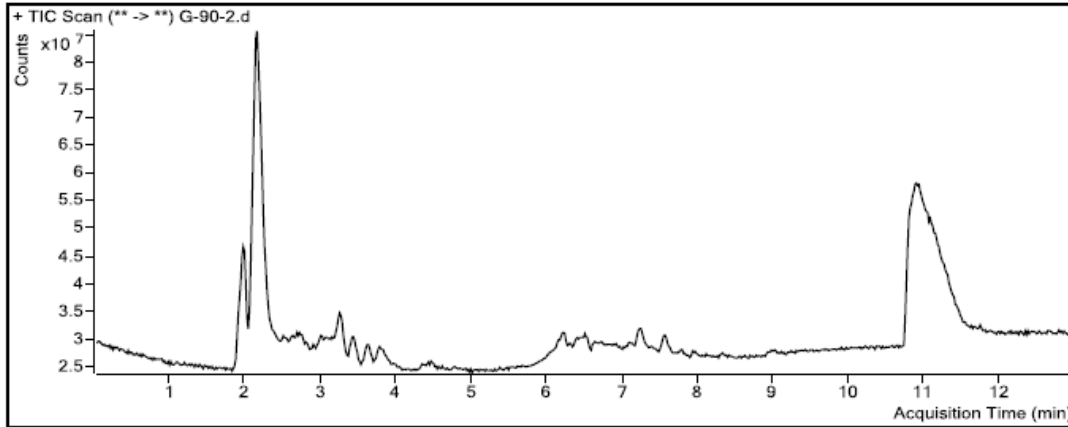
Şekil 3.95 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 72. saate ait LC/Q-TOF/MS kromatogramı ve tayin edilen amino asit konsantrasyonları.



Quantitation Results

Compound	RT	Response	Conc
L-Phenylalanine	5.023	34782	0.5252
L-Tyrosine	5.089	17657	0.6257
L-Leucine	6.268	50699	0.8074
L-Isoleucine	6.268	26027	0.6557
L-Cystine	6.617	14025	0.0139
L-Threonine	6.666	22302	0.8136
L-Methionine	6.666	12271	0.7955
L-Proline	7.031	71992	0.0000
L-Glutamic acid	7.081	202955	6.7715
L-Arginine	7.413	44497	0.0000
L-Valine	7.579	2183844	6.3565

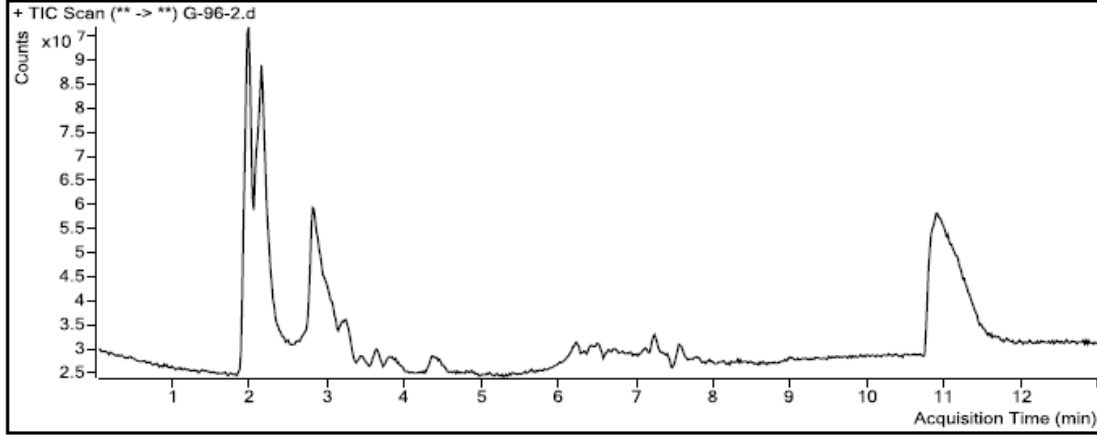
Şekil 3.96 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 84. saate ait LC/Q-TOF/MS kromatogramı ve tayin edilen amino asit konsantrasyonları.



Quantitation Results

Compound	RT	Response	Conc
L-Phenylalanine	4.990	39144	0.5266
L-Tyrosine	5.057	21961	0.6277
L-Isoleucine	6.219	15080	0.6482
L-Glutamic acid	6.517	3518	0.0000
L-Threonine	6.634	34179	1.0503
L-Methionine	6.700	21311	0.8000
L-Histidine	6.700	20015	0.0000
L-Proline	7.032	36160	0.0000
L-Alanine	7.198	12066	0.0000
L-Arginine	7.397	88945	0.0000
L-Valine	7.580	10259116	45.7391

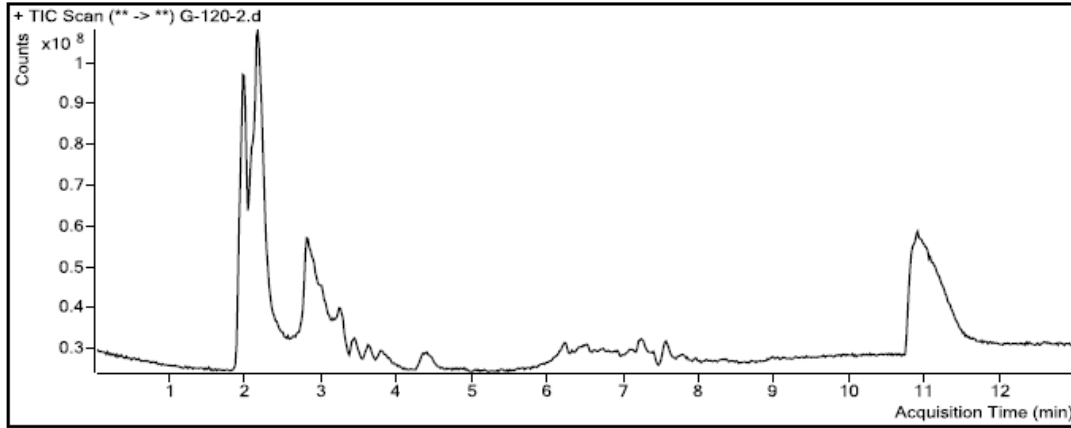
Şekil 3.97 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 90. saate ait LC/Q-TOF/MS kromatogramı ve tayin edilen amino asit konsantrasyonları.



Quantitation Results

Compound	RT	Response	Conc
L-Phenylalanine	4.923	55959	0.5320
L-Tyrosine	5.072	28283	0.6306
L-Glutamic acid	5.504	825	0.0000
L-Isoleucine	6.599	186996	0.7665
L-Threonine	6.616	24965	0.8667
L-Proline	7.014	95991	0.0000
L-Histidine	7.396	33881	0.0000
L-Arginine	7.396	89160	0.0000
L-Valine	7.579	10376726	46.3127

Şekil 3.98 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 96. saate ait LC/Q-TOF/MS kromatogramı ve tayin edilen amino asit konsantrasyonları.



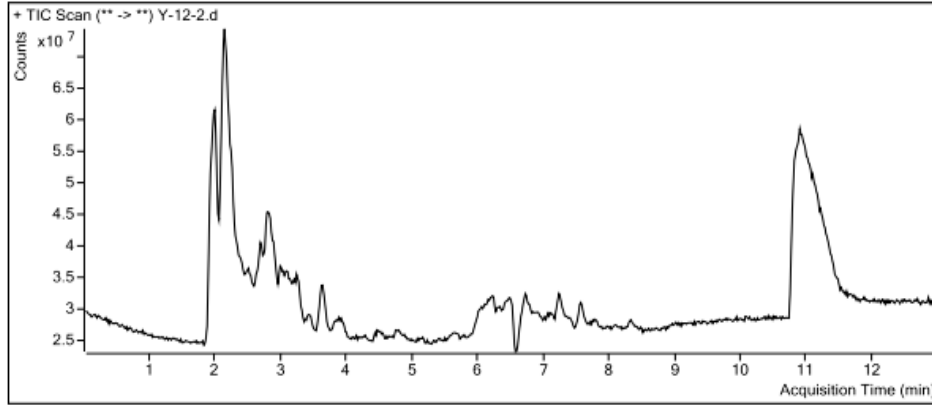
Quantitation Results

Compound	RT	Response	Conc
L-Phenylalanine	4.905	88307	0.5425
L-Tyrosine	5.071	30669	0.6317
L-Leucine	5.719	146530	0.8860
L-Isoleucine	5.719	130602	0.7277
L-Glutamic acid	6.416	22961	0.1819
L-Threonine	6.615	30591	0.9788
L-Proline	6.997	103021	0.0000
L-Arginine	7.379	195525	0.0000
L-Histidine	7.395	83819	0.0000
L-Valine	7.578	12799889	58.1303

Şekil 3.99 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 120. saate ait LC/Q-TOF/MS kromatogramı ve tayin edilen amino asit konsantrasyonları.

3.6.2.2 Karbon açlığı koşullarında (karbon kaynağı içermeyen ortamda) hücre içi amino asitlerin LC/Q-TOF/MS ile analizi

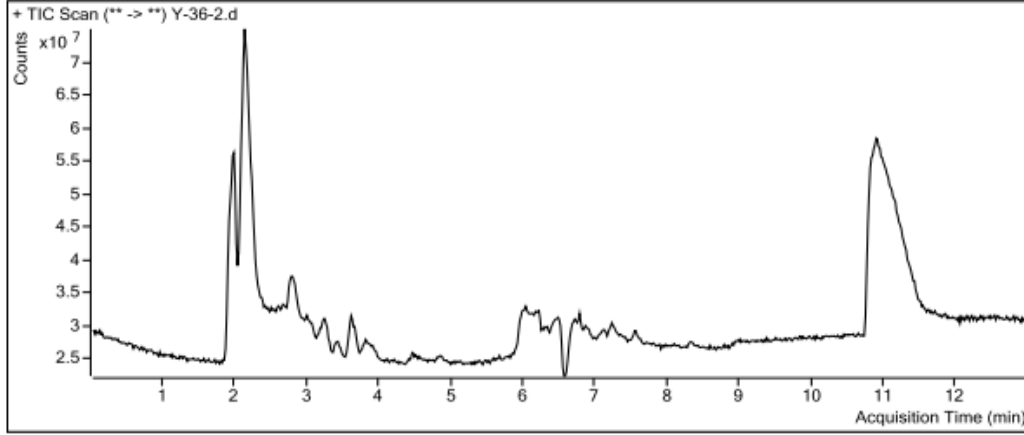
Karbon açlığı koşullarında (karbon kaynağı içermeyen ortamda) hücre içi amino asitlerin kantitatif analizi Bölüm 2.15.3'te verilen protokole göre gerçekleştirildi ve Şekil 3.100 ile Şekil 3.110'da verilen kromatogramlar elde edildi.



Quantitation Results

Compound	RT	Response	Conc
L-Phenylalanine	4.903	81508	0.5403
L-Tyrosine	5.036	40202	0.6361
L-Leucine	5.401	58542	0.8138
L-Isoleucine	5.717	38795	0.6645
L-Methionine	5.766	16608	0.7976
L-Glutamic acid	6.065	14211	0.0000
L-Threonine	6.630	37011	1.1068
L-Proline	7.011	137882	0.0000
L-Arginine	7.393	74367	0.0000
L-Histidine	7.410	34512	0.0000
L-Valine	7.576	11159720	50.1313

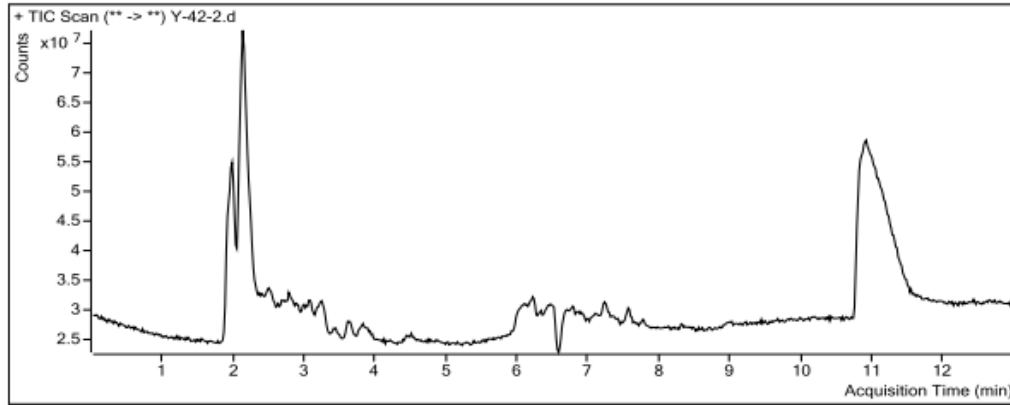
Şekil 3.100 Açlık koşullarında 12. saate ait LC/Q-TOF/MS kromatogramı ve tayin edilen amino asit konsantrasyonları



Quantitation Results

Compound	RT	Response	Conc
L-Phenylalanine	4.902	137246	0.5583
L-Tyrosine	5.068	68189	0.6491
L-Leucine	5.450	204930	0.9339
L-Isoleucine	5.450	53084	0.6743
L-Methionine	5.682	8496	0.7937
L-Glutamic acid	6.097	20981	0.1094
L-Threonine	6.612	35229	1.0713
L-Alanine	6.878	2969	0.0000
L-Proline	7.010	307022	0.0000
L-Histidine	7.392	56650	0.0000
L-Arginine	7.392	184381	0.0000
L-Valine	7.575	5547793	22.7623

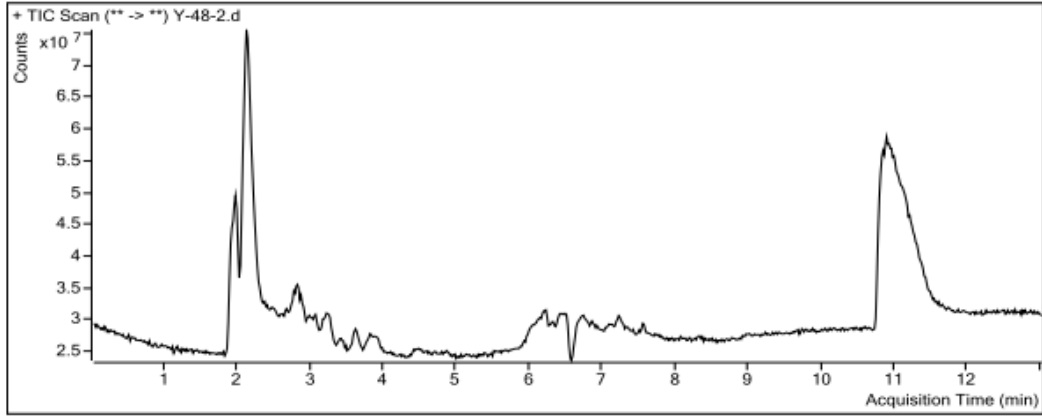
Şekil 3.101 Açlık koşullarında 36. saate ait LC/Q-TOF/MS kromatogramı ve tayin edilen amino asit konsantrasyonları



Quantitation Results

Compound	RT	Response	Conc
L-Phenylalanine	4.916	107323	0.5486
L-Tyrosine	5.082	30669	0.6317
L-Leucine	5.447	45852	0.8034
L-Isoleucine	5.447	44796	0.6686
L-Methionine	5.696	19346	0.7990
L-Glutamic acid	6.078	23865	0.2150
L-Threonine	6.609	28864	0.9444
L-Proline	7.007	170894	0.0000
L-Arginine	7.389	81116	0.0000
L-Histidine	7.422	13458	0.0000
L-Valine	7.572	8416002	36.7504

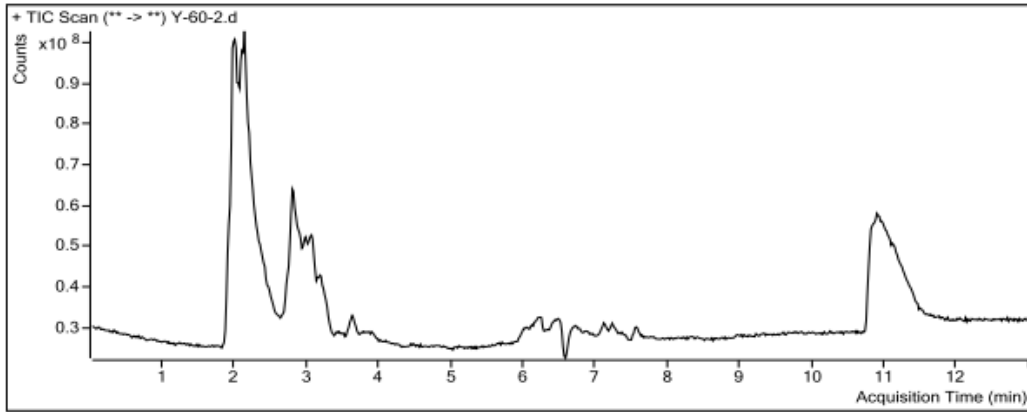
Şekil 3.102 Açlık koşullarında 42. saate ait LC/Q-TOF/MS kromatogramı ve tayin edilen amino asit konsantrasyonları



Quantitation Results

Compound	RT	Response	Conc
L-Phenylalanine	4.913	96121	0.5450
L-Tyrosine	5.046	38182	0.6352
L-Leucine	5.411	57487	0.8130
L-Glutamic acid	6.391	71191	1.9476
L-Isoleucine	6.607	281587	0.8315
L-Threonine	6.623	37429	1.1151
L-Proline	7.005	124506	0.0000
L-Alanine	7.105	8934	0.0000
L-Histidine	7.387	14781	0.0000
L-Arginine	7.387	64809	0.0000
L-Valine	7.589	4669628	18.4795

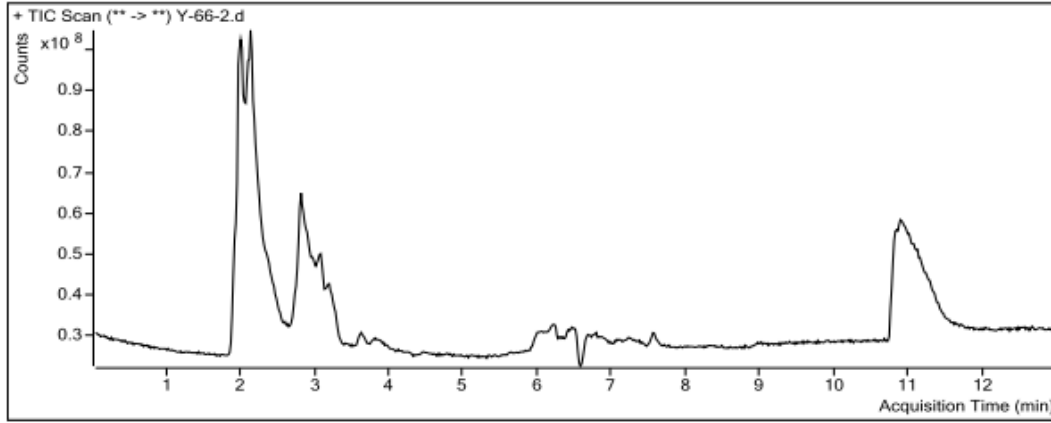
Şekil 3.103 Açlık koşullarında 48. saate ait LC/Q-TOF/MS kromatogramı ve tayin edilen amino asit konsantrasyonları



Quantitation Results

Compound	RT	Response	Conc
L-Phenylalanine	4.950	82930	0.5407
L-Tyrosine	5.050	49117	0.6403
L-Leucine	5.432	62237	0.8169
L-Methionine	5.681	11865	0.7953
L-Isoleucine	5.730	55678	0.6761
L-Glutamic acid	6.394	41448	0.8587
L-Threonine	6.610	24530	0.8580
L-Proline	7.009	193776	0.0000
L-Histidine	7.390	40758	0.0000
L-Arginine	7.390	53860	0.0000
L-Valine	7.573	7599523	32.7685

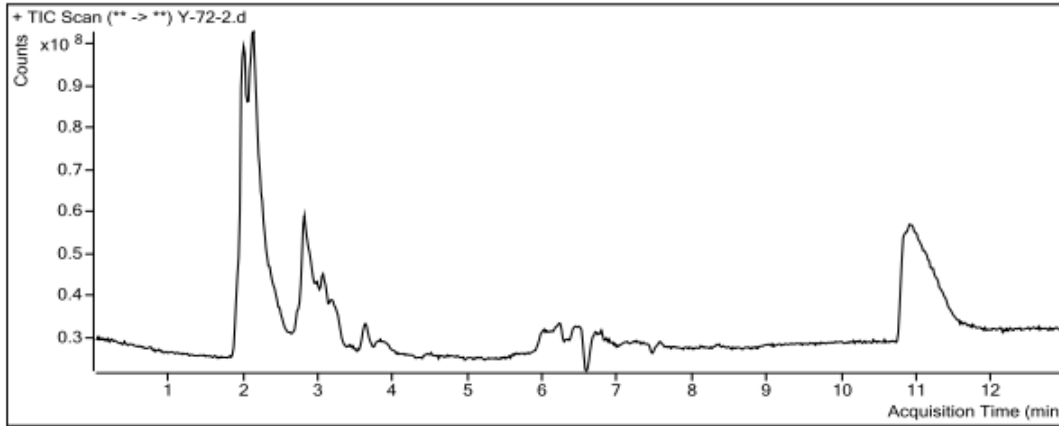
Şekil 3.104 Açlık koşullarında 60. saate ait LC/Q-TOF/MS kromatogramı ve tayin edilen amino asit konsantrasyonları



Quantitation Results

Compound	RT	Response	Conc
L-Phenylalanine	4.913	91834	0.5436
L-Tyrosine	5.062	41376	0.6367
L-Leucine	5.461	78635	0.8303
L-Isoleucine	5.461	64948	0.6825
L-Glutamic acid	6.407	56248	1.4006
L-Threonine	6.623	23834	0.8441
L-Proline	7.004	146802	0.0000
L-Alanine	7.087	13367	0.0000
L-Histidine	7.386	23567	0.0000
L-Arginine	7.403	64062	0.0000
L-Valine	7.569	9692049	42.9736

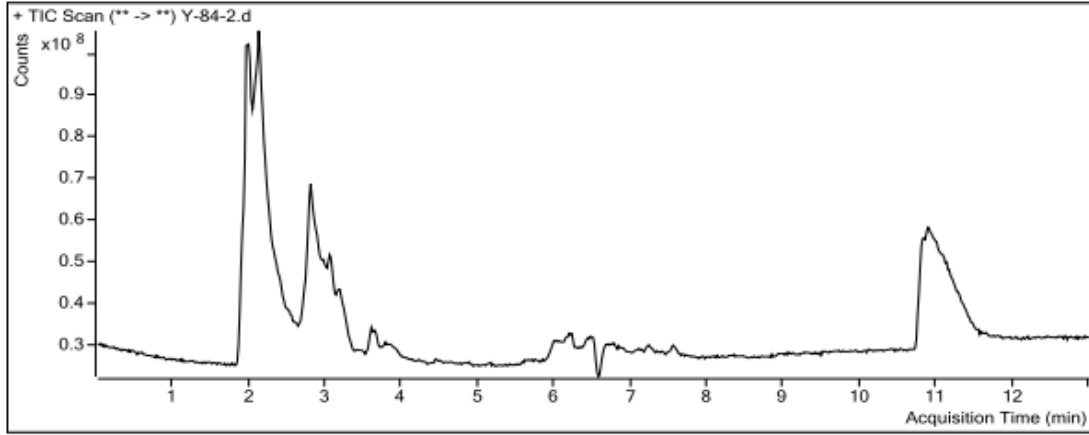
Şekil 3.105 Açlık koşullarında 66. saate ait LC/Q-TOF/MS kromatogramı ve tayin edilen amino asit konsantrasyonları



Quantitation Results

Compound	RT	Response	Conc
L-Phenylalanine	4.900	90275	0.5431
L-Tyrosine	5.066	62860	0.6466
L-Leucine	5.381	57297	0.8128
L-Isoleucine	5.713	51618	0.6733
L-Glutamic acid	6.394	58059	1.4669
L-Threonine	6.609	25666	0.8806
L-Proline	7.008	239476	0.0000
L-Histidine	7.389	41834	0.0000
L-Arginine	7.389	77877	0.0000
L-Valine	7.572	4091114	15.6582

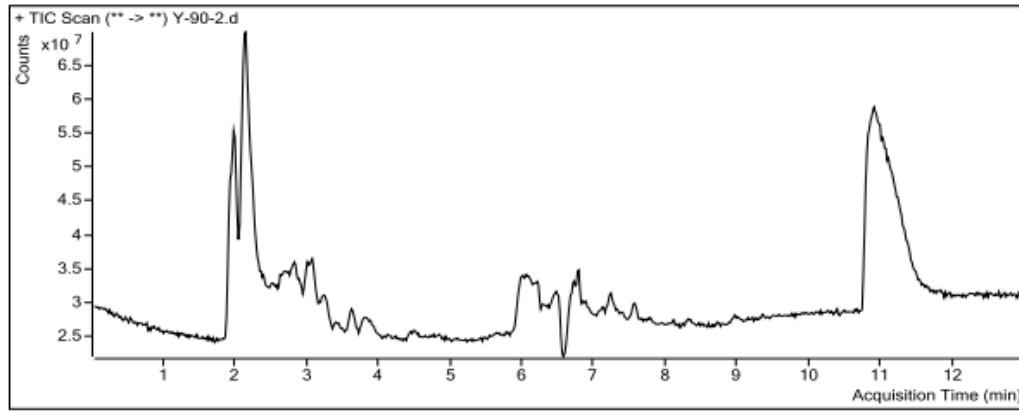
Şekil 3.106 Açlık koşullarında 72. saate ait LC/Q-TOF/MS kromatogramı ve tayin edilen amino asit konsantrasyonları



Quantitation Results

Compound	RT	Response	Conc
L-Phenylalanine	4.914	103598	0.5474
L-Tyrosine	5.097	71602	0.6506
L-Leucine	5.379	102450	0.8499
L-Isoleucine	5.694	41154	0.6661
L-Glutamic acid	6.391	59135	1.5063
L-Threonine	6.624	50743	1.3805
L-Proline	7.006	210917	0.0000
L-Arginine	7.404	79672	0.0000
L-Histidine	7.421	69260	0.0000
L-Valine	7.570	7614621	32.8421

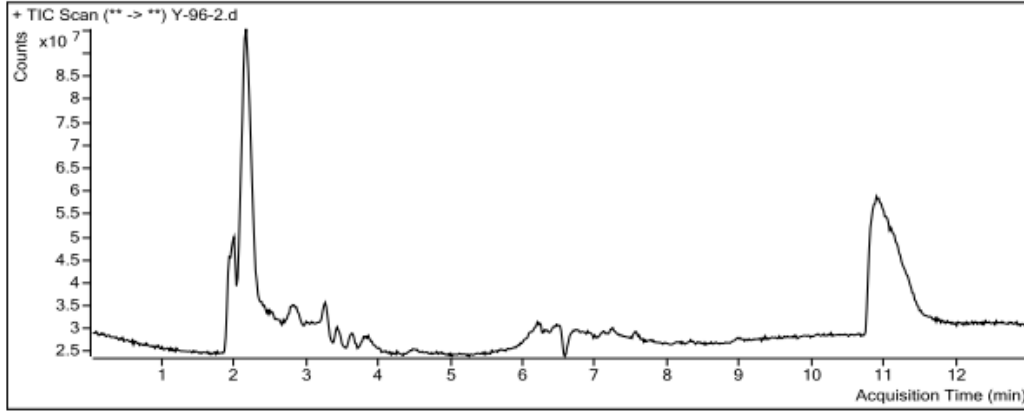
Şekil 3.107 Açlık koşullarında 84. saate ait LC/Q-TOF/MS kromatogramı ve tayin edilen amino asit konsantrasyonları



Quantitation Results

Compound	RT	Response	Conc
L-Phenylalanine	4.941	106089	0.5482
L-Tyrosine	5.024	28937	0.6309
L-Leucine	5.423	103072	0.8504
L-Isoleucine	5.688	53570	0.6746
L-Methionine	5.705	29781	0.8041
L-Glutamic acid	6.385	65596	1.7428
L-Threonine	6.618	36751	1.1016
L-Alanine	7.016	4784	0.0000
L-Proline	7.016	91634	0.0000
L-Arginine	7.381	60930	0.0000
L-Histidine	7.431	22296	0.0000
L-Valine	7.564	8101919	35.2186

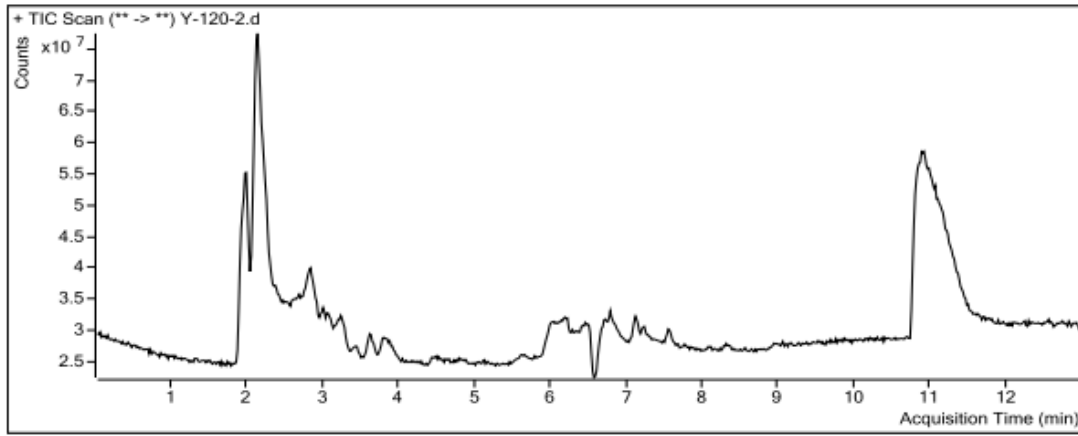
Şekil 3.108 Açlık koşullarında 90. saate ait LC/Q-TOF/MS kromatogramı ve tayin edilen amino asit konsantrasyonları



Quantitation Results

Compound	RT	Response	Conc
L-Phenylalanine	4.941	85484	0.5416
L-Tyrosine	5.058	36877	0.6346
L-Leucine	5.356	53616	0.8098
L-Isoleucine	5.356	58634	0.6781
L-Glutamic acid	6.103	12976	0.0000
L-Methionine	6.502	9362	0.7941
L-Threonine	6.601	21771	0.8030
L-Proline	7.000	99394	0.0000
L-Histidine	7.398	14042	0.0000
L-Arginine	7.398	43040	0.0000
L-Valine	7.564	5608733	23.0595

Şekil 3.109 Açlık koşullarında 96. saate ait LC/Q-TOF/MS kromatogramı ve tayin edilen amino asit konsantrasyonları



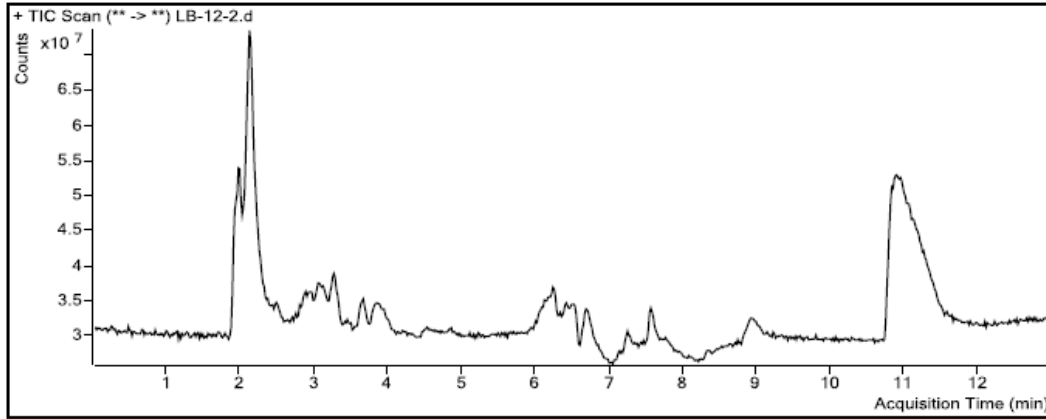
Quantitation Results

Compound	RT	Response	Conc
L-Phenylalanine	4.939	154236	0.5638
L-Tyrosine	5.088	64231	0.6472
L-Leucine	5.403	119651	0.8640
L-Isoleucine	5.403	119727	0.7202
L-Glutamic acid	6.383	44128	0.9568
L-Threonine	6.615	35336	1.0734
L-Proline	7.013	172912	0.0000
L-Alanine	7.130	12254	0.0000
L-Arginine	7.379	144127	0.0000
L-Histidine	7.412	41242	0.0000
L-Valine	7.578	8290214	36.1369

Şekil 3.110 Açlık koşullarında 120. saate ait LC/Q-TOF/MS kromatogramı ve tayin edilen amino asit konsantrasyonları

3.6.2.3 Azot sınırlamasız koşullarda (negatif kontrol) (C/N oranı düşük) hücre içi amino asitlerin LC/Q-TOF/MS ile analizi

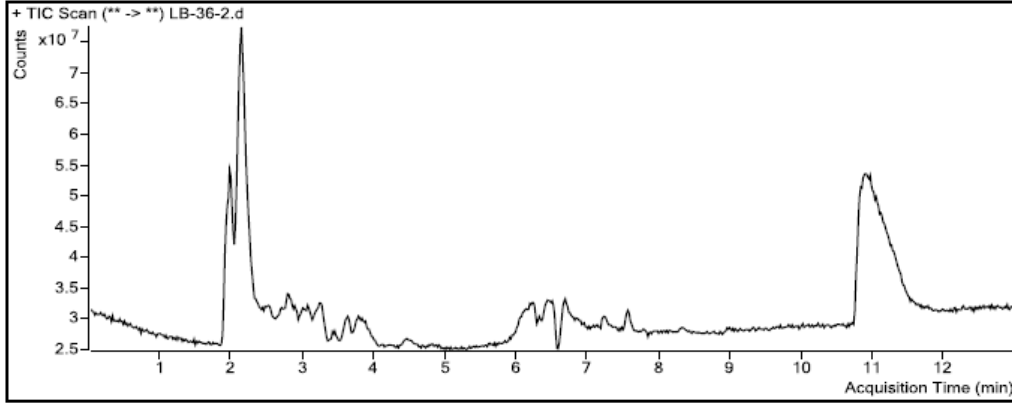
Azot sınırlamasız koşullarda (negatif kontrol) (C/N oranı düşük) hücre içi amino asitlerin kantitatif analizi Bölüm 2.15.3'te verilen protokole göre gerçekleştirildi ve Şekil 3.11 - Şekil 3.120'de verilen kromatogramlar elde edildi.



Quantitation Results

Compound	RT	Response	Conc
L-Phenylalanine	4.955	100982	0.5466
L-Tyrosine	5.104	42106	0.6370
L-Leucine	5.254	6437	0.7711
L-Isoleucine	5.768	44400	0.6683
L-Methionine	5.768	43146	0.8107
L-Threonine	6.648	24769	0.8628
L-Glutamic acid	6.930	132406	4.1887
L-Proline	7.013	132606	0.0000
L-Arginine	7.395	103070	0.0000
L-Histidine	7.412	36212	0.0000
L-Valine	7.578	16867170	77.9662

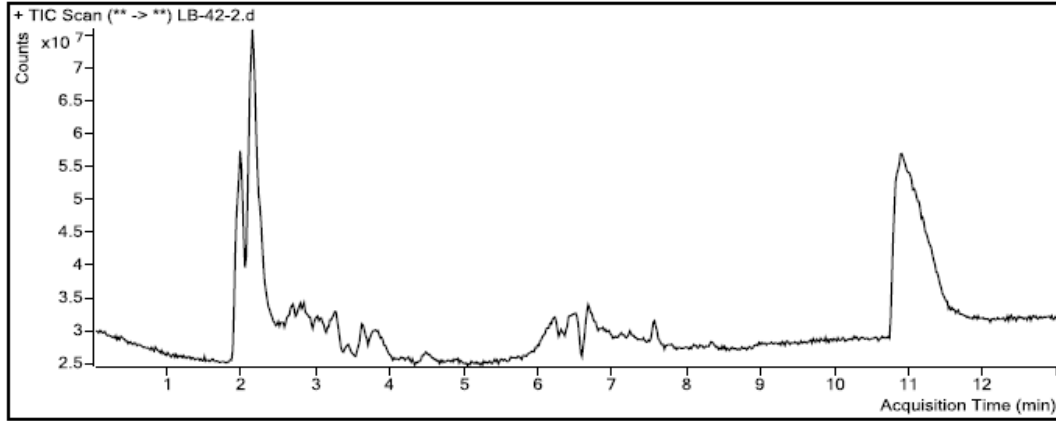
Şekil 3.111 PHA üretiminin teşvik edilmediği koşulda 12. saate ait LC/Q-TOF/MS kromatogramı ve tayin edilen aminoasit konsantrasyonları



Quantitation Results

Compound	RT	Response	Conc
L-Phenylalanine	4.918	394264	0.6413
L-Tyrosine	5.051	78133	0.6536
L-Leucine	5.433	70112	0.8233
L-Isoleucine	5.649	74649	0.6891
L-Methionine	5.698	39392	0.8088
L-Glutamic acid	6.163	41911	0.8757
L-Threonine	6.628	39823	1.1628
L-Proline	7.010	316014	0.0000
L-Arginine	7.391	63000	0.0000
L-Histidine	7.425	13177	0.0000
L-Valine	7.574	11554451	52.0564

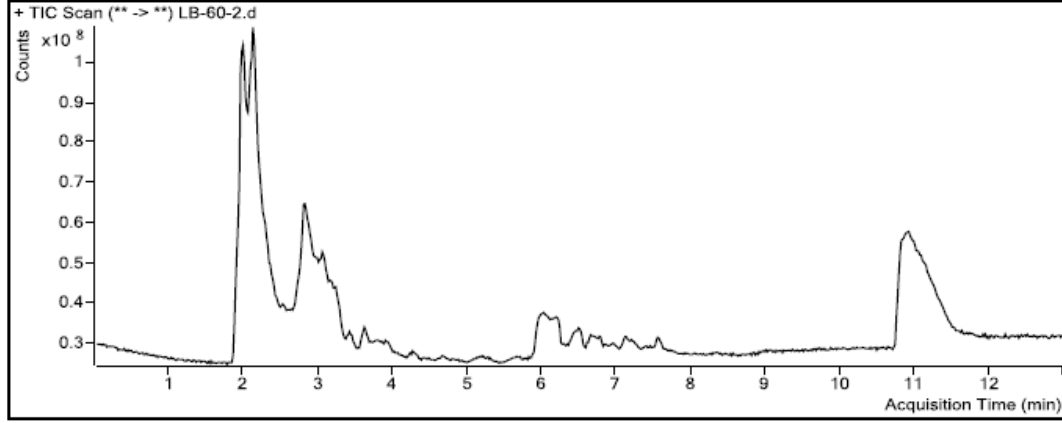
Şekil 3.112 PHA üretiminin teşvik edilmediği koşulda 36. saate ait LC/Q-TOF/MS kromatogramı ve tayin edilen aminoasit konsantrasyonları



Quantitation Results

Compound	RT	Response	Conc
L-Phenylalanine	4.919	188446	0.5748
L-Tyrosine	5.069	36397	0.6344
L-Leucine	5.417	65170	0.8193
L-Methionine	5.699	94733	0.8360
L-Isoleucine	5.716	84521	0.6959
L-Glutamic acid	6.380	16907	0.0000
L-Threonine	6.612	39218	1.1508
L-Proline	7.011	97274	0.0000
L-Arginine	7.392	52914	0.0000
L-Histidine	7.426	21982	0.0000
L-Valine	7.575	11088477	49.7839

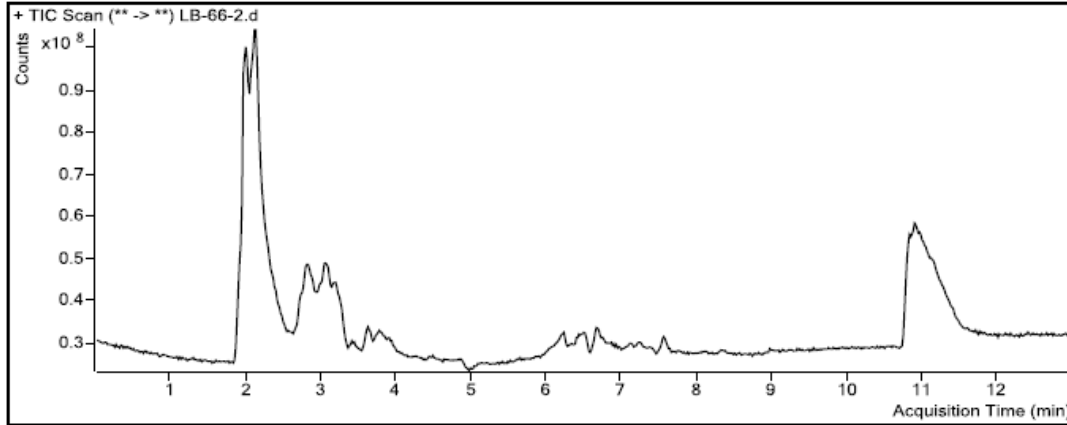
Şekil 3.113 PHA üretiminin teşvik edilmediği koşulda 42. saate ait LC/Q-TOF/MS kromatogramı ve tayin edilen aminoasit konsantrasyonları



Quantitation Results

Compound	RT	Response	Conc
L-Phenylalanine	4.911	111046	0.5498
L-Tyrosine	5.077	27338	0.6302
L-Leucine	5.425	91794	0.8411
L-Methionine	5.691	19333	0.7990
L-Isoleucine	5.707	53125	0.6743
L-Glutamic acid	5.890	187380	6.2013
L-Alanine	5.990	24527	0.0000
L-Threonine	6.620	27811	0.9234
L-Proline	7.002	146328	0.0000
L-Arginine	7.384	42612	0.0000
L-Histidine	7.400	28195	0.0000
L-Valine	7.583	11838528	53.4418

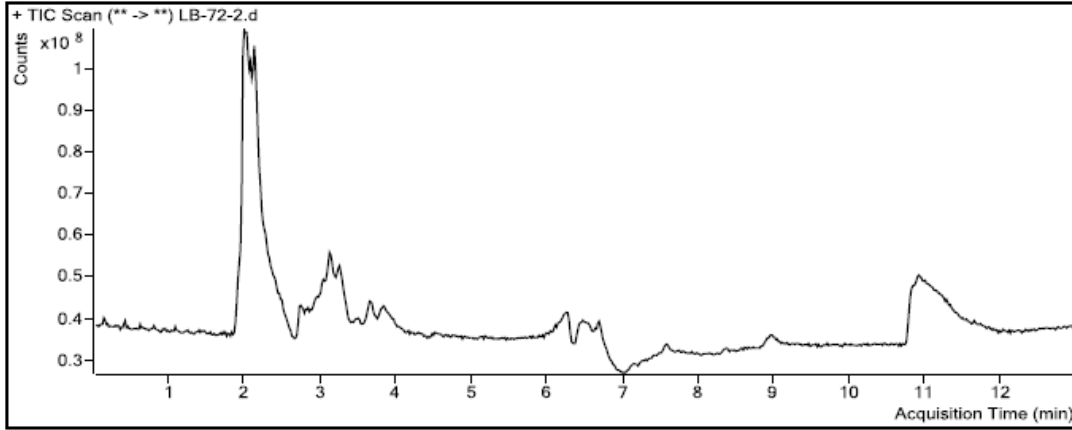
Şekil 3.114 PHA üretiminin teşvik edilmediği koşulda 60. saate ait LC/Q-TOF/MS kromatogramı ve tayin edilen aminoasit konsantrasyonları



Quantitation Results

Compound	RT	Response	Conc
L-Phenylalanine	4.933	217415	0.5842
L-Tyrosine	5.082	30732	0.6318
L-Methionine	5.696	50784	0.8144
L-Leucine	5.730	65682	0.8197
L-Isoleucine	5.730	53322	0.6745
L-Glutamic acid	5.979	4827	0.0000
L-Threonine	6.609	25267	0.8727
L-Proline	7.008	192251	0.0000
L-Histidine	7.390	30173	0.0000
L-Arginine	7.390	72980	0.0000
L-Valine	7.572	10891989	48.8256

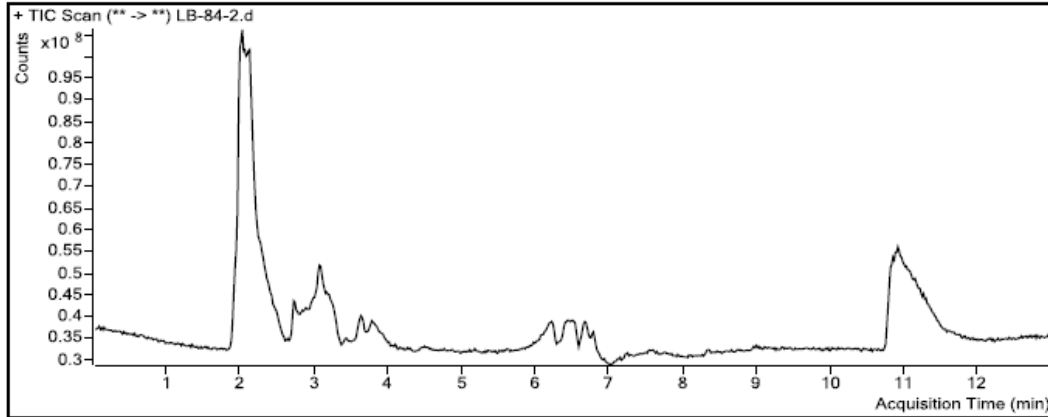
Şekil 3.115 PHA üretiminin teşvik edilmediği koşulda 66. saate ait LC/Q-TOF/MS kromatogramı ve tayin edilen aminoasit konsantrasyonları



Quantitation Results

Compound	RT	Response	Conc
L-Phenylalanine	4.990	113699	0.5507
L-Tyrosine	5.156	52827	0.6420
L-Methionine	5.737	42212	0.8102
L-Leucine	5.786	49849	0.8067
L-Isoleucine	5.786	51122	0.6730
L-Cystine	6.616	18938	0.1033
L-Threonine	6.650	20326	0.7742
L-Proline	7.031	282116	0.0000
L-Histidine	7.396	53688	0.0000
L-Arginine	7.396	29459	0.0000
L-Valine	7.596	7929393	34.3772

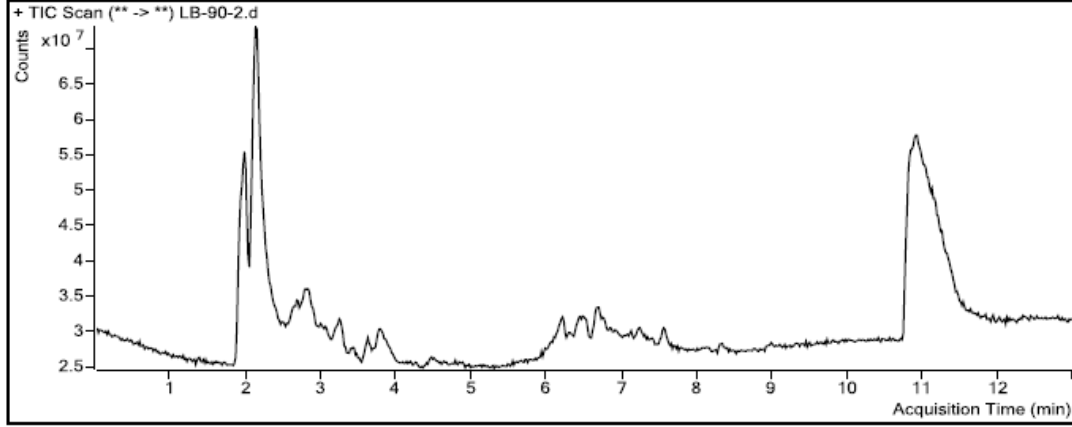
Şekil 3.116 PHA üretiminin teşvik edilmediği koşulda 72. saate ait LC/Q-TOF/MS kromatogramı ve tayin edilen aminoasit konsantrasyonları



Quantitation Results

Compound	RT	Response	Conc
L-Phenylalanine	4.918	166057	0.5676
L-Tyrosine	5.034	15261	0.6246
L-Methionine	5.682	43760	0.8110
L-Leucine	5.715	121357	0.8654
L-Isoleucine	5.715	103474	0.7090
L-Glutamic acid	5.881	214210	7.1836
L-Threonine	6.628	22608	0.8197
L-Proline	7.010	157613	0.0000
L-Histidine	7.392	21903	0.0000
L-Arginine	7.392	71971	0.0000
L-Valine	7.574	3419773	12.3841

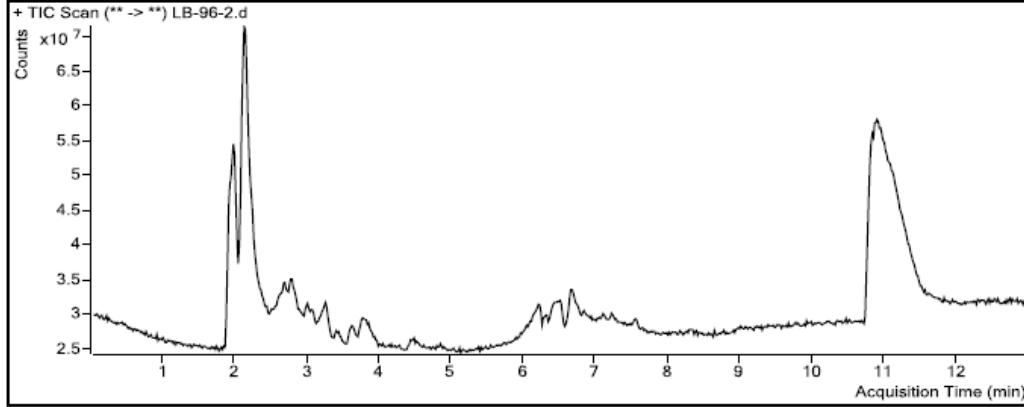
Şekil 3.117 PHA üretiminin teşvik edilmediği koşulda 84. saate ait LC/Q-TOF/MS kromatogramı ve tayin edilen aminoasit konsantrasyonları



Quantitation Results

Compound	RT	Response	Conc
L-Phenylalanine	4.930	104812	0.5478
L-Tyrosine	5.080	27167	0.6301
L-Leucine	5.428	99060	0.8471
L-Isoleucine	5.677	24685	0.6548
L-Methionine	5.694	75210	0.8264
L-Glutamic acid	6.391	27430	0.3455
L-Threonine	6.623	27296	0.9131
L-Proline	7.005	309480	0.0000
L-Histidine	7.387	15278	0.0000
L-Arginine	7.387	43056	0.0000
L-Valine	7.569	8109561	35.2559

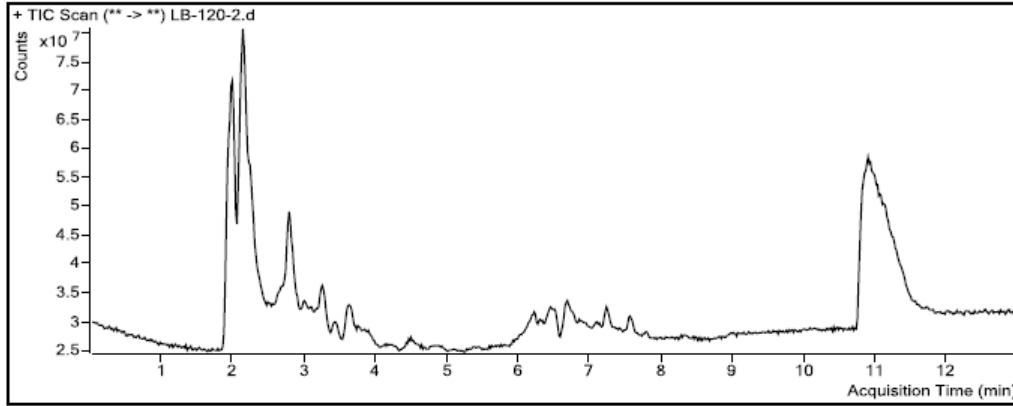
Şekil 3.118 PHA üretiminin teşvik edilmediği koşulda 90. saate ait LC/Q-TOF/MS kromatogramı ve tayin edilen aminoasit konsantrasyonları



Quantitation Results

Compound	RT	Response	Conc
L-Phenylalanine	4.913	166898	0.5679
L-Tyrosine	5.029	21520	0.6275
L-Leucine	5.676	55543	0.8114
L-Isoleucine	5.676	55168	0.6757
L-Methionine	5.676	68247	0.8230
L-Glutamic acid	6.390	55571	1.3758
L-Threonine	6.622	36226	1.0911
L-Proline	7.004	269650	0.0000
L-Alanine	7.203	23244	0.0000
L-Histidine	7.386	12490	0.0000
L-Arginine	7.419	48457	0.0000
L-Valine	7.569	4271128	16.5361

Şekil 3.119 PHA üretiminin teşvik edilmediği koşulda 96. saate ait LC/Q-TOF/MS kromatogramı ve tayin edilen aminoasit konsantrasyonları



Quantitation Results

Compound	RT	Response	Conc
L-Phenylalanine	4.934	71077	0.5369
L-Tyrosine	5.017	27574	0.6303
L-Glutamic acid	5.581	5140	0.0000
L-Leucine	5.697	58011	0.8134
L-Isoleucine	5.697	76192	0.6902
L-Methionine	5.714	36872	0.8076
L-Alanine	6.544	6228	0.0000
L-Threonine	6.610	26597	0.8992
L-Proline	7.009	200375	0.0000
L-Cystine	7.092	6526	0.0000
L-Arginine	7.390	74166	0.0000
L-Histidine	7.407	11840	0.0000
L-Valine	7.573	9583000	42.4418

Şekil 3.120 PHA üretiminin teşvik edilmediği koşulda 120. saate ait LC/Q-TOF/MS kromatogramı ve tayin edilen aminoasit konsantrasyonları

LC/Q-TOF/MS ile gerçekleştirilen amino asit analizlerinde 17 farklı L-amino asit içeren karışım standart olarak kullanılmıştır. Farklı zaman aralıklarında alınan örneklerde 17 amino asit arasından sadece 8 tanesi tayin edilebilmiş, bunların dışında kalanların konsantrasyonlarının ise tayin limitinin altında olduğu düşünülmektedir.

Çizelge 3.11'de bu amino asitlere ilişkin 12. ve 120. saatleri arasında, aşırı karbon kaynağı içeren ve azot sınırlamalı koşullarda (pozitif kontrol), karbon açlığı koşullarında (karbon kaynağı içermeyen ortamda), azot sınırlamasız koşullarda (negatif kontrol) olmak üzere 3 farklı ortamdaki konsantrasyon değişimleri verilmiştir.

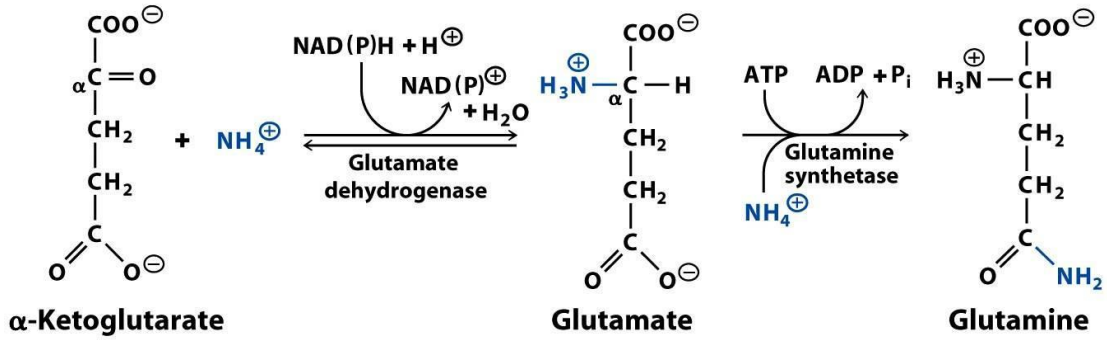
Çizelge 3.11 LC-QTOF-MS ile gerçekleştirilen amino asit analizleri verileri (M: ortam; P; hücre içi mcl-PHA üretimin teşvik edildiği , N: hücre içi mcl-PHA üretimin teşvik edilmediği, S: Açlık (yıkım) koşulları, -, analizi yapılamayan örnekleri ifade etmektedir.

M/h	12	36	42	48	60	66	72	84	90	96	120
L-Tirozin (ng/ml)											
P	0,6224	0,626	0,6276	0,6274	-	0,6594	0,6334	0,6257	0,6277	0,6306	0,6317
N	0,637	0,6536	0,6344	-	0,6302	0,6318	0,642	0,6246	0,6301	0,6275	0,6303
S	0,6361	0,6491	0,6317	0,6352	0,6403	0,6367	0,6466	0,6506	0,6309	0,6346	0,6472
L-Lösin (ng/ml)											
P	0,7713	-	-	-	-	0,852	-	0,8074	-	-	0,886
N	0,7711	0,8233	0,8193	-	0,8411	0,8197	0,8067	0,8654	0,8471	0,8114	0,8134
S	0,8138	0,9339	0,8034	0,813	0,8169	0,8303	0,8128	0,8499	0,8504	0,8098	0,864
L-İzolösin (ng/ml)											
P	0,8155	0,66	0,8307	0,7922	0,7919	0,6984	0,7721	0,6557	0,6482	0,7665	0,7277
N	0,6683	0,6891	0,6959	-	0,6743	0,6745	0,673	0,709	0,6548	0,6757	0,6902
S	0,6645	0,6743	0,6686	0,8315	0,6761	0,6825	0,6733	0,6661	0,6746	0,6781	0,7202
L-Metiyonin (ng/ml)											
P	0,7912	0,793	0,7906	-	-	-	0,793	0,7955	0,8	-	-
N	0,8107	0,8088	0,836	-	0,799	0,8144	0,8102	0,811	0,8264	0,823	0,8076
S	0,7976	0,7937	0,799	-	0,7953	-	-	-	0,8041	0,7941	-
L-Fenilalanin (ng/ml)											
P	-	0,5202	0,526	0,5217	0,526	0,5472	-	0,5252	0,5266	0,532	0,5425
N	0,5466	0,6413	0,5748	-	0,5498	0,5842	0,5507	0,5676	0,5478	0,5679	0,5369
S	0,5403	0,5583	0,5486	0,545	0,5407	0,5436	0,5431	0,5474	0,5482	0,5416	0,5638
L-Glutamik asit (ng/ml)											
P	0	0,8277	0	0	5,1604	0	2,8654	6,7715	0	0	0,1819
N	4,1887	0,8757	0	-	6,2013	0	-	7,1836	0,3455	1,3758	0
S	0	0,1094	0,215	1,9476	0,8587	1,4006	1,4669	1,5063	1,7428	0	0,9568
L-Treonin (ng/ml)											
P	1,4	0,6767	1,324	0,6683	0,6987	0,8984	0,6997	0,8136	1,0503	0,8667	0,9788
N	0,8628	1,1628	1,1508	-	0,9234	0,8727	0,7742	0,8197	0,9131	1,0911	0,8992
S	1,1068	1,0713	0,9444	1,1151	0,858	0,8441	0,8806	1,3805	1,1016	0,803	1,0734
L-Valin (ng/ml)											
P	54,5168	16,3218	30,4682	24,2367	9,6503	9,6744	27,4596	6,3565	45,7391	46,3127	58,1303
N	77,9662	52,0564	49,7839	-	53,4418	48,8256	34,3772	12,3841	35,2559	16,5361	42,4418
S	50,1313	22,7623	36,7504	18,4795	32,7685	42,9736	15,6582	32,8421	35,2186	23,0595	36,1369

Çizelge 3.11'de görüldüğü üzere tirozin, lösin, izölösin, metiyonin ve fenilalanin konsantrasyonları, aşırı karbon kaynağı içeren ve azot sınırlamalı koşulda (pozitif kontrol), karbon açlığı koşulunda (karbon kaynağı içermeyen ortamda), azot sınırlamasız koşulda (negatif kontrol) çalışılan tüm zaman dilimlerinde sırasıyla ortalama 0,6 – 0,8- 0,7 -0,8 – 0,5 ng/ml olarak saptanmıştır. Bu amino asitlerin konsantrasyonlarının hem tüm saatlerde hem de farklı 3 ortamda da kayda değer farklanmalar göstermemesi nedeniyle bu amino asitlerin PHA sentez ve yıkım metabolizmasında yer alan etkin birer ara metabolit olmadıkları düşünülmektedir.

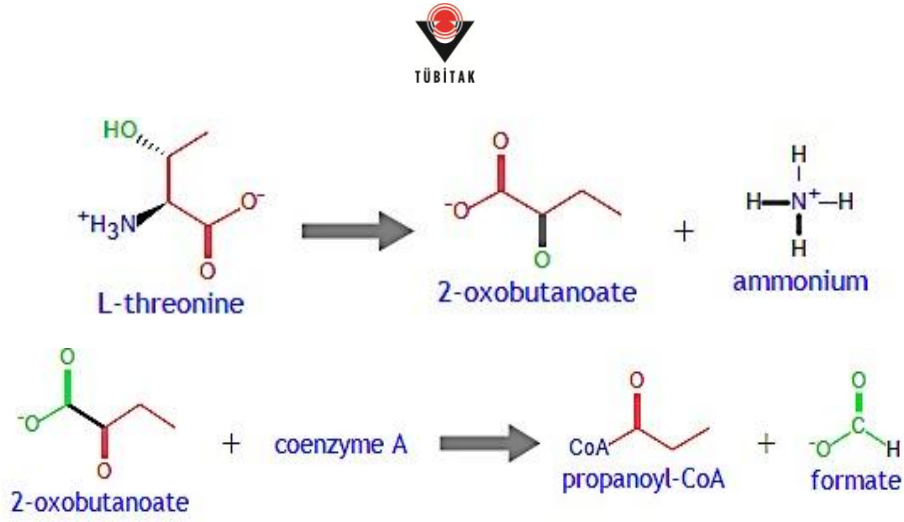
Yukarıda belirtilen aminoasitlerin aksine, tayin edilen glutamik asit, treonin ve valin amino asit konsantrasyonları farklılık göstermektedir.

Çizelge 3.11'de görüldüğü gibi aşırı karbon kaynağı içeren ve azot sınırlamalı koşulda (P), karbon açlığı koşulunda (S), azot sınırlamasız koşulda (N) glutamik asit konsantrasyonunda anlamlı bir artış veya azalış yerine dalgalanmalar gözlemlenmektedir. Glutamik asit, metabolizmada glutamat dehidrogenaz aracılığı ile TCA döngüsünün ara metaboliti olan α -ketoglutarata dönüşmektedir. Ayrıca, glutamik asit glutamin sentetaz enzimi sayesinde bir amino grubu alarak glutamine dönüşür (Şekil 3.121). Organizmada sıklıkla meydana gelen bu dönüşümler glutamik asit konsantrasyonunun belirli bir zaman dilimi arasında değişiminin saptanmasını zorlaştırmaktadır.



Şekil 3.121 Glutamik asit metabolizması (Principles of Biochemistry, 2006)

Treoninin parçalanması sonucu açığa çıkan 2-oxobütanoat serbest coenzim A ile reaksiyona girerek propiyonil CoA ve formik asit oluşturur (Şekil 3.122). Propiyonil CoA 'nın yağ asidi metabolizmasına katılması beklenirken, organik asit analizlerinde tespit edilen formik asidin bu yolağın bir ara ürünü olması muhtemeldir.

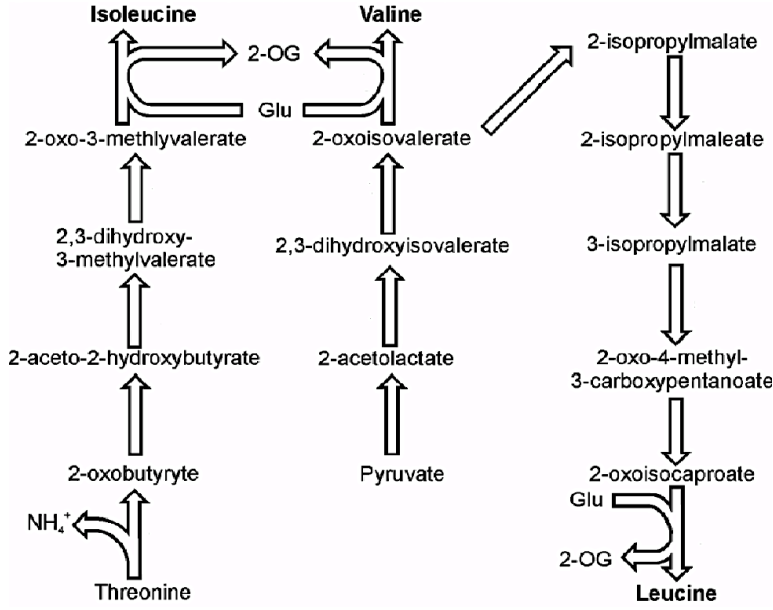


Şekil 3.122 Treonin katabolizması sonucu açığa çıkan metabolitler (MetaCyc, 2016).

Çizelge 3.11'de verilen valin konsantrasyonunun üretim ortamlarına göre değişimi incelendiğinde, diğer amino asit konsantrasyonlarına kıyasla daha yüksek olduğu görülmektedir.

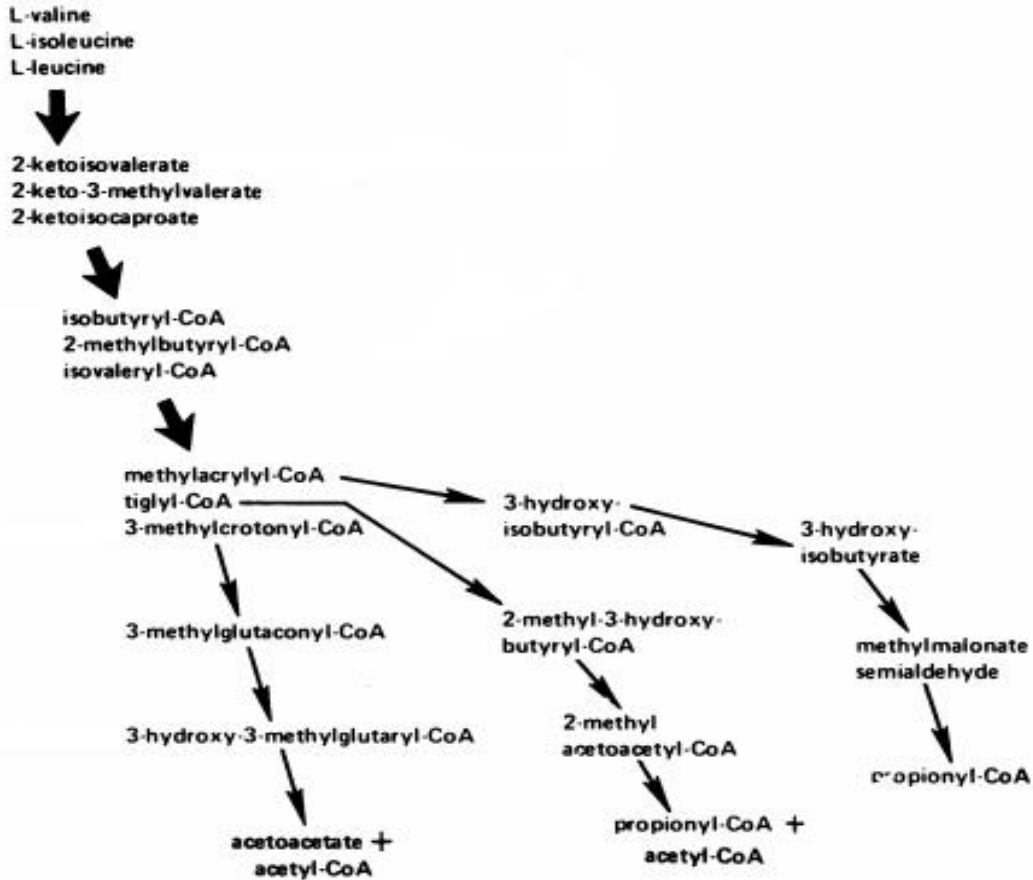
Aşırı karbon kaynağı içeren ve azot sınırlamalı koşulda (P),12. saat ile 66. saat arasında ciddi bir azalma gözlenmektedir. Bu da organizmanın lag fazda ürettiği valini metabolize ederek enerji ihtiyacını valin yıkım metabolizması (Şekil 3.123) üzerinden karşıladığı şeklinde yorumlanabilir. PHA'nın karbon kaynağı olarak kullanıldığı 66. Saatten sonra valin miktarındaki artış da PHA'nın yıkımı sonucu açığa çıkan metabolitler üzerinden valin biyosentezini arttırdığı düşünülebilir. Karbon açlığı koşulunda (karbon kaynağı içermeyen ortamda) ve azot sınırlamasız koşulda (negatif kontrol) ise valin konsantrasyonunda kayda değer farklanma görülmemektedir.

Bu proje kapsamında kullanılan *Pseudomonas aureofaciens* suşu tarafından üretilen PHA depolimeraz enzimi (NCBI erişim no:AB049413) 390 amino asitten oluşmaktadır. 390 amino asidin 19 tanesi izolösin, 18 tanesi valin ve 31 tanesi lösin olmak üzere toplamda 68 tane dallanmış amino asit rezidüsüdür. Valin biyosentezi sırasında lösin ve izolösin amino asitleri de üretilebilmektedir (Şekil 3.123). Hücrede PHA yıkımının teşvik edildiği koşullarda depolimeraz enziminin sentezinin artması buna bağlı olarak da dallanmış amino asitlerin konsantrasyonlarında özellikle de valinin konsantrasyonunda (valinden diğer dallanmış amino asitlerin sentezlenebildiği göz önünde bulundurulduğunda) azalması beklenmektedir. Depolimeraz enziminin parçalanması ile de bu dallanmış amino asitlerin konsantrasyonlarında artış gözlemlenmek olasıdır.



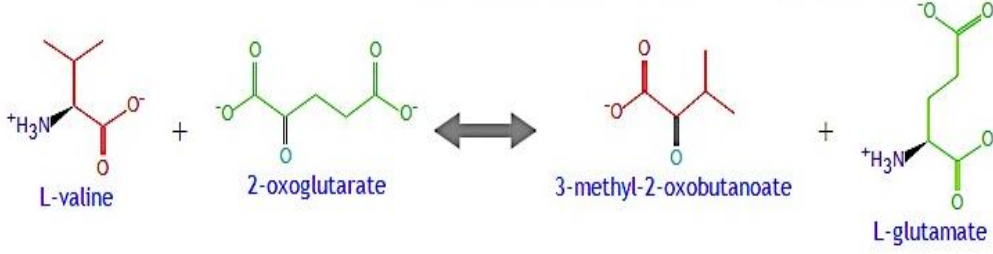
Şekil 3.123 Dallanmış amino asitlerin biyosentezi (Bromke M.A, 2013).

Bunun yanı sıra valinin katabolizması sonucunda açığa çıkabilecek propiyonil-CoA, yağ asidi metabolizmasında ve asetil-CoA enerji metabolizmasında organizma tarafından kullanılabilir (Şekil 3.124).



Şekil 3.124 L-valin'den sentezlenen olası metabolitler (Massey vd., 1976)

L-glutamat ve 3-metil-2-okzobütanoat reaksiyonu sonucunda 2-okzoglutarat ve L-valin oluşmaktadır (Şekil.3.125). L-Valin biyosentezi ve L-valin yıkımı, L-glutamat ve 2-okzoglutarat konsantrasyonlarındaki dalgalanmaların sebebi olduğu düşünülmektedir.



Şekil 3.125 L- Valin biyosentezi (MetaCyc, 2016).

3.7 Hücre İçi ve Hücre Dışı Lipaz ve Esteraz Aktivitelerinin Belirlenmesi

Mcl-PHA'ların intraselüler degradasyonu sırasında PHA depolimerazların yanı sıra lipaz ve esterazların da görev aldığı düşünülmektedir (Mukai vd., 1993; Jaeger vd., 1995) Bu amaçla PHA yıkımını teşvik edildiği koşullardaki örneklerde hücre içi ve hücre dışı lipaz ve esteraz aktivitesi tayini yapıldı. Yapılan analizler sonucu hem hücre içi hem de hücre dışı lipaz ve esteraz aktivitesine rastlanmamıştır. Bu bulgular doğrultusunda *P. aureofaciens*'de gerçekleşen hücre içi PHA yıkımında lipaz ve esteraz enzimlerinin görev almadığı düşünülmektedir.

4 SONUÇ

Proje kapsamında yapılan çalışmalardan elde edilen bulgular ışında aşağıdaki sonuçlara varılmıştır:

1. **Üretilen mcl-PHA'nın Karakterizasyonu:** Spektroskopik karakterizasyon sonucunda elde edilen veriler üretilen biyopolimerde ester bağlarının ve yan zincirde alkil grubu mevcuttur, *P. aurefaciens* tarafından üretilen biyopolimer monomer başına 8C içeren orta zincirli PHA (mcl-PHA)'dır ve 3-hidroksioktanoat monomerlerinden oluşmaktadır. DSC eğrisinin verilerine göre mcl-PHA'nın erime noktası (T_m) "42°C, cam geçiş sıcaklığı (T_g) ise "- 41°C"dir. mcl-PHA'nın kimyasal yapısının 294°C'de (T_d; termal degradasyon sıcaklığı) %96'sının tamamen bozunmaktadır. Tüm bulgular literatür verileri ile uyumludur. Saflaştırılan mcl-PHA'nın molekül ağırlığı, M_n = 160,55 kDa; M_w= 248,70 kDa ve M_z= 376, 75 kDa olarak tespit edilmiştir. Poldispersite (M_w/M_n) = 1.5 olarak hesaplanmıştır.
2. **Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullar:**
 - a. **PHA yıkım metabolitleri:** PHA üretiminin 60. saatte en yüksek değerine ulaştığı, 3HO (3-hidroksioktanoat) üretim seyri de PHA üretim seyri ile benzer olduğu görülmüştür. GC-MS spektrumlarında hekzanoik asit türevli bileşiklere rastlanmıştır fakat diğer 3-hidroksi yağ asitlerinin varlığı tespit edilememiştir. Trans-3-oktenoik asit, cis-3-oktenoik asit ve 2-oktenoik asidin Polihidroksioktanoat metabolizmasında, 3-hidroksioktanoat ve PHA sentezinde ara metabolitler oldukları düşünülmektedir. Biyosentez ve yıkım mekanizmalarında benzer adımlar üzerinde bir dizi izomerizasyon reaksiyonları ile dönüşümün gerçekleştiği var sayılmaktadır.
 - b. **Organik asitler:** Ketoglutarik asit (okzoglutarik asit), formik asit, valerik asit (pentanoik asit) ve izo bütirik asit tayin edilebilmiş, standart olarak verilen diğer organik asitler tayin aralıklarının altında kalmaları nedeni ile örneklerde tespit edilememiştir.
 - c. **Amino asitler:** Tirozin, lösin, izolösin, metiyonin ve fenilalanin konsantrasyonları için anlamlı farklanmalar saptanmamıştır. Bu nedenle, PHA sentez ve yıkım metabolizmasında yer alan etkin birer ara metabolit olmadıkları düşünülmektedir. Glutamik asit, treonin ve valin amino asit konsantrasyonları ise farklılık göstermektedir.

3. Açlık koşulları:

a. PHA yıkım metabolitleri

Yapılan analizlerin sonucunda hücre'nin PHA'yı yaşamsal faaliyetlerini sürdürebilmek için karbon kaynağı olarak kullandığı, PHA miktarı azaldıkça hücre içi 3-HO miktarının da azaldığı tespit edilmiştir. Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullardan farklı olarak hekzanal, oktanal gibi bazı aldehit türevli bileşiklerin varlığı gözlenmiştir. Metabolit analizlerinde, hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda da olduğu gibi PHA metabolizmasıyla ilişkisi olduğu düşünülen cis-3-oktenoik asit ve 2-oktenoik asit gibi metabolitler gözlenmiştir. Örneklerdeki metabolit miktarları azaldıkça dedeksiyonları da bir o kadar zorlaştığı, ayrıca izomer karakterli bileşiklerin benzer yapılarından dolayı ayrılmalarının da bir o kadar zor olduğu saptanmıştır. Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullardaki profilde olduğu gibi açlık koşullarına ait profilde de benzer bir durum söz konusudur. PHA miktarındaki değişim 3-Hidroksioktanoat miktarındaki değişime paraleldir.

b. **Organik Asitler:** Ketoglutarik asit (okzoglutarik asit), formik asit ve valerik asit (pentanoik asit) tayin edilebilmiş, standart olarak verilen diğer organik asitler tayin aralıklarının altında kalmaları nedeni ile örneklerde tespit edilememiştir.

c. **Amino Asitler:** Tirozin, lösin, izolösin, metiyonin ve fenilalanin konsantrasyonları anlamlı farklanmalar gözlenmemiştir. Bu nedenle, PHA sentez ve yıkım metabolizmasında yer alan etkin birer ara metabolit olmadıkları düşünülmektedir. Glutamik asit, treonin ve valin amino asit konsantrasyonları ise farklılık göstermektedir.

4. mcl-PHA üretiminin teşvik edilmediği koşullar:

a. **PHA yıkım metabolitleri:** Yapılan analizler sonucunda hücrenin PHA üretiminin teşvik edilmediği koşullarda da düşük seviyede PHA ürettiği fakat hücrenin bu PHA'yı kullanma yolunu tercih etmediği gözlemlendi. Gaz kromatogramları ve MS kütüphanesinden elde edilen veriler incelendiğinde PHA metabolizmasına ilişkin metabolitler gözlenmedi. PHA miktarının tayinindeki değişimler ile bu durumu doğruladı. PHA üretiminin teşvik edilmediği koşullarda PHA üretiminin ve yıkımının, PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarla benzerlik gösteren sadece iki metabolit, hekzadekanoik

asit ve bu yağ asidinin bir türevi olan 9-hekzadekanoik asit saptandı. Bu veriler ise bu iki yağ asidinin hücrenin rutin metaboliti olduğu ve PHA metabolizması ile ilişkili olmadığı sonucunu doğrulamaktadır. Oktanal ve hekzanal'in sadece PHA yıkımının teşvik edildiği koşullarda tespit edilmesi bu metabolitlerin PHA degradasyonu ile ilgili yolağın ürünleri oldukları, oktanalin sadece açlık koşullarında ve sadece 24. saatte tespit edilmesi, Polihidroksioktanoattan, 3-HO-oktanoat oluşumu ve bunun da oktanal üzerinden diğer metabolitlere dönüşümü yıkım yolağının ilk adımlarının bu saatlerde gerçekleştiği şeklinde yorumlandı. 2-oktenoik asit, cis ve trans-3-oktenoik asitler, PHA üretiminin hem teşvik edildiği hem de yıkıma yönlendirildiği koşullarda yapılan üretimler esnasında açığa çıkmakta, PHA üretiminin teşvik edilmediği ortamda rastlanılmamaktadır. Her üç koşulun metabolitlerinin karşılaştırılması sonucu karşılaşılan en bariz fark bu metabolitlerde görülmüştür. Üretimin teşvik edildiği koşullarda zamanla görülmeye başlanması ve yıkımın teşvik edildiği koşulların ileri aşamalarında görülmemesi metabolitin PHA sentez yolağı ile ilintili olduğuna işaret etmektedir. Trans-3-oktenoik asitin sadece PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda tespit edilmesi kesin olarak PHA biyosentez yolağının bir ara ürünü olduğunu göstermektedir. Test edilen her üç koşulda da palmitik asit tayin edilmiştir. Hücre doğasına ait bir metabolit olup, tespit edilen 9-hekzadekanoik asit de bu metabolik yolakla ilintilidir. Siklopropan oktanoik asit, 2-hekzil, hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 54. saatten itibaren izlenmeye başlamış ve açlık koşullarında da tespit edilmiştir. Bununla birlikte, hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edilmediği koşullarda gözlenmemiştir. Bu durum, mcl-PHA sentez ve yıkım metabolizmalarının her ikisinin de ara ürünü olabileceğini göstermektedir.

- b. **Organik asitler:** Ketoglutarik asit (okzoglutarik asit), formik asit ve valerik asit (pentanoik asit) tayin edilebilmiş, standart olarak verilen diğer organik asitler tayin aralıklarının altında kalmaları nedeni ile örneklerde tespit edilememiştir.
- c. **Amino asitler:** Tirozin, lösin, izolösin, metiyonin ve fenilalanin konsantrasyonları anlamlı farklanmalar göstermemiştir. PHA sentez ve yıkım metabolizmasında yer alan etkin birer ara metabolit olmadıkları düşünülmektedir. Glutamik asit, treonin ve valin amino asit konsantrasyonları farklılık göstermektedir.

5. **Genel Değerlendirme ve Öneriler:** PHA üretiminin teşvik edildiği, Açlık (PHA yıkımı) ve PHA yıkımının teşvik edilmediği koşullarda yapılan çalışmalardan ve GC-MS analizleri ile elde edilen veriler, PHA yıkımı ile ilgili birincil metabolitlerin farklanması ve tespiti için en önemli bilgileri vermiştir. Bu bilgiler çerçevesinde olası metabolik yollar araştırılmıştır. Organik asitlerin ve amino asitlerin taranması ile ilgili yapılan çalışmalardan elde edilen veriler ise destekleyici nitelikte olmuştur. Bununla birlikte, PHO yıkımına ilişkin daha detaylı metabolik verilere de gereksimin duyulmaktadır. Bu amaca yönelik olarak duyarlık sınırları yüksek analitik cihazların kullanımı, daha sık aralıklarla örnek alınması önerilmektedir. Bu nedenle *P. aurofaciens* intraselüler PHA depolimeraz enziminin izole edilerek karakterizasyonunun yapılması bu konudaki çalışmalara rehberlik edecektir. Lipaz ve esteraz enzimlerinin tespit edilmemesi ve belirlenen metabolitler (ör, 3-HO-oktanoat) yıkımın β - oksidasyon yanında α -oksidasyon metabolizmasını ve diğer enzimatik adımlar üzerinden gidebileceğini göstermektedir. Oktanal ve heksanal'ın sadece PHA yıkımının teşvik edildiği koşullarda tespit edilmesi bu metabolitlerin PHA degradasyonu ile ilgili yolağın ürünleri olduklarını göstermiştir. İzobütirik asitin sadece mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda tespit edilmesi izobütiratın, hücre içi mcl-PHA sentezinin bir ara metaboliti olduğunu göstermiştir. Valerik asitin yüksek konsantrasyonlarda tespit edilmesi oldukça dikkat çekicidir. Thr profili ve formik asitin tespit edilmesi ilişkilendirilebilmiştir. Valinin PHA sentezi ile ilişkili olabileceği saptanmıştır. Valin yıkım ürünlerinin de yağ asidi metabolizması ile ilişkisi bilinmektedir. PHA yıkım yolağının belirlenmesine yönelik güncel literatürler araştırıldığında mevcut çalışma ile kıyaslanabilecek yeni veri ve bilgiye rastlanmamıştır. Mevcut proje çıktılarının orijinalliğini ve güncelliğini hala koruduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle, proje kapsamında elde edilen veriler yol gösterici olup daha sonra yapılacak araştırmalara da ışık tutacaktır. Bu süreçte, proje ekibi çok önemli, akademik, teknik ve eğitsel kazanımlar elde etmiştir. Bu nedenle, proje ekibi olarak TÜBİTAK 'a desteği için bir kez daha teşekkürlerimizi sunarız.



KAYNAKLAR

Amara A.A., Salem R.S., 2007, Characterization of PHA depolymerase in phenol degrading bacteria. *Int. J. Biotechnol. Biochem.*, 3 , 69-81.

Boyandin, A.N., Prudnikova, S.V., Filipenko, M.L., Khrapov, E.A., Vasil'ev, A.D., and Volova, T.G., 2012, Biodegradation of Polyhydroxyalkanoates by Soil Microbial Communities of Different Structures and Detection of PHA Degrading Microorganisms, *Appl. Biochem. Microbiol.*, 48, 35-44.

Bren L., 2005, Metabolomics: Working toward personalized medicine. *FDA Consum*, 39, 28-33.

BRENDA, Information on EC 3.1.1.76 - poly(3-hydroxyoctanoate) depolymerase and Organism(s) *Pseudomonas fluorescens*, <http://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=3.1.1.76&Suchword=&organism%5B%5D=Pseudomonas+fluorescens>, Son Erişim Tarihi: 29.04.2016

Bromke M.A, 2013, Amino Acid Biosynthesis Pathways in Diatoms, *Metabolites*, 3, 294-311

Casado G.A., Hernandez E.J.A. and Viálchez J.L., 1998, Determination of fatty acids (C8-C22) in urban wastewater by GC-MS, *Water Research*, 32,3168- 3172.

Chanprateep, S., 2010, Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates., *Journal Of Bioscience And Bioengineering*, 110, 621-32.

Chao J., Wolfaardt G.M., and Arts M.T., 2010, Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* fatty acid profiles in biofilms and batch planktonic cultures, *Can. J. Microbiol.*, 56, 1028–1039.

Chen G-Q., 2010, *Plastics from bacteria: Natural functions and applications*, Springer, chapter: Industrial production of PHA.

Choi, Jong-il, Sang YUP Lee, and Kyuboem Han., 1998, Cloning of the *Citricoccus latus* polyhydroxyalkanoate biosynthesis genes and use of these genes for enhanced production of poly (3-hydroxybutyrate) in *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*, 64, 4897-4903.

ÇAKMAKLI ERDEN Emre, 2015, *Pseudomonas* sp.'den Karıştırmalı Tank Reaktöründe Polihidroksialkanoatların Üretim Optimizasyonu, Kinetik Modellendirilmesi, İzolasyonu, Karakterizasyonu ve Biyomateryal Olarak Kullanım Olanaklarının Araştırılması, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı.

Domb A. J., Kost J. and Wiseman D.M., 1998, Handbook of Biodegradable Polymers, CRC Press, 544.

Escapa I.F., Garcia J.L., Bühler B., Blank L.M., Prieto M.A., 2012, The polyhydroxyalkanoate metabolism controls carbon and energy spillage in *Pseudomonas putida*, Environmental Microbiology, 14, 1049-1063.

Fukui T., Chou K., Harada K., Orita I., Nakayama Y., Bamba T., Nakamura S. and Fukusaki E., 2014, Metabolite profiles of polyhydroxyalkanoate producing *Ralstonia eutropha* H16, Metabolomics, 10, 190-202.

García G.Y., Nungaray J., Córdova J., Reynoso O.,G., Koller M., Atlic A., Braunegg G., 2008, Biosynthesis and characterization of polyhydroxyalkanoates in the polysaccharide-degrading marine bacterium *Saccharophagus degradans* ATCC 43961, J Ind Microbiol Biotechnol, 35, 629-63.

German JB, Hammock BD, Watkins SM., 2005, Metabolomics: Building on a century of biochemistry to guide human health. Metabolomics, 1, 3-9.

Imperial College, Plasticity, Module 2: Plastic Fantastic, http://2013.igem.org/Team:Imperial_College/BioPlastic_Recycling:_PHB, Son Erişim Tarihi: 29.04.2016

HMDB, Formic Acid, <http://www.hmdb.ca/metabolites/hmdb00142>, Son Erişim Tarihi: 29.04.2016

Hoffmann M., Keys C. E., Song K.Y., , Brown E. W., S. Fry F. S., Whittaker P., 2008, Evaluation of multiple strains of *Enterobacter sakazakii* using fatty acid profiles, Food Chemistry, 107, 1623–1628.

Jaeger K.E., Steinbüchel A., Jendrossek D., 1995, Substrate specificities of bacterial polyhydroxyalkanoate depolymerases and lipase: bacterial lipases hydrolyze poly(β -hydroxyalkanoates), Appl. Environ. Microbiol., 61, 3113-3118.



Jendrossek D., Handrick R. , 2002, Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates, *Annu. Rev. Microbial.*, 56, 403-432.

Keshavarz T., and Roy I., 2010, Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda, *Current Opinion in Microbiology*, 13, 1–6.

Khanna, S., and Srivastava, A. K., 2005, Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates, *Process Biochem.*, 40, 607-619.

Kim Y. D., Kim H. C., Kim S. Y., 2005, Rhee Y.H., Molecular Characterization of Extracellular Medium-chain-length Poly(3-hydroxyalkanoate) Depolymerase Genes from *Pseudomonas alcaligenes* Strains, *The Journal of Microbiology*, 43, 285-294.

Lee S. Y., 1996, Bacterial Polyhydroxyalkanoates, *Biotechnology and Bioengineering*, 49, 1-14.

Lee S. Y., and Choi J., 1999, Production and degradation of polyhydroxyalkanoates in waste environment, *Waste Management*, 19, 133 -139.

Li, R., Zhang, H. X., and Qi, Q. S., 2007, The production of polyhydroxyalkanoates in recombinant *Escherichia coli*, *Bioresource Technol.*, 98, 2313-2320.

Loo, C., and Sudesh, K., 2007, Polyhydroxyalkanoates : Bio-based microbial plastics and their properties, *Polymer Journal*, 2, 31-57.

Madison, L. L. and Huisman, G. W., 1999, Metabolic Engineering of Poly 3-Hydroxyalkanoates : From DNA to Plastic, *Microbiology and molecular biology reviews*, 63, 21-53.

Massey, L. K., Sokatch, J. R, and Conrad, R. S., 1976, Branched-Chain Amino Acid Catabolism in Bacteria, *Bacteriological Reviews*, 40(1), 42-54.

Mergaert, J., and Swings, J., 1996, Biodiversity of microorganisms that degrade bacterial and synthetic polymers, *J. Ind. Microbiol.*, 17, 463-469.

MetaCyc, <http://metacyc.org/>, Son Erişim Tarihi: 29.04.2016

Mukai, K., Doi, Y., Sema, Y., and Tomita, K., 1993, Substrate specificities in hydrolysis of polyhydroxyalkanoates by microbial esterases. *Biotechnol Lett* 15, 601-604.



Ojumu, T.V., Yu, J., and Solomon, B.O., 2004, Production of polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer, *African Journal of Biotechnology*, 3, 18-24.

Papageorgiou A.C, Hermawan S., Singh C.B. and Jendrossek D., 2008, Structural Basis of Poly(3-Hydroxybutyrate) Hydrolysis by PhaZ7 Depolymerase from *Paucimonas lemoignei*, *J. Mol. Biol.*, 382, 1184–1194.

Philip, S., Keshavarz, T. and Roy, I., 2007, Polyhydroxyalkanoates : biodegradable polymers with a range of applications, *Chemical Technology*, 247, 233-247.

Principles of Biochemistry, 2006, 4/e Figure 17-4, Pearson Prentice Hall Inc

Purwadi, R., 2006, Fermentation production of poly 3-hydroxyalkanoats, Manuscript.

Ramos J.L., Filloux A., 2007, *Pseudomonas* Volume 5: A Model System in Biology, Springer

Strazzullo, G., Gambacorta, A., Monica, F., Immirzi, B., Romano, I., Calandrelli, V. and Nicolaus, B., 2008, Chemical-physical characterization of polyhydroxyalkanoates recovered by means of a simplified method from cultures of *Halomonas campaniensis*, *Applied Microbiology*, 1513-1519.

Suriyamongkol, P., Weselake, R., Narine, S., Moloney, M. and Shah, S., 2007, Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants - a review., *Biotechnology Advances*, 25, 148-75.

Tishkov V.I and Popov V.O., 2004 , Catalytic Mechanism and Application of Formate Dehydrogenase *Biochemistry*, 69, 1252-1267

Yılmaz M., ve Beyatlı Y., 2003, Biyoplastik: Poli- β -Hidroksibütirat (PHB), *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 1, 1-33.

ÖNSÖZ

Bu proje kapsamında, *Pseudomonas aureofaciens*'de mcl-PHA'ların hücre içi yıkım metabolitlerinin profillenmesi amacı ile C/N oranları değiştirilerek organizmada önce PHA biyosentez ve ardından yıkım yolları teşvik edilmiş, yıkım sürecinde oluşan ara ürünler kromatografik ve spektroskopik yöntemlerle belirlenmiş ve tespit edilen ara ürünlerden yola çıkılarak olası mcl-PHA yıkım yolu belirlenmeye çalışılmıştır.

Projenin gerçekleştirilmesi için maddi destek sağlayan TÜBİTAK Kimya ve Biyoloji Araştırma Destek Grubu'na teşekkürlerimizi borç biliriz.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖNSÖZ.....	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xv
ÖZET.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Polihidroksialkanoatlar.....	1
1.2 Polihidroksialkanoatların Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	3
1.3 Polihidroksialkanoatların Kullanım Alanları.....	3
1.4 Polihidroksialkanoatların Biyosentezi.....	4
1.5 Polihidroksialkanoatların Degradasyonu.....	5
1.5.1 Ekstraselüler PHA Degradasyonu.....	5
1.5.2 İntraselüler PHA Degradasyonu.....	7
1.5.3 PHA depolimerazlar (EC 3.1.1.75, EC 3.1.1.76).....	8
1.6 Metabolit Profilleme.....	10
2. MATERYAL ve YÖNTEM.....	11
2.1 Mikroorganizmalar.....	11
2.2 Kimyasallar ve Çözeltiler.....	11
2.3 Cihazlar.....	12
2.4 Çalkalamalı kültürlerde mcl-PHA üretimi.....	12
2.5 Çalkalamalı kültürlerde mcl-PHA yıkımının (degradasyon) teşviki.....	13
2.6 Çalkalamalı kültürlerde mcl-PHA üretiminin teşvik edilmediği koşulun Oluşturulması.....	13
2.7 mcl-PHA'ların Kalitatif Tayini.....	14

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.8 Kuru Kütle Tayini.....	14
2.9 mcl-PHA'ların Kantitatif Tayini.....	14
2.10 GC-MS ile karbon kaynağı (Oktanoat) konsantrasyonunun tayini.....	15
2.11 Berthelot yöntemi ile azot tayini.....	16
2.12 Üretilen mcl-PHA'nın izolasyonu ve karakterizasyonu.....	17
2.12.1 mcl-PHA'nın saflaştırılması.....	17
2.12.2 Spektroskopik analizler (FTIR, ¹³ C-NMR ve ¹ H-NMR).....	18
2.12.3 mcl-PHA'nın termal özelliklerinin belirlenmesi.....	18
2.12.4 mcl-PHA'nın molekül ağırlığının belirlenmesi.....	18
2.13 Hücre içi yağ asidi türevli metabolitlerin ekstraksiyonu ve GC-MS ile analizi.....	18
2.13.1 Hücre içi yağ asidi türevli metabolitlerin ekstraksiyonu ve türevlendirilmesi.....	19
2.13.2 Hücre içi yağ asidi türevli metabolitlerin GC-MS ile analizi.....	19
2.14 Hücre içi organik asitlerin ekstraksiyonu ve HPLC ile analizi.....	21
2.14.1 Hücre İçi Metabolitlerin Ekstraksiyonu.....	22
2.14.2 Hücre İçi Organik Asitlerin HPLC ile Analizi.....	22
2.15 Hücre içi amino asitlerin ekstraksiyonu, HPLC ve LC-QTOF-MS ile analizi.....	23
2.15.1 Hücre içi amino asitlerin ekstraksiyonu.....	23
2.15.2 Hücre içi amino asitlerin HPLC ile analizi.....	24
2.15.3 Hücre içi amino asitlerin LC-QTOF-MS ile analizi.....	25
2.16 Hücre İçi ve Hücre Dışı Lipaz ve Esteraz Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	26

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3 BULGULAR ve TARTIŞMA.....	28
3.1 <i>P. aureofaciens</i> 'ten çalkalamalı kültürlerde mcl-PHA üretimi.....	28
3.2 mcl-PHA'ların Kalitatif Tayini.....	29
3.3 Üretilen mcl-PHA'nın izolasyonu ve karakterizasyonu.....	30
3.3.1 Spektroskopik analizler (FTIR, ¹³ C-NMR ve ¹ H-NMR).....	30
3.3.2 mcl-PHA'nın termal özellikleri.....	32
3.3.3 mcl-PHA'nın molekül ağırlığı.....	33
3.4 Hücre içi Metabolitlerin GC-MS ile Analizi.....	35
3.4.1 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda gerçekleştirilen metabolit analizleri.....	35
3.4.2 Açlık koşullarında <i>P. aureofaciens</i> 'de mcl-PHA'nın yıkım profilinin oluşturulması.....	40
3.4.3 Çalkalamalı kültürlerde mcl-PHA üretiminin teşvik edilmediği koşulun oluşturulması.....	47
3.5 Hücre İçi Organik Asitlerin HPLC ile Analizi.....	58
3.5.1 Aşırı karbon kaynağı içeren ve azot sınırlamalı koşullarda (pozitif kontrol) (C/N oranı yüksek) hücre içi organik asitlerin HPLC ile analizi.....	58
3.5.2 Karbon açlığı koşullarında (karbon kaynağı içermeyen ortamda) hücre içi organik asitlerin HPLC ile analizi.....	65
3.5.3 Azot sınırlamasız koşullarda (negatif kontrol) (C/N oranı düşük) hücre içi organik asitlerin HPLC ile analizi.....	71
3.6 Hücre İçi Amino Asitlerin Analizi.....	82

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.6.1 Hücre İçi Amino Asitlerin HPLC ile Analizi.....	82
3.6.2 Hücre İçi Amino Asitlerin LC/Q-TOF /MS ile Analizi.....	83
3.6.2.1 Aşırı karbon kaynağı içeren ve azot sınırlamalı koşullarda (pozitif kontrol) (C/N oranı yüksek) hücre içi amino asitlerin LC/Q-TOF /MS ile analizi.....	83
3.6.2.2 Karbon açlığı koşullarında (karbon kaynağı içermeyen ortamda) hücre içi amino asitlerin LC/Q-TOF/MS ile analizi.....	89
3.6.2.3 Azot sınırlamasız koşullarda (negatif kontrol) (C/N oranı düşük) hücre içi amino asitlerin LC/Q-TOF/MS ile analizi.....	95
3.7 Hücre İçi ve Hücre Dışı Lipaz ve Esteraz Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	105
4 SONUÇ.....	106
Kaynaklar.....	110

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Wautersia eutropha H16 suşuna ait PHA granullerinin Transmission Elektron Mikroskobu (TEM) ve faz kontrast mikroskobu görüntüleri.....	2
1.2 Polihidroksialkanoatların genel yapısı.....	2
1.3 Pseudomonad'larda PHA biyosentezinde yer alan metabolik yollar.....	4
1.4 PHA'nın doğal ve denatüre haldeki fiziksel durumu.....	5
1.5 (A) Aerobik arıtma çamurunda P(3HB-3HV) 'nin biyobozunumu. (B) Karbon kaynağı ve enerji kaynağı olarak poli(3HB) kullanılan ortamda poli(HASCL)-degrade eden bakterinin büyümesi.....	6
1.6 3HA'ların Asetil-CoA' ya parçalanması.....	7
1.7 <i>Ralstonia eutropha</i> ' da PHB' in biyosentezi ve yıkımı.....	8
2.1 Krotonik Asit Standart Grafiği.....	15
2.2 Oktanoik asit metil ester standart grafiği.....	16
2.3 NH ₄ Cl Standart Grafiği.....	17
2.4 Metil 3-Hidroksidodekanoat Standart Grafiği.....	20
2.5 Metil 3-Hidroksiheksanoat Standart Grafiği.....	20
2.6 Metil 3-Hidroksioktanoat Standart Grafiği.....	21
2.7 Metil 3-Hidroksitetradekanoat Standart Grafiği.....	21
2.8 Sitrik asit, süksinik asit, izovalerik asit, ketoglutarik asit, bütirik asit, malik asit, propiyonik asit, izobütirik asit, formik asit, valerik asit standartlarına ait kromatogram.....	23
2.9 p-nitrofenol standart grafiği.....	27
3.1 mcl-PHA üretim profili.....	28
3.2 Üretim ortamından farklı zaman aralıklarında alınan örneklerde PHA'ın kalitatif tayini.....	29

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.3 <i>P. aureofaciens</i> tarafından üretilen mcl-PHA'a ait FT-IR spektrumu.....	30
3.4 <i>P. aureofaciens</i> tarafından üretilen mcl-PHA'a ait ¹³ C-NMR spektrumu.....	31
3.5 <i>P. aureofaciens</i> tarafından üretilen mcl-PHA'a ait ¹ H-NMR spektrumu.....	32
3.6 <i>Pseudomonas aureofaciens</i> tarafından üretilen mcl-PHA'nın DSC eğrisi.....	32
3.7 <i>P. aureofaciens</i> tarafından üretilen mcl-PHA'nın TGA termogramı.....	33
3.8 GPC polistiren standart grafiği.....	34
3.9 <i>P. aureofaciens</i> tarafından üretilen mcl-PHA'nın GPC ile analizi sonucu elde edilen elüsyon kromatogramı.....	34
3.10 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda PHA ve 3-hidroksioktanoat miktarının değişimi.....	35
3.11 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 0. saate ait gaz kromatogramı.....	36
3.12 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 12. saate ait gaz kromatogramı.....	36
3.13 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 18. saate ait gaz kromatogramı.....	36
3.14 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 24. saate ait gaz kromatogramı.....	37
3.15 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 36. saate ait gaz kromatogramı.....	37
3.16 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 48. saate ait gaz kromatogramı.....	37
3.17 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 54. saate ait gaz kromatogramı.....	38
3.18 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 60. saate ait gaz kromatogramı.....	38

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.19 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 72. saate ait gaz kromatogramı.....	38
3.20 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 96. saate ait gaz kromatogramı.....	38
3.21 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 120. saate ait gaz kromatogramı.....	39
3.22 mcl-PHA yıkım profili (açlık koşullarında).....	41
3.23 Açlık koşullarına ait PHA ve 3-Hidroksioktanoat miktarının değişimi.....	42
3.24 Açlık koşullarına ait 0. saat gaz kromatogramı.....	42
3.25 Açlık koşullarına ait 6. saat gaz kromatogramı.....	43
3.26 Açlık koşullarına ait 12. saat gaz kromatogramı.....	43
3.27 Açlık koşullarına ait 24. saat gaz kromatogramı.....	43
3.28 Açlık koşullarına ait 48. saat gaz kromatogramı.....	44
3.29 Açlık koşullarına ait 60. saat gaz kromatogramı.....	44
3.30 Açlık koşullarına ait 72. saat gaz kromatogramı.....	44
3.31 Açlık koşullarına ait 96. saat gaz kromatogramı.....	44
3.32 Açlık koşullarına ait 120. saat gaz kromatogramı.....	45
3.33 PHA üretiminin teşvik edilmediği koşullardaki mcl-PHA yıkım profili.....	47
3.34 PHA üretiminin teşvik edilmediği koşula ait 0. saat gaz kromatogramı.....	48
3.35 PHA üretiminin teşvik edilmediği koşula ait 24. saat gaz kromatogramı.....	48
3.36 PHA üretiminin teşvik edilmediği koşula ait 54. saat gaz kromatogramı.....	48
3.37 PHA üretiminin teşvik edilmediği koşula ait 60. saat gaz kromatogramı.....	49
3.38 PHA üretiminin teşvik edilmediği koşula ait 72. saat gaz kromatogramı.....	49
3.39 PHA üretiminin teşvik edilmediği koşula ait 96. saat gaz kromatogramı.....	49
3.40 PHA üretiminin teşvik edilmediği koşula ait 120. saat gaz kromatogramı.....	50

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.41 Piruvatın hekzanale fermentasyonu.....	53
3.42 8-amino-7-okzonanoat biyosentezi.....	54
3.43 Linoleattan traumatın ve (Z)-3-hekzen-1-yl asetat biyosentezi.....	54
3.44 Oktan oksidasyonu	55
3.45 Palmitat biyosentezi.....	57
3.46 Palmitoleat (9-hekzanoik asit) sentezi.....	57
3.47 Siklopropan yağ asitleri sentezi.....	58
3.48 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 12. saate ait HPLC kromatogramı.....	59
3.49 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 36. saate ait HPLC kromatogramı.....	59
3.50 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 42. saate ait HPLC kromatogramı.....	60
3.51 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 48. saate ait HPLC kromatogramı.....	60
3.52 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 60. saate ait HPLC kromatogramı.....	61
3.53 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 66. saate ait HPLC kromatogramı.....	61
3.54 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 72. saate ait HPLC kromatogramı.....	62
3.55 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 84. saate ait HPLC kromatogramı.....	62
3.56 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 90. saate ait HPLC kromatogramı.....	63
3.57 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 96. saate ait HPLC kromatogramı.....	63
3.58 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 120. saate ait HPLC kromatogramı.....	64

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.59 Açlık koşullarında 12. saate ait HPLC kromatogramı.....	65
3.60 Açlık koşullarında 36. saate ait HPLC kromatogramı.....	65
3.61 Açlık koşullarında 42. saate ait HPLC kromatogramı.....	66
3.62 Açlık koşullarında 48. saate ait HPLC kromatogramı.....	66
3.63 Açlık koşullarında 60. saate ait HPLC kromatogramı.....	67
3.64 Açlık koşullarında 66. saate ait HPLC kromatogramı.....	67
3.65 Açlık koşullarında 72. saate ait HPLC kromatogramı.....	68
3.66 Açlık koşullarında 84. saate ait HPLC kromatogramı.....	68
3.67 Açlık koşullarında 90. saate ait HPLC kromatogramı.....	69
3.68 Açlık koşullarında 96. saate ait HPLC kromatogramı.....	69
3.69 Açlık koşullarında 120. saate ait HPLC kromatogramı.....	70
3.70 PHA üretiminin teşvik edilmediği koşullarda 12. saate ait HPLC kromatogramı.....	71
3.71 PHA üretiminin teşvik edilmediği koşullarda 36. saate ait HPLC kromatogramı.....	71
3.72 PHA üretiminin teşvik edilmediği koşullarda 42. saate ait HPLC kromatogramı.....	72
3.73 PHA üretiminin teşvik edilmediği koşullarda 60. saate ait HPLC kromatogramı.....	72
3.74 PHA üretiminin teşvik edilmediği koşullarda 66. saate ait HPLC kromatogramı.....	73
3.75 PHA üretiminin teşvik edilmediği koşullarda 72. saate ait HPLC kromatogramı.....	73
3.76 PHA üretiminin teşvik edilmediği koşullarda 84. saate ait HPLC kromatogramı.....	74
3.77 PHA üretiminin teşvik edilmediği koşullarda 90. saate ait HPLC kromatogramı.....	74
3.78 PHA üretiminin teşvik edilmediği koşullarda 96. saate ait HPLC kromatogramı.....	75
3.79 PHA üretiminin teşvik edilmediği koşullarda 120. saate ait HPLC kromatogramı.....	75
3.80 Farklı üretim koşullarında HPLC ile tayin edilen organik asitlerin zamanla değişim profili.....	76

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.81 α -ketoglutaratın süksinil-CoA'ya dekarboksilasyonu.....	78
3.82 Yağ asidi β -oksidasyonu ile format üretim yolağı.....	79
3.83 Triaçilgliserol yıkımı.....	80
3.84 Açıl-CoA hidrolizi ile doymuş yağ asiti üretimi.....	81
3.85 İzobütirik asit sentezi.....	81
3.86 mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda izobütirat konsantrasyonunun zamanla değişimi.....	81
3.87 Amino asit standartlarının HPLC kromatogramı.....	82
3.88 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 36. saate ait HPLC kromatogramı.....	82
3.89 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 12. saate ait LC/Q-TOF/MS kromatogramı ve tayin edilen amino asit konsantrasyonları.....	83
3.90 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 36. saate ait LC/Q-TOF/MS kromatogramı ve tayin edilen amino asit konsantrasyonları.....	84
3.91 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 42. saate ait LC/Q-TOF/MS kromatogramı ve tayin edilen amino asit konsantrasyonları.....	84
3.92 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 48. saate ait LC/Q-TOF/MS kromatogramı ve tayin edilen amino asit konsantrasyonları.....	85
3.93 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 60. saate ait LC/Q-TOF/MS kromatogramı ve tayin edilen amino asit konsantrasyonları.....	85
3.94 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 66. saate ait LC/Q-TOF/MS kromatogramı ve tayin edilen amino asit konsantrasyonları.....	86
3.95 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 72. saate ait LC/Q-TOF/MS kromatogramı ve tayin edilen amino asit konsantrasyonları.....	86
3.96 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 84. saate ait LC/Q-TOF/MS kromatogramı ve tayin edilen amino asit konsantrasyonları.....	87

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.97 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 90. saate ait LC/Q-TOF/MS kromatogramı ve tayin edilen amino asit konsantrasyonları.....	87
3.98 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 96. saate ait LC/Q-TOF/MS kromatogramı ve tayin edilen amino asit konsantrasyonları.....	88
3.99 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 120. saate ait LC/Q-TOF/MS kromatogramı ve tayin edilen amino asit konsantrasyonları.....	89
3.100 Açlık koşullarında 12. saate ait LC/Q-TOF/MS kromatogramı ve tayin edilen amino asit konsantrasyonları.....	89
3.101 Açlık koşullarında 36. saate ait LC/Q-TOF/MS kromatogramı ve tayin edilen amino asit konsantrasyonları.....	90
3.102 Açlık koşullarında 42. saate ait LC/Q-TOF/MS kromatogramı ve tayin edilen amino asit konsantrasyonları.....	90
3.103 Açlık koşullarında 48. saate ait LC/Q-TOF/MS kromatogramı ve tayin edilen amino asit konsantrasyonları.....	91
3.104 Açlık koşullarında 60. saate ait LC/Q-TOF/MS kromatogramı ve tayin edilen amino asit konsantrasyonları.....	91
3.105 Açlık koşullarında 66. saate ait LC/Q-TOF/MS kromatogramı ve tayin edilen amino asit konsantrasyonları.....	92
3.106 Açlık koşullarında 72. saate ait LC/Q-TOF/MS kromatogramı ve tayin edilen amino asit konsantrasyonları.....	92
3.107 Açlık koşullarında 84. saate ait LC/Q-TOF/MS kromatogramı ve tayin edilen amino asit konsantrasyonları.....	93
3.108 Açlık koşullarında 90. saate ait LC/Q-TOF/MS kromatogramı ve tayin edilen amino asit konsantrasyonları.....	93
3.109 Açlık koşullarında 96. saate ait LC/Q-TOF/MS kromatogramı ve tayin edilen amino asit konsantrasyonları.....	94
3.110 Açlık koşullarında 120. saate ait LC/Q-TOF/MS kromatogramı ve tayin edilen amino asit konsantrasyonları.....	94

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.111 PHA üretiminin teşvik edilmediği koşulda 12. saate ait LC/Q-TOF/MS kromatogramı ve tayin edilen aminoasit konsantrasyonları.....	95
3.112 PHA üretiminin teşvik edilmediği koşulda 36. saate ait LC/Q-TOF/MS kromatogramı ve tayin edilen aminoasit konsantrasyonları.....	96
3.113 PHA üretiminin teşvik edilmediği koşulda 42. saate ait LC/Q-TOF/MS kromatogramı ve tayin edilen aminoasit konsantrasyonları.....	96
3.114 PHA üretiminin teşvik edilmediği koşulda 60. saate ait LC/Q-TOF/MS kromatogramı ve tayin edilen aminoasit konsantrasyonları.....	97
3.115 PHA üretiminin teşvik edilmediği koşulda 66. saate ait LC/Q-TOF/MS kromatogramı ve tayin edilen aminoasit konsantrasyonları.....	97
3.116 PHA üretiminin teşvik edilmediği koşulda 72. saate ait LC/Q-TOF/MS kromatogramı ve tayin edilen aminoasit konsantrasyonları.....	98
3.117 PHA üretiminin teşvik edilmediği koşulda 84. saate ait LC/Q-TOF/MS kromatogramı ve tayin edilen aminoasit konsantrasyonları.....	98
3.118 PHA üretiminin teşvik edilmediği koşulda 90. saate ait LC/Q-TOF/MS kromatogramı ve tayin edilen aminoasit konsantrasyonları.....	99
3.119 PHA üretiminin teşvik edilmediği koşulda 96. saate ait LC/Q-TOF/MS kromatogramı ve tayin edilen aminoasit konsantrasyonları.....	99
3.120 PHA üretiminin teşvik edilmediği koşulda 120. saate ait LC/Q-TOF/MS kromatogramı ve tayin edilen aminoasit konsantrasyonları.....	100
3.121 Glutamik asit metabolizması.....	102
3.122 Treonin katabolizması sonucu açığa çıkan metabolitler.....	103
3.123 Dallanmış amino asitlerin biyosentezi.....	104
3.124 L-valin'den sentezlenen olası metabolitler	104
3.125 L- Valin biyosentezi.....	105

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Üretim ortamı bileşenleri.....	13
2.2 Berthelot Yöntemi.....	17
2.3 Gradient elüsyon koşulları.....	22
2.4 HPLC- Amino asit analizi gradient programı.....	24
2.5 Amino asit türevlendirme prosedürü.....	24
2.6 LC-QTOF-MS analiz parametreleri.....	25
2.7 Gradient prosedürü.....	25
2.8 Lipaz/Esteraz aktivite tayin yöntemi.....	26
3.1 MS kütüphanesinden elde edilen metabolit profilleri.....	39
3.2 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda gerçekleştirilen analizlerde MS kütüphanesinden elde edilen metabolit profilleri.....	40
3.3 MS kütüphanesinden elde edilen metabolit profilleri.....	45
3.4 Açlık koşullarında hücre içi mcl-PHA üretiminin izlendiği analizlerde MS kütüphanesinden elde edilen metabolit profilleri.....	46
3.5 MS kütüphanesinden elde edilen metabolit profilleri.....	50
3.6 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edilmediği koşullarda gerçekleştirilen analizlerde MS kütüphanesinden elde edilen metabolit profilleri.....	50
3.7 Farklı üretim koşullarında* GC-MS ile tayin edilen metabolitler.....	52
3.8 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda alınan HPLC kromatogramlarının sonuçları.....	64
3.9 Karbon açlığı koşullarında (karbon kaynağı içermeyen ortamda) hücre içi organik asitlerin HPLC ile analizi ile elde edilen sonuçlar.....	70
3.10 PHA üretiminin teşvik edilmediği koşullarda (negatif kontrol) (C/N oranı düşük) hücre içi organik asitlerin HPLC ile analizi.....	77
3.11 LC-QTOF-MS ile gerçekleştirilen amino asit analizleri verileri.....	101

ÖZET

Poli(hidroksialkonat) (PHA) lar, biyoplastikler içinde kullanım potansiyeli en geniş olan biyobozunabilen poliesterlerdir. Endüstriyel olarak üretimi ve kullanım açısından üzerine yapılmış ve devam eden birçok çalışma bulunmaktadır. Yapılan bu çalışmalar ağırlıklı olarak üretim veriminin artırılması ve kullanım potansiyelleri yönündedir. Ancak üretici mikroorganizmada yıkım da devam etmektedir. Bu işlem ise hücre içi PHA depolimerazlar olarak adlandırılan enzimler tarafından yapılmaktadır. PHA sentezinin artırılması yanında, yıkımının da bloke edilmesinin/hızının azaltılmasının üretim verimini daha da arttıracakları açıktır. Bu işlemin getireceği bir diğer avantaj, üretim süresinin azalması, üretim maliyetinin düşürülmesi anlamına gelmektedir. Mevcut literatürler incelendiğinde PHA'ların ekstrasellüler yıkımları üzerine çalışmalara rastlanılmakla birlikte PHA'ların hücre içi yıkım yollarının belirlenmesi üzerine yapılmış araştırmalara rastlanılmamıştır.

Bu projede, model organizma olarak *Pseudomonas aureofaciens* seçilmiş ve bu organizmada hücre içi PHA yıkım ürünlerinin ve olası yıkım yolunun metabolizma mühendisliği yaklaşımı ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu çalışmada da, C/N oranları değiştirilerek organizmada önce PHA biyosentez ve ardından yıkım yolları teşvik edilerek, yıkım sürecinde oluşan ara ürünler, kromatografik (HPLC, GC-MS ve LC-QTOF-MS) yöntemlerle belirlenmiştir. Bu proje kapsamında, PHA üretiminin teşvik edildiği, Açlık (PHA yıkımı) ve PHA yıkımının teşvik edilmediği koşullarda yapılan GC-MS ve LC-QTOF-MS analizleri ile elde edilen veriler, PHA yıkımı ile ilgili birincil metabolitlerin farklanması ve tespiti için en önemli bilgileri vermiştir. Bu bilgiler çerçevesinde olası metabolik yollar araştırılmıştır. Organik asitlerin ve amino asitlerin taranması ile ilgili yapılan çalışmalardan elde edilen veriler ise destekleyici nitelikte olmuştur.

Sonuç olarak, bu proje, diğer PHA üreten mikroorganizmaların yıkım yollarının belirlenmesi için yol gösterecek bir çalışma olmasının yanı sıra, PHA sentez veriminin artırılmasına yönelik yeni stratejilerin geliştirilmesi için de bir çıkış noktası da olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Poli(hidroksialkonat), *Pseudomonas aureofaciens*, mcl-PHA, yıkım yolu, metabolik profilleme, metabolomik

ABSTRACT

Polyhydroxyalkanoates are biodegradable polyesters, which have a wide range of usage potential in bioplastics. There are lots of ongoing studies about their production and applications. These investigations are focused on increasing production yields and defining the potential applications. However, producing microorganisms are also capable to degrade polyhydroxyalkanoates. Enzymes called as intracellular PHA depolymerases carry out this process. Besides increasing PHA synthesis, production yield will be increased by decreasing/blocking of degradation rate. The other advantage of this process provides reducing the cost of production and minimizing of production time. Although the recent literature gives information about extracellular PHA degradation, there is not enough knowledge about determination of intracellular degradation pathways.

This project aims to determine the probable intracellular PHA degradation pathway and products in *Pseudomonas aureofaciens* by metabolic engineering approaches. In this project, by altering the C/N ratios of culture medium the microorganism was primarily induced for PHA synthesis and degradation pathways and then released intermediates of these pathways were analyzed by chromatographic methods (HPLC, GC-MS and LC-QTOF-MS). Obtained results from GC-MS and LC-QTOF-MS analysis for all conditions (induced PHA synthesis and starvation) gave significant information about the primary metabolites which are associated with PHA degradation. Due to these results, the possible metabolic pathways were investigated. Also, the data obtained from the studies on determination of organic acids and amino acids have been supportive.

In conclusion, it's believed that beside this proposal will be a study leading to determination of the metabolic pathways of the other PHA producing organisms, it will be also a starting point of the developing new strategies to increase PHA production yield.

Keywords: Poly(hydroxyalkanoate), *Pseudomonas aureofaciens*, mcl-PHA, degradation pathway, metabolic profiling, metabolomic

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Prof. Dr. NURDAN PAZARLIOĞLU
Proje No:	113Z813
Proje Başlığı:	Pseudomonas Aureofaciens'de Mcl-Pha'ların Hücre İçi Yıkım Metabolitlerinin Profillenmesi
Proje Türü:	1001 - Araştırma
Proje Süresi:	24
Araştırmacılar:	HASAN ERTAŞ, HATİCE ARDAĞ AKDOĞAN, YURDANUR AKGÜL, EMRE ERDEN
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	EGE Ü. FEN F. BİYOKİMYA B.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/03/2014 - 01/03/2016
Onaylanan Bütçe:	281537.0
Harcanan Bütçe:	249803.47
Öz:	<p>Poli(hidroksialkonat) (PHA) lar, biyoplastikler içinde kullanım potansiyeli en geniş olan biyobozunabilen poliestерlerdir. Endüstriyel olarak üretimi ve kullanım açısından üzerine yapılmış ve devam eden birçok çalışma bulunmaktadır. Yapılan bu çalışmalar ağırlıklı üretim veriminin artırılması ve kullanım potansiyelleri yönündedir. Ancak üretici mikroorganizmada yıkım da devam etmektedir. Bu işlem ise hücre içi PHA depolimerazlar olarak adlandırılan enzimler tarafından yapılmaktadır. PHA sentezinin artırılması yanında, yıkımının da bloke edilmesinin/hızının azaltılmasının üretim verimini daha da arttıracığı açıktır. Bu işlemin getireceği bir diğer avantaj, üretim süresinin azalması, üretim maliyetinin düşürülmesi anlamına gelmektedir. Mevcut literatürler incelendiğinde PHA?ların ekstrasellüler yıkımları üzerine çalışmalara rastlanılmakla birlikte PHA?ların hücre içi yıkım yollarının belirlenmesi üzerine yapılmış araştırmalara rastlanılmamıştır.</p> <p>Bu projede, model organizma olarak Pseudomonas aureofaciens seçilmiş ve bu organizmada hücre içi PHA yıkım ürünlerinin ve olası yıkım yolunun metabolizma mühendisliği yaklaşımı ile belirlenmesi amaçlanmıştır.</p> <p>Bu çalışmada da, C/N oranları değiştirilerek organizmada önce PHA biyosentez ve ardından yıkım yollarını teşvik edilerek, yıkım sürecinde oluşan ara ürünler, kromatografik (HPLC, GC-MS ve LC-QTOF-MS) yöntemlerle belirlenmiştir. Bu proje kapsamında, PHA üretiminin teşvik edildiği, Açlık (PHA yıkımı) ve PHA yıkımının teşvik edilmediği koşullarda yapılan GC-MS ve LC-QTOF-MS analizleri ile elde edilen veriler, PHA yıkımı ile ilgili birincil metabolitlerin farklanması ve tespiti için en önemli bilgileri vermiştir. Bu bilgiler çerçevesinde olası metabolik yollar araştırılmıştır. Organik asitlerin ve amino asitlerin taranması ile ilgili yapılan çalışmalardan elde edilen veriler ise destekleyici nitelikte olmuştur.</p> <p>Sonuç olarak, bu proje, diğer PHA üreten mikroorganizmaların yıkım yollarının belirlenmesi için yol gösterecek bir çalışma olmasının yanı sıra, PHA sentez veriminin artırılmasına yönelik yeni stratejilerin geliştirilmesi için de bir çıkış noktası da olacaktır.</p>
Anahtar Kelimeler:	Polihidroksialkonat, Pseudomonas aureofaciens, mcl-PHA, yıkım yolağı, metabolik profilleme
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır
Projeden Yapılan Yayınlar:	1- METABOLIC PROFILING OF INTRACELLULAR mcl-POLYHYROXYALKANOATE DEGRADATION IN Pseudomonas aureofaciens (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Poster Sunum),