

T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

REKOMBİNANT MİKROORGANİZMALAR KULLANILARAK
L-DOPA VE DOPAMİN'İN EŞZAMANLI BİYOSENTEZİ

DOKTORA TEZİ

Yük. Müh. Veyis SELEN

(062118201)

KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. Dursun ÖZER

İkinci Danışman: Prof. Dr. Hikmet GEÇKİL

EYLÜL-2015

T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**REKOMBİNANT MİKROORGANİZMALAR KULLANILARAK
L-DOPA VE DOPAMİN'İN EŞZAMANLI BİYOSENTEZİ**

DOKTORA TEZİ

Yük. Müh. Veyis SELEN

(062118201)

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 29 Haziran 2015
Tezin Savunulduğu Tarih : 15 Eylül 2015

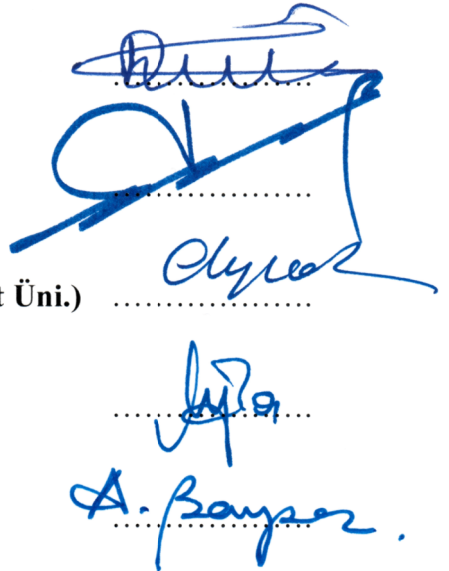
Tez Danışmanı : Prof. Dr. Dursun ÖZER (Fırat Üni.)

Diğer Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Ahmet ÖZER (Fırat Üni.)

Prof. Dr. Arzu Yadigar DURSUN (Fırat Üni.)

Prof. Dr. Ayla ÖZER (Mersin Üni.)

Prof. Dr. Ahmet BAYSAR (İnönü Üni.)



EYLÜL-2015

ÖNSÖZ

Öğrenim ve akademik hayatımın her aşamasında, değerli fikir, tavsiye ve tecrübelerini benimle paylaşan, anlayışını, yardımlarını ve her konuda desteğini asla esirgemeyen çok değerli Danışman Hocam Prof. Dr. Dursun ÖZER'e sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Doktora tez konumun seçiminde, deneylerde kullandığım mikroorganizmaların temin edilmesindeki katkılarından ve pozitif yaklaşımıyla yaptığı her türlü katkılardan dolayı İkinci Danışman Hocam Prof. Dr. Hikmet GEÇKİL'e içtenlikle teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Doktora tezim süresince yardım ve desteklerini esirgemeyen değerli arkadaşlarım Uzman Biyolog Emel AYTAN'a ve Dr. Aslı GİRAY KURT'a içtenlikle teşekkür ederim.

Çalışmamın yürütülmesinde maddi destek sağlayan Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (FÜBAP)'ne, çalışmalarımı gerçekleştirmemde sağlanan uygun çalışma koşulları nedeniyle Kimya Mühendisliği Bölümü'ne ve İnönü Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı'na teşekkürlerimi sunarım.

Desteği ve sevgisiyle her zaman yanımda hissettiğim, yaşamım boyunca bana her konuda güvenen, maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın en güzel ve en zor anlarında hep yanımda olan, her ne şartta olursa olsun hoşgörüsünde azalma olmayan canım eşim Özlem SELEN'e, çalışmalarımın sonlarına doğru aramıza katılan, üzerimdeki baskı ve stresi yenmemde bana gülcükleriyle güç veren biricik oğlum Cemal Seyfi'ye en içten teşekkürlerimi sunarım.

Veyis SELEN
ELAZIĞ-2015

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖNSÖZ	III
İÇİNDEKİLER	IV
ÖZET	VII
SUMMARY	IX
ŞEKİLLER LİSTESİ	XI
TABLolar LİSTESİ	XIX
SİMGELER LİSTESİ	XX
1. GİRİŞ	1
2. FERMANTASYON	4
2.1. Fermantasyon İçin Uygulanan Teknik İşlemler	4
2.1.1. Fermantasyon Ortamının Hazırlanması	5
2.1.2. Fermantasyon Ortamının Sterilizasyonu	5
2.1.3. Aşılama Kültürünün Hazırlanması	5
2.1.4. Fermantasyon	6
2.1.5. Fermantasyon Sıvısından Biyokütlenin Ayrılması	6
2.1.6. Ürünün Kazanılması	7
2.2. Mikrobiyal Proseslerde Üretimi Etkileyen Parametreler	7
2.2.1. Mikroorganizma Seçimi	8
2.2.2. Ortam Tasarımı: Bileşenler ve Bileşimleri	8
2.2.2.1. Karbon Kaynakları	9
2.2.2.2. Azot Kaynakları	10
2.2.2.3. İz Elementler	10
2.2.2.4. Diğer Bileşikler	10
2.2.3. Biyoreaktör İşletim Türü	10
2.2.3.1. Daldırmalı Kültür Tekniği	11
2.2.3.2. Yüzey Kültür Tekniği (Katı Hal Fermantasyonu)	13
2.2.4. Biyoreaktör İşletim Parametreleri	15
2.2.4.1. pH	15
2.2.4.2. Sıcaklık	15
2.2.4.3. Oksijen Aktarımı	16
3. L-DOPA ve DOPAMİN	19
3.1. L-DOPA (Levodopa)	19
3.2. Dopamin	20
3.3. Parkinson Hastalığı	21
3.4. L-DOPA ve Dopaminin Bakteriyel Sentezi	22
3.4.1. L-DOPA Sentezi	23
3.4.2. Tirozin Fenol Liyaz Enzimi (TPL)	24
3.4.3. Tirozinaz Enzimi	25
3.4.4. Tirozin	26
3.4.5. Katekoller	27
3.4.6. Dopaminin Sentezi	29
3.4.7. Dopa Dekarboksilaz Enzimi	30
3.5. Mikroorganizma Hemoglobinleri	30

3.6.	Bakteriyel (<i>Vitreoscilla</i>) Hemoglobin (Vhb)	31
3.6.1.	<i>Vitreoscilla</i> Hemoglobin Geni (<i>Vgb</i>)	36
3.6.2.	<i>Vitreoscilla</i> Hemoglobin Geninin Klonlandığı Organizmalara Etkisi	36
3.6.3.	Vhb Metabolik Mühendislikteki Uygulamaları	36
4.	BİYOREAKSİYON KİNETİĞİNİN MODELLENMESİ	39
4.1.	Giriş	39
4.2.	Kesikli Olarak İşletilen Fermantörlerde Fermantasyon Kinetiği	41
4.2.1.	Kütle ve Hız Denklemleri	41
4.2.2.	Mikrobiyal Büyüme	42
4.2.3.	Üreme Hızına Etki Eden Faktörler	44
4.2.4.	Substrat Tüketimi	49
4.2.5.	Ürün Oluşumu	50
4.2.6.	Kinetik Parametrelerin Hesaplanması	51
4.2.6.1.	μ_m ve K_S 'in Hesaplanması	51
4.2.6.2.	$Y_{x/s}$ ve m 'nin Hesaplanması	52
4.2.6.3.	Ürün Oluşum Parametreleri α ve β 'in Hesaplanması	52
5.	MATERYAL VE METOD	54
5.1.	Mikroorganizmalar	54
5.2.	Kullanılan <i>vgb</i> Klonları	54
5.3.	Uygun Bakteri Suşlarının Eldesi ve Klonlama Çalışmaları	57
5.3.1.	Plazmid İzolasyonu İçin Bakteri Kültürleri	57
5.3.2.	Plazmid İzolasyonu (Miniprep)	57
5.3.3.	Plazmidlerin Restriksiyon Enzimleri ile Kesilimi ve Agaroz Jel Elektroforezi	59
5.3.4.	Bakterilerin İzole Edilen Vektörlerle Transformasyonu	60
5.4.	Mikroorganizma Büyüme Ortamı ve Şartları	62
5.5.	Fermantasyon Ortamı	65
5.6.	Biyoreaktör İşletim Şartları	66
5.7.	Analitik Yöntemler	66
5.7.1.	Biokütle Derişimi	66
5.7.2.	Toplam Protein Derişimi Tayini	67
5.7.3.	DNS Yöntemi ile Substrat (Glikoz) Derişimi Tayini	68
5.7.4.	Hücre Ekstraktlarının Hazırlanması	69
5.7.5.	L-DOPA ve Dopaminin HPLC ile Analizi	69
5.7.6.	Tirozin Fenol Liyaz (TPL) Enzimi Aktivitesi Tayini	70
5.7.7.	Sıvı Faz Hacimsel Kütle Aktarım Katsayısı ve Oksijen Tüketim Hızı	71
5.8.	İstatistiksel Testler	71
6.	BULGULAR VE TARTIŞMA	74
6.1.	<i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) ve Rekombinant Suşları ile L-DOPA ve Dopamin Üretimi	75
6.1.1.	Karbon Kaynağının Etkisi	76
6.1.2.	Organik Azot Kaynaklarının Etkisi	81
6.1.3.	İnorganik Azot Kaynaklarının Etkisi	91
6.1.4.	Diğer Ortam Bileşenlerinin Etkisi	96

6.1.5.	Başlangıç Ortam pH'sının Etkisi	101
6.1.6.	Ekim Derişiminin (Oranının) Etkisi	106
6.1.7.	Fermantasyon Sıcaklığının Etkisi	110
6.1.8.	Çalkalama Hızının Etkisi	114
6.1.9.	Tirozin Fenol Liyaz (TPL) Enzimi Aktivitesi Üzerine Optimizasyonun Etkisi	120
6.2.	Kesikli Olarak İşletilen Biyoreaktörde L-DOPA ve Dopamin Üretimi	120
6.2.1.	Karıştırma Hızının Etkisi	121
6.2.2.	Hava Giriş Hızının Etkisi	123
6.2.3.	Oksijen Aktarımı Etkisi	126
7.	L-DOPA ve DOPAMİN ÜRETİMİNİN MATEMATİKSEL MODELLENMESİ	133
7.1.	Genetik Algoritma (GA)	133
7.1.1.	Genetik Algoritmanın Tarihçesi	135
7.1.2.	Genetik Algoritmanın Tanımı	135
7.1.3.	Genetik Algoritmanın Adımları	137
7.1.4.	Genetik Algoritmanın Uygulama Alanları	144
7.2.	Yapay Sinir Ağları	145
7.2.1.	Biyolojik Sinir Sistemi	146
7.2.2.	Yapay Sinir Ağı (YSA)	147
7.2.2.1.	Yapay Sinir Ağlarının Özellikleri	148
7.2.2.2.	Yapay Sinir Ağlarının Tarihi Gelişimi	149
7.2.2.3.	Yapay Sinir Ağları (YSA)'nın Uygulama Alanları	151
7.2.2.4.	Yapay Sinir Ağlarında Öğrenme	152
7.2.2.5.	Yapay Sinir Ağı Yapıları	154
7.3.	Genetik Algoritma ve Yapay Sinir Ağları (YSA) Kullanılarak Fermantasyon Prosesinin Modellenmesi	159
8.	GENEL SONUÇ VE ÖNERİLER	181
9.	KAYNAKLAR	190
10.	EKLER	202
EK-1.	<i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2633) Derişimi İçin Çalışma Doğrusu	202
EK-2.	<i>Citrobacter freundii</i> pMK79 Derişimi İçin Çalışma Doğrusu	203
EK-3.	Toplam Protein Derişimi İçin Çalışma Doğrusu	204
EK-4.	Dinitrosalisilikasit (DNS) Metodu ile Glikoz Derişimi Tayini İçin Çalışma Doğrusu	205
EK-5.	Dinitrosalisilikasit (DNS) Metodu ile Glikoz Analizi İçin Reaktiflerin Hazırlanması	206
EK-6.	L-DOPA ve Dopamin İçin HPLC Spektrumları	207
EK-7.	L-DOPA ve Dopamin İçin HPLC Çalışma Doğruları	208
EK-8.	Tirozin Fenol Liyaz (TPL) Enzimi İçin Amonyak Derişimi Çalışma Doğrusu	209
EK-9.	Dinamik Yöntem İle Sıvı Faz Kütle Aktarım Katsayısı (k_{La}) ve Mikroorganizmanın Oksijen Tüketim Hızının ($-r_o$) Belirlenmesi	210
11.	ÖZGEÇMİŞ	212

ÖZET

Doktora Tezi

REKOMBİNANT MİKROORGANİZMALAR KULLANILARAK L-DOPA VE DOPAMİN'İN EŞZAMANLI BİYOSENTEZİ

Veyis SELEN

Fırat Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

2015, Sayfa: 215

Çalışmada, *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ve *Erwinia herbicola* (NRRL B-3466) gibi gram-negatif bakterilerin doğal (yabani) suşları ile *Vitrocella* hemoglobin (VHb⁺/VHb⁻) geni (*vgb*⁺/*vgb*⁻)'nin aktarılması sonucu elde edilen rekombinant suşları (*Citrobacter freundii* pMK57, *Citrobacter freundii* pMK79, *Erwinia herbicola* pUC8, *Erwinia herbicola* pUC8:15) kullanılmıştır. Doğal ve rekombinant suşlar ile hücre içi ve hücre dışı L-DOPA ve Dopamin'in biyosentezi sentetik fermantasyon ortamlarında karşılaştırmalı olarak çalışılmıştır. Araştırmada L-DOPA ve Dopamin üretim miktarının, hem genetik mühendisliği uygulaması olan rekombinant DNA teknolojisi ile hem de metabolit mühendislik uygulamalarından olan ortam optimizasyonu ile artırılması amaçlanmıştır. Deneyler, 250 ml'lik erlenlerde ve 1 litre hacmindeki biyoreaktörde gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada, karbon kaynağı (glikoz) derişimi, organik (pepton, yeast ekstrakt, üre) ve inorganik ((NH₄)₂SO₄, NaNO₃) azot kaynakları ve derişimleri ile diğ er ortam bileş enleri (NaCl ve CaCl₂)’nin yanı sıra, inokulum oranı, pH, sıcaklık ve çalkalama hızının L-DOPA ve Dopamin  retimi üzerine etkisi sentetik ortamlarda kesikli sistemde incelenmiştir. En yüksek L-DOPA ve Dopamin  retimi *Citrobacter freundii* MK79 rekombinant suşu kullanarak sırasıyla hücre dışı 663 mg L⁻¹ ve 481 mg L⁻¹, hücre içi ise 339 mg L⁻¹ ve 190 mg L⁻¹ düzeylerinde optimize edilen fermentasyon ortamında (5.0 g L⁻¹ glikoz, 15.0 g L⁻¹ pepton, 12.5 g L⁻¹ yeast extract, 2.5 g L⁻¹ amonyum sülfat, 1.0 g L⁻¹ kalsiyum klorür, pH₅: 7.0, İnokulum oranı: % 5.0 v/v; Ortam sıcaklığı: 30  C ve çalkalama hızı 200 rpm) elde edilmiştir.

Kesikli olarak işletilen biyoreaktördeki fermentasyon ortamında kütle aktarım parametreleri araştırılmıştır. Karıştırma ve hava giriş hızı arttı a hacimsel kütle transfer katsayısı, k_La ve oksijen t k tim hızı, r_o değerinin de arttığı görülmüştür.

Kesikli olarak işletilen bioreaktör sistemde, *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643)’den L-DOPA biyosentezi kinetiği incelenmiştir. Çalışmada literatürde mevcut çeşitli kinetik modeller ile Yapay Sinir Ağı (YSA) ile oluşturulan model kıyaslanmıştır. Kinetik parametrelerin değerleri Genetik Algoritma Toolbox’ı ile optimizasyon yapılarak belirlenmiştir. Mikrobiyal büyüme, L-DOPA  retimi ve glikoz t k timine ait deneysel sonuçlar ile modellerden elde edilen sonuçlar kıyaslanmış ve YSA modelinin sistemin davranışını daha iyi tanımladığı belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: L-DOPA, Dopamin, *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) *Citrobacter freundii* pMK57, *Citrobacter freundii* pMK79, *Erwinia herbicola* (NRRL B-3466), *Erwinia herbicola* pUC8, *Erwinia herbicola* pUC8:15, Rekombinant DNA teknolojisi, Daldırmalı fermentasyon, Biyoproses şartları, Kesikli fermentasyon, Biyoreaktör işletim parametreleri, Kinetik model, Genetik algoritma, Yapay sinir ağı.

SUMMARY

PhD Thesis

SIMULTANEOUS BIOSYNTHESIS OF L-DOPA AND DOPAMINE USING RECOMBINANT MICROORGANISMS

Veyis SELEN

Firat University

Graduate School of Natural and Applied Science

Department of Chemical Engineering

2015, Page: 215

In the study, gram-negative bacterium as *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643), *Erwinia herbicola* (NRRL B-3466) and their recombinant culture include (*vgb*⁺/*vgb*⁻) gene (*Citrobacter freundii* pMK57, *Citrobacter freundii* pMK79, *Erwinia herbicola* pUC8, *Erwinia herbicola* pUC8:15) were used. The biosynthesis of extracellular and cytoplasmic L-DOPA and Dopamine in synthetic fermentation media by wild and recombinant cultures as comparative studied. The research focused on the improvement of L-DOPA and Dopamine level using both of recombinant DNA technology and metabolic engineering application. Experiments were carried out in 250 ml shake-flask as well as 1.0 L bioreactor.

In the study, the effect of carbon source (glucose), organic (peptone, yeast extract, urea) and inorganic ((NH₄)₂SO₄, NaNO₃) nitrogen sources and their concentrations, and other medium components (NaCl and CaCl₂), inoculum, pH of initial media, temperature and shaking speed on production L-DOPA and Dopamine were investigated in synthetic media for microorganisms.

Mass transfer characteristics of fermentation broth in batch bioreactor were investigated. Increases in both the agitation rate and the air feed rate increased volumetric mass transfer coefficients, k_La and oxygen uptake rates, r_o values.

The fermentation kinetics of L-DOPA by *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) were studied in a batch system. This study focuses on comparing different kinetic models in literature and the use of artificial neural networks model. Various kinetic parameters were obtained for L-DOPA fermentation optimising with Genetic Algorithm Toolbox. The experimental results of growth, L-DOPA production and glucose consumption are compared model results, and artificial neural networks model appeared to provide a reasonable description.

Key Words: L-DOPA, Dopamine, *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643), *Citrobacter freundii* pMK57, *Citrobacter freundii* pMK79, *Erwinia herbicola* (NRRL B-3466), *Erwinia herbicola* pUC8, *Erwinia herbicola* pUC8:15, Recombinant DNA technology, Submerged fermentation, Bioprocess conditions, Batch fermentation, Bioreactor operating parameters, Kinetic modeling, Genetic algorithm, Artificial neural network modeling.

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 2.1.	Fermantasyon akış şeması. 4
Şekil 2.2.	Katı maddelerin kültür karışımından ayrılması 6
Şekil 2.3.	Sıcaklığın fonksiyonu olarak spesifik büyüme hızı 16
Şekil 2.4.	Çözünmüş oksijen derişiminin kalma süresi ile değişimi 17
Şekil 2.5.	Sıvı faz hacimsel kütle aktarım katsayısı (k_{La})'nın belirlenmesi 18
Şekil 3.1.	L-DOPA'nın molekül ve üç boyutlu yapısı 19
Şekil 3.2.	Dopamin'in molekül ve üç boyutlu yapısı 20
Şekil 3.3.	L-tirozinin TPL enzimi ile pirüvat, amonyak ve fenole 23 dönüştürülmesi
Şekil 3.4.	Katekol ilavesi ve TPL enzimi ile L-DOPA'nın yapımı 23
Şekil 3.5.	L-DOPA'dan Dopamin oluşumu 23
Şekil 3.6.	Tirozinazın L-DOPA sentez şeması 26
Şekil 3.7.	Tirozin metabolizması 28
Şekil 3.8.	L-DOPA'dan Dopamin Sentezi 29
Şekil 3.9.	Bakteriyel hemoglobin geni taşıyan yegane bakteri <i>Vitreoscilla</i> 'nın 31 taksonomik konumu
Şekil 3.10.	VHb'nin 3-boyutlu yapısı 32
Şekil 3.11.	Düşük oksijen yoğunluğunda <i>Vitreoscilla</i> hemoglobinin rolü 33
Şekil 3.12.	VHb ve sitokrom <i>bo</i> ubiquinol oksidazların I. alt ünitesi arasındaki 35 ilişkinin muhtemel mekanizması
Şekil 3.13.	<i>E. coli</i> transkripsiyon sistemi tarafından tanınan <i>vgb</i> promotoru 36
Şekil 4.1.	Kesikli fermantasyonda mikroorganizma büyüme eğrisi 43
Şekil 4.2.	Spesifik üreme hızı ile substrat derişimi arasındaki ilişki 46
Şekil 4.3.	Kesikli fermantasyon proses kinetiklerinin genel modelleri 51
Şekil 4.4.	Ürün oluşum parametrelerinin bulunması 53
Şekil 5.1.	pUC8 plazmidinin fiziki haritası 55
Şekil 5.2.	pUC8:15 plazmidinin fiziki haritası 55
Şekil 5.3.	pMK57 plazmidinin fiziki haritası 56
Şekil 5.4.	pMK79 plazmidinin fiziki haritası 56
Şekil 5.5.	Rekombinant bakterilerde piyosiyanın pigmenti 63
Şekil 5.6.	Deneylerin yapılışında takip edilen yöntem 65
Şekil 5.7.	Biyoreaktör Düzenegi 67
Şekil 6.1.	<i>Citrobacter freundii</i> B-2643 ve rekombinant suşları pMK57 ile 74 pMK79'ın LB ortamındaki maksimum hücre dışı L-DOPA ve Dopamin üretim düzeyleri
Şekil 6.2.	<i>Erwinia herbicola</i> B-3466 ve rekombinant suşları pUC8 ile 75 pUC8:15'in LB ortamındaki maksimum hücre dışı L-DOPA ve Dopamin üretim düzeyleri
Şekil 6.3.	Farklı glikoz derişimlerinde <i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) 77 ile yapılan deneylerde hücre dışı ve hücre içi L-DOPA ve Dopamin derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi
Şekil 6.4.	Farklı glikoz derişimlerinde <i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) 78 ile yapılan deneylerde biyokütle derişiminin, pH ve glikoz derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi

Şekil 6.5.	Farklı glikoz derişimlerinde <i>Citrobacter freundii</i> pMK79 ile yapılan deneylerde hücre dışı ve hücre içi L-DOPA ve Dopamin derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi	79
Şekil 6.6.	Farklı glikoz derişimlerinde <i>Citrobacter freundii</i> pMK79 ile yapılan deneylerde biyokütle derişiminin, pH ve glikoz derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi	80
Şekil 6.7.	<i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) ve rekombinant suşları pMK57 ile pMK79'ın glikoz varlığındaki LB ortamındaki maksimum hücre dışı ve hücre içi L-DOPA üretim düzeyleri	81
Şekil 6.8.	<i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) ve rekombinant suşları pMK57 ile pMK79'ın glikoz varlığındaki LB ortamındaki maksimum hücre dışı ve hücre içi Dopamin üretim düzeyleri	81
Şekil 6.9.	Farklı pepton derişimlerinde <i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde hücre dışı ve hücre içi L-DOPA ve Dopamin derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi	82
Şekil 6.10.	Farklı pepton derişimlerinde <i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) ile pH ve biyokütle derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi	83
Şekil 6.11.	Farklı pepton derişimlerinde <i>Citrobacter freundii</i> pMK79 ile yapılan deneylerde hücre dışı ve hücre içi L-DOPA ve Dopamin derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi	84
Şekil 6.12.	Farklı pepton derişimlerinde <i>Citrobacter freundii</i> pMK79 ile yapılan deneylerde pH ve biyokütle derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi	85
Şekil 6.13.	<i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) ve rekombinant suşları pMK57 ile pMK79'ın glikoz varlığındaki pepton derişiminin etkisinin incelendiği fermantasyon ortamındaki maksimum hücre dışı ve hücre içi L-DOPA üretim düzeyleri	86
Şekil 6.14.	<i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) ve rekombinant suşları pMK57 ile pMK79'ın glikoz varlığındaki pepton derişiminin etkisinin incelendiği fermantasyon ortamındaki maksimum hücre dışı ve hücre içi Dopamin üretim düzeyleri	86
Şekil 6.15.	Farklı yeast ekstrakt derişimlerinde <i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde hücre dışı ve hücre içi L-DOPA ve Dopamin derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi	87
Şekil 6.16.	Farklı yeast ekstrakt derişimlerinde <i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde pH ve biyokütle derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi	88
Şekil 6.17.	Farklı yeast ekstrakt derişimlerinde <i>Citrobacter freundii</i> pMK79 ile yapılan deneylerde hücre dışı ve hücre içi L-DOPA ve Dopamin derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi	89
Şekil 6.18.	Farklı yeast ekstrakt derişimlerinde <i>Citrobacter freundii</i> pMK79 ile yapılan deneylerde pH ve biyokütle derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi	89
Şekil 6.19.	<i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) ve rekombinant suşları pMK57 ile pMK79'ın glikoz varlığındaki yeast ekstrakt etkisinin incelendiği fermantasyon ortamındaki maksimum hücre dışı ve hücre içi L-DOPA derişimleri	90

Şekil 6.20.	<i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) ve rekombinant suşları pMK57 ile pMK79'nin glikoz varlığındaki yeast ekstrakt etkisinin incelendiği fermantasyon ortamındaki maksimum hücre dışı ve hücre içi Dopamin derişimleri	90
Şekil 6.21.	Farklı amonyum sülfat derişimlerinde <i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde hücre dışı ve hücre içi L-DOPA ve Dopamin derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi	92
Şekil 6.22.	Farklı amonyum sülfat derişimlerinde <i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde pH ve biyokütle derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi	93
Şekil 6.23.	Farklı amonyum sülfat derişimlerinde <i>Citrobacter freundii</i> pMK79 ile yapılan deneylerde hücre dışı ve hücre içi L-DOPA ve Dopamin derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi	94
Şekil 6.24.	Farklı amonyum sülfat derişimlerinde <i>Citrobacter freundii</i> pMK79 ile yapılan deneylerde pH ve biyokütle derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi	95
Şekil 6.25.	<i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) ve rekombinant suşları pMK57 ile pMK79'nin glikoz varlığındaki amonyum sülfat etkisinin incelendiği fermantasyon ortamındaki maksimum hücre dışı ve hücre içi L-DOPA derişimi	95
Şekil 6.26.	<i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) ve rekombinant suşları pMK57 ile pMK79'nin glikoz varlığındaki amonyum sülfat etkisinin incelendiği fermantasyon ortamındaki maksimum hücre dışı ve hücre içi Dopamin derişimi	96
Şekil 6.27.	Farklı kalsiyum klorür derişimlerinde <i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde hücre dışı ve hücre içi L-DOPA ve Dopamin derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi	97
Şekil 6.28.	Farklı kalsiyum klorür derişimlerinde <i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde pH ve biyokütle derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi	98
Şekil 6.29.	Farklı kalsiyum klorür derişimlerinde <i>Citrobacter freundii</i> pMK79 ile yapılan deneylerde hücre dışı ve hücre içi L-DOPA ve Dopamin derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi	99
Şekil 6.30.	Farklı kalsiyum klorür derişimlerinde <i>Citrobacter freundii</i> pMK79 ile yapılan deneylerde pH ve biyokütle derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi	100
Şekil 6.31.	<i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) ve rekombinant suşları pMK57 ile pMK79'nin glikoz varlığındaki kalsiyum klorür etkisinin incelendiği fermantasyon ortamındaki maksimum hücre dışı ve hücre içi L-DOPA derişimi	100
Şekil 6.32.	<i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) ve rekombinant suşları pMK57 ile pMK79'nin glikoz varlığındaki kalsiyum klorür etkisinin incelendiği fermantasyon ortamındaki maksimum hücre dışı ve hücre içi Dopamin derişimi	101
Şekil 6.33.	Farklı ortam başlangıç pH'larında <i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde hücre dışı ve hücre içi L-DOPA ve Dopamin derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi	102

Şekil 6.34.	Farklı ortam başlangıç pH'larında <i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde pH ve biyokütle derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi	103
Şekil 6.35.	Farklı ortam başlangıç pH'larında <i>Citrobacter freundii</i> pMK79 ile yapılan deneylerde hücre dışı ve hücre içi L-DOPA ve Dopamin derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi	104
Şekil 6.36.	Farklı ortam başlangıç pH'larında <i>Citrobacter freundii</i> pMK79 ile yapılan deneylerde pH ve biyokütle derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi	104
Şekil 6.37.	<i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) ve rekombinant suşları pMK57 ile pMK79'ın glikoz varlığındaki ortam başlangıç pH'sının incelendiği fermantasyon ortamındaki maksimum hücre dışı ve hücre içi L-DOPA derişimi	105
Şekil 6.38.	<i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) ve rekombinant suşları pMK57 ile pMK79'ın glikoz varlığındaki ortam başlangıç pH'sının incelendiği fermantasyon ortamındaki maksimum hücre dışı ve hücre içi Dopamin derişimi	106
Şekil 6.39.	Farklı ekim derişimlerinde <i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde hücre dışı ve hücre içi L-DOPA ve Dopamin derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi	107
Şekil 6.40.	Farklı ekim derişimlerinde <i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde pH ve biyokütle derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi	107
Şekil 6.41.	Farklı ekim derişimlerinde <i>Citrobacter freundii</i> pMK79 ile yapılan deneylerde hücre dışı ve hücre içi L-DOPA ve Dopamin derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi	108
Şekil 6.42.	Farklı ekim derişimlerinde <i>Citrobacter freundii</i> pMK79 ile yapılan deneylerde pH ve biyokütle derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi	109
Şekil 6.43.	<i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) ve rekombinant suşları pMK57 ile pMK79'ın glikoz varlığındaki ekim derişiminin incelendiği fermantasyon ortamındaki maksimum hücre dışı ve hücre içi L-DOPA derişimi	109
Şekil 6.44.	<i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) ve rekombinant suşları pMK57 ile pMK79'ın glikoz varlığındaki ekim derişiminin incelendiği fermantasyon ortamındaki maksimum hücre dışı ve hücre içi Dopamin derişimi	110
Şekil 6.45.	Farklı ortam sıcaklıklarında <i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde hücre dışı ve hücre içi L-DOPA ve Dopamin derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi	111
Şekil 6.46.	Farklı ortam sıcaklıklarında <i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde pH ve biyokütle derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi	111
Şekil 6.47.	Farklı ortam sıcaklıklarında <i>Citrobacter freundii</i> pMK79 ile yapılan deneylerde hücre dışı ve hücre içi L-DOPA ve Dopamin derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi	112
Şekil 6.48.	Farklı ortam sıcaklıklarında <i>Citrobacter freundii</i> pMK79 ile yapılan deneylerde pH ve biyokütle derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi	113

Şekil 6.49.	<i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) ve rekombinant suşları pMK57 ile pMK79'ın glikoz varlığındaki sıcaklığın etkisinin incelendiği fermantasyon ortamındaki maksimum hücre dışı ve hücre içi L-DOPA derişimi	113
Şekil 6.50.	<i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) ve rekombinant suşları pMK57 ile pMK79'ın glikoz varlığındaki sıcaklığın etkisinin incelendiği fermantasyon ortamındaki maksimum hücre dışı ve hücre içi Dopamin derişimi	114
Şekil 6.51.	Farklı çalkalama hızlarında <i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde hücre dışı ve hücre içi L-DOPA ve Dopamin derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi	115
Şekil 6.52.	Farklı çalkalama hızlarında <i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde pH ve biyokütle derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi	115
Şekil 6.53.	Farklı çalkalama hızlarında <i>Citrobacter freundii</i> pMK79 ile yapılan deneylerde hücre dışı ve hücre içi L-DOPA ve Dopamin derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi	116
Şekil 6.54.	Farklı çalkalama hızlarında <i>Citrobacter freundii</i> pMK79 ile yapılan deneylerde pH ve biyokütle derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi	117
Şekil 6.55.	<i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) ve rekombinant suşları pMK57 ile pMK79'ın glikoz varlığındaki çalkalama hızının etkisinin incelendiği fermantasyon ortamındaki maksimum hücre dışı ve hücre içi L-DOPA derişimi	117
Şekil 6.56.	<i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) ve rekombinant suşları pMK57 ile pMK79'ın glikoz varlığındaki çalkalama hızının etkisinin incelendiği fermantasyon ortamındaki maksimum hücre dışı ve hücre içi Dopamin derişimi	118
Şekil 6.57.	<i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) yabanil suşu, rekombinant suşlar <i>Citrobacter freundii</i> pMK57 ve <i>Citrobacter freundii</i> pMK79'ın L-DOPA üretim seviyelerinin optimizasyon öncesi (a) ve optimizasyon sonrası (b) karşılaştırılması	119
Şekil 6.58.	<i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) yabanil suşu, rekombinant suşlar <i>Citrobacter freundii</i> pMK57 ve <i>Citrobacter freundii</i> pMK79'ın Dopamin üretim seviyelerinin optimizasyon öncesi (a) ve optimizasyon sonrası (b) karşılaştırılması	119
Şekil 6.59.	<i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) yabanil suşu, rekombinant suşlar <i>Citrobacter freundii</i> pMK57 ve <i>Citrobacter freundii</i> pMK79'ın Tirozin Fenol Liyaz (TPL) aktivitesi değerlerinin optimizasyon öncesi (a) ve optimizasyon sonrası (b) karşılaştırılması	120
Şekil 6.60.	Kesikli olarak işletilen biyoreaktörde farklı karıştırma hızlarında <i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde hücre dışı L-DOPA, Dopamin, biyokütle ve glikoz derişimlerinin zamanla değişimi	122
Şekil 6.61.	Kesikli olarak işletilen biyoreaktörde farklı karıştırma hızlarında <i>Citrobacter freundii</i> pMK79 ile yapılan deneylerde hücre dışı L-DOPA, Dopamin, biyokütle ve glikoz derişiminin zamanla değişimi	123

Şekil 6.62.	Kesikli olarak işletilen biyoreaktörde farklı hava giriş hızlarında <i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde hücre dışı L-DOPA, Dopamin, biyokütle ve glikoz derişiminin zamanla değişimi	124
Şekil 6.63.	Kesikli olarak işletilen biyoreaktörde farklı hava giriş hızlarında <i>Citrobacter freundii</i> pMK79 ile yapılan deneylerde hücre dışı L-DOPA, Dopamin, biyokütle ve glikoz derişiminin zamanla değişimi	126
Şekil 7.1.	Genetik algoritma adımlarının akım diagramı	137
Şekil 7.2.	Rastgele oluşturulmuş örnek bir başlangıç popülasyonu	138
Şekil 7.3.	Tek noktalı çaprazlama	142
Şekil 7.4.	Üç noktalı çaprazlama	142
Şekil 7.5.	Basit dönüşümünün gösterimi	143
Şekil 7.6.	Değiştirme dönüşümünün gösterimi	143
Şekil 7.7.	Ekleme dönüşümünün gösterimi	143
Şekil 7.8.	Karşılıklı değişim dönüşümünün gösterimi	143
Şekil 7.9.	Yer değiştirme dönüşümünün gösterimi	144
Şekil 7.10.	Biyolojik sinir sisteminin blok gösterimi	146
Şekil 7.11.	Biyolojik sinir hücresi ve bileşenleri	147
Şekil 7.12.	Eğitici öğrenme yöntemi	153
Şekil 7.13.	Eğitici öğrenme yöntemi	153
Şekil 7.14.	Takviyeli öğrenme yöntemi	154
Şekil 7.15.	İleri beslemeli 3 katmanlı Yapay Sinir Ağı (YSA) yapısı	155
Şekil 7.16.	Geri beslemeli iki katmanlı Yapay Sinir Ağı (YSA)	156
Şekil 7.17.	Yöresel geri-küresel ileri (YGKİ) beslemeli Yapay Sinir Ağı yapısı	157
Şekil 7.18.	Bellek hücreli yapay sinir ağı ve bellekli bir hücrenin yapısı	158
Şekil 7.19.	<i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) yabanil suşu için spesifik üreme hızının başlangıç substrat derişimi ile değişimi	160
Şekil 7.20.	0.5 g L ⁻¹ glikoz derişimindeki fermantasyon ortamında deneysel olarak elde edilen sonuçlarla Tessier modelinden elde edilen sonuçların zamanla değişimi	172
Şekil 7.21.	1.0 g L ⁻¹ glikoz derişimindeki fermantasyon ortamında deneysel olarak elde edilen sonuçlarla Tessier modelinden elde edilen sonuçların zamanla değişimi	172
Şekil 7.22.	2.5 g L ⁻¹ glikoz derişimindeki fermantasyon ortamında deneysel olarak elde edilen sonuçlarla Andrews-Noack modelinden elde edilen sonuçların zamanla değişimi	173
Şekil 7.23.	5.0 g L ⁻¹ glikoz derişimindeki fermantasyon ortamında deneysel olarak elde edilen sonuçlarla Andrews-Noack modelinden elde edilen sonuçların zamanla değişimi	173
Şekil 7.24.	10.0 g L ⁻¹ glikoz derişimindeki fermantasyon ortamında deneysel olarak elde edilen sonuçlarla Andrews-Noack modelinden elde edilen sonuçların zamanla değişimi	174
Şekil 7.25.	Oluşturulan Yapay Sinir Ağı (YSA) modeli	175
Şekil 7.26.	Yapay Sinir Ağı (YSA)'nın eğitimi için blok diyagramı	176
Şekil 7.27.	0.5 g L ⁻¹ glikoz derişimindeki fermantasyon ortamında deneysel olarak elde edilen sonuçlarla Yapay Sinir Ağı (YSA) modelinden elde edilen sonuçların zamanla değişimi	177

Şekil 7.28.	1.0 g L ⁻¹ glikoz derişimindeki fermentasyon ortamında deneysel olarak elde edilen sonuçlarla Yapay Sinir Ağı (YSA) modelinden elde edilen sonuçların zamanla değişimi	178
Şekil 7.29.	2.5 g L ⁻¹ glikoz derişimindeki fermentasyon ortamında deneysel olarak elde edilen sonuçlarla Yapay Sinir Ağı (YSA) modelinden elde edilen sonuçların zamanla değişimi	178
Şekil 7.30.	5.0 g L ⁻¹ glikoz derişimindeki fermentasyon ortamında deneysel olarak elde edilen sonuçlarla Yapay Sinir Ağı (YSA) modelinden elde edilen sonuçların zamanla değişimi	179
Şekil 7.31.	10.0 g L ⁻¹ glikoz derişimindeki fermentasyon ortamında deneysel olarak elde edilen sonuçlarla Yapay Sinir Ağı (YSA) modelinden elde edilen sonuçların zamanla değişimi	179
Şekil 7.32.	1.5 g L ⁻¹ glikoz derişimindeki fermentasyon ortamında deneysel olarak elde edilen sonuçlarla Yapay Sinir Ağı (YSA) modelinden elde edilen sonuçların zamanla değişimi	180
Şekil 8.1.	Farklı glikoz derişimlerinde <i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) ve <i>Citrobacter freundii</i> pMK79 ile yapılan deneylerde elde edilen maksimum hücre dışı L-DOPA ve Dopamin derişimleri	182
Şekil 8.2.	Farklı pepton derişimlerinde <i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) ve <i>Citrobacter freundii</i> pMK79 ile yapılan deneylerde elde edilen maksimum hücre dışı L-DOPA ve Dopamin derişimleri	182
Şekil 8.3.	Farklı yeast ekstrakt derişimlerinde <i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) ve <i>Citrobacter freundii</i> pMK79 ile yapılan deneylerde elde edilen maksimum hücre dışı L-DOPA ve Dopamin derişimleri	183
Şekil 8.4.	amonyum sülfat derişimlerinde <i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) ve <i>Citrobacter freundii</i> pMK79 ile yapılan deneylerde elde edilen maksimum hücre dışı L-DOPA ve Dopamin derişimleri	183
Şekil 8.5.	Farklı kalsiyum klorür derişimlerinde <i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) ve <i>Citrobacter freundii</i> pMK79 ile yapılan deneylerde elde edilen maksimum hücre dışı L-DOPA ve Dopamin derişimleri	184
Şekil 8.6.	Farklı başlangıç ortam pH'larında <i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) ve <i>Citrobacter freundii</i> pMK79 ile yapılan deneylerde elde edilen maksimum hücre dışı L-DOPA ve Dopamin derişimleri	185
Şekil 8.7.	Farklı ekim derişim (oran)'lerinde <i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) ve <i>Citrobacter freundii</i> pMK79 ile yapılan deneylerde elde edilen maksimum hücre dışı L-DOPA ve Dopamin derişimleri	185
Şekil 8.8.	Farklı ortam sıcaklıklarında <i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) ve <i>Citrobacter freundii</i> pMK79 ile yapılan deneylerde elde edilen maksimum hücre dışı L-DOPA ve Dopamin derişimleri	186
Şekil 8.9.	Farklı çalkalama hızlarında <i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) ve <i>Citrobacter freundii</i> pMK79 ile yapılan deneylerde elde edilen maksimum hücre dışı L-DOPA ve Dopamin derişimleri	186
Şekil 8.10.	Biyoreaktörde farklı karıştırma hızlarında <i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) ve <i>Citrobacter freundii</i> pMK79 ile yapılan deneylerde elde edilen maksimum hücre dışı L-DOPA ve Dopamin derişimleri	187

Şekil 8.11. Biyoreaktörde farklı hava giriş hızlarında *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ve *Citrobacter freundii* pMK79 ile yapılan deneylerde elde edilen maksimum hücre dışı L-DOPA ve Dopamin derişimleri 188

TABLÖLER LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 3.1. <i>Vitreocilla</i> Hemogloblin'nin literatürdeki çalışmalardaki kullanımı	37
Tablo 4.1. Tek substratlı, inhibisyonuz üreme kinetiği modelleri	45
Tablo 4.2. Substrat inhibisyon kinetiği için önerilen modeller	47
Tablo 4.3. Ürün inhibisyon kinetiği için önerilen modeller	48
Tablo 5.1. Luria-Berteni (LB) besi ortamı	62
Tablo 5.2. HPLC işletme parametreleri	69
Tablo 6.1. L-DOPA ve Dopamin üretiminde <i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) yabancı suşu ve <i>Citrobacter freundii</i> pMK79 rekombinant suşu için optimum fermentasyon ortamı bileşenleri derişimleri ve çevresel koşullar	118
Tablo 6.2. <i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) yabancı suşu için kesikli olarak işletilen biyoreaktörde farklı karıştırma hızlarında k_{La} ve r_o değerlerinin kalma süresi ile değışimi	128
Tablo 6.3. <i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) yabancı suşu için kesikli olarak işletilen biyoreaktörde farklı hava giriş hızlarında k_{La} ve r_o değerlerinin kalma süresi ile değışimi	129
Tablo 6.4. <i>Citrobacter freundii</i> pMK79 rekombinant suşu için kesikli olarak işletilen biyoreaktörde farklı karıştırma hızlarında k_{La} ve r_o değerlerinin kalma süresi ile değışimi	130
Tablo 6.5. <i>Citrobacter freundii</i> pMK79 rekombinant suşu için kesikli olarak işletilen biyoreaktörde farklı hava giriş hızlarında k_{La} ve r_o değerlerinin kalma süresi ile değışimi	131
Tablo 7.1. Hamming uzaklığı ve gri kodlama	140
Tablo 7.2. Biyolojik çaprazlama örneğı	141
Tablo 7.3. İki bitlik çaprazlama örneğı	142
Tablo 7.4. Fermentasyon ortamını tanımlamak amacıyla uygunluğu test edilen model eşitlikleri	163
Tablo 7.5. MATLAB 7.04 Genetik Algoritma Toolbox'ı ile hesaplanmış, matematiksel modellere ait kinetik parametrelerin değıerleri	167
Tablo 7.6. İstatistiksel testler ile elde edilen sonuçlar	169
Tablo 7.7. Yapay Sinir Ağı (YSA) uygulaması sonucu istatistiksel testler ile elde edilen sonuçlar	173

SİMGELER LİSTESİ

VHb	: Vitrocella hemoglobin
vgb	: Vitrocella hemoglobin geni
C _o	: Sıvı ortamdaki çözünmüş oksijen derişimi (mg L ⁻¹)
C _o [*]	: Sıvı ortamdaki çözünmüş oksijenin doygunluk derişimi (mg L ⁻¹)
C _x	: Sıvı ortamdaki mikroorganizma derişimi (mg L ⁻¹)
r _o	: Oksijen tüketim hızı (mol m ⁻³ s ⁻¹)
r _o [']	: Birim hücre başına oksijen tüketim hızı (mol m ⁻³ s ⁻¹)
k _{La}	: Sıvı faz kütle aktarım katsayısı (s ⁻¹)
V	: Sıvı kültür hacmi (L)
K _m	: Michaelis- Menten sabiti
μ	: Spesifik üreme hızı (saat ⁻¹)
x	: Hücre derişimi (g L ⁻¹)
r _x	: Büyüme hızı
r _S	: Substrat tüketim hızı
r _P	: Ürün oluşum hızı
r _d	: Hücrelerin ölüm hızı
K _{sx}	: Monod doygunluk sabiti (g L ⁻¹)
K _{sp}	: Kinetik parametre (g L ⁻¹)
K _{is}	: Substrat inhibisyon sabiti (g L ⁻¹)
K _{ip}	: Ürün inhibisyon sabiti (g L ⁻¹)
K _{ps}	: Kinetik parametre (g L ⁻¹)
K _{pp}	: Kinetik parametre (g L ⁻¹)
K _{ipp}	: Kinetik parametre (g L ⁻¹)
t	: Zaman
n	: Katsayı
q _{pmax}	: Spesifik üretim hızı (U g ⁻¹ h ⁻¹)
Y _{X/S}	: Hücre için verim faktörü (g _{hücre} g _{substrat} ⁻¹)
Y _{P/S}	: Ürün için verim faktörü (g _{ürün} g _{substrat} ⁻¹)
m	: Hücre için bakım katsayısı (g _{substrat} g _{hücre} ⁻¹ h ⁻¹)
α	: Üremeye bağlı ürün oluşum sabiti
β	: Üremeye bağlı olmayan ürün oluşum sabiti

1. GİRİŞ

Doğada milyonlarca canlı türü bulunmasına rağmen, bu çeşitlilik içinde canlılar arasında bir ortak yapı ve karakter mevcuttur. Mikroorganizmalar insanların sahip olduğu birçok gene sahip olmalarının yanı sıra insanlarda olmayan bazı genleri de bünyelerinde barındırmaktadır. Mikroorganizma terimi bakteri, fungus, alg ve hatta protozoaları da içeren mikro boyutlardaki geniş yelpazede birçok canlıyı tanımlamak için kullanılmaktadır. Bakteriler bunlar arasında ve hatta tüm canlılar arasında yerküre üzerinde en yüksek sayıda ve kütlede bulunan mikroorganizmalardır.

Bakteriler, çoğalmak için yenilenebilir ucuz kaynakları karbon ve enerji kaynağı olarak kullanmaları, belirli bir sürede yüksek oranda çoğalma yetenekleri, nispeten basit yapıları ile değişikliğe uğratılabilir özelliklerinden dolayı ve ucuz maliyet sağladıkları için sağlık endüstrisinde kullanılan birçok ilacın doğal yollardan sentezlenmesinde kullanılmaktadır. Günümüzde bakteriler tarafından herhangi bir genetik manipülasyona gerek duyulmadan endüstriyel boyutlarda üretilen bir çok ürün (amino asit, etanol, enzimler, sitrik asit gibi daha bir çok diğer spesifik kimyasal ve metabolit) bulunduğu gibi, bakterilerin kendileri tarafından yapılamayan ancak çeşitli endüstri kollarında yüksek kullanım potansiyeli olan bir çok ürün rekombinant teknikler kullanılarak bakterilerin genetik manipülasyonu ile başarılmaktadır. Genetik mühendisliği alanında yakın zamanda geliştirilen teknikler sonucunda antibiyotikler ve hormonlar gibi daha pek çok yararlı ürünün bakteriler tarafından geniş ölçekte üretilmesi mümkün kılınmıştır [1]. Bakterilerin bu yöndeki kullanım potansiyelleri onlara sadece heterolog bir gen aktarılması ile sınırlı değildir. Bakterilerde doğal olarak işleyen metabolik şemaya ek olarak bazı durumlarda bakteriler genetik olarak kısmen modifiye edilir ve amaca uygun yeni bir üretim şeması elde edilebilir. Özellikle bakterilerin birçok hastalığın tedavisinde kullanılan ilaçlar için temel kaynaklar olması ve genetik mühendislik çalışmalarının hızla gelişmesi etkin ilaç üretimi için yeni çözümleri beraberinde getirmiştir. Örneğin, insülin böyle bir teknoloji ile insan insülin geninin *Escherichia coli*'ye aktarılması ile ticari amaçlı olarak üretilen ürünlerden sadece bir tanesidir. Metabolik mühendislikte genetik mühendisliğin araçları kullanılarak (yeni gen veya regülatör DNA dizileri bakterinin genomuna aktararak) organizmanın metabolit üretim kapasitesi istenilen yönere ayarlanabileceği gibi, bazen organizmada bu değişiklikler yapılmadan da organizmanın normal koşullar altında çok az

ürettiği bir metabolit için uygun kimyasal ve fiziksel ortamlar sağlanarak da o metabolitin yüksek miktarlarda üretimi söz konusu olabilmektedir.

Aerobik mikroorganizmalar için oksijen hayati bir öneme sahiptir. Oksijen, organizmaların enerjilerinin (ATP) büyük kısmını sağladıkları oksidatif fosforilasyon olayının gerçekleşmesinde kullanılmasının yanı sıra birçok enzim tarafından substrat olarak da kullanılmaktadır. Aromatik halkaya sahip zararlı bileşiklerin yıkılmasından, reaktif oksijen türlerine ve hücredeki diğer birçok doğal metabolik reaksiyona kadar birçok enzim oksijeni kullanarak bu bileşiklerin metabolizmasını gerçekleştirmektedir. Birçok mikroorganizma için ortamdaki oksijen dalgalanmaları üreme ve çoğalma için belirleyici rol oynamaktadır. Fermantasyon ortamındaki çözünmüş oksijen derişimi belli sınırlar altına düştüğü zaman, bütün hücrelerin fizyolojik ve metabolik aktivitelerinde önemli değişimler olurken, çoğu zaman hücre büyümesi durmakta ve olay hücre parçalanması ile son bulmaktadır [2].

Günümüzde ortalama insan ömrünün artmasına paralel olarak ileri yaşlara özgü hastalıklar olan nörodejeneratif hastalıklar (Alzheimer ve Parkinson vb.) grubunda bir artış gözlenmiştir. Nörodejeneratif hastalıklar, yalnız hastalar ve onlara bakmakla yükümlü yakınlarının yaşam kalitesini düşürmekle kalmamakta, aynı zamanda aile ve ülke ekonomisine giderek artan bir yük oluşturmaktadır. 20. yüzyıl başlarında 60 yaş ve üstü nüfus toplam dünya nüfusunun yüzde 4'ünü oluştururken, 21. yüzyılda 65 yaş üstü nüfusun yüzde 17'leri bulacağı öngörülmektedir [3]. Dolayısı ile yaşlanmaya bağlı hastalıkların erken teşhis ve tedavisinin önemi ortaya çıkmaktadır. İlerleyen yaşlarda görülen nörodejeneratif hastalıkların en önemlileri demansın yani bunamanın en sık görülen ve özgün bir çeşidi olan "Alzheimer Hastalığı" ile hareketlerde yavaşlama ve ellerde titreme belirtileri gösteren "Parkinson Hastalığı"dır.

Son yıllarda bu hastalıklar üzerine yapılan çalışmalar sonunda bu tip hastalıkların yaşlılığın bir kaderi olmadığı, erken tanı ve etkin tedaviyle en azından hastalıkların ilerlemesinin durdurulup, temel hedef olan hasta ve yakınlarının yaşam kalitesinin arttırılabileceği ortaya konmuştur. L-DOPA'nın Parkinson Hastalığı'nda temel ilaç olarak kullanılması ve Dopamin'in kan basıncını ve kardiyak verimini arttırmak amacıyla kullanılması bu bileşiklere olan ilgiyi arttırmıştır.

Vitreoscilla hemoglobini (VHb) bakteriyel orijinli bir hemoglobin olup, prokaryotik hemoglobindir. VHb geni (*vgb*) klonlanmış tüm heterolog (yabancı) organizmalarda bu proteinin organizmalar üzerinde pozitif etkisi olduğu belirlenmiştir. Bu pozitif etkinin

özellikle yüksek oksijen seviyesi gerektiren proseslerde daha etkin olduğu belirlenmiştir. Vhb'nin organizma üzerindeki ve ürün üretimindeki etkisi en açık şekilde düşük oksijen derişimlerdeki ortamlarda görölmektedir [4].

Bu çalışmanın amacı, *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ve *Erwinia herbicola* (NRRL B-3466) gibi gram-negatif bakterilerin doğal (yabanıl) suşlarına *Vitrocella* hemoglobin (Vhb⁺/Vhb⁻) geni (*vgb*⁺/*vgb*⁻)'nin aktarılması ve bu rekombinantları kullanarak endüstriyel açıdan önemli fermantatif ürünler olan L-DOPA ve Dopamin üretiminin araştırılmasıdır. Diğer bir deyimle, oluşturulmuş olan rekombinantların L-DOPA ve Dopamin gibi iki önemli nörotransmitteri değişik kültür ortamlarında üretme karakteristikleri, bunların yabanıl suşlarına göre karşılaştırmalı olarak çalışılmıştır. Çalışmalar orbital çalkalamalı inkübatördeki erlenlerde ve kesikli olarak işletilen biyoreaktörde gerçekleştirilmiştir. Çeşitli kültür ortamlarında yapılan deneylerde L-DOPA ve Dopamin sentezi üzerine karbon kaynağı (glikoz) derişimi, organik (pepton, yeast ekstrakt, üre) ve inorganik ((NH₄)₂SO₄, NaNO₃) azot kaynakları ve derişimleri ile diğer ortam bileşenleri (NaCl ve CaCl₂)'nin yanı sıra, ekim (İnokulum) derişimi (oranı), pH, sıcaklık, çalkalama hızı, karıştırma hızı ve hava giriş hızı gibi parametrelerin etkileri de incelenmiştir. Erlenlerde ve biyoreaktörde gerçekleştirilen deneylerde biyoproses şartları optimize edilerek maksimum ürünün elde edildiği fermantasyon ortamı belirlenmiştir. Deneysel çalışmaları takiben L-DOPA ve Dopamin sentezine ilişkin veriler (mikrobiyal büyüme hızı, substrat tüketim hızı ve L-DOPA'nın biyosentez hızı) ışığında matematiksel modelleme teknikleri kullanılarak sistemin matematiksel modelinin eldesine çalışılmıştır.

2. FERMANTASYON

Fermantasyon, organik maddelerin enzim katalizli dönüşümlerini gerçekleştirmek için mikroorganizmalar kullanılarak belirli ürünlerin oluşturulma prosesi olarak tanımlanır. Molekül ağırlıkları büyük organik maddelerin, havalı ya da havasız şartlarda, molekül ağırlığı daha küçük organik maddelere mikroorganizmalar tarafından parçalanmasıdır [5].

Fermantasyon prosesleri için genel ifade aşağıdaki şekilde verilebilir;

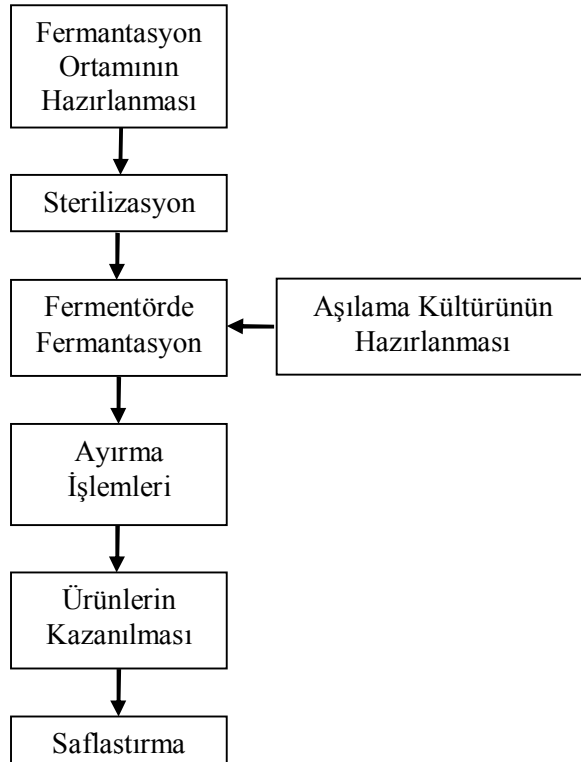
Mikroorganizma + Substrat $\longrightarrow$ Daha Fazla Mikroorganizma + Fermantasyon Ürünleri

Fermantasyon ürünleri dört ana grupta toplanabilir;

1. Mikrobiyal hücreler
2. Enzim ve polisakkarit gibi büyük moleküller
3. Primer metabolitler
4. Sekonder metabolitler

2.1. Fermantasyon İçin Uygulanan Teknik İşlemler

Fermantasyon için uygulanan teknik işlemler sadeleştirilerek Şekil 2.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Fermantasyon akış şeması.

2.1.1. Fermantasyon Ortamının Hazırlanması

Bu konuda dikkat edilmesi gereken en önemli nokta mikroorganizmaların kullanabileceği ucuz substratların seçimidir. Mikroorganizmaların gelişmesi için suyun varlığı ön planda gelir. Birçok mikroorganizma gelişmesi için gerekli olan karbonlu bileşikler organik karbon kaynaklarından karşılar ve biyosentezi de bu yoldan yapar. Azot kaynağı olarak organik azotlu maddeler ya da inorganik azotlu maddelerden yararlanılır. Mikroorganizmaların temel karbon ve azot kaynaklarının dışında oksijen, fosfat, kükürt, potasyum, kalsiyum, magnezyum, demir gibi elementlere de ihtiyaç duyduğu bir gerçektir [6].

2.1.2. Fermantasyon Ortamının Sterilizasyonu

Hazırlanan besiyeri ve kullanılan sistem yabancı mikroorganizma ihtiva etmemelidir. Bu nedenle fermantasyon işleminde kullanılan besi yerinin, aletlerin ve eğer fermantasyonda havalandırma yapılıyorsa kullanılan havanın sterilize edilmesi zorunludur.

Besiyerinin sterilizasyonunda ısısal (termal) yöntemler kullanılır ve genellikle “yüksek sıcaklık kısa süre” tekniği uygulanır. Besiyerinde, vitamin gibi ısıya az dirençli bileşiklerin ısısal bozunma aktivasyon enerjilerinin bilinmesi ve sterilizasyonun mikroorganizmaları öldürecek, ancak besiyerindeki yararlı bileşikler en az oranda bozacak koşullarda yapılması yada bu tür bileşenlerin diğer sterilizasyon yöntemleri kullanılarak sterilize edilmesi gerekmektedir. Sterilizasyon için uygulanan yöntemler şu şekilde sıralanabilir;

- Su buharı ile doğrudan sterilizasyon
- Su buharı ile basınç altında sterilizasyon
- Kuru hava ile sterilizasyon
- Kimyasal maddelerle sterilizasyon
- Işınlamayla sterilizasyon
- Filtrasyon ile sterilizasyon

2.1.3. Aşılama Kültürünün Hazırlanması

Laboratuarda +4 °C’de katı (agarlı) veya sıvı besiyerlerinde saklanan mikroorganizmalar, erlenlerde ve laboratuvar fermantöründe üretilir ve hazırlanan aşı kültürü oradan da mikrobiyal ürün üretiminin gerçekleştiği fermantöre ekimi gerçekleştirilir. Aşı kültürünün çoğaltılmasında genellikle üretim fermantöründe kullanılan

substrat ve besi yeri seçilir. Böylece fermantasyonda kullanılacak mikroorganizmalar fermantörde kullanılacak olan substrata ve besiyerine alıştırmış olur. Aşı kültürünün çoğaltılmasında genellikle kültür, kendisinin 10-100 katı hacmindeki besiyerine aşılanır.

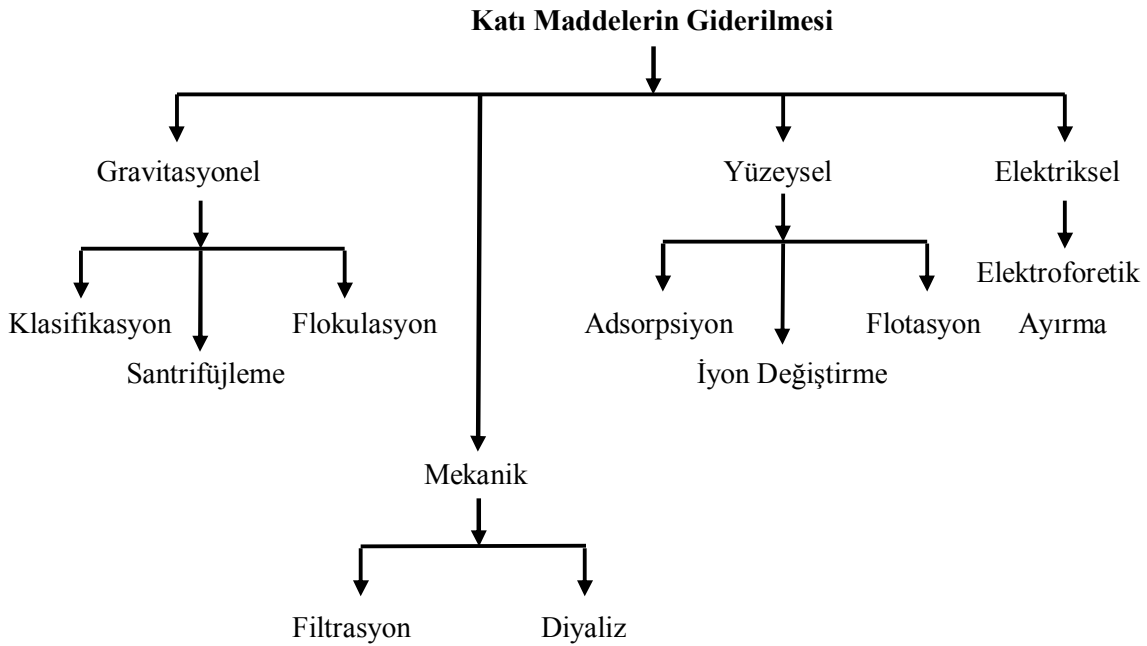
2.1.4. Fermantasyon

Fermantasyonda kullanılacak olan mikroorganizmalar istenilen oranda çoğaltıldıktan sonra üretim fermantöründe esas fermantasyona geçilir. Üretim fermantörüne mikroorganizma aşılanarak belirlenen şartlarda fermantasyon sürdürülür. Laboratuvarda üretim için genellikle sıcaklık ve çalkalama hızının sabit tutulduğu çalkalayıcılardaki erlenlerde gerçekleştirilir.

2.1.5. Fermantasyon Sıvısından Biyokütlenin Ayrılması

Fermantasyon sıvısında ürünün yanı sıra mikroorganizmalar, besiyerini oluşturan harcanmamış substratlar, nutrientler ve yan ürünler de bulunabilmektedir. Ürünün saflaştırılmasına geçilmeden önce fermantasyon sıvısından katı maddelerin ayrılması gerekmektedir. Katı maddelerin fermantasyon sıvılarından ayrılma yöntemleri Şekil 2.2.'de özetlenmektedir.

Fermantasyon endüstrisinde en çok gravitasyonel ve mekanik yöntemlerden yararlanılmaktadır. Bunlar arasında da santrifüjleme ve filtrasyon ilk sırada yer almaktadır.



Şekil 2.2. Katı maddelerin kültür karışımından ayrılması [5].

Fermantasyon işleminde kimi durumlarda ürün, hücre içerisinde bulunan herhangi bir enzim, nükleik asit yada metabolit gibi biyokimyasal maddeler veya maya ve aşı örneğinde olduğu gibi mikroorganizmanın bizzat kendisi de olabilir. Ürün olarak mikroorganizma veya mikroorganizma sıvısındaki metabolitlerin kazanılması isteniliyorsa, saflaştırmaya yönelik temel işlemler fermantasyon sıvısından ayrılan hücrelere uygulanır. Eğer ürün, fermantasyon sıvısında ise, saflaştırma işlemi taneciklerden ayrılan bu sıvı üzerinde yapılır.

2.1.6. Ürünün Kazanılması

Fermantasyon sıvısında oluşan ürünler, mikroorganizmalar tarafından dışarıya salgılanan hücre dışı metabolitler (enzim, organik asit vb.) ya da hücrelerin parçalanması sonucu elde edilen protein, RNA, DNA vb. tür biyokimyasal maddeler istenilen saflık derecesine göre çeşitli saflaştırma yöntemleri (vakum kurutucu, diyaliz hücresi vb.) uygulanarak saflaştırılırlar.

2.2. Mikrobiyal Proseslerde Üretimi Etkileyen Parametreler

Karbon (C) kaynağı, azot (N) kaynağı, fosfor (P) kaynağı, inorganik tuzlar, vitaminler gibi bileşenlerin girdi olduğu ve mikroorganizmalar kullanılarak üretilen ürünlere “mikrobiyal ürünler”, bu ürünlerin (antibiyotikler, farmasötik proteinler, amino asitler, organik asitler, enzimler) elde edildiği ve çeşitli ayırma işlemleri ile istenen niteliğe getirildiği proseslere de “mikrobiyal ürün üretim prosesleri” denir.

Mikrobiyal ürün üretim proseslerinde üretimi etkileyen parametreler aşağıdaki şekilde sıralanabilir [7]:

1. Mikroorganizma
2. Ortam bileşimi
3. Biyoreaktör işletim türü
4. Biyoreaktör işletim parametreleri
 - a) pH ve sıcaklık
 - b) Oksijen aktarımı
 - Havalandırma hızı
 - Karıştırma hızı

2.2.1. Mikroorganizma Seçimi

Mikrobiyal ürün üretim proseslerinde istenilen nitelikte ve nicelikte ürün üretmenin birinci koşulu onu üretebilen uygun mikroorganizmayı seçmektir. Mikroorganizmalar farklı ürünler üretebildikleri gibi, aynı ürünü üretebilen farklı mikroorganizmalar da bulunmaktadır. Günümüzde seleksiyon ve mutasyon gibi teknikler yanında, genetik mühendisliği teknikleri ile verim ve seçimliliği yüksek mikroorganizma geliştirilebildiği gibi, metabolik mühendisliği teknikleriyle kararlılığı ve aktivitesi yüksek, istenen ortamda ve istenen koşullarda tepkimeleri katalizleyebilen enzimlerin de geliştirilmesi araştırma geliştirme ile artık mümkündür.

Bazı mikroorganizmalar aşırı şartlarda (çok sıcak veya çok soğuk, asidik veya bazik gibi) üretim yapabilmektedirler. Örneğin denizden izole edilen mikroorganizmalar (izole edildikleri yerlere bağlı olarak) çok yüksek basınçlara dayanabilirler. Birçok mikroorganizma için ürettikleri spesifik kararlı proteinler belirlenmiş ve özellikleri araştırılmıştır. İstenilen kararlılıkta ve istenilen katalitik etkiye sahip enzimi üreten mikroorganizmayı bulmak için birçok mikrobiyal türün araştırılması gerekir.

2.2.2. Ortam Tasarımı: Bileşenler ve Bileşimleri

Üretim potansiyeli olan mikroorganizma seçimi yapıldıktan sonra mikrobiyal ürün üretim proseslerinde istenilen ürünün maksimum ürün verimi ve seçimliliği sağlanarak üretilmesi için uygun ortam bileşenlerinin belirlenmesi ve optimum bileşimin bulunması için fizyolojik araştırma gerekmektedir. Fermantasyon ortamında mikroorganizmanın çoğalması, istenilen ürünü sentezlemesi ve diğer işlevlerini gerçekleştirebilmesi için ortamda gerekli maddeler bulunmalıdır. Ortam bileşimi ürün için farklı, hücre çoğalması için farklı olabilir. Bu nedenle amaç doğrultusunda ortam tasarımı yapılır. Hazırlanan fermantasyon ortamı, belirli bir mikroorganizmanın çoğalması, fizyolojik yaşamını sürdürebilmesi ve istenilen ürünü üretebilmesini sağlayacak nitelikte gerekli maddeleri içermelidir. Mikroorganizmalar için gerekli bileşenler, genel olarak aşağıdaki temel gruplara ayrılır:

1. Karbon, hidrojen, oksijen ve azot gibi mikroorganizma yapısının temelini oluşturan elementleri sağlayan bileşikler
2. Yukarıda sayılan temel elementlere kıyasla ikinci derecede önemli olan fosfor, potasyum, kükürt ve magnezyum gibi elementleri sağlayan bileşikler

3. İz elementler

4. Vitamin gibi metabolizmada çeşitli görevleri olan özel maddeleri sağlayan bileşikler

Mikroorganizmalar için gerekli bileşikleri içeren ortamlar “tanımlanmış”, “yarı tanımlanmış” ve “kompleks” olmak üzere üç grupta incelenebilir. Tanımlanmış ortama “sentetik ortam” da denilebilir. Bu durumda fermentasyon ortamında bulunan bileşenlerin bileşimleri net olarak bilinir. Yarı tanımlanmış ve kompleks ortamlarda ise çok sayıda bileşen içermeleri sebebiyle bu ortamların analizleri yapılarak tam bileşimlerinin belirlenmesi güçtür.

Mikroorganizmalar türüne bağlı olarak da farklı bileşikler tüketirler. Bu yüzden mikroorganizmadan mikroorganizmaya ortam tasarımı değişmektedir. Mikrobiyal ürün üretim proseslerinde, mikroorganizmalar için gerekli ortamları oluşturan ana maddeler ve bunların özellikleri aşağıdaki temel gruplara ayrılmıştır:

2.2.2.1. Karbon kaynakları

Anaerobik metabolizmada mikrobiyal ürün üretim proseslerinde, ortamdaki karbonun yaklaşık % 10'u; aerobik metabolizmada ise % 50-55'i hücre yapısını oluşturmak üzere kullanılır. Genel olarak ortama katılan karbonlu bileşikler mikroorganizmalar tarafından aynı zamanda enerji kaynağı olarak da kullanılırlar. Karbon kaynağı olarak en sık kullanılan bileşikler karbonhidratlardır. Özellikle kompleks ortamı oluşturan melas, nişasta, selüloz vb. karbonhidratların kullanılması ekonomik açıdan da yararlıdır. Ayrıca hidrokarbonlar, alkoller, yağ ve yağ asitleri de karbon kaynağı olarak kullanılabilir. Ayrıca hidrokarbonlar, alkoller, yağ ve yağ asitleri de karbon kaynağı olarak kullanılabilir.

Bazı mikroorganizmalar, karbon kaynaklarını seçimli olarak kullanabilir. Ortamda birden fazla karbon kaynağı varsa mikroorganizma önce en az enerji harcayarak metabolize edilecek kaynaktan başlamak üzere sırasıyla karbon kaynaklarını kullanır.

Birçok proste karbon kaynakları ürün oluşumunu hızlandırdığı halde bunların fazlası katabolit geriletilici etkisi göstererek ürün oluşumunu yavaşlatabilir. Bu tür proseslerde çoğalmayı hızlandıran karbon kaynağının fazlasından kaçınılmalı, buna ek olarak ürün oluşum hızına olumsuz etki etmeyen ya da bu olayı hızlandıran karbon kaynağı ile ortamdaki karbon eksikliği giderilmelidir [5].

2.2.2.2. Azot kaynakları

Mikrobiyal ürün üretim proseslerinde kullanılan azot, basit inorganik kaynaklardan (amonyak, nitrat ve amonyum tuzları gibi) kompleks karışımlara (maya özütü, pepton, pamuk çekirdeği unu gibi) kadar geniş bir alandan sağlanabilir. Çoğunlukla amonyak, amonyum sülfat ya da amonyum fosfattan yararlanılır. Bazı mikroorganizmalar ise yalnız organik azot kullanırlar. Saf organik azot bileşikleri oldukça pahalıdır. Soya, kazein, mısır altı şurubu, balık unu, maya unu, peynir altı suyu gibi kompleks azot kaynaklarının kullanımı ise oldukça ekonomiktir. Azotlu maddelerin de fazlası üretime olumsuz yönde etki edebilir. Azot kaynakları da bazı durumlarda enerji kaynağı yerine geçebilmektedir [7].

2.2.2.3. İz elementler

Mikroorganizmalar karbon ve azot kaynaklarının dışında Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, Zn vb. elementlere de ihtiyaç duyarlar. Fosfor, kükürt ve esansiyel katyonlar genellikle inorganik tuzlardan sağlanır. İz elementler bazen özellikle ortama eklenir, fakat sıklıkla su ve diğer ortam bileşenlerindeki safsızlık olarak da bulunabilmektedirler.

Eser elementlerin fazlası mikroorganizmanın gelişmesine karşı inhibitör etkisi gösterebilir. Ayrıca bazı iyonlar ortamda bulunan amino asit, protein vb. maddelerle yada oluşan ürünlerle kompleks oluşturarak biyoproses işlemine olumsuz etki yapabilmektedir. İnhibitör etkisi gösteren bu elementlerin fazlasının çıkarılması, mikroorganizmalar için gerekli ortamın hazırlanmasında göz önüne alınması gereken en önemli hususlardan biridir [5].

2.2.2.4. Diğer bileşikler

Bazı durumlarda mikroorganizmaların büyümeleri için ortamda vitamin (tiamin, biyotin) gibi büyüme faktörüne de ihtiyaç bulunabilir [5, 8]. Ortam dizaynında, indükleyici etkisi de göz önünde bulundurulmalıdır. Bazı ürünler sadece spesifik indüktörlerin varlığında sentezlenirler.

2.2.3. Biyoreaktör İşletim Türü

Mikrobiyal ürünlerin üretilmesinde kullanılan iki ana proses vardır. Fermantasyon daldırmalı kültür tekniği veya katı hal fermantasyonu ile gerçekleştirilir.

2.2.3.1. Daldırmalı Kültür Tekniği

Daldırmalı fermantasyon, sıvı ortamda tamamen çözünmüş yada katı süspansiyon halindeki nütrientleri kullanan, süspanse haldeki mikroorganizmaların gelişmesiyle oluşur. Bu yöntemde mikroorganizma besiyerinin içerisinde geliştirilir. Gerekli hava substratın yüzeyi üstünde bulunur veya havalandırma düzeni yardımıyla substrat içerisine verilir.

En basit daldırma metodu, aşılınmış sıvı kültürünün çalkalanmasıdır. Bunun için dairesel veya yatay hareketler yapan çalkalayıcılara yerleştirilen erlenler, istenilen hız, süre ve sıcaklıkta çalkalanır. Daha büyük hacimde çalışmalar için daldırma biyoreaktörleri kullanılır. Daldırmalı fermantasyon için bir çok bioreaktör sistemi vardır.

- 1) Mekanik karıştırmalı sistemler
- 2) Konveksiyon akımlı sistemler
- 3) Kabarcık kolon sistemler
- 4) Pnömatik çalışan sistemler

Mevcut sistemlerin çeşitliliğine rağmen pratikte ağırlıklı olarak 1. türden karıştırmalı reaktörler kullanılır.

Bu yöntemde uygun büyüklükteki karıştırmalı bir tanka gerekli bileşimde hazırlanan hammaddeler beslenir. İstenilen pH'ya ayarlanan besleme sürekli Yüksek Sıcaklık Kısa Süre (High Temperature Short Time-HTST) sterilizasyon birimi yardımıyla daha önceden buharla sterilize edilmiş fermentör kaplarına pompalanır. Gerekirse, köpük kırıcı maddeler, viskozite ve çözünübilirliğini ayarlayan bazı maddeler steril ortama ayrıca ilave edilir [9]. Diğer koldan mikroorganizma, fermantöre gelmeden önce birkaç aşı hazırlama safhasından geçer. Kullanılan tanklar fermantasyon ortamının korozyif özelliklerine uygun bir paslanmaz çelikten geniş bir basınç aralığında (tipik olarak vakumdan 20 kPa basıncına kadar) çalışacak şekilde dizayn edilir. Proseste, aerobik mikroorganizmalar kullanılırsa, fermantasyon ortamına steril hava verilmesi gerekir. Ayrıca oksijenin gaz fazdan sıvı faza transferi için ortamın karıştırılması gerekmektedir. Verilen hava içerisindeki mikrobiyal hücrelerin uzaklaştırılmasında endüstride kullanılan temel iki prosesten birincisi, hidrofobik silikon esaslı membran filtreler kullanarak yapılır, diğeri ise ısıyla ön sterilize edilebilen lifli maddeleri içeren derin filtreler kullanılarak yapılır [8]. Sterilize edilen hava fermantasyon ortamına tek veya çok girişli dağıtıcı bir sistem yardımıyla verilir. Karıştırma ise dikey olarak dönen bir shaft üzerine bindirilmiş çok bıçaklı disk türbinlerle yapılır.

Aerobik mikrobiyal büyüme ekzotermik bir süreçtir ve ısı üretir. Havalandırma ve karıştırma prosesleriyle ısı dağılımına ilave olarak fermentasyon sıcaklığını 30-35 °C’de tutmak için ortamdan ısı uzaklaştırılmalıdır. Bakteriyel fermentasyonda daha fazla metabolik ısı üretilmektedir ve bu bazı durumlarda diğer organizmalar için olan değerin iki katı olabilir. Büyümenin ve metabolit üretiminin kontrol altında tutularak sürekli bir ürün eldesi için çeşitli parametreler hem aşı geliştirme hem de fermentasyon ile ürün üretim aşamasında dikkatlice incelenmelidir. Fermentasyon ortamının sıcaklığını, soğutma suyunun sıcaklığını, sıvı hacmini, karıştırıcı hızını, gücünü veya torkunu, hava ve sıvı besleme hızını kültür ortamındaki köpük varlığı gibi fiziksel parametreleri izlemek için çeşitli cihazlar kullanılır.

Fermentasyon kesikli, yarı kesikli ve sürekli kültürasyon metodlarından biriyle yapılabilir. Kesikli kültür fermentasyonda başlangıçta gerekli olan tüm bileşenler (nütrientler ve hücreler) fermentöre ilave edilir. Kültür ortamında büyüme ilerledikçe nütrientler harcanır mikrobiyal kütle artar. Bir kesikli fermentasyon için gerekli zaman, sağlanacak çalışma koşullarına göre birkaç saatten birkaç haftaya kadar değişebilir. Bu süre sonunda fermentasyon ortamı bileşenleri çeşitli ayırma yöntemleri ile ayrılır. Ürün kazanımı amacıyla alt akım işlemleri (santrifüjleme, filtrasyon, diyaliz hücresi, vakum altında buharlaştırma vb.) uygulanır.

Kesikli fermentasyon, biyoteknolojik ürünlerin üretiminde tercih edilen bir metod olarak yaygın bir şekilde kullanılır. Bununla birlikte substrat tarafından katabolit represyon meydana geldiği zaman sınırlı karbon koşullarında çalışabilmek için alternatif olarak yarı kesikli fermentasyon kullanılabilir. Bu tür proseslerin esas özeliği, maksimum üretim periyodunu uzatmak için ilave nütrientlerin fermentasyon ortamına beslenmesidir. Yarı kesikli sistemlerde, yüksek substrat derişimli kesikli fermentasyona göre biyokütle üretimi azalmaktadır ve böylece kütle ve oksijen transfer mekanizmaları kolaylaşmaktadır.

Alternatif bir işletme şekli sürekli kültürasyondur. Burada sürekli olarak kültüre steril taze nütrient beslenirken aynı zamanda ortamdan eşit hacimde karışım fermentörden çekilir. Fermentörü terk eden biyokütle ile hücre büyümesi dengededir. Kemostat olarak adlandırılan sürekli kültür sisteminin en yaygın kullanılan tipi, ortam beslenmesini içeren bileşenlerden biri hariç tüm nütrientleri aşırı olacak şekilde besleme tasarlanır. Bu koşullar altında kararlı halde kültürün spesifik büyüme hızı, seyrelme oranı olarak adlandırılan besleme hacminin kültür hacmine oranı yardımı ile belirlenir. Kültürün biyokütle derişimi besleme ortamındaki sınırlayıcı komponentin derişimi tarafından belirlenir. Sürekli kültür,

klasik kesikli fermantasyon kültüründen daha yüksek verimlilik ve spesifik nutrientin sınırlandırılmasıyla represyon mekanizmalarının etkilerini hafifletebilmesine rağmen, ticari üretim proseslerinde oldukça sınırlı olarak kullanılmaktadır. Bunun sebebini dört başlık altında inceleyebiliriz.

- a) Sürekli proseslerin uzun sürelerinden dolayı yabancı mikroorganizmaların oluşmasıyla fermantasyon ortamının kontaminasyonu muhtemeldir. Kontaminasyon riski sürekli fermantörlerde karşılaşılan en büyük sorundur. Öyle ki kontaminant mikroorganizma tüm fermantöre hakim olabilir. Ticari öneme sahip çoğu ürün (özellikle sekonder metabolitler) mikroorganizma üremesi durduktan sonra yani durağan evrede elde edilir. Büyüme ürün üretimini baskılar ve bu şartlar altında sekonder metabolit üretimi için ideal sistemler kesikli olarak işletilen fermantasyon sistemleridir. Sekonder metabolitlerin üretiminde ürün hızı (productivity) kesikli olarak işletilen sistemlerde sürekli olarak işletilen sistemlere göre daha yüksektir.
- b) Kesikli olarak işletilen fermantasyon sistemlerinin diğer bir avantajı ise mikroorganizmaların genetik stabilitesidir. Çok uzun çalışma saatlerinde özellikle yirmi beşinci jenerasyondan sonra rekombinant mikroorganizmaların yapısal kararlılıkları bozulmaktadır.
- c) Kesikli olarak işletilen fermantörler değişik amaçlar kapsamında değişik zaman dilimlerinde kullanılabilirler.
- d) Ticari metabolitlerin üretim proseslerinde yaygın olarak kullanılan kompleks ortamlarda, büyümeyi sınırlayan nutrientlerin miktarlarının kesin olarak belirlenmesindeki güçlüklerdir.

2.2.3.2. Yüzey Kültür Tekniği (Katı Hal Fermantasyonu)

Bu yöntemde mikroorganizma sıvı, yarı katı veya katı substratın yüzeyinde gelişir. Bu sırada genellikle besiyeri üzerinde, mikroorganizma hücreleri ve bunların metabolitlerinden ibaret bir tabaka ya da misel örtüsü oluşmaktadır. Mikroorganizmalar besiyerinin üzerindeki bu zar üzerinde gelişirler. Metabolizma ürünü hücre içinde kalır, ortama salgılanır ya da her iki halde de bulunur. Besi ortamı sıvı, katı veya yarı katı karakterde olabilir. Bu yöntemde geniş ve yayvan biçiminde çeşitli tür kaplar kullanılır. Yüzey büyüdükçe yüzeydeki misel örtüsünün havalandırılması o kadar kolay olur.

Katı hal fermantasyonu (KHF), düşük nem seviyesi veya su aktivitesinde katı substratların fermantasyonudur. Tipik bir daldırma fermantasyonunun su içeriği % 95'den fazladır. KHF'nda su içeriği % 40 ile % 80 arasında değişir.

Katı hal fermantasyonu, biyokimya ve mikrobiyoloji prensipleri tam olarak anlaşılmadan yüzyıllarca ürün eldesi için kullanılmıştır. Katı hal fermantasyonuyla üretim "koji" prosesine dayanır. Japonların geleneksel koji prosesi, 25-30 °C' de havalandırılmalı bir ortamda tabakalarca istiflenmiş sepetlerde yüksek nemlilikte aşılınmış substratın fermantasyonuyla meydana gelmektedir. Substrat olarak genellikle pirinç, buğday veya soya fasulyesi gibi nemli maddeler kullanılırdı. Bu substratlar üzerinde *Aspergillus oryzae* gibi filamentli mantarların gelişmesiyle enzim karışımı üretilir ve besinlerin tadı değiştirilirdi. Bu tür endüstriyel proseslerin kontrolü çok güçtür. Bu proseslerde hedeflenen modifikasyonlar sıcaklık, pH ve nemlilik gibi çevresel koşulların kontrolünü kolaylaştırmak ve bu kontrolleri fermantasyon yığının tümünü etkileyecek şekilde geliştirmektir. Yakın zamanda yem olarak kullanılan tarımsal yan ürünlerde protein zenginleştirmede, enzim, organik asit ve diğer metabolitlerin üretiminde kullanımı yaygınlaşmıştır [6, 10-11].

Endüstriyel katı hal fermantasyonunun pek çoğu aerobik ortamda gerçekleştirildiğinden fermantasyon şartları oksijen transferinin ve CO₂'yi ortamdan uzaklaştıracak şekilde ayarlanmalıdır. Ayrıca substrat olarak kullanılan partiküllerin büyüklüğü de katı hal fermantasyonunda oldukça önemlidir. Çünkü iyi bir gaz ve ısı transferi için partiküller arasındaki boşluğun optimize edilmesi gerekir. Isının uzaklaştırılması, sistemin hava akış hızının artırılmasıyla nispeten kolaylaştırılabilir.

Katı hal fermantasyonunun avantajları aşağıdaki şekilde özetlenebilir:

- a)** Daha düşük maliyet; kullanılan substratlar genellikle kolay elde edilebilir ve ekonomik olan buğday kepeği, tahıl tanesi, baklagiller v.b. maddelerdir.
- b)** Daha basit bir teknik ve daha az enerjiye ihtiyaç vardır. Kullanılan ekipmanlar düşük güç harcamaktadır.
- c)** Düşük nemli ortamlarda çalışıldığı için kontaminasyona sebep olacak bakteri türlerinin üremesi inhibe edilmiş olur.
- d)** Sistemi terkeden atık suyun daha az olmasıdır.
- e)** Köpük oluşumunun olmamasıdır.
- f)** Daha fazla prodaktivite olmasıdır.

Bu avantajlarının yanında bazı dezavantajları da vardır. Bunları da şöyle sıralanabilir.

- a) Düşük nem konsantrasyonunda gelişebilen mikroorganizmalar ile sınırlı olması.
- b) Proses parametrelerinin ölçümü kültürün homojen olmamasından dolayı güçtür. (Sıcaklık, oksijen transferi, pH gibi parametrelerin kontrolü zordur.)
- c) Biyokütle miktarının kolaylıkla ölçülememesi.
- d) Substrat için nem oranının tam olarak kontrol edilememesi.

2.2.4. Biyoreaktör İşletim Parametreleri

İşletim sistemine bakılmaksızın (kesikli, yarı kesikli yada sürekli) havalandırma hızı, karıştırma hızı, çözünmüş oksijen, pH ve kültür sıcaklığı fermantasyonu etkileyebilen faktörlerdir.

2.2.4.1. pH

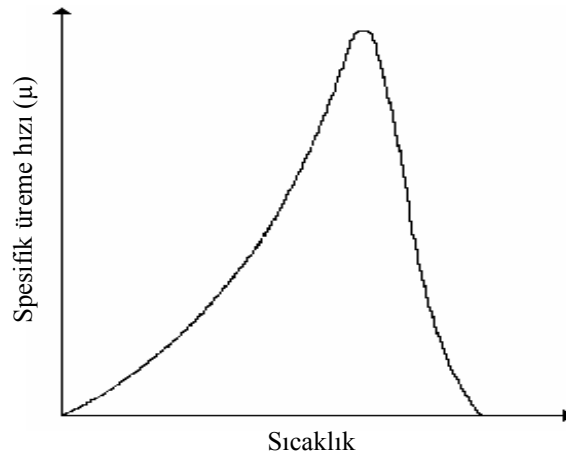
Her mikroorganizmanın özgün bir iç pH değeri vardır ve hücreler yaşamları süresince bu pH değerini sabit tutmaya çalışırlar. Ortamdaki hidrojen iyonu derişimi hücrenin metabolik faaliyetlerine bağlı olarak değişir ve hücre dışındaki değişimlere rağmen hücre, iç pH değerini sabit tutar. Ortam pH'sına bağlı olarak hücre içi tepkimeler ve hızları değiştiğinden, mikrobiyal ürünlerin üretiminde kullanılan mikroorganizmalar, çoğalma ve istenen ürünün üretimi için farklı optimum pH değerine yada aralığına sahip olabilirler. Ayrıca mikrobiyal ürün üretim süresince pH, kullanılan karbon kaynaklarının farklı ürünlere dönüşmesiyle değişme eğilimindedir. Karbonhidratlar, örneğin glikoz kullanıldığında, hücre içi tepkimelerle oluşan organik ve amino asitlerin ortama salgılanmasıyla birlikte ortam pH'sında önce düşme, ortama salgılanan metabolitlerin tekrar hücreye transferi ve kullanımıyla da sonra artış gözlenir. Sonuç olarak fermantasyon sürecinde verim ve seçimlilik açısından dış ortamın pH'sını belli değerde ya da aralıkta tutmak gerekebilir [5].

2.2.4.2. Sıcaklık

Mikroorganizmalar genel olarak üç gruba ayrılabilirler. 20 °C veya daha düşük sıcaklıklarda optimum büyüme gösteren psikrofiller, 35 °C civarında optimum gösteren mezofiller, büyüme sıcaklığı 50 °C'den fazla olan termofillerdir. Her bir sınıf içinde optimum değere doğru sıcaklık artarken spesifik büyüme hızı Arhenius eşitliğindeki ($\mu = Ae^{-E/RT}$) gibidir (Şekil 2.3.). Ancak optimum değer in ötesinde sıcaklığın daha fazla

artmasına rağmen büyüme hızlı bir şekilde azalmaktadır. Büyüme zamanlarını minimize etmek için kültür sıcaklığı mümkün olduğunca optimum sıcaklığa yakın olmalıdır.

Fermantasyon ortam sıcaklığı, mikroorganizma çoğalma hızını olduğu gibi karbon ve enerji kaynaklarının kullanım hızını ve ürün oluşum verimliliğinde de etkilidir. Her mikrobiyal ürün üretim prosesi için mikroorganizmanın çoğalmasının ve ürün oluşumunun maksimum olduğu bir sıcaklık veya sıcaklık aralığı vardır.



Şekil 2.3. Sıcaklığın fonksiyonu olarak spesifik büyüme hızı [8].

2.2.4.3. Oksijen aktarımı

Aerobik proseslerde mikrobiyal hücreler solunum, çoğalma, substrat tüketimi ve ürün sentezi gibi metabolik faaliyetlerini sürdürebilmek için gerekli olan temel girdilerden biri oksijendir. Bu nedenle mikrobiyal ürün üretim ortamındaki çözünmüş oksijen derişimi ve oksijenin aktarım hızı önemlidir. Oksijen aktarımı, ürün verimi ve seçimliliğini etkiler. Bir mikrobiyal ürün üretim prosesinde oksijen gereksinimi ve aktarım hızı, mikroorganizma türü, fermantasyon ortamının fiziksel özelliği, biyoreaktör ve karıştırıcı konfigürasyonu ile ilgilidir. Karıştırmalı biyoreaktörlerde oksijen/hava giriş hızı ve karıştırma hızı önemli işletim parametrelerindendir.

Çözünmüş oksijenin metabolizmaya yeterli hızda aktarılıp aktarılmadığının bilinmesi, hacimsel oksijen aktarım katsayısı (k_La)'nın belirlenmesi ile mümkündür. k_La , mikroorganizma türüne, fermantasyon ortamının özelliklerine (viskozite, sıcaklık vb.), biyoreaktörün ve karıştırıcının boyutlarına, karıştırma ve havalandırma hızlarına bağlıdır [12]. k_La 'nın belirlenmesi için çeşitli deneysel ölçüm yöntemleri geliştirilmiştir [13]. Bunlardan en yaygın olarak kullanılanı dinamik yöntemdir. Kolay uygulanabilir olması ve

gaz içerisindeki bileşenlerin analizine ihtiyaç duyulmaması yöntemin avantajları arasındadır [14]. Yöntem biyoreaktöre gönderilen havanın kısa süreli olarak kesilmesi ve bir oksijen elektrodu ile çözünmüş oksijen derişiminde azalmanın, havanın tekrar sisteme verilmesi ile de artışının incelenmesi prensibine dayanır [15].

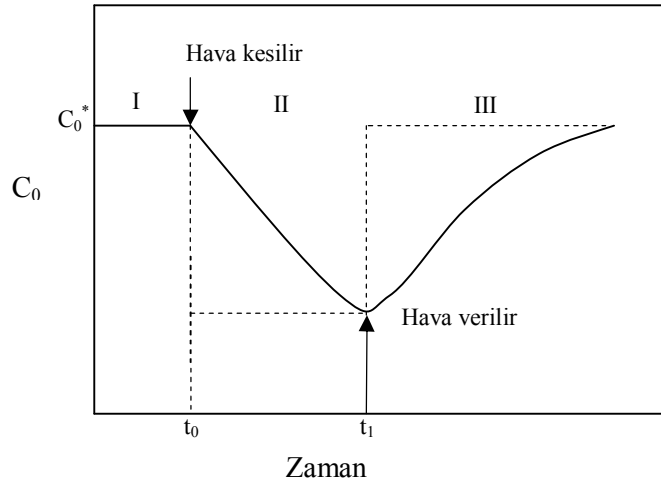
Yatışkın olmayan koşulda kütle korunum denklemi çözünmüş oksijen derişimi cinsinden yazılacak olursa denklem (2.1) elde edilir.

$$k_L a(C_o^* - C_o) + r_o^I C_x = \frac{dC_o}{dt} \quad (2.1)$$

Zamanla çözünmüş oksijen derişimi değışimi Şekil 2.4.'deki gibi karakterize edilmektedir. t_0 anına hava kesilir ve t_1 anında hava yeniden verilmektedir. t_0 anından t_1 anına kadar zamanla çözünmüş oksijen derişimindeki azalma gözlenir. Burada oksijen aktarımı gerçekleşmediğinden $k_L a(C_o^* - C_o)$ terimi sıfıra eşittir ve denklem 2.1 denklem 2.2'ye indirgenir.

$$\frac{dC_o}{dt} = r_o \quad (2.2)$$

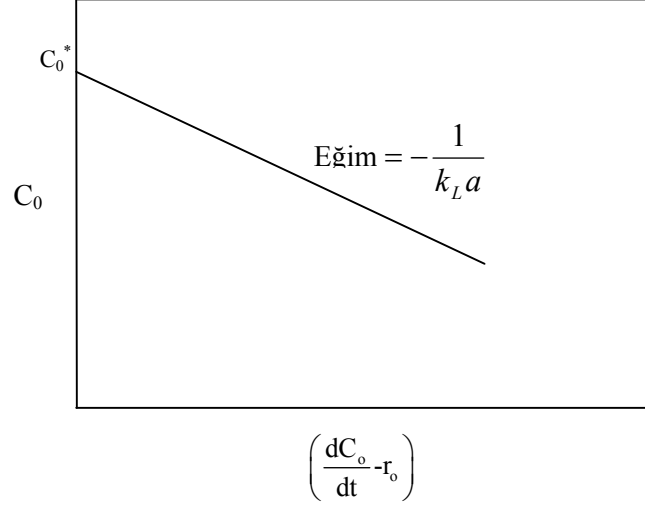
$$r_o = r_o^I C_x \quad (2.3)$$



Şekil 2.4. Çözünmüş oksijen derişiminin kalma süresi ile değışimi.

Denklem (2.2.)'den oksijen tüketim hızı r_o bulunabilir. t_1 anında hava gönderilmesi ile çözünmüş oksijen derişiminin zamanla artışı gözlenmektedir (Şekil 2.4.). Bu durumda

denklem (2.1) geçerlidir. Denklem (2.1) ve (2.2)'den yararlanılarak $\left[\left(\frac{dC_o}{dt} - r_o \right); C_o \right]$ grafiği elde edilir (Şekil 2.5.). Bu grafiğin eğiminden $k_L a$ hesaplanır.

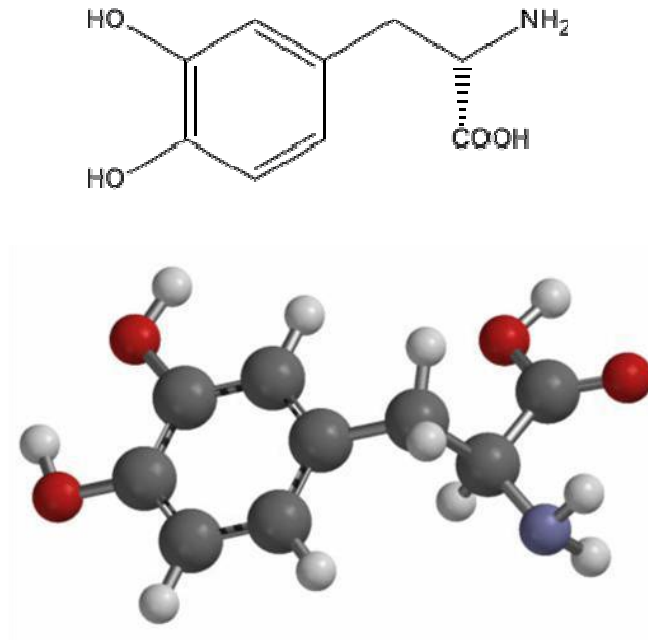


Şekil 2.5. Sıvı faz hacimsel kütle aktarım katsayısı ($k_L a$ (s^{-1}))'nın belirlenmesi.

3. L-DOPA ve DOPAMİN

3.1. L-DOPA (Levodopa)

L-DOPA (3,4-dihidroksi-L-fenilalanin) ve Dopamin, norepinefrin ve epinefrin gibi katekolaminlerin sentezinde yer alan önemli bir ara üründür. L-DOPA'nın kimyasal yapısı ve üç boyutlu görüntüsü Şekil 3.1.'de gösterilmiştir. L-DOPA, vücutta tirozinin tirozin hidroksilaz (TH) enzimi tarafından hidroksillenmesi ile doğal olarak sentezlenmektedir [16].



Şekil 3.1. L-DOPA'nın molekül ve üç boyutlu yapısı.

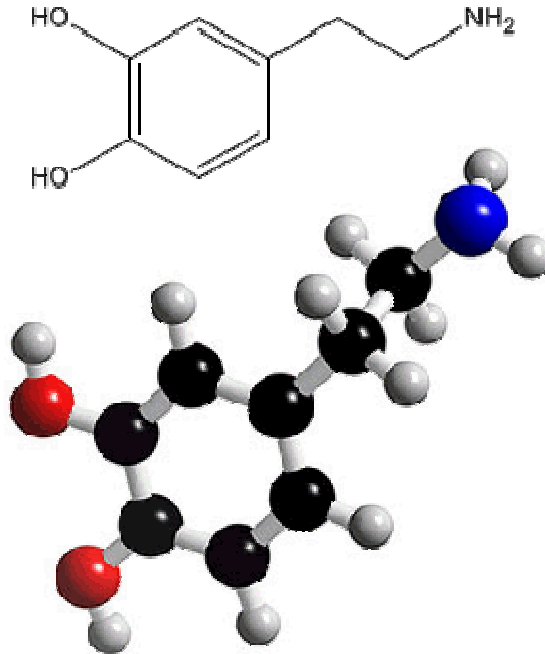
İlk olarak 1913 yılında L-DOPA bakla (*Vicia faba*) tohumlarından izole edildiğinde biyolojik olarak inaktif bir karaktere sahip olduğu ileri sürülmüştür. Ancak 1927 ve 1930 yıllarında yapılan çalışmalar ile L-DOPA'nın glikoz metabolizması ve arteriyal (atardamar) kan basıncı üzerine önemli etkilerinin olduğu kanıtlanmıştır [17].

1938'de L-DOPA dekarboksilaz (DDC) enziminin keşfedilmesi ile L-DOPA'ya olan ilgi yeniden artmıştır. L-DOPA dekarboksilaz insan ve hayvan vücudunda L-DOPA'nın enzimatik olarak Dopamine dönüşümünü katalizlemektedir [18]. 1950'li yıllarda Arvid Carlsson, Parkinson hastalığına benzer semptomlar gösteren farelerde ilaç

olarak L-DOPA'yı kullanmış, bu semptomların azaldığını saptamış ve bu buluşu ile benzer konularda araştırmaları olan Paul Greengard ve Eric Kandel ile birlikte sinir sisteminde sinyal iletimi konusundaki keşif için 2000 Nobel Tıp Ödülünü almaya hak kazanmıştır [17]. 1968'de William Knowless rodyum ile kiral fosfinler kullanarak asimetric hidrojenasyonla L-DOPA sentezini gerçekleştirmiştir. Bu çalışma ise 2001 yılında Nobel Kimya Ödülü'ne layık görülmüştür [19]. Dopaminden farklı olarak, L-DOPA'daki kirallık onun seçici olarak kan-beyin bariyerini geçerek beyne geçmesini mümkün olduğu ve beyinde Dopamine metabolize olarak etki ettiği düşünülmektedir. Bu yüzden L-DOPA günümüzde 1700 kişiden birinin yakalandığı önemli bir nörodejenaratif hastalık olan Parkinson hastalığının tedavisinde 1961 yılından bu yana en etkili ilaç olarak kullanılmaktadır [20]. Dünyada başta Parkinson hastalığı olmak üzere çeşitli nörodejenaratif hastalıkların tedavisinde yıllık gereksinim duyulan L-DOPA miktarının yaklaşık 250 ton seviyelerinde olduğu tahmin edilmektedir [21].

3.2. Dopamin

Dopamin (3,4 dihidroksifeniletılamin), norepinefrin ve epinefrinin öncül maddesi olmasının yanında, nörotransmitter özelliği taşıyan önemli farmakolojik etkilere sahip basit yapılı bir katekolamindir [22]. Dopamin'in kimyasal yapısı ve üç boyutlu görüntüsü Şekil 3.2.'de gösterilmiştir.



Şekil 3.2. Dopamin'in molekül ve üç boyutlu yapısı.

Nörotransmitterler, beyinde iki nöron arasında veya nöron ile hücre arasında elektriksel sinyallerin iletimini sağlayan kimyasallardır. Sinyal iletiminde görev yapan önemli bir nörotransmitter olan Dopamin, beyinde nöron hücreleri tarafından L-DOPA'dan sentezlenmektedir [23]. Dopamin genellikle nöral olanlar başta olmak üzere çeşitli hastalıklardaki tedavi edici (terapötik) etkisi ile bilinmektedir. Dopaminin bu tür hastalıklardaki terapötik fonksiyonu onun kardiyak verimi ve kan basıncını artırmadaki özelliğinden kaynaklanır [24]. Dopaminin beyindeki diğer önemli rollerinden üç tanesi de hareket, algı ve motivasyondaki rolüdür. Dopamin, fiziki hareketlerimizin kontrol edilmesi bakımından önemli olup eksikliği Parkinson hastalığına yol açar. Frontal loblarda Dopamin beyinin diğer alanlarından bilgi akışını kontrol eder. Beynin bu bölgesinde Dopamin seviyesinde meydana gelecek bir bozukluk, algılama dikkat ve problem çözme yeteneklerinde azalmaya neden olur. Ayrıca, retinadaki sinapslarda bulunan Dopamin kırmızı-yeşil renklerin ayırt edilmesinde rol oynamaktadır. Dopamin aynı zamanda zevk ve motivasyonla da ilişkili bir kimyasaldır. Dopamin diğer iki katekolamin (epinefrin ve norepinefrin) gibi akut ve strese adaptasyonda yardımcı hormonlarla birlikte önemli rol oynamaktadır [25].

3.3. Parkinson Hastalığı

Parkinson hastalığı adını hastalığı 1817'de ilk defa titremeli felç olarak tarifleyen İngiliz Doktor James Parkinson'dan almıştır. Parkinson hastalığı beyinin substantia nigra denilen kısmındaki sinir hücrelerinin ölmesi veya hasar görmesi ile ortaya çıkar [19]. Bu hücrelerin yaklaşık olarak %80'i hasar görürse bu hastalığın semptomlarının ortaya çıktığı belirlenmiştir. Hastalığın semptomları titreme, kaslarda oluşan sertlik, hareketlerdeki yavaşlama ve denge bozukluğudur. Diğer semptomlar ise sıkışık ve okunaksız yazı yazma, sert veya sinirli bir yüz ifadesi, ayaklarını sürüyerek yürüme, boğuk bir sesle konuşma ve depresyondur. Sosyal, etnik, ekonomik ya da coğrafik sınırlar tanımayan bu hastalığın kadın ve erkekteki oranı hemen hemen aynıdır [26].

Parkinson hastalığının tedavisi için eksilen ya da doğal yollardan üretilmeyen Dopamini yerine koymak veya Dopamin benzeri etki gösteren ilaçlar (pramipexole, ropinirole, pergolide, bromocriptine) geliştirmek için yapılan çalışmalar önemli ölçüde artmıştır. Ancak bu hastalığın tedavisinde kullanılan en yaygın uygulama, L-DOPA hapları kullanarak Dopamin eksikliğini gidermeye dayalı olanıdır. L-DOPA'nın kan beyin

bariyerine ulaşmadan kanda ve diğer dokularda Dopamine dekarboksilasyonu bu maddenin terapötik etki derecesini önemli ölçüde azaltmaktadır. Bu nedenle L-DOPA uygulamasının onun Dopamin'e dekarboksilasyonunu önleyecek inhibitörlerle (*cardidopa* ve *benserazide* gibi L-DOPA dekarboksilaz (DDC) enzimi inhibitörleri) birlikte yapılmasını gerekmektedir. Dopamin kan-beyin bariyerini geçemediğinden direkt olarak Parkinson hastalığı tedavisinde kullanılmaz. Bu nedenle, Dopamin öncülü olan L-DOPA kullanılarak bu bariyer aşılar ve nöronlara alınan L-DOPA burada DDC enziminin katalizlediği bir reaksiyonla Parkinson hastalığının esas tedavi edici kimyasalı olan Dopamin'e dönüştürülmektedir. Bunun yanı sıra, Dopamin'in direkt olarak kullanım alanları da bulunmaktadır. Örneğin, kardiyak verimi ve kan basıncını artırmak için şok halindeki hastalarda bu madde inotropik ilaç olarak verilmektedir [27].

3.4. L-DOPA ve Dopaminin Bakteriyel Sentezi

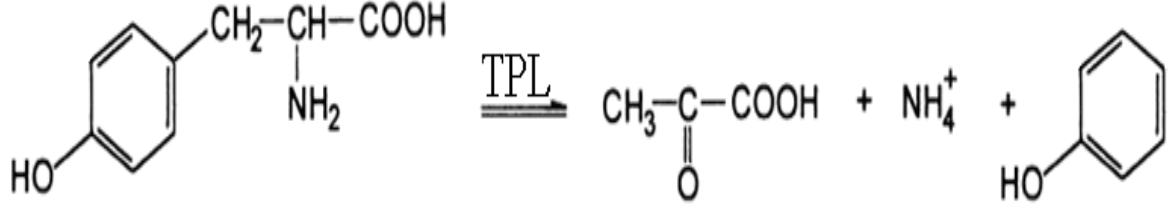
Terapötik açıdan oldukça önemli olan L-DOPA ve Dopamin'in bakteriyel sentezi iki aşamada gerçekleşmektedir. Birinci aşamada tirozin, katekol gibi substratlardan L-DOPA sentezlenirken, ikinci aşamada ise L-DOPA'dan Dopamin sentezlenmektedir.

Birinci basamağında çeşitli substratlardan L-DOPA oluşumunu katalizleyen *tirozin fenol liyaz* (TPL, EC 4.1.99.2) ve ikinci basamağı olan L-DOPA'dan Dopamin oluşumunu katalizleyen *dopa dekarboksilaz* (DDC, EC 4.1.1.28) enzimleri farklı bakterilerde çalışıldığı rapor edilmiştir. Yapılan çalışmalarda L-DOPA sentezi için bir bakteriye ihtiyaç duyulurken, L-DOPA'dan Dopamin sentezi için başka bir bakteriye gereksinim duyulmuştur. Araştırmacılar bu iki aşamayı eş zamanlı olarak başlatarak ardı ardına tepkimeleri gerçekleştirdiklerinde üretkenliğin, aşamalar ayrı ayrı yapıldığındaki üretkenlikten daha düşük olduğunu gözlemlemişlerdir [28-29].

L-DOPA ve Dopamin'in diğer bir oluşum mekanizması ise pentoz fosfat yolunun tirozin amino asiti ile başlayan metabolik sürecinde görülmektedir. *Tirozin hidroksilaz* (TH) enzimi tirozinin aromatik halkasına hidroksil grubu (OH⁻) ekleyerek katekolaminin ilk basamağı olan L-DOPA sentezini başlatmakta ve L-DOPA aromatik *L-amino asit dekarboksilaz* enziminin dekarboksilasyonu ile Dopamin'e dönüşmektedir [30].

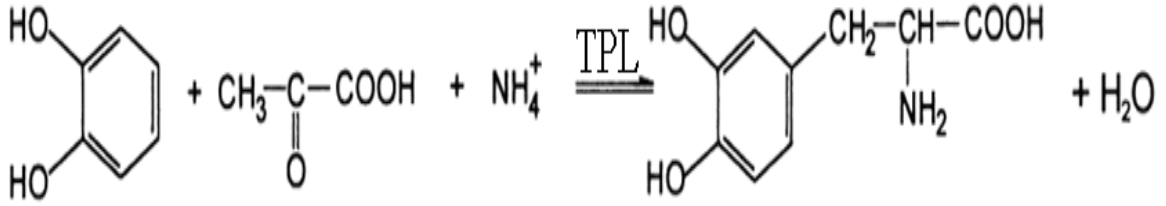
3.4.1. L-DOPA Sentezi

Bakteriyel bir enzim olan *tirozin fenol liyaz* (TPL, EC 4.1.99.2) aracılığı ile L-tirozin L-DOPA'ya dönüştürülür. TPL enzimi normalde L-tirozinden fenol, amonyak ve pirüvat oluşumunu katalizlemektedir (Şekil 3.3.) [31].



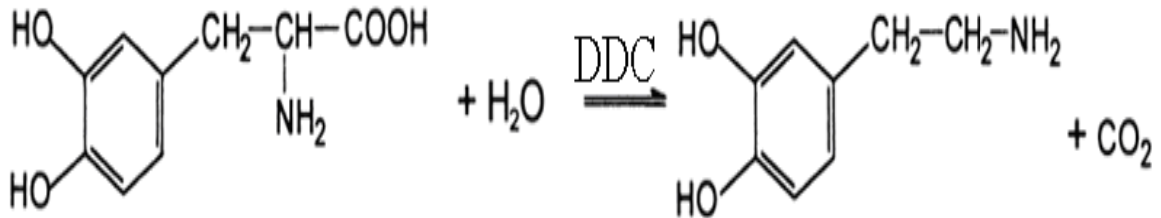
Şekil 3.3. L-tirozinin TPL enzimi ile pirüvat, amonyak ve fenole dönüştürülmesi.

Ortama katekol ilavesi yapıldığında fenol ile katekol yer değiştirerek TPL enzimi aracılığı ile katekol, amonyak ve pirüvattan L-DOPA oluşumunu sağlamaktadır (Şekil 3.4.).



Şekil 3.4. Katekol ilavesi ve TPL enzimi ile L-DOPA'nın yapımı.

Dopamin ise tek bir enzimatik basmakta (L-DOPA dekarboksilaz enzimi yardımı ile) L-DOPA'dan sentezlenmektedir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. L-DOPA'dan Dopamin oluşumu.

3.4.2. Tirozin Fenol Liyaz Enzimi (TPL)

L-DOPA titreme, sertlik, konuşma yavaşlığı ve sonunda akıl hastalığına neden olan dejeneratif bir beyin hastalığı olarak da bilinen Parkinson hastalığının tedavisinde kullanılmaktadır [32]. Her yıl yaklaşık 250 ton L-DOPA elde edildiği ve bunun yaklaşık olarak yarısının *tirozin fenol liyazın* katalizlediği enzimatik metotla oluşturulduğu bildirilmektedir [33].

β -tirozinaz olarak bilinen ve tirozin ile indüklenen *tirozin fenol liyaz* (TPL, EC 4.1.99.2) enzimi tersinir olarak α,β -yıkım, β -değişim ve rasemik gibi multi fonksiyonel reaksiyonları katalizleyen bir enzimdir [34-35]. L-aminoasitler ile α,β -eliminasyon, β -değişim fonksiyonu ile girdiği reaksiyonda amino asitlerin β -karbonlarının bağlı bulunduğu -OH, -SH, fenol gibi fonksiyonel grupların sabit kalmasını sağlamaktadır [32, 36]. Ayrıca TPL enzimi aromatik bir amino asit olan tirozini α,β -eliminasyonu ile pirüvat, amonyak ve fenol oluşturmak için katalizlemektedir. Bunu gerçekleştirebilmek için piridoksal fosfata ihtiyaç duymaktadır. Böylece bakterilere karbon ve azot kaynağı olarak L-tirozinden faydalanma olanağı sağlamaktadır. Bu reaksiyon tersinirdir ve katekol fenol ile yer değiştirdiği zaman L-DOPA üretilmektedir [21, 37-38].

Mikroorganizmalar arasında L-tirozini, fenol, pirüvat ve amonyağa dönüştüren ve TPL tarafından katalizlenen reaksiyon *Enterobacteriaceae* familyasına ait bir özelliktir [39]. Bununla birlikte, *Symbiobacterium* türlerinde de bu çeşit bir reaksiyona rastlanıldığı belirtilmiştir. *Symbiobacterium* sp. SC-1 bakterisinden izole edilen TPL enziminin yüksek derişimlerde toksik etki gösteren katekolün varlığında kararlı kaldığı belirlenmiştir. Bu nedenle bu enzimin katekol, pirüvat ve amonyaktan L-DOPA oluşumu için avantaj sağlayacağı bildirilmiştir [29, 40-41].

TPL enzimi L-tirozin ile indüklenirken, katobolit baskılanmaya maruz kalmış hücrelerde inhibe olmaktadır [42]. TPL, *aminotransferaz* ailesine ait PLP-bağımlı bir enzim (B6 enzimi) olup L-tirozinin β -eliminasyon reaksiyonunu katalizlemektedir. Monovalent katyonların (NH_4^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+) olmadığı ortamlarda enzim aktivitesi görülmezken, Na^+ katyonu enzimi inhibe etmektedir. Birçok PLP-bağımlı enzim normal reaksiyonun yanında yan grup transaminasyon reaksiyonları da gerçekleştirmektedirler. Yani, bu enzimler bir substrattaki amino grubunu ko-enzime bağlayarak piroksidamin fosfat ve bir keto asit oluşumunu sağlamaktadırlar [43]. TPL enzimi, dört aynı alt üniteden meydana gelmiş olup (homotetramer), alt ünitelerin her birinin moleküler kütlesi yaklaşık 50 kDa'dur. Her alt üniteye transaminasyon reaksiyonunda görev yapan bir ko-enzim olan

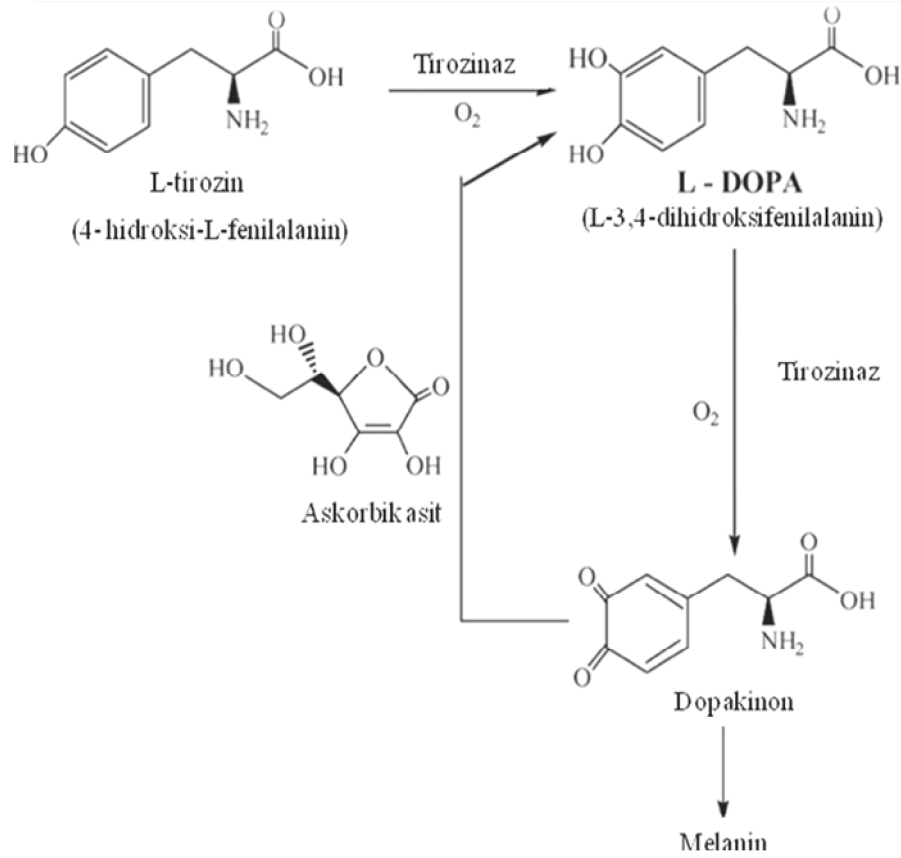
1 adet piridoksal 5'- fosfat (PLP) bağılı bulunmaktadır. Diğer PLP bağımlı enzimlerin tersine TPL aktivitesi pH 6.0 ve 9.0 arasında önemli bir değişiklik göstermemektedir [44].

3.4.3. Tirozinaz Enzimi

Tirozinaz (monofenol monooksijenaz, EC 1.14.18.1) hem tirozinin L-DOPA'ya hidroksilasyonunu hem de L-DOPA'nın dopakinona oksidasyonunu katalizleyen ve L-DOPA'nın biyosentezinde anahtar bir rol oynayan biyofonksiyonel bir enzimdir [45]. Aynı zamanda tirozinaz melanin ve diğer polifenolik bileşiklerin biyosentezinden sorumlu olan bakır içerikli bir metalloproteindir. Tirozinazın iki enzimatik aktivitesi bulunmaktadır. İlki monofenollerden *o*-difenol hidroksilasyonu, ikincisi *difenolaz* aktivitesiyle *o*-difenolden *o*-quinon oksidasyonudur. Ayrıca *katalaz* oksidasyonu ile quinondan hem *o*-difenol hem de *p*-difenol oluşur [46]. Çok reaktif molekül olan dopakinon enzimatik olmayan polimerilasyonu ile melanine dönüşmektedir (Şekil 3.6.). Dopakinondan L-DOPA'ya dönüşümü ise askorbik asit gibi indirgen maddeler kullanarak gerçekleşmektedir.

Araştırmalar tirozinazın fungus, bakteri, bitki, böcek ve memeli hücrelerinde bulunduğunu göstermiştir. Melanin üretebilen bakteriler *Aeromonas*, *Azotobacter*, *Mycobacterium*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Legionella*, *Streptomyces*, *Vibrio*, *Rhizobium*, *Proteus*, *Azospirillum* and *Shewanella* olduğu belirlenmiştir [47]. Tirozinaz enzimi mikrobiyal olarak (*Aspergillus*, *Rhizopus*, *Neurospora* vb.) ve *Agaricus* ve *Vicia* vb. gibi bitkilerden yüksek oranda saflaştırıldığı saptanmıştır. Başarılı bir üretim için kültür koşullarının optimize edilmesi gerekir ve bu optimizasyon kullanılan organizmanın türüne göre sistemden sisteme farklılık göstermektedir [48]. Bununla birlikte mikroorganizmalarda tirozinaz aktivitesi genellikle çok zayıf olup L-tirozin ile L-DOPA hızlı bir şekilde diğer metabolitlere ayrılmaktadır. Sonuç olarak L-DOPA'nın saf olarak elde edilmesi oldukça zordur.

Tirozinazların memeliler ve bitkilerde de yaygın bir şekilde bulunduğu saptanmıştır. Bitki tirozinazları bazı meyve ve sebzelerde istenmeyen kararma reaksiyonlarından sorumlu enzimlerdir [49]. Memeli tirozinazları ise spesifik olarak deri, saç ve gözlerde yerleşen yüksek derecede özelleşmiş hücrelerde ve pigment üreten melanositlerde bulunmaktadır. Böylece ultraviyole radyasyon yaralanmasına karşı koruyucu bir etkiye sahip olan melaninin oluşmasında da yer alan anahtar enzimlerdir [50-51].



Şekil 3.6. Tirozinazın L-DOPA sentez şeması.

3.4.4. Tirozin

Aromatik bir molekül olan tirozin çeşitli endüstriyel ve farmokimyasal uygulamalarda önemli bir öncül olarak kullanılmaktadır. Alternatif olarak TPL enzimi L-tirozinden fenol, amonyak ve pirüvat oluşumunu da katalizlemektedir [35].

Ayrıca tirozin son yıllarda Parkinson hastalığının tedavisinde en etkili semptomik ilaç olarak kullanılan L-DOPA gibi önemli birçok bileşiğin sentezini başlatan önemli bir öncül amino asit olduğu belirtilmektedir. Yine çeşitli endüstriyel bileşenlerde de öncülük etmektedir [52-54].

Tirozinin vücutta fenilalaninden sentez edildiği ve bu nedenle esansiyel bir amino asit olmadığı savunulmaktadır. Vücut fenilalanini önemli oranda (2/3) tirozine dönüştürmesine rağmen tirozini fenilalanine dönüştürememektedir. Esansiyel olmayan bir amino asit olarak sınıflandırılmasına karşın tirozinin şartlı olarak esansiyel bir amino asite dönüştüğüne dair bulgular da bulunmaktadır. İnsanlarda esansiyel olmayan amino asitlerin çoğu glukoz ve amonyaktan sentezlenmektedir. Dolayısıyla tirozinin oluşması için de

fenilalanine gereksinim vardır. Bu yüzden L-tirozin bilinen 22 adet standart amino asitten biri olup, sentezindeki kompleks reaksiyon serilerinden dolayı esansiyel bir amino asit olarak adlandırılır. Fenilalaninin tirozine dönüşümü tersinir olmayan bir şekilde katalizleyen *fenilalanin hidroksilaz* enzimi aktivitesindeki bir düşüş veya enzimdeki fonksiyon kaybı hücrede fenilalanin birikimine sebep olmaktadır. Bu durum en iyi bilinen amino asit metabolizma bozukluklarından biri olan ve kendini mental bozuklukla gösteren *fenilketonürea*'ya sebep olmaktadır [28, 55-57].

Tirozin, merkezi ve periferik sinir sistemi ile adrenal medulla da Dopamin, L-DOPA, nörepinefrin ve epinefrin; tiroid bezi tarafından tiroksin ve triiyodotironin gibi katekolaminlerin, hormonların ve nörotransmitterlerin üretimi için gerekli temel bir bileşiktir.

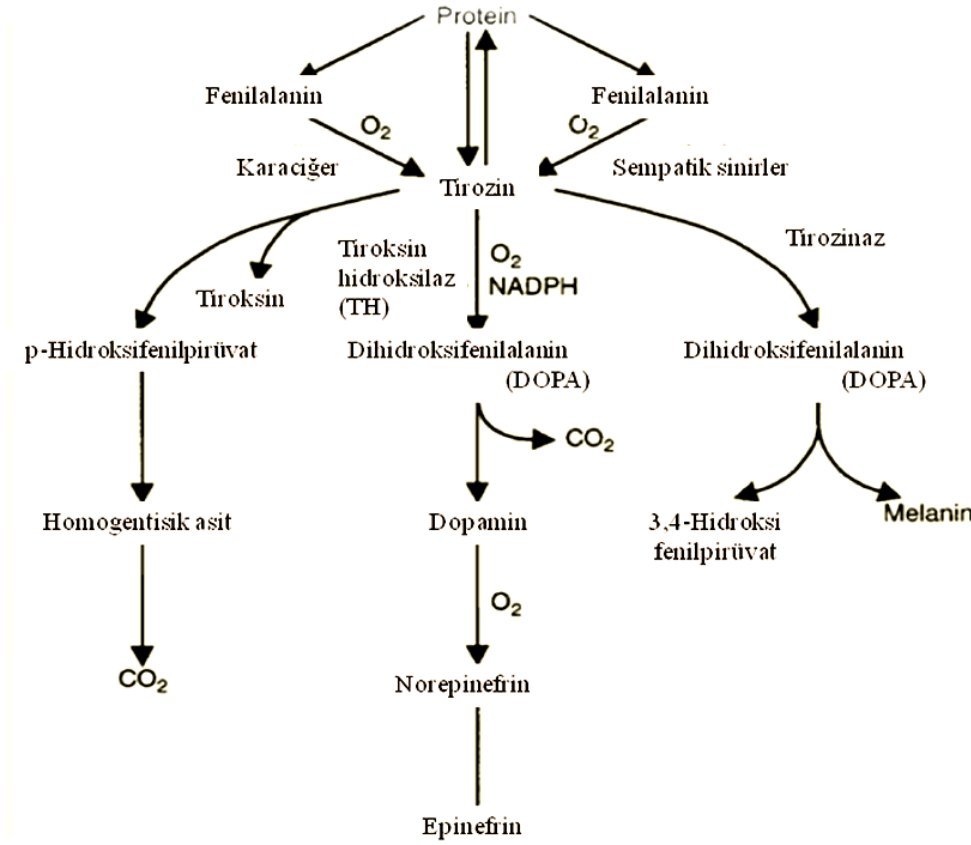
Katekolamin sentezinde oran belirleyici basamak L-tirozinin L-DOPA'ya hidroksilasyonudur. Şekil 3.7.'de gösterildiği gibi bu basamak *tirozin hidroksilaz* (TOH) enzimi tarafından katalizlenmektedir. Ancak, bu reaksiyon basamağındaki inhibisyon daha çok epinefrin ve norepinefrin hormonlarının seviyesini düşürürken Dopamin seviyelerini önemli oranda etkilememesi Dopaminin sentezinde alternatif mekanizmaların rol oynadığını düşündürmüştür. Muhtemel alternatif bir mekanizma *tirozinaz* enzimi ile katalizlenen tirozinden dopakinon yapılmasıdır. Melanin oluşumu ile sonlanan bir seri reaksiyonun ilk safhasında dopakinon'dan L-DOPA üretilmektedir. L-DOPA *tirozinaz* enzimi için alternatif bir substrat olduğundan bu reaksiyon daha ileri gitmektedir. *Tirozin hidroksilaz* (TH) enzimi eksikliğindeki durumun tersine, *tirozinaz* enzimi eksikliği öldürücü değildir daha çok kendini albinizmle belli etmektedir [58].

3.4.5. Katekoller

Katekol (1,2-dihidroksibenzen) eczacılık, kürk boyama, lastik ve plastik üretimi gibi birçok uygulama alanlarına sahiptir. Katekoller mikroorganizmalar tarafından aromatik maddelerin ve lignin parçalanmasının ara ürünleridir [59].

İnsan ve birçok hayvanda katekoller daha çok hormon (steroid) metabolizmasının metabolitleri olmalarının yanında Adrenalin, Nöradrenalin, Dopamin ve L-DOPA gibi endojen bileşiklerin metabolitleri olarak da bulunabilirler.

Katekolaminler diğer biyogenik aminler gibi omurgalıların sinir sistemindeki rolüne ek olarak gram-negatif bakterilerin büyümesini ve virülans bağımlı faktörlerin üretimini ayarlama da önemli etkiler göstermektedir. Minimal besi ortamına eklendiklerinde her üç



Şekil 3.7. Tirozin metabolizması

yaygın katekolamin çeşidinin (norepinefrin, epinefrin ve Dopamin) bakteri büyüme ve çoğalmasında önemli artışa neden oldukları belirlenmiştir [60-62]. Son zamanlarda özellikle *Citrobacter freundii* ve *Erwinia herbicola*, bakterileri ticari olarak L-DOPA üretiminde kullanılan mikroorganizmalardır. Bu bakteriler L-DOPA sentezi için *tirozin fenol liyaz* (TPL) enzimini kullanırlar. L-DOPA sentezi tersinirdir. Katekol TPL katalizinde başlama materyali olarak kullanılmakla birlikte çok iyi bir otooksidattır. Katekol sentezi arada kesilirse antioksidan etki göstermektedir. Bu yüzden katekol büyük bir engel oluştururken yüksek derişimlerde mikroorganizmalarda toksik etki göstermektedir.

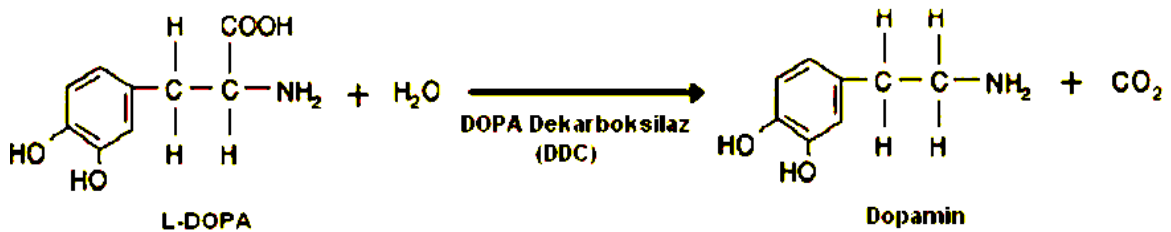
TPL ve katekol üreten enzimler alternatif olarak birleşebilirler. Katekol üretimi bittiğinde mikroorganizmalardaki toksisite azalmakta ve otooksidasyonları en aza inmektedir. Katekolün biyolojik üretimi *toluen dioksijenaz* (TDO) ve *cis-toluen dihidrodiolehidrojenaz* (TCGDH) ile iki adımlı reaksiyondan oluşmaktadır [68]. TDO/TCGDH L-DOPA sentezinde TPL ile başarılı bir şekilde birleşirse hem L-DOPA sentez sürecinde ekonomiklik kazandırmakta hem de büyük endüstrinin toksik atıklarından biri olan benzenin tekrar kullanılmasında etkili bir yol oluşturmaktadır [63].

Oksidize katekoller proteinlerin sülfidril grupları ile reaksiyona girmektedirler. Böylece katekol ya doğrudan sülfidril gruplarına bağlanarak proteinleri inaktive etmekte ya da protein radikallerinin (karbon merkezli radikaller) oluşmasına neden olmaktadır. Bu protein radikalleri yeni çapraz bağlara ve dimer oluşmasına yol açarak proteinlerin ve peptidlerin yığılması ve dolayısı ile inaktivasyonuna neden olmaktadır. Glutasyon hücrelerde önemli bir redükleyici (indirgeyici) ajan olduğu için iki glutasyon molekülünün bu şekilde birbirine bağlanması bu ajan tarafından sağlanan hücrenin redoks statüsünü değiştirmekte ve böylece oksidatif stres oluşmaktadır [64].

Katekollerin membranlar üzerindeki zararlı etkisi onların reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu ya da lipid molekülleri ile reaksiyonları sonucu değil, membran potansiyelinde sebep oldukları değişiklikten dolayıdır. Katekollerin kimyasal reaksiyonu ve kimyasal özelliği DNA, protein ve membran gibi biyomoleküllerde onarılamayan zararlar oluşturmaktadır. Proteinlerle reaksiyona girdiğinde enzimlerin ve proteinlerin inaktivasyonuna sebep olduğu belirlenmiştir. Membranla katekollerin etkileşimi sonucu lipid peroksidasyonu oluşmaktadır. Ayrıca katekol ile farklı biyomoleküllerin etkileşimi serbest oksijen radikallerinin oluşumuna sebep olmaktadır [65]. Örneğin, Dopamin *monoamin oksidaz* (MAO) enzimi tarafından homovalinik asite (HVA) yıkılmaktadır. Dopaminin bu metabolizması ve otooksidasyonu ile hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}$) oluşmaktadır. Ayrıca ferro demir (Fe^{+2}) ve ferri demir (Fe^{+3}) serbest kalarak hidrojen peroksitin (H_2O_2) miktarının artmasına sebep olup fenton reaksiyonunun oluşumu gözlenmektedir [66].

3.4.6. Dopaminin Sentezi

L-DOPA'dan Dopamin oluşumu *L-DOPA dekarboksilaz* (DDC; aromatik L-amino grup asit dekarboksilaz, EC 4.1.1.28) enzimi tarafından katalizlenmektedir. Dopaminin bakteriyel sentezinde birinci aşamada sentez edilen L-DOPA ikinci aşamada substrat olarak kullanılmaktadır (Şekil 3.8.).



Şekil 3.8. L-DOPA'dan Dopamin Sentezi

Sentez sırasında açığa çıkan CO₂ ortam pH'sının düşmesine yol açmaktadır. Bundan dolayı Dopamin veriminde bir azalma olmaması için reaksiyon ortamının sürekli kontrol altında olması gerekmektedir [29].

3.4.7. Dopa Dekarboksilaz Enzimi

DOPA dekarboksilaz (DDC, EC 4.1.1.28) nöral dokularda Dopamin biyosentezinde önemli bir rol oynayan piridoksal 5'-fosfat (PLP)'a bağımlı bir enzimdir. Enzim karaciğer ve böbrekler gibi periferik organlarda bulunmaktadır [67-68]. Memelilerdeki çoğu DDC enzimi L-DOPA, tirozin, fenilalanin ve triptofan gibi aromatik amino asitlere geniş bir substrat özgüllüğü göstermektedir.

Bakteriyel dekarboksilazlar arasında *Streptococcus faecalis* tirozin dekarboksilaz (TDC, EC 4.1.1.25) enzimi, L-DOPA üzerindeki daha büyük dekarboksilaz aktivitesi olduğundan Dopamin sentezinde rol alan tersinmez ve oldukça önemli olduğu bilinen bir enzimdir [69]. *S. faecalis* TDC'si tirozin ve L-DOPA'ya tam bir substrat özgüllüğü göstermektedir ve bu yüzden Dopamin sentezi için bu enzim tercih edilmektedir.

3.5. Mikroorganizma Hemoglobinleri

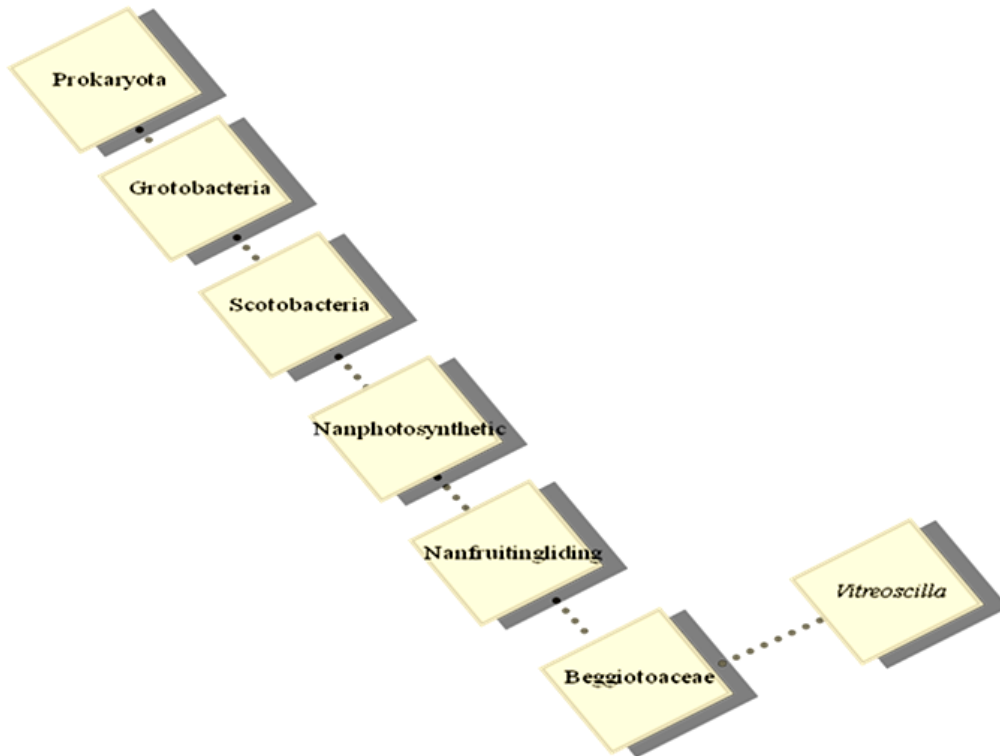
Bakteriyel globinler, Flavohemoglobinler (FlavoHbs), Trunkat hemoglobinler (TrHbs) ve hemoglobinler (Hbs) olarak üç sınıfa ayrılmaktadır [70-71]. Bakteriyel hemoglobine *Vitreoscilla* VHb, *Campylobacter jejuni* CHb ve *Clostridium perfringens* CpHb örnek olarak verilebilir [70, 72-73].

İlk grub flavohemoglobinler kimerik yapıya sahip olup, bir globin domeyni ile aynı zamanda bir FAD-bağımlı oksido-redüktaz domeynini'ne sahiptirler. Ayrıca FAD-bağımlı oksido-redüktaz enzimi yapısal olarak ferrodoksin *NADP⁺ reduktaza* benzemektedir [74]. Flavohemoglobinler bitki Hb'lerine benzeyen diziye de sahiptirler. İkinci grup olan trunkat hemoglobinler ise "kırpılmış tip zincir" hemoglobinler olup normallerden 20-40 amino asit daha kısadırlar ve oldukça yüksek oksijen affinitesine sahiptirler. Üçüncü grup ise bu proteinlerin bakteriyel orijinli olanları olup en iyi bilineni *Vitreoscilla* hemoglobindir. Bakteriler genel olarak iki tip hemoglobine sahiptir. İlk bakteriyel tipi Hb'i buradaki çalışmada da ele alınan *Vitreoscilla* Hb'dir (VHb). Spektral karakteristiklerinin ve aminoasit dizisinin ökaryotik hemoglobine % 25'e varan benzerliğinden dolayı, hemoglobin olarak adlandırılmıştır [75].

Hem grubunun etrafındaki grupların özel dizilimi bu proteinlerin yüksek oksijen affinitelerine katkıda bulunur. FlavoHb'ler ise daha yaygın bulunurlar. VHb'nin tersine FlavoHb'ler bir amino terminal globin domeyni ve FAD⁻ ve NADP⁺ bağlanma bölgelerine sahip bir karboksil flavodomeynine sahiptirler. VHb'nin fonksiyonu her ne kadar hala tam olarak bilinmiyorsa da, bu hemoglobinin oksijen taşıma ve depolamada (tamponlamada) rol oynadığı sanılmaktadır. Flavin domeyninde oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarından dolayı FlavoHb'lerin böyle bir fonksiyonunun olmadığı sanılmaktadır. FlavoHb'lerin daha çok *NO deoksigenazlar* olarak davrandıkları ileri sürülmüştür [76].

3.6. Bakteriyel (*Vitreoscilla*) Hemoglobin (VHb)

1986 yılına kadar hemoglobinler ökaryotik orijinli proteinler olarak bilinmiştir. Fakat Dr. Webster ve arkadaşları gram-negatif bir bakteri olan *Vitreoscilla stercoraria*'nın doğal olarak hemoglobin (VHb) içerdiğini saptamışlardır [77]. *Vitreoscilla* mor bakterilerin beta-alt grubunda *Beggiatoaceae* familyasında bulunmaktadır (Şekil 3.9.) [78]. *Vitreoscilla* zorunlu bir aerob gram negatif, kemoorganotrof filamentöz bir bakteridir. Zorunlu aerob olmasına rağmen doğal yaşam alanı oksijeni düşük ortamlardır [70].

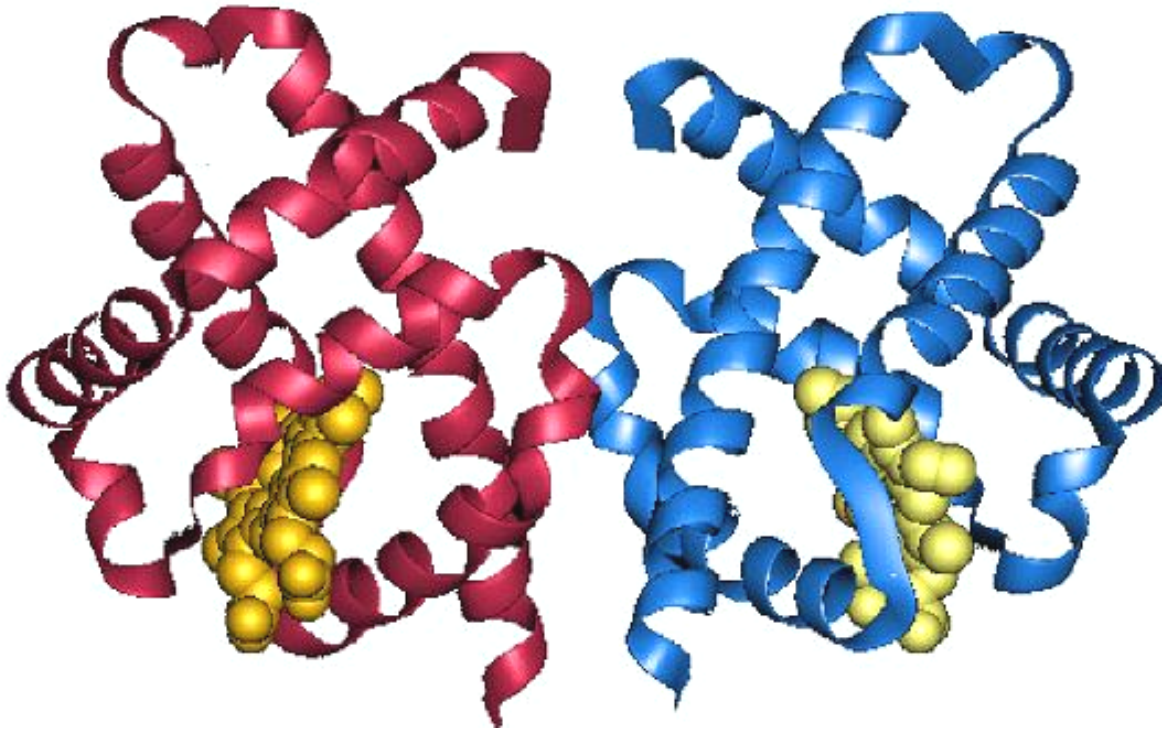


Şekil 3.9. Bakteriyel hemoglobin geni taşıyan yegane bakteri *Vitreoscilla*'nın taksonomik konumu [79].

Vitreoscilla stercoraria bakterisi düşük oksijen şartlarına dayanabilmek için sitoplazmasında eriyebilen hemoglobin sentezi yolunu seçmiştir. Son yıllarda bu hemoglobinin üzerindeki çalışmalar onun çeşitli endüstriyel organizmalarda enerji metabolizmasında uygun bir ajan olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

Bakteriyel hemoglobin, hemoglobine benzeyen proteinlerin büyük ailesinin bir üyesidir. Bu ailenin en iyi karakterize olan üyesi hemoglobin ve daha çok hayvanlarda miyoglobindir. Ama son zamanlarda hemoglobine benzeyen oksijen transformu yapan bu hemoproteinlerin protozoa, bitki, fungus ve bakterilerde de bulunduğu belirlenmiştir [80-83]. Hemoglobin ile miyoglobinin (Mb) 3 boyutlu yapısı (3D) ve benzer amino asit sırası onların aynı atada evrimleştiğini göstermektedir [73, 84-87]. Diğer hemoglobinlerle kıyaslandığında örneğin kök hemoglobiniyle %24, *B. subtilis* flavo hemoglobiniyle %56 gibi önemli bir benzerlik göstermektedir [77, 88].

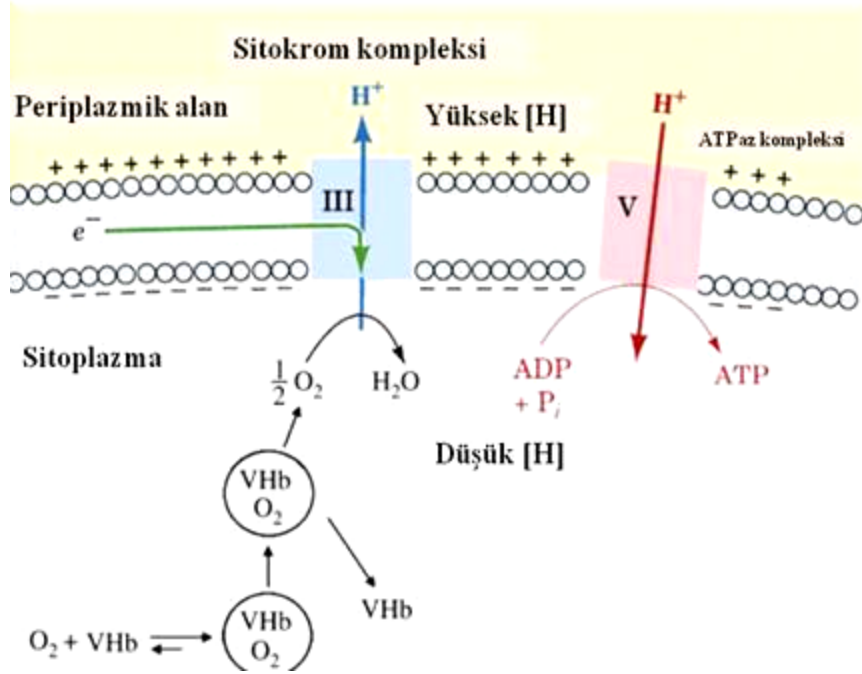
VHb'nin yapısı klasik globin katlanmasına uymakta ve ökaryotik hemoglobinleri ile yüksek bir homoloji göstermekte olup klasik 8-helikse (A-H) sahiptir ve globin katlanması göstermektedir (Şekil 3.10.). VHb proteini iki benzer alt üniteden oluşan bir hem proteindir [77].



Şekil 3.10. VHb'nin 3-boyutlu yapısı. Homodimerik yapıda “hem” grubunun lokalize olduğu yer sarı renk ile gösterilmiştir [77].

Rekombinant *E. coli*'de hem *Vitreoscilla* hemoglobini hem de proteini sitoplazmik olarak yerleştiği tespit edilmiştir [89]. Ekstrasellüler oksijenin düşük olduğu durumlarda bu proteinin sentezinin arttığı ve bağlandığı oksijenin ökaryotik hücrelerde olduğu gibi serbest bırakıldığı rapor edilmiştir [90].

Oksijen kaynağı olarak rol alan *Vitreoscilla* hemoglobinin, mikroaerobik koşullar altında çözülmüş oksijen derişiminde intrasellüler etkisi artmakta ve çözülmüş-oksijendeki artış hem sitokrom *o* hem de sitokrom *d* aktivitesini arttırmaktadır. Öte yandan sitokrom *o* spesifik aktivitesi sitokrom *d*'den daha hızlı bir şekilde arttırarak proton pompasında artışa sebep olmaktadır (Şekil 3.11.). Böylece sitoplazmadaki ATPaz yoluyla bu proton gradiyenti sayesinde ATP üretilmektedir [91].



Şekil 3.11. Düşük oksijen yoğunluğunda *Vitreoscilla* hemoglobinin rolü.

Bu proteini bulunduran hücrelerin daha oksitlenmiş durumda bulunmaları, VHb'nin hücrelerin karbon metabolizması akış şemalarında önemli yeniden düzenlemelere sebep olması ile ilgilidir. Her ne kadar bunun nasıl sağlandığı kesin olarak ortaya konmamışsa da, NAD^+/NADH ve ADP/ATP oranlarında olan önemli değişimlere esas teşkil ettiği sanılmaktadır. VHb içeren hücrelerde NADH seviyesinde düşüş ATP miktarında ise artış gözlenmektedir. Dolayısı ile NAD^+/NADH ve ADP/ATP oranlarında meydana gelen önemli değişimler hücrenin karbon bileşiklerini kullanımı yollarında önemli değişime

neden olur. Bu bağlamda VHb ekspresyonu yapan *Enterobacter aerogenes*'de gözlenen % 80'lik artışın bu tür bir metabolik akış şeması değişikliğinden olabileceği bildirilmiştir [92-93].

Vitreoscilla hemoglobini ise son yıllarda keşfedilen ilk prokaryotik hemoglobin olup, bu proteinin çeşitli endüstriyel proseslerdeki kullanım potansiyeli son yıllarda birçok araştırmının konusunu oluşturmıştır. Bu bağlamda, özellikle düşük oksijen derişimlerinin negatif etki yarattığı birçok biyoüretim olayında bu proteinin potansiyelinin olabileceği ileri sürülmüştür. Gram negatif bakteri olan *Vitreoscilla* atmosferik oksijen konsantrasyonundan %90 daha düşük ortamda *E. coli* ile kıyaslandığında 50 kat daha fazla ürün elde ettiği belirlenmiştir [94]. Rekombinant protein üretiminden, çeşitli antibiyotiklerin üretimine ve zararlı aromatiklerin parçalanmasına birçok proste bu proteinin klonlanmış hücrelere önemli avantaj kazandırdığı saptanmıştır. Dolayısı ile son yıllarda literatüre girmiş olan “metabolik mühendislik” terimi kullanıldığında bu protein ilk sırada bahsedilen ajan olarak karşımıza çıkmıştır. VHb genini (*vgb*) çeşitli bakteri ve fungusla transformasyonu ile büyüme ve üretimlerinde artış olduğu saptanmıştır. Aerobik bakterilerde toksik aromatik bileşiklerin yıkımı biyoremediasyonunu artırarak “VHb teknolojisi” terimini de karşımıza çıkarmıştır [95-96].

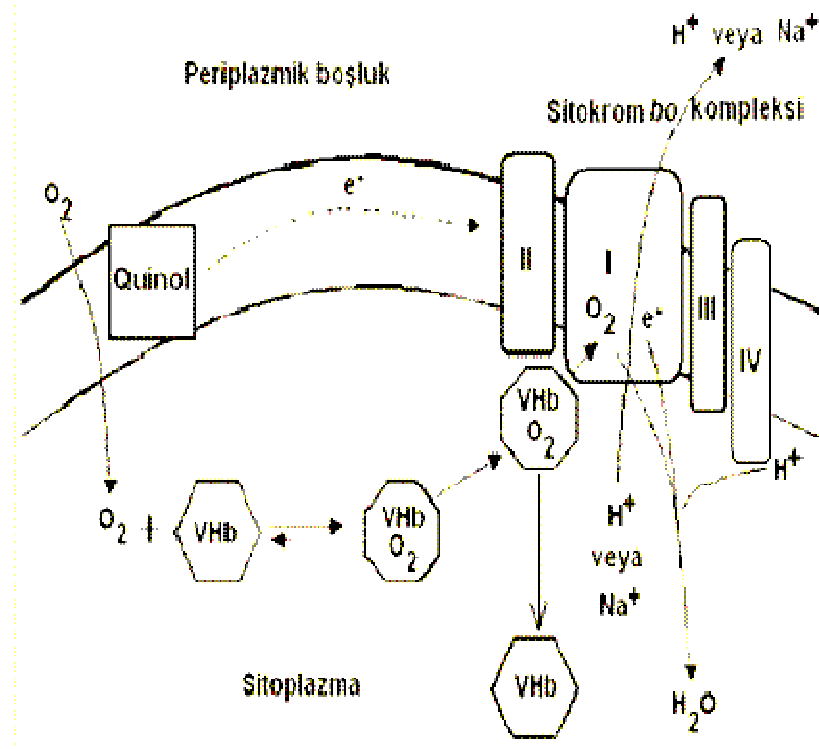
Globin proteinleri bütün canlılarda yapısal ve fonksiyonel olarak farklılık göstermektedir. Hem grubunun yanında 6–8 α -heliks segmenti içeren hemoglobinleri karakteristik olarak dönüşümlü oksijen bağlayabilme yeteneğine sahiptirler [97].

Vitreoscilla'nın *sitokrom bo terminal oksidaz* bir çok yönüyle *E. coli*'ye benzese de, bu kompleks *E. coli*'de H^+ pompalayarak bir membran proton gradiyentine katkıda bulunurken (kemoozmotik hipotez), *Vitreoscilla*'da Na^+ pompalamaktadır (Şekil 3.12.). *Sitokrom bo oksidaz* I, II, III ve IV olarak adlandırılan 4 alt üniteden oluşmaktadır. En büyük alt ünitesi alt ünite I olup sodyum pompalamada kullanılır ve aynı zamanda VHb'nin hücredeki etkisi ile ilişkilidir [94].

VHb sitokrom *bo₃* kompleksinin I altünite interaksyonu ile reaktif azot türlerinin toksik etkisine karşı *bo₃*'un enerji üreten aktivitesini koruduğu gözlemlenmiştir [98]. Bu gözlemler önceki sonuçları destekleyerek Hbs ve FlavoHbs *nitrik oksit dioksijenaz* (NOD) aktivitesini belirtmektedir [94].

Diğer hemoglobine göre VHb, oksijene karşı düşük affiniteye sahiptir. VHb'nin ayrışma sabiti diğer birçok globinin ayrışma sabitesinden daha büyüktür. Böylece oksijenin

VHb'den ayrışma sabitesi oldukça yüksek olup bu durumun önemi oksijenin hızlı salıverilmesinin bir gereklilik olduğu hipoksik şartlarda ortaya çıkmaktadır.



Şekil 3.12. VHb ve sitokrom *bo* ubiquinol oksidazların I. alt ünitesi arasındaki ilişkinin muhtemel mekanizması.

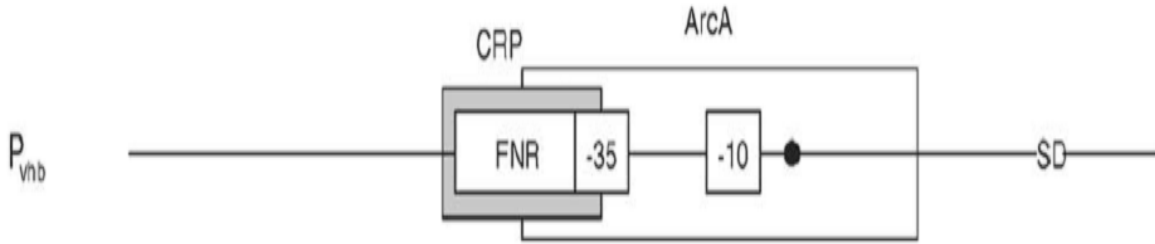
Vitreosilla hemoglobin geninin klonlanmış olduğu tüm organizmalarda, regülasyonu oksijenle olan birçok metabolit ve rekombinant proteinin sentezinde önemli artış gözlenmiştir. Özellikle, bakteri ve funguslarda VHb'nin hem solunumu hem de büyümeyi arttırma yeteneğine sahip olduğu belirlenmiştir. Bundan dolayı, VHb teknolojisi genel olarak oksijence fakir şartların bulunduğu alanlarda ve oluşumları belli kritik seviyede oksijen gerektiren biyoremediasyondan rekombinant protein üretimine kadar bütün biyoproseslerde uygulama alanı bulmaktadır [96, 99-100]. "VHb teknolojisi"nin kullanılması ile toksik aromatik bileşiklerin mikrobiyal oksidatif yıkımlarının arttığı rapor edilmiştir [101].

Yapılan bazı çalışmalarda VHb'nin *Pseudomonas*'larda biyoremediasyonu arttırmada önemli bir potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir [101-102]. Bunun en önemli

nedenlerinden birisi de yabancı türler oranla VHb aktarılan türlerin daha yüksek oksijen alımına sebep olmasıdır [99, 103].

3.6.1. *Vitreoscilla* Hemoglobin Geni (*vgb*)

Vitreoscilla hemoglobin geni (*vgb*) promotor-operatör bölge ve hemoglobini kodlayan bölge ile toplam 648 nükleotidden oluşmaktadır. Genin promotoru oksijene duyarlı bir promotordur ve aynı zamanda katabolit baskılanma gösterir. Promotorun oksijene duyarlı olmasını üzerinde taşıdığı FNR ve ArcAB proteinlerine özgü dizilerden sağlar. Katabolit baskılanmayı ise promotor üzerinde bulunan cAMP-CRP bağlanma bölgesi sağlar [103]. Güçlü bir promotor olan *vgb* promotoru -35 korunmuş dizisi taşımaz. Ancak pribnov kutusundan 20 nükleotid geride katabolit aktivatör protein bağlanma bölgesine benzer bir bölge vardır (Şekil 3.13.) [75, 104].



Şekil 3.13. *E. coli* transkripsiyon sistemi tarafından tanınan *vgb* promotoru. Shine-Dalgarno (SD) bölgesi, transkripsiyon başlama bölgesi (●), -10 ve -35 dizileri, ArcA, CRP ve FNR bağlanma bölgeleri. Yatay çizgi (—) promotorun AUG başlama kodonununun akış-yukarı 150 nükleotidlik fragmanını göstermektedir [105].

3.6.2 *Vitreocilla* Hemoglobin Geninin Klonlandığı Organizmalara Etkisi

VHb geni (*vgb*) *E. coli* [79], *Enterobacter aerogenes* [75], *Streptomyces* türleri [106] ve bütün bitkisi [107] gibi farklı sistemlere klonlanarak, hemoglobinin bu organizmaların fizyolojik ve metabolik aktiviteleri üzerine etkileri araştırılmıştır. VHb hemen hemen bütün klonlanmış olduğu hücrelere daha iyi bir oksijen alım ve kullanım potansiyeli kazandırırken [75, 108-109] (Tablo 3.1.) bu proteinin hücre üreme ve çoğalması üzerine olan etkisi konusunda farklı sonuçlar rapor edilmiştir [110-112].

3.6.3. VHb'nin Metabolik Mühendislikteki Uygulamaları

1991 yılında, Bailey “metabolik mühendislik” olarak adlandırılan yeni bilim ile “Rekombinant DNA teknolojisini, hücresel aktivitesindeki fonksiyonların düzenlenmesi, taşınması ve enzimatik kullanımı” olarak tanımlamıştır [113].

Tablo 3.1. *Vitreocilla* Hemoglobinin literatürdeki çalışmalardaki kullanımı.

	VHb'nin Etkisi	İlgili Literatür
<i>Schwanniomyces occidentalis</i>	α -amilaz aktivitesinde artış ve total protein de artış	[114]
<i>Pichia pastoris</i>	Büyümede ve heterolog protein üretiminde artış	[115]
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Asetoin ve 2,3-bütandiol üretiminde % 80 artış, hücrelerin böyle bir ortamda daha uzun süre canlı kalmaları	[93]
<i>Acremonium chrysogenum</i>	Sefalosporin C üretiminde 3.2 kat artış	[116]
<i>Bacillus subtilis</i>	% 30 proteaz artışı, α -amilaz aktivitesinde % 7–15 artış ve protein salınımında 1.5 kat artış	[117]
<i>Burkholderia sp.</i>	Biyomasta % 15, DNT parçalanmasında 2 kat artış	[118]
Çin hamster'i ovaryum hücreleri	Doku plazminojen aktivatör proteini üretiminde % 40–100 artış	[119]
<i>Escherichia coli</i>	L-laktamaz aktivitesinde % 61 artış	[120]
<i>Escherichia coli</i>	Toplam hücre proteininde % 30, CAT aktivitesinde % 80, L-galaktozidaz aktivitesinde 40% artış	[112]
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	L-lizin üretiminde % 24 artış	[121]
<i>Escherichia coli</i>	α -amilaz aktivitesinde 3.3 kat artış	[122]
<i>Escherichia coli</i>	Ferritin üretiminde 1.8 kat artış	[123]
<i>Nicotiana tabacum</i>	% 50 daha hızlı çimlenme, artan büyüme, % 80–100 daha fazla kuru ağırlık, % 30–40 daha fazla klorofil ve % 34 daha fazla nikotin	[124]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Canlı hücre sayısında % 11 artış ve 2–5 kat daha fazla oksijen alımı	[108]
<i>Rhizobium etli</i>	Bakla nodüllerinde nitrojenaz aktivitesinde %68 artış ve % 53 daha fazla azot içeriği	[124]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hücre yoğunluğunda 3 kat artış ve etanol üretiminde artış	[125]
<i>Saccharopolyspora erythraea</i>	Eritromaysin üretiminde % 70 artış	[126–127]
<i>Serratia marcescens</i>	Hücre büyüklüğünde artış	[110]
<i>Streptomyces coelicolor</i>	Aktinorodin üretiminde 10 kat artış	[106]
<i>Streptomyces lividans</i>	Kültür sonu hücre yoğunluğunda % 50 artış	[106]
<i>Serratia marcesce</i>	Oksitetrasiklin üretiminde 2.2 kat artış	[128]
<i>Xantomonas maltophila</i>	Canlı hücre sayısında % 15 artış, benzoik asitin yıkımında artış	[129]

Çevre kirliliğine paralel olarak mikrobiyal habitatlara ağır metal salınımı gün geçtikçe artmaktadır. Bununla beraber mikroorganizmaların ağır metal stresi ile baş edebilecekleri sistemlerin geliştirilmesi çalışmalarına da önem kazandırmıştır. Bu amaçla yapılan bir çalışmada *Enterobacter aerogenes* bakterisinin yabancıl tipi ile *vgb* geni klonlanmış Ea[pUC8:16] suşu Cd^{2+} içeren besi ortamında üretilmiş ve Cd^{2+} alımı, biyosorbsiyon bakımından karşılaştırıldığında Ea[pUC8:16] suşu daha yüksek biyokütle değeri, daha yüksek Cd^{2+} alımı ve daha yüksek biyosorbsiyon değerleri ile dikkat çekmiştir. Çalışma sonucunda bakteriyel hemoglobinin ağır metal detoksifikasyonunun kontrolü için çok uygun bir aday olduğu bildirilmiştir [130].

Yapılan başka bir çalışmada ise *vgb* klonlanmış *Burkholderia sp.*'de dinitrotoluen yıkımında artış sağladığı bildirilmiştir [96]. *vgb* klonlanmış bakterilerde protein sentezi artmaktadır. Bu konu ile ilgili olarak yapılan bazı çalışmalarda *vgb*'nin mayalar ile

antibiyotik ve etanol üretimini arttırdığı tespit edilmiştir. Diğer bir çalışma ise *vgb* 'nin bazı Enterobacteriaceae üyelerinin bütandiol ve asetoin üretimini arttırdığını göstermiştir [126].

Diğer bir çalışmada ise *Enterebacter aerogenes* ve *Pseudomonas aeruginosa* ve onların *vgb* klonlanmış rekombinant bakterileri kanser tedavisinde kullanılan asparaginaz enzimini farklı karbon katabolitinde üretimleri çalışılmıştır. Enzim üretiminde karbon katabolit baskılanmasından dolayı *vgb*⁺ taşıyan Ea[pUC8:15] bakterisi *vgb*⁻ olan Ea[pUC8] kıyaslandığında 20 kat daha düşük olduğu belirlenmiştir [131].

4. REAKSİYON KİNETİĞİNİN MODELLENMESİ

4.1. Giriş

Biyolojik proseslerin performansı genellikle ampirik yöntemlerle incelenmektedir. Bu yaklaşımda biyoreaktörün davranışı tüm işletme koşullarında incelenir ve sonuçlardan yeni işletme koşulları için biyoreaktörün performansı tahmin edilir. Bu ampirik yaklaşım prosesin ayrıntıları üzerinde çok az düşünce gerektirir. Uygun görünmesine karşın bu yöntemin pek çok olumsuz yanı vardır. Her türlü proses koşullarını kapsaması için çok sayıda deney gereklidir. Buna karşın modelleme yaklaşımının amacı biyoreaktörün gerçek performansını iyi kurulmuş teoriye dayanarak öngörmeye çalışmaktır. Modelleme sırasında modeli kuranın, en önemli proses parametrelerinin proses üzerine etkisini ve her bir parametrenin nicel olarak nasıl belirleneceğini göz önüne almak zorundadır. En önemli değişkenlerin belirlenmesi ve proses üzerine ayrı ayrı etkilerinin incelenmesi gerekmektedir. Dolayısıyla ilgili teorinin kritik bir yaklaşımla sürekli olarak değerlendirilmesi gerektiğinden, modelleme, prosesin daha iyi anlaşılması için bize katkı sağlar [132].

Model kurulduktan sonra ortaya çıkan denklemler çözülür ve modelin öngördüğü ile deneysel veriler karşılaştırılır. Eğer ikisi arasında fark varsa model ile deneysel veriler arasında uyum sağlanıncaya kadar model yeniden gözden geçirilir. Modelin deneysel verilerle uyumlu olduğu gösterildikten sonra artık model biyoreaktörün performansını çeşitli işletme koşulları altında öngörmek, yeni proses tasarımı yapmak ve optimizasyon ve kontrol için kullanılabilir. Modelin geçerliliğini doğrulamak için deneysel veri gereklidir. Fakat deney sayısı geleneksel ampirik yöntemle göre oldukça azdır. Bunun yanı sıra modellemenin en önemli avantajı prosesin daha iyi anlaşılmasını sağlamasıdır [133]. Kısaca; ampirik yöntemde, biyoreaktörün tüm işletme koşulları altında performansı ölçülür ve aralarında bir ilişki oluşturulmaya çalışılır. Az düşünce fakat çok deney gerektirir. Modelleme de ise model kurulur ve model parametrelerini belirlemek için deney yapılır. Modelin davranışı deneylerle karşılaştırılır ve model, proses tasarımı, optimizasyon ve kontrol için kullanılır. Az deney gerekir ve prosesi daha iyi tanımlar.

Prosesin modellemesinin faydaları şunlardır [133]:

- ✓ Modelleme prosesin anlaşılmasını kolaylaştırır: Proses modelini kurarken prosesteki karmaşık neden-sonuç ilişkileri ayrıntılı olarak göz önüne alınır.

Modelin öngördüğü ile prosesin gerçek davranışının karşılaştırılması prosesin daha iyi anlaşılmasına yardımcı olur. Simulasyon sonuçları bazen uygulamada karşılaşılan fakat açıklanamayan olayların sebeplerinin açıklanmasına yardımcı olur.

- ✓ Model deney tasarımına yardımcı olur: Modelin doğru olarak test edilebileceği deneylerin tasarlanması önemlidir. Model parametrelerinin bilinmesi için bazı özel deneyler gerekecektir. Ayrıca hassasiyet analizi (sensitivity analysis) bazı parametrelerin modelin davranışı üzerine etkisinin ihmal edilebilir olduğunu öğrenebilir. Dolayısıyla bu etkiler modelden ve deney programından çıkarılabilir.
- ✓ Model, tasarım ve kontrol için kullanılabilir: Model kurulduğu zaman prosesin performansını farklı koşullarda öngörmesi gerekir. Ayrıca matematiksel modeller kontrol algoritmalarının tasarımında kullanılabilir ve hatta kontrol algoritmalarının bir parçası olabilir.
- ✓ Model eğitimde kullanılabilir: Biyoprosesin çeşitli yönleri basit modeller kullanılarak simüle edilebilir. Herhangi bir etkenin biyoproses performansı üzerine etkisi bu modelleri kullanarak bilgisayarda gösterilebilir. Deneysel olarak bunu yapmak pahalı ve zordur.
- ✓ Model proses optimizasyonunda kullanılabilir: Optimizasyon genellikle iki veya daha fazla değişkenin etkisini göz önüne almayı gerektirir. Örneğin birisi kârla ilgili iken diğeri maliyetle ilgilidir. Reaktörü maksimum hızda ürünü üretmek üzere işletmek olabilir.

Mikrobiyal üreme ve ürün oluşumu, hücrenin içinde bulunduğu fiziksel ve kimyasal ortama gösterdiği tepkidir. Dolayısıyla üreme ve ürün oluşumunu anlamak için organizmanın içinde bulunduğu ortam ile metabolizması arasındaki ilişkiyi anlamak gerekir. Bir miktar canlı organizma gerekli bileşenleri içeren besiyerine aşılandığı zaman ürer. Üreme iki şekilde gerçekleşir: Birincisi hücrelerin sayısı artar ve ikincisinde ise hücrelerin kütlesi artar. Tek hücreli mikroorganizmaların kütlelerindeki artışa paralel olarak sayıları artar. Küfler (molds) gibi bazı organizmaların ise üreme sırasında kütleleri ve boyutları artar, fakat sayıları artmayabilir. Uygun koşullarda hücreler ortamdaki bileşikleri kullanarak enerji üretirler ve makromoleküllerin yapı taşlarını sentezlerler.

4.2. Kesikli Olarak İşletilen Fermantörlerde Fermantasyon Kinetiği

4.2.1. Kütle ve Hız Denklemleri

Kesikli sistem, biyoproses ortamına giriş ve çıkış akımları olmadığı için kapalı bir sistem olarak değerlendirilir. Kontrol hacmi olarak biyoreaktör içerisindeki fermantasyon ortamı seçilirse, kütle eşitlikleri aşağıdaki şekilde yazılabilir [134]:

$$\text{Giriş hızı} - \text{Çıkış hızı} + \text{Üretim hızı} - \text{Tüketim hızı} = \text{Birikim hızı}$$

$$\text{Biyokütle için} \quad : 0 - 0 + r_x V - r_d V = \frac{dx}{dt} V \quad (4.1)$$

$$\text{Ürün için} \quad : 0 - 0 + r_p V - 0 = \frac{dP}{dt} V \quad (4.2)$$

$$\text{Substrat için} \quad : 0 - 0 + 0 - r_s V = \frac{dS}{dt} V \quad (4.3)$$

Burada; x ; biyokütle derişimi (g L^{-1}), P ; ürün derişimi (g L^{-1}), S ; substrat derişimi (g L^{-1}), V ; sıvı kültür hacmi (L), r_x ; büyüme hızı ($\text{g L}^{-1} \text{st}^{-1}$), r_s ; substrat tüketim hızı ($\text{g L}^{-1} \text{st}^{-1}$), r_p ; ürün oluşum hızı ($\text{g L}^{-1} \text{st}^{-1}$), r_d ; hücrelerin ölüm hızı ($\text{g L}^{-1} \text{st}^{-1}$).

Kesikli fermantasyonda, biyoproses ortamına madde giriş ve çıkışı olmadığından sıvı kültür hacmi sabittir. Mikrobiyal üreme sırasında hücrelerin ölüm hızı (r_d) ihmal edilebilir. Bu durumda denklemler şu şekilde ifade edilebilir [134]:

$$r_x = \frac{dx}{dt} \quad (4.4)$$

$$r_p = \frac{dP}{dt} \quad (4.5)$$

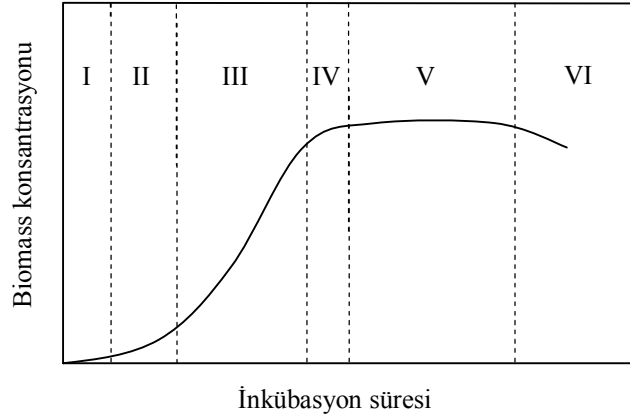
$$r_s = -\frac{dS}{dt} \quad (4.6)$$

4.2.2. Mikrobiyal Büyüme

Herhangi bir besiyeri bir mikroorganizma ile aşılandığı zaman hücreler ortamdan sırasıyla ihtiyacı olduğu bileşenleri alır ve onları biyokütleye dönüştürür. Kesikli (batch) kültürde üreme aşağıdaki safhalardan geçer:

- ✓ lag fazı
- ✓ logaritmik veya üstel üreme fazı
- ✓ yavaşlama fazı
- ✓ durağan (stationary) faz
- ✓ ölüm fazı

Bu safhalar Şekil 4.1.'de gösterilmiştir. Her safha biyolojik proseslerde oldukça önemlidir. Prosesin amacı lag fazını kısaltmak, logaritmik üreme fazının süresini ve hızını uzatmak olabilir. Lag fazı, hücrelerin besiyerine aşılmasından sonra gözlenen ilk safhadır. Bu sırada hücrelerin yeni ortama adaptasyonu gerçekleşir. Hücreler kendi moleküler yapılarını yeni ortama uyumlu kılacak şekilde yeniden düzenler. Besiyerinde bulunan bileşikleri parçalayıp biyokütle veya ürünlere dönüştürmek için yeni enzimler sentezlenir. Hücreler ortama adapte olduktan sonra logaritmik üreme safhasında hızla çoğalırlar. Hücre sayısı ve kütlesi zamanla üstel olarak artar. Üremenin dengeli olduğu safhadır. Besiyerindeki bileşiklerin derişimleri yüksek olduğundan üreme hızı derişimden bağımsızdır ve hücre derişimine göre birinci mertebededir. Üreme hızı özgül üreme hızı (specific growth rate) ile karakterize edilir. Yavaşlama fazı logaritmik üreme fazını izleyen safhadır. Bu fazda üreme hızı, bazı bileşenlerin azalması veya toksik ürünlerin ortamda birikmesi sonucu yavaşlar. Organizma üzerine uygulanan stres, hücrenin kendisine zararlı olan ortamda yaşama şansını artırmak için hücre içyapısının yeniden yapılanmasına sebep olur. Durağan faz (stationary phase), yavaşlama safhasından sonra başlar. Bu sırada net üretim hızı sıfırdır. Net üreme hızının sıfır olmasına rağmen metabolizma ve ürünlerin hücre içinde veya ortamda birikmesi devam edebilir. Ölüm fazı (death phase) durağan fazı izleyen safhadır. Fakat ölüm bir önceki fazda başlayabilir ve bu iki fazı net olarak birbirinden ayırmak bazen zordur.



Şekil 4.1. Kesikli fermantasyonda mikroorganizma büyüme eğrisi (I: lag fazı, II: gelişme fazı, III: logaritmik veya üstel üreme fazı, IV: yavaşlama fazı, V: durağan faz, VI: ölüm fazı).

Logaritmik fazda mikroorganizma üreme hızı mikroorganizma derişimi ile orantılı olarak artar.

$$r_x = \frac{dx}{dt} = \mu x \quad (4.7)$$

Burada μ özgül üreme hızı (st^{-1}), x biyokütle derişimidir. Logaritmik fazda, özgül üreme hızı sabit ve maksimum değerdedir. Yani; $\mu = \mu_{max}$ 'dır. Denklem (4.7)'nin integrasyonu şu bağıntıyı verir:

$$\ln \frac{x}{x_0} = \mu t \quad (4.8)$$

t 'ye karşı $\ln \left(\frac{x}{x_0} \right)$ 'ın grafiğe geçirilmesi ile μ bulunur.

Fermantasyon sürecinde, mikroorganizmaların bir kısmı canlılığını, fizyolojik aktivitelerini kaybederler. Genellikle ölü hücreler otoliz olur ve ortama bırakılan bileşikler canlı organizmalar tarafından kullanılır. Ölüm hızı matematiksel olarak birinci derecedendir:

$$r_d = \frac{dx}{dt} = -k_d x \quad (4.9)$$

burada k_d , ölüm hızı için sabittir.

$$\ln \frac{x}{x_s} = -k_d t \quad (4.10)$$

t 'ye karşı $\ln \left(\frac{x}{x_s} \right)$ 'ın grafiğe geçirilmesi ile k_d bulunur. (4.10) eşitliğinde, x_s , durağan fazın sonunda bulunan hücre derişimidir.

4.2.3. Üreme Hızına Etki Eden Faktörler

Üreme hızı için kullanılan kinetik modellerin çoğu enzim kinetiği için kullanılan kinetik modellere benzer. Hücrenin mikro boyutta bir kimyasal reaktör olduğu ve bu reaktörün içinde substratların, enzimlerin katalizlediği karmaşık reaksiyonlar zinciri ile canlı hücreye ve ürünlere dönüştürüldüğü düşünülmektedir. Biri dışında bütün substratların ortamda aşırı miktarda bulunduğu ve bu substratın kısıtlayıcı substrat olduğu, reaksiyon zincirindeki en yavaş adımın toplam reaksiyon hızını kontrol ettiği kabul edilmektedir.

Enzim reaksiyon hız ifadelerinin en basiti Michaelis- Menten ifadesidir:

$$V = \frac{kE_o S}{K_m + S} \quad (4.11)$$

Burada V ; reaksiyon hızı, k ; hız sabiti, E_o ; toplam enzim miktarı, K_m ; Michaelis-Menten sabiti ve S ; substrat derişimidir. kE_o çarpımı reaksiyonun ilerleyebileceği maksimum hızdır ve $V_{\max}$ olarak gösterilir.

Eğer böyle bir enzim reaksiyonunu hızı kontrol eden adım olarak belirler ve enzim derişiminin hücre derişimine orantılı olduğunu varsayarsak hücre üremesi için enzim kinetiğine benzer bir ifade yazılabilir:

$$r_x = \mu(S)x \quad (4.12)$$

Burada r_x hücre üreme hızı ($g \text{ hücre m}^{-3} \text{ h}^{-1}$), x hücre derişimidir ($g \text{ hücre m}^{-3}$).

$$\mu(S) = \frac{\mu_m S}{K_s + S} \quad (4.13)$$

şeklindedir ve Monod denklemi olarak bilinir. Burada K_s ; Monod doygunluk sabitidir (g substrat m^{-3}) ve organizmanın substrata olan ilgisinin bir ölçüsüdür. Monod denklemi en çok kullanılan yapısal olmayan üreme modellerinden biridir. Genellikle üreme hızının yavaş ve hücre yoğunluğunun düşük olduğu zaman deneysel verilerle oldukça iyi uyushmaktadır. Monod denkleminin deneylerle uyuşmadığı durumları açıklamak için yeni üreme hızı modelleri literatürde önerilmiştir. Bunlardan bazıları Tablo 4.1.' de verilmiştir.

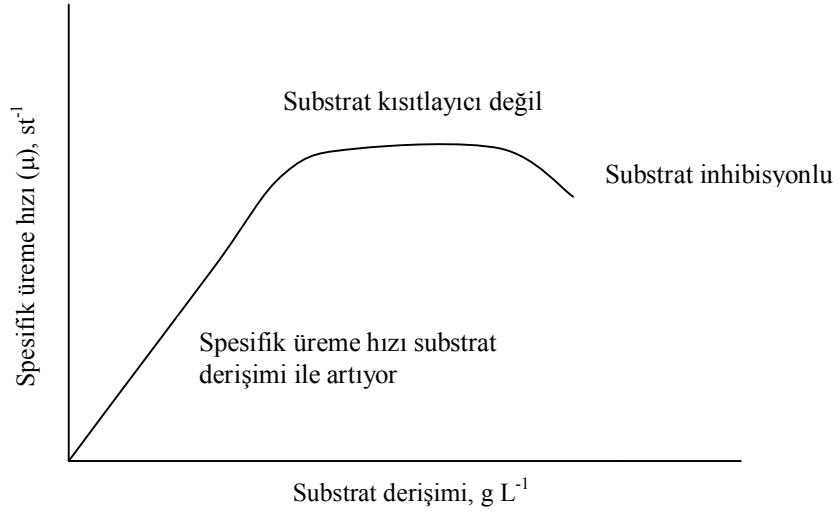
Tablo 4.1. Tek substratlı, inhibisyonuz üreme kinetiği modelleri [135].

Tessier	$\mu = \mu_m (1 - e^{-S/K_s})$
Moser	$\mu = \mu_m \frac{S^n}{K_s + S^n}$
Contois	$\mu = \mu_m \frac{S}{K_s x + S}$
Blackman	$\mu = \frac{1}{2} \mu_m \frac{S}{K_s} \quad S < 2K_s \text{ için}$
	$\mu = \mu_m \quad S \geq 2K_s \text{ için}$

Tessier denkleminde iki sabit (μ_m , K_s) vardır ve difüzyon kontrollü substrat beslenmesi sırasındaki üremeyi modellemek için önerilmiştir. Moser denklemi daha genel bir denklemdir ve üç tane sabiti (μ_m , K_s , n) vardır. $n=1$ olduğu zaman Monod denkleminde indirgenir. Contois denkleminde doyma sabiti K_s hücre derişiminin bir fonksiyonudur. Yüksek hücre derişimlerinde üreme hızını modellemek için kullanılmaktadır. Deneysel verilere Monod denkleminde daha iyi uymasına rağmen Blackman denklemindeki süreksizlik denklemin istenmeyen bir özelliğidir.

Üreme hızı üzerine substrat derişiminin etkisi incelediğinde, düşük substrat derişimlerinde üreme hızının substrat derişimi ile arttığı ve bir maksimuma ulaştığı görülür. Substrat derişiminin daha da artmasıyla üreme hızı azalmaya başlar. Bu olay “substrat inhibisyonu” olarak adlandırılır. Bu durum Şekil 4.2.'de gösterilmiştir.

Hücrelerin değişen substrat derişimine karşı davranışı sürpriz değildir. Hücrelerin özgül üreme hızı (μ), termodinamik su aktivitesinden etkilenir. Besiyerinin fizikokimyasal özelliklerindeki derişimler (osmotik basınç, iyon gücü, dielektrik sabiti gibi) hücre zarının geçirgenliğini etkileyebilir.



Şekil 4.2. Spesifik üreme hızı ile substrat derişimi arasındaki ilişki.

Yüksek substrat derişimlerinin üreme hızı üzerine etkisini nicel olarak ifade etmek üzere çeşitli denklemler öne sürülmüştür. Bunlardan yaygın olarak kullanılanlardan biri Andrews [136] tarafından önerilen denklemdir:

$$\mu = \mu_m \frac{S}{K_s + S + S^2/K_i} \quad (4.14)$$

Denklem (4.14), 1930’larda Haldane tarafından inaktif enzim-substrat kompleksi oluşumunu modellemek için önerilen denkleme dayandırılmıştır. Denklem (4.14)’in kesikli veya sürekli kültürde çeşitli organizmaların substrat inhibisyon kinetiğini öngördüğü gösterilmiştir. Substrat inhibisyonunu modellemek için öne sürülen bazı denklemler Tablo 4.2’de verilmiştir.

Tablo 4.2’deki 1-4 nolu denklemler ile denklem (4.14) karşılaştırılmış ve pek farklı olmadıkları görülmüştür. Denklem 5 ise deneylere bu denklemlerden daha iyi uymasına rağmen denklemdeki süreksizlik bir dezavantajdır. Luong [137], substrat inhibisyonunu modellemek için 4.15 denklemini öne sürmüştür:

$$\mu = \mu_m \frac{S}{K_s + S} \left(1 - \frac{S}{S_m} \right)^n \quad (4.15)$$

Tablo 4.2. Substrat inhibisyon kinetiği için önerilen modeller [138].

Denklem No	Kinetik model
1	$\mu = \mu_m \frac{S(1+S/K)}{K_s + S + S^2/K_{si}}$
2	$\mu = \mu_m \frac{S}{K_s + S + (S^2/K_{si})(1+S/K)}$
3	$\mu = \mu_m \frac{S}{K_s + S} e^{-S/K_{si}}$
4	$\mu = \mu_m (e^{-S/K_{si}} - e^{-S/K_s})$
5a	$\mu = \mu_m \frac{S}{K_s + S} - K_{si}(S - S^*) \quad \text{eger } S > S^*$
5b	$\mu = \mu_m \frac{S}{K_s + S} \quad \text{eğer } S < S^*$

Bu denklem (4.15) düşük substrat derişimlerinde üreme hızının artışı ve yüksek substrat derişimlerinde substrat inhibisyonunun etkisini hesaba katmaktadır. Ayrıca bu denklem, üremenin tamamen durduğu ($\mu=0$) maksimum substrat derişimi öngörmektedir.

İki substratın düşük derişimlerde bulunduğu ve üremenin her iki substrat tarafından sınırlandırıldığı durumlarda (çift substrat kısıtlaması) üreme hızı için aşağıdaki bağıntı yazılabilir:

$$\mu = \mu_m \left(\frac{S_1}{(K_{s1} + S_1)} \right) \left(\frac{S_2}{(K_{s2} + S_2)} \right) \quad (4.16)$$

Bu ifade substratlardan birinin derişimi doyma sabitinden büyük olduğu zaman klasik Monod denkleminde indirgenir.

Biyolojik reaksiyonların son ürünlerinin mikrobiyal üreme üzerine olumsuz etkileri fermantasyon endüstrisinde önemli bir problemdir. Fermantasyon ürünlerinin üreme üzerine olumsuz etkileri “ürün inhibisyonu (product inhibition)” olarak adlandırılır. Etanol, bütanol, laktik asit gibi ürünlerin ortamda birikmesi özgül üreme hızının sonuç olarak ürün oluşum hızının azalmasına sebep olur. Bu ürünler üreme hızı üzerine enzim reaksiyonlarındakine benzer bir etki yaparlar. Eğer oluşan ürün üreme hızını etkiliyorsa genel olarak şöyle yazılabilir.

$$\mu = f(S, P) \quad (4.17)$$

Ürünün, üreme hızı üzerine etkisini modellemek üzere önerilen denklemlerden bazıları Tablo 4.3.'de verilmiştir.

Tablo 4.3. Ürün inhibisyon kinetiği için önerilen modeller [138].

Denklem No	Kinetik model
1	$\mu = \mu_m \frac{S}{K_s + S} (1 - K_1 P)$
2	$\mu = \mu_m \frac{S}{K_s + S} [1 - K_1 (P - K_2)]$
3	$\mu = \mu_m \frac{S}{K_s + S} \frac{K_{pl}}{K_{pl} + P}$
4	$\mu = \mu_m \frac{S}{K_s + S} e^{-K_3 P}$
5	$\mu = \mu_m \frac{S}{K_s + S} \left(1 - K_4 \frac{P}{K_2 - P_m} \right)$
6	$\mu = \mu_m \frac{S}{K_s + S} \left(1 - \frac{P}{P_m} \right)$
7	$\mu = \mu_m \frac{S}{K_s + S} \left(1 - \frac{P}{P_m} \right)^\beta$
8	$\mu = \mu_m \frac{S}{K_s + S} \left(1 - \left(\frac{P}{P_m} \right)^\gamma \right)$

Tablo 4.3.'deki denklemlerdeki K sabitleri her bir denklem için ayrı anlamlara sahiptir. Denklemler arası seçim tamamen keyfidir ve gerçek gözlemlere ve geniş aralıkta elde edilen deney sonuçlarına dayanarak yapılır. Denklemin birini manipüle etmek diğerinden daha kolay olabilir. Eğer deneysel bulgular çok hassas değilse ve sınırlı sayıda veri varsa modeller arasındaki farkı görmek zordur.

Üreme sırasında elde edilen sigmoidal x-t eğrisi ampirik olarak aşağıdaki denklemle (lojistik üreme denklemi) ifade edilebileceği gösterilmiştir:

$$\mu = \mu_m \left(1 - \frac{x}{x_m} \right) \quad (4.18)$$

Bu denklem üremeyi logaritmik fazın başlangıcından durağan faza kadar (yavaşlama fazı dahil) temsil eder.

Han ve Levenspiel (1988), Monod modelini substrat, hücre ve ürün inhibisyon etkilerini hesaba katacak şekilde genelleştirmiştir. Önerilen denklem genelleştirilmiş Monod denklemi olarak adlandırılır ve genel olarak:

$$\mu = \mu_m \left(1 - \frac{I}{I^*} \right)^n \frac{S}{S + K_s \left(1 - \frac{I}{I^*} \right)^m} \quad (4.19)$$

şeklindedir. Burada $I=S$, x veya P olabilir. m ve n sabittir. I^* ise kritik inhibitör derişimidir. Denklem 4.19 substrat, hücre ve ürün inhibisyonu için aşağıda verilmiştir:

Substrat inhibisyonu için;

$$\mu = \mu_m \left(1 - \frac{S}{S^*} \right)^n \frac{S}{S + K_s \left(1 - \frac{S}{S^*} \right)^m} \quad (4.20)$$

Hücre inhibisyonu için;

$$\mu = \mu_m \left(1 - \frac{x}{x^*} \right)^n \frac{S}{S + K_s \left(1 - \frac{x}{x^*} \right)^m} \quad (4.21)$$

Ürün inhibisyonu için;

$$\mu = \mu_m \left(1 - \frac{P}{P^*} \right)^n \frac{S}{S + K_s \left(1 - \frac{P}{P^*} \right)^m} \quad (4.22)$$

$I \ll I^*$ olduğu durumlarda denklem (4.20)-(4.22) klasik Monod denklemine indirgenir.

4.2.4. Substrat Tüketimi

Üreme, substrat tüketim sonucu gerçekleşen bir olaydır. Substratlar biyoprosesler için enerji ve hammadde kaynağıdır. Hücreler şu üç fonksiyonu yerine getirmek için substratlara gereksinim duyarlar [132]:

- ✓ hücre sentezlemek
- ✓ ürün sentezlemek
- ✓ enerji sağlamak

Üreme sırasında elde edilen enerji hücre sentezinde, ürün sentezinde ve yaşamsal faaliyet (maintenance) fonksiyonlarını yerine getirmek için kullanılır. Burada yaşamsal faaliyet, hücrenin canlı olarak tutulabilmesi (bazal metabolizma) için gerekli minimum enerjiyi gösterir. Substrat tüketim hızı matematiksel olarak şu şekilde ifade edilir:

$$r_s = r_{sx} + r_{sp} + r_{sm} \quad (4.23)$$

Burada; r_{sx} ; hücre sentezi için substrat tüketim hızı ($\text{g L}^{-1} \text{st}^{-1}$), r_{sp} ; ürün sentezi için substrat tüketim hızı ($\text{g L}^{-1} \text{st}^{-1}$), r_{sm} ; hücre yaşamsal faaliyetleri için substrat tüketim hızı ($\text{g L}^{-1} \text{st}^{-1}$).

Hız eşitliği, verim faktörünü içerecek şekilde aşağıdaki gibi ifade edilir.

$$r_s = \frac{r_x}{Y_{x/S}} + \frac{r_p}{Y_{p/S}} + m \times x \quad (4.24)$$

Burada; $Y_{x/S}$; hücre için verim faktörü ($\text{g}_{\text{hücre}} \text{g}_{\text{substrat}}^{-1}$), $Y_{p/S}$; ürün için verim faktörü ($\text{g}_{\text{ürün}} \text{g}_{\text{substrat}}^{-1}$), m ; hücre için bakım katsayısı ($\text{g}_{\text{substrat}} \text{g}_{\text{hücre}}^{-1} \text{st}^{-1}$).

4.2.5. Ürün Oluşumu

Ürün oluşum kinetiği son derece komplekstir. Ürünler, bazen büyüme esnasında büyümeye paralel olarak (primer metabolitler), bazen de büyüme durduktan sonra (sekonder metabolitler) oluşur. Biyoproseslerde elde edilen ürünler, literatürde çeşitli yöntemler ile sınıflandırılmıştır. Bunlar içinde en yaygın olarak kabul göreni Gaden [139] tarafından oluşturulan sınıflandırmadır. Gaden'e göre oluşan ürünler üç gruba ayrılır:

Tip 1 ürünler: Enerji metabolizmasının sonucu ortaya çıkan ürünlerdir. Büyüme ve ürün oluşumu paralel oluşur.

Tip 2 ürünler: Enerji metabolizmasında dolaylı olarak çıkan ara ürünlerdir (sitrik asit gibi).

Tip 3 ürünler: Enerji metabolizmasının doğrudan sonucu olmayan kompleks moleküllerdir.

Basit kinetik modellere dayalı sınıflandırmanın faydalı olduğu görülmüştür:

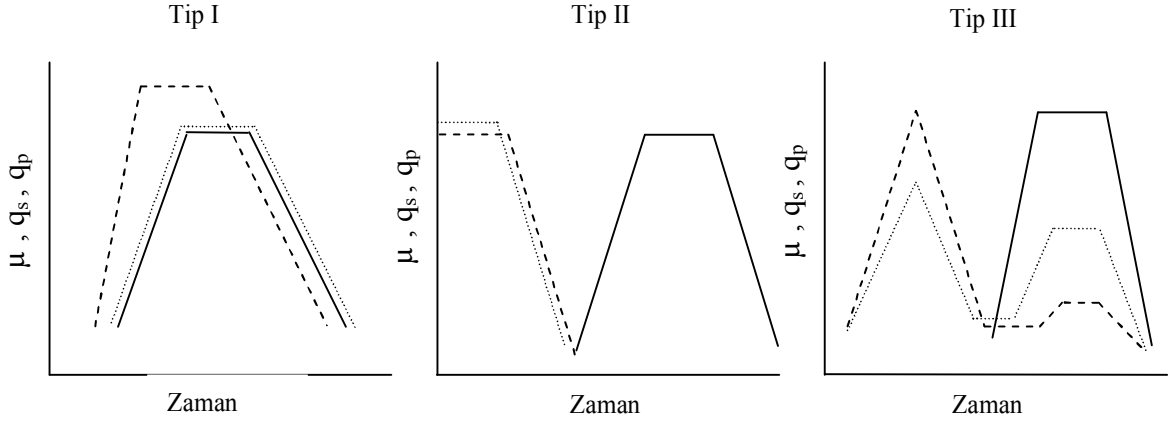
$$\text{I. Üremeye bağlı ürünler (growth associated)} \quad r_p = \alpha r_x \quad (4.25)$$

$$\text{II. Üremeye bağlı olmayan ürünler (non-growth associated)} \quad r_p = \beta x \quad (4.26)$$

$$\text{III. Karışık ürün oluşumu (mixed type product formation)} \quad r_p = \alpha r_x + \beta x \quad (4.27)$$

Burada; α : Üremeye bağlı ürün oluşum sabitini, β : Üremeye bağlı olmayan ürün oluşum sabitini göstermektedir.

Bu üç durum Şekil 4.3.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.3. Kesikli fermantasyon proses kinetiklerinin genel modelleri (---- μ , spesifik üreme hızı, q_s , spesifik substrat tüketim hızı, — q_p , spesifik ürün oluşum hızı) [139].

4.2.6. Kinetik Parametrelerin Hesaplanması

Kesikli kültürde en çok uygulanan yöntem deneysel verilerin “doğruya uydurulması”dır. Bu yöntem grafik çizilerek kolaylıkla uygulanabilir. Diğer yöntem deneysel verilerin “eğriye uydurulması”dır. Bu bilgisayar yardımıyla uygun programlar kullanılarak yapılır.

4.2.6.1. μ_m ve K_s 'in hesaplanması

Deneysel verilerin doğruya uydurulmasına en yaygın örnek Lineweaver-Burke grafiğidir. Aşağıdaki üreme hızı denklemini ele alırsak;

$$\mu = \mu_m \frac{S}{K_s + S} \quad (4.28)$$

Burada r_x , S ve x değişkenler μ_m ve K_s parametrelerdir. Yukarıdaki denklem düzenlenirse;

$$\frac{1}{\mu} = \frac{K_s}{\mu_m} \frac{1}{S} + \frac{1}{\mu_m} \quad (4.29)$$

elde edilir. Eğer $1/S$ 'e karşı $1/\mu$ grafiğe geçirilirse bir doğru elde edilir. Bu doğrunun kaymasından ve eğiminden μ_m ve K_s değerleri bulunur.

4.2.6.2. $Y_{x/s}$ ve m 'nin hesaplanması

Verim faktörü ve yaşam faktörü katsayısının hesaplanması için Luedeking-Piret tarafından geliştirilen substrat tüketim hız denklemi (4.24) kullanılır. Bu eşitlikte ürün oluşumu için kullanılan substrat miktarı ihmal edilir ve yeniden düzenlenirse denklem (4.30) elde edilir. Literatürde yapılan birçok çalışmada da ürün oluşumu için tüketilen substrat miktarının ihmal edilebilir olduğu ifade edilmiştir.

$$\frac{r_s}{x} = \frac{1}{Y_{x/s}} \frac{r_x}{x} + m \quad (4.30)$$

Eğer r_s/x 'in r_x/x 'e karşı grafiği çizilirse bir doğru elde edilir. Bu doğrunun kaymasından ve eğiminden $Y_{x/s}$ ve m değerleri bulunur.

4.2.6.3. Ürün oluşum parametreleri α ve β 'in hesaplanması

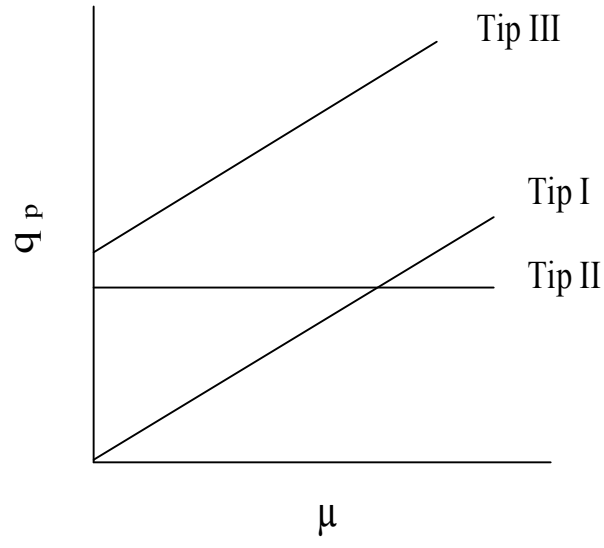
Ürün oluşum parametreleri α ve β 'in hesaplanması için, denklem (4.27) x ile bölünür ve düzenlenerek kullanılırsa;

$$\frac{r_p}{x} = \alpha \frac{r_x}{x} + \beta \quad (4.32)$$

Denklem (4.32) elde edilir. $r_p/x = q_p$ ve $r_x/x = \mu$ olduğundan denklem (4.32) denklem (4.33)'e dönüşür:

$$q_p = \alpha \mu + \beta \quad (4.33)$$

μ ve q_p grafiği çizilirse, α ve β değerleri bulunur.



Şekil 4.4. Ürün oluşum parametrelerinin bulunması. **Tip I:** Üremeye bağlı ürünler; $\alpha > 0$, $\beta = 0$, **Tip II:** Üremeye bağlı olmayan ürünler; $\alpha = 0$, $\beta > 0$, **Tip III:** Bağımsız ürün oluşumu; $\alpha > 0$, $\beta > 0$.

5. MATERYAL VE METOD

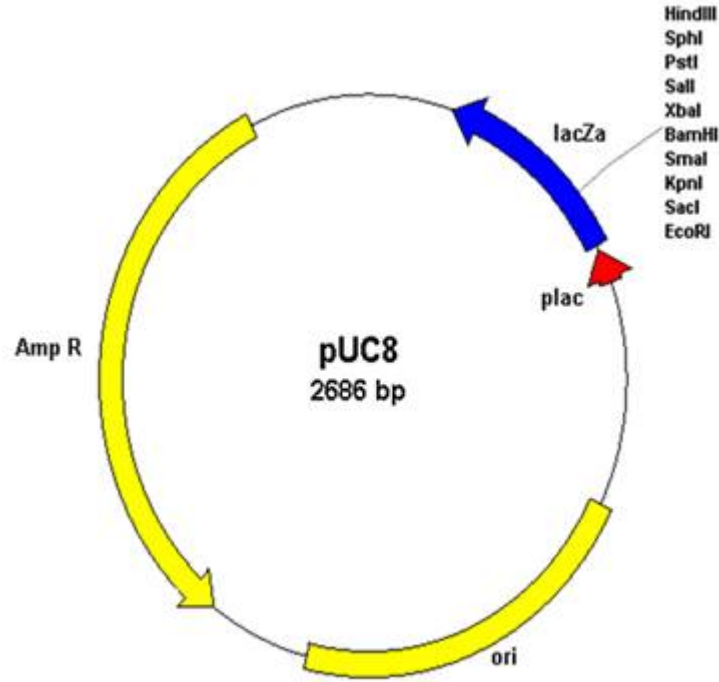
5.1. Mikroorganizmalar

Bu çalışmada, mikroorganizma olarak gram-negatif bakterilerden *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ve *Erwinia herbicola* (NRRL B-3466) kullanılmıştır. *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ve *Erwinia herbicola* (NRRL B-3466) L-DOPA ve Dopamin üretimleri ile bilinen bakterilerdir. Bu bakteriler İnönü Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Hikmet GEÇKİL tarafından sağlanmıştır. *Enterobacter aerogenes*'in iki rekombinantından *vgb* genini taşımayan vektörü bulunduran rekombinant suş Ea[pUC8], *vgb* genini taşıyan vektörü bulunduran rekombinant suş ise Ea[pUC8:15] olarak adlandırılmıştır. *Escherichia coli*'de ise *vgb* genini taşımayan vektörü bulunduran rekombinant suş Ec[pMK57], *vgb* genini taşıyan vektörü bulunduran rekombinant suş ise Ec[pMK79] olarak ifade edilmiştir. *Escherichia coli* ve *Enterobacter aerogenes*'in *vgb* klonlanmamış ve *vgb* klonlanmış rekombinant suşlarından plazmidler izole edilerek, *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ve *Erwinia herbicola* (NRRL B-3466) suşlarına transformasyonları gerçekleştirilmiştir. Her iki bakterinin *vgb* genini taşımayan (*vgb*⁻) (*Citrobacter freundii* pMK57 ve *Erwinia herbicola* pUC8) ve *vgb* genini taşıyan (*vgb*⁺) (*Citrobacter freundii* pMK79 ve *Erwinia herbicola* pUC8:15) rekombinantları elde edilmiştir.

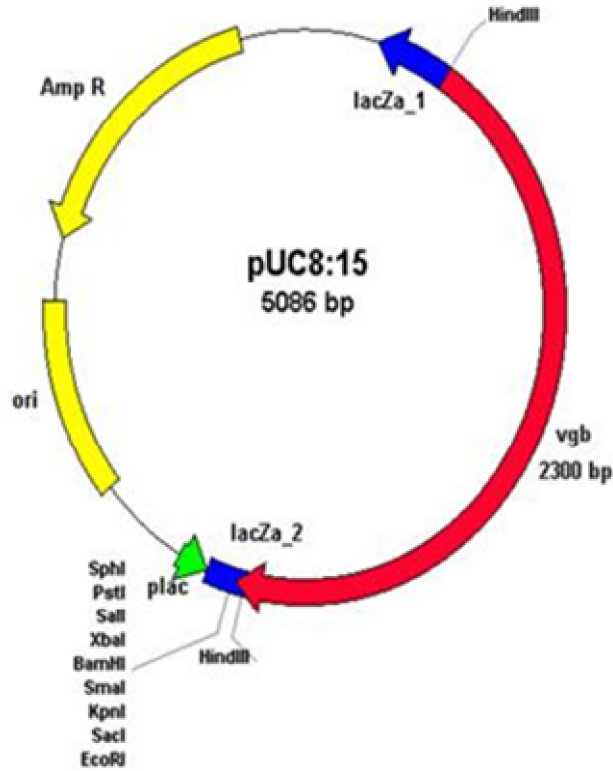
5.2. Kullanılan *vgb* Klonları

Çalışmada kullanılan *Enterobacter aerogenes*'in *vgb* rekombinantı Şekil 5.1. ve Şekil 5.2.'de gösterilen pUC plazmidi (pUC8 ve pUC8:15) üzerinde bulunmaktadır. *Enterobacter aerogenes*'in *vgb*⁻ rekombinantı Ea[pUC8] olarak, *Enterobacter aerogenes*'in *vgb*⁺ rekombinantı ise Ea[pUC8:15] olarak adlandırılmaktadır. Ea[pUC8:15] rekombinant suşu 665 baz çiftine sahip pUC8 plazmidinin multi klonlama bölgesindeki Hind III restriksiyon bölgesine yaklaşık 2.3-kb'lık promotörü ile beraber *vgb* geni taşıyan *Vitreoscilla* genomik fragmanının klonlanması ile oluşturulmuş bir rekombinant bakteri suşudur. [pUC8:15] plazmidinin büyüklüğü yaklaşık 5.0-kb'dır [4].

Escherichia coli JM103 [pMK57] ve JM103 [pMK79] ise pUC8 plazmidine amfisisilin (Amp^R), amilaz geni (*Amy*), *lacZ*, β -galaktozidaz geni, *lacZP* β -galaktozidaz geninin promotoru entegre edilerek *vgb*⁻ plazmidi pMK57 elde edilmiştir. pMK57 plazmidine *vgb* geni klonlanarak *vgb*⁺ plazmidi pMK79 oluşturulmuştur.

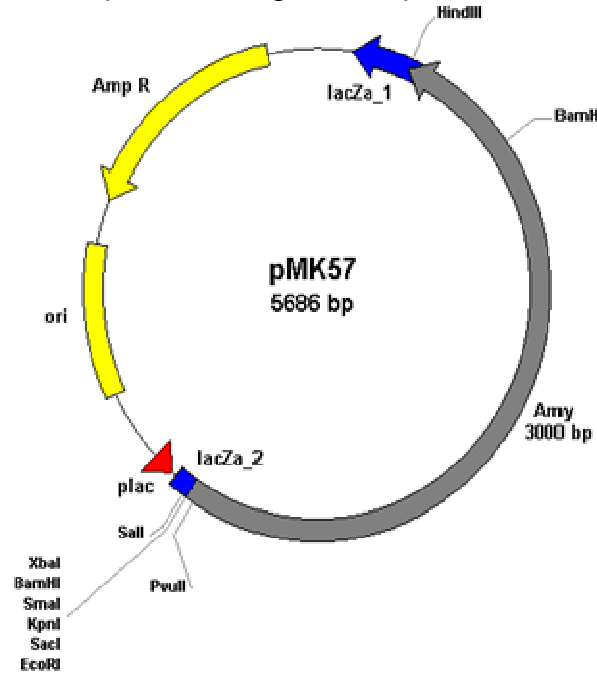


Şekil 5.1. pUC8 plazmidinin fiziki haritası.

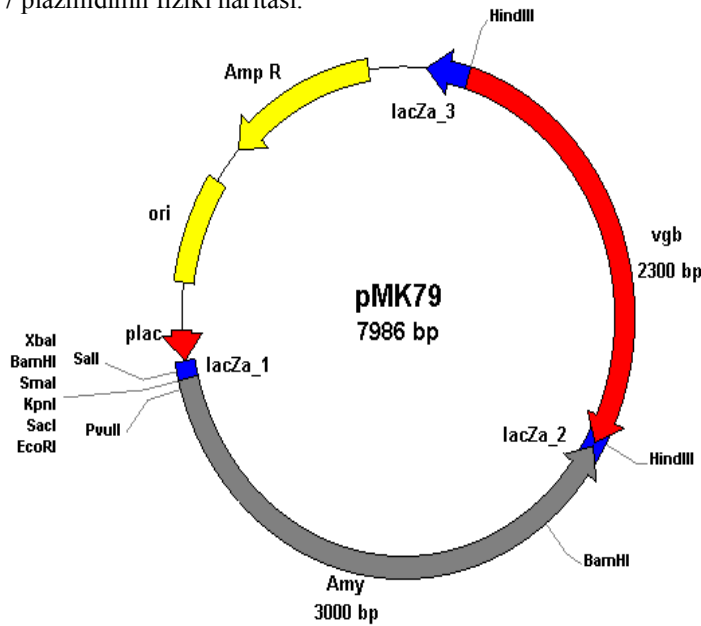


Şekil 5.2. pUC8:15 plazmidinin fiziki haritası.

Escherichia coli JM103 [pMK57] rekombinantı, 2.7-kb'den oluşan pUC8 ile 3.0-kb'den oluşan *Bacillus subtilis*'in α -amilaz genini içeren *Escherichia coli* suşudur. Oluşan plazmid yaklaşık 5.7-kb'dır. *Escherichia coli* JM103 [pMK79] suşu 665 baz çiftine sahip pMK57 plazmidinin multi klonlama bölgesindeki Hind III restriksiyon bölgesine yaklaşık 2.3-kb'lık promotörü ile beraber *vgb* geni taşıyan *Vitreoscilla* genomik fragmanı klonlanması ile oluşturulmuş bir rekombinant bakteri suşudur. *Escherichia coli* JM103 [pMK79] plazmidinin büyüklüğü yaklaşık 8.0-kb'dır. pMK57 ve pMK79 plazmitlerinin fiziki haritaları Şekil 5.3. ve Şekil 5.4.'de gösterilmiştir.



Şekil 5.3. pMK57 plazmidinin fiziki haritası.



Şekil 5.4. pMK79 plazmidinin fiziki haritası.

5.3. Uygun Bakteri Suşlarının Eldesi ve Klonlama Çalışmaları

Plazmid izolasyonu, transformasyonu ve restriksiyon haritalaması için standart protokoller kullanılmıştır. *Enterobacter aerogenes* ve *Escherichia coli*'nin *vgb* klonlanmış rekombinant suşlarından plazmidler izole edilerek, VHb kaynağı olarak L-DOPA ve Dopamin üretimleri ile bilinen *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ve *Erwinia herbicola* (NRRL B-3466) suşlarına transformasyonları gerçekleştirilmiştir. Bütün transformantlardan elde edilen plazmidlerin minipreplerinden onların uygun plazmidi içerdikleri kanıtlanmıştır. Hedeflenen bütün rekombinantlar elde edildikten sonra, bu rekombinant suşlar ile *vgb* içermeyen (*vgb*⁻) suşların ve yabancı suşların L-DOPA ve Dopamin üretme karakteristikleri karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır. Elde edilen muhtemel transformantlardan tekrar plazmid izolasyonu yapılarak doğruluğu test edilmiştir.

5.3.1. Plazmid İzolasyonu İçin Bakteri Kültürleri

Vitreoscilla hemoglobin (VHb) geninin (*vgb*) kaynağı olarak bu geni plazmid vektörler üzerinde taşıyan *Enterobacter aerogenes* ve *Escherichia coli* rekombinantları kullanılmıştır. Negatif kontroller elde etmek için aynı plazmidin *vgb*⁻ (yani *vgb* geni taşımayan) formunu taşıyan rekombinantlarından bu plazmidler izole edilmiştir. Bunun için taze bir pasaj üzerindeki bir koloniden alınan örnek 250 ml'lik erleninde 100 µg ml⁻¹ amfisilin içeren 50 ml sıvı LB içine ekilerek gece boyunca (37 °C'de 18 saat) inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonu gerçekleştirilen bu kültürler santrifüjlenerek sıvı kısım uzaklaştırıldıktan sonra geriye kalan peletler plazmid izolasyonu için kullanılmıştır.

5.3.2. Plazmid İzolasyonu (Miniprep)

Yukarıdaki şekilde kültürü yapılan *E. aerogenes* ve *E. coli*'nin *vgb*⁺ ve *vgb*⁻ rekombinantlarından plazmid izolasyonu standart alkali-lizis yöntemi kullanılarak yapılmıştır [140]. İzlenen standart protokol aşağıdaki verilmiştir.

1. Gece boyunca inkübasyonu yapılan kültürlerden 1.5 ml'lik süspansiyon bir santrifüj tüpüne alınarak 10000 devir dk⁻¹'de 3 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant atılarak santrifüj tüpünde kalan pelet plazmid izolasyonu için muhafaza edilmiştir.
2. Pelet 100 µl soğuk Çözelti I (GTE) ile sulandırılıp 30 sn iyi bir süspansiyon karışımı için vortekslelendikten sonra 5 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir.

3. Taze olarak hazırlanmış 200 µl Çözelti II (NaOH/SDS) eklenip tüp alt-üst edildikten sonra 5 dk buz içerisinde bekletilmiştir.
4. Karışıma 150 µl oda sıcaklığındaki Çözelti III (potasyum asetat) eklenerek tekrar vortekslenmiş ve 5 dk buzda bekletilmiştir.
5. Karışım 10000 devir dk^{-1} 'de + 4 °C'de 3 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant kısım temiz bir tüpe aktarılmış ve üzerine 800 µl % 95'lik etanol eklenerek 2 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 3 dk 10000 devir/dk'de santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır.
6. Peletin üzerine 1 ml % 70'lik etanol eklenerek yıkama işleminden sonra tekrar santrifüj edilmiş ve pelet inkübatörde 37 °C'de 30 dk kurumaya bırakılmıştır.
7. Yukarıdaki pelete 30 µl steril TE tamponu eklenerek süspansiyon edilmiş ve DNA süspansiyonu ileriki çalışmalar için + 4 °C'de muhafaza edilmiştir.

Buradaki alkali-lizis yöntemi ile plazmid izolasyonu için kullanılan çözeltilerin stokları ve hazırlanışları aşağıdaki verilmiştir.

Çözelti stokları:

i) 10 ml GTE çözeltisi

ii) 1.5 ml NaOH/SDS çözeltisi (taze hazırlanmış)

iii) 100 ml potasyum asetat çözeltisi

iv) 10 ml TE tamponu

i) GTE çözeltisinin (Glikoz/Tris.HCl/EDTA) hazırlanışı:

[22, 141] glikoz

25 mM Tris-HCl, pH 8.0

10 mM EDTA

GTE çözeltisi hazırlandıktan sonra otoklav edilerek sterilize edilmiş ve +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

ii) NaOH/SDS çözeltisinin hazırlanışı:

0.2 N NaOH

%1 (w v^{-1}) SDS

Bu çözeltinin taze hazırlanması gerekir.

iii) Potasyum asetat çözeltisinin (pH 4.8) hazırlanışı:

29.5 ml glasiyel asetik asit

KOH peletleri (pH 4.8 oluncaya kadar)

70.5 ml dH₂O

iv) TE (Tris/EDTA) Tamponu

10 mM Tris-HCl, pH 8.0

1 mM EDTA, pH 8.0

TE çözeltisi hazırlandıktan sonra otoklav edilerek steriliz edilmiş ve 4 °C'de muhafaza edilmiştir.

5.3.3. Plazmidlerin Restriksiyon Enzimleri İle Kesilimi Ve Agaroz Jel Elektroforezi

Uygun restriksiyon enzimleri ile muamele edilerek kesilen plazmidlerin restriksiyon haritaları agaroz jel elektroforezi ile belirlenmiştir. Jellerin hazırlanmasında ve yürütülmesinde 50X stok Tris-Asetat-EDTA (TAE) tamponu kullanılmıştır.

TAE tampon çözeltisinin hazırlanışı:

242 g L⁻¹ Tris baz (pH 8.5)

57.1 g L⁻¹ glasiyel asetik asit

37.2 g L⁻¹ EDTA (pH 8.0)

Jeller ve yürütme tamponu bu stokun 1X'e seyreltilmiş çözeltisi ile hazırlanmışlardır. Jellerin hazırlanması ve yürütülmesi genel olarak aşağıdaki protokole göre yapılmıştır [140].

1. Minijeller toplam 100 ml jel solüsyonu ile yapılmışlardır. Bunun için 98 ml dH₂O'ya 2 ml 50X TAE tamponu eklenmiş ve agarozun jeldeki derişimi %1.25 (w v⁻¹) olarak hazırlanmıştır. Bu karışım mikrodalga fırında agaroz tamamen eriyip solüsyon berraklaşınca kadar kaynatılmış ve çözelti sıcaklığı yaklaşık 60–70 °C'ye düşünce etidyum bromürün stok çözeltisinden (10 mg ml⁻¹) 10 µl eklenerek hava kabarcığı veya köpürme olmayacak şekilde hafifçe karışması sağlanmıştır.
2. Yukarıdaki jel solüsyonu temiz ve kuru bir jel döküm kalıbına (15 x 15 cm, Biorad) tarak dişlerini kapatacak kalınlıkta dökülerek yaklaşık 30 dk jel çözeltisinin katılaşması beklenmiştir.
3. Jel, döküm kalıbı ile beraber jel yürütme tankı içine alınarak taraklar çıkarılmış ve jeli yaklaşık 0.5 cm kapatacak miktarda jel yürütme tamponu tanka doldurulmuştur.
4. Bu esnada plazmidlerin restriksiyon muameleleri, 100 µl TE tamponu içerisindeki plazmid örneklerinden 10 µl alınıp steril tüplere konulmuş ve üzerine 2 µl HindIII tamponu ve 2 µl HindIII enzimi eklenerek gerçekleştirilmiştir.

5. Karışım 37 °C'de 2 saat su banyosunda bekletildikten sonra içinde izleme boyası olarak brom fenol blue bulunan yükleme tamponundan 5 µl eklenmiştir.
6. Restriksiyon enzimi ile muamele görmüş plazmid DNA'sı ve yine uygun restriksiyon enzimleri ile önceden kesilmiş ve standart işaretleyici (marker) olarak kullanılan lambda (λ) DNA'sı uygun kuyucuklara eklenerek jel elektroforezi sabit voltaj (50–70 Volt) ve akımda (20–25 mA) gerçekleştirilmiştir.
7. Minijellerin yürütülmesi bu şartlar altında genel olarak 4–5 saat zaman almış ve bu sürenin sonunda izleme boyasının iki bileşeninden hafif olanının jelin sonuna kadar yürümesinin beklenmesinden sonra elektroforez işlemine son verilmiştir.
8. Jeldeki DNA bantlaşma motifi UV ışık altında floresan ışık yayan etidyum bromür ile belirlenmiş ve elektroforetogramları yapılmıştır.
9. Boyama işleminden sonra jel yüzeyi çok koyu boyandığı takdirde, bantların net olarak görülebilmesi için jeller ek bir yıkamadan geçirilmişlerdir [65].
10. Plazmidlerin restiksiyon bantlaşmasından istediğimiz DNA fragmanlarının bulunup bulunmadığı λ DNA'sının bilinen fragmanları ile oluşturulan standart eğriler yardımı ile bulunmuşlardır.

5.3.4. Bakterilerin İzole Edilen Vektörlerle Transformasyonu

Escherichia coli'nin *vgb*⁻ (Ec[pMK57]), *Escherichia coli*'nin *vgb*⁺ (Ec[pMK79]) ve *Enterobacter aerogenes*'in *vgb*⁻ (Ea[pUC8]), *Enterobacter aerogenes*'in *vgb*⁺ (Ea[pUC8:15]) rekombinantlarından izole edilmiş olan plazmid vektörlerin, L-DOPA ve Dopamin üretmeleri ile bilinen *Erwinia herbicola* 3466 ve *Citrobacter freundii* 2633'ye transformasyonları standart CaCl₂-ısı şoku metodu ile yapılmıştır [142]. Bakteri kültürleri taze pasajlardan alınan kolonilerden yapılmıştır. Bunun için, pasajlardan bir koloninin bir kısmı öze ile alınarak 50 ml LB içeren 250 ml kapasiteli erlenlere ekim yapılmış ve gece boyunca çalkalamalı koşullarda (200 devir dk⁻¹) 37 °C'de inkübe edilmiştir. Bu gece kültürlerinden yeni LB besi ortamına 1/100 (v v⁻¹) oranında ekim (ör; 50 ml LB içeren erlenlere 500 µl gece kültürü) transfer edilerek OD₆₀₀ değeri yaklaşık 0.5 olana kadar aynı koşullarda inkübe edilmişlerdir. Plazmidlerin transformasyonu için bu logaritmik faz kültürleri kullanılmıştır. Bu hücrelerin eksojen kaynaklı DNA moleküllerini (yani yukarıda izole edilen plazmidleri) içine almaları için öncelikle kompetan duruma getirilmeleri gerekir. Bunun için aşağıdaki CaCl₂ yöntemi kullanılmıştır.

Kompetan hücre oluşturulması:

1. Gece boyunca (15–18 saat) 37 °C’de 200 devir dk⁻¹’de kültürü yapılan hücrelerden 500 µl örnek (ekim) alınarak 50 ml LB içeren erlenlere ekim yapıldı ve bu kültürler yine çalkalamalı şartlarda (160 rpm) ve 37 °C’de A₆₀₀ değeri yaklaşık 0.5 olana kadar inkübe edildi.
2. Yukarıdaki optik yoğunluğa ulaşan erlenler bir buz kabına gömülerek 10 dk. bekletildikten sonra, santrifüj tüplerine kültürler alındı ve soğutmalı (4 °C) santrifüjde 5000 devir dk⁻¹’de 5 dk santrifüj edilerek süpernatant atıldı.
3. Soğuk 10 mM NaCl’den 1 ml peletlerin üzerine eklendi ve peletler süspande edildi.
4. 5 dk 5000 devir dk⁻¹’de 4 °C’de santrifüj edildi.
5. Toplanan pelete 0.5 ml soğuk 0.1 M CaCl₂ eklenerek 20 dk buz üstünde tutulduktan sonra 4 °C 5000 devir dk⁻¹’de yine 5 dk santrifüj edildi ve yine pelet muhafaza edildi.
6. Toplanan pelet 150 µl soğuk 0.1 M CaCl₂ içinde süspande edilerek transformasyon için hemen kullanıldı.

Hücrelerin transformasyonu:

Yukarıdaki şekilde elde edilen kompetan hücrelere *vgb⁻* ve *vgb⁺* genlerini taşıyan plazmidinin aktarımı (transformasyonu) literatürdeki standart “ısı şoku” protokolüne göre aşağıdaki şekilde yapıldı.

1. Süspansiyonun üzerine 0.1–1 µg DNA içeren 2 µl DNA solüsyonu eklendi ve buzda 1 saat bekletildi.
2. Tüpler 42 °C’deki bir su banyosuna alınarak 2 dk tutulduktan sonra tekrar buza gömülerek 10 dk bekletildi.
3. Tüplere 1 ml LB eklenerek hafifçe çalkalandıktan sonra 37 °C’de yaklaşık 1 saat inkübe edildiler.
4. Hücreler amfisilin (100 µg ml⁻¹) içeren LB_{agar} petri kaplarına 200 µl olarak transfer edilerek cam çubukla yayıldıktan sonra inkübatöre kaldırılarak en az 18 saat süre ile inkübe edildiler.

Rekombinant kolonilerin seçimi:

Elde edilen rekombinant kolonilerin gözle görülebilir bir büyüklüğe ulaşmalarının en az 18 saatlik bir inkübasyonu gerektirdiği belirlenmiştir. Rekombinant kolonilerden iğne öze ile alınarak 50 ml LB_{amp} (100 µg ml⁻¹ amfisilin içeren sıvı LB ortamı) ortamına

ekim yapıldıktan sonra çalkalamalı koşullarda (200 devir dk^{-1}) 37 °C’de gece boyunca inkübasyona bırakıldı ve sadece rekombinant bakterilerde mavi-yeşil renkli pigment olan piyosiyenin ürettikleri gözlemlendi (Şekil 5.5.).

Antibiyotiğe (amfisilin) direnç sağlayan gen sayesinde transformantlar ilgili antibiyotiği içeren ortamlarda oluşturdıkları uydu (satellit) koloni morfolojilerinden seçilerek bunların gerçek transformant olup olmadıklarını anlamak için restriksiyon haritalaması yapılmış ve vektörlerin başarılı bir şekilde transform edildiklerini kanıtlanmıştır. Bunun için standart alkali-lizis yöntemi kullanılarak yapılmıştır [143]. Uygun restriksiyon enzimleri ile muamele edilerek kesilen plazmidlerin restriksiyon haritaları agaroz jel elektroforezi ile belirlenmiştir.

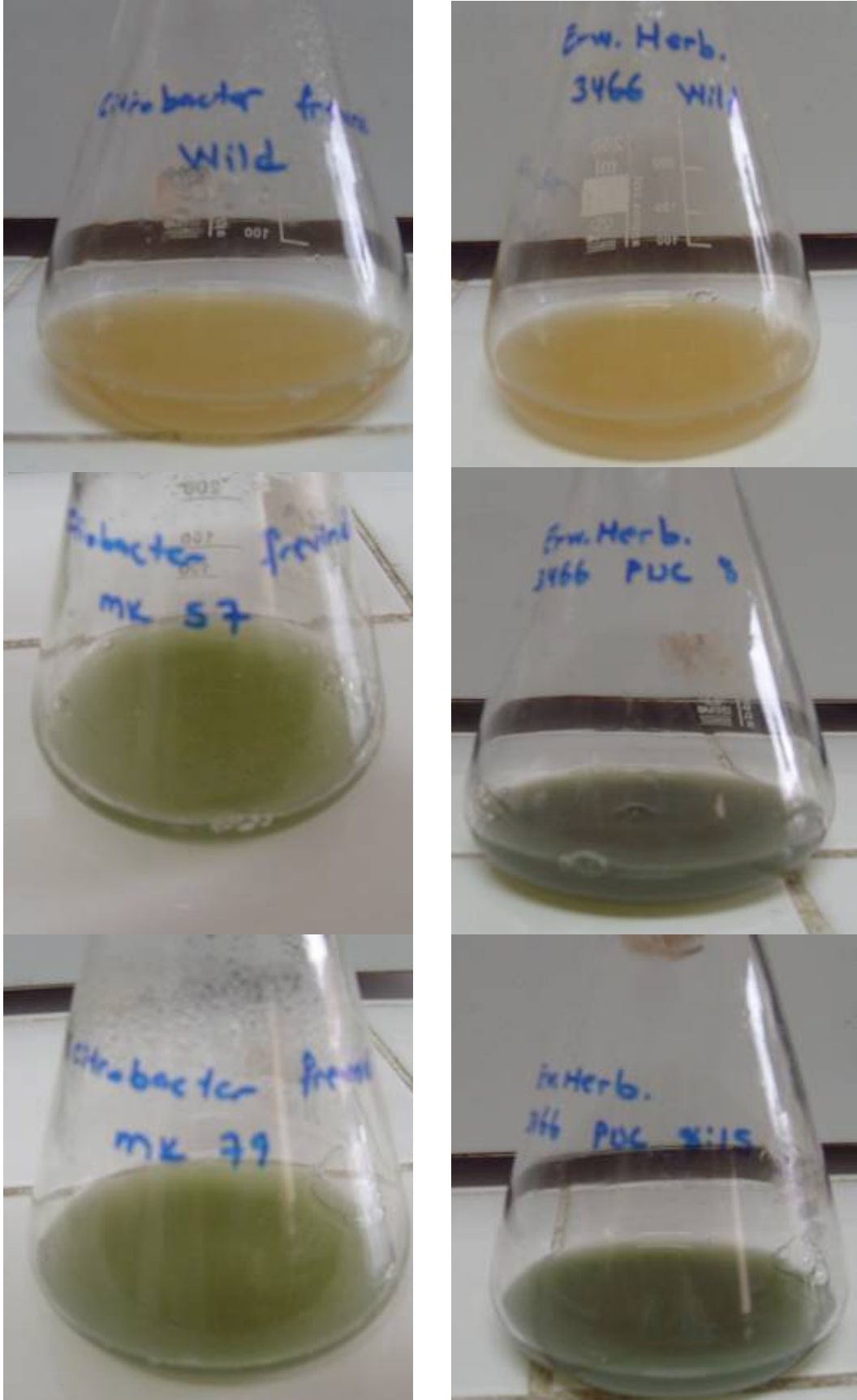
5.4. Mikroorganizma Büyüme Ortamı ve Şartları

L-DOPA ve Dopamin üretiminde kullanılan bakterilerin saklanması ve geliştirilmesinde Tablo 5.1.’de verilen zengin bir besi ortamı olan Luria-Berteni (LB) [144] besi ortamı kullanılmıştır.

Tablo 5.1. Luria-Berteni (LB) besi ortamı [144].

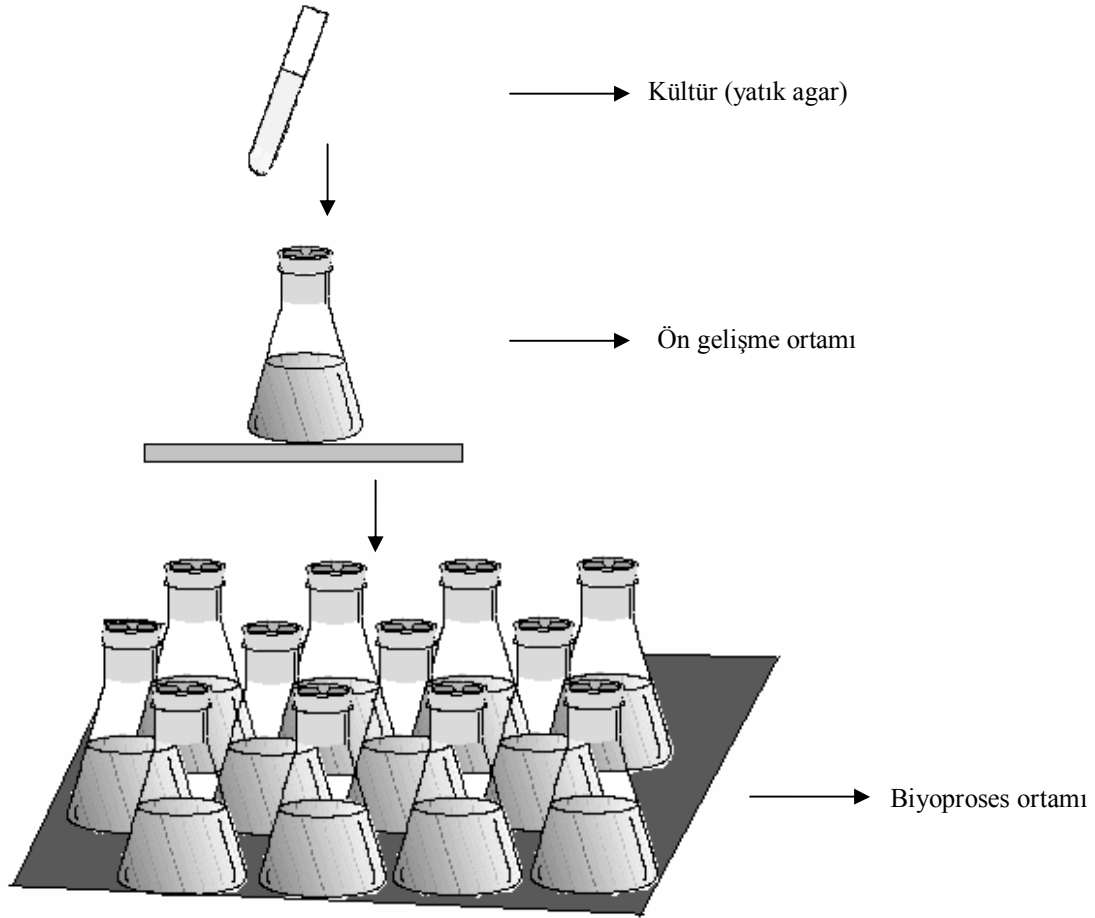
Bileşen	Bakteri Saklama Besi Ortamı	Bakteri Gelişim Besi Ortamı
Pepton	10 g L^{-1}	10 g L^{-1}
Yeast Ekstrakt	5 g L^{-1}	5 g L^{-1}
NaCl	10 g L^{-1}	10 g L^{-1}
Agar	15 g L^{-1}	
* Amfisilin	0.1 $\mu\text{g ml}^{-1}$	0.1 $\mu\text{g ml}^{-1}$

* Sadece rekombinant suşların üretildiği besi ortamında bulunmaktadır.



Şekil 5.5. Rekombinant bakterilerde piyosyanin pigmenti.

Stok kültürler Tablo 5.1.'de verilen kültür saklama besi ortamına ekilerek inkübasyon sonrasında + 4 °C'de muhafaza edilmiştir. Çalışmada kullanılan bakterilerin (*C. freundii*, *E. herbicola*, *E. aerogenes* ve *E. coli*) uzun süreli stokları % 20 gliserol (v v⁻¹) içeren sıvı besi ortamında yapılmıştır. Bunun için logaritmik fazdaki kültürlerden steril santrifüj tüplerine 1 ml alınarak 5000 devir dk⁻¹ hızda 3 dk santrifüj edildi ve supernatant dökülerek bunun yerine 0.8 ml sıvı LB ve 0.2 ml gliserol ilave edilmiştir. Santrifüj tüpleri anlık homejenizasyonu sağlamak için vortekslenerek sıvı azotun içerisine atıldı ve faz ayrımı oluşmadan hücre süspansiyonu dondurulmuştur. Bu şekilde hazırlanan stoklar -26 °C'de muhafaza edilmiştir. Bu stoklardaki hücrelerin 2 yıl kadar canlılıklarını korudukları bilinmektedir. Ancak, çalışmalarda kullanılan bakteriler bu stok kültürlerden değil, LB agar ve rekombinantlar için amfisilin içeren LB agar plakalar üzerine ekilen ve + 4 °C'de muhafaza edilen hücrelerden taze pasajlar alınarak yapılmış ve kültürler 20 günde bir yenilenmiştir. Çalışmanın her aşamasında kullanılan bakteriler iki aşamada ekilmiştir, ilk olarak kültür saklama ortamından bakteri geliştirme ortamına ve daha sonra bakteri gelişme ortamından alınan mikroorganizmalar L-DOPA ve Dopamin üretim ortamına ekilmiştir. Hazırlanan besi ortamlarından 50 ml alınarak 250 ml'lik erlenlere konulmuştur. Biyoproses ortamlarının başlangıç pH'ları 0.1 N HCl ve 0.1 N NaOH kullanarak ayarlanmıştır. Erlenlerin ağzı pamuk ve sargı bezinden yapılmış bir tıpa, tıpanın üzeri de alüminyum folyo ile kaplanmıştır. Bu şekilde hazırlanan besiyeri 121 °C'de ve 1.2 bar basınçta 20 dakika süre ile otoklavda (Prior Clave 129) sterillemiştir. Sterillenen besi yerleri laminar flow'da ortam sıcaklığına soğutulmuştur. Eğik slantlarda (yatık agar) bulunan bakteri kültürleri steril bir öze (loop) yardımıyla 50 ml bakteri gelişme ortamı içeren 250 ml'lik erlenlere aşılanmıştır. Erlenlere aşılanan kültür 37 °C'de 150 devir dk⁻¹ çalkalama hızına sahip orbital inkübatörlü çalkalayıcıda (Selecta Rotabit) 18 saat süre ile bakterilerin gelişimi sağlanmıştır. Gelişme ortamındaki mikroorganizma % 1 (v v⁻¹) oranında L-DOPA ve Dopamin üretim ortamına eklenmiştir. Üretim ortamı farklı sürelerde fermantasyona tabii tutulmuştur (Şekil 5.6.).



Şekil 5.6. Deneylerin yapılışında takip edilen yöntem.

5.5. Fermantasyon Ortamı

Gelişme ortamında gelişimini tamamlayan mikroorganizmalar % 1 ($v v^{-1}$) oranında farklı bileşimde hazırlanan L-DOPA ve Dopamin üretim ortamlarına aktarılmıştır. L-DOPA ve Dopamin üretimi erlenlerde ve biyoreaktörde yapılan deneylerde incelenmiştir. Erlenlerde gerçekleştirilen deneylerde karbon kaynağının (glukoz) farklı derişimlerinde, farklı organik (pepton, yeast ekstrakt, üre) ve inorganik (amonyum sülfat, sodyum nitrat) azot kaynakları ile derişimleri ve diğer ortam bileşenlerinin yanı sıra, pH, sıcaklık, ve karıştırma hızı gibi fiziksel parametrelerin etkileri araştırılarak L-DOPA ve Dopaminin maksimum düzeyde üretiminin gerçekleştiği optimum biyoproses ortamı belirlenmiştir.

5.6. Biyoreaktör İşletim Şartları

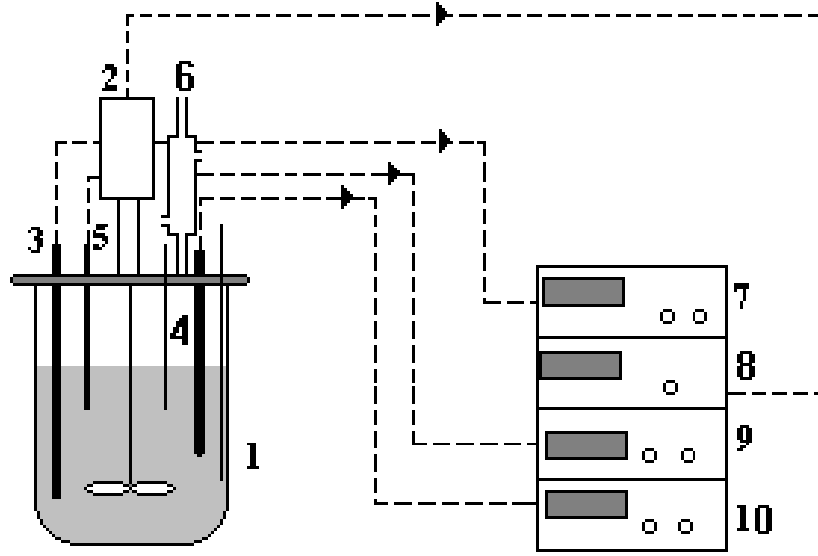
Kesikli çalışan karıştırmalı biyoreaktörde, farklı bileşenlerden oluşan sentetik ortamlar kullanılarak L-DOPA ve Dopamin üretimi gerçekleştirilmiştir. Biyoreaktör olarak 800 ml çalışma hacminde ısıya dayanıklı pyreks camdan yapılmış, 1.0 L hacimli silindirik bir fermentör kullanılmıştır. Paslanmaz çelik malzemedan yapılmış kapak üzerinde pH elektrodu, oksijen probu, sıcaklık sensörü, aşı ekleme, ürün çıkışı, hava giriş ve çıkışı, karıştırıcı, asit veya baz ilavesi için uygun bağlantılar bulunmaktadır. Sistem pH metre ve buna bağlı pH kontrol ünitesi, asit ve baz pompaları, numune alma kabı ve numune alma pompası, karıştırıcı motor, hava pompası, rotametre ve sıcaklık ölçerden oluşmaktadır. Biyoproses süresince elektrotlar ve kontrol sistemi yardımıyla karıştırma hızı, çözünmüş oksijen derişimi, sıcaklık ve pH değerleri izlenmiştir. Hava akış hızı rotametreden kontrol edilerek, hava 0.2 mikron gözenekliliğindeki filtrelerden geçirildikten sonra karıştırıcının alt kısmındaki hava dağıtıcısından biyoreaktöre gönderilmektedir. Çalışmalar steril koşullarda yapıldığından reaktörün tüm bağlantıları yapılarak otoklavlanmıştır. Sterilizasyondan sonra besi ortamına, aşı ekleme, ürün analizi için numune alma işlemleri sterilliği bozmayacak şekilde yapılmıştır (Şekil 5.7.).

5.7. Analitik Yöntemler

Fermantasyon prosesi süresince farklı zamanlarda alınan örneklerde, biyokütle derişimi, substrat derişimi, pH, hücre içi ve hücre dışı L-DOPA ve Dopamin derişimleri ile Tirozin Fenol Liyaz (TPL) enzim aktivitesi belirlenmiştir.

5.7.1. Biyokütle Derişimi

Mikroorganizma gelişimi UV-vis spektrofotometrede absorbans ölçümüyle takip edilmiştir. Çalışma doğrusu, belirli derişimde hücre içeren besi ortamı için 200-800 nm arasında yapılan dalga boyu taraması sonucu en uygun dalga boyu olarak seçilen 600 nm'de hazırlanmıştır (Ek 1. ve Ek 2.). Absorbans değerleri hazırlanan standart doğrudan faydalanılarak, kuru ağırlık olarak ifade edilmiştir. Referans çözelti olarak mikroorganizma içermeyen fermantasyon ortamları kullanılmıştır. $OD_{600} > 1.0$ olduğu zaman kültürler uygun şekilde (1/5 veya 1/10) dilüsyon yapılarak değerleri kaydedilmiştir. Bu tür bir ölçümü yapılmasının amacı hücre ekstraktlarının hazırlanmasında eşit OD değerlerini sağlayarak eşit miktarda biyokütle'yi sonifiye etmektir.



Şekil 5.7. Biyoreaktör Düzenegi. 1: Reaktör, 2: Karıştırıcı motor, 3: Oksijen probu, 4: pH probu, 5: Sıcaklık sensörü, 6: Kondensör, 7: Oksijen metre, 8: Karıştırma hızı kontrol ünitesi, 9: Sıcaklık kontrol ünitesi, 10: pH metre.

5.7.2. Toplam Protein Derişimi Tayini

Fermantasyon ortamında toplam protein miktarını belirlemek için, Lowry (1951) tarafından verilen yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır [145].

Protein tayininde kullanılan reaktifler:

Reaktif 1: % 2 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

Reaktif 2: % 2 Na-K-Tartarat

Reaktif A: 0.1 N NaOH içinde % 2'lik Na_2CO_3 (2 gr Na_2CO_3 + 0.4 gr NaOH / 100ml)

Reaktif B: 1 ml Reaktif 1 + 1 ml Reaktif 2 alınarak, 100 ml'ye Reaktif A ile tamamlanır.

Reaktif C: Folin Ciocalteu fenol reaktifi distile su ile 1/1 oranında seyreltilir.

Örneklerdeki toplam protein derişimini belirlemek için bovine serum albuminin (BSA) derişimi bilinen örneklerinden yararlanılarak derişim-absorbans çalışma doğrusu hazırlanmıştır (Ek 3.). Protein standardı, örnek ve kör aşağıdaki işlemlere tabi tutulmuştur.

Kontrol	Örnek
0.5 ml distile su	0.5 ml seyreltilmiş örnek
+	+
2.5 ml reaktif B	2.5 ml reaktif B

↓
Vortex ile karıştırılmış ve oda sıcaklığında 10 dakika bekletilmiştir.

↓
0.25 ml folin ciocalteu fenol reaktifi eklenmiştir.

↓
Tekrar vortex ile karıştırılıp 30 dakika oda sıcaklığında tutulmuştur.

↓
Standart ve örneklerin 660 nm’de köre karşı absorpsanları okunmuştur.

Çalışma doğrusundan yararlanılarak, örnekteki protein derişimi aşağıdaki formülle göre mg ml^{-1} olarak hesaplanmıştır.

$$\text{Protein Derişimi (mg ml}^{-1}\text{)} = (A_{660}/\text{Eğim}) \times \text{Seyreltme Faktörü} \quad (5.1)$$

5.7.3. DNS Yöntemi ile Substrat (Glikoz) Derişimi Tayini

Fermantasyon ortamında harcanmadan kalan glikoz derişimi DNS (dinitrosalisilik asit) yöntemi ile belirlenmiştir [146]. Bunun için önce derişimi bilinen miktarlarda glikoz içeren ortamlar kullanılarak çalışma doğrusu hazırlanmıştır. Oluşturulan çalışma doğrusu Ek 4.’de, DNS çözeltisi hazırlama yöntemi ise Ek 5.’te verilmiştir. Çalışma doğrusunun oluşturulmasında ve örneklerin analizinde kullanılan yöntem aşağıda verilmiştir.

1. Farklı derişimlerdeki glikoz içeren ortamdan 1 ml alınarak üzerine 3 ml DNS çözeltisi eklenmiştir.
2. Karışım 5 dakika kaynayan su banyosunda tutulduktan sonra 5 dakika buz banyosunda bekletilmiştir.
3. Glikoz içermeyen ve aynı basamaklardan geçen standart çözelti ile UV-spektrometre’nin sıfır (blank) ayarı yapılmıştır. Çözeltilerin absorpsanları en uygun dalga boyu olarak seçilen 550 nm’de okunmuştur.

5.7.4. Hücre Ekstraktlarının Hazırlanması

Santrifüj edilen fermantasyon ortamından sıvı kısım uzaklaştırıldıktan sonra arta kalan hücre kültürü peletleri bu bölümde hücre içi L-DOPA, Dopamin derişimleri ve tirozin fenol liyaz (TPL) aktiviteleri için kullanılmıştır. Peletler 0.05 M potasyum fosfat (KPi) tamponunda (pH 8.6) iki kez yıkandıktan sonra aynı tamponda $A_{600}=1.0$ olacak şekilde tekrar süspansiyon yapılmıştır. Bu süspansiyonlar bir ultrasonifikatör (Sonopuls HD 2070) ile 40 saniye sonifikasyon, 20 saniye buz üzerinde inkübasyon olacak şekilde toplam 3 dakika sonifiye edilerek kültürlerin hücre duvarları parçalanmış ve ultrasonik hücre ekstraktları hazırlanmıştır. Hücre ekstraktları 10000 devir/dk hızda 5 dakika santrifüj edilerek supernatant kısımda TPL enzim aktivitesi tayin edilmiş ve bu supernatantlar hücre içi L-DOPA ve Dopamin tayini için alüminyum folyo ile ışığa maruz kalmayacak şekilde kaplanmış tüplere konularak HPLC ile ölçüm yapılana kadar + 4 °C’de buzdolabında saklanmışlardır.

5.7.5. L-DOPA ve Dopaminin HPLC ile Analizi

Hem hücre içi hem hücre dışı elde edilen L-DOPA ve Dopamin miktarları Cecil 1100 ve Shimadzu LC20 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) cihazları ile tayin edilmiştir. Analizler Tablo 5.2.’de verilen HPLC işletme şartlarında gerçekleştirilmiştir. Burada 1000 mg L⁻¹’lik stok L-DOPA ve Dopamin çözeltileri hazırlanmış ve bu stoktan 25–500 mg L⁻¹ aralığında standartlar hazırlanarak, çalışma grafikleri oluşturulmuştur (Ek 6. ve Ek 7.). Bu çalışma doğruları için korelasyon katsayıları genel olarak ≥ 0.999 olarak bulunmuş ve her analiz öncesi standart grafikler çizilerek çalışma doğrusu yenilenmiştir. Analizlerde her bir örneğin üç tekrarı hazırlanarak ölçülmüş ve elde edilen verilerin aritmetik ortalamaları alınarak sonuçlar hesaplanmıştır. Analiz süresi her bir örnek için toplam 25 dakika olarak belirlenmiştir.

Tablo 5.2. HPLC işletme parametreleri.

Parametre	
Kolon	250 mm/4.6 mm/100 Å-Inertsil ODS-4 (C18)
Dedektör	UV Dedektör
Taşıyıcı faz	25 mM pH:3.0 Fosfat Tamponu/Metanol (97/3)
Taşıyıcı faz akış hızı	1.0 ml dk ⁻¹
Kolon sıcaklığı	25 °C
Tayin yapılan dalga boyu	290 nm
Hesaplama kriteri	Pik Alanı

5.7.6. Tirozin Fenol Liyaz (TPL) Enzimi Aktivitesi Tayini

Tirozin fenol liyaz (TPL) enzim aktivitesi, bu enzim tarafından L-tirozinin fenol, pirüvat ve amonyağa yıkılmasından açığa çıkan amonyağın belirlenmesine dayanan (Ek 8.) ve yaygın olarak kullanılan Nessler reaksiyonu ile belirlenmiştir [147]. Nessler ayırıcı çözelti A ve çözelti B adı verilen iki çözeltinin karışımından oluşmaktadır [101].

Nessler ayırıcında kullanılan çözeltiler:

Çözelti A: 35 g KI, 50 g HgI₂ içeren 200 ml'lik çözelti

Çözelti B: 50 g NaOH içeren 250 ml'lik çözelti.

Çözelti A ve B soğutulduktan sonra Çözelti B, Çözelti A'ya eklenmiş; karışım (Nessler ayırıcı) ışıktan korunacak şekilde koyu renkli şişeler içerisinde karanlıkta saklanmıştır. Renk oluşumu ve olabilecek çökelmenin tamamlanması amacı ile bir hafta süre ile korunmuştur. Bu süreden sonra ayırıcın renklenmiş (sarı-turuncu) olan sıvı kısmı (dipte oluşan çökeltiye dokunulmadan) kullanılmıştır.

Tirozin Fenol Liyaz (TPL) enziminin aktivitesinin tayininde izlenen basamaklar aşağıda sıralanmıştır:

1. Toplam 1 ml olan reaksiyon karışımı 5 mM L-tirozin ve 0.1 mM piridoksal fosfat (PLP) içeren 800 µl 0.05 M KPi (pH 8.6) ve 200 µl hücre ekstraktından oluşmaktadır.
2. Her bir örnek için paralel hazırlanmış körlere ekstrakt konulmadan önce 0.1 ml 1.5 M trikloroasetik asit (TCA) konularak hücre proteinlerinin (dolayısı ile TPL'nin) denatürasyonu sağlanmıştır.
3. Örnekler ve bunlara karşı gelen körleri 37 °C'de 30 dk. inkübasyona bırakıldıktan sonra örnek tüplerine 0.1 ml 1.5 M trikloroasetik asit (TCA) konularak reaksiyon durdurulmuştur.
4. Reaksiyon karışımı daha sonra 10000 devir dk⁻¹'de 5 dk santrifüj edilerek 500 µl süpernatant 1.75 ml distile su içeren tüplere transfer edilmiştir. Bu karışıma 250 µl Nessler ayırıcı eklenerek toplam hacim 2.5 ml yapılmış ve karışım vortekslenerek, 20 dk oda sıcaklığında ışık geçirmeyen bir ortamda tutulmuştur.

5. Bu süre sonunda oluşan renk yoğunluğu değerleri o renge özgü olan 480 nm dalga boyunda körlerine karşı okunarak kayıt edilmiştir.

Bir TPL enzim ünitesi (IU) 37 °C’de 1 dakikada 1 µmol amonyak açığa çıkaran enzim miktarı olarak tanımlanır. Spesifik aktivite (SA) miligram toplam hücre proteininde bulunan enzim ünitesi olarak ifade edilmiştir. Örneklerdeki amonyak derişimi, daha önce amonyum sülfatla hazırlanmış olan standart eğri yardımı ile hesaplanmıştır (Ek 8.). Bu metodta amonyak belirleme alt sınırı yaklaşık 10 µM olarak belirlenmiştir.

5.7.7. Sıvı Faz Hacimsel Kütle Aktarım Katsayısı ve Oksijen Tüketim Hızı

L-DOPA ve Dopamin üretiminde, sıvı faz hacimsel kütle aktarım katsayısı ve oksijen tüketim hızı “Dinamik Yöntem” ile belirlenmiştir. Yöntem biyoreaktöre gönderilen havanın kısa süreli olarak kesilmesi ve bir oksijen elektrodu yardımıyla biyoreaktör ortamındaki çözünmüş oksijen derişimindeki azalmanın; daha sonra havanın tekrar sisteme verilmesi ile oksijen derişimindeki artışın zamanla ölçülmesi prensibine dayanmaktadır [148].

Belirli sürelerde, biyoreaktöre beslenen hava mikroorganizmanın biyolojik faaliyetlerini etkilemeyecek şekilde çok kısa süreli olarak kesilmiş, yüzey havalandırma etkisini azaltmak amacıyla karıştırma hızı da 20-50 devir dk⁻¹ arasında tutulmuştur. Fermantasyon ortamında çözünmüş oksijen derişiminin doğrusal azalmasından yararlanılarak mikroorganizmanın oksijen tüketim hızı r_o hesaplanmıştır (Denklem 2.2.). Sıvı faz kütle aktarım katsayısının belirlenebilmesi için incelenen oksijen aktarım koşullarında sisteme tekrar hava verilerek çözünmüş oksijen derişimindeki doğrusal olmayan artış incelenmiştir. Denklem (2.1)’in düzenlenmesi ile Şekil 2.4.’de gösterildiği gibi $\{C_o; (dC_o/dt)-r_oC^*\}$ yapılan deneylerde grafiğinin eğiminden k_L değeri hesaplanmıştır. Örnek grafikler ve hesaplama Ek 9.’da gösterilmiştir.

5.8. İstatistiksel Testler

L-DOPA ve Dopamin’in fermantasyon yoluyla eş zamanlı üretim prosesinde, sistemin davranışını tanımlayan en uygun modelin belirlenebilmesi için literatürden elde edilen kinetik modellerin çözümü MATLAB 7.04 ve Polymath 6.1 paket programları

kullanılarak yapılmıştır. Modellerden elde edilen sonuçların güvenilirliğini araştırmak amacıyla modelleme yeteneği (EF), hata karelerinin ortalama karekökü (RMSE) ve Khi-kare (χ^2) gibi çeşitli istatistiksel karşılaştırma metotları kullanılmış ve uygun model belirlenmeye çalışılmıştır.

Modelleme Yeteneği ;

$$EF = \frac{\sum_{i=1}^N (x_{di} - x_{dort})^2 - (x_{hi} - x_{di})^2}{\sum_{i=1}^N (x_{di} - x_{dort})^2} \quad (5.2)$$

EF = Modelleme yeteneği

x_{di} = Deneysel değer

x_{hi} = Modelden hesaplanan değer

x_{dort} = Deneysel değerlerin ortalaması

N = Ölçüm sayısı

Hata Karelerinin Ortalama Karekökü;

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_{hi} - x_{di})^2}{N}} \quad (5.3)$$

RMSE = Ortalama hata

x_{di} = Deneysel değer

x_{hi} = Modelden hesaplanan değer

N = Ölçüm sayısı

Khi-kare;

$$\chi^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (x_{di} - x_{hi})^2}{N-n} \quad (5.4)$$

χ^2 = Khi-kare

x_{di} = Deneysel değer

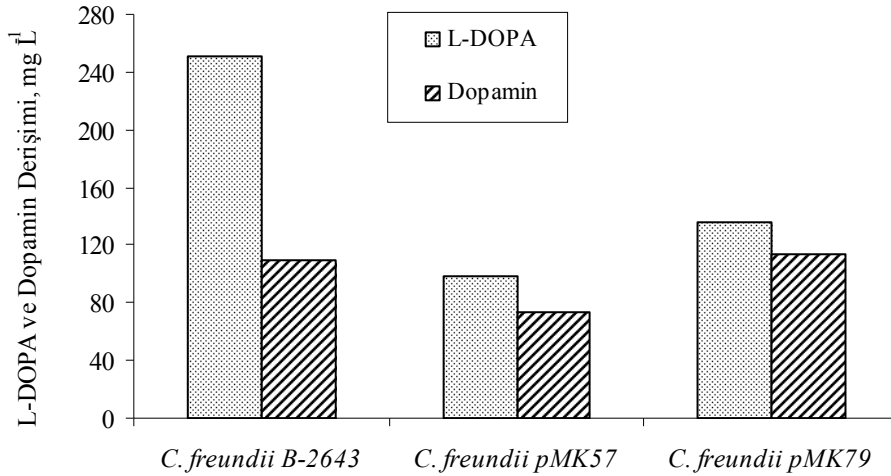
X_{hi} = Modelden hesaplanan değer

N = Ölçüm sayısı

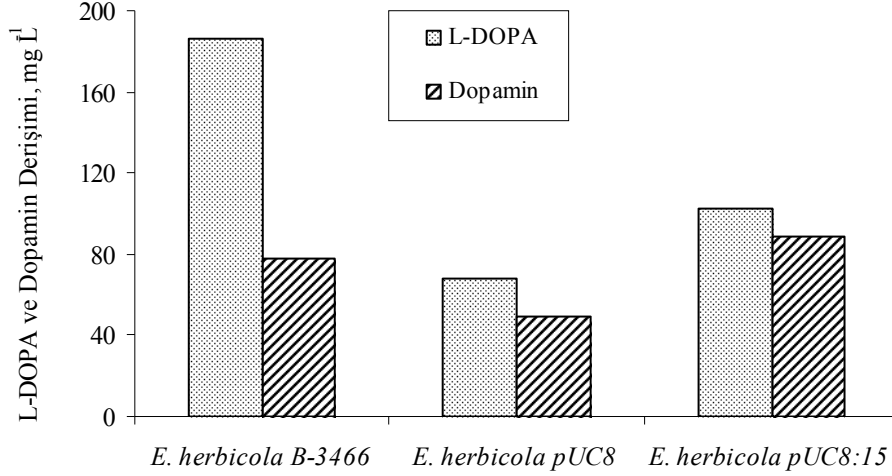
n = Modeldeki parametre sayısı

6. BULGULAR VE TARTIŞMA

Yapılan çalışmalarda, iyi birer L-DOPA ve Dopamin üreticisi olarak bilinen *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ve *Erwinia herbicola* (NRRL B-3466) gram negatif bakterilerinin yabanıl suşları ile her iki bakterinin *vgb* genini taşımayan (*vgb*⁻) ve *vgb* genini taşıyan (*vgb*⁺) rekombinantları kullanılmıştır. Çalışmanın başlangıcında her iki gram negatif bakteri ve bunların rekombinantları ile Luria-Bertani (LB) kültür ortamında L-DOPA ve Dopamin üretim kapasiteleri karşılaştırılmıştır. Şekil 6.1. ve Şekil 6.2.'den görüleceği üzere *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) yabanıl suşu ile *vgb*⁻ ve *vgb*⁺ rekombinant suşlarının L-DOPA ve Dopamin üretim kapasitelerinin, *Erwinia herbicola* (NRRL B-3466) yabanıl suşu ile *vgb*⁻ ve *vgb*⁺ rekombinant suşlarının L-DOPA ve Dopamin üretim kapasitelerinden daha yüksek düzeylerde olduğu görülmektedir. Bu sebeple bundan sonra yapılan çalışmalar boyunca *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) gram negatif bakterisi ve rekombinantları ile değişik kültür ortamları ve koşullarında L-DOPA ve Dopamin üretim kapasiteleri bu mikroorganizma için karşılaştırmalı olarak çalışılmıştır.



Şekil 6.1. *Citrobacter freundii* B-2643 ve rekombinant suşları pMK57 ile pMK79'nin LB ortamındaki maksimum hücre dışı L-DOPA ve Dopamin üretim düzeyleri (Şartlar: 10 g L⁻¹ pepton, 5 g L⁻¹ Y.E., 10 g L⁻¹ NaCl, pH_p: 7.0; Ekim oranı: % 1 v v⁻¹; Çalkalama hızı: 150 rpm; Ortam sıcaklığı: 37 °C).



Şekil 6.2. *Erwinia herbicola* B-3466 ve rekombinant suşları pUC8 ile pUC8:15'in LB ortamındaki maksimum hücre dışı L-DOPA ve Dopamin üretim düzeyleri (Şartlar: 10 g L⁻¹ pepton, 5 g L⁻¹ Y.E., 10 g L⁻¹ NaCl, pH₆: 7.0; Ekim oranı: % 1 v v⁻¹; Çalkalama hızı: 150 rpm; Ortam sıcaklığı: 37 °C).

Bakteriler zor koşullar altında enerjetik sebepler ve diğer nedenlerden dolayı (karbon ve azot kaynağı eksikliği) ürettikleri L-DOPA ve Dopamin'in bir kısmını hücre içerisinde tutarlar. Ancak, bu iki önemli metabolit birincil derecede hücre dışına (besi ortamına) atılırlar. Bu nedenle L-DOPA ve Dopamin'in üretimleri hücre içi ve hücre dışı şeklinde ayrı ayrı belirlenmiştir.

Yapılan tüm çalışmalarda ön gelişim ortamı olarak LB kullanılmıştır. L-DOPA ve Dopamin üretim ortamı ise LB içerisindeki ortam bileşenlerinin yanı sıra karbon (glukoz), organik azot kaynakları, inorganik azot kaynakları ve diğer ortam bileşenlerinin ilavesi ile optimize edilmiş ve maksimum metabolit üretim ortamı belirlenmiştir. *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) yabanil suşu ile *vgb* genini taşımayan (*vgb*⁻) ve *vgb* genini taşıyan (*vgb*⁺) rekombinantlarından L-DOPA ve Dopamin üretimi, hem 50 ml çalışma hacmindeki 250 ml'lik erlen'lerde hem de sıcaklığın, pH'nın, karıştırma ve havalandırma hızının doğrudan kontrol edildiği 0.8 L çalışma hacmine sahip 1.0 L'lik kesikli olarak işletilen biyoreaktörde gerçekleştirilmiştir.

6.1. *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ve Rekombinant Suşları ile L-DOPA ve Dopamin Üretimi

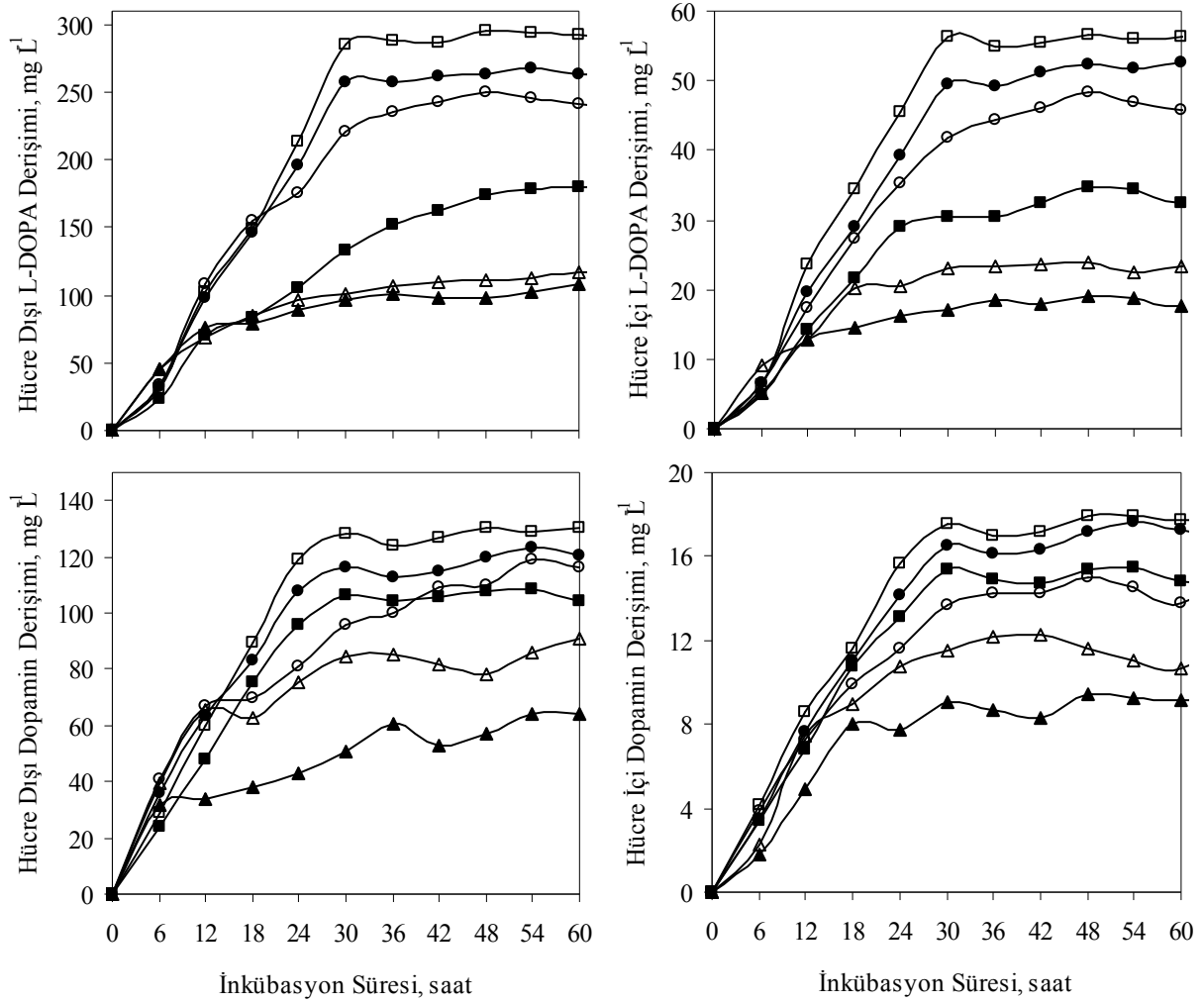
Citrobacter freundii (NRRL B-2643) yabanil suşu ve *vgb* genini taşımayan (*vgb*⁻) *Citrobacter freundii* pMK57 ile *vgb* genini taşıyan (*vgb*⁺) *Citrobacter freundii* pMK79 rekombinant suşları ile karbon ve azot kaynaklarının kullanıldığı ortamlarda L-DOPA ve Dopamin üretimleri incelenmiştir. Deneyler iki kısımda gerçekleştirilmiştir. Birinci kısmını

erlenlerde yapılan çalışmalar oluşturmaktadır. Erlenlerde yapılan deneylerde L-DOPA ve Dopamin üretimi üzerine karbon kaynağı (glikoz) ve derişimi, organik (pepton, yeast ekstrakt, üre) ve inorganik ((NH₄)₂SO₄, NaNO₃) azot kaynakları ve derişimleri ile diğer ortam bileşenleri (NaCl ve CaCl₂)'nin yanı sıra, pH, sıcaklık, çalkalama hızı ve ekim derişimi (oranı)'nin etkileri de incelenmiştir. Böylelikle maksimum L-DOPA ve Dopamin'in sentezlendiği optimum fermantasyon ortamı ve koşulları elde edilmiştir. Çalışmanın ikinci kısmını ise 0.8 L'lik çalışma hacmine sahip 1.0 L'lik biyoreaktörde yapılan deneyler oluşturmaktadır. Biyoreaktörde kesikli sistem kullanılarak, bazı parametrelerin (karıştırma hızı ve hava besleme hızı) mikroorganizma gelişimi, substrat tüketimi, oksijen transfer hızı, L-DOPA ve Dopamin üretimi üzerine etkileri incelenmiştir.

6.1.1. Karbon Kaynağının Etkisi

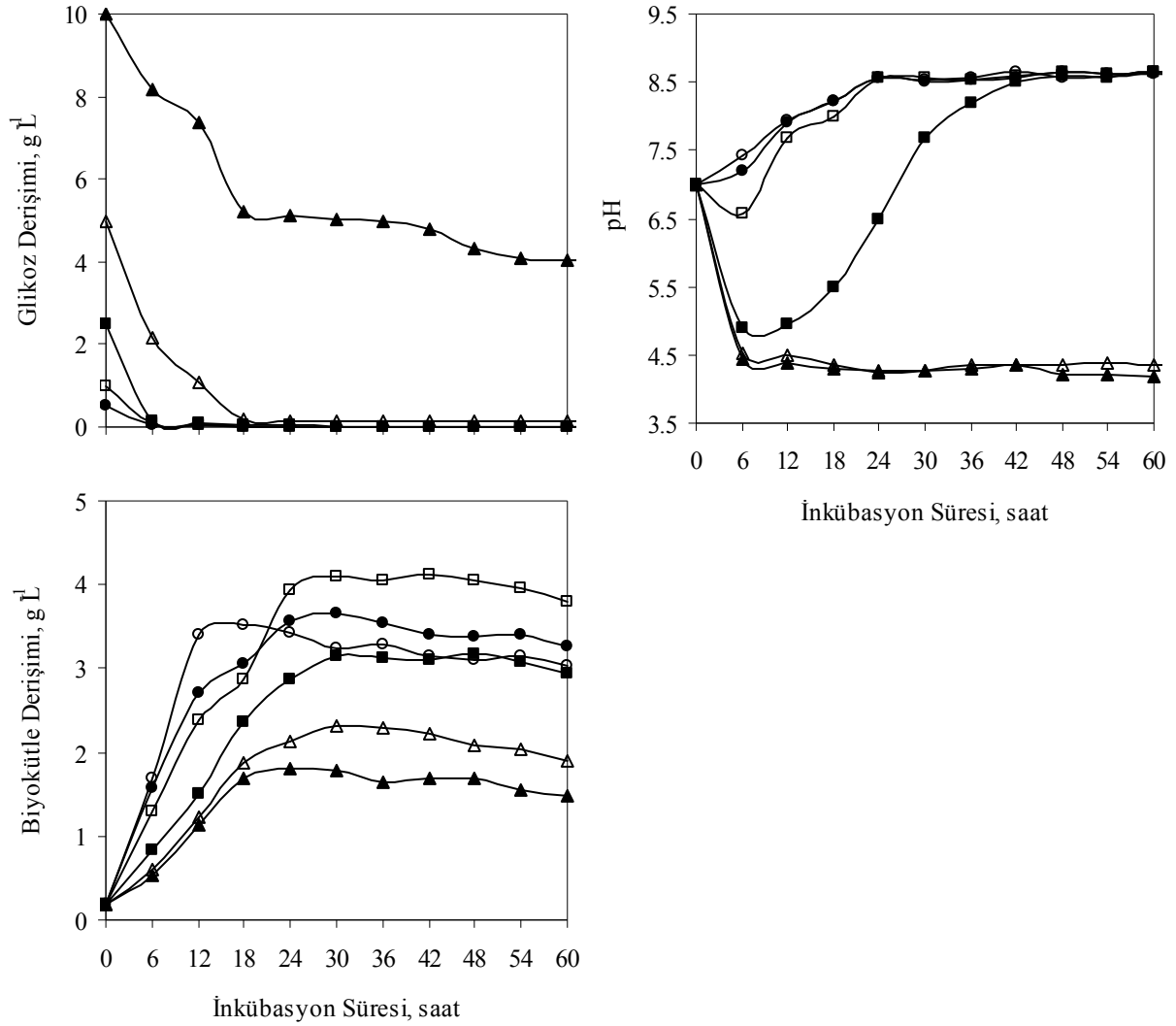
Mikroorganizmalar kullanılarak çeşitli metabolitlerin üretimini etkileyen en önemli parametrelerden biri ortam bileşimidir. Ortam bileşenleri içerisinde karbon kaynağı ortam maliyetinin yaklaşık % 60-80'ini oluşturmaktadır [149]. Karbon kaynağının etkisini incelemek amacıyla farklı derişimlerde glikoz kullanılmıştır. *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) yabanıl suşu ile beş farklı başlangıç glikoz derişiminde (0.5, 1, 2.5, 5 ve 10 g L⁻¹) 250 ml'lik erlenlerde yapılan deneylerde elde edilen sonuçlar Şekil 6.3. ve Şekil 6.4.'de verilmiştir. Şekil 6.3.'de, başlangıç glikoz derişiminin, hücre dışı ve hücre içi L-DOPA ve Dopamin üretimi üzerine etkisi görülmektedir. Şekil 6.4.'de, başlangıç glikoz derişiminin *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) yabanıl suşu ile yapılan deneylerde biyokütle oluşumu, pH ve substrat tüketimi üzerine etkisi görülmektedir.

Başlangıç glikoz derişiminin, *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) yabanıl suşu ile L-DOPA ve Dopamin üretimi üzerine etkisi incelendiğinde, en yüksek hücre dışı L-DOPA ve Dopamin üretimi 1.0 g L⁻¹ glikoz derişiminde sırasıyla 296 mg L⁻¹ ve 131 mg L⁻¹ değerlerine ulaştığı görülmektedir. En yüksek hücre içi L-DOPA ve Dopamin üretimi ise yine 1.0 g L⁻¹ glikoz derişiminde sırasıyla 57 mg L⁻¹ ve 18 mg L⁻¹ değerlerine ulaştığı görülmektedir. Bütün glikoz derişimlerinde maksimum üretim düzeyine logaritmik evre sonlarına doğru ulaşıp inkübasyon süresi sonuna kadar bu üretim düzeylerinde yaklaşık olarak sabit kaldığı görülmektedir. 2.5, 5 ve 10 g L⁻¹ değerlerindeki glikoz derişiminin L-DOPA ve Dopamin üretimi üzerine represyon etkisi yaparak L-DOPA ve Dopamin üretim düzeyini düşürdüğü görülmektedir.



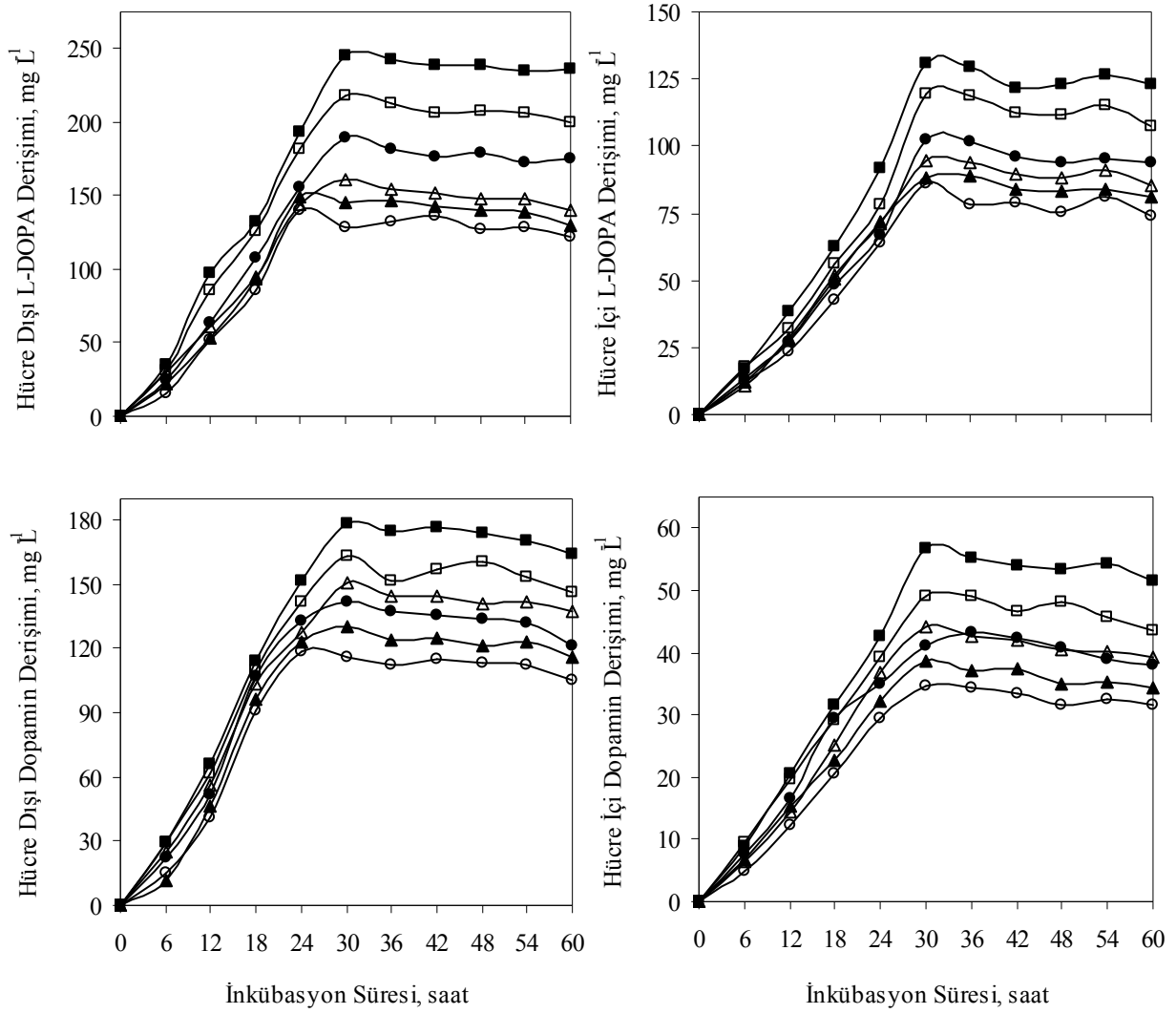
Şekil 6.3. Farklı glikoz derişimlerinde *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde hücre dışı ve hücre içi L-DOPA ve Dopamin derişiminin inkübasyon süresi ile değışimi (Şartlar: ○: 0, ●: 0.5, □: 1.0, ■: 2.5, △: 5.0, ▲: 10 g L⁻¹ glikoz, 10 g L⁻¹ pepton, 5 g L⁻¹ Y.E., 10 g L⁻¹ NaCl, pH_b: 7.0; Ekim oranı: % 1 v v⁻¹; Çalkalama hızı: 150 rpm; Ortam sıcaklığı: 37 °C).

Literatürde bulunan diğer çalışmalarda da, fermentasyon ortamında bazı karbon kaynaklarının yüksek derişimlerde represyon etkisi yaptığı gözlenmiş ve bu durum mikroorganizmaların salgıladıkları metabolitlerin azalması ile ifade edilmiştir [131, 150-151]. Mikroorganizma büyüme evreleri ve L-DOPA ve Dopamin üretimi arasında yakın bir eğilim olduğu belirlenmiştir. Şekil 6.3. ve 6.4. birlikte incelendiğinde mikroorganizma ve üretilen L-DOPA ve Dopamin derişimlerinin zamanla paralellik gösterdiği sonucu çıkarılabilir. *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) yabani suşu tüm glikoz derişimlerinde yaklaşık 30. saatte durağan evreye ulaşmaktadır.



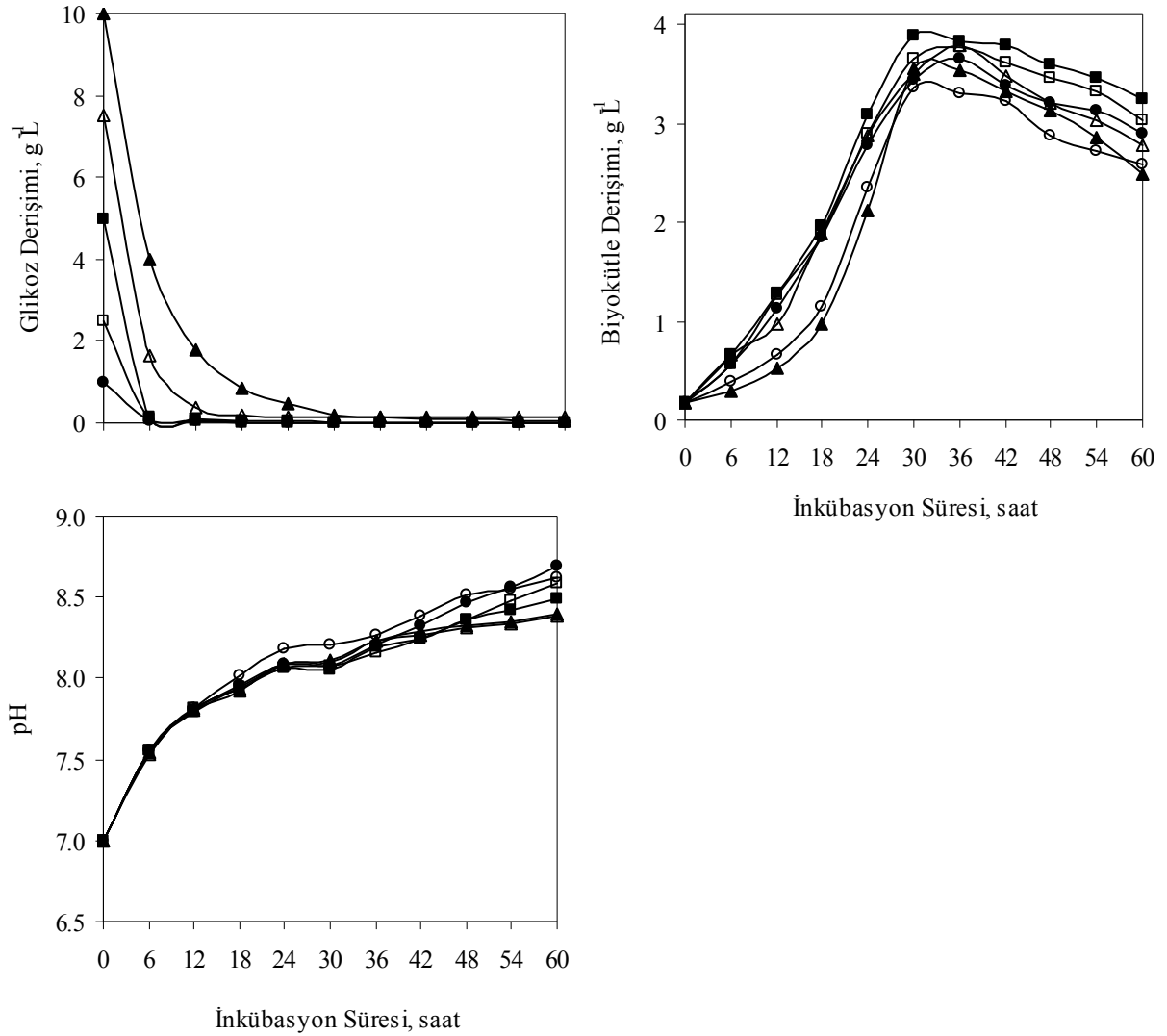
Şekil 6.4. Farklı glikoz derişimlerinde *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde biyokütle derişiminin, pH ve glikoz derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi (Şartlar: ○: 0, ●: 0.5, □: 1.0, ■: 2.5, △: 5.0, ▲: 10 g L⁻¹ glikoz, 10 g L⁻¹ pepton, 5 g L⁻¹ Y.E., 10 g L⁻¹ NaCl, pH_b: 7.0; Ekim oranı: % 1 v v⁻¹; Çalkalama hızı: 150 rpm; Ortam sıcaklığı: 37 °C).

Vgb genini taşıyan (*vgb*⁺) *Citrobacter freundii* pMK79 rekombinant suşu ile beş farklı başlangıç glikoz derişiminde (1, 2.5, 5, 7.5 ve 10 g L⁻¹) 250 ml'lik erlenlerde yapılan deneylerde elde edilen sonuçlar Şekil 6.5. ve Şekil 6.6.'de verilmiştir. Şekil 6.5.'de, başlangıç glikoz derişiminin, *Citrobacter freundii* pMK79 ile elde edilen hücre dışı ve hücre içi L-DOPA ve Dopamin üretimi üzerine etkisi görülmektedir. Şekil 6.6.'de ise başlangıç glikoz derişiminin *Citrobacter freundii* pMK79 ile yapılan deneylerde biyokütle oluşumu, pH ve substrat tüketimi üzerine etkisi görülmektedir.



Şekil 6.5. Farklı glikoz derişimlerinde *Citrobacter freundii* pMK79 ile yapılan deneylerde hücre dışı ve hücre içi L-DOPA ve Dopamin derişiminin inkübasyon süresi ile değışimi (Şartlar: ○: 0, ●: 1.0, □: 2.5, ■: 5.0, △: 7.5, ▲: 10 g L⁻¹ glikoz, 10 g L⁻¹ pepton, 5 g L⁻¹ Y.E., 10 g L⁻¹ NaCl, pH_b: 7.0; Ekim oranı: % 1 v v⁻¹; Çalkalama hızı: 150 rpm; Ortam sıcaklığı: 37 °C).

Başlangıç glikoz derişiminin, *Vgb* genini taşıyan (*vgb*⁺) *Citrobacter freundii* pMK79 rekombinant suşu ile L-DOPA ve Dopamin üretimi üzerine etkisi incelendiğinde, en yüksek hücre dışı L-DOPA ve Dopamin üretimi 5.0 g L⁻¹ glikoz derişiminde sırasıyla 245 mg L⁻¹ ve 180 mg L⁻¹ değerlerine ulaştığı görülmektedir. En yüksek hücre içi L-DOPA ve Dopamin üretimi ise yine 5.0 g L⁻¹ glikoz derişiminde sırasıyla 131 mg L⁻¹ ve 57 mg L⁻¹ değerlerine ulaştığı görülmektedir. Bütün glikoz derişimlerinde maksimum üretim düzeyine logaritmik evre sonlarına doğru ulaşıp inkübasyon süresi sonuna kadar bu üretim düzeylerinde yaklaşık olarak sabit kaldığı görülmektedir. Ortamda bulunan bütün glikoz derişimlerinde L-DOPA ve Dopamin üretimini arttırdığı fakat maksimum üretim düzeyine 5.0 g L⁻¹ glikoz derişiminde ulaştığı görülmektedir.



Şekil 6.6. Farklı glikoz derişimlerinde *Citrobacter freundii* pMK79 ile yapılan deneylerde biyokütle derişiminin, pH ve glikoz derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi (Şartlar: ○: 0, ●: 1.0, □: 2.5, ■: 5.0, △: 7.5, ▲: 10 g L⁻¹ glikoz, 10 g L⁻¹ pepton, 5 g L⁻¹ Y.E., 10 g L⁻¹ NaCl, pH_b: 7.0; Ekim oranı: % 1 v v⁻¹; Çalkalama hızı: 150 rpm; Ortam sıcaklığı: 37 °C).

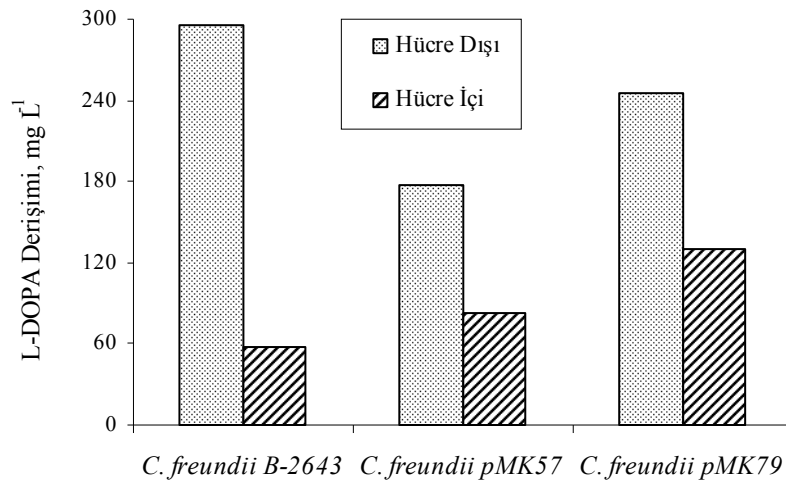
Citrobacter freundii pMK79 rekombinant suşunun, yabanil suşuna göre ortamdaki glikozu kullanma ve tüketme hızının daha yüksek olduğu Şekil 6.6.'dan görölmektedir. MK79 rekombinant suşunun yabanil suşa göre çok daha yavaş ürediği ortaya konulmuştur. Bunun başlıca nedeni olarak, genetiği değiştirilmiş mikroorganizmaların yabanil suşlara göre üreme hızının daha yavaş olduğu literatürde belirtilmiştir [152]. Elde edilen bu sonuçlar literatür ile uyum içersindedir.

Vgb genini taşımayan (*vgb*⁻) ve *vgb* genini taşıyan (*vgb*⁺) rekombinant suşlar ile yabanil suşun maksimum L-DOPA ve Dopamin üretim düzeyleri sırasıyla Şekil 6.7. ve Şekil 6.8.'de verilmiştir. Hücre dışı L-DOPA üretimi en yüksek düzeyde (296 mg L⁻¹) 1 g

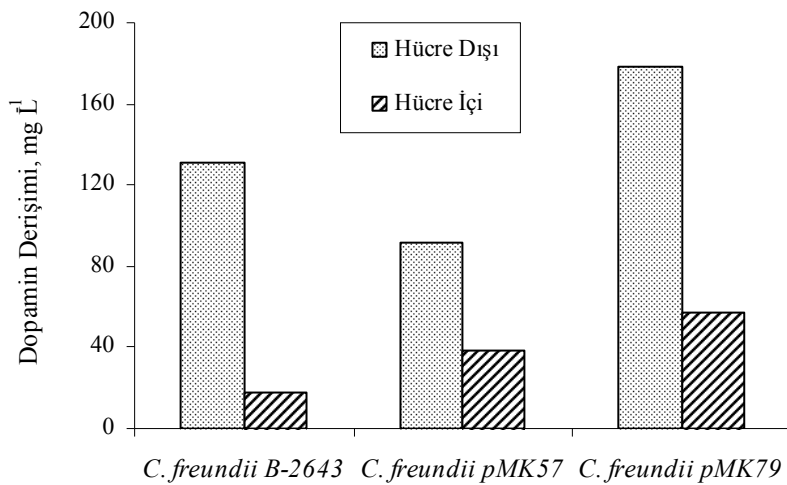
L^{-1} glikozun bulunduğu LB ortamında *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) yabanil suşu ile elde edilmiştir. Hücre içi L-DOPA üretimi ise en yüksek düzeyde 131 mg L^{-1} ile 5 g L^{-1} glikozun bulunduğu LB ortamında *Citrobacter freundii* pMK79 rekombinant suşu kullanılarak elde edilmiştir. Yabanil ve rekombinant suşlar arasında Dopamin üretim düzeyleri kıyaslandığında hücre dışı ve hücre içi Dopamin üretiminin en yüksek 5 g L^{-1} glikozun bulunduğu LB ortamında *Citrobacter freundii* pMK79 rekombinant suşunun kullanıldığı deneylerde sırasıyla 178 ve 57 mg L^{-1} olarak elde edilmiştir.

6.1.2. Organik Azot Kaynaklarının Etkisi

Mikrobiyal aktiviteler neticesinde elde edilen değerli metabolitlerin maksimum düzeyde elde edilebilmesi üretimin gerçekleştirildiği fermantasyon ortamındaki



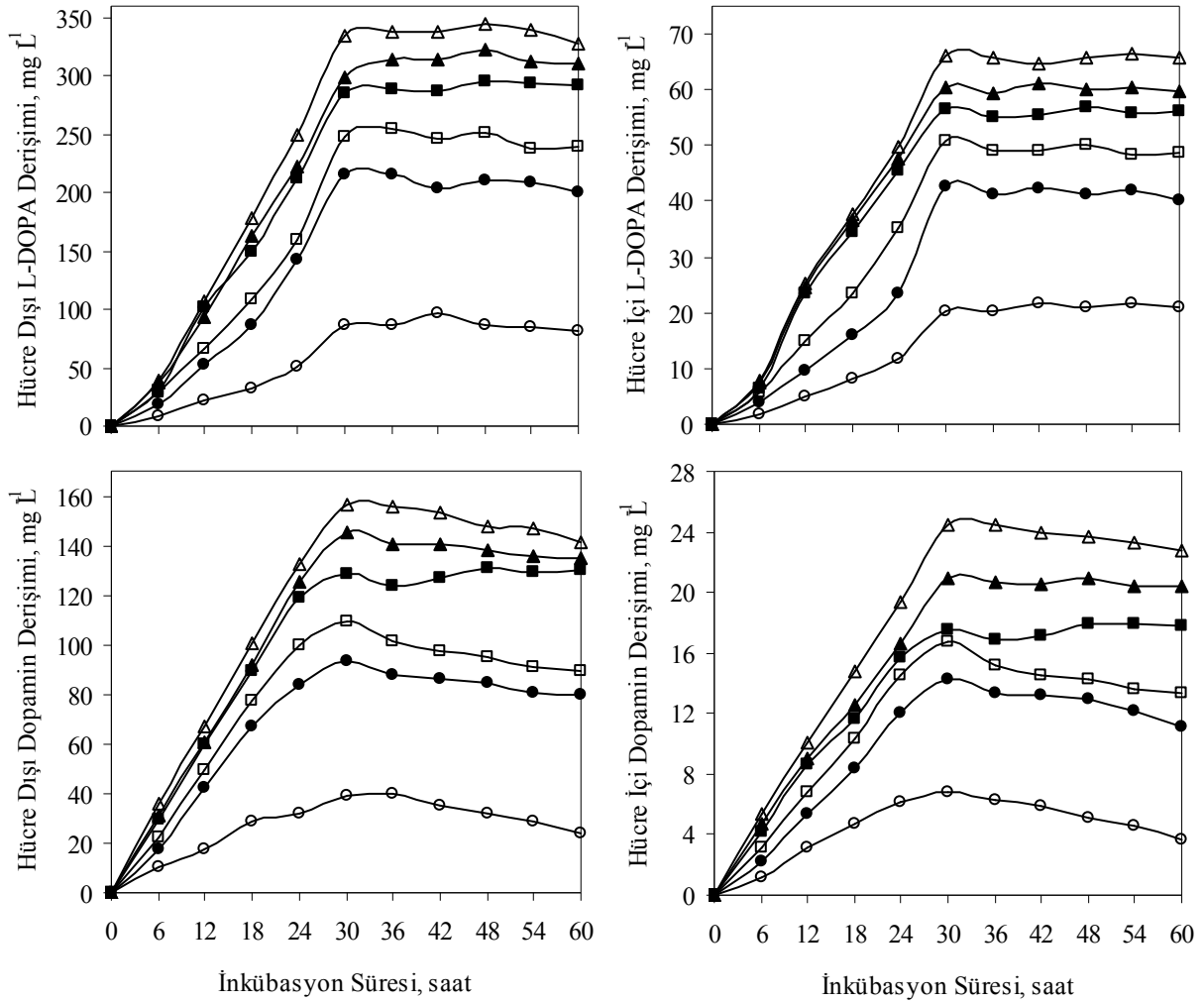
Şekil 6.7. *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ve rekombinant suşları pMK57 ile pMK79'nin glikoz varlığındaki LB ortamındaki maksimum hücre dışı ve hücre içi L-DOPA üretim düzeyleri.



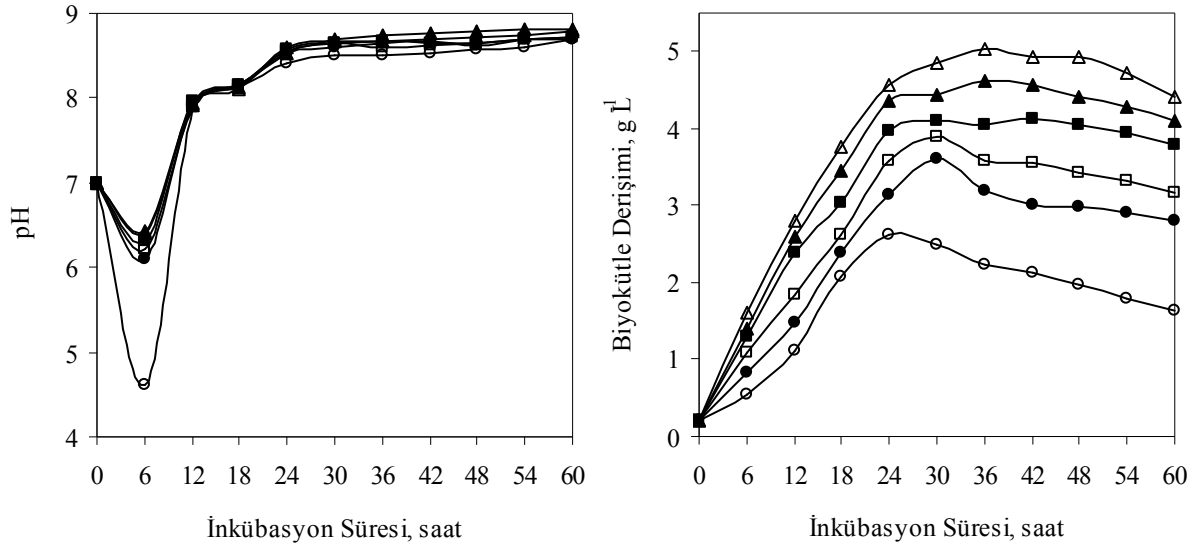
Şekil 6.8. *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ve rekombinant suşları pMK57 ile pMK79'nin glikoz varlığındaki LB ortamındaki maksimum hücre dışı ve hücre içi Dopamin üretim düzeyleri.

karbon/azot (C/N) oranı ile yakından ilişkilidir [153]. Bu kapsamda yapılan çalışmalarda C/N oranının optimum değerde olması sonucu, metabolit üretiminin maksimum değerlere ulaşacağı belirtilmektedir [154]. Çalışmada, organik azot kaynaklarının hücre içi ve hücre dışı L-DOPA ve dopamin sentezine, biyokütle miktarına ve ortam pH'sına etkisini araştırmak amacı ile farklı derişimlerde pepton, yeast ekstrakt ve üre ile deneyler gerçekleştirilerek; sonuçlar aşağıda sunulmuştur.

1 g L⁻¹ glikoz, 5 g L⁻¹ yeast ekstrakt ve 10 g L⁻¹ NaCl içeren fermantasyon ortamına beş farklı derişimde (5, 7.5, 10, 12.5 ve 15 g L⁻¹) pepton ilave edilerek 250 ml'lik erlenlerde *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) yabani suşu ile yapılan deneylerde elde edilen sonuçlar Şekil 6.9. ve Şekil 6.10.'da verilmiştir. Şekil 6.9.'da, başlangıç pepton derişiminin, hücre dışı ve hücre içi L-DOPA ve Dopamin derişiminin zamanla değişimi Şekil 6.10.'da ise pH ve biyokütle derişiminin zamanla değişimi görülmektedir.



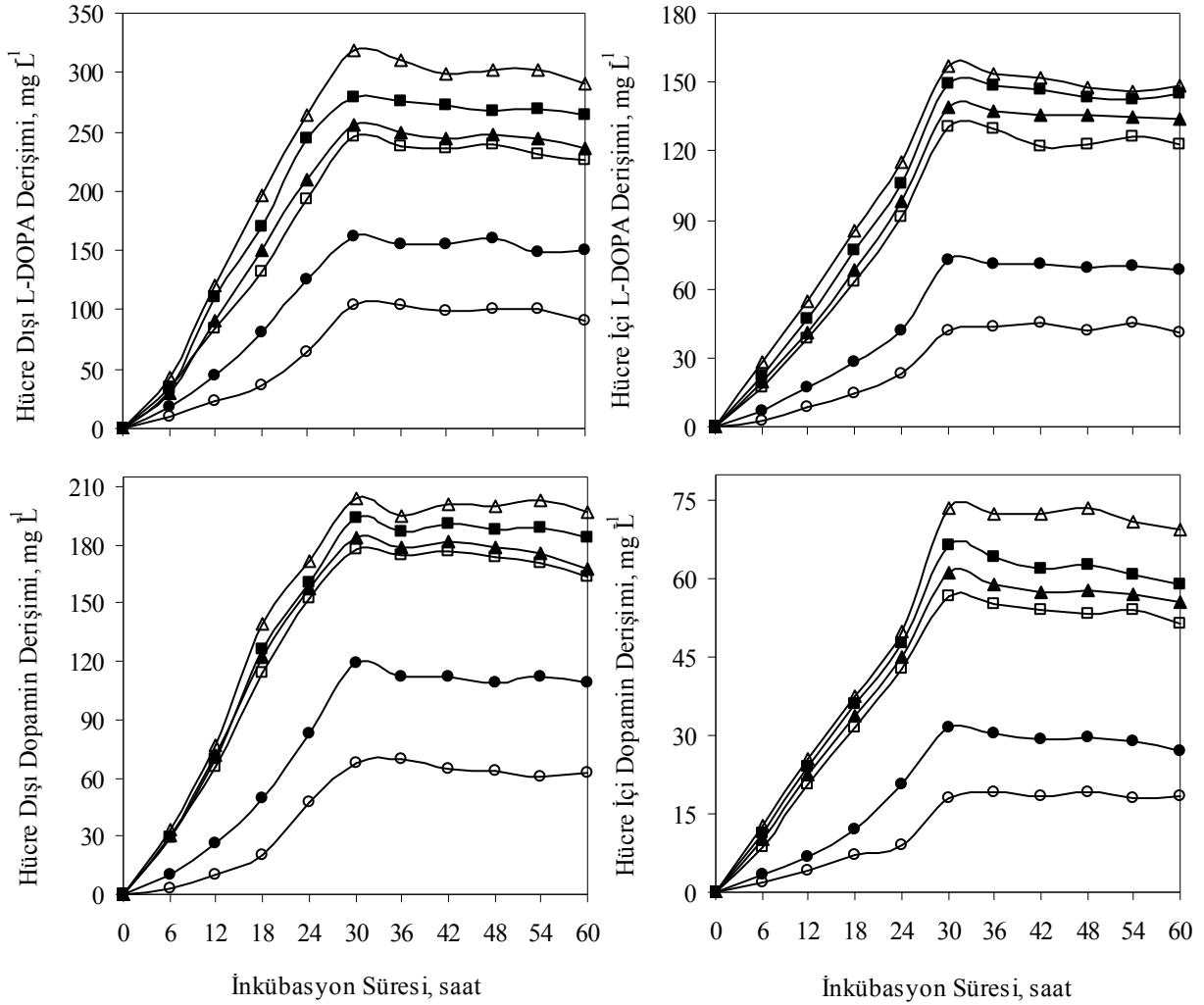
Şekil 6.9. Farklı pepton derişimlerinde *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde hücre dışı ve hücre içi L-DOPA ve Dopamin derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi (Şartlar: ○: 0, ●: 5.0, □: 7.5, ■: 10.0, △: 12.5, ▲: 15.0 g L⁻¹ pepton, 1 g L⁻¹ glikoz, 5 g L⁻¹ Y.E., 10 g L⁻¹ NaCl, pH_b: 7.0; Ekim oranı: % 1 v v⁻¹; Çalkalama hızı: 150 rpm; Ortam sıcaklığı: 37 °C).



Şekil 6.10. Farklı pepton derişimlerinde *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ile pH ve biyokütle derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi (Şartlar: ○: 0, ●: 5.0, □: 7.5, ■: 10.0, △: 12.5, ▲: 15.0 g L⁻¹ pepton, 1 g L⁻¹ glikoz, 5 g L⁻¹ Y.E., 10 g L⁻¹ NaCl, pH_b: 7.0; Ekim oranı: % 1 v v⁻¹; Çalkalama hızı: 150 rpm; Ortam sıcaklığı: 37 °C).

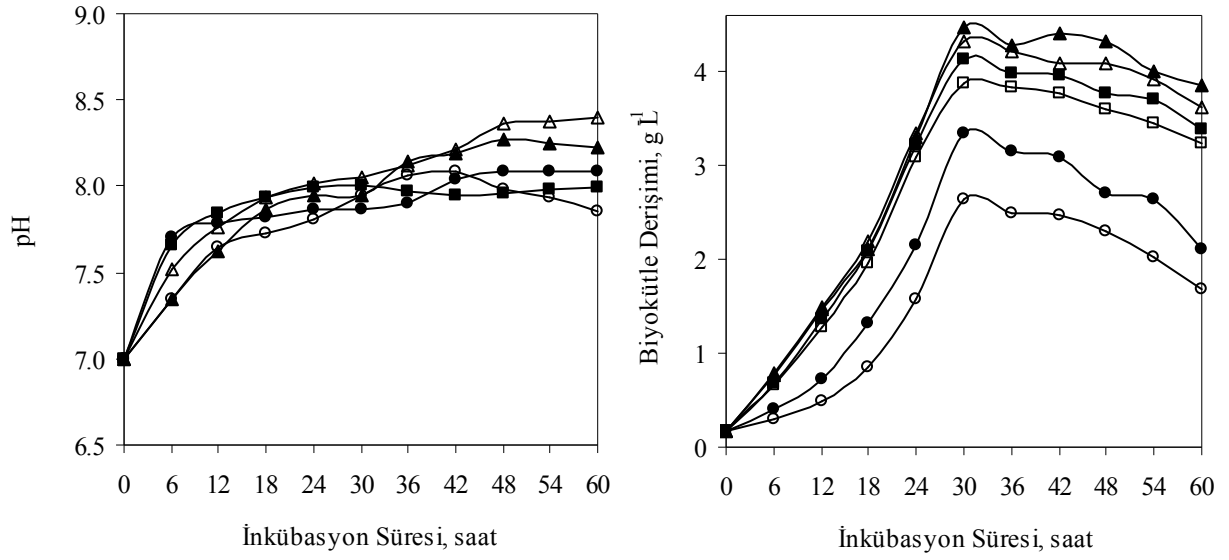
Başlangıç pepton derişiminin, *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) yabanıl suşu ile L-DOPA ve Dopamin üretimi üzerine etkisi incelendiğinde, en yüksek hücre dışı L-DOPA ve Dopamin üretimi 12.5 g L⁻¹ pepton derişiminde sırasıyla 344 mg L⁻¹ ve 157 mg L⁻¹ değerlerine ulaştığı görülmektedir. En yüksek hücre içi L-DOPA ve Dopamin üretimi ise yine 12.5 g L⁻¹ pepton derişiminde sırasıyla 66 mg L⁻¹ ve 25 mg L⁻¹ değerlerine ulaştığı görülmektedir. Bütün pepton derişimlerinde maksimum L-DOPA ve Dopamin üretim düzeyine logaritmik evre sonlarına doğru ulaşıp inkübasyon süresi sonuna doğru bu üretim düzeylerinde azda olsa bir azalmanın olduğu görülmektedir.

Citrobacter freundii pMK79 rekombinant suşu ile 5 g L⁻¹ glikoz, 5 g L⁻¹ yeast ekstrakt ve 10 g L⁻¹ NaCl içeren fermentasyon ortamına beş farklı başlangıç pepton derişiminde (5, 10, 12.5, 15 ve 17.5 g L⁻¹) 250 ml'lik erlenlerde yapılan deneylerde elde edilen sonuçlar Şekil 6.11. ve Şekil 6.12.'de verilmiştir. Şekil 6.11.'de, başlangıç pepton derişiminin, *Citrobacter freundii* pMK79 ile elde edilen hücre dışı ve hücre içi L-DOPA ve Dopamin derişiminin zamanla değişimi görülmektedir. Şekil 6.12.'de ise başlangıç pepton derişiminin biyokütle derişimi ve ortam pH'nın değişimi üzerine etkisi görülmektedir.



Şekil 6.11. Farklı pepton derişimlerinde *Citrobacter freundii* pMK79 ile yapılan deneylerde hücre dışı ve hücre içi L-DOPA ve Dopamin derişiminin inkübasyon süresi ile değışimi (Şartlar: ○: 0, ●: 5.0, □: 10.0, ■: 12.5, △: 15.0, ▲: 17.5 g L⁻¹ pepton, 5 g L⁻¹ glikoz, 5 g L⁻¹ Y.E., 10 g L⁻¹ NaCl, pH_b: 7.0; Ekim oranı: % 1 v v⁻¹; Çalkalama hızı: 150 rpm; Ortam sıcaklığı: 37 °C).

Pepton derişiminin, *Vgb* genini taşıyan (*vgb*⁺) *Citrobacter freundii* pMK79 rekombinant suşu ile L-DOPA ve Dopamin üretimi üzerine etkisi incelendiğinde, en yüksek hücre dışı L-DOPA ve Dopamin üretimi 15.0 g L⁻¹ pepton derişiminde sırasıyla 318 mg L⁻¹ ve 204 mg L⁻¹ değerlerine ulaştığı görülmektedir. En yüksek hücre içi L-DOPA ve Dopamin üretimi ise yine 15.0 g L⁻¹ pepton derişiminde sırasıyla 157 mg L⁻¹ ve 74 mg L⁻¹ değerlerine ulaştığı görülmektedir. Bütün pepton derişimlerinde maksimum üretim düzeyine logaritmik evre sonlarına doğru ulaşıp inkübasyon süresi sonuna kadar bu üretim düzeylerinde yaklaşık olarak sabit kaldığı görülmektedir. Ortamda bulunan bütün pepton derişimlerinde L-DOPA ve Dopamin üretimini arttırdığı fakat maksimum üretim düzeyine 15.0 g L⁻¹ pepton derişiminde ulaştığı görülmektedir.



Şekil 6.12. Farklı pepton derişimlerinde *Citrobacter freundii* pMK79 ile yapılan deneylerde pH ve biyokütle derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi (Şartlar: ○: 0, ●: 5.0, □: 10.0, ■: 12.5, △: 15.0, ▲: 17.5 g L⁻¹ pepton, 5 g L⁻¹ glikoz, 5 g L⁻¹ Y.E., 10 g L⁻¹ NaCl, pH_b: 7.0; Ekim oranı: % 1 v/v; Karıştırma hızı: 150 rpm; Ortam sıcaklığı: 37 °C).

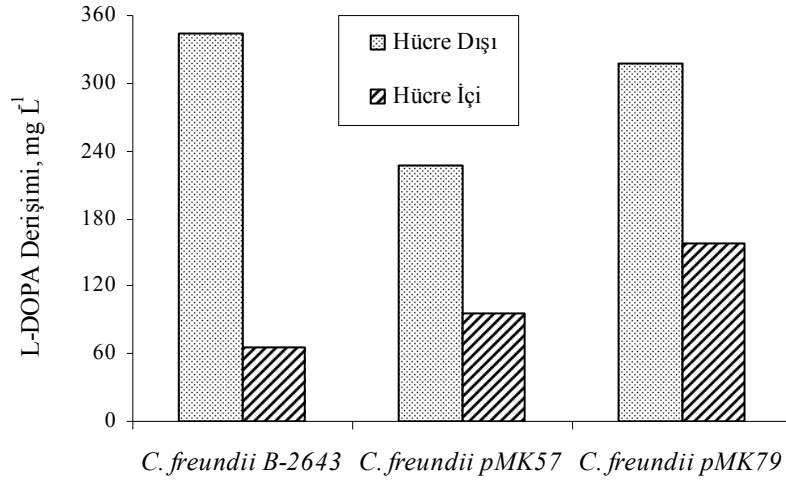
Kullanılan organik azot kaynaklarından pepton ve yeast ekstrakt'ın mikrobiyal ürün oluşumunu pozitif yönde etkilediği, buna karşın bir diğer organik azot kaynağı olarak fermentasyon ortamına ilave edilen üre'nin ise düşük derişimlerde mikrobiyal ürün verimini etkilemediği ancak yüksek derişimlerde mikrobiyal ürün üretimini negatif yönde etkileyerek azalttığı gözlemlenmiştir. Bu sebeple üre'nin etkisinin incelendiği deneylerden elde edilen sonuçlara yer verilmemiştir.

Literatürde, fermentasyon ortamında yeterli derişimde azot kaynağının olmaması halinde mikrobiyal ürün üretiminin negatif yönde etkileneceği, bununla birlikte yüksek derişimlerde azot kaynağının fermentasyon ortamında bulunması halinde ise mikrobiyal ürün üretim veriminin inhibisyona uğrayacağı belirtilmektedir [155].

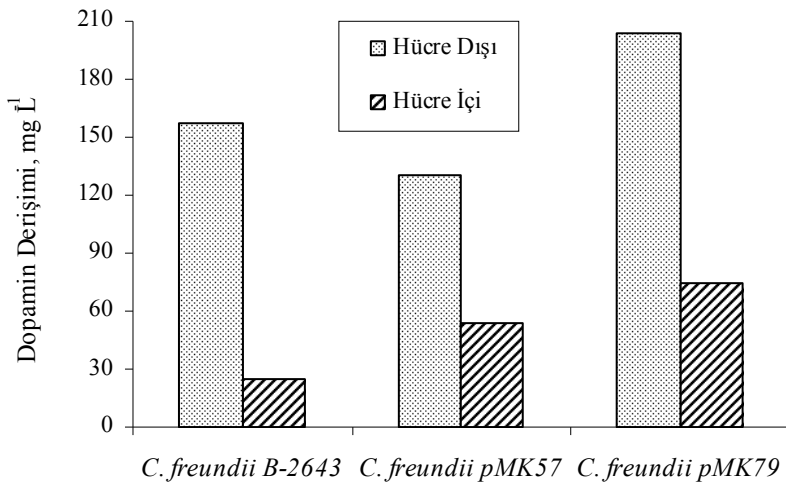
Vgb genini taşımayan (*vgb*⁻) *Citrobacter freundii* pMK57 ve *vgb* genini taşıyan (*vgb*⁺) *Citrobacter freundii* pMK79 rekombinant suşları ile *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) yabanıl suşun maksimum L-DOPA ve Dopamin üretim düzeyleri sırasıyla Şekil 6.13. ve Şekil 6.14.'de verilmiştir. Hücre dışı L-DOPA üretimi en yüksek düzeyde (344 mg L⁻¹) 12.5 g L⁻¹ peptonun bulunduğu fermentasyon ortamında *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) yabanıl suşu ile elde edilmiştir. Hücre içi L-DOPA üretimi ise en yüksek düzeyde 157 mg L⁻¹ ile 15.0 g L⁻¹ peptonun bulunduğu fermentasyon ortamında *Citrobacter freundii* pMK79 rekombinant suşu kullanılarak elde edilmiştir. Yabanıl ve rekombinant suşlar arasında Dopamin üretim düzeyleri kıyaslandığında hücre dışı ve hücre içi Dopamin

üretiminin en yüksek 15.0 g L^{-1} pepton bulunduran fermantasyon ortamında *Citrobacter freundii* pMK79 rekombinant suşunun kullanıldığı deneylerde sırasıyla 204 ve 74 mg L^{-1} olarak elde edilmiştir.

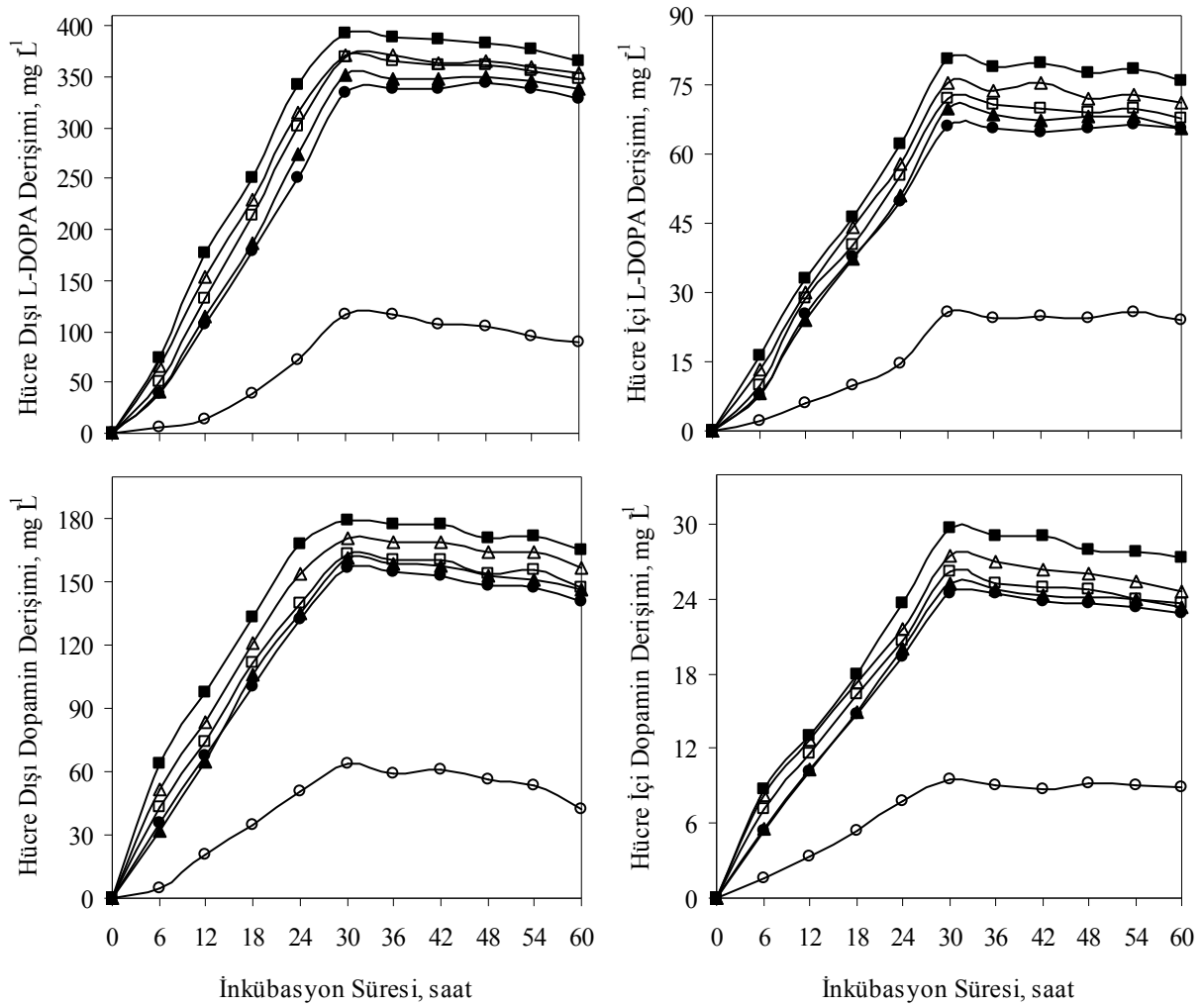
Yeast ekstrakt derişiminin etkisini gözlemlemek amacıyla 1 g L^{-1} glikoz, 12.5 g L^{-1} pepton ve 10 g L^{-1} NaCl içeren fermantasyon ortamına beş farklı derişimde (5, 7.5, 10, 12.5 ve 15 g L^{-1}) yeast ekstrakt ilave edilerek 250 ml'lik erlenlerde *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) yabanil suşu ile yapılan deneylerde elde edilen sonuçlar Şekil 6.15. ve Şekil 6.16.'da verilmiştir. Şekil 6.15.'de, başlangıç yeast ekstrakt derişimi ile hücre dışı ve hücre içi L-DOPA ve Dopamin derişiminin zamanla değışimi Şekil 6.16.'da ise biyokütle derişimi ve ortam pH'sının zamanla değışimi görölmektedir.



Şekil 6.13. *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ve rekombinant suşları pMK57 ile pMK79'nin glikoz varlığındaki pepton derişiminin etkisinin incelendiği fermantasyon ortamındaki maksimum hücre dışı ve hücre içi L-DOPA üretim düzeyleri.

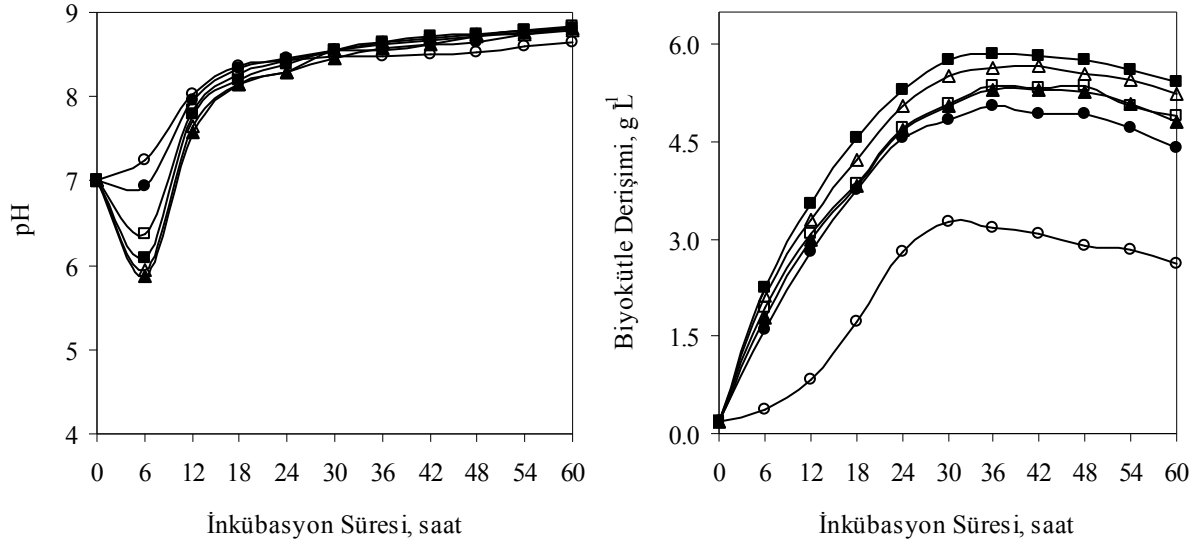


Şekil 6.14. *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ve rekombinant suşları pMK57 ile pMK79'nin glikoz varlığındaki pepton derişiminin etkisinin incelendiği fermantasyon ortamındaki maksimum hücre dışı ve hücre içi Dopamin üretim düzeyleri.



Şekil 6.15. Farklı yeast ekstrakt derişimlerinde *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde hücre dışı ve hücre içi L-DOPA ve Dopamin derişiminin inkübasyon süresi ile değışimi (Şartlar: ○: 0, ●: 5.0, □: 7.5, ■: 10.0, △: 12.5, ▲: 15.0 g L⁻¹ Y.E., 1 g L⁻¹ glikoz, 12.5 g L⁻¹ pepton, 10 g L⁻¹ NaCl, pH₀: 7.0; Ekim oranı: % 1 v v⁻¹; Çalkalama hızı: 150 rpm; Ortam sıcaklığı: 37 °C).

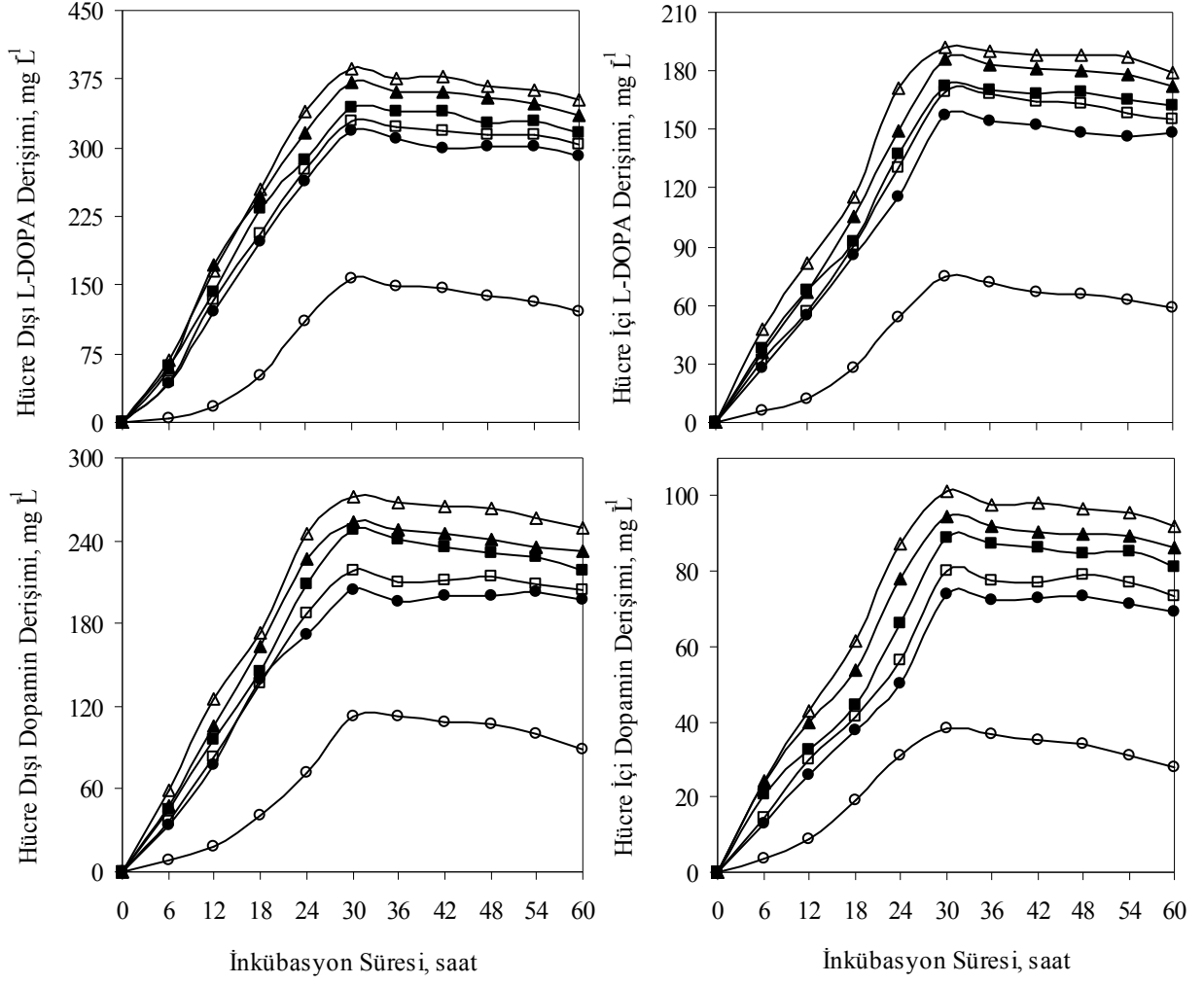
Fermantasyon ortamındaki yeast ekstrakt derişiminin, *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) yabancı suşu ile L-DOPA ve Dopamin üretimi üzerine etkisi incelendiğinde, en yüksek hücre dışı L-DOPA ve Dopamin üretimi 10.0 g L⁻¹ yeast ekstrakt derişiminde sırasıyla 392 mg L⁻¹ ve 179 mg L⁻¹ değerlerine ulaştığı görülmektedir. En yüksek hücre içi L-DOPA ve Dopamin üretimi ise yine 10.0 g L⁻¹ yeast ekstrakt derişiminde sırasıyla 81 mg L⁻¹ ve 30 mg L⁻¹ değerlerine ulaştığı görülmektedir. Bütün yeast ekstrakt derişimlerinde maksimum L-DOPA ve Dopamin üretim düzeyine logaritmik evre sonlarına doğru ulaşıp inkübasyon süresi sonuna doğru bu üretim düzeylerinde azda olsa bir azalmanın olduğu görülmektedir.



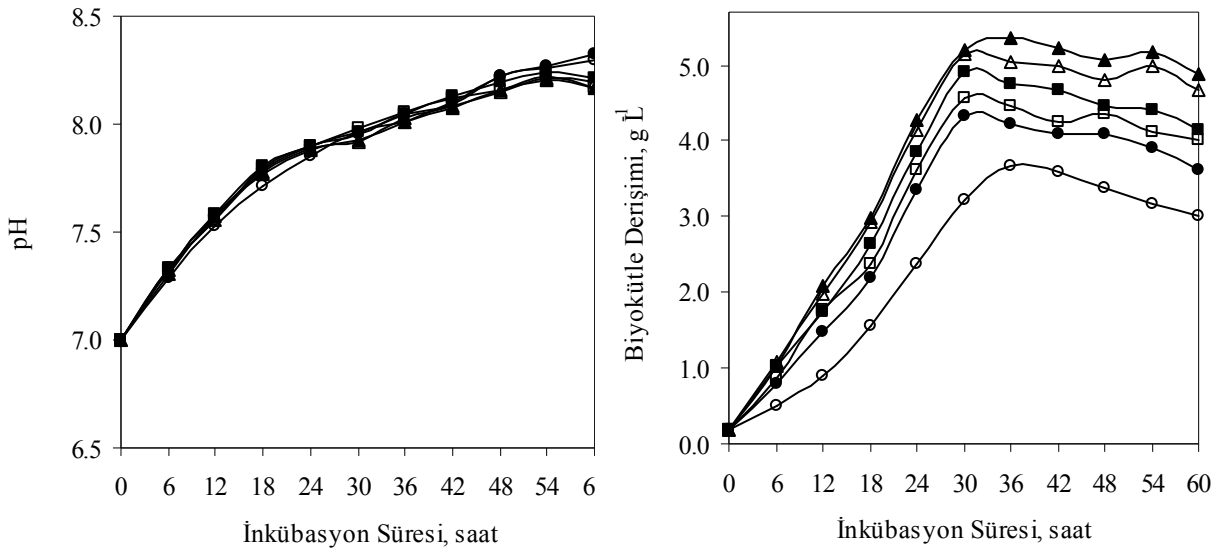
Şekil 6.16. Farklı yeast ekstrakt derişimlerinde *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde pH ve biyokütle derişiminin inkübasyon süresi ile değışimi (Şartlar: ○: 0, ●: 5.0, □: 7.5, ■: 10.0, △: 12.5, ▲: 15.0 g L⁻¹ Y.E., 1 g L⁻¹ glikoz, 12.5 g L⁻¹ pepton., 10 g L⁻¹ NaCl, pH_b: 7.0; Ekim oranı: % 1 v v⁻¹; Çalkalama hızı: 150 rpm; Ortam sıcaklığı: 37 °C).

Citrobacter freundii pMK79 rekombinant suşu ile 5 g L⁻¹ glikoz, 12.5 g L⁻¹ pepton ve 10 g L⁻¹ NaCl içeren fermantasyon ortamına beş farklı yeast ekstrakt derişiminde (5, 7.5, 10, 12.5 ve 15 g L⁻¹) 250 ml'lik erlenlerde yapılan deneylerde elde edilen sonuçlar Şekil 6.17. ve Şekil 6.18.'de verilmiştir. Şekil 6.17.'de, başlangıç yeast ekstrak derişiminin, *Citrobacter freundii* pMK79 ile elde edilen hücre dışı ve hücre içi L-DOPA ve Dopamin üretimi üzerine etkisi görülmektedir. Şekil 6.18.'de ise yeast ekstrakt derişiminin *Citrobacter freundii* pMK79 ile yapılan deneylerde biyokütle oluşumu ve ortam pH'nın değışimi üzerine etkisi görülmektedir.

Yeast ekstrakt derişiminin, *Vgb* genini taşıyan (*vgb*⁺) *Citrobacter freundii* pMK79 rekombinant suşu ile L-DOPA ve Dopamin üretimi üzerine etkisi incelendiğinde, en yüksek hücre dışı L-DOPA ve Dopamin üretimi 12.5 g L⁻¹ yeast ekstrakt derişiminde sırasıyla 386 mg L⁻¹ ve 272 mg L⁻¹ değerlerine, en yüksek hücre içi L-DOPA ve Dopamin üretimi ise yine 12.5 g L⁻¹ yeast ekstrakt derişiminde sırasıyla 192 mg L⁻¹ ve 101 mg L⁻¹ değerlerine ulaştığı görülmektedir (Şekil 6.17.). Ortamda etkisi incelenen tüm yeast ekstrakt derişimlerinde maksimum üretim düzeyine logaritmik evre sonlarına doğru ulaşıp inkübasyon süresi sonuna doğru azda olsa bir azalmanın olduğu görülmektedir. Ortamda bulunan bütün yeast ekstrakt derişimlerinde L-DOPA ve Dopamin üretimini arttırdığı fakat maksimum üretim düzeyine 12.5 g L⁻¹ yeast ekstrakt derişiminde ulaştığı görülmektedir.

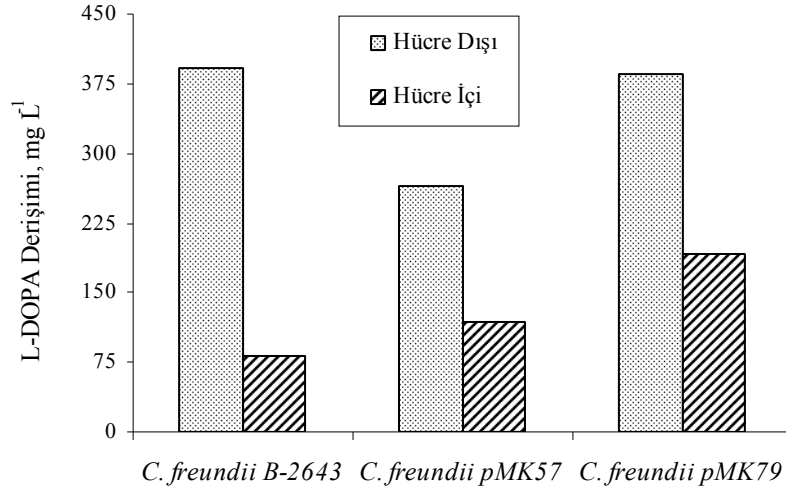


Şekil 6.17. Farklı yeast ekstrakt derişimlerinde *Citrobacter freundii* pMK79 ile yapılan deneylerde hücre dışı ve hücre içi L-DOPA ve Dopamin derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi (Şartlar: ○: 0, ●: 5.0, □: 7.5, ■: 10.0, △: 12.5, ▲: 15.0 g L⁻¹ Y.E., 5 g L⁻¹ glikoz, 15 g L⁻¹ pepton, 10 g L⁻¹ NaCl, pH_b: 7.0; Ekim oranı: % 1 v v⁻¹; Çalkalama hızı: 150 rpm; Ortam sıcaklığı: 37 °C).

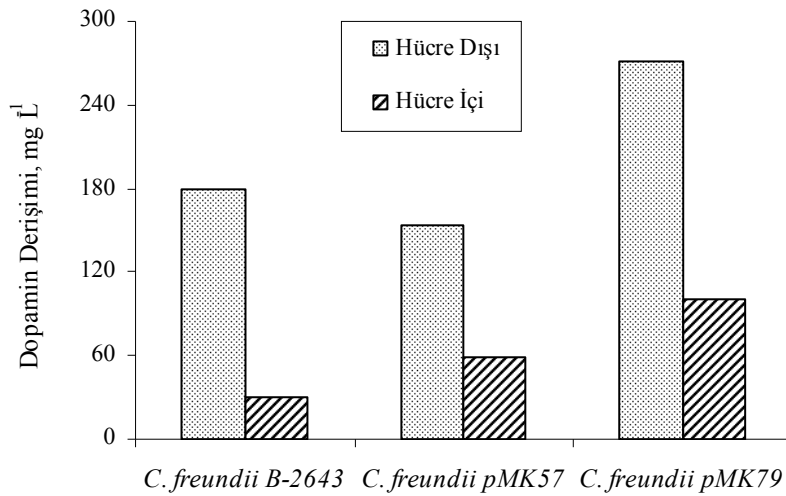


Şekil 6.18. Farklı yeast ekstrakt derişimlerinde *Citrobacter freundii* pMK79 ile yapılan deneylerde pH ve biyokütle derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi (Şartlar: ○: 0, ●: 5.0, □: 7.5, ■: 10.0, △: 12.5, ▲: 15.0 g L⁻¹ Y.E., 5.0 g L⁻¹ glikoz, 15.0 g L⁻¹ pepton, 10.0 g L⁻¹ NaCl, pH_b: 7.0; Ekim oranı: % 1 v v⁻¹; Çalkalama hızı: 150 rpm; Ortam sıcaklığı: 37 °C).

Vgb genini taşımayan (*vgb*⁻) *Citrobacter freundii* pMK57 ve *vgb* genini taşıyan (*vgb*⁺) *Citrobacter freundii* pMK79 rekombinant suşları ile *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) yabancı suşun maksimum L-DOPA ve Dopamin üretim düzeyleri sırasıyla Şekil 6.19. ve Şekil 6.20.'de verilmiştir. Hücre dışı L-DOPA üretimi en yüksek düzeyde (392 mg L⁻¹) 10.0 g L⁻¹ yeast ekstraktın bulunduğu fermentasyon ortamında *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) yabancı suşu ile elde edilmiştir. Hücre içi L-DOPA üretimi ise en yüksek düzeyde 192 mg L⁻¹ ile 12.5 g L⁻¹ yeast ekstraktın bulunduğu fermentasyon ortamında *Citrobacter freundii* pMK79 rekombinant suşu kullanılarak elde edilmiştir. Yabancı ve rekombinant suşlar arasında Dopamin üretim düzeyleri kıyaslandığında hücre dışı ve hücre içi Dopamin üretiminin en yüksek 12.5 g L⁻¹ yeast ekstrakt bulunduran fermentasyon ortamında *Citrobacter freundii* pMK79 rekombinant suşunun kullanıldığı deneylerde sırasıyla 272 ve 101 mg L⁻¹ olarak elde edilmiştir.



Şekil 6.19. *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ve rekombinant suşları pMK57 ile pMK79'nin glikoz varlığındaki yeast ekstrakt etkisinin incelendiği fermentasyon ortamındaki maksimum hücre dışı ve hücre içi L-DOPA derişimleri.



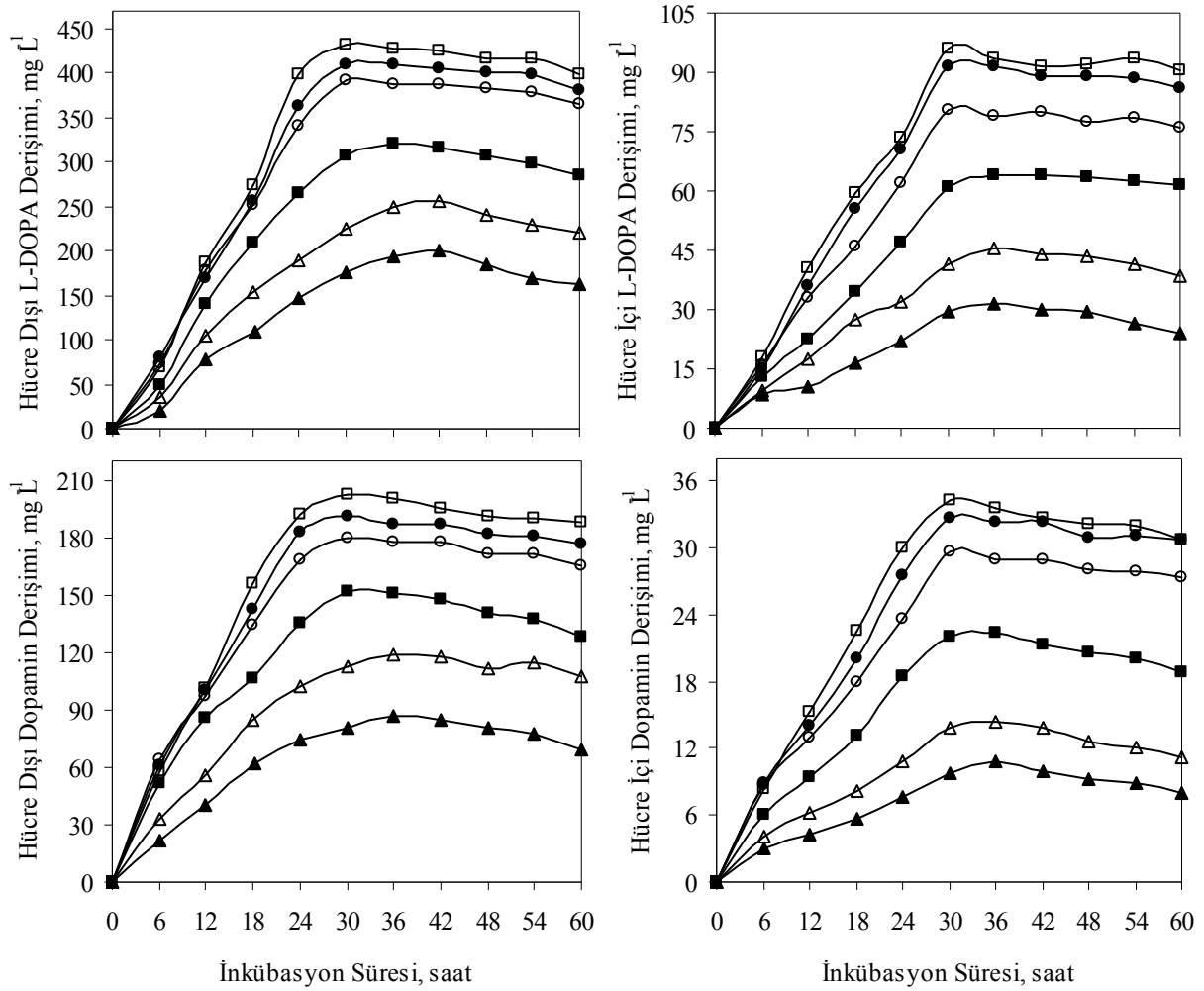
Şekil 6.20. *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ve rekombinant suşları pMK57 ile pMK79'nin glikoz varlığındaki yeast ekstrakt etkisinin incelendiği fermentasyon ortamındaki maksimum hücre dışı ve hücre içi Dopamin derişimleri.

6.1.3. İnorganik Azot Kaynaklarının Etkisi

İnorganik azot kaynaklarının hücre dışı ve hücre içi L-DOPA ve Dopamin üretimi ile biyokütle oluşumu üzerine etkisini araştırmak amacıyla farklı derişimlerde amonyum sülfat ((NH₄)₂SO₄) ve sodyum nitrat (NaNO₃) fermantasyon ortamına ilave edilerek deneyler gerçekleştirilmiştir. Kullanılan inorganik azot kaynaklarından amonyum sülfatın mikrobiyal ürün oluşumunu pozitif yönde etkilediği, diğer inorganik azot kaynağı olarak fermantasyon ortamına ilave edilen sodyum nitrat'ın ise düşük derişimlerde mikrobiyal ürün verimini etkilemediği ancak yüksek derişimlerde mikrobiyal ürün verimini negatif yönde etkileyerek azalttığı gözlemlenmiştir. Bu sebeple inorganik azot kaynakları ile yapılan deneylerden sadece amonyum sülfat ile yapılan deney sonuçlarına yer verilmiştir.

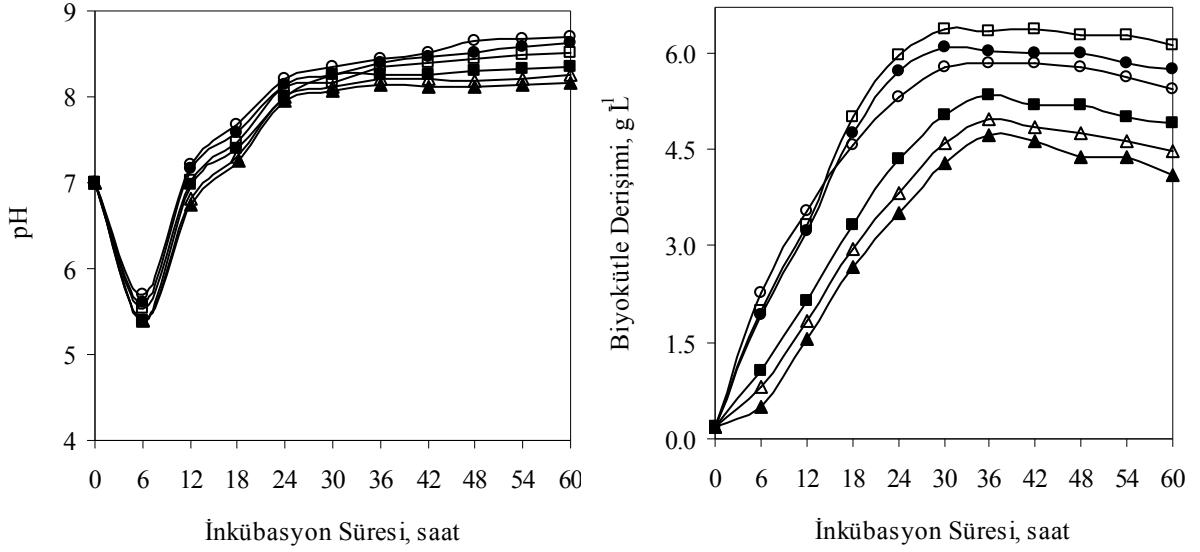
1 g L⁻¹ glikoz, 12.5 g L⁻¹ pepton, 10.0 g L⁻¹ yeast ekstrakt ve 10 g L⁻¹ NaCl içeren fermantasyon ortamına beş farklı derişimde (1, 2.5, 5, 7.5 ve 10 g L⁻¹) amonyum sülfat ((NH₄)₂SO₄) ilave edilerek 250 ml'lik erlenlerde *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) yabani suşu ile yapılan deneylerde elde edilen sonuçlar Şekil 6.21. ve Şekil 6.22.'de verilmiştir. Şekil 6.21.'da, amonyum sülfat derişiminin, hücre dışı ve hücre içi L-DOPA ve Dopamin üretimi üzerine etkisi Şekil 6.22.'de ise biyokütle oluşumu ve ortam pH'nın değişimi üzerine etkisi görülmektedir.

Düşük derişimlerde (1 ve 2.5 g L⁻¹) (NH₄)₂SO₄'ün fermantasyon ortamına ilave edilmesi ile gerçekleştirilen deneylerde L-DOPA ve Dopamin üretiminin yüksek olduğu, (NH₄)₂SO₄ derişiminin artmasıyla L-DOPA ve Dopamin üretiminin fermantasyon ortamındaki (NH₄)₂SO₄ derişimi ile ters orantılı olarak değiştiği görülmüştür. Maksimum L-DOPA ve Dopamin üretim verimine 2.5 g L⁻¹ (NH₄)₂SO₄ içeren fermantasyon ortamında ulaşılmıştır. İnorganik azot kaynağı olan (NH₄)₂SO₄ fermantasyon ortamına ilave edilen diğer organik azot kaynaklarıyla kıyaslandığında yeast ekstrakt'a eşdeğer, pepton'a nazaran da daha az L-DOPA ve Dopamin üretimine etkisinin olduğu görülmektedir. Ancak organik azot kaynaklarının (yeast ekstrakt, pepton, beef ekstrakt, mısır ıslatma şurubu vb.) bakteriyel suşlarda maksimum mikrobiyal ürün üretimi sağladığı yapılan çalışmalarda ifade edilmektedir [156-157]. Azot kaynağı olarak (NH₄)₂SO₄ kullanıldığı ortamda, yeast ekstrakt kullanılan ortamda elde edilen mikrobiyal ürün verimlerinin birbirine yakın oluşu her bir suşun farklı azot kaynaklarında farklı ürün üretim kapasitesine sahip olduğu bilgisini güçlendirmektedir [158].



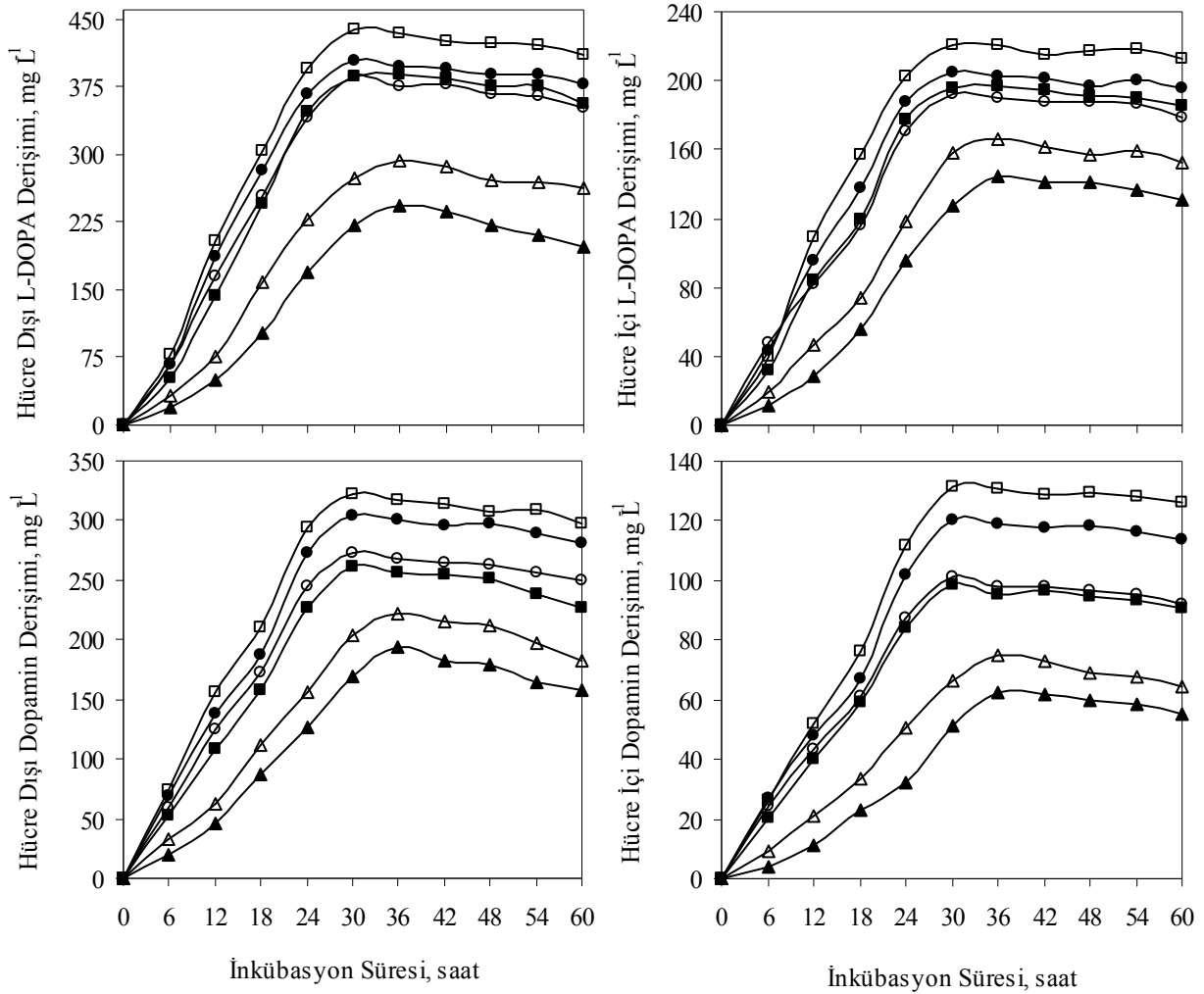
Şekil 6.21. Farklı amonyum sülfat derişimlerinde *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde hücre dışı ve hücre içi L-DOPA ve Dopamin derişiminin inkübasyon süresi ile değışimi (Şartlar: ○: 0, ●: 1.0, □: 2.5, ■: 5.0, △: 7.5, ▲: 10.0 g L⁻¹ amonyum sülfat, 1.0 g L⁻¹ glikoz, 12.5 g L⁻¹ pepton., 10.0 g L⁻¹ Y.E., 10.0 g L⁻¹ NaCl, pH_b: 7.0; Ekim oranı: % 1 v v⁻¹; Çalkalama hızı: 150 rpm; Ortam sıcaklığı: 37 °C).

Fermantasyon ortamındaki diğer bileşenlere ek olarak ortama ilave edilen amonyum sülfatın, *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) yabani suşu ile L-DOPA ve Dopamin üretimi üzerine etkisi incelendiğinde, en yüksek hücre dışı L-DOPA ve Dopamin üretimi 2.5 g L⁻¹ amonyum sülfat derişiminde sırasıyla 433 mg L⁻¹ ve 202 mg L⁻¹ değerlerine ulaştığı görülmektedir. En yüksek hücre içi L-DOPA ve Dopamin üretimi ise yine 2.5 g L⁻¹ amonyum sülfat derişiminde sırasıyla 96 mg L⁻¹ ve 34 mg L⁻¹ değerlerine ulaşılmıştır. Bütün amonyum sülfat derişimlerinde maksimum L-DOPA ve Dopamin üretim düzeyine logaritmik evre sonlarında ulaşılmıştır. Maksimum mikrobiyal ürün verimine, düşük amonyum sülfat derişimlerinde (1 ve 2.5 g L⁻¹) 30. saat sonunda yüksek amonyum sülfat derişimlerinde ise (5, 7.5 ve 10 g L⁻¹) 36. ile 42. saatlerde ulaşılmıştır ve inkübasyon süresi sonuna doğru bu üretim düzeylerinde azda olsa bir azalmanın olduğu gözlemlenmiştir.



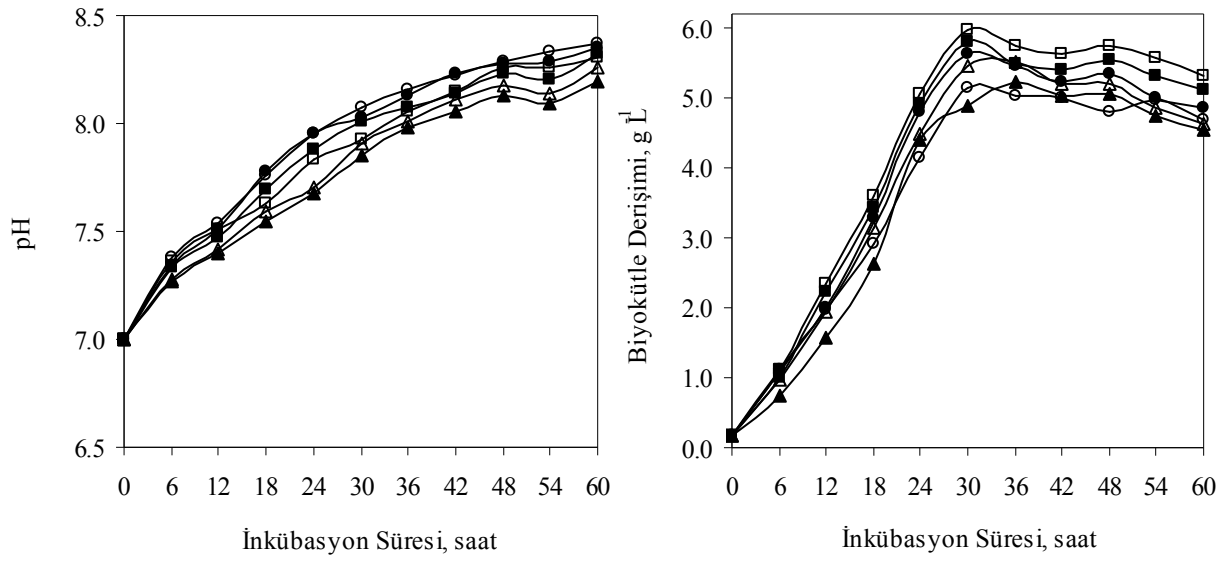
Şekil 6.22. Farklı amonyum sülfat derişimlerinde *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde pH ve biyokütle derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi (Şartlar: ○: 0, ●: 1.0, □: 2.5, ■: 5.0, △: 7.5, ▲: 10.0 g L⁻¹ amonyum sülfat, 1.0 g L⁻¹ glikoz, 12.5 g L⁻¹ pepton, 10.0 g L⁻¹ Y.E., 10.0 g L⁻¹ NaCl, pH_b: 7.0; Ekim oranı: % 1 v v⁻¹; Çalkalama hızı: 150 rpm; Ortam sıcaklığı: 37 °C).

Citrobacter freundii pMK79 rekombinant suşu ile 5 g L⁻¹ glikoz, 15.0 g L⁻¹ pepton, 12.5 g L⁻¹ yeast ekstrakt ve 10 g L⁻¹ NaCl içeren fermentasyon ortamına beş farklı amonyum sülfat derişiminde (1, 2.5, 5, 7.5 ve 10 g L⁻¹) 250 ml'lik erlenlerde yapılan deneylerde elde edilen sonuçlar Şekil 6.23. ve Şekil 6.24.'de verilmiştir. Şekil 6.23.'de, amonyum sülfat derişiminin, *Citrobacter freundii* pMK79 ile elde edilen hücre dışı ve hücre içi L-DOPA ve Dopamin üretimi üzerine etkisi görülmektedir. Şekil 6.24.'de ise amonyum sülfat derişiminin *Citrobacter freundii* pMK79 ile yapılan deneylerde biyokütle oluşumu ve ortam pH'nın değişimi üzerine olan etkisi görülmektedir. Amonyum sülfat derişiminin, *Vgb* genini taşıyan (*vgb*⁺) *Citrobacter freundii* pMK79 rekombinant suşu ile L-DOPA ve Dopamin üretimi üzerine etkisi incelendiğinde, en yüksek hücre dışı L-DOPA ve Dopamin üretimi 2.5 g L⁻¹ amonyum sülfat derişiminde sırasıyla 438 mg L⁻¹ ve 322 mg L⁻¹ değerlerine ulaştığı görülmektedir. En yüksek hücre içi L-DOPA ve Dopamin üretimi ise yine 2.5 g L⁻¹ amonyum sülfat derişiminde sırasıyla 221 mg L⁻¹ ve 131 mg L⁻¹ değerlerine ulaşmaktadır. Ortamda etkisi incelenen tüm amonyum sülfat derişimlerinde maksimum üretim düzeyine logaritmik evre sonlarına doğru ulaşıp inkübasyon süresi sonuna doğru azda olsa bir azalmanın olduğu görülmektedir. Fermentasyon ortamına ilave edilen amonyum sülfatın 1.0-5.0 g L⁻¹ derişimlerinde L-DOPA ve Dopamin üretimini arttırdığı, 5 g L⁻¹'den yüksek amonyum sülfat derişimlerinde ise L-DOPA ve Dopamin üretimini düşürdüğü görülmektedir.

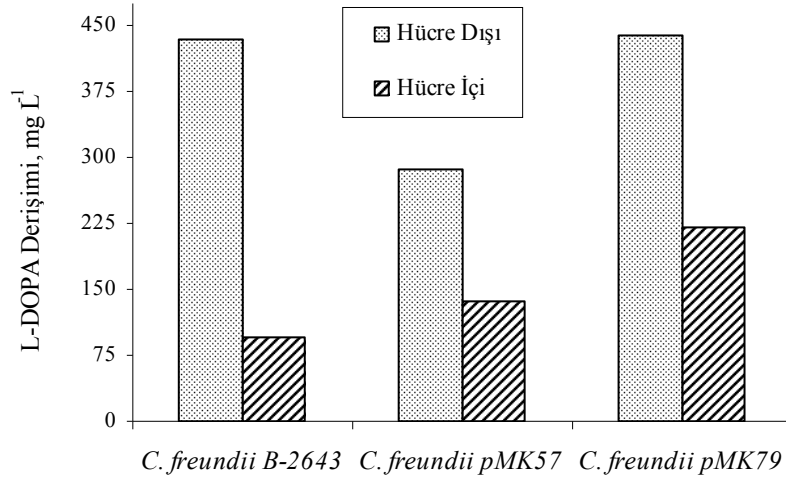


Şekil 6.23. Farklı amonyum sülfat derişimlerinde *Citrobacter freundii* pMK79 ile yapılan deneylerde hücre dışı ve hücre içi L-DOPA ve Dopamin derişiminin inkübasyon süresi ile değışimi (Şartlar: ○: 0, ●: 1.0, □: 2.5, ■: 5.0, △: 7.5, ▲: 10.0 g L⁻¹ amonyum sülfat, 5 g L⁻¹ glikoz, 15 g L⁻¹ pepton, 12.5 g L⁻¹ Y.E., 10 g L⁻¹ NaCl, pH₀: 7.0; Ekim oranı: % 1 v v⁻¹; Çalkalama hızı: 150 rpm; Ortam sıcaklığı: 37 °C).

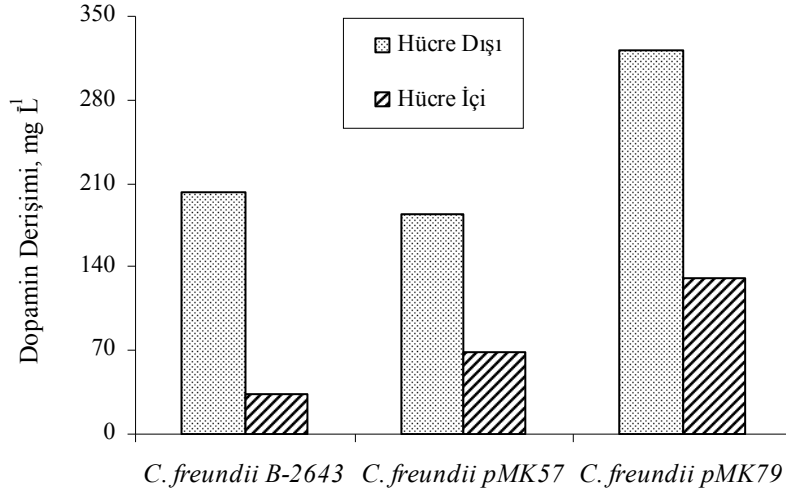
Vgb genini taşımayan (*vgb*⁻) *Citrobacter freundii* pMK57 ve *vgb* genini taşıyan (*vgb*⁺) *Citrobacter freundii* pMK79 rekombinant suşları ile *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) yabanil suşun maksimum L-DOPA ve Dopamin üretim düzeyleri sırasıyla Şekil 6.25. ve Şekil 6.26.'da verilmiştir. Hücre dışı L-DOPA üretimi en yüksek düzeyde (438 mg L⁻¹) 2.5 g L⁻¹ amonyum sülfatın bulunduğu fermentasyon ortamında *Citrobacter freundii* pMK79 rekombinant suşu ile elde edilmiştir. Hücre içi L-DOPA üretimi de en yüksek düzeyde 221 mg L⁻¹ ile 2.5 g L⁻¹ amonyum sülfatın bulunduğu fermentasyon ortamında *Citrobacter freundii* pMK79 rekombinant suşu kullanılarak elde edilmiştir. Yabanil ve rekombinant suşlar arasında Dopamin üretim düzeyleri kıyaslandığında hücre dışı ve hücre içi Dopamin üretiminin en yüksek 2.5 g L⁻¹ amonyum sülfat bulunduran fermentasyon ortamında *Citrobacter freundii* pMK79 rekombinant suşunun kullanıldığı deneylerde sırasıyla 322 ve 131 mg L⁻¹ olarak elde edilmiştir.



Şekil 6.24. Farklı amonyum sülfat derişimleri *Citrobacter freundii* pMK79 ile yapılan deneylerde pH ve biyokütle derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi (Şartlar: ○: 0, ●: 1.0, □: 2.5, ■: 5.0, △: 7.5, ▲: 10.0 g L⁻¹ amonyum sülfat, 5 g L⁻¹ glikoz, 15 g L⁻¹ pepton, 12.5 g L⁻¹ Y.E., 10 g L⁻¹ NaCl, pH_b: 7.0; Ekim oranı: % 1 v v⁻¹; Çalkalama hızı: 150 rpm; Ortam sıcaklığı: 37 °C).



Şekil 6.25. *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ve rekombinant suşları pMK57 ile pMK79'nın glikoz varlığındaki amonyum sülfat etkisinin incelendiği fermentasyon ortamındaki maksimum hücre dışı ve hücre içi L-DOPA derişimi.

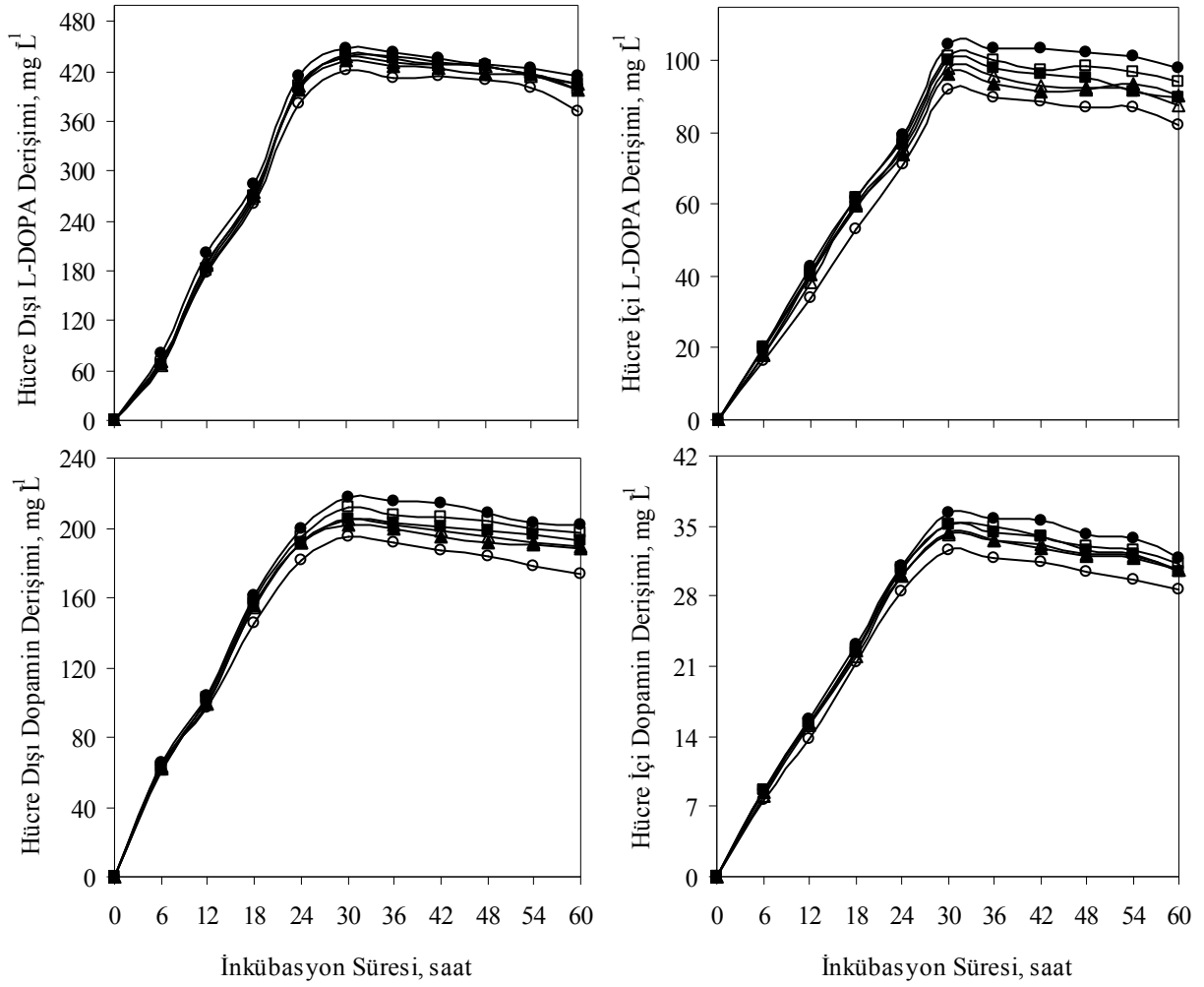


Şekil 6.26. *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ve rekombinant suşları pMK57 ile pMK79'nin glikoz varlığındaki amonyum sülfat etkisinin incelendiği fermentasyon ortamındaki maksimum hücre dışı ve hücre içi Dopamin derişimi.

6.1.4. Diğer Ortam Bileşenlerinin Etkisi

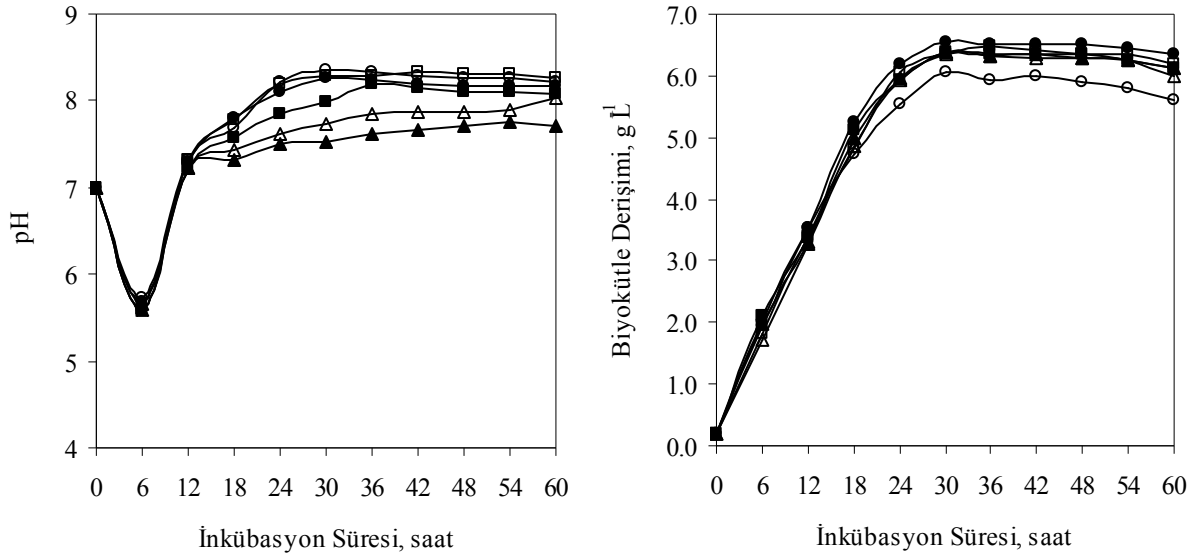
Fermentasyon yoluyla üretimi gerçekleştirilen birçok metabolit, enzimlerin katalizlediği reaksiyonlar sonucu fermentasyon ortamına salgılanmaktadır. Mikrobiyal ürün oluşum reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerin kararlılıklarının sağlanması ve proteolitik etkilere karşı korunması için mutlaka ortamda etkili metal iyonlarının bulunması gerekliliği yapılan çalışmalarda belirtilmektedir [159]. Bu amaçla L-DOPA ve Dopamin üretimi üzerine etkisi olabileceği düşünülen ve başlangıçta seçilen zengin besi yeri ortamı (LB) bileşenlerinden olan sodyum klorürün (NaCl) yanı sıra kalsiyum klorürün (CaCl_2) etkileri farklı derişimlerde fermentasyon ortamına ilave edilerek araştırılmıştır. Yapılan deneylerde NaCl 'nin ürün üretimini artırıcı bir etkiye sahip olmadığı ancak CaCl_2 'nin farklı derişimlerde az da olsa pozitif yönde bir etkiye sahip olduğu gözlemlenmiştir. Ürün üretimi üzerine artırıcı bir etkiye sahip olmadığı için NaCl 'nin etkisinin incelendiği deney sonuçları verilmemiştir.

1 g L⁻¹ glikoz, 12.5 g L⁻¹ pepton, 10.0 g L⁻¹ yeast ekstrakt ve 2.5 g L⁻¹ (NH_4)₂SO₄ içeren fermentasyon ortamına beş farklı derişimde (1, 2.5, 5, 7.5 ve 10 g L⁻¹) kalsiyum klorür (CaCl_2) ilave edilerek 250 ml'lik erlenlerde *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) yabanil suşu ile yapılan deneylerde elde edilen sonuçlar Şekil 6.27. ve Şekil 6.28.'de verilmiştir. Şekil 6.27.'de, kalsiyum klorür derişiminin, hücre dışı ve hücre içi L-DOPA ve Dopamin üretimi üzerine etkisi görülmektedir.



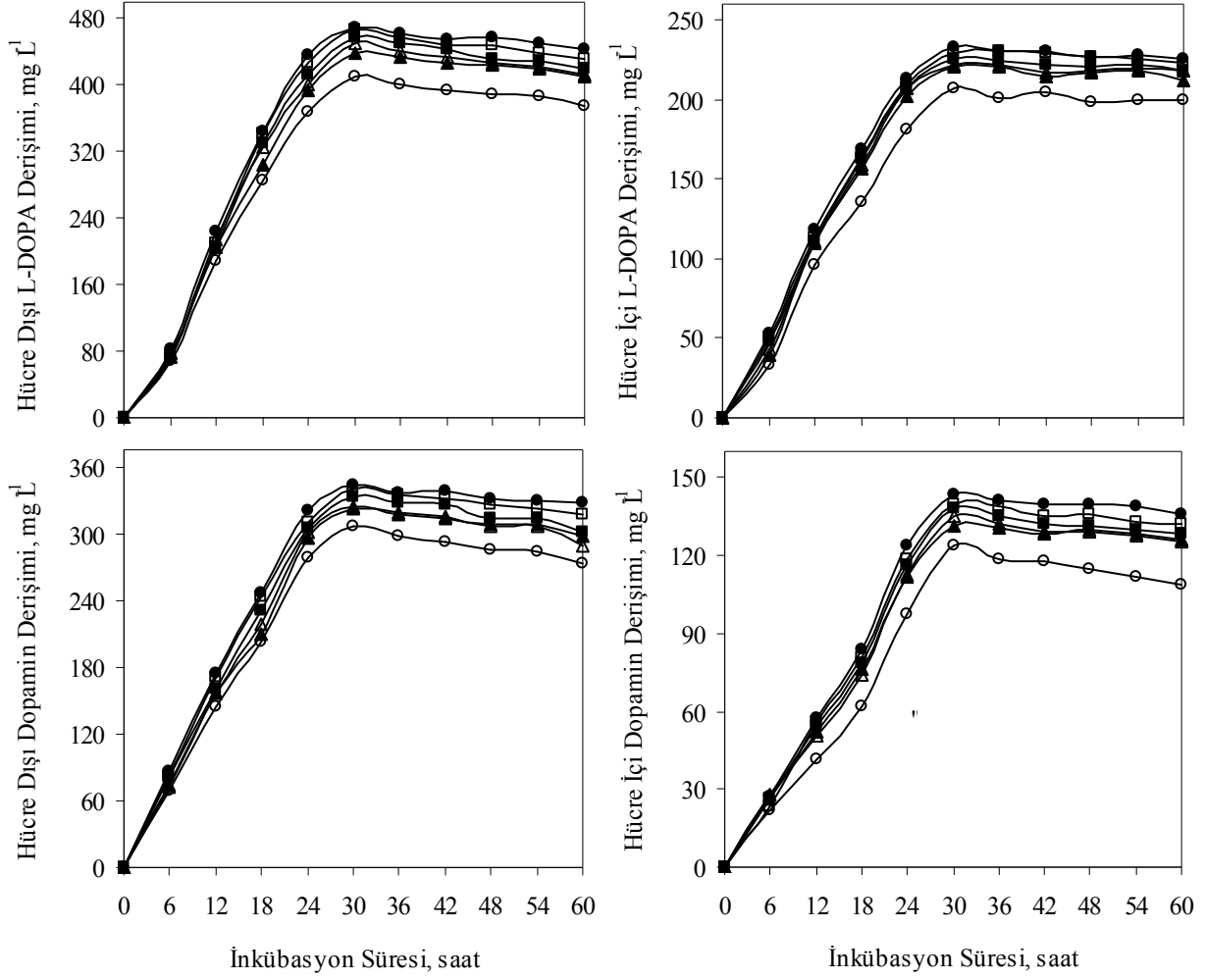
Şekil 6.27. Farklı kalsiyum klorür derişimlerinde *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde hücre dışı ve hücre içi L-DOPA ve Dopamin derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi (Şartlar: ○: 0, ●: 1.0, □: 2.5, ■: 5.0, △: 7.5, ▲: 10.0 g L⁻¹ kalsiyum klorür, 1.0 g L⁻¹ glikoz, 12.5 g L⁻¹ pepton., 10.0 g L⁻¹ Y.E., 2.5 g L⁻¹ amonyum sülfat, pH_b: 7.0; Ekim oranı: % 1 v v⁻¹; Çalkalama hızı: 150 rpm; Ortam sıcaklığı: 37 °C).

Şekil 6.28.'de ise biyokütle oluşumu ve ortam pH'nın değişimi üzerine etkisi görölmektedir. *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) yabanil suşu ile L-DOPA ve Dopamin üretimi üzerine kalsiyum klorürün farklı derişimlerdeki etkisi incelendiğinde, en yüksek hücre dışı L-DOPA ve Dopamin üretimi 1.0 g L⁻¹ kalsiyum klorür derişiminde sırasıyla 447 mg L⁻¹ ve 218 mg L⁻¹ değerlerine ulaştığı görölmektedir. En yüksek hücre içi L-DOPA ve Dopamin üretimi ise yine 1.0 g L⁻¹ kalsiyum klorür derişiminde sırasıyla 105 mg L⁻¹ ve 36 mg L⁻¹ değerlerine ulaştığı görölmektedir. Bütün kalsiyum klorür derişimlerinde maksimum L-DOPA ve Dopamin üretim düzeyine logaritmik evre sonlarında ulaşılmış ve inkübasyon süresi sonuna doğru bu üretim düzeylerinde azda olsa bir azalmanın olduğu gözlemlenmiştir.



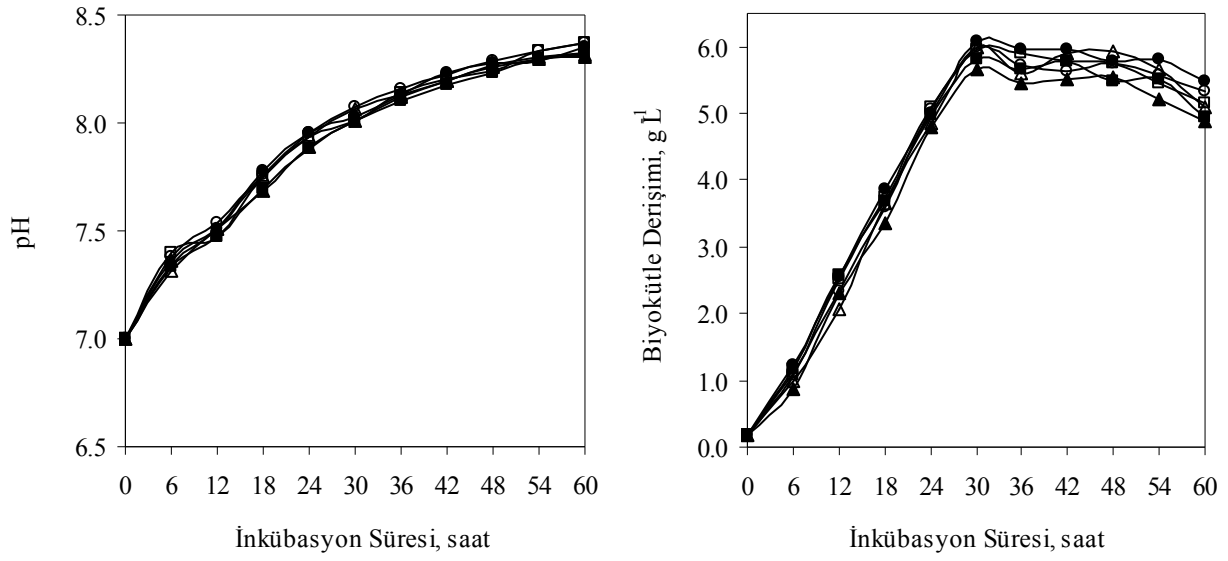
Şekil 6.28. Farklı kalsiyum klorür derişimlerinde *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde pH ve biyokütle derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi (Şartlar: ○: 0, ●: 1.0, □: 2.5, ■: 5.0, △: 7.5, ▲: 10.0 g L⁻¹ kalsiyum klorür, 1.0 g L⁻¹ glikoz, 12.5 g L⁻¹ pepton, 10.0 g L⁻¹ Y.E., 2.5 g L⁻¹ amonyum sülfat, pH_b: 7.0; Ekim oranı: % 1 v v⁻¹; Çalkalama hızı: 150 rpm; Ortam sıcaklığı: 37 °C).

Vgb genini taşıyan (*vgb*⁺) *Citrobacter freundii* pMK79 rekombinant suşu ile 5 g L⁻¹ glikoz, 15.0 g L⁻¹ pepton, 12.5 g L⁻¹ yeast ekstrakt ve 2.5 g L⁻¹ amonyum sülfat içeren fermentasyon ortamına beş farklı kalsiyum klorür derişiminde (1, 2.5, 5, 7.5 ve 10 g L⁻¹) 250 ml’lik erlenlerde yapılan deneylerde elde edilen sonuçlar Şekil 6.29. ve Şekil 6.30.’da verilmiştir. Şekil 6.29.’da, kalsiyum klorür derişiminin, *Citrobacter freundii* pMK79 ile elde edilen hücre dışı ve hücre içi L-DOPA ve Dopamin üretimi üzerine etkisi görülmektedir. Şekil 6.30.’da ise kalsiyum klorür derişiminin *Citrobacter freundii* pMK79 ile yapılan deneylerde biyokütle oluşumu ve ortam pH’nın değişimi üzerine olan etkisi görülmektedir. Kalsiyum klorür derişiminin, *Citrobacter freundii* pMK79 rekombinant suşu ile L-DOPA ve Dopamin üretimi üzerine etkisi incelendiğinde, en yüksek hücre dışı L-DOPA ve Dopamin üretimi 1.0 g L⁻¹ kalsiyum klorür derişiminde sırasıyla 470 mg L⁻¹ ve 344 mg L⁻¹ değerlerine ulaştığı görülmektedir. En yüksek hücre içi L-DOPA ve Dopamin üretimi ise yine 1.0 g L⁻¹ kalsiyum klorür derişiminde sırasıyla 233 mg L⁻¹ ve 143 mg L⁻¹ değerlerine ulaştığı görülmektedir. Fermentasyon ortamına ilave edilen tüm kalsiyum klorür derişimlerinde L-DOPA ve Dopamin üretimini azda olsa arttırmıştır.

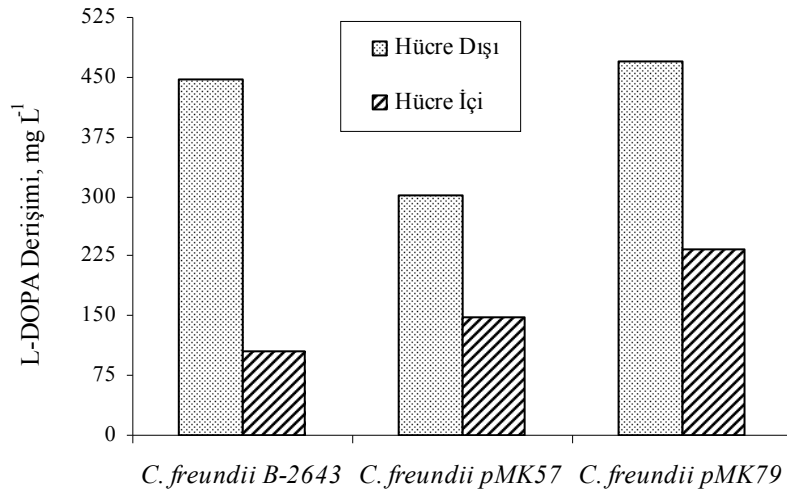


Şekil 6.29. Farklı kalsiyum klorür derişimlerinde *Citrobacter freundii* pMK79 ile yapılan deneylerde hücre dışı ve hücre içi L-DOPA ve Dopamin derişiminin inkübasyon süresi ile değışimi (Şartlar: ○: 0, ●: 1.0, □: 2.5, ■: 5.0, △: 7.5, ▲: 10.0 g L⁻¹ kalsiyum klorür, 5 g L⁻¹ glikoz, 15 g L⁻¹ pepton, 12.5 g L⁻¹ Y.E., 2.5 g L⁻¹ amonyum sülfat, pH₆: 7.0; Ekim oranı: % 1 v v⁻¹; Çalkalama hızı: 150 rpm; Ortam sıcaklığı: 37 °C).

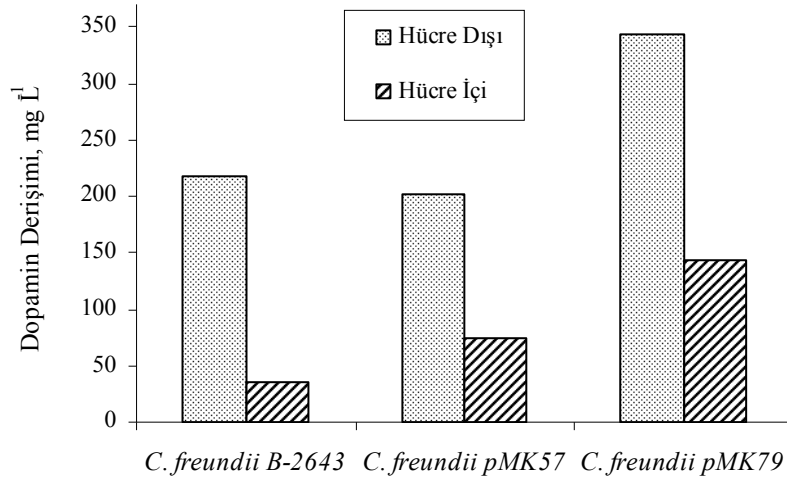
Vgb genini taşımayan (*vgb*⁻) *Citrobacter freundii* pMK57 ve *vgb* genini taşıyan (*vgb*⁺) *Citrobacter freundii* pMK79 rekombinant suşları ile *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) yabanil suşun maksimum L-DOPA ve Dopamin üretim düzeyleri sırasıyla Şekil 6.31. ve Şekil 6.32.'de verilmiştir. Hücre dışı L-DOPA üretimi en yüksek düzeyde (470 mg L⁻¹) 1.0 g L⁻¹ kalsiyum klorürün bulunduğu fermentasyon ortamında *Citrobacter freundii* pMK79 rekombinant suşu ile elde edilmiştir. Hücre içi L-DOPA üretimi de en yüksek düzeyde 233 mg L⁻¹ ile 1.0 g L⁻¹ kalsiyum klorürün bulunduğu fermentasyon ortamında *Citrobacter freundii* pMK79 rekombinant suşu kullanılarak elde edilmiştir. Yabanil ve rekombinant suşlar arasında Dopamin üretim düzeyleri kıyaslandığında hücre dışı ve hücre içi Dopamin üretiminin en yüksek 1.0 g L⁻¹ kalsiyum klorür bulunduran fermentasyon ortamında *Citrobacter freundii* pMK79 rekombinant suşunun kullanıldığı deneylerde sırasıyla 344 ve 143 mg L⁻¹ olarak elde edilmiştir.



Şekil 6.30. Farklı kalsiyum klorür derişimlerinde *Citrobacter freundii* pMK79 ile yapılan deneylerde pH ve biyokütle derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi (Şartlar: ○: 0, ●: 1.0, □: 2.5, ■: 5.0, △: 7.5, ▲: 10.0 g L⁻¹ kalsiyum klorür, 5 g L⁻¹ glikoz, 15 g L⁻¹ pepton, 12.5 g L⁻¹ Y.E., 2.5 g L⁻¹ amonyum sülfat, pH_b: 7.0; Ekim oranı: % 1 v v⁻¹; Çalkalama hızı: 150 rpm; Ortam sıcaklığı: 37 °C).



Şekil 6.31. *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ve rekombinant suşları pMK57 ile pMK79'ın glikoz varlığındaki kalsiyum klorür etkisinin incelendiği fermentasyon ortamındaki maksimum hücre dışı ve hücre içi L-DOPA derişimi.

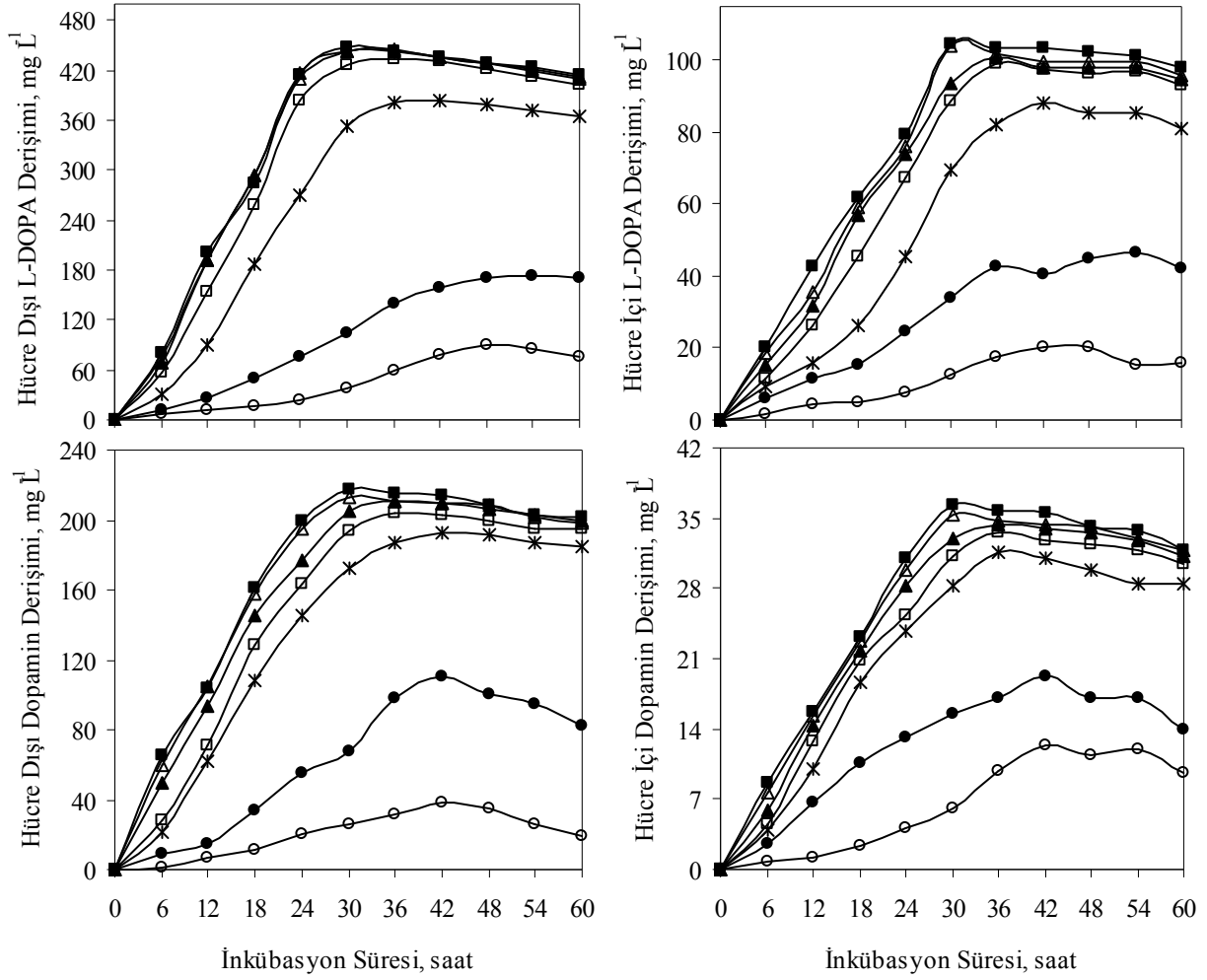


Şekil 6.32. *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ve rekombinant suşları pMK57 ile pMK79'nin glikoz varlığındaki kalsiyum klorür etkisinin incelendiği fermantasyon ortamındaki maksimum hücre dışı ve hücre içi Dopamin derişimi.

6.1.5. Başlangıç Ortam pH'sının Etkisi

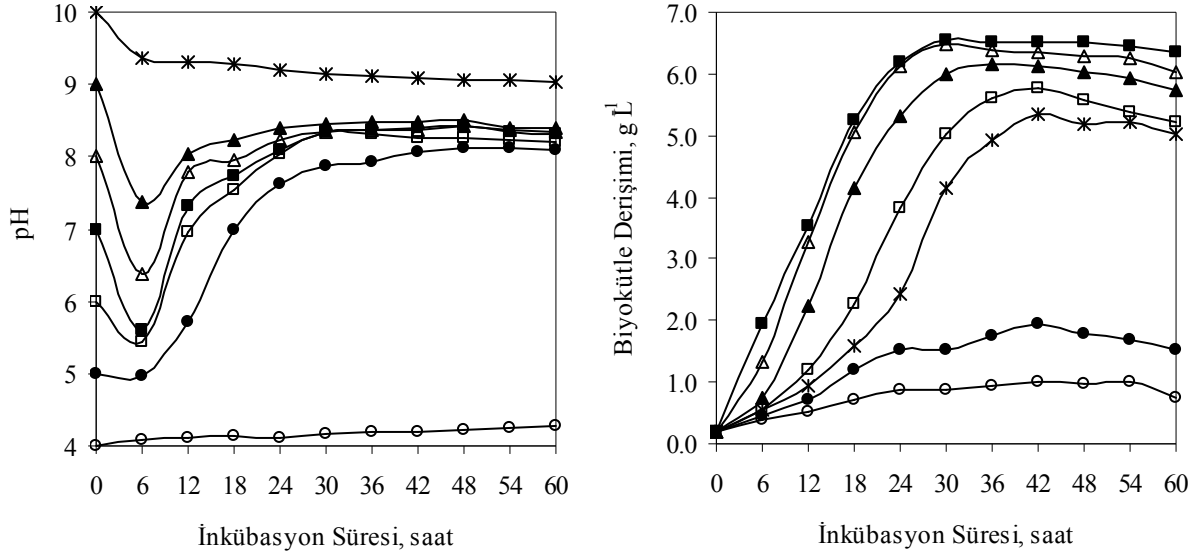
Biyoproseslerde ortam pH'sı zamanla değişim göstermektedir ve bu değişim başlangıç pH'ı ile yakından ilişkilidir. Mikroorganizmanın söz konusu ürün üretim faaliyetlerini optimum düzeyde gerçekleştirebilmesi için fermantasyon ortamının belirli bir pH değerine ayarlanması gerekir [7]. Bu aşamadan önce yapılan deneylerde fermantasyon başlangıç ortamı pH değeri 7.0'a ayarlanmıştır.

Farklı başlangıç ortam pH'sının mikrobiyal ürün oluşumuna etkisini incelemek amacıyla 1 g L⁻¹ glikoz, 12.5 g L⁻¹ pepton, 10.0 g L⁻¹ yeast ekstrakt, 2.5 g L⁻¹ (NH₄)₂SO₄ ve 1.0 g L⁻¹ CaCl₂'den oluşan fermantasyon ortamında *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) yabani suşu ile farklı başlangıç pH değerlerinde (pH 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 ve 10.0) deneyler gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 6.33. ve Şekil 6.34.'de verilmiştir. Şekil 6.33.'de, başlangıç pH'ının hücre dışı ve hücre içi L-DOPA ve Dopamin üretimi üzerine etkisi, Şekil 6.34.'de ise biyokütle oluşumu ve ortam pH'ının değişimi üzerine etkisi görülmektedir.



Şekil 6.33. Farklı ortam başlangıç pH'larında *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde hücre dışı ve hücre içi L-DOPA ve Dopamin derişiminin inkübasyon süresi ile değışimi (Şartlar: ○: 4.0, ●: 5.0, □: 6.0, ■: 7.0, △: 8.0, ▲: 9.0, *: 10.0 pH, 1.0 g L⁻¹ glikoz, 12.5 g L⁻¹ pepton., 10.0 g L⁻¹ Y.E., 2.5 g L⁻¹ amonyum sülfat, 1.0 g L⁻¹ kalsiyum klorür, Ekim oranı: % 1 v v⁻¹; Çalkalama hızı: 150 rpm; Ortam sıcaklığı: 37 °C).

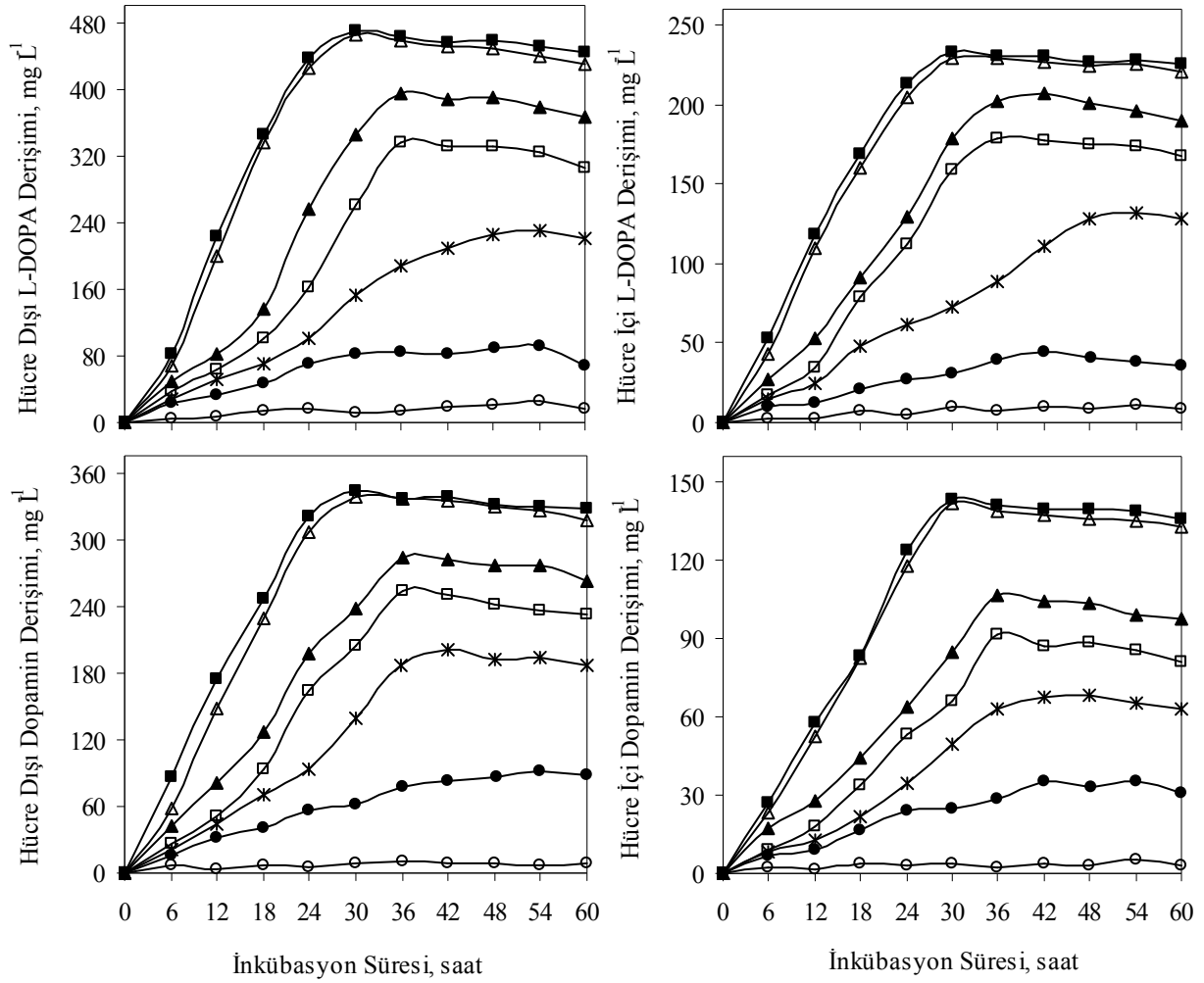
Şekil 6.33.'den de görüldüğü gibi en yüksek L-DOPA ve Dopamin üretimi pH 7 değerinde gözlenmiştir. Başlangıç ortam pH'sının L-DOPA ve Dopamin üretimi üzerine etkisine bakılacak olursa nötr, hafif asidik ve hafif bazik ortamlarda maksimum L-DOPA ve Dopamin üretiminin oldukça yakın olduğu görülmektedir. Buna karşın başlangıç pH'ının düşük ve yüksek değerlerinde L-DOPA ve Dopamin üretiminin oldukça etkilendiği ve diğer ortamlara göre üretimin düşük seviyelerde kaldığı görülmektedir. Şekil 6.34.'de başlangıç pH'sının 4.0 ve 10.0 olduğu değerlerde pH'nın zamanla değışmeden aynı kaldığı, diğer başlangıç pH değerlerinde (5.0, 6.0, 7.0, 8.0 ve 9.0) ise logaritmik evrenin sonlarına doğru tüm deneylerde yaklaşık aynı noktaya geldiği ve aynı karaktere sahip olduğu görülmektedir. Benzer durum biyokütle oluşumu için söz konusu olmakla birlikte biyokütle ve ürün arasındaki ilişki pH'nın 4.0 ve 5.0 olduğu değerlerde şimdiye kadar elde edilen sonuçlarla benzerlik göstermemektedir.



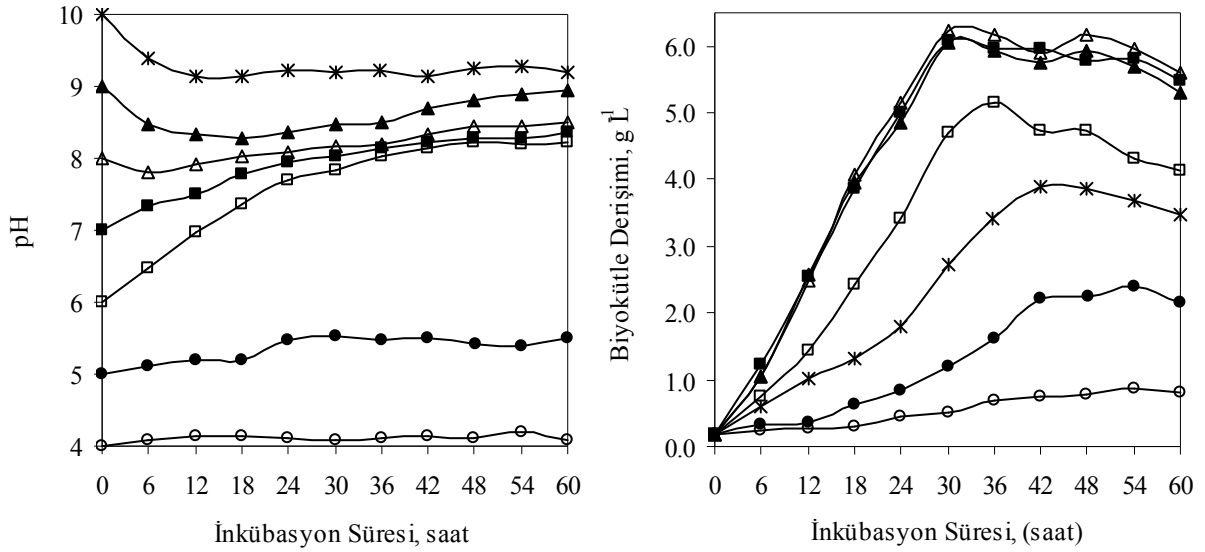
Şekil 6.34. Farklı ortam başlangıç pH'larında *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde pH ve biyokütle derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi (Şartlar: ○: 4.0, ●: 5.0, □: 6.0, ■: 7.0, △: 8.0, ▲: 9.0, *: 10.0 pH, 1.0 g L⁻¹ glikoz, 12.5 g L⁻¹ pepton., 10.0 g L⁻¹ Y.E., 2.5 g L⁻¹ amonyum sülfat, 1.0 g L⁻¹ kalsiyum klorür, Ekim oranı: % 1 v v⁻¹; Çalkalama hızı: 150 rpm; Ortam sıcaklığı: 37 °C).

Bu durum ortam pH'sının, bazik ve asidik bölgede ürün üretiminin oldukça fazla azaldığını göstermektedir. Bir başka deyişle, doğal ve doğala yakın pH değerlerinin dışına çıkmasıyla mikroorganizma olumsuz yönde etkilenmektedir.

Citrobacter freundii pMK79 rekombinant suşu ile farklı başlangıç pH'larının L-DOPA ve Dopamin oluşumuna etkisini incelemek amacıyla 5 g L⁻¹ glikoz, 15.0 g L⁻¹ pepton, 12.5 g L⁻¹ yeast ekstrakt, 2.5 g L⁻¹ (NH₄)₂SO₄ ve 1.0 g L⁻¹ CaCl₂'den oluşan fermentasyon ortamında farklı başlangıç pH değerlerinde (pH 4, 5, 6, 7, 8, 10) deneyler gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 6.35. ve Şekil 6.36.'da verilmiştir. Şekil 6.35.'de, başlangıç pH'ının hücre dışı ve hücre içi L-DOPA ve Dopamin üretimi üzerine etkisi, Şekil 6.36.'da ise biyokütle oluşumu ve ortam pH'ının değişimi üzerine etkisi görölmektedir. *Citrobacter freundii* pMK79 rekombinant suşunun yabani suşa nazaran pH etkisine daha duyarlı olduğu elde edilen sonuçlardan görölmektedir. Maksimum L-DOPA ve Dopamin üretim seviyesine başlangıç pH'sının 7.0 ve 8.0 olduğu değerlerde ulaşılmıştır.

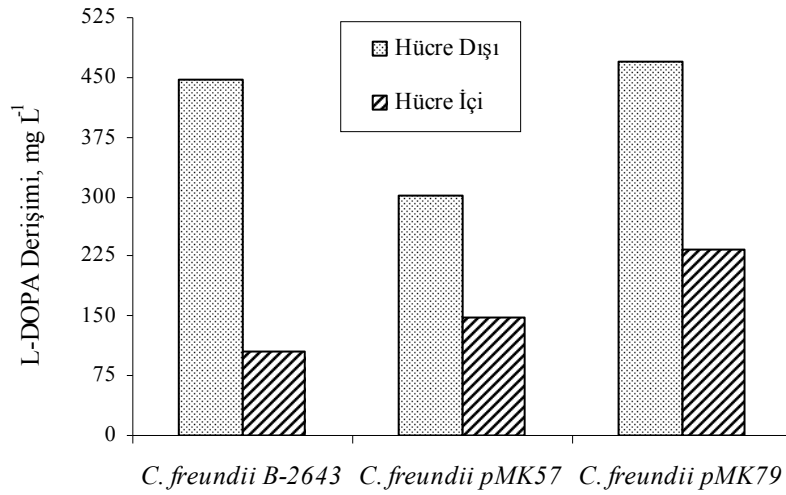


Şekil 6.35. Farklı ortam başlangıç pH'larında *Citrobacter freundii* pMK79 ile yapılan deneylerde hücre dışı ve hücre içi L-DOPA ve Dopamin derişiminin inkübasyon süresi ile değışimi (Şartlar: ○: 4.0, ●: 5.0, □: 6.0, ■: 7.0, △: 8.0, ▲: 9.0, *: 10.0 pH, 5 g L⁻¹ glikoz, 15 g L⁻¹ pepton, 12.5 g L⁻¹ Y.E., 2.5 g L⁻¹ amonyum sülfat, 1.0 g L⁻¹ kalsiyum klorür, Ekim oranı: % 1 v v⁻¹; Çalkalama hızı: 150 rpm; Ortam sıcaklığı: 37 °C).

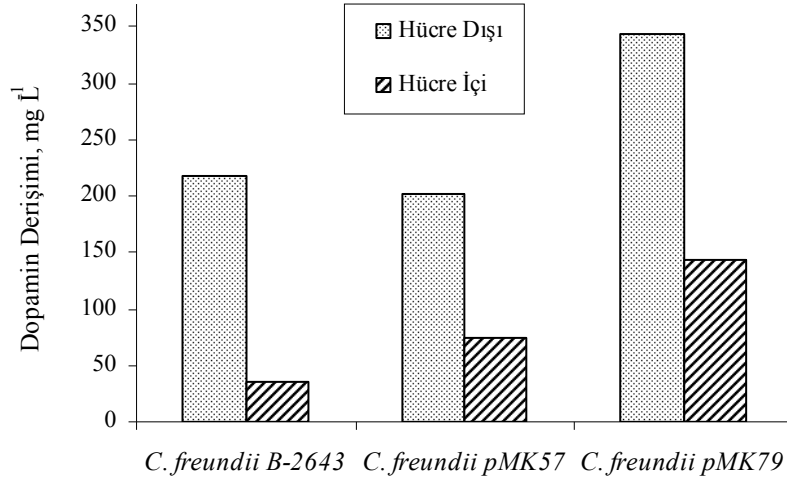


Şekil 6.36. Farklı ortam başlangıç pH'larında *Citrobacter freundii* pMK79 ile yapılan deneylerde pH ve biyokütle derişiminin inkübasyon süresi ile değışimi (Şartlar: ○: 4.0, ●: 5.0, □: 6.0, ■: 7.0, △: 8.0, ▲: 9.0, *: 10.0 pH, 5 g L⁻¹ glikoz, 15 g L⁻¹ pepton, 12.5 g L⁻¹ Y.E., 2.5 g L⁻¹ amonyum sülfat, 1.0 g L⁻¹ kalsiyum klorür, Ekim oranı: % 1 v v⁻¹; Çalkalama hızı: 150 rpm; Ortam sıcaklığı: 37 °C).

Vgb genini taşımayan (*vgb*⁻) *Citrobacter freundii* pMK57 ve *vgb* genini taşıyan (*vgb*⁺) *Citrobacter freundii* pMK79 rekombinant suşları ile *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) yabanıl suşun maksimum L-DOPA ve Dopamin üretim düzeyleri sırasıyla Şekil 6.37. ve Şekil 6.38.'de verilmiştir. Hücre dışı L-DOPA üretimi en yüksek düzeyde (470 mg L⁻¹) 7.0 ortam başlangıç pH'sında *Citrobacter freundii* pMK79 rekombinant suşu ile elde edilmiştir. Hücre içi L-DOPA üretimi de en yüksek düzeyde 233 mg L⁻¹ ile 7.0 ortam başlangıç pH'sında *Citrobacter freundii* pMK79 rekombinant suşu kullanılarak elde edilmiştir. Yabanıl ve rekombinant suşlar arasında Dopamin üretim düzeyleri kıyaslandığında hücre dışı ve hücre içi Dopamin üretiminin en yüksek 7.0 ortam başlangıç pH'sında *Citrobacter freundii* pMK79 rekombinant suşun kullanıldığı deneylerde sırasıyla 344 ve 143 mg L⁻¹ olarak elde edilmiştir.



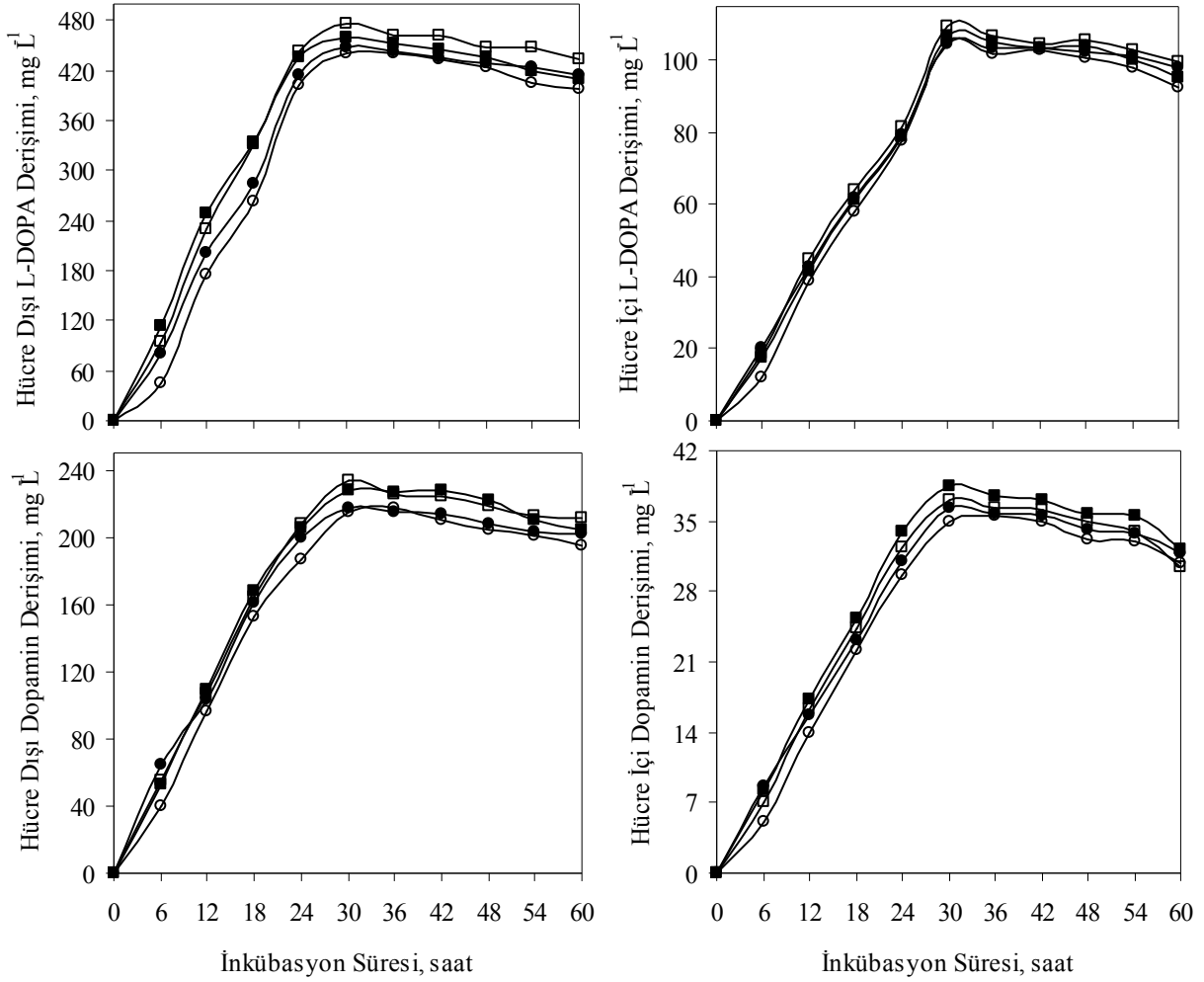
Şekil 6.37. *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ve rekombinant suşları pMK57 ile pMK79'ın glikoz varlığındaki ortam başlangıç pH'sının incelendiği fermentasyon ortamındaki maksimum hücre dışı ve hücre içi L-DOPA derişimi.



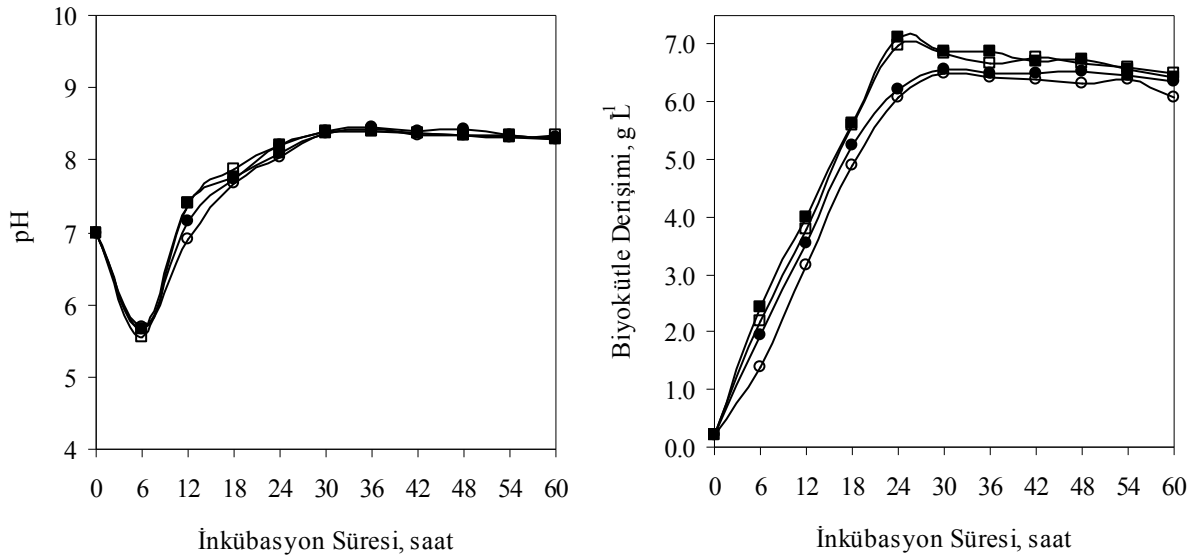
Şekil 6.38. *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ve rekombinant suşları pMK57 ile pMK79'nin glikoz varlığındaki ortam başlangıç pH'sının incelendiği fermentasyon ortamındaki maksimum hücre dışı ve hücre içi Dopamin derişimi.

6.1.6. Ekim Derişiminin (Oramının) Etkisi

Citrobacter freundii (NRRL B-2643) yabanıl suşu ile farklı ekim derişimlerinin L-DOPA ve Dopamin üretimi üzerine etkisinin incelendiği deney sonuçları Şekil 6.39. ve Şekil 6.40.'da verilmiştir. Farklı ekim derişimlerinin etkisini incelemek amacıyla 1 g L⁻¹ glikoz, 12.5 g L⁻¹ pepton, 10.0 g L⁻¹ yeast ekstrakt, 2.5 g L⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 1.0 g L⁻¹ CaCl₂ ve başlangıç pH'sı 7.0 olan fermentasyon ortamına % 0.5, 1, 2.5, 5 v v⁻¹ oranlarında ekim gerçekleştirilmiştir. Ekim derişiminin mikroorganizmaların lag fazını değiştireceği ve böylece mikrobiyal ürün üretiminin daha erken olması beklenmektedir. Elde edilen sonuçlardan ekim derişiminin L-DOPA ve Dopamin üretim düzeyini çok fazla değiştirmedeği ve en yüksek üretim seviyesinin % 2.5 v v⁻¹ olan ekim derişiminde gerçekleştiği görülmektedir. Bu aşamadan sonra gerçekleştirilen deneylerde ekim derişimi olarak % 2.5 v v⁻¹ değeri kullanılmıştır.



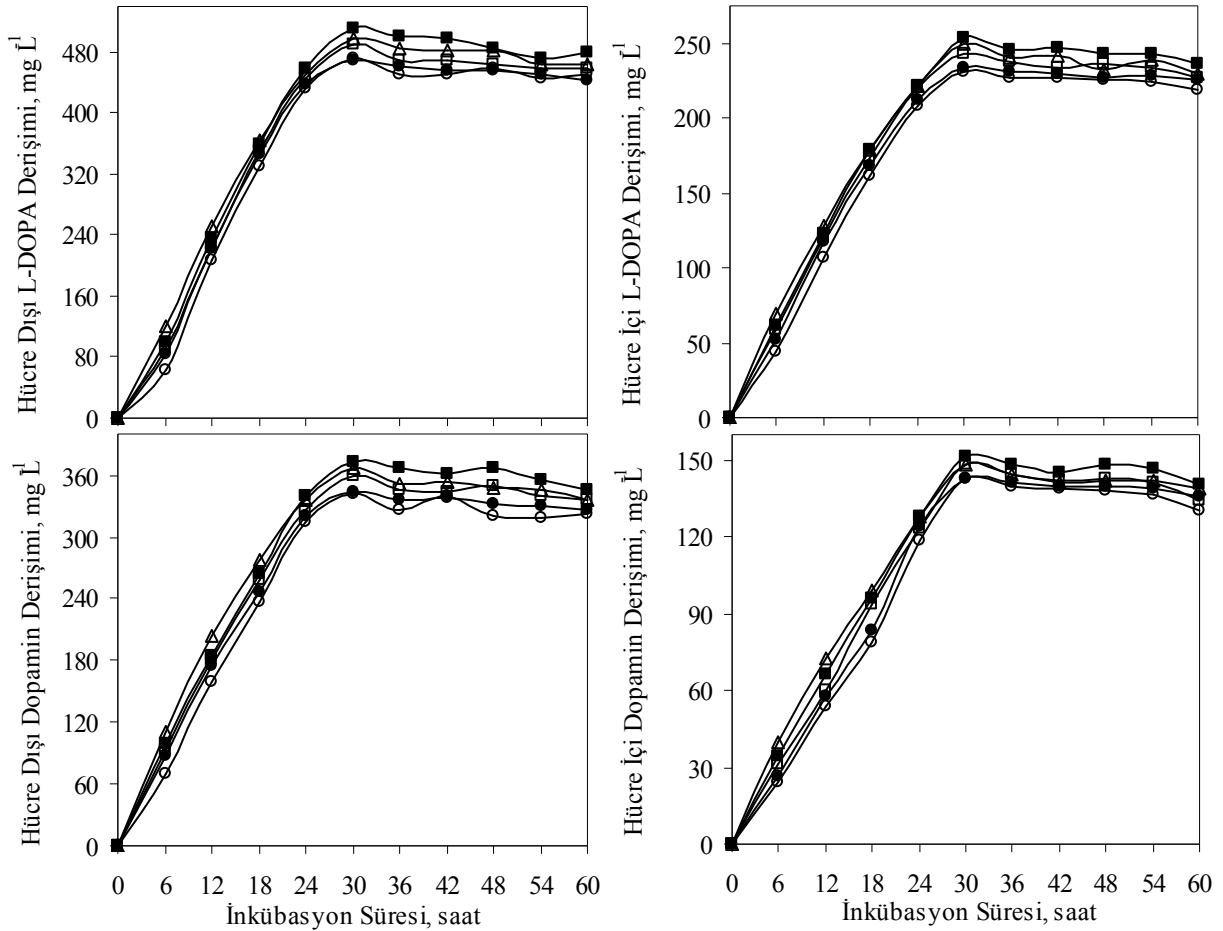
Şekil 6.39. Farklı ekim derişimlerinde *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde hücre dışı ve hücre içi L-DOPA ve Dopamin derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi (Şartlar: ○: % 0.5, ●: % 1.0, □: % 2.5, ■: % 5.0 v v⁻¹, 1.0 g L⁻¹ glikoz, 12.5 g L⁻¹ pepton., 10.0 g L⁻¹ Y.E., 2.5 g L⁻¹ amonyum sülfat, 1.0 g L⁻¹ kalsiyum klorür, pH_b: 7.0; Çalkalama hızı: 150 rpm; Ortam sıcaklığı: 37 °C).



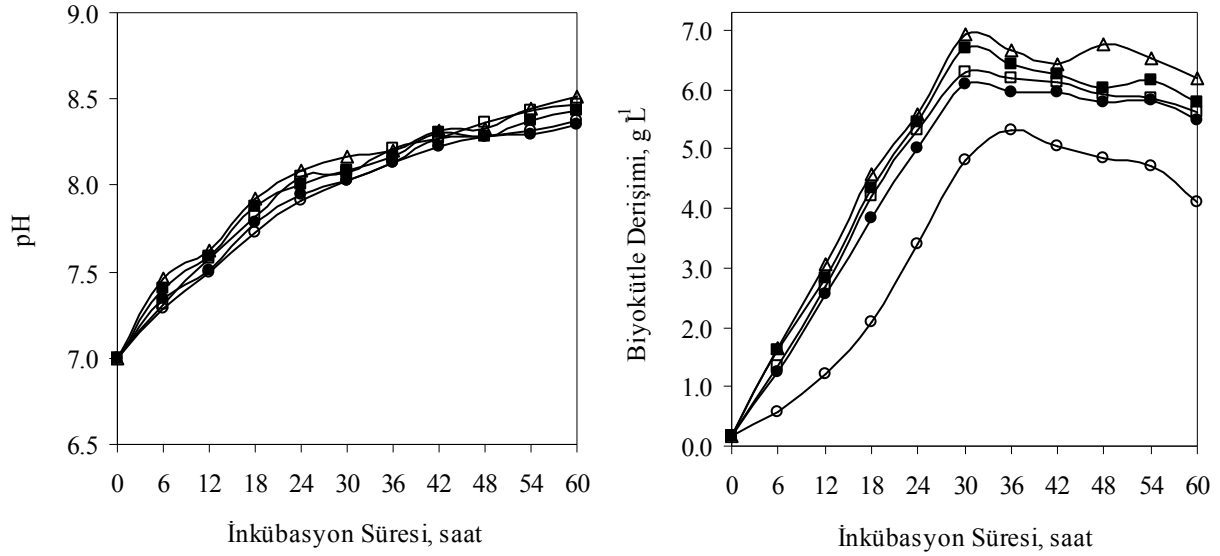
Şekil 6.40. Farklı ekim derişimlerinde *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde pH ve biyokütle derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi (Şartlar: ○: % 0.5, ●: % 1.0, □: % 2.5, ■: % 5.0 v v⁻¹, 1.0 g L⁻¹ glikoz, 12.5 g L⁻¹ pepton., 10.0 g L⁻¹ Y.E., 2.5 g L⁻¹ amonyum sülfat, 1.0 g L⁻¹ kalsiyum klorür, pH_b: 7.0; Çalkalama hızı: 150 rpm; Ortam sıcaklığı: 37 °C).

Citrobacter freundii pMK79 rekombinant suşu ile beş farklı ekim derişimlerinde (% 0.5, 1, 2.5, 5 ve 7.5 v v⁻¹) yapılan deneylerde elde edilen sonuçlar Şekil 6.41. ve Şekil 6.42.'de verilmiştir. Şekil 6.41.'de, ekim derişiminin, *Citrobacter freundii* pMK79 ile elde edilen hücre dışı ve hücre içi L-DOPA ve Dopamin üretimi üzerine etkisi görölmektedir. Şekil 6.42.'de ise ekim derişiminin *Citrobacter freundii* pMK79 ile yapılan deneylerde biyokütle oluşumu ve ortam pH'nın değışimi üzerine etkisi görölmektedir.

Ekim derişiminin, *Vgb* genini taşıyan (*vgb*⁺) *Citrobacter freundii* pMK79 rekombinant suşu ile L-DOPA ve Dopamin üretimi üzerine etkisi incelendiğinde, en yüksek hücre dışı L-DOPA ve Dopamin üretimi % 5.0 v v⁻¹ ekim derişiminde sırasıyla 510 mg L⁻¹ ve 373 mg L⁻¹ değerlerine ulaştığı görölmektedir. En yüksek hücre içi L-DOPA ve Dopamin üretimi ise yine % 5.0 v v⁻¹ ekim derişiminde sırasıyla 254 mg L⁻¹ ve 152 mg L⁻¹ değerlerine ulaştığı görölmektedir. Ekim derişimindeki artışa paralel olarak lag faz süresi azalmıştır. Maksimum ürün üretimine % 5.0 v v⁻¹'lik ekim derişiminde 30. saatte ulaşılırken daha düşük ekim derişimi değerlerinde 36. saatte ulaşılmaktadır.

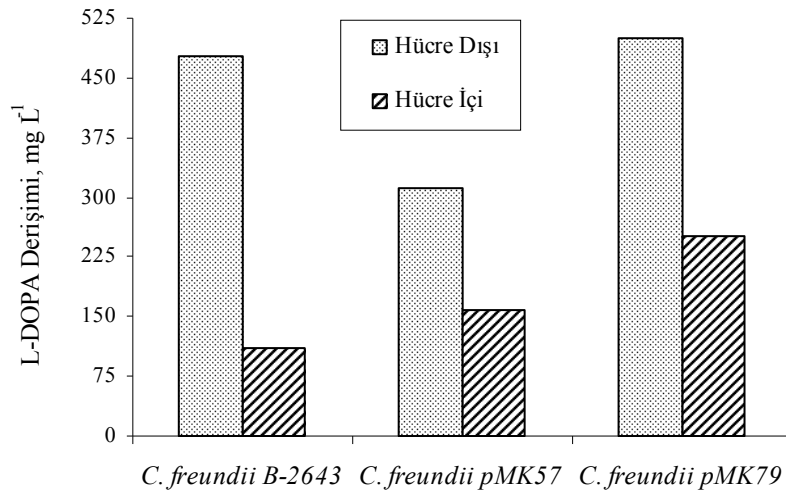


Şekil 6.41. Farklı ekim derişimlerinde *Citrobacter freundii* pMK79 ile yapılan deneylerde hücre dışı ve hücre içi L-DOPA ve Dopamin derişiminin inkübasyon süresi ile değışimi (Şartlar: ○: % 0.5, ●: % 1.0, □: % 2.5, ■: % 5.0, Δ: % 7.5 v v⁻¹, 5 g L⁻¹ glikoz, 15 g L⁻¹ pepton, 12.5 g L⁻¹ Y.E., 2.5 g L⁻¹ amonyum sülfat, 1.0 g L⁻¹ kalsiyum klorür, pH₀; 7.0; Çalkalama hızı: 150 rpm; Ortam sıcaklığı: 37 °C).

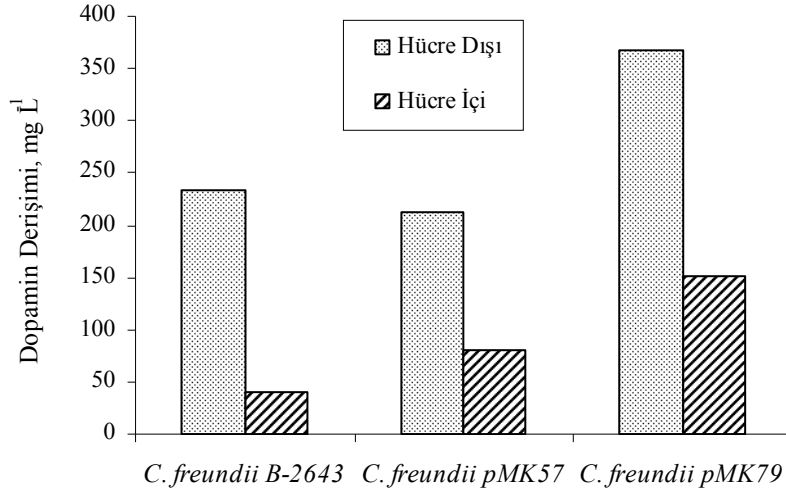


Şekil 6.42. Farklı ekim derişimlerinde *Citrobacter freundii* pMK79 ile yapılan deneylerde pH ve biyokütle derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi (Şartlar: ○: % 0.5, ●: % 1.0, □: % 2.5, ■: % 5.0, △: % 7.5 v v⁻¹, 5 g L⁻¹ glikoz, 15 g L⁻¹ pepton, 12.5 g L⁻¹ Y.E., 2.5 g L⁻¹ amonyum sülfat, 1.0 g L⁻¹ kalsiyum klorür, pH₀: 7.0; Çalkalama hızı: 150 rpm; Ortam sıcaklığı: 37 °C).

Citrobacter freundii pMK57 ve *Citrobacter freundii* pMK79 rekombinant suşları ile *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) yabancı suşun maksimum L-DOPA ve Dopamin üretim düzeyleri sırasıyla Şekil 6.43. ve Şekil 6.44.'de verilmiştir. Hücre dışı ve hücre içi L-DOPA üretimi en yüksek düzeyde (499 mg L⁻¹ ve 250 mg L⁻¹) % 2.5 v v⁻¹ ekim derişimindeki fermantasyon ortamında *Citrobacter freundii* pMK79 rekombinant suşu ile elde edilmiştir. Yabancı ve rekombinant suşlar arasında Dopamin üretim düzeyleri kıyaslandığında hücre dışı ve hücre içi Dopamin üretiminin en yüksek % 2.5 v v⁻¹ ekim derişiminde yine *Citrobacter freundii* pMK79 rekombinant suşun kullanıldığı deneylerde sırasıyla 368 ve 152 mg L⁻¹ olarak elde edilmiştir.



Şekil 6.43. *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ve rekombinant suşları pMK57 ile pMK79'nın glikoz varlığındaki ekim derişiminin incelendiği fermantasyon ortamındaki maksimum hücre dışı ve hücre içi L-DOPA derişimi.

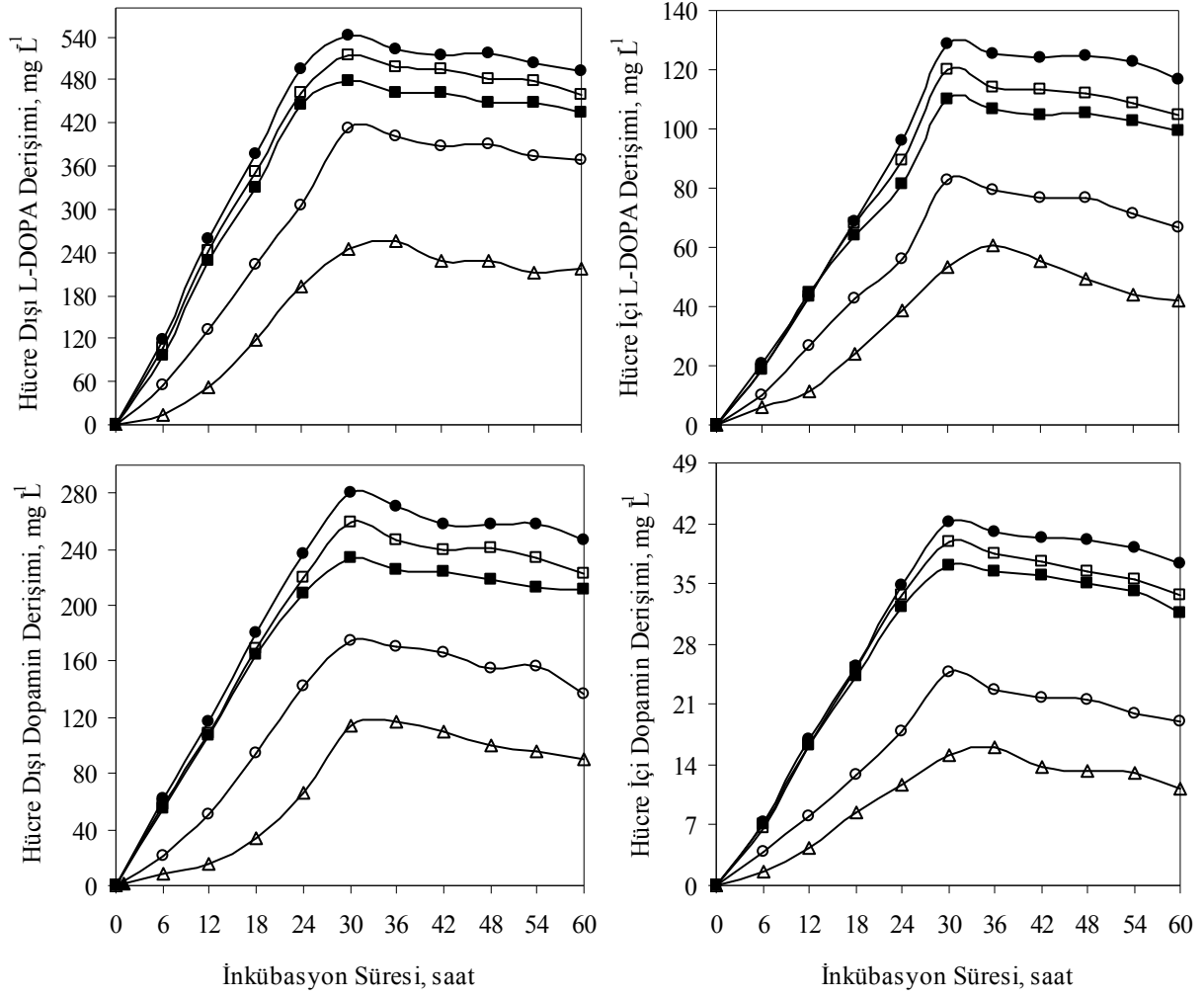


Şekil 6.44. *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ve rekombinant suşları pMK57 ile pMK79'nin glikoz varlığındaki ekim derişiminin incelendiği fermantasyon ortamındaki maksimum hücre dışı ve hücre içi Dopamin derişimi.

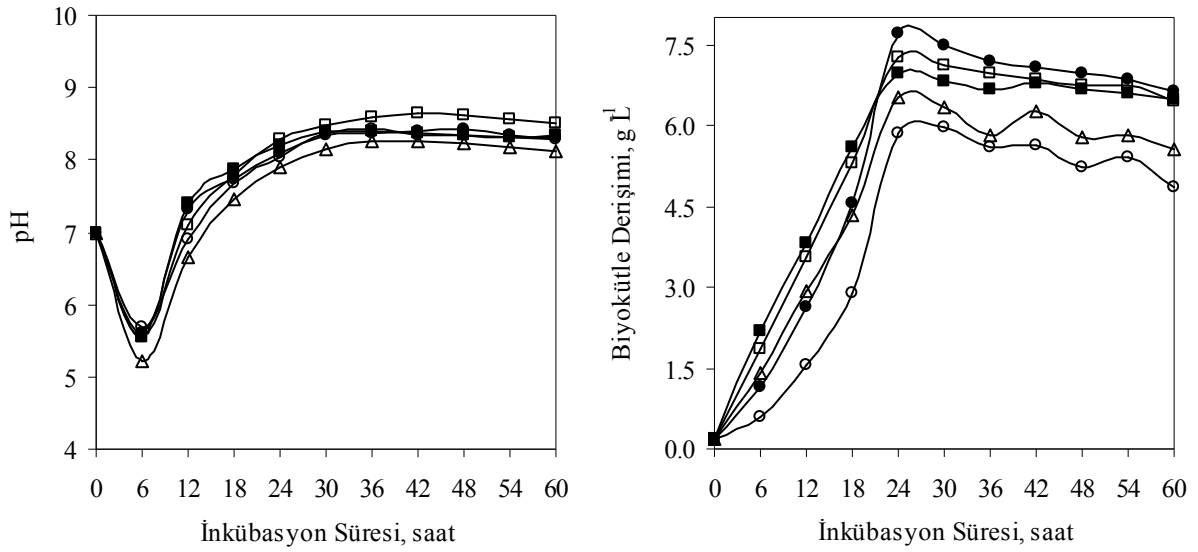
6.1.7. Fermantasyon Sıcaklığının Etkisi

Ortam sıcaklığının *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) yabancı suşu ile L-DOPA ve Dopamin üretimi üzerine etkisinin incelendiği deney sonuçları Şekil 6.45. ve Şekil 6.46.'da verilmiştir. Bu amaçla 27, 30, 33, 37 ve 40 °C ortam sıcaklığında deneyler gerçekleştirilmiştir. Fermantasyon ile metabolitlerin yada enzimlerin maksimum oranda üretilibilmeleri, mikroorganizmaların ideal gelişim sağlayabilmeleri fermantasyon ortam sıcaklığı ile yakından ilişkilendirilmiştir [160-161].

30 ve 33 °C'de yapılan deneylerde elde edilen maksimum L-DOPA ve Dopamin üretimi yakın olmalarına rağmen maksimum L-DOPA ve Dopamin üretimi 30 °C'de yapılan deneylerde elde edilmiştir. Ortam sıcaklığının 30 °C'den 37 °C'ye yükseltilmesiyle maksimum L-DOPA ve Dopamin üretiminde önemli bir düşüş gözlenmiştir. Sıcaklığın 30 °C'den 40 °C ye çıkarılmasıyla ise L-DOPA ve Dopamin üretiminde yaklaşık % 60'lık bir azalmanın meydana geldiği gözlenmiştir. Düşük sıcaklık değerlerinde fermantasyon ortamında çözünen substratın ve diğer nutrientlerin bakteri hücre duvarından difüzyonunun yavaşladığı bu sebeple ürün üretiminin azaldığı, yüksek ortam sıcaklığı değerlerinde ise farklı metabolik yolların oluşması ve sentezlenmesi hedeflenen ürün yerine başka ürünlerin sentezlenmesi durumu ortaya çıkmaktadır [162]. Ayrıca fermantasyon sıcaklığının önceki deneylere göre 37 °C'den 30 °C'ye inmesiyle ortamın buharlaşma hızı düşmüş ve buda fermantasyon prosesine ekstra bir avantaj sağlamıştır. Bundan sonra yapılan deneylerde ortam sıcaklığı 30 °C'de tutulmuştur.

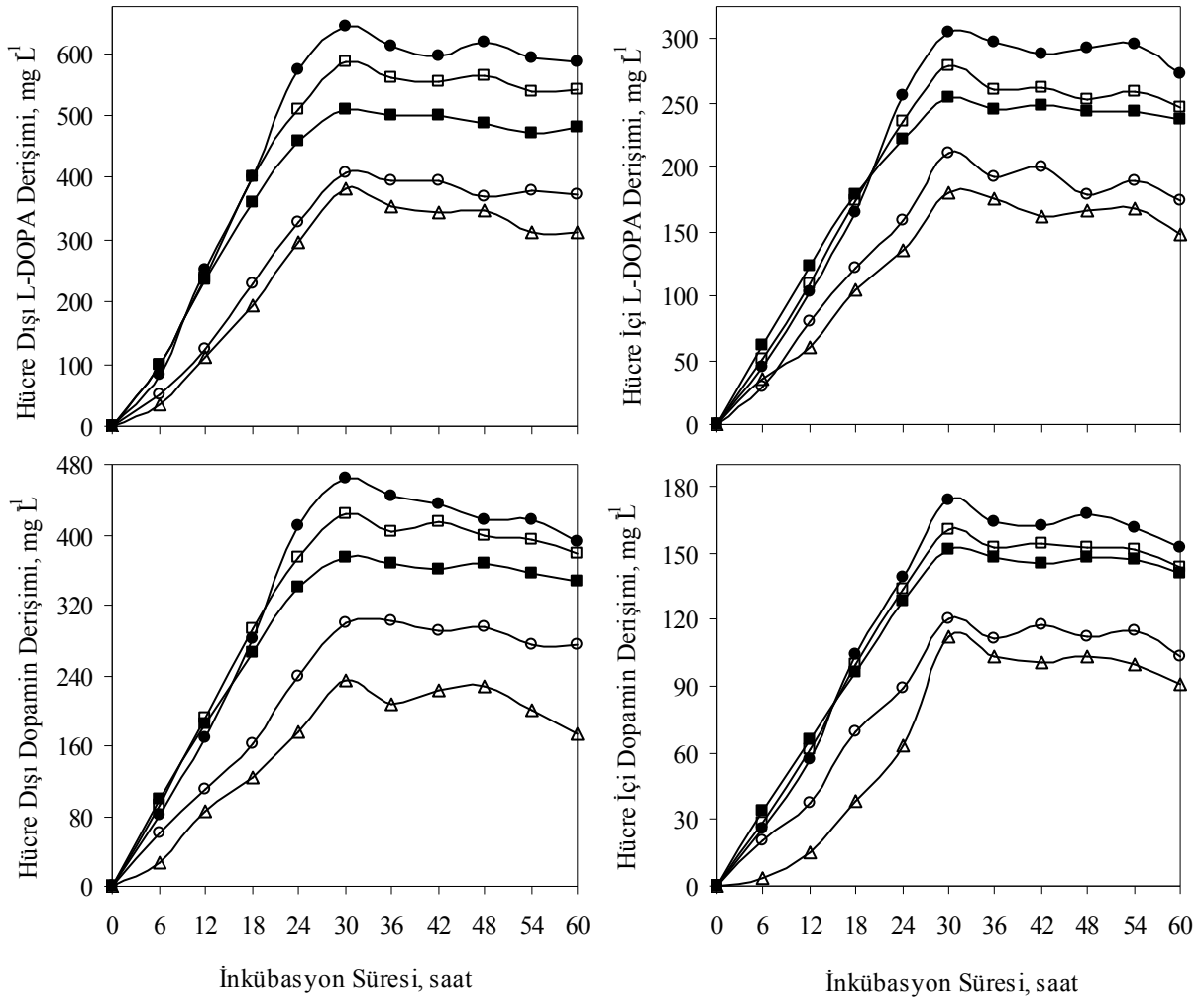


Şekil 6.45. Farklı ortam sıcaklıklarında *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde hücre dışı ve hücre içi L-DOPA ve Dopamin derişiminin inkübasyon süresi ile değışimi (Şartlar: ○: 27 °C, ●: 30 °C, □: 33 °C, ■: 37 °C, △: 40 °C, 1.0 g L⁻¹ glikoz, 12.5 g L⁻¹ pepton, 10.0 g L⁻¹ Y.E., 2.5 g L⁻¹ amonyum sülfat, 1.0 g L⁻¹ kalsiyum klorür, pH_b: 7.0; Ekim oranı: % 2.5 v v⁻¹; Çalkalama hızı: 150 rpm).

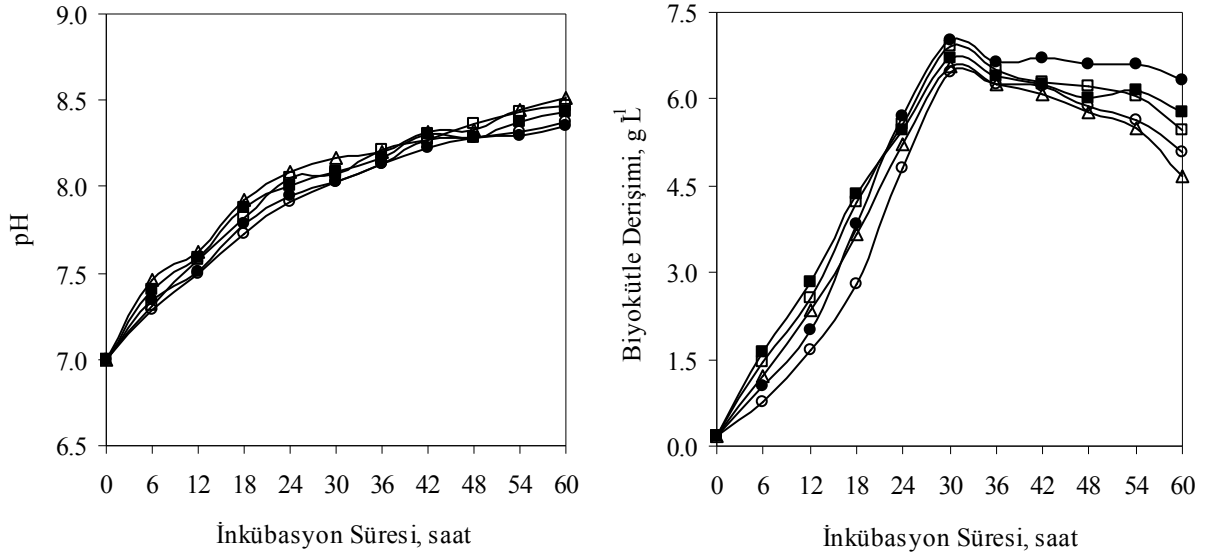


Şekil 6.46. Farklı ortam sıcaklıklarında *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde pH ve biyokütle derişiminin inkübasyon süresi ile değışimi (Şartlar: ○: 27 °C, ●: 30 °C, □: 33 °C, ■: 37 °C, △: 40 °C, 1.0 g L⁻¹ glikoz, 12.5 g L⁻¹ pepton, 10.0 g L⁻¹ Y.E., 2.5 g L⁻¹ amonyum sülfat, 1.0 g L⁻¹ kalsiyum klorür, pH_b: 7.0; Ekim oranı: % 2.5 v v⁻¹; Çalkalama hızı: 150 rpm).

Citrobacter freundii pMK79 rekombinant suşu ile ortam sıcaklığının etkisinin incelendiği deney sonuçları Şekil 6.47. ve Şekil 6.48.'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlardan maksimum L-DOPA ve Dopamin üretiminin 30 °C'de gerçekleştiği görülmektedir. Ulaşılan maksimum hücre dışı L-DOPA ve Dopamin derişimleri sırasıyla 643 mg L⁻¹ ve 465 mg L⁻¹ hücre içi ise 306 mg L⁻¹ ve 174 mg L⁻¹ seviyesindedir. Sonuç olarak, Şekil 6.47. ve Şekil 6.48.'den de görüldüğü gibi biyokütle oluşumunun sıcaklık değişiminden çok fazla etkilenmediği buna karşın üretilen ürün miktarının sıcaklığa oldukça bağlı olduğu görülmektedir. Bu aşamadan sonra incelenen parametrelerde fermentasyon ortam sıcaklığı 30 °C'de tutulmuş ve deneyler bu sıcaklık değerinde gerçekleştirilmiştir.

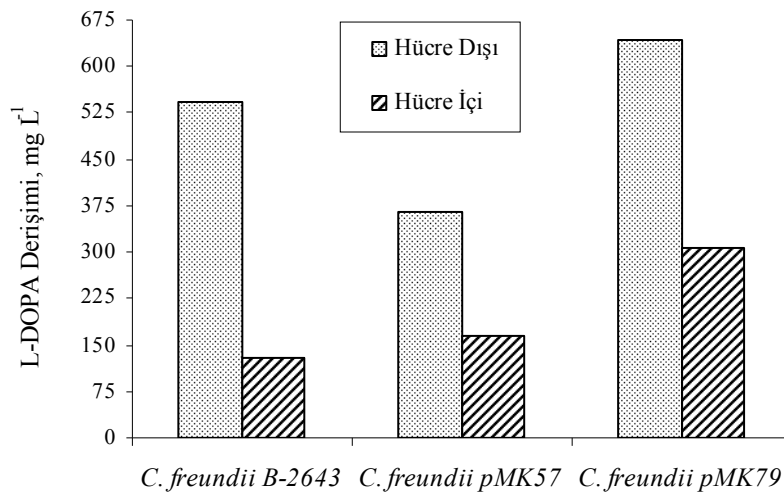


Şekil 6.47. Farklı ortam sıcaklıklarında *Citrobacter freundii* pMK79 ile yapılan deneylerde hücre dışı ve hücre içi L-DOPA ve Dopamin derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi (Şartlar: ○: 27 °C, ●: 30 °C, □: 33 °C, ■: 37 °C, △: 40 °C, 5 g L⁻¹ glikoz, 15 g L⁻¹ pepton, 12.5 g L⁻¹ Y.E., 2.5 g L⁻¹ amonyum sülfat, 1.0 g L⁻¹ kalsiyum klorür, pH_i: 7.0; Ekim oranı: % 5.0 v v⁻¹; Çalkalama hızı: 150 rpm).

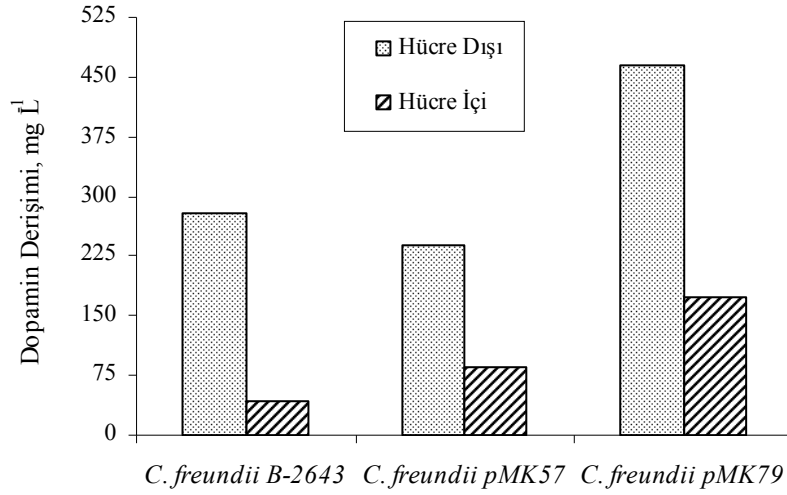


Şekil 6.48. Farklı ortam sıcaklıklarında *Citrobacter freundii* pMK79 ile yapılan deneylerde pH ve biyokütle derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi (Şartlar: ○: 27 °C, ●: 30 °C, □: 33 °C, ■: 37 °C, △: 40 °C, 5 g L⁻¹ glikoz, 15 g L⁻¹ pepton, 12.5 g L⁻¹ Y.E., 2.5 g L⁻¹ amonyum sülfat, 1.0 g L⁻¹ kalsiyum klorür, pH₀: 7.0; Ekim oranı: % 5.0 v v⁻¹; Çalkalama hızı: 150 rpm).

Citrobacter freundii pMK57 ve *Citrobacter freundii* pMK79 rekombinant suşları ile *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) yabancı suşun maksimum L-DOPA ve Dopamin üretim düzeyleri sırasıyla Şekil 6.49. ve Şekil 6.50.'de verilmiştir. Hücre dışı ve hücre içi L-DOPA üretimi en yüksek düzeyde (643 mg L⁻¹ ve 306 mg L⁻¹) 30 °C sıcaklıktaki fermantasyon ortamında *Citrobacter freundii* pMK79 rekombinant suşu ile elde edilmiştir. Yabancı ve rekombinant suşlar arasında Dopamin üretim düzeyleri kıyaslandığında hücre dışı ve hücre içi Dopamin üretiminin en yüksek 30 °C sıcaklıktaki fermantasyon ortamında yine *Citrobacter freundii* pMK79 rekombinant suşun kullanıldığı deneylerde sırasıyla 465 ve 174 mg L⁻¹ olarak elde edilmiştir.



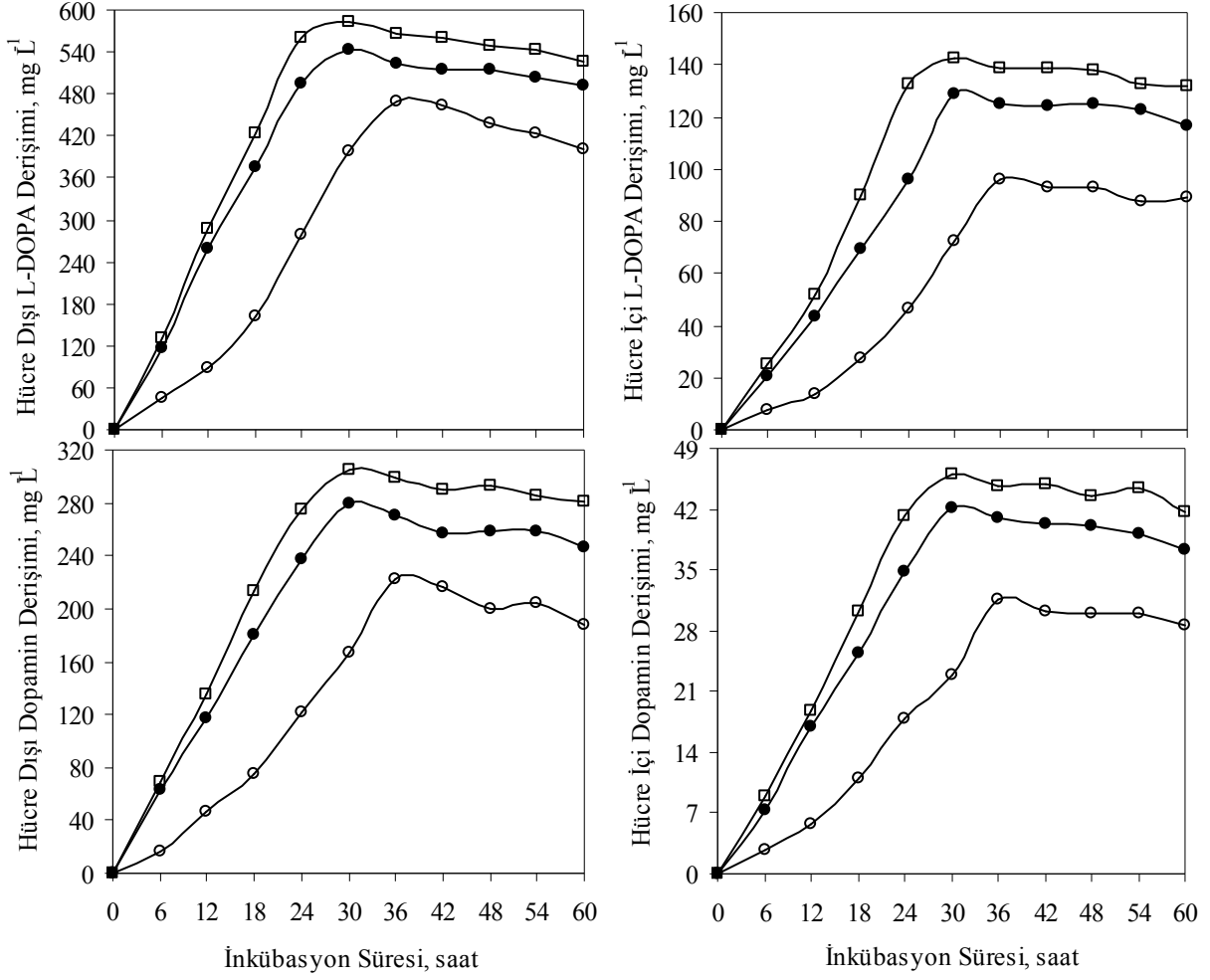
Şekil 6.49. *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ve rekombinant suşları pMK57 ile pMK79'nın glikoz varlığındaki sıcaklığın etkisinin incelendiği fermantasyon ortamındaki maksimum hücre dışı ve hücre içi L-DOPA derişimi.



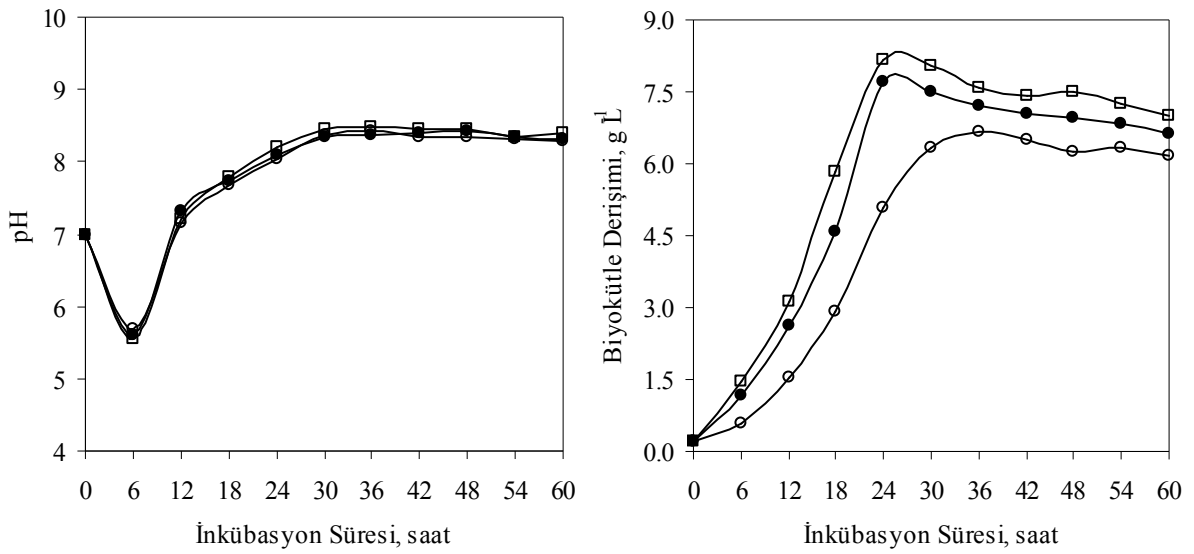
Şekil 6.50. *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ve rekombinant suşları pMK57 ile pMK79'nin glikoz varlığındaki sıcaklığın etkisinin incelendiği fermentasyon ortamındaki maksimum hücre dışı ve hücre içi Dopamin derişimi.

6.1.8. Çalkalama Hızının Etkisi

Aerobik ortamda gelişen mikroorganizmalar ihtiyaç duydukları oksijeni ancak optimum şartlardaki karıştırma ile temin ederler [163]. Özellikle küçük erlenlerde gerçekleştirilen deneylerde iyi bir kütle transferi için, en iyi karıştırma hızının belirlenmesi gerekir. *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) yabancı suşu ile oksijen transferini önemli oranda etkileyen çalkalama hızının incelendiği deney sonuçları Şekil 6.51. ve Şekil 6.52.'da verilmiştir. Çalkalama hızının artışına paralel olarak üretilen L-DOPA ve Dopamin miktarlarında artış gözlemlenmiştir. Bu sonuçlardan hareketle, denenen düşük karıştırma hızlarında oksijen transferinin sınırlandığı yada mikroorganizmanın fermentasyon ortamında bulunan bileşenleri tam olarak kullanamadığı sonucu çıkarılabilir. Maksimum L-DOPA ve Dopamin üretimi sırasıyla 200 rpm'de yapılan deneyde hücre dışı 583 mg L⁻¹ ve 305 mg L⁻¹, hücre içi ise 142 mg L⁻¹ ve 46 mg L⁻¹ düzeyinde elde edilmiştir.

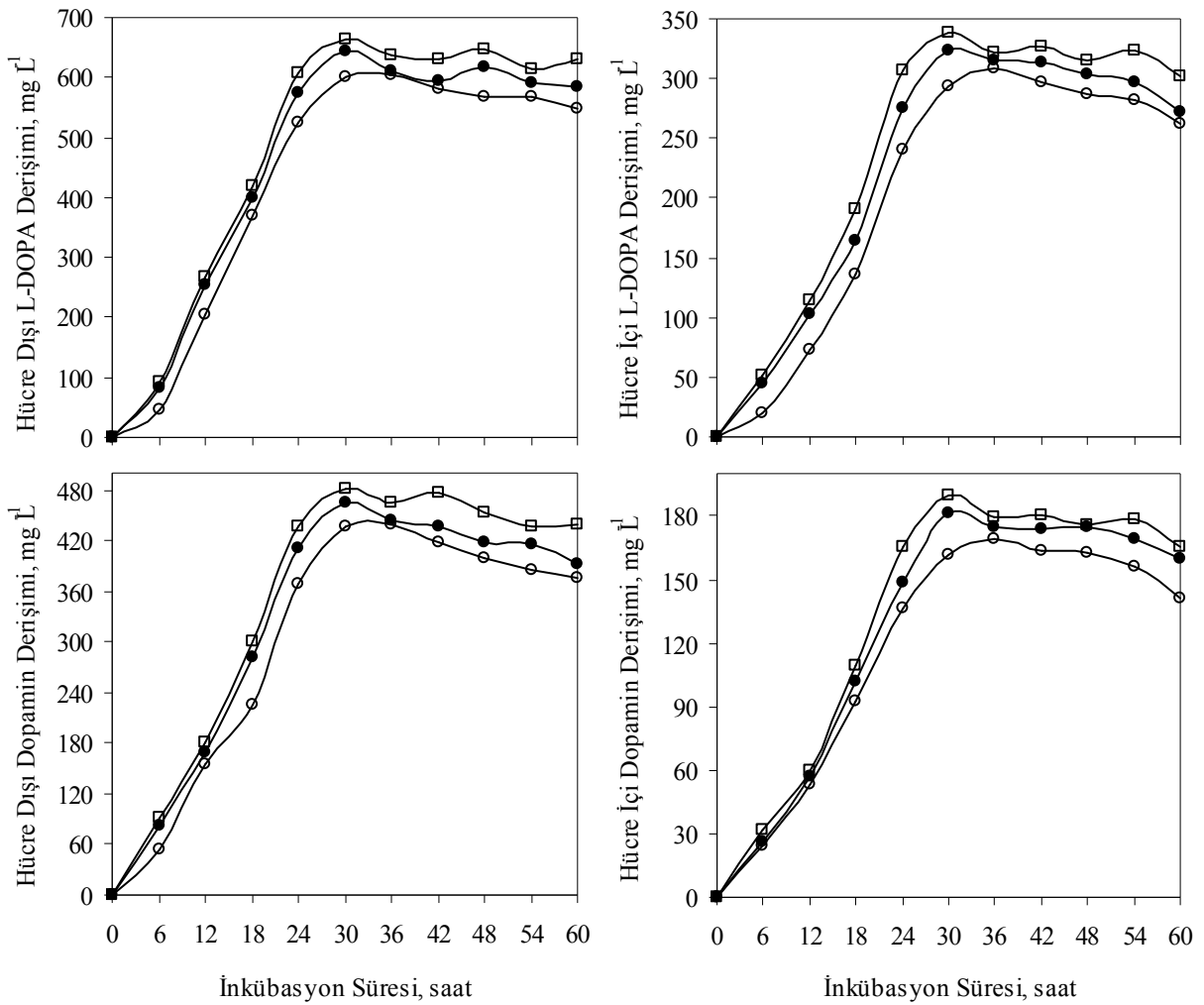


Şekil 6.51. Farklı çalkalama hızlarında *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde hücre dışı ve hücre içi L-DOPA ve Dopamin derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi (Şartlar: ○: 100 rpm, ●: 150 rpm, □: 200 rpm, 1.0 g L⁻¹ glikoz, 12.5 g L⁻¹ pepton, 10.0 g L⁻¹ Y.E., 2.5 g L⁻¹ amonyum sülfat, 1.0 g L⁻¹ kalsiyum klorür, pH₀: 7.0; Ekim oranı: % 2.5 v v⁻¹; Ortam sıcaklığı: 30 °C).

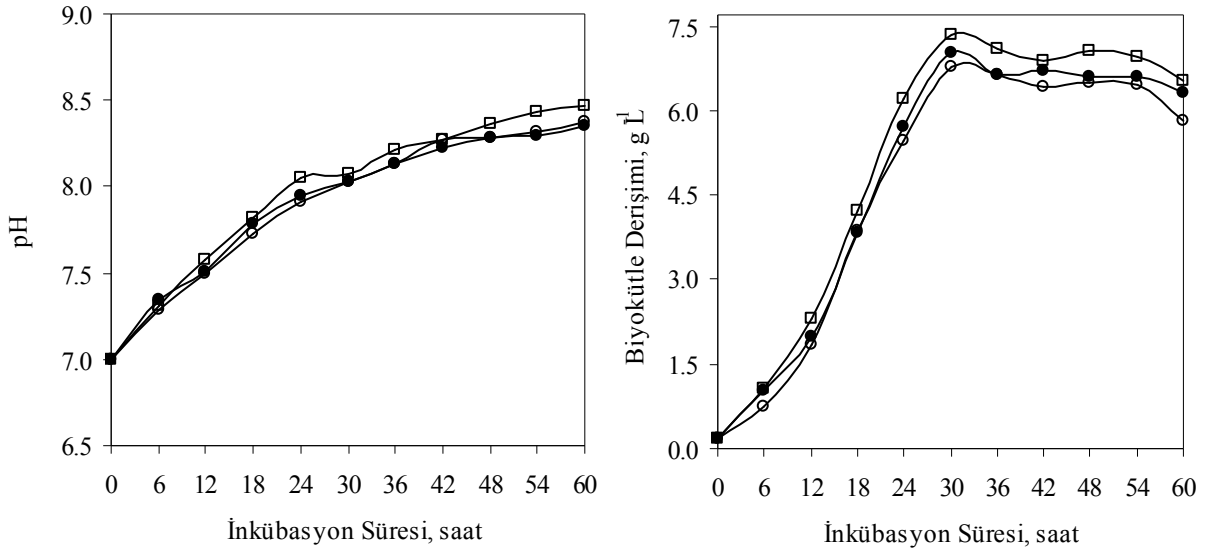


Şekil 6.52. Farklı çalkalama hızlarında *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde pH ve biyokütle derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi (Şartlar: ○: 100 rpm, ●: 150 rpm, □: 200 rpm, 1.0 g L⁻¹ glikoz, 12.5 g L⁻¹ pepton, 10.0 g L⁻¹ Y.E., 2.5 g L⁻¹ amonyum sülfat, 1.0 g L⁻¹ kalsiyum klorür, pH₀: 7.0; Ekim oranı: % 2.5 v v⁻¹; Ortam sıcaklığı: 30 °C).

Citrobacter freundii pMK79 rekombinant suşu ile çalkalama hızının etkisinin incelendiği deney sonuçları Şekil 6.53. ve Şekil 6.54.'de verilmiştir. Çalkalama hızının artışıyla birlikte üretilen L-DOPA ve Dopamin miktarlarında azda olsa bir artış gözlemlenmiştir. Şekil 6.53.'den etkisi incelenen düşük karıştırma hızlarında L-DOPA ve Dopamin *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) yabanil suşuna nazaran daha az etkilendiği görülmektedir. Bu durum yukarıda yapılan oksijen transferinin düşük karıştırma hızlarında sınırlandığı yorumunu güçlendirmekte ve *vgb* geni klonlanan *Citrobacter freundii* pMK79'in ortamda bulunan oksijeni daha etkin kullandığını göstermektedir. Şekil 6.53.'de ve 6.54.'de verilen deney sonuçları bu yorumu doğrulamaktadır. Maksimum L-DOPA ve Dopamin üretimi sırasıyla 200 rpm karıştırma hızında yapılan deneyde hücre dışı 663 mg L⁻¹ ve 481 mg L⁻¹, hücre içi ise 339 mg L⁻¹ ve 190 mg L⁻¹ düzeylerinde elde edilmiştir. Optimum fermentasyon ortamı için karıştırma hızı olarak 200 rpm değeri seçilmiştir.

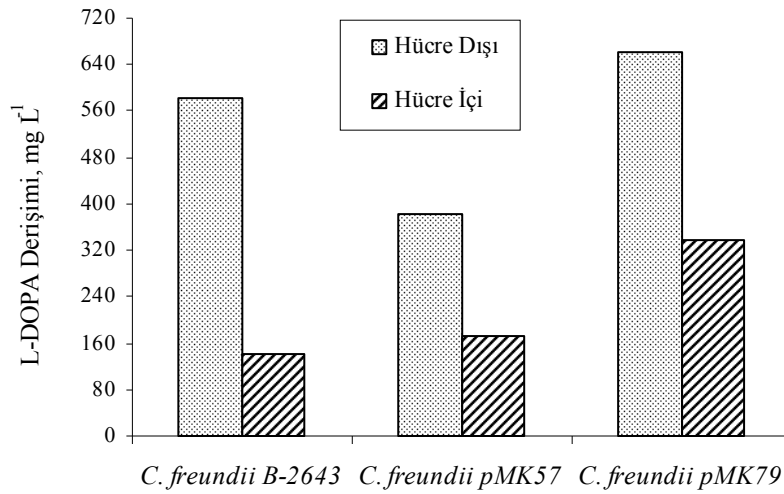


Şekil 6.53. Farklı çalkalama hızlarında *Citrobacter freundii* pMK79 ile yapılan deneylerde hücre dışı ve hücre içi L-DOPA ve Dopamin derişiminin inkübasyon süresi ile değışimi (Şartlar: ○: 100 rpm, ●: 150 rpm, □: 200 rpm, 5 g L⁻¹ glikoz, 15 g L⁻¹ pepton, 12.5 g L⁻¹ Y.E., 2.5 g L⁻¹ amonyum sülfat, 1.0 g L⁻¹ kalsiyum klorür, pH_b: 7.0; Ekim oranı: % 5.0 v v⁻¹; Ortam sıcaklığı: 30 °C).

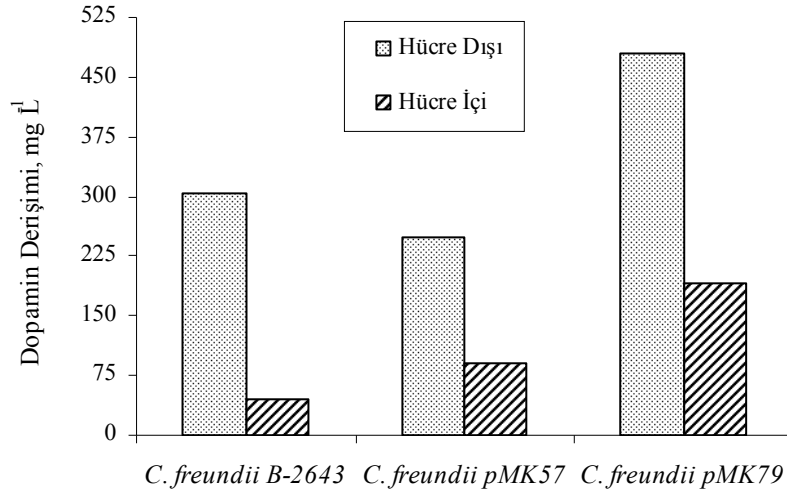


Şekil 6.54. Farklı çalkalama hızlarında *Citrobacter freundii* pMK79 ile yapılan deneylerde pH ve biyokütle değişiminin inkübasyon süresi ile değişimi (Şartlar: ○: 100 rpm, ●: 150 rpm, □: 200 rpm, 5 g L⁻¹ glikoz, 15 g L⁻¹ pepton, 12.5 g L⁻¹ Y.E., 2.5 g L⁻¹ amonyum sülfat, 1.0 g L⁻¹ kalsiyum klorür, pH_b: 7.0; Ekim oranı: % 5.0 v v⁻¹; Ortam sıcaklığı: 30 °C).

Citrobacter freundii pMK57 ve *Citrobacter freundii* pMK79 rekombinant suşları ile *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) yabanıl suşun maksimum L-DOPA ve Dopamin üretim düzeyleri sırasıyla Şekil 6.55. ve Şekil 6.56.'da verilmiştir. Hücre dışı ve hücre içi L-DOPA üretimi en yüksek düzeyde (663 mg L⁻¹ ve 339 mg L⁻¹) 200 rpm çalkalama hızındaki fermantasyon ortamında *Citrobacter freundii* pMK79 rekombinant suşu ile elde edilmiştir. Yabanıl ve rekombinant suşlar arasında Dopamin üretim düzeyleri kıyaslandığında hücre dışı ve hücre içi Dopamin üretiminin en yüksek 30 °C sıcaklıktaki fermantasyon ortamında yine *Citrobacter freundii* pMK79 rekombinant suşun kullanıldığı deneylerde sırasıyla 481 ve 190 mg L⁻¹ olarak elde edilmiştir.



Şekil 6.55. *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ve rekombinant suşları pMK57 ile pMK79'ın glikoz varlığındaki çalkalama hızının etkisinin incelendiği fermantasyon ortamındaki maksimum hücre dışı ve hücre içi L-DOPA derişimi.

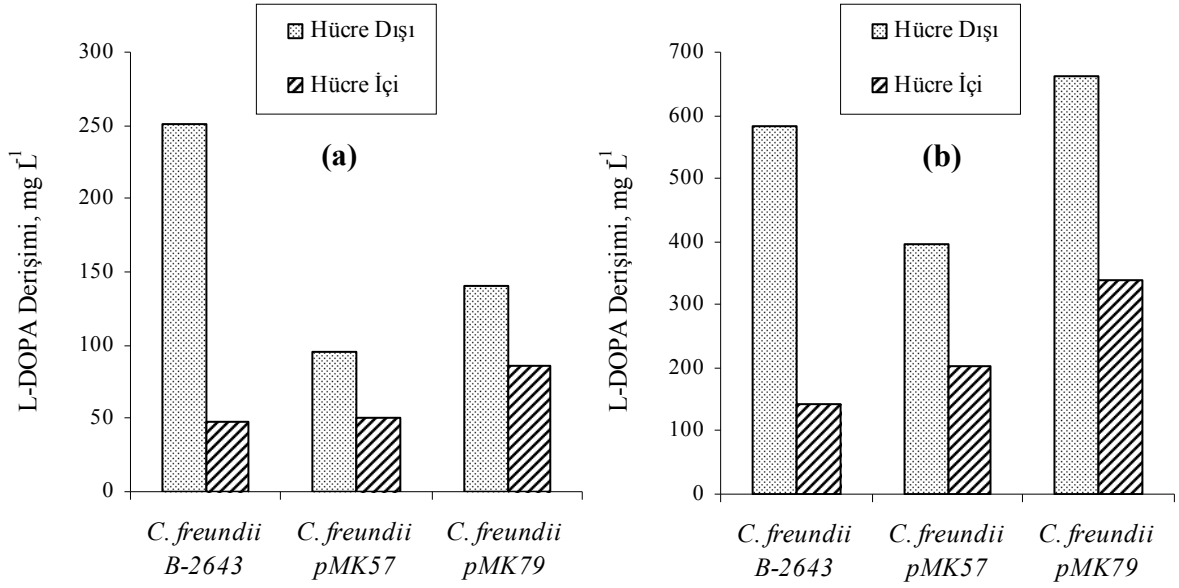


Şekil 6.56. *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ve rekombinant suşları pMK57 ile pMK79'nin glikoz varlığındaki çalkalama hızının etkisinin incelendiği fermantasyon ortamındaki maksimum hücre dışı ve hücre içi Dopamin derişimi.

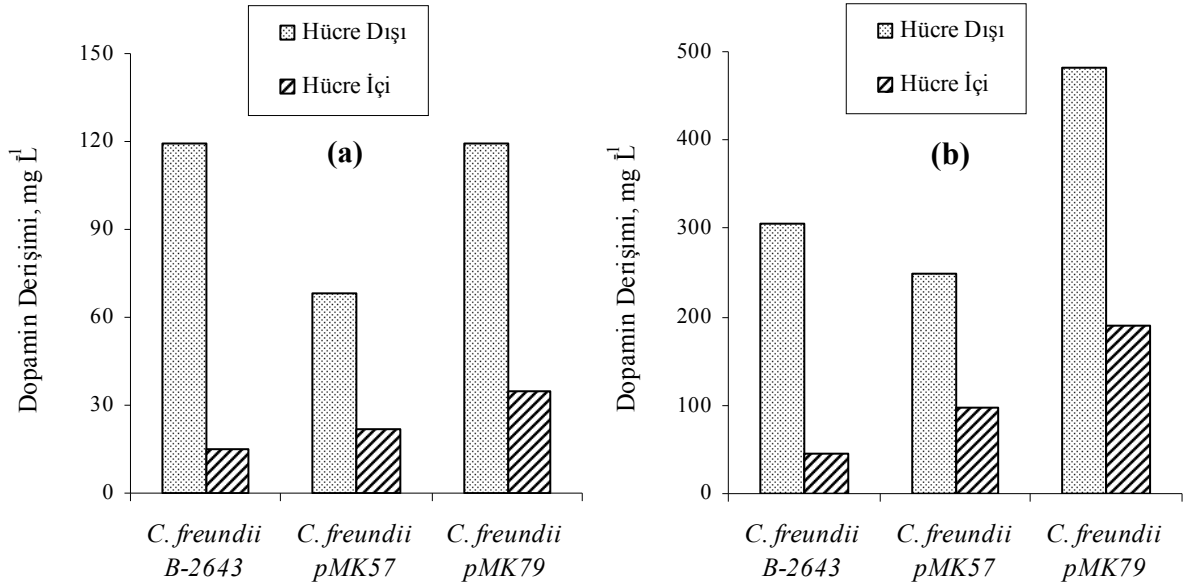
Citrobacter freundii (NRRL B-2643) yabancı suşu ve *vgb* genini bünyesinde barındıran *Citrobacter freundii* pMK79 rekombinant suşu ile erlenlerde yapılan optimizasyon deneyleri sonucunda elde edilen optimum fermantasyon ortamının bileşime ve fermantasyon koşulları Tablo 6.1.'de verilmiştir. Elde edilen maksimum L-DOPA ve Dopamin üretim seviyeleri ise fermantasyon ortamı optimizasyonu öncesi ve sonrası elde edilen sonuçlar ile sırasıyla Şekil 6.57. ve Şekil 6.58.'de karşılaştırılmıştır.

Tablo 6.1. L-DOPA ve Dopamin üretiminde *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) yabancı suşu ve *Citrobacter freundii* pMK79 rekombinant suşu için optimum fermantasyon ortamı bileşenleri derişimleri ve çevresel koşullar.

Ortam	<i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643)	<i>Citrobacter freundii</i> pMK79
Glikoz	1.0 g L ⁻¹	5.0 g L ⁻¹
Pepton	12.5 g L ⁻¹	15.0 g L ⁻¹
Yeast ekstrakt	10.0 g L ⁻¹	12.5 g L ⁻¹
Amonyum sülfat	2.5 g L ⁻¹	2.5 g L ⁻¹
Kalsiyum klorür	1.0 g L ⁻¹	1.0 g L ⁻¹
Başlangıç pH'ı	7.0	7.0
Ekim Derişimi	2.5 v v ⁻¹ , %	5.0 v v ⁻¹ , %
Sıcaklık	30 °C	30 °C
Çalkalama hızı	200 rpm	200 rpm



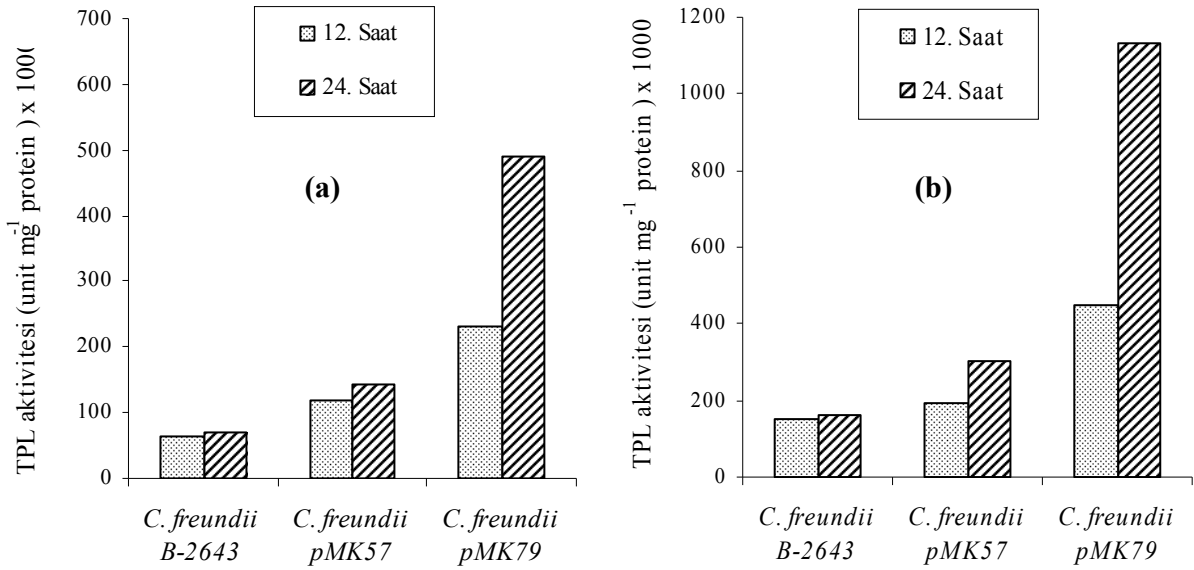
Şekil 6.57. *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) yabancı suşu, rekombinant suşlar *Citrobacter freundii* pMK57 ve *Citrobacter freundii* pMK79'ın L-DOPA üretim seviyelerinin optimizasyon öncesi **(a)** ve optimizasyon sonrası **(b)** karşılaştırılması.



Şekil 6.58. *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) yabancı suşu, rekombinant suşlar *Citrobacter freundii* pMK57 ve *Citrobacter freundii* pMK79'ın Dopamin üretim seviyelerinin optimizasyon öncesi **(a)** ve optimizasyon sonrası **(b)** karşılaştırılması.

6.1.9. Tirozin Fenol Liyaz (TPL) Enzimi Aktivitesi Üzerine Optimizasyonun Etkisi

Çalışmanın her aşamasında takip edilen Tirozin Fenol Liyaz (TPL) enzimi spesifik aktivitesi sonuçlarından bu kısımda sadece optimizasyon öncesi LB ortamında ve optimizasyon sonrası maksimum L-DOPA ve Dopaminin elde edildiği optimum fermantasyon ortamlarındaki aktivite değerleri verilmiştir. LB ortamında ve optimize edilmiş fermantasyon ortamında, *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) yabanıl suşu, rekombinant suşlar *Citrobacter freundii* pMK57 ve *Citrobacter freundii* pMK79'ın 12. ve 24. saatlerdeki hücrelerin TPL spesifik aktivitelerinin değişimi Şekil 6.59.'da verilmiştir. Maksimum TLP aktivitesi değerine çalışılan ve etkisi incelenen bütün ortamlarda 24. saatin sonunda ulaşılmıştır. TLP aktivitesi en yüksek optimizasyon öncesi LB ortamında ve optimizasyon sonrası elde edilen optimum fermantasyon ortamında *vgb* genini taşıyan *Citrobacter freundii* pMK79 rekombinant suşunun kullanıldığı fermantasyon süreçlerinde elde edilmiştir.



Şekil 6.59. *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) yabanıl suşu, rekombinant suşlar *Citrobacter freundii* pMK57 ve *Citrobacter freundii* pMK79'ın Tirozin Fenol Liyaz (TPL) aktivitesi değerlerinin optimizasyon öncesi (a) ve optimizasyon sonrası (b) karşılaştırılması.

6.2. Kesikli Olarak İşletilen Biyoreaktörde L-DOPA ve Dopamin Üretimi

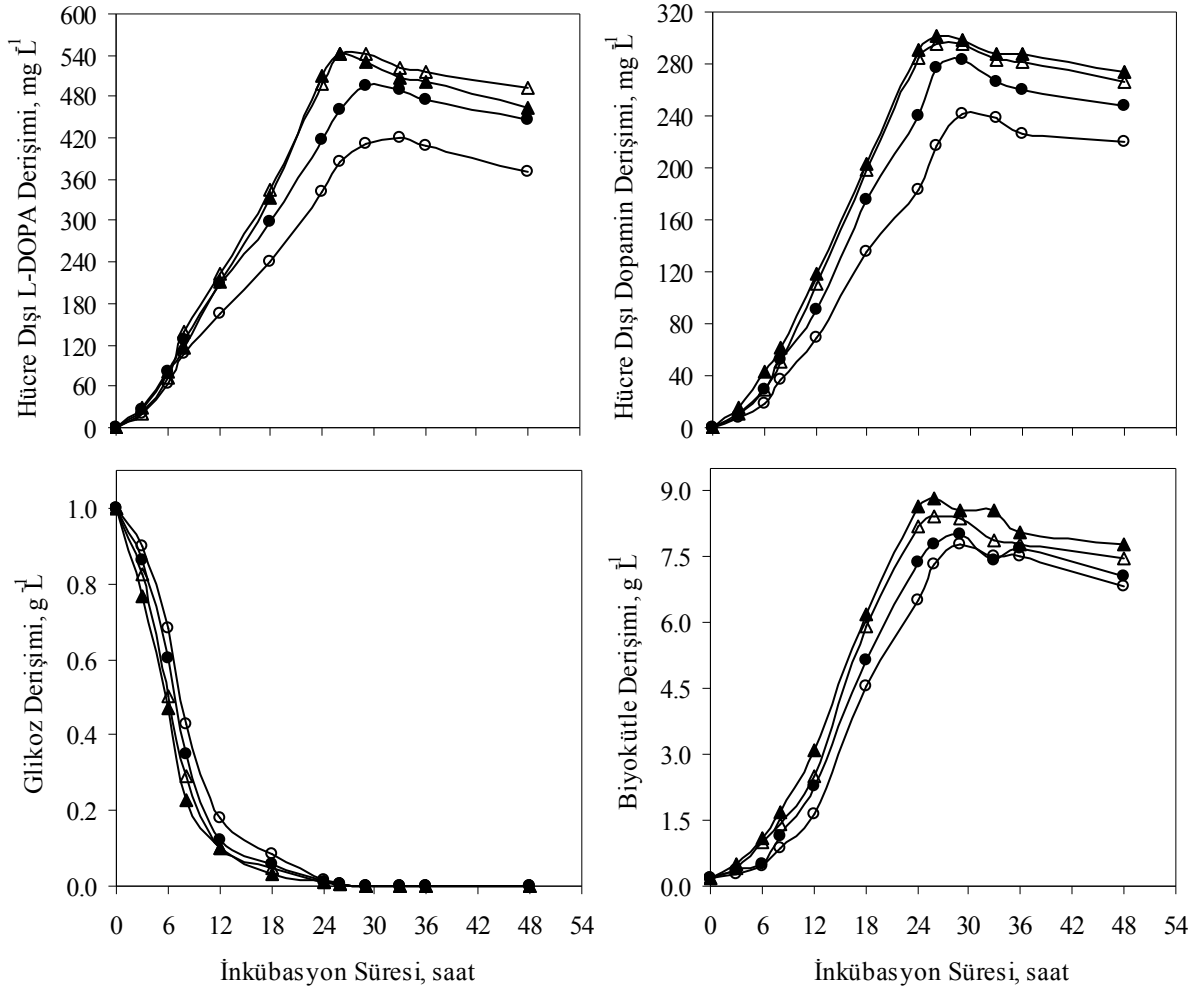
Çalışmanın bu bölümünde, erlenlerde yapılan deneylerden elde edilen optimum sonuçlar ile, kesikli olarak işletilen biyoreaktörde karıştırma hızının, havalandırma hızının ve ölçek büyütmenin *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) yabanıl suşu ve *Citrobacter*

freundii pMK79 rekombinant suşundan L-DOPA ve Dopamin üretimi üzerine etkisi incelenmiştir. Bu amaçla, pH, sıcaklık, karıştırma hızı ve hava akış hızının kontrol edilebildiği 800 ml çalışma hacmindeki 1 L'lik laboratuvar ölçekli bir biyorektör kullanılmıştır.

6.2.1. Karıştırma Hızının Etkisi

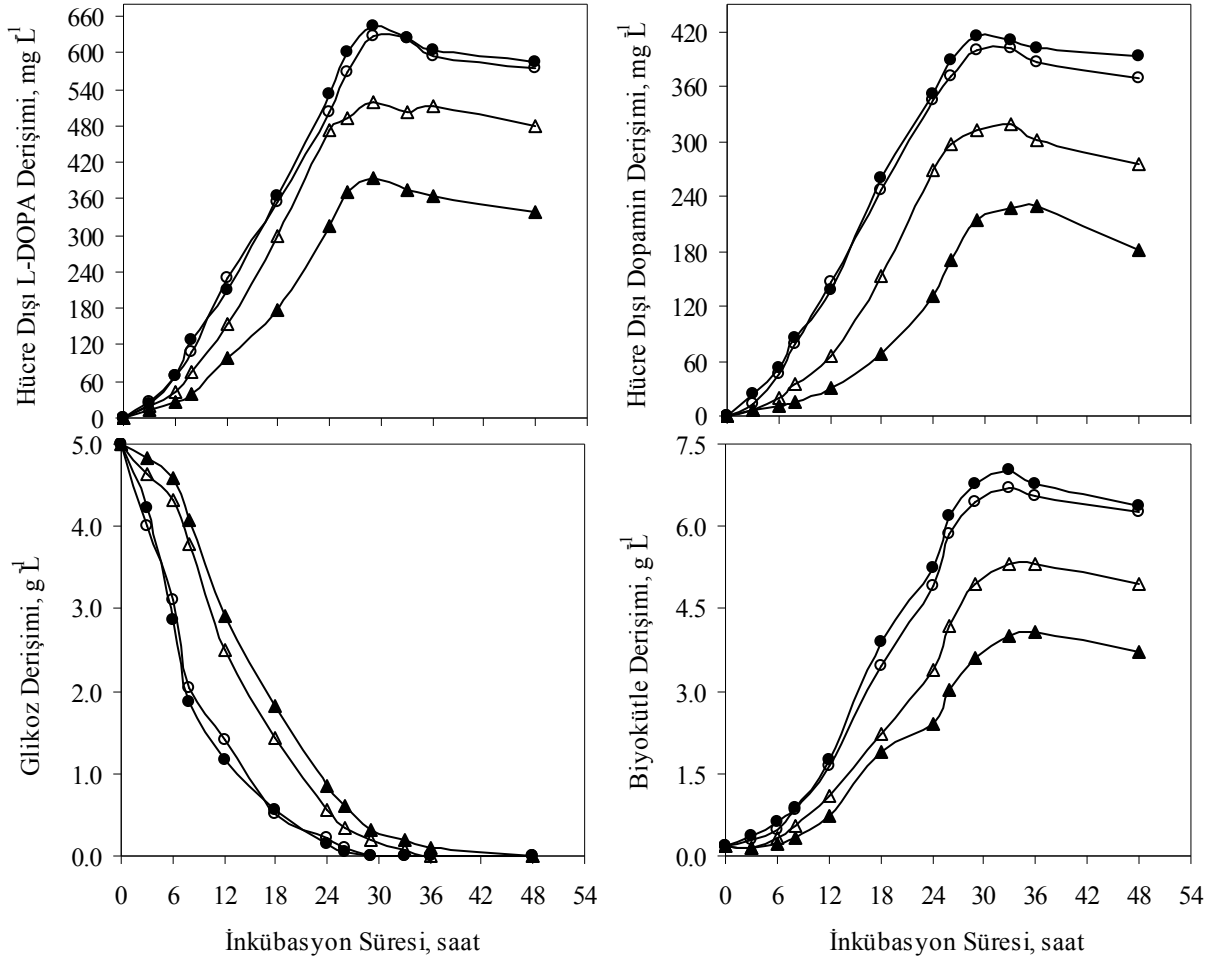
Aerobik proseslerde mikrobiyal hücrelerin metabolik faaliyetlerini sürdürebilmesi için gerekli olan temel girdilerden biri oksijendir. Biyoproses ortamındaki çözünmüş oksijen derişimi ve oksijenin aktarım hızı, mikrobiyal büyüme ve ürün verimini etkilenmektedir. Karıştırmalı biyoreaktörlerde, karıştırma hızı, oksijen aktarımını etkileyen temel parametrelerden biridir [7]. Erlenlerde yapılan deneylerde belirlenen optimum şartlarda (1.0 g L⁻¹ glikoz, 12.5 g L⁻¹ pepton, 10.0 g L⁻¹ Y.E., 2.5 g L⁻¹ amonyum sülfat, 1.0 g L⁻¹ kalsiyum klorür, pH_b: 7.0, Ekim derişimi: % 2.5 v/v, Ortam sıcaklığı: 30 °C), *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) yabanil suşu ile L-DOPA ve Dopamin üretimi üzerine karıştırma hızının etkisini incelemek amacıyla, 300, 400, 500 ve 600 rpm karıştırma hızlarında deneyler gerçekleştirilmiştir. Mikrobiyal ürün üretim ortamından alınan numunelerde, hücre dışı L-DOPA ve Dopamin derişimi, mikroorganizma derişimi, ve substrat derişimlerinin zamanla değişimi belirlenmiş ve sonuçlar Şekil 6.60.'da verilmiştir.

Şekil 6.60.'da görüldüğü gibi, karıştırma hızının artmasıyla *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) tarafından üretilen hücre dışı L-DOPA ve Dopamin düzeyi 500 rpm karıştırma hızı değerine kadar artmıştır. Denenen en yüksek karıştırma hızı değeri olan 600 rpm karıştırma hızında ise L-DOPA ve Dopamin derişiminde anlamlı bir değişim gözlemlenmemiştir. 500 rpm ve 600 rpm karıştırma hızlarında maksimum L-DOPA ve Dopamin üretimine 26. saat sonunda ulaşılırken daha düşük karıştırma hızlarında (300 rpm ve 400 rpm) ise 30. saat sonunda ulaşılmıştır. Ulaşılan maksimum L-DOPA ve Dopamin derişimleri sırasıyla 543 mg L⁻¹ ve 302 mg L⁻¹ olarak ölçülmüştür. Etkisi incelenen dört karıştırma hızında da mikroorganizma derişimi yaklaşık 24-33 saat sonunda durağan evreye ulaşmıştır. L-DOPA ve Dopamin üretim seviyeleri, mikrobiyal büyümeye paralel bir davranış göstermiştir. Substrat olarak kullanılan glikoz tüketilmesinde, karıştırma hızının artmasıyla göreceli bir değişim olmamıştır. Bundan sonra incelenen havalandırma hızının etkisi deneylerinde karıştırma hızı 500 rpm olarak alınmıştır.



Şekil 6.60. Kesikli olarak işletilen biyoreaktörde farklı karıştırma hızlarında *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde hücre dışı L-DOPA, Dopamin, biyokütle ve glikoz derişimlerinin zamanla değışimi (Şartlar: ○: 300 rpm, ●: 400 rpm, △: 500 rpm, ▲: 600 rpm Karıştırma hızı, 1.0 g L⁻¹ glikoz, 12.5 g L⁻¹ pepton, 10.0 g L⁻¹ Y.E., 2.5 g L⁻¹ amonyum sülfat, 1.0 g L⁻¹ kalsiyum klorür, pH_b: 7.0; Ekim oranı: % 2.5 v v⁻¹; Ortam sıcaklığı: 30 °C; Hava giriş hızı: 0.6 vvm).

Citrobacter freundii pMK79 ile erlenlerde yapılan deneylerde belirlenen optimum ortam ve fermentasyon şartlarında (5 g L⁻¹ glikoz, 15 g L⁻¹ pepton, 12.5 g L⁻¹ Y.E, 2.5 g L⁻¹ amonyum sülfat, 1.0 g L⁻¹ kalsiyum klorür, pH_b: 7.0, Ekim oranı: % 5.0 v/v, Ortam sıcaklığı: 30 °C) L-DOPA ve Dopamin üretimi üzerine karıştırma hızının etkisini incelenmek amacıyla, kesikli olarak işletilen biyoreaktörde 300, 400, 500 ve 600 rpm karıştırma hızlarında deneyler gerçekleştirilmiştir. Alınan örneklerde, hücre dışı L-DOPA ve Dopamin derişimi, mikroorganizma derişimi, ve substrat derişimlerinin zamanla değışimi belirlenmiş ve sonuçlar Şekil 6.61.'de verilmiştir.



Şekil 6.61. Kesikli olarak işletilen biyoreaktörde farklı karıştırma hızlarında *Citrobacter freundii* pMK79 ile yapılan deneylerde hücre dışı L-DOPA, Dopamin, biyokütle ve glikoz derişiminin zamanla değışimi (Şartlar: ○: 300 rpm, ●: 400 rpm, Δ: 500 rpm, ▲: 600 rpm Karıştırma hızı, 5.0 g L⁻¹ glikoz, 15.0 g L⁻¹ pepton, 12.5 g L⁻¹ Y.E., 2.5 g L⁻¹ amonyum sülfat, 1.0 g L⁻¹ kalsiyum klorür, pH_b: 7.0; Ekim oranı: % 5.0 v v⁻¹; Ortam sıcaklığı: 30 °C; Hava giriş hızı: 0.6 vvm).

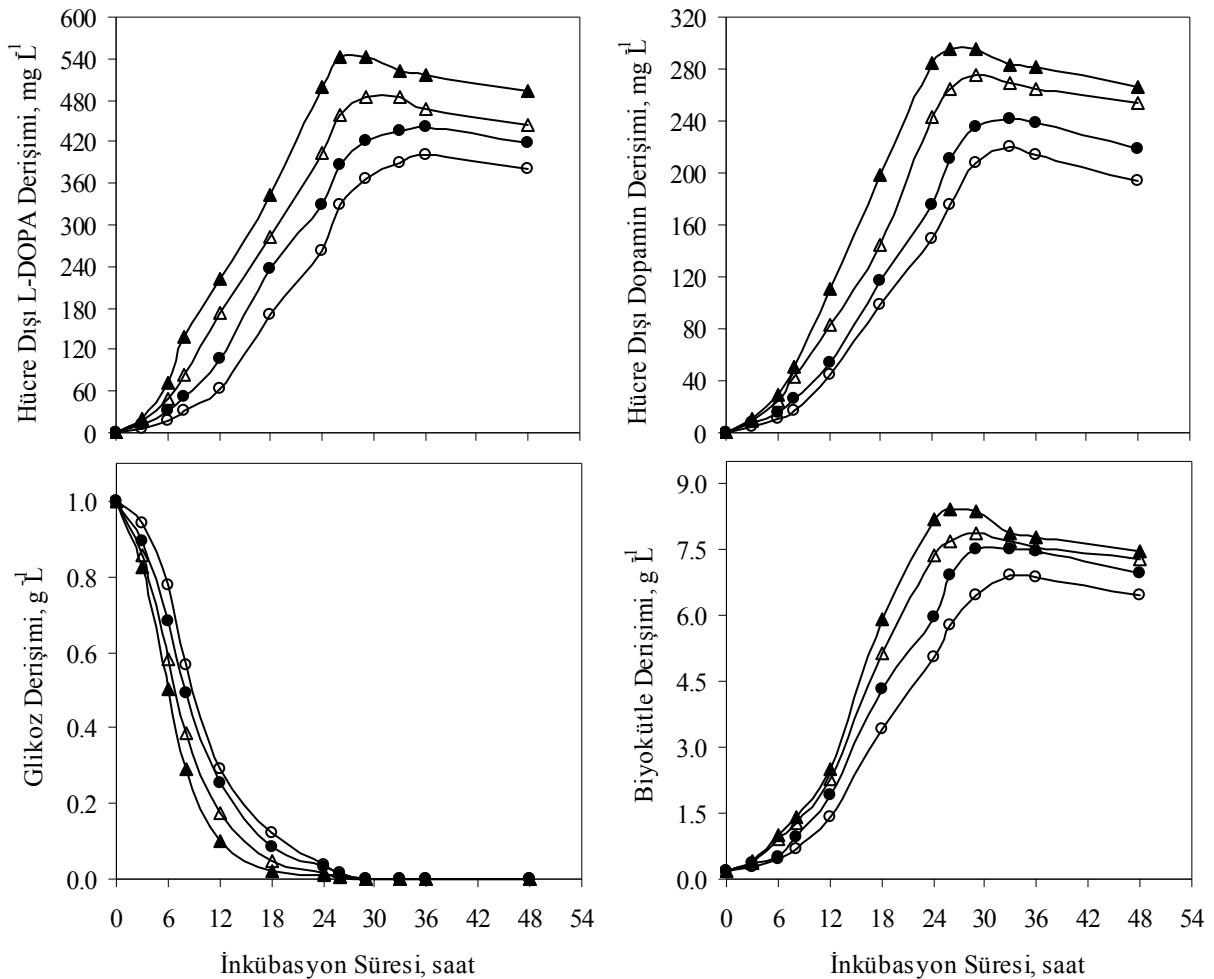
Şekil 6.61.'de karıştırma hızının 300 rpm'den 400 rpm'e çıkarılmasıyla L-DOPA ve Dopamin üretiminde azda olsa bir artışın olduğu görülmekle birlikte daha yüksek karıştırma hızlarında ise üretim seviyelerinde bir azalma görülmektedir. Yüksek karıştırma hızlarında L-DOPA ve Dopamin üretim seviyelerindeki azalmanın yüksek karıştırma hızlarında oluşan stres ve heterojen karıştırmadan kaynaklandığı düşünülmektedir [164].

6.2.2. Hava Giriş Hızının Etkisi

Oksijenin girdi olarak kullanıldığı aerobik proseslerde mikrobiyal hücreler solunum, çoğalma, ürün sentezi gibi metabolik faaliyetlerini sürdürebilmek için temel girdilerden biri olan oksijene ihtiyaç duyarlar. Bu nedenle çoğalma ve üretim ortamındaki çözünmüş oksijen derişimi ve oksijenin aktarım hızı önemlidir. Oksijenin aktarımının eksikliği ya da fazlalığı ürün verimi ve seçimliliğini etkiler. Aerobik üretim proseslerinde mikrobiyal hücrelere oksijenin aktarım hızı, biyolojik dönüşüm hızının belirlenmesinde

önemli bir kısıtlayıcı etkidir. Çünkü biyokimyasal reaksiyonların hızları, üretim ortamına aktarılan oksijenin aktarım hızına oranla genel olarak daha yüksektir [165].

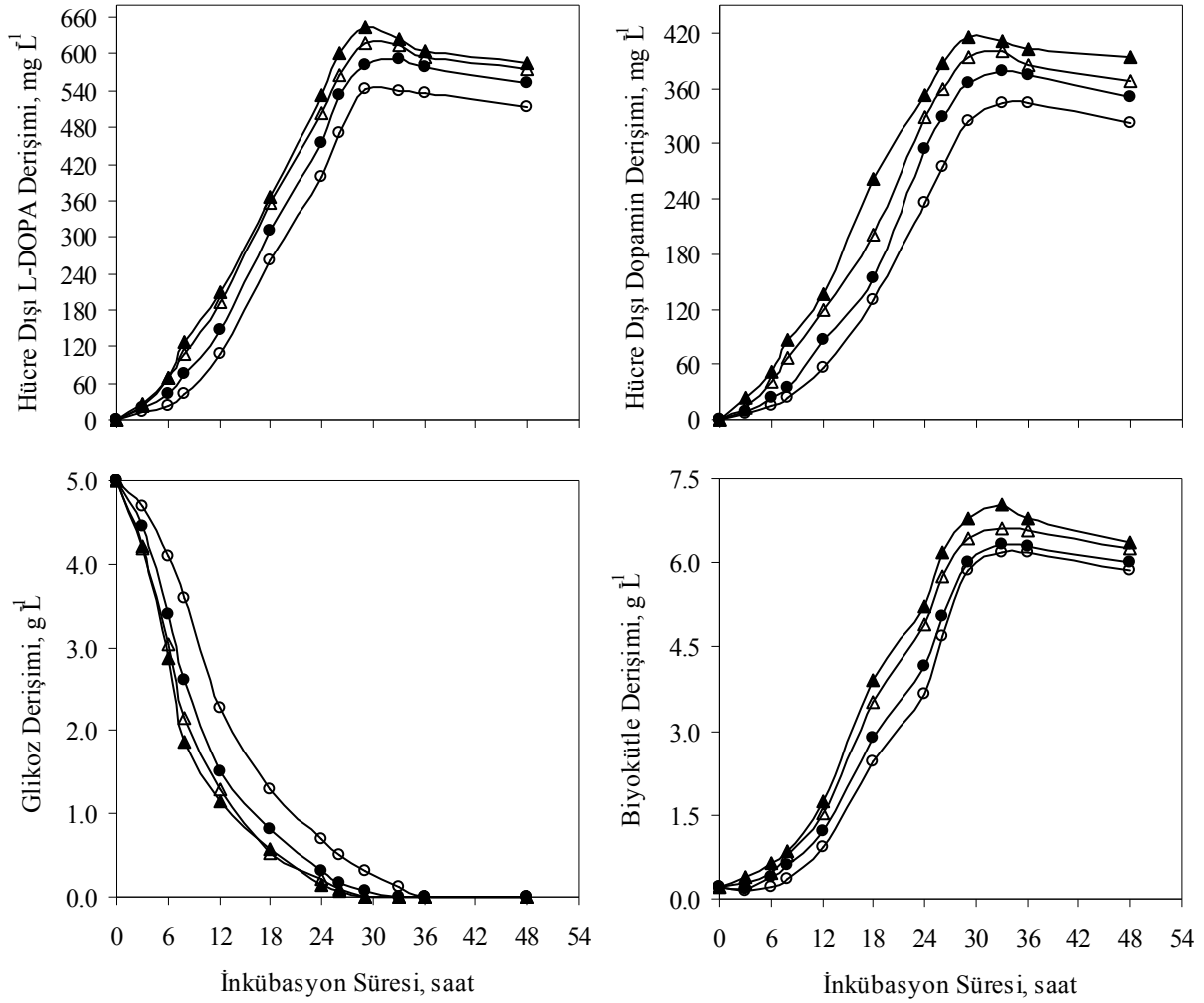
Biyoproses işletim parametrelerinden hava giriş hızının, L-DOPA ve Dopamin üretimi için en uygun değerinin belirlenmesi amacıyla *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ile biyoreaktörde kesikli sistemde, 0.3, 0.4, 0.5 ve 0.6 vvm hava giriş hızlarında deneyler gerçekleştirilmiştir. Hava giriş hızı ile hücre dışı L-DOPA ve Dopamin üretimi, mikroorganizma derişimi ve substrat derişiminin değişimi Şekil 6.62.'de verilmiştir. L-DOPA ve Dopamin üretiminin kesikli olarak işletilen biyoreaktöre beslenen hava miktarı ile arttığı, maksimum L-DOPA üretiminin 0.6 vvm hava giriş hızında 543 mg L^{-1} olduğu ve maksimum Dopamin üretiminin ise yine 0.6 vvm hava giriş hızında 296 mg L^{-1} olduğu belirlenmiştir. Maksimum mikroorganizma derişiminin, 0.6 vvm hava giriş hızında, 8.40 g L^{-1} olduğu gözlenmiştir.



Şekil 6.62. Kesikli olarak işletilen biyoreaktörde farklı hava giriş hızlarında *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde hücre dışı L-DOPA, Dopamin, biyokütle ve glikoz derişiminin zamanla değişimi (Şartlar: ○: 0.3 vvm, ●: 0.4 vvm, Δ: 0.5 vvm, ▲: 0.6 vvm Havalandırma hızı, 1.0 g L^{-1} glikoz, 12.5 g L^{-1} pepton, 10.0 g L^{-1} Y.E., 2.5 g L^{-1} amonyum sülfat, 1.0 g L^{-1} kalsiyum klorür, pH_b: 7.0; Ekim oranı: % 2.5 v v⁻¹; Ortam sıcaklığı: 30 °C; Karıştırma hızı: 500 rpm).

Citrobacter freundii (NRRL B-2643) için dört hava giriş hızında da 24-30. saat sonunda durağan evreye ulaştığı Şekil 6.62.'den görülmektedir. Denenen en yüksek hava giriş hızında L-DOPA ve Dopaminin en yüksek değerlerde elde edilmesi ve artan hava giriş hızına bağlı olarak artışı *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643)'den L-DOPA ve Dopamin üretiminde yüksek oksijen gerekliliğini ortaya koymuştur. Elde edilen bu sonuçlar aynı zamanda L-DOPA ve Dopamin gibi iki önemli nörotransmitterin üretimlerinin fermantasyon ortamındaki oksijen seviyesi ile yakından ilişkili olduğu gerçeğini deneysel olarak desteklemektedir.

Citrobacter freundii pMK79 rekombinant suşu ile biyoreaktörde kesikli sistemde, 0.3, 0.4, 0.5 ve 0.6 vvm hava giriş hızlarında deneyler gerçekleştirilmiştir. Hava giriş hızı ile hücre dışı L-DOPA ve Dopamin üretimi, mikroorganizma derişimi ve substrat derişiminin değışimi Şekil 6.63.'de verilmiştir. Hava giriş hızının artışına paralel olarak ürün üretim düzeyinin arttığı şekilden görülmektedir. Maksimum L-DOPA üretiminin 0.6 vvm hava giriş hızında 29. saatte 643 mg L⁻¹ olduğu ve maksimum Dopamin üretiminin ise yine 0.6 vvm hava giriş hızında ve 29. saatte 415 mg L⁻¹ olduğu belirlenmiştir. Hava besleme hızının 0.4, 0.5 ve 0.6 vvm olduğu değerlerde gerçekleştirilen deney sonuçlarına bakıldığında metabolit üretim seviyelerinin çok fazla etkilenmediği ancak 0.3 vvm hava besleme hızı değerinde ise L-DOPA ve Dopamin üretim seviyelerinin yaklaşık %25-35 düzeyinde bir düşüşün olduğu görülmektedir. L-DOPA ve Dopamin üretim düzeylerinin 0.4, 0.5, 0.6 vvm hava besleme hızında birbirine yakın oluşu *Citrobacter freundii* pMK79'ın *Vitreoscilla* hemoglobini (VHb) genini taşıyan (*vgb*⁺) rekombinant suşu olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu sebeple rekombinant mikroorganizmanın daha düşük hava besleme hızlarında neredeyse aynı ürün üretimini gerçekleştirmesi, eksojen bir oksijen kaynağı tarafından sağlanan oksijenin düşük olduğu durumlarda *Vitreoscilla* hemoglobin sentezinin arttığı ve bağlandığı oksijenin ökaryotik hücrelerde olduğu gibi serbest bıraktığı belirtilmektedir [90, 103].



Şekil 6.63. Kesikli olarak işletilen biyoreaktörde farklı hava giriş hızlarında *Citrobacter freundii* pMK79 ile yapılan deneylerde hücre dışı L-DOPA, Dopamin, biyokütle ve glikoz derişiminin zamanla değışimi (Şartlar: ○: 0.3 vvm, ●: 0.4 vvm, △: 0.5 vvm, ▲: 0.6 vvm Havalandırma hızı, 5.0 g L⁻¹ glikoz, 15.0 g L⁻¹ pepton, 12.5 g L⁻¹ Y.E., 2.5 g L⁻¹ amonyum sülfat, 1.0 g L⁻¹ kalsiyum klorür, pH_b: 7.0; Ekim oranı: % 5.0 v v⁻¹; Ortam sıcaklığı: 30 °C; Karıştırma hızı: 400 rpm).

6.2.3. Oksijen Aktarımı Etkisi

Aerobik fermentasyon proseslerinde mikrobiyal hücreye oksijen aktarımı, metabolik akıların değışmesi ve metabolik yol izlerinin etkileneşmesi nedeniyle ürün verimini ve seçimliliğini etkileyen parametrelerdendir. Bu nedenle mikroorganizmanın fizyolojisiyle ilgili biyoreaktör performansının belirlenmesi için mikroorganizma oksijen ihtiyacının aydınlatılması gerekmektedir. Genel olarak, metabolik yol izlerinin ve hücre çoğalma profillerinin analizine göre bazı biyoprosesler yüksek oksijen aktarım hızı gerektirirken, bazı biyoprosesler için de düşük oksijen aktarım hızı seçilmesi gerekmektedir [166]. Karıştırmalı biyoreaktörlerde hava giriş hızı ve karıştırma hızı önemli

biyoreaktör işletim parametreleridir. Bölüm 6.2.1 ve 6.2.2’de bu parametrelerin etkileri ayrıntılı bir şekilde sunulmuştur.

Karıştırma hızı ve hava giriş hızı gibi temel biyoproses işletim parametrelerinin farklı değerlerinde dinamik oksijen aktarım deneyleri gerçekleştirilerek, oksijen aktarım parametreleri; sıvı faz hacimsel kütle aktarım katsayısı (k_{La}) ve mikroorganizma oksijen tüketim hızı (r_0), kesikli olarak işletilen biyoreaktörde *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ve *Citrobacter freundii* pMK79 için farklı kalma sürelerinde hesaplanmıştır. Karıştırma hızı ve hava giriş hızıyla, sıvı faz hacimsel kütle aktarım katsayısı ve mikroorganizma oksijen tüketim hızı’nın değişimleri sırasıyla *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) için Tablo 6.2. ve 6.3.’de *Citrobacter freundii* pMK79 için ise Tablo 6.4. ve 6.5.’de verilmiştir.

Tablo 6.2. ve Tablo 6.4.’de görüldüğü gibi, karıştırma hızının artmasıyla k_{La} ve r_0 değerleri de artış göstermiştir. r_0 değerindeki artış, mikrobiyal büyümeye paralellik göstermektedir. Oksijen tüketim hızı, mikroorganizmanın üstel büyüme fazında en yüksek değere ulaşmış, daha sonra da düşüş göstermiştir. Biyoproseslerde, mikroorganizma derişimindeki artışla oksijen tüketim hızı’nın artması beklenen bir sonuçtur. Literatürde yapılan birçok çalışmada, mikroorganizmanın üstel büyüme fazında oksijen tüketim hızı artmış, durağan fazda ve karbon kaynağının tükendiği durumlarda ise bu değer azalma göstermiştir [7, 167-168].

Havalandırma hızının, sıvı faz kütle aktarım katsayısı ve mikroorganizma oksijen tüketim hızı değerlerine etkisini değerlendirmek amacıyla oluşturulan Tablo 6.3. ve 6.5.’den görüldüğü gibi, havalandırma hızının artmasıyla k_{La} ve r_0 değerlerinde genel olarak artış görülmüştür. Elde edilen sonuçların ışığında, *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ve *Citrobacter freundii* pMK79’den L-DOPA ve Dopamin üretiminde, yüksek karıştırma ve havalandırma hızının en uygun oksijen aktarım koşullarını oluşturduğu sonucu çıkarılabilir.

Tablo 6.2. *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) yabancı suşu için kesikli olarak işletilen biyoreaktörde farklı karıştırma hızlarında k_{La} ve r_o değerlerinin kalma süresi ile değişimi.

Karıştırma Hızı (rpm)	Zaman (st)	$r_o \times 10^4$ (mol m ⁻³ s ⁻¹)	k_{La} (s ⁻¹)
300 rpm 0.6 vvm	3	10.4	0.026
	6	11.8	0.024
	8	16.3	0.027
	12	27.0	0.023
	18	33.3	0.031
	24	39.5	0.028
	26	38.1	0.024
	29	40.4	0.028
	33	31.1	0.026
	36	25.9	0.027
	48	15.3	0.025
400 rpm 0.6 vvm	3	12.6	0.034
	6	14.3	0.036
	8	19.9	0.033
	12	32.9	0.036
	18	40.5	0.032
	24	47.8	0.037
	26	48.1	0.040
	29	42.4	0.046
	33	33.4	0.041
	36	28.8	0.035
	48	16.4	0.031
500 rpm 0.6 vvm	3	14.5	0.048
	6	17.1	0.053
	8	23.1	0.055
	12	39.5	0.058
	18	48.6	0.060
	24	57.4	0.062
	26	55.3	0.055
	29	50.6	0.060
	33	39.9	0.053
	36	33.2	0.050
	48	21.5	0.052
600 rpm 0.6 vvm	3	17.4	0.053
	6	20.6	0.059
	8	27.8	0.069
	12	39.9	0.066
	18	53.5	0.074
	24	60.9	0.067
	26	58.5	0.057
	29	59.4	0.072
	33	48.0	0.060
	36	40.3	0.056
	48	29.1	0.054

Citrobacter freundii (NRRL B-2643) ile gerçekleştirilen deneylerde oksijen tüketim hızı ve sıvı faz kütle aktarım katsayısı değerlerini sırasıyla; $10.4-60.9 \times 10^{-4}$ mol m⁻³ s⁻¹ ve $0.023-0.074$ s⁻¹ değerleri arasında 300, 400, 500, 600 rpm karıştırma hızında ve 0.6 vvm havalandırma hızı değerinde elde edilmiştir.

Tablo 6.3. *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) yabanıl suşu için kesikli olarak işletilen biyoreaktörde farklı hava giriş hızlarında k_La ve r_o değerlerinin kalma süresi ile değişimi.

Hava Giriş Hızı (vvm)	Zaman (st)	$r_o \times 10^4$ (mol m ⁻³ s ⁻¹)	k_La (s ⁻¹)
0.3 vvm 500 rpm	3	10.1	0.024
	6	13.7	0.026
	8	14.9	0.019
	12	20.8	0.027
	18	22.4	0.029
	24	25.6	0.028
	26	29.3	0.021
	29	30.9	0.023
	33	28.7	0.024
	36	22.6	0.020
	48	14.2	0.022
0.4 vvm 500 rpm	3	11.2	0.030
	6	16.1	0.036
	8	14.4	0.028
	12	21.6	0.034
	18	27.3	0.032
	24	36.7	0.035
	26	40.2	0.037
	29	39.1	0.031
	33	30.9	0.033
	36	24.3	0.032
	48	16.8	0.029
0.5 vvm 500 rpm	3	12.6	0.044
	6	15.5	0.046
	8	19.8	0.041
	12	30.1	0.049
	18	41.7	0.038
	24	45.2	0.040
	26	45.9	0.048
	29	40.1	0.041
	33	32.5	0.036
	36	27.0	0.038
	48	18.3	0.034
0.6 vvm 500 rpm	3	14.5	0.048
	6	17.1	0.053
	8	23.1	0.055
	12	39.5	0.058
	18	48.6	0.060
	24	57.4	0.062
	26	55.3	0.055
	29	50.6	0.060
	33	39.9	0.053
	36	33.2	0.050
	48	21.5	0.052

Citrobacter freundii (NRRL B-2643) ile gerçekleştirilen deneylerde oksijen tüketim hızı ve sıvı faz kütle aktarım katsayısı değerlerini sırasıyla; $10.1-57.4 \times 10^{-4}$ mol m⁻³ s⁻¹ ve 0.019-0.062 s⁻¹ değerleri arasında 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 vvm hava giriş hızlarında ve 500 rpm karıştırma hızı değerinde elde edilmiştir.

Tablo 6.4. *Citrobacter freundii* pMK79 rekombinant suşu için kesikli olarak işletilen biyoreaktörde farklı karıştırma hızlarında k_{La} ve r_o değerlerinin kalma süresi ile değişimi.

Karıştırma Hızı (rpm)	Zaman (st)	$r_o \times 10^4$ (mol m ⁻³ s ⁻¹)	k_{La} (s ⁻¹)
300 rpm 0.6 vvm	3	17.2	0.062
	6	24.6	0.058
	8	43.6	0.049
	12	53.9	0.058
	18	65.3	0.063
	24	62.9	0.050
	26	64.5	0.058
	29	55.0	0.053
	33	38.3	0.060
	36	26.8	0.057
	48	23.7	0.054
400 rpm 0.6 vvm	3	19.3	0.055
	6	29.5	0.069
	8	47.3	0.079
	12	55.1	0.059
	18	67.8	0.070
	24	65.1	0.059
	26	67.4	0.061
	29	56.5	0.054
	33	42.1	0.066
	36	25.4	0.073
	48	23.3	0.071
500 rpm 0.6 vvm	3	13.7	0.081
	6	21.3	0.083
	8	37.6	0.090
	12	48.1	0.077
	18	52.6	0.092
	24	52.8	0.079
	26	54.9	0.086
	29	43.7	0.078
	33	32.3	0.076
	36	22.2	0.080
	48	15.3	0.081
600 rpm 0.6 vvm	3	9.9	0.104
	6	17.3	0.097
	8	32.8	0.093
	12	40.6	0.102
	18	46.3	0.099
	24	45.1	0.103
	26	47.7	0.089
	29	40.4	0.096
	33	27.6	0.091
	36	18.5	0.095
	48	12.4	0.099

Citrobacter freundii pMK79 rekombinant suşu ile gerçekleştirilen deneylerde oksijen tüketim hızı ve sıvı faz kütle aktarım katsayısı değerlerini sırasıyla; $9.9-67.8 \times 10^{-4}$ mol m⁻³ s⁻¹ ve 0.050-0.104 s⁻¹ değerleri arasında 300, 400, 500, 600 rpm karıştırma hızında ve 0.6 vvm havalandırma hızı değerinde elde edilmiştir.

Tablo 6.5. *Citrobacter freundii* pMK79 rekombinant suşu için kesikli olarak işletilen biyoreaktörde farklı hava giriş hızlarında k_La ve r_o değerlerinin kalma süresi ile değişimi.

Hava Giriş Hızı (vvm)	Zaman (st)	$r_o \times 10^4$ (mol m ⁻³ s ⁻¹)	k_La (s ⁻¹)
0.3 vvm 400 rpm	3	14.9	0.029
	6	23.3	0.036
	8	34.8	0.027
	12	43.6	0.031
	18	50.0	0.032
	24	53.9	0.035
	26	52.1	0.028
	29	43.7	0.029
	33	35.8	0.034
	36	22.5	0.032
	48	18.1	0.034
0.4 vvm 400 rpm	3	15.3	0.045
	6	24.9	0.039
	8	39.7	0.034
	12	46.8	0.042
	18	53.6	0.040
	24	56.2	0.039
	26	57.1	0.041
	29	45.4	0.044
	33	38.3	0.038
	36	24.9	0.042
	48	19.7	0.037
0.5 vvm 400 rpm	3	18.1	0.050
	6	27.6	0.053
	8	42.3	0.057
	12	50.6	0.049
	18	58.1	0.051
	24	60.7	0.047
	26	59.6	0.049
	29	51.3	0.053
	33	40.8	0.045
	36	26.4	0.056
	48	20.5	0.054
0.6 vvm 400 rpm	3	19.3	0.055
	6	29.5	0.069
	8	47.3	0.079
	12	55.1	0.059
	18	67.8	0.070
	24	65.1	0.059
	26	67.4	0.061
	29	56.5	0.054
	33	42.1	0.066
	36	25.4	0.073
	48	23.3	0.071

Citrobacter freundii pMK79 rekombinant suşu ile gerçekleştirilen deneylerde oksijen tüketim hızı ve sıvı faz kütle aktarım katsayısı değerlerini sırasıyla; 14.9-67.8 * 10⁻⁴ mol m⁻³ s⁻¹ ve 0.029-0.079 s⁻¹ değerleri arasında 300, 400, 500, 600 rpm karıştırma hızında ve 0.6 vvm havalandırma hızı değerinde elde edilmiştir.

Literatürde farklı mikroorganizmalarla yapılan çalışmalarda, oksijen tüketim hızı, r_o ve sıvı faz kütle aktarım katsayısı, k_L değerlerini sırasıyla; Ulgen ve Mavituna [168] *Streptomyces coelicolor* ile $4.1-15.3 \times 10^{-4} \text{ mol m}^{-3}\text{s}^{-1}$ ve $0.011-0.029 \text{ s}^{-1}$, Bilir [169] *Bacillus licheniformis* ile $4-16.5 \times 10^{-4} \text{ mol m}^{-3}\text{s}^{-1}$ ve $0.034-0.074 \text{ s}^{-1}$, Pehlivan [170] *Bacillus subtilis* ile $1.2-29.7 \times 10^{-4} \text{ mol m}^{-3}\text{s}^{-1}$ ve $0.020-0.066 \text{ s}^{-1}$, Yılmaz [171] *Bacillus subtilis* ile $2.0-20.0 \times 10^{-4} \text{ mol m}^{-3}\text{s}^{-1}$ ve $0.011-0.033 \text{ s}^{-1}$ olarak belirlemişlerdir.

7. L-DOPA ve DOPAMİN ÜRETİMİNİN MATEMATİKSEL MODELLENMESİ

7.1. Genetik Algoritma (GA)

Modern bilimde veri kümeleri arasındaki ilişkileri, tecrübelerden de faydalanarak belirlemek, üzerinde çokça çalışılan ve araştırılan bir taslaktır. Günümüzdeki araştırma konuları ve problemleri eskiye nazaran çok daha karışıktır. Bu karışıklık, problemi etkileyen parametre sayısının fazlalığından ve problemin çözüm kümesinin boyutunun büyümesinden kaynaklanmaktadır. Bundan dolayı eldeki verilerin analizi ve sonucu bu verilerden kestirme yöntemlerinin önemi, araştırmacılar için gittikçe artmaktadır. Faydalı iyi bir veri analiz yöntemi şu kriterlere göre değerlendirilebilir. İyi tahmin veya sonucu kestirmeye yönelik olmalı, sistemin içindeki her bir mekanizmanın analiz edilebilmesi ve sonuçların mümkün olabilecek çözüm uzayı kümesinde olmasıdır [7].

Geçmişte araştırmacılar tarafından çalışılan, parametreler arasındaki ilişkiler, genelde deneme yoluyla, zor olan örneklerde karmaşık veya sabit olmayan ilişkiler için yapılmış; fakat parametre sayısı artınca çözümsüzlük veya elde edilen çözümü değerlendirememesi problemini getirmiştir. İstatistiksel yöntemler, araştırmacılara ilişkileri bulmada faydalı olan ilk araçlardandır. İstatistiksel yöntemlerde: (1) verinin normal toplandığı, (2) verinin eşitlik ilişkisinin belirli bir formda olması (ör: lineer, quadratic, veya polinomsal), (3) değişkenlerin bağımsız olması gerekir. Eğer problem bu kriterleri sağlarsa, istatistiksel yöntem ilişkileri bulmada faydalı olabilir. Oysa gerçek hayatta problemler bu kriterleri nadiren sağlarlar [7].

Genetik algoritmalar yapay zekânın gittikçe genişleyen bir kolu olan evrimsel hesaplama tekniğinin bir parçasını oluşturmaktadır. Adından da anlaşılacağı üzere, evrimsel hesaplama tekniğinin bir parçası olan genetik algoritma Darwin'in evrim teorisinden esinlenerek oluşturulmuştur. Herhangi bir problemin genetik algoritma ile çözümü, problemi sanal olarak evrimden geçirmek suretiyle yapılmaktadır [172].

Evrimsel teoriye göre ilk canlılar rastgele bir araya gelmiş organik moleküllerden oluşmuş tek hücreli varlıklardır. Daha sonra bu canlılar bulundukları ortama ayak uydurabilmek için bazı yetilerini geliştirmiştir. Bu gelişim doğal seleksiyon olarak tanımlanmıştır. Doğal seleksiyon kavramında bir popülasyon içerisinde güçlü ve iyi özelliklere sahip bireylerin bu özelliklerini bir sonraki nesillere aktarma noktasında daha şanslı oldukları kabul edilmiştir. Bundan dolayı zaman içerisinde her yeni nesilde çevreye

uyum için gereken iyi özellikler daha fazla görünmektedir. Bir başka deyişle canlılar nesiller boyunca çevre şartlarına uymada hep daha iyi özelliklere sahip olmakta ve biyolojik olarak mükemmelleşmektedirler. Bu durum, canlıların yaşamlarını sürdürdükleri ortama daha iyi adapte olmalarını sağlamaktadır. Böylece canlı yaşadığı ortamdan maksimum ölçüde faydalanabilecek ve olumsuz şartlardan da minimum düzeyde etkilenecek hale gelmektedir. Bir başka deyişle nesiller, çevre şartları sabit kaldığı varsayılırsa, mükemmel doğru yol almaktadır. Ancak çevre şartları sürekli olarak değiştiğinden bu mükemmellik bir türlü sağlanamamaktadır [173].

Evrimsel algoritmalarından biri olan genetik algoritma ilk defa Michigan Üniversitesinde psikoloji ve bilgisayar bilimi uzmanı olan John Holland 1975'te kullanılmıştır ve canlı sistemlerdeki genetik şifre mantığı kullanılarak sezgisel olarak en iyi çözümü veya en iyi çözüme yakın olabilecek bir sonuç bulmayı hedefler. Bu mantık evrim teorisindeki doğal seleksiyon sürecinin yani güçlü bireyin hayatta kalma olasılığının yüksek olmasıdır. Bu yöntemle evrim sonucu hayatta kalan birey en iyi sonuç olarak alınır [174].

Genetik algoritmalar arama ve optimizasyon için sezgisel yöntemlerdir. Mühendislik, bilim, ekonomi, finansman v.s. deki problemleri çözmeye kullanılan arama teknikleri, hesap-temelli ve doğrudan arama teknikleri olarak sınıflandırılabilir. Eğer problemler sayısal veya analitik olarak iyi tanımlanabiliyorsa veya çözüm uzayı küçük ve tek ise, hesap temelli arama tekniği daha iyi çalışır. Buna rağmen hesap-temelli teknik mühendislik optimizasyonların da gittikçe artan optimum bulma fonksiyonlarında oldukça zayıf kalır. Sadece fonksiyon bilgisi gerekli olan doğrudan arama tekniği, hesap-temelli teknikten daha kısa sürede işler ve daha etkilidir. Doğrudan arama tekniğinin esas problemi, ulaşılabilen bilgisayar zamanı ile optimal çözümün kesinliği arasındaki bağıntıdır [175].

Genetik algoritmaların çoklu mümkün çözümleri araştırma gibi önemli özelliklere sahip olmaları ve amaç fonksiyonunun gredyeninin bilinmesine ihtiyaç duymaları en önemli üstünlükleridir. Genetik algoritmalar bu nedenle diğer geleneksel yöntemlerden, karakteristik olarak dört özelliği ile farklıdır. Bunlar aşağıdaki şekilde sıralanabilir;

- ✓ GA, parametrelerin kendileriyle değil, oluşturulabilir bir koduyla çalışır.
- ✓ GA, çözüm kümesine doğrudan tek nokta ile değil, noktalar topluluğuyla yaklaşır.

- ✓ GA, türevleri yada diğer yardımcı bilgileri (matematik bilgisi) değil, sadece amaç fonksiyonu bilgisini kullanır.
- ✓ GA, aramayı deterministik kurallarla değil, olasılıklı geçiş (ihtimal) kuralları ile yapar.

7.1.1. Genetik Algoritmanın Tarihçesi

“Genetik Algoritma” kalıbı, ilk olarak 1967 yılında Bagley tarafından bir oyun programının yenmek üzere tasarlanmasında kullanılmıştır. Bagley’in kullandığı GA yöntemleri bugünkünden çok farklı olmakla birlikte günümüzde kullanılan GA teknikleri için bir temel teşkil etmiştir. Rosenberg de aynı dönemde bu algoritmaya biyolojik ve benzetimsel etmenleri eklemiştir [176]. De Jong bu çalışmaları matematiksel boyuta taşımış ve fonksiyon enküçüklenmesi için kullanmıştır. Bagley, Rosenberg ve De Jong gibi öncülerinin bulunmasına rağmen Genetik Algoritmanın babası John Holland olarak kabul edilmektedir. Bunun sebebi Holland’ın “Genetik Algoritma “ kavramını “Cellular Automata” çalışmaları ve “Doğal ve Yapay Sistemlerde Uyarılma” kitabının yayınlanması ile literatüre kazandırmıştır. Holland’ın bu kitabında ana düşünce şudur; “Verilen bir popülasyonun genetik havuzu potansiyel olarak istenen en iyi çözümü içerir veya uyarılan probleme ilişkin iyi bir çözüm vardır”. Holland GA’nın temel ilkeleri olan yeniden üreme ve çaprazlama operatörlerini tanımlamıştır. Holland’dan sonra Genetik Algoritma’ların gelişimi doktora öğrencisi olan Goldberg ile devam etmiştir. Goldberg, GA’nın teoriden pratiğe dönüştürülemez tabusunu yıkmış ve 1989’da yayınlanan “Genetic Algorithms in Search, Optimization and Machine Learning” adlı kitabında GA içeren 83 uygulama göstermiştir. Goldberg’i takiben GA çalışmaları geniş kullanım alanları bulmaya başlamış ve GA kodlaması yapılan bilgisayar programları ortaya çıkmıştır. Bunların en önemlisi ve ünlüsü 1992’de John Koza tarafından LISP ile yazılan bilgisayar programıdır [176-177].

7.1.2. Genetik Algoritmanın Tanımı

Genetik Algoritma, canlı sistemlerdeki genetik şifre mantığı kullanılarak sezgisel olarak en iyi çözüm veya en iyi çözüme yakın olabilecek bir sonuç bulmayı hedefler. Doğadaki bireylerin birleşerek çocukları oluşturması ve bu çocuklardan güçlü olanın hayatta kalması GA’nın temelini oluşturur. GA, bir bireyler topluluğuyla başlayarak bu bireylerden çocuklar elde eder. Bu bireylerin özellikleri ve sayısı rassal olarak belirlenir.

Bu bireyler de rassal olarak eşleştirilerek ebeveyn olurlar. Bu ebeveynlerden elde edilen çocuklar seleksiyon, çaprazlama ve dönüşüm işlemlerine maruz kalırlar. Bu işlemlerin tekrarlanması ile evrim gerçekleştirilir. Genetik algoritmanın bitirilmesi bitiş ölçütlerinin gerçekleşip gerçekleşmediğine bağlıdır [176].

Genetik Algoritmaları (GA) diğer metotlardan ayıran noktalar şu şekilde sıralanabilir:

- ✓ GA, sadece bir arama noktası değil, bir grup arama noktası (adaylar) üzerinde çalışır. Yani arama uzayında, **yerel** değil **global** arama yaparak sonuca ulaşmaya çalışır. Bir tek yerden değil bir grup çözüm içinden arama yapar.
- ✓ GA, arama uzayında bireylerin uygunluk değerini bulmak için sadece “amaç - uygunluk fonksiyonu” (objective-fitness function) ister.
- ✓ Bireyleri seçme ve birleştirme aşamalarında deterministik kurallar değil “olasılık kuralları” kullanır.
- ✓ Diğer metodlarda olduğu gibi doğrudan parametreler üzerinde çalışmaz. Genetik Algoritmalar, optimize edilecek parametreleri kodlar ve parametreler üzerinde değil, bu kodlar üzerinde işlem yapar. Parametrelerin kodlarıyla uğraşır. Bu kodlamanın amacı, orjinal optimizasyon problemini kombinezonsal bir probleme çevirmektir.
- ✓ Genetik algoritma ne yaptığı konusunda bilgi içermez, nasıl yaptığını bilir. Bu nedenle kör bir arama metotudur.
- ✓ Olasılık kurallarına göre çalışırlar. Programın ne kadar iyi çalıştığı önceden kesin olarak belirlenemez. Ama olasılıkla hesaplanabilir.

Genetik Algoritmalar, yeni bir nesil oluşturabilmek için 3 aşamadan geçer:

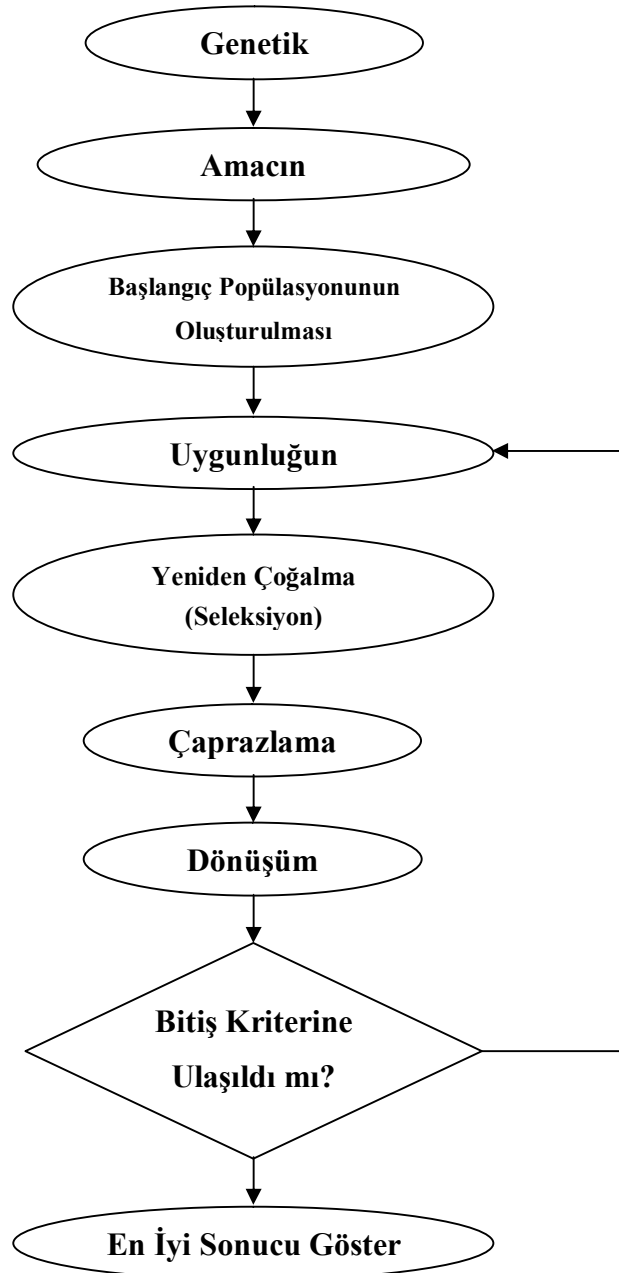
- I. Eski nesildeki her bir bireyin uygunluk değerini hesaplama.
- II. Bireyleri, uygunluk değerini göz önüne alarak (uygunluk fonksiyonu) seçme.
- III. Seçilen bireyleri, çaprazlama (crossover), mutasyon (mutation) gibi genetik operatörler kullanarak uyuşturma.

Algoritmik bakış açısından bu aşamalar, mevcut çözümleri lokal olarak değiştirip birleştirmek olarak görülebilir.

Genetik Algoritmalar; başlangıçta bilinmeyen bir arama uzayından topladığı bilgileri yığıp, daha sonraki aramaları alt arama uzaylarına yönlendirmek için kullanılır.

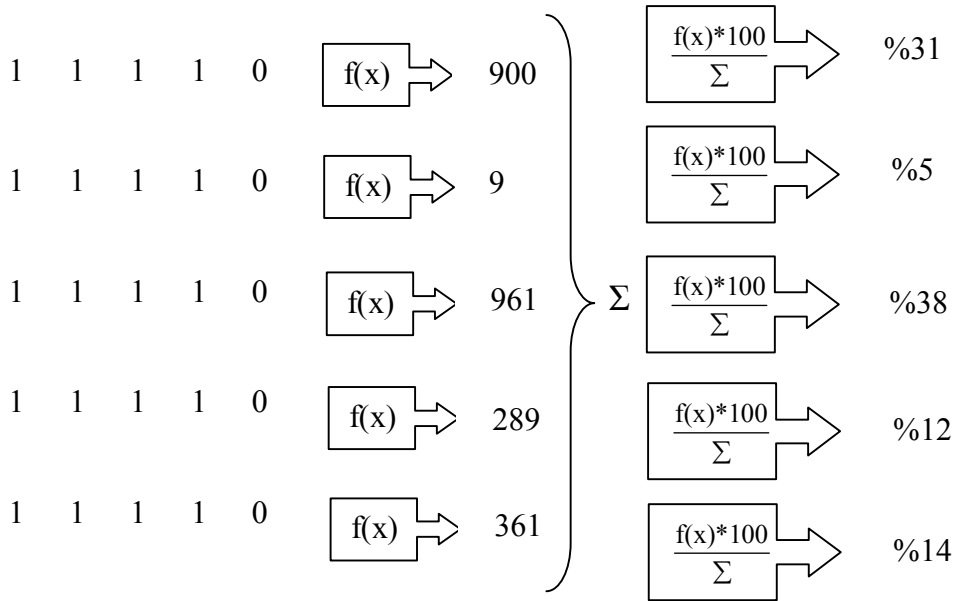
7.1.3. Genetik Algoritmanın Adımları

İşlem, çözüm uzayından belirli bir sayıda başlangıç çözümün seçilmesi ile başlar. Her adımda çaprazlama, mutasyon ve uygunluk değerlendirmesi yapılır. Sonlandırma kriteri sağlanıncaya kadar bu işlem devam eder. Sonlandırma kriteri; belli bir sayıda iterasyon, uygunluk değerinin beklenen bir değere ulaşması veya belli sayıda iyileşme olmadan sürdürülen iterasyon sayısı olabilir. Genetik algoritmanın genel işleyiş adımları Şekil 7.1.'de verilmiştir.



Şekil 7.1. Genetik algoritma adımlarının akım diagramı.

Kodlama planı Genetik algoritmanın önemli bir kısmını teşkil eder. Çünkü bu plan bilginin çerçevesini şiddetle sınırlayabilir. Öyle ki probleme özgü bilginin bir kromozomsal gösterimiyle temsili sağlanır. *Kromozom* genellikle, problemdeki değişkenlerin belli bir düzende sıralanmasıdır. Kromozomu oluşturmak için sıralanmış her bir değişkene *gen* adı verilir. Buna göre bir *gen* kendi başına anlamlı genetik bilgiyi taşıyan en küçük genetik yapıdır. GA'yı bir probleme uygulamadan önce, verinin nasıl kodlanacağı ve mümkün olabilen çözümler kümesinden örnek çözümlerin bilinmesi gerekir. Genel olarak en yaygın kodlama uzunluğu belirlenmiş bit katarı şeklindedir. Klasik GA'da, topluluktaki her bir birey, problemdeki parametreler kümesinin kodlandığı belirli uzunlukta ikili (binary) katardan oluşur. Bu kodlanan katar tekrar kod çözülerek parametrelerin ondalık değerini verebilir. Şekil 7.2'de $f(x)=x^2$ fonksiyonun maksimizasyonu problemi için 0-32 aralığında, rastgele oluşturulmuş başlangıç popülasyonu örneği gösterilmiştir.



Şekil 7.2. Rastgele oluşturulmuş örnek bir başlangıç popülasyonu

Adım 1. Genetik Kodlama: Genetik kodlama işlemi fenotipin genotipe dönüştürülme işlemidir. Bir popülasyon kromozom topluluğu, kromozom ise genler topluluğu olarak açıklanır. Kromozomun yapısı ise aşağıda verilmiştir.

$$S = S_1 S_2 \dots S_j \dots S_n$$

Burada s_i , $i = 1, 2, \dots, n$ genleri göstermektedir. i değeri genin lokusudur. Herhangi bir s_i geninin alabileceği değişik değerler allel olarak adlandırılır. Bir kromozomun uzunluğu (n) genellikle sabit tutulur. Herhangi bir sayı değerini genetik kodlamaya çevirme işlemi bir fonksiyon olarak ele alınabilir. Bu fonksiyonda fenotipler çözüm uzayında, genotipler kod uzayında yer alırlar. Bir kodlama fonksiyonunun başarılı olabilmesi için çözüm uzayı ve kod uzayı birebir eşlenebilir olmalıdır.

Gerçek sayılar, tamsayılar, harfler ya da bazı semboller kodlama için uygundur ancak kodlama için en çok kullanılan yöntem Holland tarafından geliştirilen 0-1 ikili kodlama sistemidir. Kodlamanın doğru yapılması GA'nın işleyişi için çok önemlidir. Kullanılan kodlama yöntemleri aşağıda verilmiştir [176, 178].

İkili Kodlama: Çözüm uzayındaki değerlerin ikilik sayma sistemine dönüştürülmesiyle gerçekleşir. İkili kodlama tekniğinin avantajı ileride anlatılacak olan çaprazlama ve dönüşüm kolaylaştırmasıdır. Örneğin 7 kod uzayında 0111 ile gösterilirken, 8 kod uzayında 1000 ile gösterilir. Bu kodlama sisteminde karşılaşılan sorun şudur: 2'lik sayma sisteminde 0111 ve 1000 ardışık sayılar değildir. Bu sorunu gidermek için gri kodlama tekniği geliştirilmiştir [176].

Gri Kodlama: 0-1 ikili kodlamadan farkı Hamming Uzaklığı kavramını geliştirmesidir. Sayıları ikili sistemde yazmaya başladığında ilk olarak Hamming Uzaklığı ölçülür. Hamming Uzaklığı, kromozomdaki değişen genlerin sayısını gösterir. Oysa ikili kodlamada aradaki Hamming Uzaklığı'nın 1 olması istenir. 0-7 arası sayıların gri kodlamada gösterimi aşağıda verilmiştir [176].

Harf Kodlama: 0-1 ikili kodlamanın kullanılmak istenmediği durumlarda kullanılır. Örneğin [0-15] aralığındaki değerler, ikili kodlama dışında İngiliz Alfabesi'ndeki [A-O] harfleri ile kodlanabilir. Çözüm uzayı bu yöntemler dışında, problem tipleri için özel olarak geliştirilen yöntemlerle kodlanabilirler. Eğer çözüm uzayında birden çok değişken için değer aranıyorsa, bu durumda kromozomlar bu değişkenlerin birleştirilmesi ile gösterilir.

$$\begin{array}{ccccccc} 0010011011 & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & 10101 \\ \underbrace{\hspace{1.5cm}} & & & & & & \underbrace{\hspace{1.5cm}} \\ X_1 & X_2 & & & & & X_n \end{array}$$

Tablo 7.1. Hamming uzaklığı ve gri kodlama

Sayı	İkili Kodlama Gösterimi	Hamming Uzaklığı	Gri Kodlama Gösterimi	Hamming Uzaklığı
0	000		000	
1	001	1	001	1
2	010	2	011	1
3	011	1	010	1
4	100	3	110	1
5	101	1	111	1
6	110	2	101	1
7	111	1	100	1

Adım 2. Amacın Tanımlanması: Elimizde çözüm kümesi olduğunda bu çözümlerin ne kadar iyi olduğunu belirlemek gerekir. Bunun için amaç fonksiyonu tanımlanmalıdır. Genetik Algoritma'nın bir avantajı da amaç fonksiyonunu formüle etmenin zor olduğu problemlere kullanım kolaylığı getirmesidir.

Adım 3. Başlangıç Populasyonun Yaratılması: Bu adım ile algoritmada kullanılacak bireyler (ebeveynler) oluşturulur. Burada yapılacak seçim başlangıç popülasyonundaki birey sayısıdır. Az sayıda birey algoritmada kullanılabilecek birçok değer işlenmeden atlanmasına neden olur. Bunun nedeni çaprazlamanın az sayıda birey arasında gerçekleşmesi ve çeşitliliğin daha az olmasıdır. Çok sayıda birey ise algoritmanın yavaşlamasına neden olur. Burada her döngüde (nesil) daha çok birey incelenir. Populasyon sayısı belli bir değeri geçtikten sonra daha fazla arttırmak algoritmanın verimliliği azalmaktadır. Her problem tipi için en iyi çözümün başlangıç populasyonu sayısı farklıdır. Nesiller boyunca populasyon sayısı genellikle korunur [176].

Adım 4. Yeniden Çoğalma (Seleksiyon): Yeniden üretme operatörü, hazır topluluktan uygun olan bireylerin seçilmesi ve bunların sonraki topluluğa kopyalanarak hayatta kalmalarıyla ilgilidir. Seçim modeli, tabiatın hayatta kalabilmek için uygunluk mekanizması modelidir. Yeniden üretme işleminde, bireyler onların uygunluk fonksiyonlarına göre kopya edilirler. Uygunluk fonksiyonu, mümkün olduğu kadar yükseltilmesi gereken bazı faydalı ve iyi ölçülerdir. Topluluk uzayındaki her bir bireyin uygunlukları baz alınarak ne kadar sayıda kopyasının olacağına karar verilir. En iyi bireylerden daha fazla kopya alınır, en kötü bireylerden kopya alınmaz. Bu hayatta kalmak için uygunluk stratejisinin GA'ya sağladığı avantajdır.

GA tarafından üretilen döllerin (nesillerin) sayısını belirlemede birkaç yol vardır. Birbirine yakın parametrelerden kaçınmak için uygun bir seçim metodu kullanılmalıdır. Tekrar üretme başlangıcında basit bir yöntem “roulette wheel selection” (rulet tekerleğiyle seçim)’e göre bireylerin uygunluk değerlerini bir rulet tekerleğinde hazırlar. Rasgele tekerleğin döndürülmesinden sonra, bireyin bir sonraki nesil için seçilmesi, tekerlek üzerinde kapladığı alanla doğrudan bağlantılıdır. Bu yöntem düşük uygunluğa sahip bireylere de seçilme hakkı verir [179].

$$P_i = \frac{F_i}{\sum_{i=1}^N F_i} \quad (7.1.)$$

Burada; F_i , i. Eleman için uygunluk değerini ve N ise birey sayısını göstermektedir.

Adım 5. Çaprazlama: Çaprazlama iki kromozomun bir araya gelerek genetik bilgi değişimi yapmasıdır. Bunun yanında iki ebeveynden yeni kromozomlar üreten genetik algoritmaların temel bir özelliğidir. Çaprazlama, bir önceki nesilde bireylerin uygunluklarına göre seçilip, gen havuzuna kopyalanmalarından sonra olmaktadır.

Biyolojik kromozomlar üzerinde yapılan çaprazlamada amaç daha iyi, daha dayanıklı birey oluşturup ait olduğu bireyler topluluğunun neslini dışarıdan etkiyle daha mükemmel hale getirmektir. Bu işlem yapılırken her zaman sonuçlar önceden tahmin edilemez. Bu yüzden gelişigüzel yapılan değişikliklerde sonucun mükemmelliğe doğru gitmesi için belirli kriterler bulmak için çalışılır. Kromozomlardaki genlerin yapısı ve etkileri araştırılarak, bu genlere yapılan müdahalelerle bireye bazı iyi özellikler kazandırılabilir. Tablo 7.2.’de biyolojik çaprazlamaya bir örnek verilmiştir.

Tablo 7.2. Biyolojik çaprazlama örneği.

1. ebeveyn	AA	BB	2. ebeveyn	aa	bb
1. döl	AABB		2. döl	aabb	

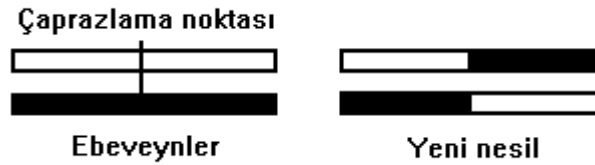
Benzer şekilde GA, çaprazlama işlemini uygunluk değerlerine göre seçilmiş iki ebeveyn bireyden, iyi özellikte yeni bireyler elde etmek için kullanır. Çaprazlama rasgele seçilmiş iki çift katarın içindeki alt küme bilgilerin değiştirilmesi işlemidir. Kendi içindeki bilgilerini 1. Pozisyondan itibaren, katarın uzunluğunun bir eksik pozisyonuna kadar, aradaki bilgi kısmen karşılıklı bireyler arasında yer değiştirilir.

Eğer iki bireyin problemin çözümünde bazı etkileri var ise onların bir parçaları faydalı, iyi veya uygun nitelenebilecek bilgi taşımaktadır. Çaprazlama belki problemin çözümünde, bu faydalı bilgileri birleştirerek, daha çok etkili yeni bireyler üretecektir. Tablo 7.3.'de ikili kodda verilmiş bir katarda, örnek 2 bitlik bir çaprazlama işlemi verilmiştir.

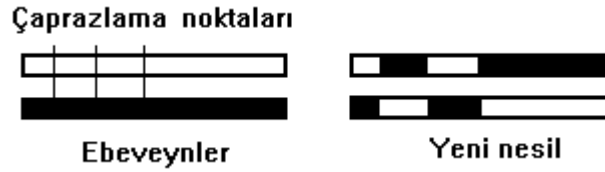
Tablo 7.3. İki bitlik çaprazlama örneği.

1. ebeveyn	100110 00	1. döl	10011001
2. ebeveyn	110111 01	2. döl	11011100

Tek noktalı çaprazlama Şekil 7.3.'de, üç noktalı çaprazlama Şekil 7.4.'de gösterilmiştir. Buna göre her iki bireyde bir çaprazlama noktası seçilir ve üçüncü adım olarak bu noktadan sonraki kısımlar karşılıklı yer değişir.



Şekil 7.3. Tek noktalı çaprazlama.



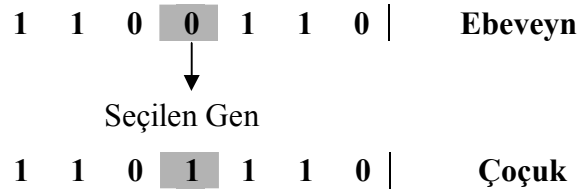
Şekil 7.4. Üç noktalı çaprazlama.

Çoğu genetik algoritma uzmanları çaprazlama işleminin GA'yı diğer bütün optimizasyon algoritmalarından ayıran belirleyici bir faktör olarak göz önüne alır.

Adım 6. Dönüşüm (Mutasyon): Dönüşüm genetik algoritma operatörlerinden biridir. Bu operatör nesiller boyunca kaybolan bir allel varsa onun geri getirilmesinde kullanılır. Dönüşüm operatörü bir geni alarak allellerinden biriyle değiştirir. Dönüşüm operatörünün en önemli özelliği dönüşüm olasılığı (pm)'dir. Dönüşüm olasılığı bir genin dönüşüme uğrama olasılığıdır. Bir populasyon içinde dönüşümün beklenen değeri dönüşüm olasılığının o populasyondaki gen sayısı ile çarpımına eşittir. Dönüşüm olasılığı genellikle 0.001 ile 0.01 arasındadır. Bu hız genlerin kaybolma hızına bağlıdır [180].

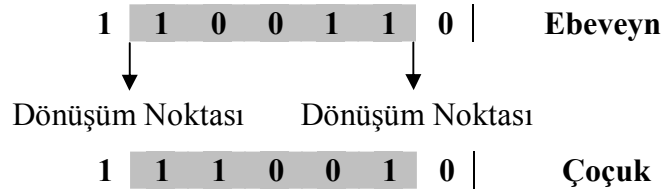
Genetik algoritmada kullanılan dönüşüm yöntemleri aşağıdaki şekilde sıralanabilir;

Basit dönüşüm; Kromozomdan herhangi bir gen seçilerek alleliyle değiştirilir (Şekil 7.5.).



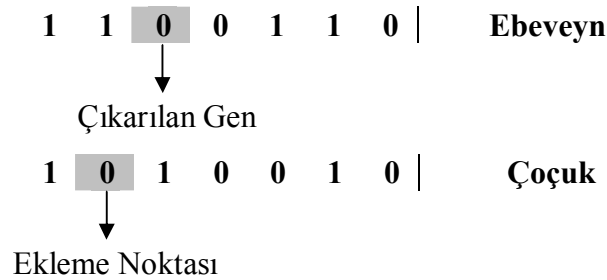
Şekil 7.5. Basit dönüşümünün gösterimi.

Değiştirme dönüşümü; Kromozom içerisinde iki dönüşüm noktası seçilerek noktalar arasında kalan genler ters çevrilir (Şekil 7.6.).



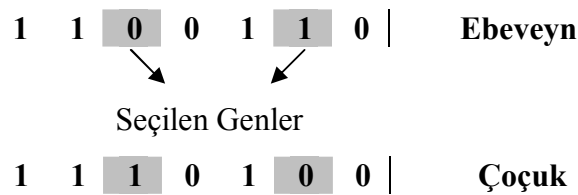
Şekil 7.6. Değiştirme dönüşümünün gösterimi.

Ekleme dönüşümü; Kromozom içerisinde rassal bir gen seçilir. Seçilen gen rassal bir noktaya eklenir (Şekil 7.7.).



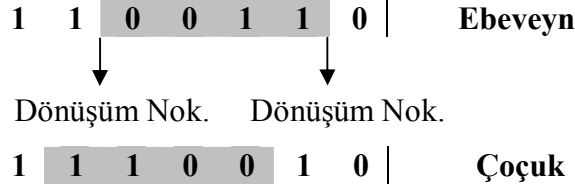
Şekil 7.7. Ekleme dönüşümünün gösterimi.

Karşılıklı değişim dönüşümü; Kromozom içerisinde rassal iki gen seçilerek yerleri değiştirilir (Şekil 7.8.).



Şekil 7.8. Karşılıklı değişim dönüşümünün gösterimi.

Yer Değiştirme dönüşümü; Değiştirme dönüşümünün özel bir durumudur. Değiştirme dönüşümünde olduğu gibi iki nokta arasında kalan genleri ters çevirir. Ancak ters çevrilen genleri rassal bir pozisyona ekler (Şekil 7.9.).



Şekil 7.9. Yer değiştirme dönüşümünün gösterimi.

Adım 6. Bitiş Kriterine Ulaşma: Genetik Algoritma'nın döngülerinin bitirilmesi (nesillerin sonlandırılması) için gerekli ölçütler farklı tanımlanabilir. Bazı ölçütler şunlardır:

- i. Belli bir nesil sayısı bitirildikten sonra döngüler durdurulur ve nesiller boyunca kimin en çok uygunluk gösterdiğine bakılır.
- ii. Evrim sonucunda uygunluk fonksiyonundaki iyileşme belli bir değerin altına düştüğünde döngüler bitirilir.
- iii. Evrim için belirli bir süre verilerek, bu süre bittiğinde evrim durdurulabilir.
- iv. Uygunluk fonksiyonu için belirli bir değer verilerek, bu değeri geçen ilk döngüde evrim bitirilebilir [181].

Adım 8. En İyi Sonucun Gösterilmesi: Bitiş ölçütlerine ulaşıldıktan sonra, en iyi değer en iyi çözüm kabul edilerek bu sonuç problemin çözümü olarak sunulur.

7.1.4. Genetik Algoritmanın Uygulama Alanları

Genetik algoritmaların en uygun olduğu problemler geleneksel yöntemler ile çözümü mümkün olmayan ya da çözüm süresi problemin büyüklüğü ile üstel orantılı olarak artanlardır. Bugüne kadar GA ile çözümüne çalışılan konulardan bazıları şunlardır:

- **Optimizasyon:** GA, sayısal optimizasyon ve kombinatoral optimizasyon problemleri olan devre tasarımı, doğrusal olmayan denklem sistemlerinin çözümünde ve fabrika üretim planlamasında kullanılır.

Otomatik Programlama (automatic programming): GA, bilgisayar programları yardımıyla network sıralamasında (sorting), sınav/ders programı hazırlanmasında kullanılır.

Makine öğrenmesi (machine learning): GA, robot sensörlerinde, neural networklerde, VLSI yonga tasarımı ve protein yapısal analizinde kullanılır.

Ekonomi (economics): GA, ekonomik modellerin geliştirilmesinde ve işleminde kullanılır. Mesela seralarda salatalık yetiştirilmesinde iklim kontrolünü yapabilmek ve optimal sıcaklığın nasıl yayılmasını belirlemek için GA yöntemin kullanılmıştır. Yöntem optimal kontrol teorisinde kullanılan dinamik optimumlaştırmaya bir alternatif olarak ele alınmıştır

İmmün sistemler (Immune systems): GA, çok gen'li ailelerin evrimi esnasında ve doğal immün sistem modellerinde kullanılır.

Popülasyon genetiği (population genetics): GA, evrim ile ilgili sorulara cevap bulmada kullanılır.

Evrin ve öğrenme (evolution and learning): GA, fertlerin öğrenmesini ve türlerin evrilmesinde kullanılır.

Sosyal sistemler (social systems): GA, sosyal sistemlerin analizinde kullanılır.

Müzik: Stokastik müzik üreticinin çıktısından elde edilen materyali sınırlayan bir takım veri filtreleri ile müzik oluşturma GA'nın bir uygulamasıdır. Bunun için algoritmik düzenin yapısındaki değişiklikler tanımlanır ve bunların çıktıları müzikal örnekler verirler.

7.2. Yapay Sinir Ağları

Son yıllarda, insan beyninin çalışma prensibini yapay olarak modellemeyi amaçlayan Yapay Sinir Ağları (YSA); nesne/örüntü tanıma, sinyal işleme, arıza analizi ve tespiti, sistem tanılama (modelleme) ve denetimi gibi çeşitli alanlarda yaygın olarak kullanılmaya başlanmış ve kullanıldığı alanlardaki problemlerin çözümüne yeni yaklaşımlar getirmiştir. Genel olarak bir YSA, tek katmanlı ya da çok katmanlı olarak düzenlenebilen ve paralel olarak çalışan çok sayıda doğrusal olmayan yapay hücreden (işlem elemanı) meydana gelen bir sistem ya da matematiksel model olarak tanımlanır. Hücreler arasındaki ağırlıklar, arzu edilen tasarım amaçlarını sağlayacak şekilde çeşitli öğrenme kuralları ile ayarlanır. Bu yapısı ile YSA, öğrenme sürecinde bilgiyi toplayan ve ağırlıkları yardımıyla bu bilgiyi saklayan paralel bir işlemcidir. Bugün, çeşitli YSA yapıları

ve öğrenme algoritmaları geliştirilmiştir. Herhangi bir uygulama için uygun YSA yapısını ve öğrenme algoritmasını seçmek yada geliştirmek gerekir.

7.2.1. Biyolojik Sinir Sistemi

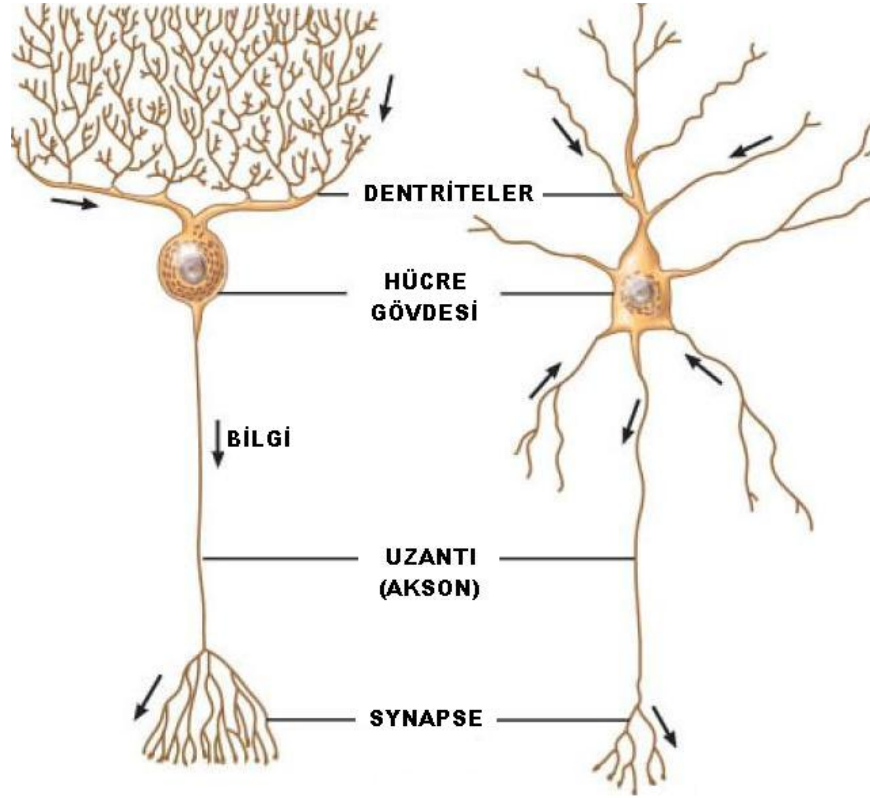
Biyolojik sinir sistemi, merkezinde sürekli olarak bilgiyi alan, yorumlayan ve uygun bir karar üreten beynin (merkezi sinir ağı) bulunduğu 3 katmanlı bir sistem olarak açıklanır. Alıcı sinirler (receptor) organizma içerisinden ya da dış ortamlardan algıladıkları uyarıları, beyine bilgi ileten elektriksel sinyallere dönüştürür. Tepki sinirleri (effector) ise, beyinin ürettiği elektriksel darbeleri organizma çıktısı olarak uygun tepkilere dönüştürür. Şekil 7.10.'da bir sinir sisteminin blok gösterimi verilmiştir.



Şekil 7.10. Biyolojik sinir sisteminin blok gösterimi.

Merkezi sinir ağında bilgiler, alıcı ve tepki sinirleri arasında ileri ve geri besleme yönünde değerlendirilerek uygun tepkiler üretilir. Bu yönüyle biyolojik sinir sistemi, kapalı çevrim denetim sisteminin karakteristiklerini taşır. Merkezi sinir sisteminin temel işlem elemanı, sinir hücresi (nöron) dir ve insan beyinde yaklaşık 10 milyar sinir hücresi olduğu tahmin edilmektedir. Sinir hücresi; hücre gövdesi, dendriteler ve axonlar olmak üzere 3 bileşenden meydana gelir. Dendriteler, diğer hücrelerden aldığı bilgileri hücre gövdesine bir ağaç yapısı şeklinde ince yollarla iletir. Axonlar ise elektriksel darbeler şeklindeki bilgiyi hücreden dışarı taşıyan daha uzun bir yoldur. Axonların bitimi, ince yollara ayrılabilir ve bu yollar, diğer hücreler için dendriteleri oluşturur. Şekil 7.11.'de görüldüğü gibi axon-dendrite bağlantı elemanı synapse olarak söylenir.

Synapse gelen ve dendriteler tarafından alınan bilgiler genellikle elektriksel darbelerdir ancak, synapsedeki kimyasal ileticilerden etkilenir. Belirli bir sürede bir hücreye gelen girişlerin değeri, belirli bir eşik değerine ulaştığında hücre bir tepki üretir. Hücrenin tepkisini artırıcı yöndeki girişler uyarıcı, azaltıcı yöndeki girişler ise önleyici girişler olarak söylenir ve bu etkiyi synapse belirler.



Şekil 7.11. Biyolojik sinir hücresi ve bileşenleri.

İnsan beyninin 10 milyar sinir hücresinden ve 60 trilyon synapse bağlantısından oluştuğu düşünülürse son derece karmaşık ve etkin bir yapı olduğu anlaşılır. Diğer taraftan bir sinir hücresinin tepki hızı, günümüz bilgisayarlarına göre oldukça yavaş olmakla birlikte duyuşal bilgileri son derecede hızlı değerlendirebilmektedir. Bu nedenle insan beyni; öğrenme, birleştirme, uyarılma ve genelleştirme yeteneği nedeniyle son derece karmaşık, doğrusal olmayan ve paralel dağılmış bir bilgi işleme sistemi olarak tanımlanabilir.

7.2.2. Yapay Sinir Ağı (YSA)

Beynin üstün özellikleri, bilim adamlarını üzerinde çalışmaya zorlamış ve beynin nörofiziksel yapısından esinlenerek matematiksel modeli çıkarılmaya çalışılmıştır. Beynin bütün davranışlarını tam olarak modelleyebilmek için fiziksel bileşenlerinin doğru olarak modellenmesi gerektiği düşüncesi ile çeşitli yapay hücre ve ağ modelleri geliştirilmiştir. Böylece Yapay Sinir Ağları denen yeni ve günümüz bilgisayarlarının algoritmik hesaplama yönteminden farklı bir bilim alanı ortaya çıkmıştır. Yapay sinir ağları; yapısı, bilgi işleme

yöntemindeki farklılık ve uygulama alanları nedeniyle çeşitli bilim dallarının da kapsam alanına girmektedir.

Genel anlamda YSA, beynin bir işlevi yerine getirme yöntemini modellemek için tasarlanan bir sistem olarak tanımlanabilir. YSA, yapay sinir hücrelerinin birbirleri ile çeşitli şekillerde bağlanmasından oluşur ve genellikle katmanlar şeklinde düzenlenir. Donanım olarak elektronik devrelerle ya da bilgisayarlarda yazılım olarak gerçekleştirilebilir. Beynin bilgi işleme yöntemine uygun olarak YSA, bir öğrenme sürecinden sonra bilgiyi toplama, hücreler arasındaki bağlantı ağırlıkları ile bu bilgiyi saklama ve genelleme yeteneğine sahip paralel dağılmış bir işlemcidir. Öğrenme süreci, arzu edilen amaca ulaşmak için YSA ağırlıklarının yenilenmesini sağlayan öğrenme algoritmalarını ihtiva eder.

7.2.2.1. Yapay Sinir Ağlarının Özellikleri

Yukarıda verilen açıklamalardan, YSA' nın hesaplama ve bilgi işleme gücünü, paralel dağılmış yapısından, öğrenebilme ve genelleme yeteneğinden aldığı söylenebilir. Genelleme, eğitim ya da öğrenme sürecinde karşılaşılmayan girişler için de YSA' nın uygun tepkileri üretmesi olarak tanımlanır. Bu üstün özellikleri, YSA' nın karmaşık problemleri çözebilme yeteneğini gösterir. Günümüzde birçok bilim alanında YSA, aşağıdaki özellikleri nedeniyle etkin olmuş ve uygulama yeri bulmuştur.

Doğrusal Olmama: YSA'nın temel işlem elemanı olan hücre doğrusal değildir. Dolayısıyla hücrelerin birleşmesinden meydana gelen YSA da doğrusal değildir ve bu özellik bütün ağa yayılmış durumdadır. Bu özelliği ile YSA, doğrusal olmayan karmaşık problemlerin çözümünde en önemli araç olmuştur.

Öğrenme: YSA'nın arzu edilen davranışı gösterebilmesi için amaca uygun olarak ayarlanması gerekir. Bu, hücreler arasında doğru bağlantıların yapılması ve bağlantıların uygun ağırlıklara sahip olması gerektiğini ifade eder. YSA' nın karmaşık yapısı nedeniyle bağlantılar ve ağırlıklar önceden ayarlı olarak verilemez yada tasarlanamaz. Bu nedenle YSA, istenen davranışı gösterecek şekilde ilgilendiği problemten aldığı eğitim örneklerini kullanarak problemi öğrenmelidir.

Genelleme: YSA, ilgilendiği problemi öğrendikten sonra eğitim sırasında karşılaşmadığı test örnekleri için de arzu edilen tepkiyi üretebilir. Örneğin, karakter tanıma amacıyla

eğitilmiş bir YSA, bozuk karakter girişlerinde de doğru karakterleri verebilir yada bir sistemin eğitilmiş YSA modeli, eğitim sürecinde verilmeyen giriş sinyalleri için de sistemle aynı davranışı gösterebilir.

Uyarlanabilirlik: YSA, ilgilendiği problemdeki değişikliklere göre ağırlıklarını ayarlar. Yani, belirli bir problemi çözmek amacıyla eğitilen YSA, problemdeki değişimlere göre tekrar eğitilebilir, değişimler devamlı ise gerçek zamanda da eğitime devam edilebilir. Bu özelliği ile YSA, uyarlamalı örnek tanıma, sinyal işleme, sistem tanılama ve denetim gibi alanlarda etkin olarak kullanılır.

Hata Toleransı: YSA, çok sayıda hücrenin çeşitli şekillerde bağlanmasından oluştuğundan paralel dağılmış bir yapıya sahiptir ve ağına sahip olduğu bilgi, ağıdaki bütün bağlantılar üzerine dağılmış durumdadır. Bu nedenle, eğitilmiş bir YSA'nın bazı bağlantılarının hatta bazı hücrelerinin etkisiz hale gelmesi, ağına doğru bilgi üretmesini önemli ölçüde etkilemez. Bu nedenle, geleneksel yöntemlere göre hatayı tolere etme yetenekleri son derece yüksektir.

Donanım ve Hız: YSA, paralel yapısı nedeniyle büyük ölçekli entegre devre (VLSI) teknolojisi ile gerçekleştirilebilir. Bu özellik, YSA'nın hızlı bilgi işleme yeteneğini artırır ve gerçek zamanlı uygulamalarda arzu edilir.

Analiz ve Tasarım Kolaylığı: YSA'nın temel işlem elemanı olan hücrenin yapısı ve modeli, bütün YSA yapılarında yaklaşık aynıdır. Dolayısıyla, YSA'nın farklı uygulama alanlarındaki yapıları da standart yapıdaki bu hücrelerden oluşacaktır. Bu nedenle, farklı uygulama alanlarında kullanılan YSA'ları benzer öğrenme algoritmalarını ve teorilerini paylaşabilirler. Bu özellik, problemlerin YSA ile çözümünde önemli bir kolaylık getirecektir.

7.2.2.2. Yapay Sinir Ağlarının Tarihi Gelişimi

İnsan daima kendi beyinin yapısı ve çalışması hakkında merak sahibi olmuştur. Beynin üstün özellikleri, bilim adamlarını üzerinde çalışmaya zorlamış ve insan sinir sisteminin yapısı ve fonksiyonları hakkındaki bilgi zamanla artmıştır. Birbiri ile bağlantılı olan ve sayıları milyarları bulan nöronlar, en gelişmiş bilgisayarla kıyaslandığında bile,

dev bir sistemi oluşturmaktadır. Araştırmacılar, nöronların fonksiyonları ve birbiri ile olan bağlantıları daha iyi anladıkça teorilerini test etmek amacı ile matematiksel modeller geliştirme imkânı bulmuştur. Böylece sinir modellemenin, birincisi insan sinir sisteminin fizyolojik ve psikolojik işleyişini anlamak, ikincisi de beynine benzeyen fonksiyonlar gerçekleştiren yapay sinir ağları üretmek olmak üzere birbirini karşılıklı olarak destekleyen iki ana hedef belirlenmiştir.

Bu gelişmelerle birlikte yapay sinir ağları ile ilgili çalışmalar 1943 yılında başlamıştır. Mc Culloch ve Pitts tarafından yapılan çalışmayla yapay nöronlardan oluşan bir ağın matematiksel ve mantıksal işlevleri yapabileceği gösterilmiştir. 1949 yılında Hebb, ağı oluşturan bağlantıları ayarlamak için ilk öğrenme kuralını önermiştir.

1950 ve 1960'lı yıllarda, bir grup araştırmacı bu biyolojik gelişmeleri birleştirerek ilk yapay sinir ağını üretmişlerdir. İlk olarak elektrik devreleri şeklinde üretilen ağ, daha sonra bilgisayar simülasyonu haline dönüştürülmüştür. Marvin Minsky, Frank Rosenblatt, Bernard Winrow ve daha birçok bilim adamları tek yapay nöron katmanından oluşan ağlar geliştirdiler. Perceptron adı verilen bu ağlar, hava tahmini, elektrokardiogramlar analizleri ve yapay görme gibi çeşitli alanlarda kullanılmıştır. Bu dönemde bilim adamları zekanın anlaşıldığı, çözüldüğü düşüncesine beynin benzerini üretmenin yeterince büyük bir ağın oluşturulmasından ibaret olduğu iyimserliğine kapıldılar.

1969'larda yapılan çalışmalar, ağların o güne kadar çözebildiği problemlere genel hatları ile benzeyen farklı problemleri çözümleyememiştir. Bu sebeple bilinmeyen başarısızlıklar sonunda Marvin Minsky, matematiksel teknikleri kullanarak, ağ işlemleriyle ilgili sağlam teoriler geliştirmiş ve Perceptrons adlı kitabıyla, Minsky ve Papert o zaman kullanımda olan tek katmanlı ağların teorik olarak oldukça basit problemleri çözemeyeceğini ispatlamışlardır. Sonuçta Minsky yapay sinir ağlarının başarılı olacağı fikrine karşıydı. Bu sonuçlar karşısında yapay sinir ağları ile ilgili olan çalışmalara teşvik destekleri çekilmiş ve bu alandaki araştırmalar durma noktasına gelmiş, 20 yıllık karanlık bir döneme girmiştir. Ancak bazı bilim adamları çalışmalarına devam etmiştir. 1976'da Grossberg, Adaptif Rezonans Teori (ART)'yi, 1982'de Hopfield dinamik Hopfield ağını (recurrent network) geliştirmiştir.

1986 yılında, Rumelhart ve Mc Clelland çok katmanlı ileri beslemeli ağlarda geriye yayılma algoritmasını ortaya koyarak Minsky ve Papert tarafından ortaya konan problemi çözmüş ve yapay sinir ağlarına olan ilgiyi bir anda artırmışlardır.

Son yıllarda, bu alanda yapılan araştırmalar büyük bir ivme kazanmış ve yapay sinir ağları günümüzde de devamlı gelişme göstermektedir. Hatta bu teknolojinin ticari kısmıyla ilgilenen şirketler ortaya çıkmış ve birçok alana uygulanmıştır.

7.2.2.3. Yapay Sinir Ağları (YSA)'nın Uygulama Alanları

Son yıllarda YSA'ları, özellikle günümüze kadar çözümü güç ve karmaşık olan yada ekonomik olmayan çok farklı alanlardaki problemlerin çözümüne uygulanmış ve genellikle başarılı sonuçlar alınabilmektedir. YSA'ları çok farklı alanlara uygulanabildiğinden bütün uygulama alanlarını burada sıralamak zor olmakla birlikte genel bir sınıflandırma ile YSA' nın uygulama alanları aşağıdaki gibi 6 grup içerisinde toplanabilir.

Arıza Analizi ve Tespiti: Bir sistemin, cihazın ya da elemanın düzenli (doğru) çalışma şeklini öğrenen bir YSA yardımıyla bu sistemlerde meydana gelebilecek arızaların tanımlanma olanağı vardır. Bu amaçla YSA; elektrik makinalarının, uçakların yada bileşenlerinin, entegre devrelerin v.s. arıza analizinde kullanılmıştır.

Tıp Alanında: EEG ve ECG gibi tıbbi sinyallerin analizi, kanserli hücrelerin analizi, protez tasarımı, transplantasyon zamanlarının optimizasyonu ve hastanelerde giderlerin optimizasyonu v.s gibi uygulama yeri bulmuştur.

Savunma Sanayi: Silahların otomasyonu ve hedef izleme, nesneleri/görüntüleri ayırma ve tanıma, yeni algılayıcı tasarımı ve gürültü önleme gibi alanlara uygulanmıştır.

Haberleşme: Görüntü ve veri sıkıştırma, otomatik bilgi sunma servisleri, konuşmaların gerçek zamanda çevirisi gibi alanlarda uygulama örnekleri vardır.

Üretim: Üretim sistemlerinin optimizasyonu, ürün analizi ve tasarımı, ürünlerin (entegre, kağıt, kaynak v.s.) kalite analizi ve kontrolü, planlama ve yönetim analizi alanlarına uygulanmıştır.

Otomasyon ve Kontrol: Uçaklarda otomatik pilot sistemi otomasyonu, ulaşım araçlarında otomatik yol bulma/gösterme, robot sistemlerin kontrolü, doğrusal olmayan sistem

modelleme ve kontrolü, elektrikli sürücü sistemlerin kontrolü gibi yaygın bir uygulama yeri bulmuştur.

7.2.2.4. Yapay Sinir Ağlarında Öğrenme

YSA'nın en önemli özelliklerinden biri, ilgilendiği problemde aldığı örneklerle problemi öğrenerek öz yeteneğini düzeltebilmesidir. YSA, tanımlanan bir ölçüte göre ağı serbest parametrelerinin ardışıl olarak uyarlanmasıyla problemi öğrenir. YSA açısından öğrenme aşağıdaki gibi tanımlanır.

Öğrenme, YSA'nın ilgilendiği ortam tarafından ağı belirli bir süre uyarılmasıyla YSA'nın serbest parametrelerinin, arzu edilen öz yeteneği sağlayacak şekilde ayarlanması işlemidir ve öğrenmenin tipi, parametre değişikliklerinin yapılış şekline bağlıdır.

Bu tanıma göre öğrenme sürecinde; ağı uyarılması, bu uyarının sonucu olarak ağı parametrelerinin uyarılması ve ağı probleme yeni tepkisini vermesi gerekir. YSA'daki herhangi bir ağırlık ele alınırsa öğrenme, matematiksel olarak aşağıdaki gibi ifade edilir.

$$W_{\text{yeni}} = W_{\text{eski}} \pm \Delta W \quad (7.2.)$$

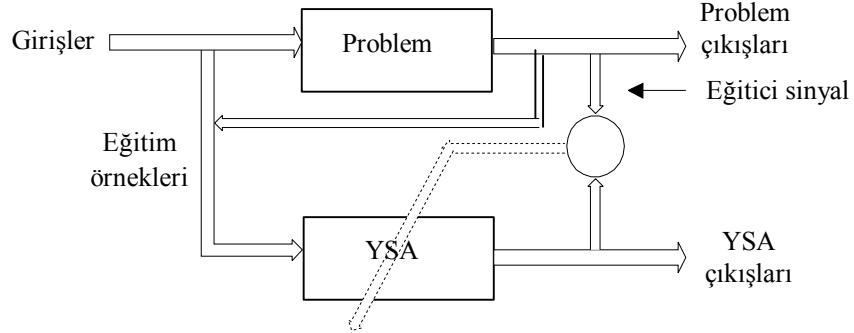
Burada ΔW , belirli bir kurala göre hesaplanarak o anki ağırlıklara uygulanacak düzeltme miktarını verir ve ΔW yı belirlemek için tanımlanmış kurallara öğrenme algoritmaları ya da kuralları denir. YSA'nın ilgilendiği ortam tarafından uyarılma yöntemi de öğrenmede önemli bir etkidir ve bu tanımlara göre öğrenme çeşitli sınıflara ayrılır.

Öğrenme Yöntemleri

Öğrenmenin tanımından, YSA'nın bir problemi çözebilmesi için ilgilendiği problem tarafından uyarılması gerektiği anlaşılmaktadır. YSA'nın ağırlıklarının uyarlanabilmesi için ihtiyaç duyduğu uyarı sinyallerine göre öğrenme 3 guruba ayrılır.

- **Eğitici Öğrenme:** YSA'nın öğrenebilmesi için ağı ilgilendiği ortamın (problemin) davranışlarını ihtiva eden bir eğitici sinyal kullanılır ve bu sinyal, YSA için arzu edilen tepkiyi temsil eder. Eğitici sinyalle birlikte problemde alınan ağ girişleri eğitim örneklerini oluşturur. Eğitici çıkış ile gerçek ağ çıkışı arasındaki hata sinyaline göre YSA ağırlıkları uyarlanır. Sonuçta, eğitici sinyalde bulunan ilgili problemin davranışları YSA tarafından bilinir ve eğitimsiz de aynı davranışı gösterebilir. Bu özelliği ile eğitici öğrenme fonksiyon yaklaştırma, nesne tanıma, sistem tanımlama ve

uyarlamalı denetim alanlarında kullanılan YSA'ları için etkin bir öğrenme yöntemidir. Eğitici öğrenme yöntemi, Şekil 7.12.'de verilen blok şema ile gösterilebilir.

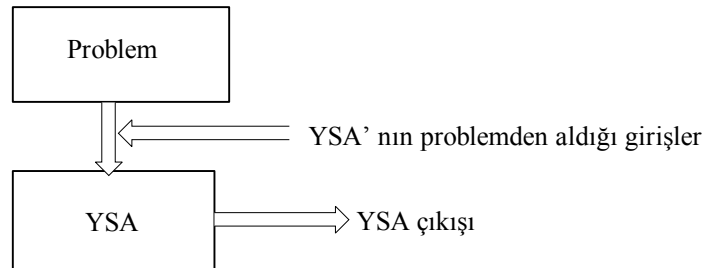


Şekil 7.12. Eğitici Öğrenme Yöntemi.

- **Eğitici Öğrenme:** Eğitici ya da kendiliğinden düzenlemeli öğrenme yönteminde ağın öğreneceği belirgin davranış örnekleri yani eğitici bir sinyal yoktur. Ağ girişleri üzerinden gerçekleştirilmek istenen bir amaca göre YSA ağırlıkları ayarlanır. Eğitici öğrenme genellikle,

- ağ giriş verilerini kümelemek,
- sürekli zaman ağ girişlerini nitelendirmek,
- ağ giriş verilerini daha farklı boyutlu uzayda göstermek,
- ağ giriş sinyalini temsil eden özellikleri belirlemek

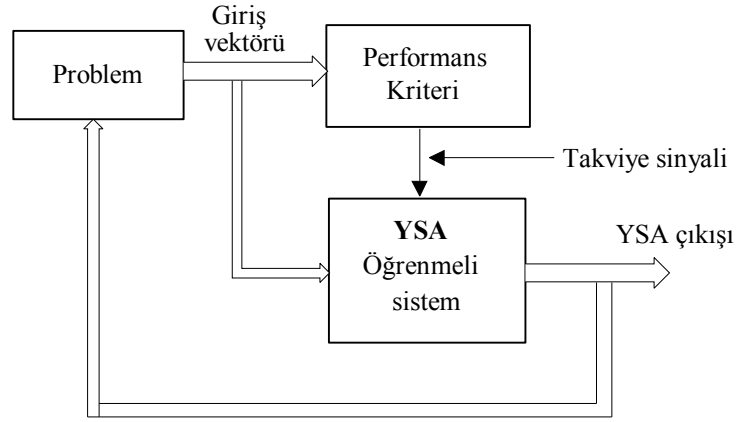
gibi amaçlar için kullanılır. RTFA'da, YSA'nın giriş verilerini kümeleyerek en iyi taban fonksiyonu merkezlerinin belirlenmesi, bir sinyalin öz niteliklerini çıkararak sinyal, nesne ve ses tanıma gibi uygulamalarda eğitici öğrenme yöntemleri kullanılmıştır (Şekil 7.13.).



Şekil 7.13. Eğitici Öğrenme Yöntemi.

- **Takviyeli Öğrenme:** Takviyeli öğrenme yönteminde, YSA'nın öğrenmesi için bir eğitici sinyal bulunmaz ancak, ağın davranışının uygun olup olmadığını bildiren bir öz

yetenek bilgisine göre ağırlıklar ayarlanır. Bu nedenle genellikle gerçek zamanda öğrenme yöntemidir ve deneme yanılma esasına göre YSA öğrenir (Şekil 7.14.).



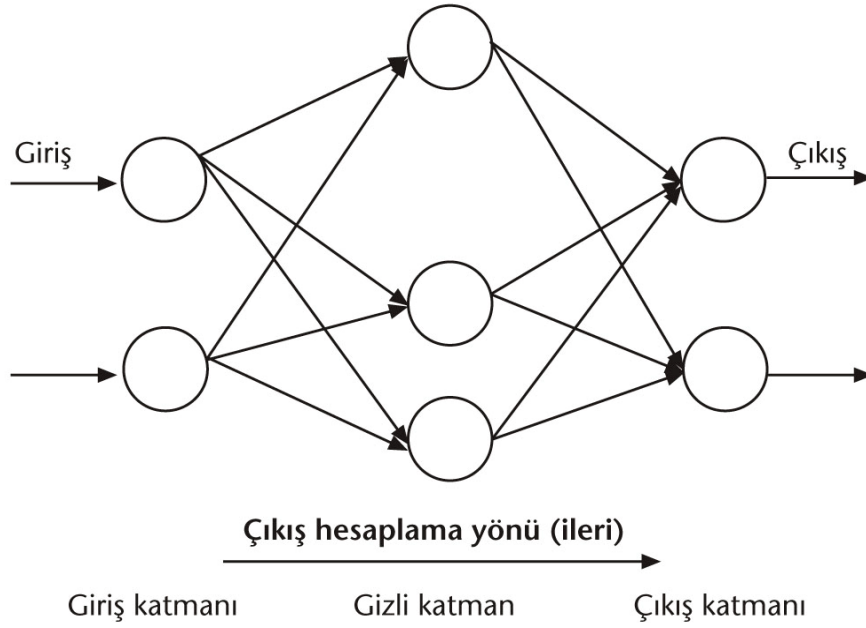
Şekil 7.14. Takviyeli öğrenme yöntemi

7.2.2.5. Yapay Sinir Ağı Yapıları

Yapay sinir ağları, hücrelerin birbirleri ile çeşitli şekillerde bağlanmalarından oluşur. Hücre çıkışları, ağırlıklar üzerinden *diğer hücrelere* ya da *kendisine* giriş olarak bağlanabilir ve bağlantılarda gecikme birimi de kullanılabilir. Hücrelerin bağlantı şekillerine, öğrenme kurallarına ve aktivasyon fonksiyonlarına göre çeşitli YSA yapıları geliştirilmiştir. Bu bölümde, çeşitli problemlerin çözümünde kullanılan ve kabul görmüş bazı YSA yapıları ayrıntısına girmeksizin genel özellikleri ile tanıtılacaktır.

i. İleri Beslemeli Yapay Sinir Ağları (İBYSA)

İleri beslemeli YSA'da, hücreler katmanlar şeklinde düzenlenir ve bir katmandaki hücrelerin çıkışları bir sonraki katmana ağırlıklar üzerinden giriş olarak verilir. Giriş katmanı, dış ortamlardan aldığı bilgileri hiçbir değişikliğe uğratmadan orta (gizli) katmandaki hücrelere iletir. Bilgi, orta ve çıkış katmanında işlenerek ağ çıkışı belirlenir. Bu yapı ile ileri beslemeli ağlar doğrusal olmayan statik bir işlevi gerçekleştirir. İleri beslemeli 3 katmanlı YSA'nın, orta katmanında yeterli sayıda hücre olmak kaydıyla, herhangi bir sürekli fonksiyonu istenilen doğrulukta yaklaştırabileceği gösterilmiştir. En çok bilinen geriye yayılım öğrenme algoritması, bu tip YSA ların eğitiminde etkin olarak kullanılmakta ve bazen bu ağlara geriye yayılım ağları da denmektedir. Şekil 7.15.'de giriş, orta ve çıkış katmanı olmak üzere 3 katmanlı ileri beslemeli YSA yapısı verilmiştir.



Şekil 7.15. İleri beslemeli 3 katmanlı Yapay Sinir Ağı (YSA) yapısı.

İleri beslemeli 3 katmanlı ve **çıkış katmanı doğrusal** olan YSA'nın matematiksel modeli, $\mathbf{x}$: giriş vektörünü, $\mathbf{o}$: orta katman çıkış vektörünü, $\mathbf{y}$: ağ çıkış vektörünü göstermek üzere Denklem 7.3.'deki gibi yazılabilir. x_0 ve o_0 girişleri, polarma girişleri olarak alınmıştır.

$$v_j = \sum_{i=0}^n W_{ji} \cdot x_i, \quad o_j = f(v_j) \quad j=1,2,\dots,m \quad (7.3.)$$

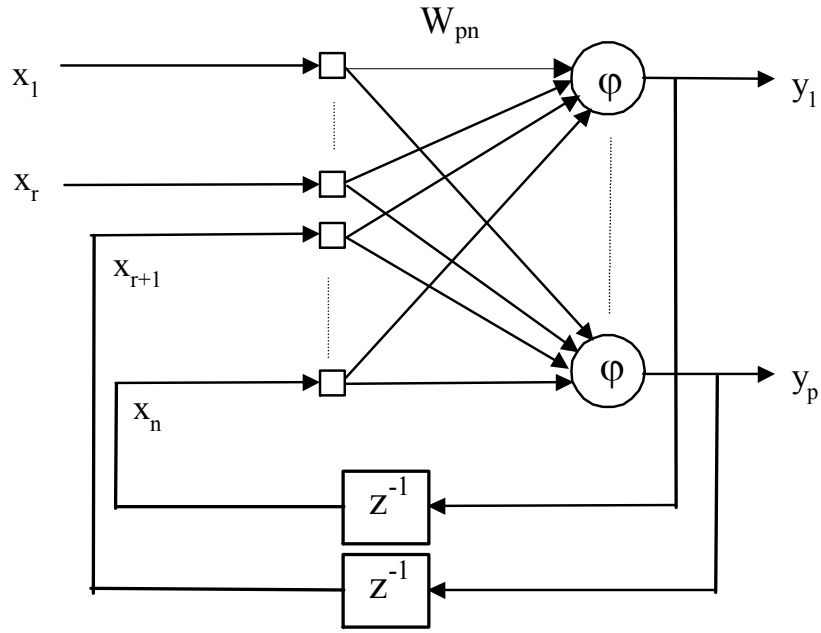
$$y_l = \sum_{j=0}^m \theta_{lj} \cdot o_j \quad l=1,2,\dots,p$$

Herhangi bir problemi çözmek amacıyla kullanılan YSA da, katman sayısı ve orta katmandaki hücre sayısı gibi kesin belirlenememiş bilgilere rağmen nesne tanıma ve sinyal işleme gibi alanların yanı sıra ileri beslemeli YSA, sistemlerin tanınması ve denetiminde de yaygın olarak kullanılmaktadır.

ii. Geri Beslemeli Yapay Sinir Ağları (GBYSA)

Geri beslemeli YSA'da, en az bir hücrenin çıkışı kendisine ya da diğer hücrelere giriş olarak verilir ve genellikle geri besleme bir geciktirme elemanı üzerinden yapılır. Geri besleme, bir katmandaki hücreler arasında olduğu gibi katmanlar arasındaki hücreler

arasında da olabilir. Bu yapısı ile geri beslemeli YSA, doğrusal olmayan dinamik bir davranış gösterir. Dolayısıyla, geri beslemenin yapılış şekline göre farklı yapıda ve davranışta geri beslemeli YSA yapıları elde edilebilir. Bu nedenle, bu bölümde bazı geri beslemeli YSA yapılarında örnekler verilecektir. Şekil 7.16.'de iki katmanlı ve çıkışlarından giriş katmanına geri beslemeli bir YSA yapısı görülmektedir.



Şekil 7.16. Geri beslemeli iki katmanlı Yapay Sinir Ağı (YSA).

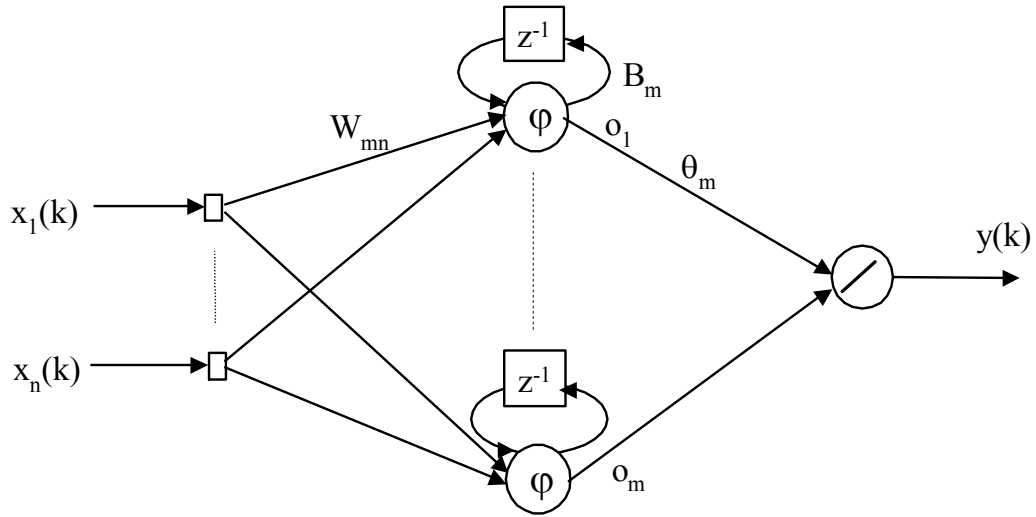
Şekil 7.16.'da verilen geri beslemeli YSA da giriş vektörü, r adet dış giriş ve p adet gecikmiş ağ çıkışlarından oluşmaktadır. Buna göre YSA' nın giriş vektörü aşağıdaki gibi yazılabilir.

$$x = (x_1, x_2, \dots, x_r, y_1(-1), y_2(-1), \dots, y_p(-1)) \quad (7.4.)$$

Denklem 7.4. ile tanımlanan toplam $n = r + p$ adet ağ girişine göre YSA'nın çıkışları Denklem 7.5.'deki gibi yazılabilir.

$$y_j = f\left(\sum_{i=0}^n W_{ji} \cdot x_i\right) \quad j = 0, 1, 2, \dots, p \quad (7.5.)$$

Geri beslemeli YSA'ları; hücreler arası ya da katmanlar arası geri besleme yapılış şekline göre farklı isimlerle söylenir. Genellikle derecesi bilinmeyen dinamik sistemlerin tanımlanmasında kullanılan diğer bir YSA yapısı, gizli katman hücrelerinde öz geri beslemenin kullanıldığı ve yöresel geri-küresel ileri beslemeli (YGKİ) olarak söylenen Şekil 7.17.'de verilen YSA'dır.



Şekil 7.17. Yöresel geri-küresel ileri (YGKİ) beslemeli Yapay Sinir Ağı yapısı.

YGKİ ağlar, ileri beslemeli YSA'nın eğitim algoritmalarında gerçekleştirilen küçük değişikliklerle eğitilebilmeleri nedeniyle ileri ve geri beslemeli YSA'nın ortak özelliklerini taşımaktadır. Şekil 7.17.'ye göre YGKİ YSA'nın matematiksel ifadesi aşağıdaki gibi yazılabilir.

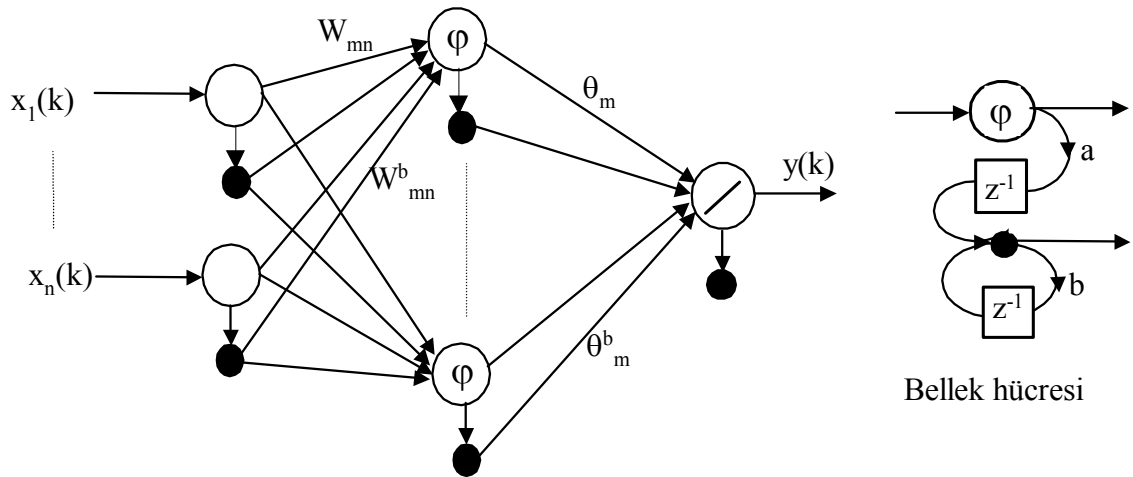
$$v_j(k) = \sum_{i=0}^n W_{ji} \cdot x_i(k) + B_j \cdot o_j(k-1) \quad , \quad o_j(k) = f(v_j(k)) \quad (7.6.)$$

$$y(k) = \sum_{j=0}^m \theta_j \cdot o_j(k) \quad (7.7.)$$

Özellikle bozucu ve ölçülemeyen girişleri olan dinamik sistemleri modellemek amacıyla kullanılmış ve başarılı sonuçlar alınmıştır.

iii. Bellek Hücreli YSA Yapıları (BHYSA)

Doğrusal olmayan sistemlerin tanılanması ve denetiminde, katmanlı YSA yapıları etkin olarak kullanılmaktadır. YSA ile sistem tanılamada, doğru model yapısının seçilebilmesi ve model girişlerinin belirlenebilmesi için sistemin giriş ve çıkışının gecikme derecelerinin bilinmesi gerekir. Sistemin derecesinin doğru belirlenememesi, modelde temsil edilemeyen dinamikler nedeniyle kararlı ve değişen dinamik şartlarda doğru bir model elde edilmesini etkiler. Bu nedenle, geri beslemeli YSA yapıları kullanılarak sistemin derecesine ihtiyaç duymayan tanı modelleri geliştirilmiştir. Şekil 7.18.'de Bellek Hücreli Yapay Sinir Ağları (BHYSA) olarak söylenen ve ağdaki her bir hücre için bir bellek hücresinin kullanıldığı katmanlı-geri beslemeli bir ağ yapısı verilmiştir.



Şekil 7.18. Bellek hücreli yapay sinir ağı ve bellekli bir hücrenin yapısı.

BHYSA' da her bir ağ hücresine ait olan bellek hücresi, bir ağırlık (b_j) üzerinden öz geri besleme girişine ve başka bir ağırlık üzerinden (a_j) ait olduğu hücrenin gecikmiş girişine göre bir çıkış üretir. Çıkış katmanında ise genellikle sadece öz geri besleme kullanılır. Buna göre BHYSA' nın matematiksel ifadesi aşağıdaki gibi yazılabilir.

$$x_i^b(k) = w_j^a \cdot x_i(k-1) + w_j^b \cdot x_i^b(k-1) \quad (7.8.)$$

$$v_j(k) = \sum_{i=1}^n \{W_{ji} \cdot x_i(k) + W_{ji}^b \cdot x_i^b(k)\} \quad (7.9.)$$

$$o_j(k)=f\{v_j(k)\} \quad (7.10.)$$

$$o_j^b(k)=\theta_j^a.o_j(k-1)+\theta_j^b.o_j^b(k-1) \quad (7.11.)$$

$$y(k)=\sum_{j=1}^m \{\theta_j.o_j(k)+\theta_j^b.o_j^b(k)\}+\theta^c.y(k-1) \quad (7.12.)$$

BHYSA'nın doğrusal olmayan bir sistemi modelleme ve denetim yeteneği, sadece sistemin o an ki giriş ve bir önceki çıkış verileri model girişi alınarak incelenmiş ve tatmin edici sonuçlar alındığı gösterilmiştir. İleri beslemeli katmanlı YSA'nın sadece gizli katmanında bellek hücreleri kullanılarak bellek hücresinin, ait olduğu hücre çıkışının geçmişteki örneklerini giriş olarak aldığı ve zaman gecikmeli YSA olarak söylenen geri beslemeli ağ yapıları da incelenmiştir.

7.3. Genetik Algoritma ve Yapay Sinir Ağları (YSA) Kullanılarak Fermantasyon Prosesinin Modellenmesi

Fermantasyon proseslerinde, üreme ve ürün oluşumu hücre içinde cereyan eden binlerce biyokimyasal reaksiyon sonucu meydana gelen karmaşık bir olaydır. Mikrobiyal üreme ve ürün oluşumu, hücrenin içinde bulunduğu fiziksel ve kimyasal ortama gösterdiği tepkidir. Dolayısıyla üreme ve ürün oluşumunu anlamak için organizmanın içinde bulunduğu ortam ile metabolizması arasındaki ilişkiyi anlamak gerekir. Bu amaçla literatürde, biyoproseslerde mikrobiyal üreme, ürün oluşumu ve substrat tüketimini tanımlamak için kullanılan çok sayıda kinetik model mevcuttur. Mikrobiyal prosesleri ifade eden kinetik modeller genel olarak aşağıdaki gibi ifade edilebilir:

$$\frac{dx}{dt}=f_x(x,S,P) \quad \text{Mikroorganizma Üretim Hızı} \quad (7.13.)$$

$$\frac{dP}{dt}=f_p(x,S,P) \quad \text{Ürün Üretim Hızı} \quad (7.14.)$$

$$\frac{dS}{dt}=f_s(x,S,P) \quad \text{Substrat Tüketim Hızı} \quad (7.15.)$$

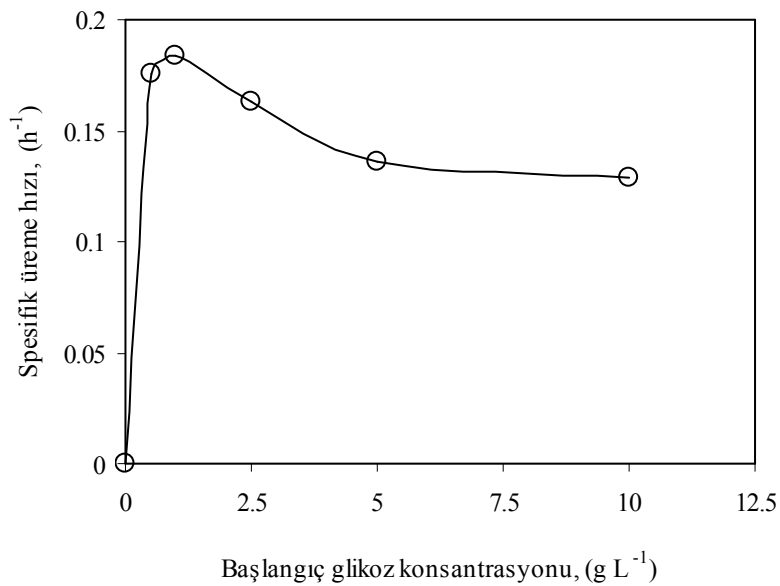
Mikrobiyal üreme, ürün oluşum ve substrat tüketim hızları, biyokütle derişimi (x), ürün derişimi (P) ve substrat derişimi (S) ile ilişkili olarak değışir. Mikrobiyal proseslerde üreme hızı mikroorganizma derişimi ile orantılı olarak artar.

$$r_x = \frac{dx}{dt} = \mu x \quad (4.4.)$$

Denklem 4.4.'ün integrasyonu aşağıdaki bağıntıyı verir:

$$\ln \frac{x}{x_0} = \mu t \quad (4.8.)$$

t 'ye karşı $\ln \left(\frac{x}{x_0} \right)$ 'in grafiğe geçirilmesi ile spesifik üreme hızı (μ) bulunur. Logaritmik fazda, spesifik üreme hızı sabit ve maksimum değerdedir. Yani, $\mu = \mu_{\max}$ 'dır. Deneysel olarak elde edilen verilerin logaritmik faza ait olan kısmından yararlanılarak, her bir başlangıç substrat derişimine ait *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) yabanil suşu için hesaplanan μ değerlerinin değışimi Şekil 7.19.'da verilmiştir. Şekil 7.19.'dan görüldüğü gibi yabanil suş için başlangıç substrat derişiminin artması ile spesifik üreme hızı 1 g/l glikoz derişimine kadar artmış, daha yüksek (2.5, 5.0 ve 10 g L⁻¹) glikoz derişiminde ise spesifik üreme hızı düşüş göstermiştir.



Şekil 7.19. *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) yabanil suşu için spesifik üreme hızının başlangıç substrat derişimi ile değışimi.

Bu durum substrat veya ürün inhibisyon etkisi ile açıklanabilir. *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) yabancı suşundan L-DOPA ve Dopamin üretimi üzerine glikoz derişiminin etkisinin incelendiğı fermentasyon ortamında elde edilen deney sonuçlarına göre çizilen grafiklerde de yüksek substrat derişiminin inhibisyon etkisi yaptığı Bölüm 6.1.1.'de verilen deney sonuçlarında da görülmüştü. Hücrelerin değışen substrat derişimine karşı davranışının değışmesi doğal bir olaydır. Hücrelerin spesifik üreme hızı (μ) termodinamik su aktivitesinden etkilenir. Besiyerinin fizikokimyasal özelliklerindeki değışimler (osmotik basınç, iyon gücü, dielektrik sabiti gibi) hücre zarının geçirgenliğini etkileyebilir [134].

Genel olarak biyoteknolojik çalışmalarda, fermentasyon proseslerinin modellenmesi, proses hakkında fikir edinmek ve tanımlamak için büyük öneme sahiptir. Bioproseslerin tasarımında kullanılan kinetik modeller, yapısal olan ve yapısal olmayan olmak üzere iki farklı mekanizma ile ifade edilir. Yapısal olmayan modellerde hücre sabit kimyasal bileşime sahip reaksiyona giren tek tür olarak kabul edilir. Yapısal olmayan modeller bioproseslerin anlaşılmasında ve gelişmesinde temel oluşturmaktadır. Ancak bazı durumlarda hücre içerisinde meydana gelen reaksiyonların daha ayrıntılı olarak ele alınması gerekebilir. Bu durumda da yapısal olan modellere başvurulur. Yapısal modeller ise organizmayı birden fazla değışkenle tanımlayan ve organizmanın fizyolojik durumunu dikkate alan modellerdir [182]. Hücrenin DNA, RNA, protein ve karbonhidrat gibi önemli bileşenlerini göz önüne alır. Ancak modele çok sayıda parametre sokmak ve bu parametreleri ölçmek için çok kritik deneyler yapmak gerektirmektedir. Bu durum yapısal olan modeller için bir dezavantaj oluşturmaktadır.

Kesikli olarak işletilen sistemlerin modellenmesinde ve modelde mevcut olan kinetik parametrelerin hesaplanması için uygulanan yöntemlerden biri, deneysel verilerin “doğruya uydurulması (fit)” dır. Bu yöntem modelin doğruya uydurulması sonucu grafik çizilerek uygulanır ve kinetik parametreler doğrunun eğim ve kaymasından yararlanılarak bulunur. Diğer yöntem ise deneysel verilerin “eğriye uydurulması (curve fitting)” dır. Bu yöntem bilgisayar yardımıyla uygun programlar kullanılarak yapılır ve sistemi tanımlayan model ve kinetik parametreler daha hassas olarak belirlenebilmektedir.

Citrobacter freundii (NRRL B-2643) yabancı suşu ve *Citrobacter freundii* pMK79 rekombinant suşu'ndan L-DOPA ve Dopamin üretiminin gerçekleştirildiğı bu çalışmada ortamını tanımlamak amacıyla literatürde yer alan çeşitli modellerin uygunluğu denenmiştir. Bu amaçla, daha önce çalkalamalı inkübatördeki erlenlerde maksimum ürün

eldesinin gerçekleştirildiği optimum fermantasyon ortamı ile kesikli olarak işletilen biyoreaktörde farklı glikoz derişimlerinde deneyler gerçekleştirilmiş ve elde edilen bu deney sonuçlarının modellerle olan uyumu *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) yabanil suşu için kontrol edilmiştir. Gerçekleştirilen deneylerde elde edilen deney sonuçları ile uygunluğu kontrol edilen model eşitlikleri Tablo 7.4.'te verilmiştir.

Bu model eşitlikleri içerisinde, Monod (1), Moser (2) ve Tessier (3) modelleri tek substrat limitasyonu ve inhibisyonlu üreme kinetiğini ifade eder. Andrews-Noack (4), Aiba (5) ve Loung (6) modelleri substrat inhibisyon kinetiğini, Levenspiel (7), Aiba (8), Jerusalimsky (9), Ghose-Tyagi (10) ve Hinshelwood (11) modelleri ise ürün inhibisyon kinetiğini ifade etmektedir.

Tablo 7.4.'te verilen model denklemleri içerisinde, Monod en yaygın olarak kullanılan yapısal olmayan kinetik modellerdendir. Mikrobiyal üreme ve ürün oluşumu substrat derişimi tarafından kontrol edilmektedir. Moser ve Tessier modelleri, Monod modeline alternatif olarak verilmiştir ve yine substrat sınırlaması hakimdir. Moser modelinde $n=1$ olduğu zaman Monod denklemine indirgenir. Tessier modeli, substrat difüzyon kontrollü üremeyi modellemek için önerilmiştir. Üreme hızı üzerine yüksek substrat derişimlerinin etkisini nicel olarak ifade etmek üzere geliştirilen modeller içerisinde en yaygın olarak kullanılanlardan Andrews-Noack, Aiba ve Loung modelleri substrat inhibisyon kinetiğini ifade etmektedir. Bazı biyoproseslerde ürün inhibisyonu önemli bir rol oynadığından, test edilen modeller arasında, Levenspiel, Aiba, Jerusalimsky, Ghose-Tyagi ve Hinshelwood tarafından ürün inhibisyon kinetiği için önerilen modeller de yer almaktadır.

Tablo 7.4. Fermantasyon ortamını tanımlamak amacıyla uygunluğu test edilen model eşitlikleri.

Model No	Model	$\frac{dx}{dt}$	$\frac{dP}{dt}$	$\frac{dS}{dt}$
1	Monod	$\mu_{\max} \left(\frac{S}{K_{sx} + S} \right) x$	$q_{\max} \left(\frac{S}{K_{sp} + S} \right) x$	$-\left(\frac{1}{Y_{s/x}} \frac{dx}{dt} \right) - mx$
2	Moser	$\mu_{\max} \left(\frac{S^n}{K_{sx} + S^n} \right) x$	$q_{\max} \left(\frac{S^n}{K_{sp} + S^n} \right) x$	$-\left(\frac{1}{Y_{s/x}} \frac{dx}{dt} \right) - mx$
3	Tessier	$\mu_{\max} \left(1 - \exp \left(-\frac{S}{K_{sx}} \right) \right) x$	$q_{\max} \left(1 - \exp \left(-\frac{S}{K_{sp}} \right) \right) x$	$-\left(\frac{1}{Y_{s/x}} \frac{dx}{dt} \right) - mx$
4	Andrews-Noack	$\mu_{\max} \left(\frac{S}{1 + \frac{K_{sx}}{S} + \frac{S}{K_{is}}} \right) x$	$q_{\max} \left(\frac{S}{1 + \frac{K_{sp}}{S} + \frac{S}{K_{ip}}} \right) x$	$-\left(\frac{1}{Y_{s/x}} \frac{dx}{dt} \right) - mx$
5	Aiba	$\mu_{\max} \left(\frac{S}{K_{sx} + S} \right) \exp \left(-\frac{S}{K_{is}} \right) x$	$q_{\max} \left(\frac{S}{K_{sp} + S} \right) \exp \left(-\frac{S}{K_{ip}} \right) x$	$-\left(\frac{1}{Y_{s/x}} \frac{dx}{dt} \right) - mx$

6	Luong	$\mu_{\max} \left(\frac{S}{K_{sx} + S} \right) \left(1 - \frac{S}{S_{s \max}} \right)^n x$	$q_{\max} \left(\frac{S}{K_{sp} + S} \right) \left(1 - \frac{S}{S_{p \max}} \right)^n x$	$-\left(\frac{1}{Y_{s/x}} \frac{dx}{dt} \right) - mx$
7	Levenspiel	$\mu_{\max} \left(\frac{S}{K_{sx} + S} \right) \left(1 - \frac{P}{P_{s \max}} \right)^n x$	$q_{\max} \left(\frac{S}{K_{sp} + S} \right) \left(1 - \frac{P}{P_{p \max}} \right)^n x$	$-\left(\frac{1}{Y_{s/x}} \frac{dx}{dt} \right) - mx$
8	Aiba	$\mu_{\max} \left(\frac{S}{K_{sx} + S} \right) \exp(-K_{px} P) x$	$q_{\max} \left(\frac{S}{K_{sp} + S} \right) \exp(-K_{pp} P) x$	$-\left(\frac{1}{Y_{s/x}} \frac{dx}{dt} \right) - mx$
9	Jerusalimsky	$\mu_{\max} \left(\frac{S}{K_{sx} + S} \right) \left(\frac{K_{ip}}{K_{ip} + P} \right) x$	$q_{\max} \left(\frac{S}{K_{sp} + S} \right) \left(\frac{K_{ipp}}{K_{ipp} + P} \right) x$	$-\left(\frac{1}{Y_{s/x}} \frac{dx}{dt} \right) - mx$
10	Ghose-Tyagi	$\mu_{\max} \left(1 - \frac{P}{P_{x \max}} \right) x$	$q_{\max} \left(1 - \frac{P}{P_{p \max}} \right) x$	$-\left(\frac{1}{Y_{s/x}} \frac{dx}{dt} \right) - mx$
11	Hinshelwood	$\mu_{\max} \left(\frac{S}{K_{sx} + S} \right) (1 - K_{px} P) x$	$q_{\max} \left(\frac{S}{K_{sp} + S} \right) (1 - K_{pp} P) x$	$-\left(\frac{1}{Y_{s/x}} \frac{dx}{dt} \right) - mx$

Kullanılan modeller, 4. dereceden Runge-Kutta metodu kullanılarak sayısal çözüm tekniği ile çözülmüştür. Nümerik hesaplamalar MATLAB 7.04 ve Polymath 6.1 versiyonuna sahip paket programlar kullanılarak yapılmıştır. Model içerisindeki kinetik parametreler, MATLAB'ın Genetik Algoritma Toolbox'ından yararlanılarak belirlenmiştir. Model eşitliklerinin Runge-Kutta metodu ile sayısal çözümü, ve modellere ait kinetik parametrelerin belirlenmesi için optimizasyon işlemi, programda eş zamanlı olarak gerçekleştirilmiştir. Genetik algoritma ile optimizasyon işlemi için amaç fonksiyonu olarak en küçük kareler metodu kullanılmıştır. En küçük kareler metodu, deneysel ve model değerleri arasındaki hatanın karelerinin toplamının ortalamasını ifade etmektedir. Fermantasyon proseslerinde, deneysel bulgular çok hassas değilse ve sınırlı sayıda veri varsa modeller arasındaki farkı görmek zordur [134]. Fermantasyon ortamını tanımlayan en uygun modeli belirlemek için, birinci kriter olarak, deneysel sonuçlarla modelin uygulanması sonucunda elde edilen sonuçların birbiriyle uyumuna grafiksel olarak bakılmış ve istatistiksel testler kullanılarak bu uyum sayısal olarak ifade edilmiştir. İkinci kriter olarak ise modelde yer alan kinetik parametrelerin, nümerik çözümden elde edilen değerlerinin büyüklükleri dikkate alınmıştır.

Citrobacter freundii (NRRL B-2643) yabanıl suşundan L-DOPA ve Dopamin üretimini incelediğimiz fermantasyon ortamını tanımlamak ve literatürde mevcut olan kinetik modellere uygunluğunu belirlemek amacıyla, optimize edilen fermantasyon ortamında 0.5, 1, 2.5, 5 ve 10 g L⁻¹'lik farklı glikoz derişimlerinde kesikli sistemde elde edilen deney sonuçları kullanılmıştır. Bu sonuçlardan yararlanılarak, Genetik Algoritma ile yapılan optimizasyon sonucu kinetik parametrelerin değerleri belirlenmiş ve elde edilen sonuçlar Tablo 7.5.'de verilmiştir. Literatürde yapılan modelleme çalışmalarının birçoğunda, her bir substrat derişimi için sistem ayrı ayrı modellenmiştir. Yapılan bu çalışmada da, her bir substrat derişimi için kullanılan modeller çok daha iyi uyum sağlamasına rağmen, sistemi tüm glikoz derişimleri için tanımlayan tek bir model belirlenmeye çalışılmıştır.

0.5, 1, 2.5, 5 ve 10 g L⁻¹ glikoz derişimleri ile oluşturulan fermantasyon ortamlarından deneysel olarak elde edilen mikroorganizma derişimi (biyokütle; x), L-DOPA derişimi (ürün; P) ve glikoz derişimi (substrat; S) değerleri kullanılarak, MATLAB 7.04 Genetik Algoritma Toolbox'ı yazılımları ile Tablo 7.5.'de verilen

modellerde yer alan katsayılar belirlenmiştir. Aynı glikoz derişimlerinde elde edilen deney sonuçları, katsayıları belirlenerek tanımlanmış 11 modelde kontrol edilmiştir. Deneysel sonuçlarla modellerden elde edilen bu sonuçlar arasındaki uyum, modelleme yeteneği (EF), hata karelerinin ortalama karekökü (RMSE) ve Khi-kare (χ^2) gibi istatistiksel testler kullanılarak model uygunluk dereceleri ifade edilmeye çalışılmıştır. MATLAB 7.04 ve Polymath 6.1 yazılımları ile elde edilen sonuçlar Tablo 7.4.'te verilmiştir. Bu işlemler sonucunda sistemin davranışını en iyi tanımlayan modelin seçilmesi hedeflenmiştir. En uygun modeli seçerken her başlangıç derişimi için, mikroorganizma derişimi (biyokütle; x), L-DOPA derişimi (ürün; P) ve glikoz derişimi (substrat; S) değerlerinin üçü için de en yüksek EF, en düşük RMSE ve χ^2 değerine sahip olan model tercih edilmiştir.

Çalışmada, sistem bir bütün olarak değerlendirilmiş, *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) yabanil suşundan hücre dışı L-DOPA üretiminin gerçekleştiği fermantasyon ortamını tanımlayan tek bir modelin belirlenmesi hedeflenmiştir. Ancak Tablo 7.6.'dan da görüldüğü gibi, tüm derişim aralıklarında sistem tek bir modelle ifade edilememiştir. Yine aynı tablodan görüldüğü gibi, 0.5 ve 1 g L⁻¹ glikoz derişimlerinde en yüksek modelleme yeteneği (EF), en düşük RMSE ve Khi-kare (χ^2) değerleri Tessier modelinde belirlenmiştir. Benzer şekilde 2.5, 5 ve 10 g L⁻¹ gibi daha yüksek glikoz derişimleri için en yüksek modelleme yeteneği (EF), en düşük RMSE ve Khi-kare (χ^2) değerleri Andrews-Noack modelinde belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre test edilen modeller içerisinde; 0.5 ve 1 g L⁻¹ glikoz derişimi aralığında sistemi en iyi tanımlayan modelin Tessier modeli olduğu, 2.5, 5 ve 10 g L⁻¹ glikoz derişimi aralığında ise Andrews-Noack modeli olduğu görülmüştür. Tessier modeli, substrat limitasyonu ve inhibisyonlu üreme kinetiğini ifade eden modeller içerisinde yer alırken, Andrews-Noack modeli, substrat inhibisyonlu üreme kinetiğini ifade eden modeller içerisinde yer almaktadır. *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) yabanil suşundan hücre dışı L-DOPA üretiminde, yüksek substrat derişiminin inhibisyon etkisi yarattığı daha önce yapılan deneysel çalışmalarda da belirlenmişti. 0.5 ve 1 g L⁻¹ glikoz derişimlerinde substrat derişimi ile L-DOPA üretiminin de arttığı, 2.5, 5 ve 10 g L⁻¹ glikoz derişiminde ise hücre dışı L-DOPA üretiminin daha düşük olduğu görülmüştü. Bu durum test edilen modellerden elde edilen sonuçlarla da uyum içerisinde. Başka bir deyişle; 0.5 ve 1 g

Tablo 7.5. MATLAB 7.04 Genetik Algoritma Toolbox’ı ile hesaplanmış, matematiksel modellere ait kinetik parametrelerin değerleri.

Model	Kinetik parametreler									
Monod	μ_{max} (h ⁻¹) 0.188	K_{sx} (g lt ⁻¹) 0.643		q_{pmax} (U g hücre ⁻¹ h ⁻¹) 6.04	K_{sp} (g lt ⁻¹) 0.00057		$Y_{x/s}$ (g g ⁻¹) 14.01		m (g g hücre ⁻¹ h ⁻¹) 0.022	
Moser	μ_{max} (h ⁻¹) 0.357	K_{sx} (g lt ⁻¹) 6.864	n 1.229	q_{pmax} (U g hücre ⁻¹ h ⁻¹) 7.139	K_{sp} (g lt ⁻¹) 0.00099	n 0.113	$Y_{x/s}$ (g g ⁻¹) 13.87		m (g g hücre ⁻¹ h ⁻¹) 0.0043	
Tessier	μ_{max} (h ⁻¹) 0.166	K_{sx} (g lt ⁻¹) 0.903		q_{pmax} (U g hücre ⁻¹ h ⁻¹) 13.762	K_{sp} (g lt ⁻¹) 0.169		$Y_{x/s}$ (g g ⁻¹) 10.97		m (g g hücre ⁻¹ h ⁻¹) 0.0242	
Andrews and Noack	μ_{max} (h ⁻¹) 0.437	K_{sx} (g lt ⁻¹) 16.40	K_{is} (g lt ⁻¹) 2.272	q_{pmax} (U g hücre ⁻¹ h ⁻¹) 5.140	K_{sp} (g lt ⁻¹) 0.7163	K_{ip} (g lt ⁻¹) 2.017	$Y_{x/s}$ (g g ⁻¹) 0.995		m (g g hücre ⁻¹ h ⁻¹) 0.5346	
Aiba	μ_{max} (h ⁻¹) 0.968	K_{sx} (g lt ⁻¹) 13.91	K_{is} (g lt ⁻¹) 13.87	q_{pmax} (U g hücre ⁻¹ h ⁻¹) 6.187	K_{sp} (g lt ⁻¹) 0.00005	K_{ip} (g lt ⁻¹) 3.779	$Y_{x/s}$ (g g ⁻¹) 8.355		m (g g hücre ⁻¹ h ⁻¹) 0.8052	
Luong	μ_{max} (h ⁻¹) 0.168	K_{sx} (g lt ⁻¹) 3.373	S_{smax} (g lt ⁻¹) 5.078	n 0.461	q_{pmax} (U g hücre ⁻¹ h ⁻¹) 0.219	K_{sp} (g lt ⁻¹) 0.430	S_{pmax} (g lt ⁻¹) 0.250	n 1.442	$Y_{x/s}$ (g g ⁻¹) 4.407	m (g g hücre ⁻¹ h ⁻¹) 2.176
Levenspiel	μ_{max} (h ⁻¹) 0.299	K_{sx} (g lt ⁻¹) 3.483	P_{smax} (g lt ⁻¹) 9.900	n 0.121	q_{pmax} (U g hücre ⁻¹ h ⁻¹) 3.716	K_{sp} (g lt ⁻¹) 0.019	P_{pmax} (g lt ⁻¹) 0.139	n 0.105	$Y_{x/s}$ (g g ⁻¹) 34.01	m (g g hücre ⁻¹ h ⁻¹) 1.826
Aiba	μ_{max} (h ⁻¹) 0.382	K_{sx} (g lt ⁻¹) 0.288	K_{ps} (g lt ⁻¹) 0.0094	q_{pmax} (U g hücre ⁻¹ h ⁻¹) 15.63	K_{sp} (g lt ⁻¹) 0.0703	K_{pp} (g lt ⁻¹) 0.00005	$Y_{x/s}$ (g g ⁻¹) 34.21		m (g g hücre ⁻¹ h ⁻¹) 0.167	
Jerusalimsky	μ_{max} (h ⁻¹) 1.858	K_{sx} (g lt ⁻¹) 0.0017	K_{ip} (g lt ⁻¹) 37.62	q_{pmax} (U g hücre ⁻¹ h ⁻¹) 25.93	K_{sp} (g lt ⁻¹) 0.0005	K_{ipp} (g lt ⁻¹) 22.99	$Y_{x/s}$ (g g ⁻¹) 44.96		m (g g hücre ⁻¹ h ⁻¹) 0.352	
Ghose and Tyagi	μ_{max} (h ⁻¹) 0.0011		P_{xmax} (g lt ⁻¹) 56.87	q_{pmax} (U g hücre ⁻¹ h ⁻¹) 0.00006	P_{pmax} (g lt ⁻¹) 24.96		$Y_{x/s}$ (g g ⁻¹) 41.55		m (g g hücre ⁻¹ h ⁻¹) 0.0572	
Hinshelwood	μ_{max} (h ⁻¹) 3.350	K_{sx} (g lt ⁻¹) 21.27	K_{px} (g lt ⁻¹) 0.0002	q_{pmax} (U g hücre ⁻¹ h ⁻¹) 9.982	K_{sp} (g lt ⁻¹) 0.0005	K_{pp} (g lt ⁻¹) 0.0006	$Y_{x/s}$ (g g ⁻¹) 42.40		m (g g hücre ⁻¹ h ⁻¹) 0.257	

L^{-1} glikoz derişimlerindeki biyoproses ortamı substrat limitasyonu ve inhibisyonlu üreme kinetiğini ifade eden Tessier modeli ile tanımlanırken, 2.5, 5 ve 10 g L^{-1} glikoz derişimlerindeki ortam ise substrat inhibisyonlu üreme kinetiğini ifade eden Andrews-Noack modeli ile tanımlanmaktadır.

Test edilen modeller içerisinde ürün inhibisyonunu ifade eden modellerin hiçbirisi sistemi tanımlamamıştır. Bu durum da, üretilen L-DOPA'nın proses üzerinde inhibisyon etkisi yapmadığı sonucu çıkarılabilir.

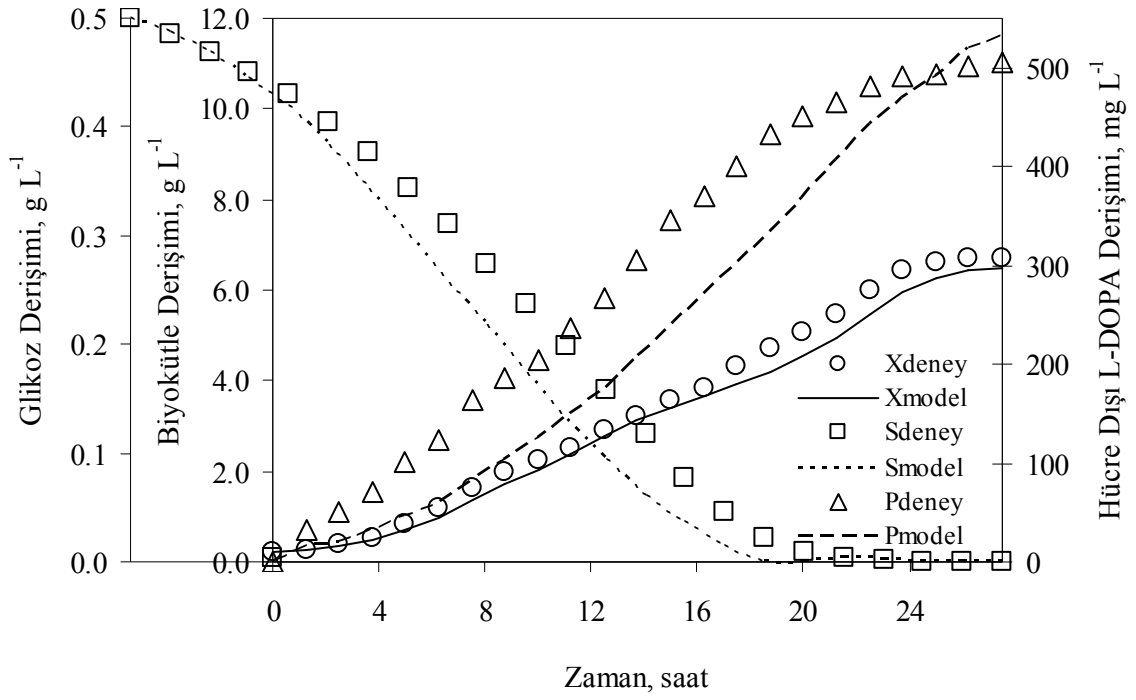
0.5 ve 1 g L^{-1} glikoz derişimlerinde elde edilen deneysel biyokütle (x), ürün (P) ve substrat (S) değerleri ile bu şartlarda sistemi en iyi tanımlayan model olarak seçilen Tessier modelinden elde edilen sonuçların zamanla değişimleri karşılaştırmalı olarak Şekil 7.20. ile 7.21. arasında verilirken, 2.5, 5 ve 10 g L^{-1} glikoz derişimlerinde elde edilen deneysel sonuçlar ile Andrews-Noack modelinden elde edilen sonuçlar Şekil 7.22. ile 7.24.'de verilmiştir. Tablo 7.4. ışığında, ilgili şekiller incelendiğinde modelleme yeteneği (EF) değeri 1'e ne kadar yakınsa, deneysel değerler ile model değerlerinin uyumluluğu o kadar yüksektir ve matematiksel model biyoproses sistemini o kadar iyi tanımlar.

Tablo 7.6. İstatistiksel testler ile elde edilen sonuçlar (M.O.: *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643), 12.5 g L⁻¹ pepton, 10.0 g L⁻¹ Y.E., 2.5 g L⁻¹ amonyum sülfat, 1.0 g L⁻¹ kalsiyum klorür, pH_b: 7.0; Ekim oranı: % 2.5 v v⁻¹; Karıştırma hızı: 500 rpm; Havalandırma hızı: 600 vvm, Sıcaklık: 30 °C).

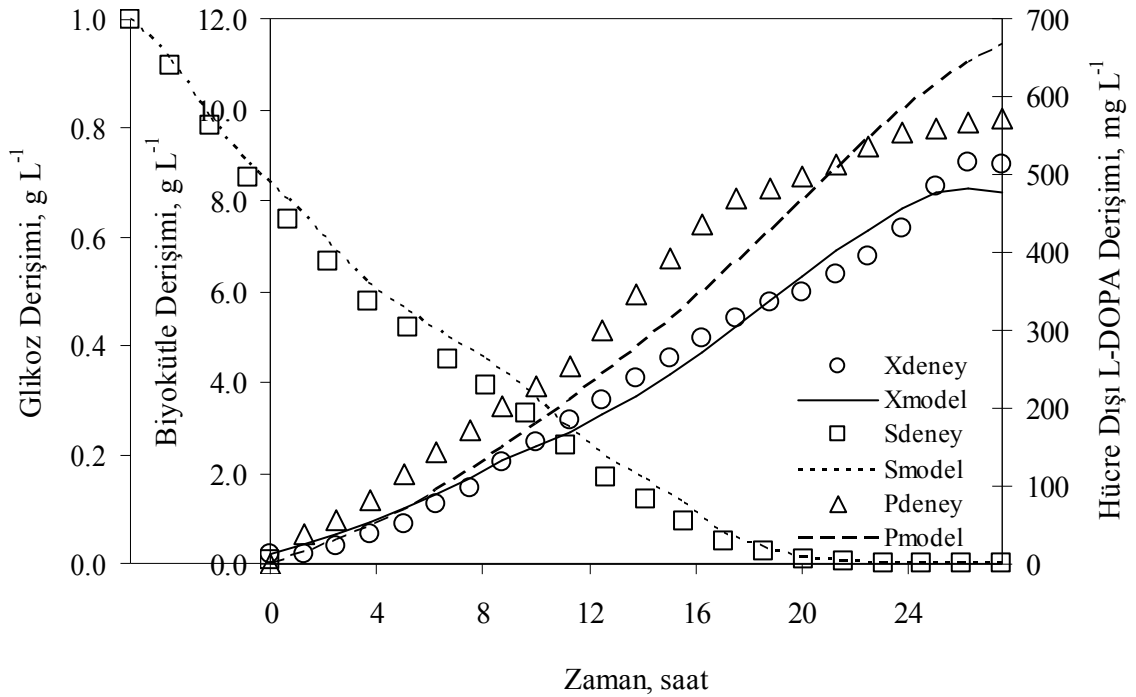
Model	Glikoz Derişimi (g L ⁻¹)	EF			RMSE			Khi-kare (χ^2)		
		EF _x	EF _P	EF _s	RMSE _x	RMSE _P	RMSE _s	χ^2_x	χ^2_P	χ^2_s
Monod	0.5	0.9414	0.5225	0.9115	0.00621	0.07715	0.01132	0.00884	0.09054	0.01556
	1.0	0.9667	0.5871	0.9457	0.00569	0.08132	0.00978	0.00509	0.06781	0.01115
	2.5	0.9645	0.6017	0.6181	0.00541	0.08422	0.04461	0.00547	0.06563	0.02653
	5.0	0.9341	0.5736	0.6674	0.00653	0.08563	0.02546	0.00836	0.07724	0.01746
	10.0	0.9032	0.5249	0.6491	0.00701	0.08397	0.02483	0.00909	0.08763	0.01801
Moser	0.5	0.9532	0.4974	0.7363	0.00826	0.12549	0.09412	0.00671	0.14536	0.06751
	1.0	0.9577	0.4163	0.8576	0.00899	0.14637	0.08754	0.00688	0.19746	0.05687
	2.5	0.9368	0.4625	0.7139	0.00854	0.14526	0.09456	0.00769	0.20747	0.04726
	5.0	0.7942	0.3741	0.8236	0.00943	0.14742	0.07963	0.00872	0.20847	0.04168
	10.0	0.7687	0.4063	0.8126	0.00902	0.11621	0.08051	0.00955	0.18273	0.03822
Tessier	0.5	0.9801	0.7942	0.9541	0.00501	0.02752	0.00652	0.00552	0.00941	0.00416
	1.0	0.9865	0.8649	0.9707	0.00523	0.00931	0.00593	0.00634	0.00863	0.00276
	2.5	0.9732	0.7075	0.9023	0.00603	0.01423	0.04921	0.00512	0.08514	0.01934
	5.0	0.9541	0.7342	0.8036	0.00665	0.03547	0.06397	0.00563	0.08876	0.08712
	10.0	0.9503	0.7181	0.7714	0.00642	0.04286	0.08346	0.00608	0.08739	0.09268
Andrews and Noack	0.5	0.6152	0.5934	0.4167	0.02341	0.05843	0.07864	0.02274	0.08746	0.11872
	1.0	0.6721	0.6007	0.2974	0.03217	0.05461	0.13751	0.06413	0.03467	0.19675
	2.5	0.9901	0.8834	0.9516	0.00227	0.00703	0.09430	0.00551	0.01379	0.09870
	5.0	0.9886	0.8249	0.9652	0.00534	0.00751	0.04674	0.00296	0.00871	0.08763
	10.0	0.9911	0.8164	0.9695	0.00671	0.00867	0.00972	0.00224	0.00973	0.00777
Aiba	0.5	0.9241	0.2393	0.4012	0.00465	0.13421	0.00415	0.00654	0.19423	0.08641
	1.0	0.9647	0.3507	0.6569	0.00524	0.00874	0.00398	0.00632	0.02274	0.00691
	2.5	0.5567	0.6180	0.4452	0.01423	0.02463	0.00983	0.01951	0.11822	0.15246
	5.0	0.4934	0.4897	0.2612	0.07614	0.14236	0.01649	0.03159	0.18643	0.13547
	10.0	0.4851	0.1885	0.3874	0.05549	0.15721	0.02436	0.03274	0.25769	0.10124

Model	Glikoz Derişimi (g L ⁻¹)	EF			RMSE			Khi-kare (χ^2)		
		EF _x	EF _p	EF _s	RMSE _x	RMSE _p	RMSE _s	χ^2_x	χ^2_p	χ^2_s
Luong	0.5	0.4421	0.1726	0.6214	0.08875	0.11243	0.07462	0.09401	0.27468	0.00991
	1.0	0.4311	0.2649	0.3017	0.08316	0.12374	0.19341	0.08219	0.23548	0.24003
	2.5	0.4723	0.1943	0.2467	0.07964	0.13527	0.15347	0.08517	0.22147	0.21715
	5.0	0.4055	0.2346	0.2563	0.08463	0.11876	0.18743	0.10631	0.19654	0.22811
	10.0	0.4273	0.2134	0.2974	0.08547	0.12873	0.18624	0.12485	0.20679	0.21727
Levenspiel	0.5	0.6173	0.2919	0.4425	0.05709	0.10719	0.06190	0.06799	0.27801	0.10686
	1.0	0.6072	0.3439	0.4434	0.05728	0.10722	0.06109	0.01147	0.22849	0.10680
	2.5	0.6790	0.2596	0.5286	0.05568	0.11431	0.10641	0.01457	0.26552	0.16835
	5.0	0.6581	0.3806	0.3805	0.05644	0.09828	0.09836	0.01026	0.13273	0.13296
	10.0	0.5868	0.4696	0.4641	0.06109	0.08574	0.08594	0.15566	0.09644	0.09776
Aiba	0.5	0.4625	0.3344	0.2308	0.07872	0.10722	0.12295	0.10762	0.22209	0.21862
	1.0	0.4557	0.2274	0.2925	0.07699	0.10628	0.10729	0.10372	0.27083	0.22244
	2.5	0.3819	0.1490	0.2833	0.09371	0.13596	0.12108	0.12797	0.25799	0.22452
	5.0	0.3947	0.1463	0.1922	0.08957	0.13680	0.12688	0.12523	0.27738	0.23350
	10.0	0.3957	0.1955	0.2637	0.08807	0.12913	0.10451	0.12226	0.26360	0.26733
Jerusalimsky	0.5	0.2968	0.4484	0.2017	0.11406	0.08873	0.12488	0.22309	0.09471	0.25959
	1.0	0.2502	0.2284	0.2907	0.09560	0.13330	0.11625	0.12351	0.22072	0.22422
	2.5	0.3433	0.2947	0.4242	0.11539	0.01147	0.07503	0.22369	0.22060	0.10652
	5.0	0.3744	0.3312	0.2287	0.06638	0.10175	0.13318	0.10490	0.12576	0.22060
	10.0	0.3236	0.1231	0.1904	0.11153	0.12248	0.13882	0.12971	0.33025	0.26406
Ghose and Tyagi	0.5	0.3857	0.3426	0.3242	0.10282	0.10254	0.11732	0.10157	0.11664	0.11998
	1.0	0.4492	0.1963	0.2050	0.09537	0.13896	0.12648	0.08772	0.24562	0.24035
	2.5	0.4387	0.2955	0.2987	0.07576	0.13773	0.11746	0.09837	0.22763	0.20742
	5.0	0.3550	0.1463	0.2357	0.09641	0.14974	0.13459	0.11396	0.25873	0.20391
	10.0	0.3862	0.2224	0.3320	0.10205	0.13982	0.10761	0.10135	0.23417	0.12053

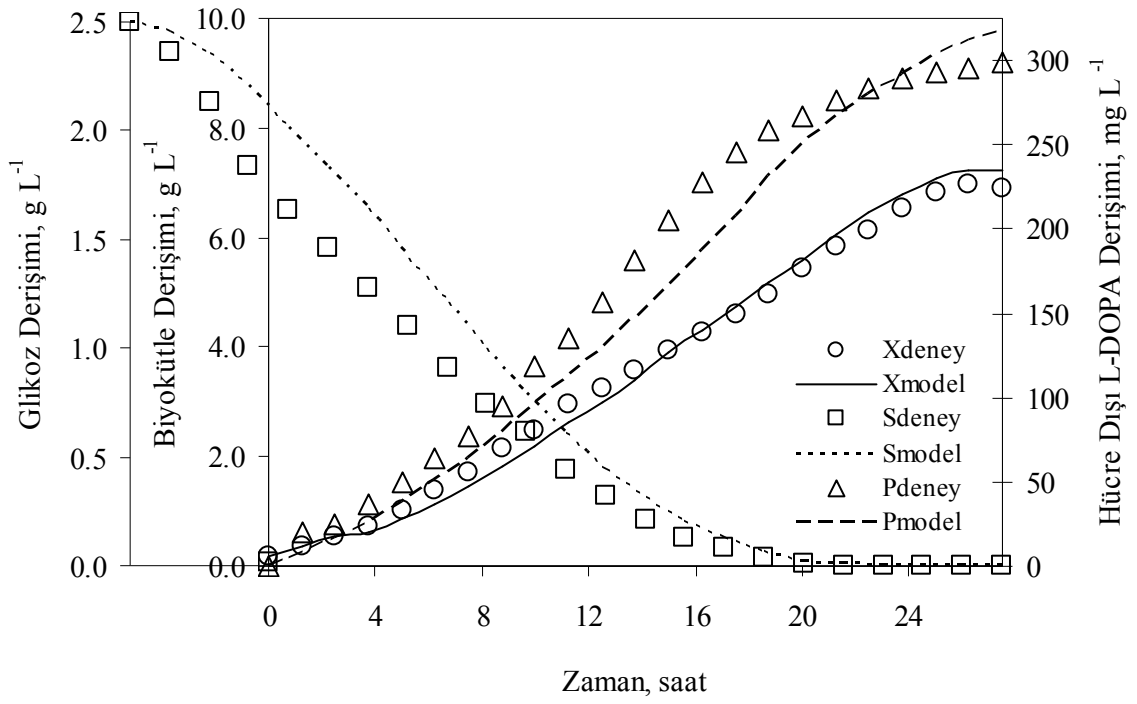
Model	Glikoz Derişimi (g L ⁻¹)	EF			RMSE			Khi-kare (χ^2)		
		EF _x	EF _p	EF _s	RMSE _x	RMSE _p	RMSE _s	χ^2_x	χ^2_p	χ^2_s
Hinshelwood	0.5	0.4528	0.3742	0.2557	0.07693	0.11626	0.12417	0.10429	0.12374	0.22073
	1.0	0.4495	0.4429	0.3617	0.07955	0.07780	0.12318	0.10666	0.10273	0.13028
	2.5	0.3733	0.3282	0.2554	0.11677	0.12296	0.12424	0.12656	0.21664	0.22097
	5.0	0.3928	0.5548	0.2117	0.10592	0.06174	0.13049	0.12252	0.27540	0.26106
	10.0	0.3483	0.2439	0.4603	0.11791	0.12872	0.08617	0.12301	0.24736	0.12114



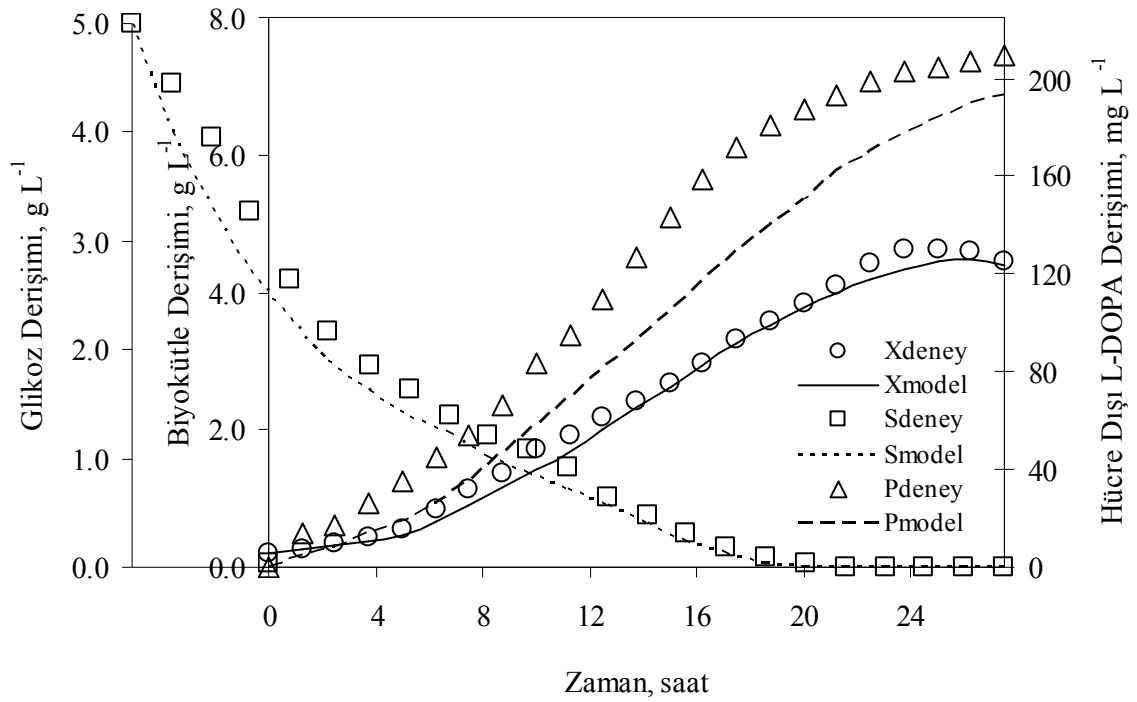
Şekil 7.20. 0.5 g L⁻¹ glikoz derişimindeki fermentasyon ortamında deneysel olarak elde edilen sonuçlarla Tessier modelinden elde edilen sonuçların zamanla değışimi (pH_b:7, Ekim oranı: % 2.5 v v⁻¹, Karıştırma hızı: 500 rpm, Sıcaklık: 30 °C, Hava giriş hızı: 0.6 vvm).



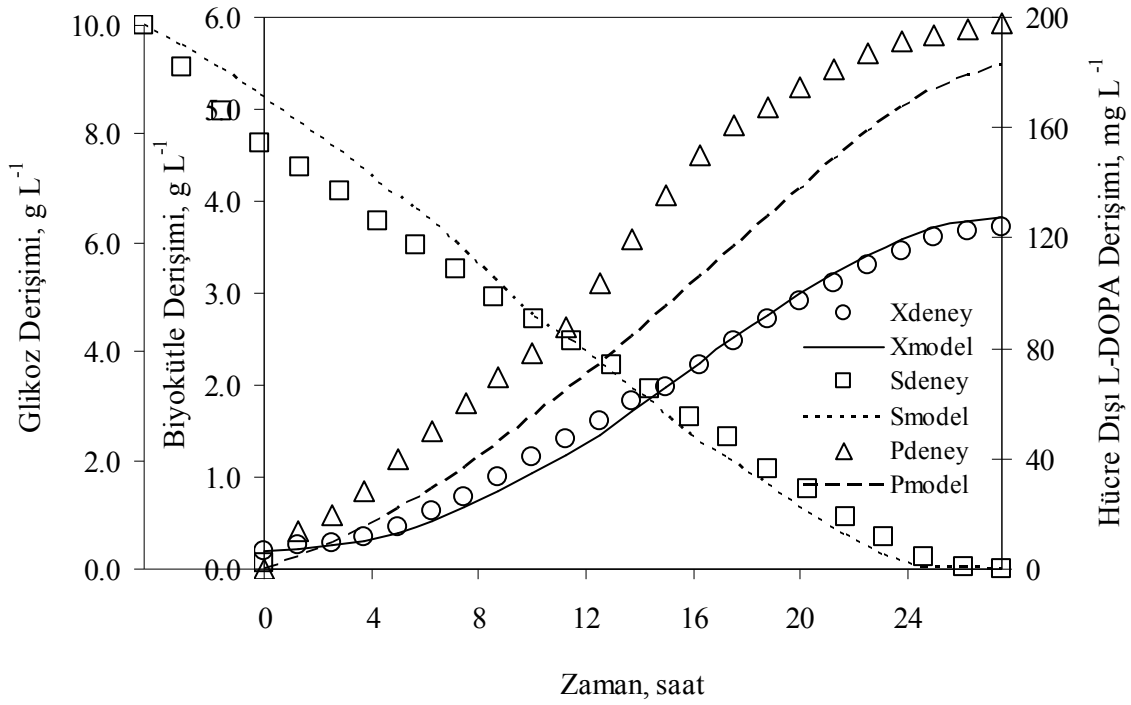
Şekil 7.21. 1.0 g L⁻¹ glikoz derişimindeki fermentasyon ortamında deneysel olarak elde edilen sonuçlarla Tessier modelinden elde edilen sonuçların zamanla değışimi (pH_b:7, Ekim oranı: % 2.5 v v⁻¹, Karıştırma hızı: 500 rpm, Sıcaklık: 30 °C, Hava giriş hızı: 0.6 vvm).



Şekil 7.22. 2.5 g L⁻¹ glikoz derişimindeki fermentasyon ortamında deneysel olarak elde edilen sonuçlarla Andrews-Noack modelinden elde edilen sonuçların zamanla değışimi (pH_b:7, Ekim oranı: % 2.5 v v⁻¹, Karıştırma hızı: 500 rpm, Sıcaklık: 30 °C, Hava giriş hızı: 0.6 vvm).



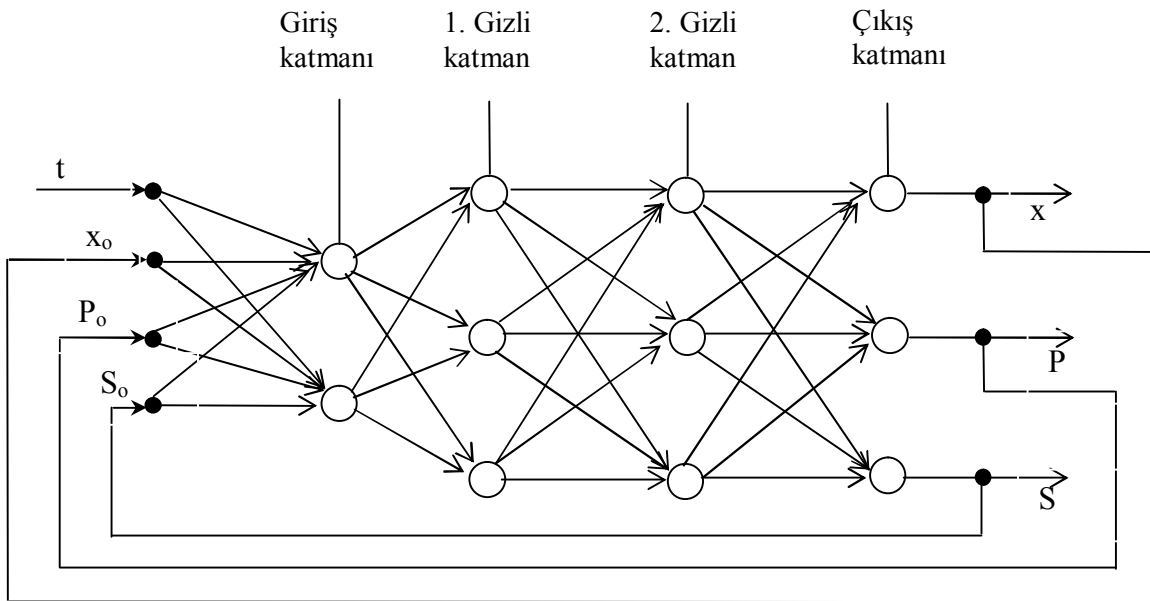
Şekil 7.23. 5.0 g L⁻¹ glikoz derişimindeki fermentasyon ortamında deneysel olarak elde edilen sonuçlarla Andrews-Noack modelinden elde edilen sonuçların zamanla değışimi (pH_b:7, Ekim oranı: % 2.5 v v⁻¹, Karıştırma hızı: 500 rpm, Sıcaklık: 30 °C, Hava giriş hızı: 0.6 vvm).



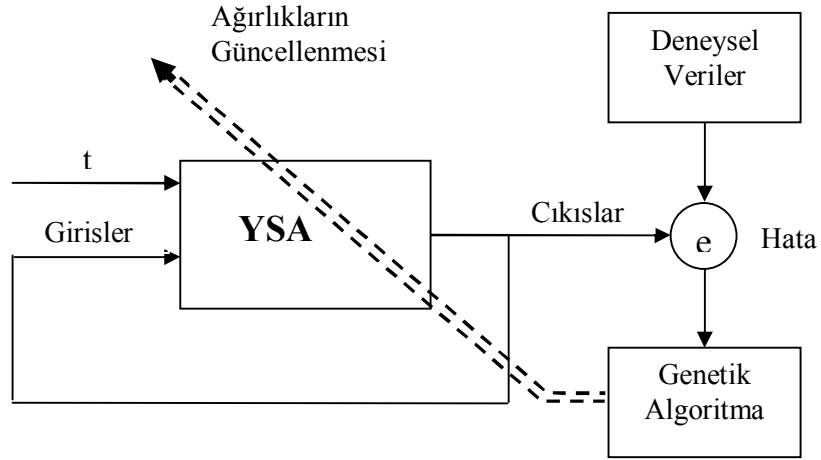
Şekil 7.24. 10.0 g L⁻¹ glikoz derişimindeki fermentasyon ortamında deneysel olarak elde edilen sonuçlarla Andrews-Noack modelinden elde edilen sonuçların zamanla değişimi (pH_b:7, Ekim oranı: % 2.5 v v⁻¹, Karıştırma hızı: 500 rpm, Sıcaklık: 30 °C, Hava giriş hızı: 0.6 vvm).

Buraya kadar yapılan modelleme çalışmasında, *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) yabanıl suşundan hücre dışı L-DOPA üretiminde 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 ve 10.0 g L⁻¹ gibi farklı glikoz derişimlerinde oluşturulan fermentasyon ortamının, literatürde mevcut 11 modele uygulanması sonucu sistemi tanımlayan modelin belirlenmesi amaçlanmıştır. Model içerisindeki optimum kinetik katsayılar MATLAB 7.04 paket programı içerisindeki Genetik Algoritma Toolbox'ı kullanılarak belirlenmiştir. 0.5 ve 1.0 g L⁻¹ gibi düşük glikoz derişiminde sistem davranışını en iyi tanımlayan modelin Tessier, 2.5, 5.0 ve 10.0 g L⁻¹ gibi diğer ortamlara nazaran daha yüksek derişiminde ise Andrews-Noack modelinin olduğu belirlenmiştir. Bütün derişim aralıkları için fermentasyon ortamını tanımlayan tek bir model elde edilememiştir. Elde edilen bu sonuçların ışığında, sistemi bir bütün olarak ele alıp tanımlayacak yeni bir yöntem belirlenmeye çalışılmıştır. Son yıllarda, insan beyninin çalışma prensibini yapay olarak modellemeyi amaçlayan Yapay Sinir Ağları (YSA); sistem tanımlama (modelleme) ve denetimi gibi çeşitli alanlarda yaygın olarak kullanılmaya başlanmış ve kullanıldığı alanlardaki problemlerin çözümüne yeni yaklaşımlar getirmiştir. YSA, öğrenme sürecinde bilgiyi toplayan ve ağırlıkları yardımıyla

bu bilgiyi saklayan paralel bir işlemcidir. *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) yabani suşundan hücre dışı L-DOPA üretiminde, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 ve 10.0 g L⁻¹ glikoz derişimlerinde oluşturulan optimize edilmiş fermantasyon ortamında, elde edilen deney sonuçları, YSA'yı eğitmek için eğitim dataları olarak kullanılmıştır. YSA ile sistemin davranışını tanımlayan model için gerekli yazılım, MATLAB 7.04 versiyonu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Oluşturulan YSA modeli, bir giriş, iki gizli ve bir çıkış katmanından ibarettir. Giriş katmanında 2 nöron, diğer katmanlarda ise 3'er nöron kullanılmıştır. Çıkış katmanındaki nöronlarda aktivasyon fonksiyonu olarak purelin, diğer katmanlardaki nöronlarda ise tansigmoid fonksiyonu kullanılmıştır. Oluşturulan YSA modeli Şekil 7.25.'de gösterilmiştir. YSA modelinin eğitimi için yaygın olarak kullanılan geriye yayılım metodu, bu çalışmada kullanılmamıştır. Bunun yerine YSA'ya ait ağırlık katsayıları Genetik Algoritma ile optimize edilmiştir. Bunun için MATLAB 7.04 versiyonunun Genetik Algoritma Toolbox'ından yararlanılmıştır. Eğitim sırasında çıkıştaki hatayı denetlemek için, amaç fonksiyonu olarak en küçük kareler yöntemi kullanılmıştır. YSA'nın eğitimi için kurulan blok diyagram Şekil 7.26.'da verilmiştir. YSA'nın eğitimi tamamlandıktan sonra, oluşturulan modelin doğruluğunu test etmek amacıyla, eğitim için kullanılan beş farklı glikoz derişiminde oluşturulan fermantasyon ortamından elde edilen deneysel dataların dışında, farklı bir glikoz derişiminde (1.5 g L⁻¹) oluşturulan biyoproses ortamından elde edilen deney dataları kullanılmıştır.



Şekil 7.25. Oluşturulan Yapay Sinir Ağı (YSA) modeli.



Şekil 7.26. Yapay Sinir Ağı (YSA)'nın eğitimi için blok diyagramı.

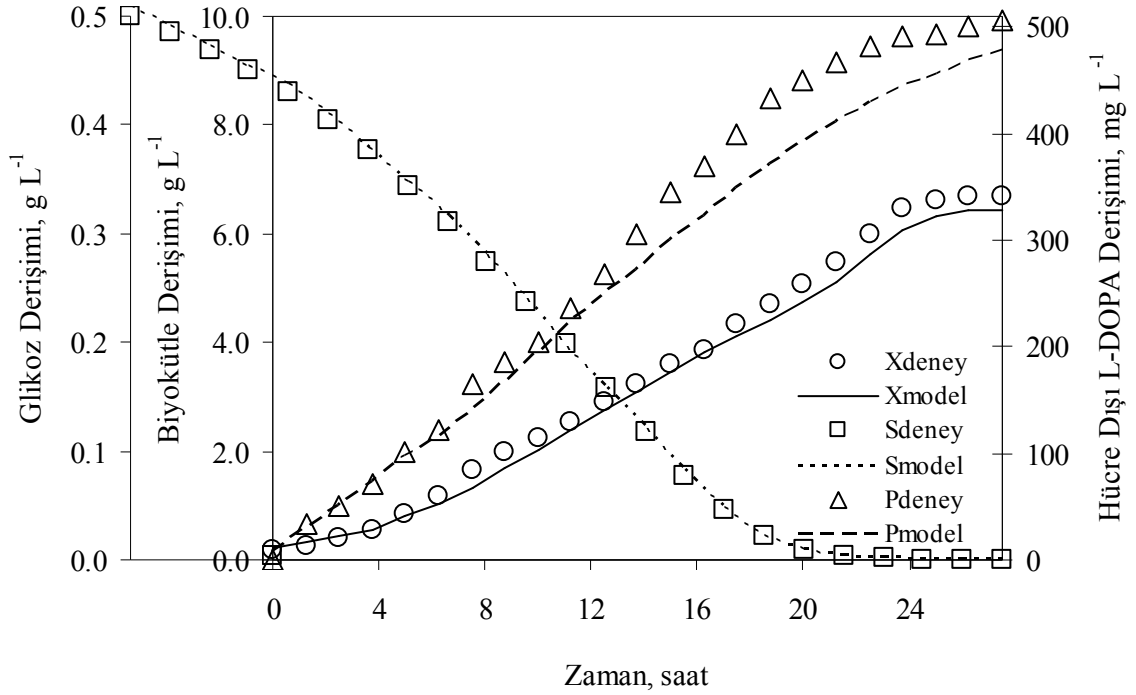
Eğitilmiş olan Yapay Sinir Ağı (YSA) modelinden elde edilen veriler ile deneysel veriler arasındaki uyum, çeşitli istatistiksel kıyaslama metotları kullanılarak belirlenmeye çalışılmıştır. Modelleme yeteneği (EF), hata karelerinin ortalama karekökü (RMSE) ve Khi-kare (χ^2) gibi istatistiksel testler sonucunda elde edilen değerler Tablo 7.5.'de verilmiştir. EF değeri 1'e, RMSE ve χ^2 değerleri de 0'a ne kadar yakınsa, YSA modeli sistemi o kadar iyi tanımlamaktadır. Tablo 7.5.'de, ölçülen bütün parametreler için (x, P, S), EF değerleri 1'e yakın, RMSE ve χ^2 değerlerinin de oldukça düşük olduğu görülmektedir.

0.5, 1.0, 2.5, 5.0 ve 10.0 g L⁻¹ glikoz derişimlerdeki deney sonuçları ile, aynı derişimlerde elde edilen Yapay Sinir Ağı (YSA) model çıkışları karşılaştırmalı olarak Şekil 7.27.-7.31.'de verilmiştir. Ayrıca 1.5 g L⁻¹ glikoz derişiminde elde edilen deneysel veriler ve bu verilerin test amaçlı uygulandığı YSA model sonuçları karşılaştırmalı olarak Şekil 7.32.'de, istatistiksel test sonuçları ise Tablo 7.7.'de verilmiştir. Bu sonuçlar da, kurulan YSA modelinin sistem davranışını büyük bir doğrulukla tanımladığını göstermektedir.

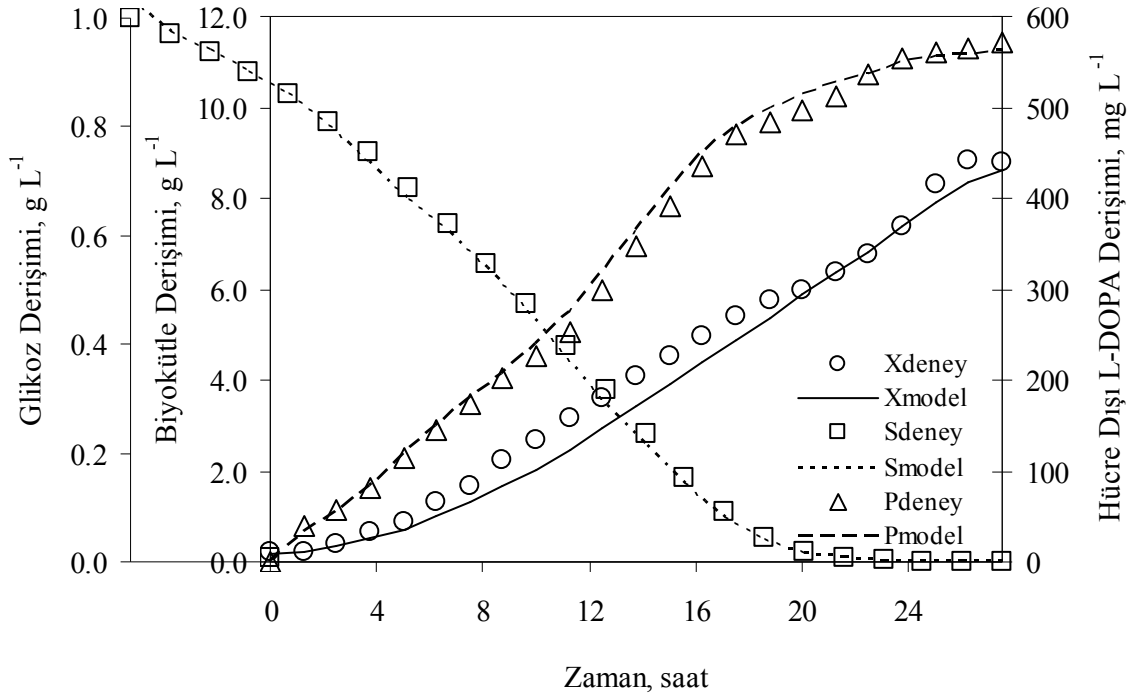
İlgili tablolar ve grafikler ışığında, YSA modelinin, Genetik Algoritma Toolbox'ı ile optimum katsayıları belirlenen modellere göre, sistemin davranışını daha iyi açıkladığı görülmüştür.

Tablo 7.7. Yapay Sinir Ağı (YSA) uygulaması sonucu istatistiksel testler ile elde edilen sonuçlar

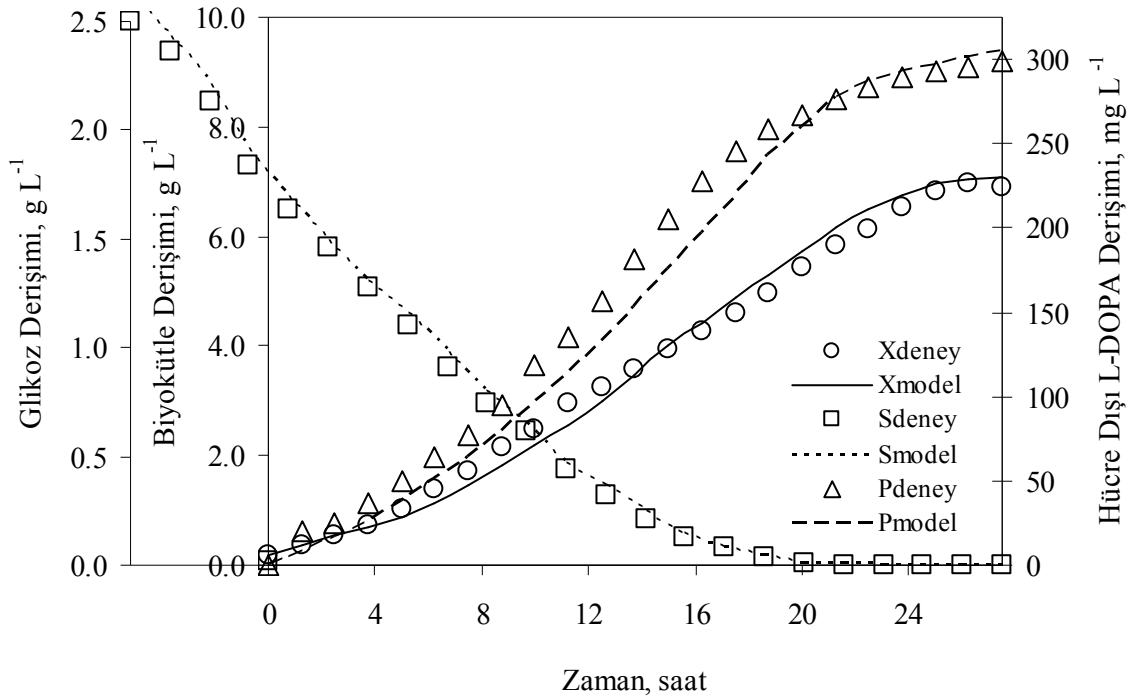
Glikoz Derişimi (g L ⁻¹)	EF			RMSE			Khi-kare (χ^2)		
	EF _X	EF _P	EF _S	RMSE _X	RMSE _P	RMSE _S	χ^2_X	χ^2_P	χ^2_S
0.5	0.9904	0.9447	0.9926	0.00322	0.00412	0.00264	0.00254	0.00405	0.00346
1.0	0.9871	0.9891	0.9965	0.00456	0.00443	0.00293	0.00326	0.00436	0.00405
2.5	0.9909	0.9755	0.9905	0.00641	0.00511	0.00341	0.00574	0.00471	0.00344
5.0	0.9911	0.9781	0.9932	0.00632	0.00743	0.00293	0.00496	0.00657	0.00401
10.0	0.9949	0.9876	0.9919	0.00526	0.00673	0.00325	0.00645	0.00768	0.00379
Test 1.5	0.9736	0.9310	0.9922	0.00701	0.00811	0.00274	0.00786	0.00723	0.00388



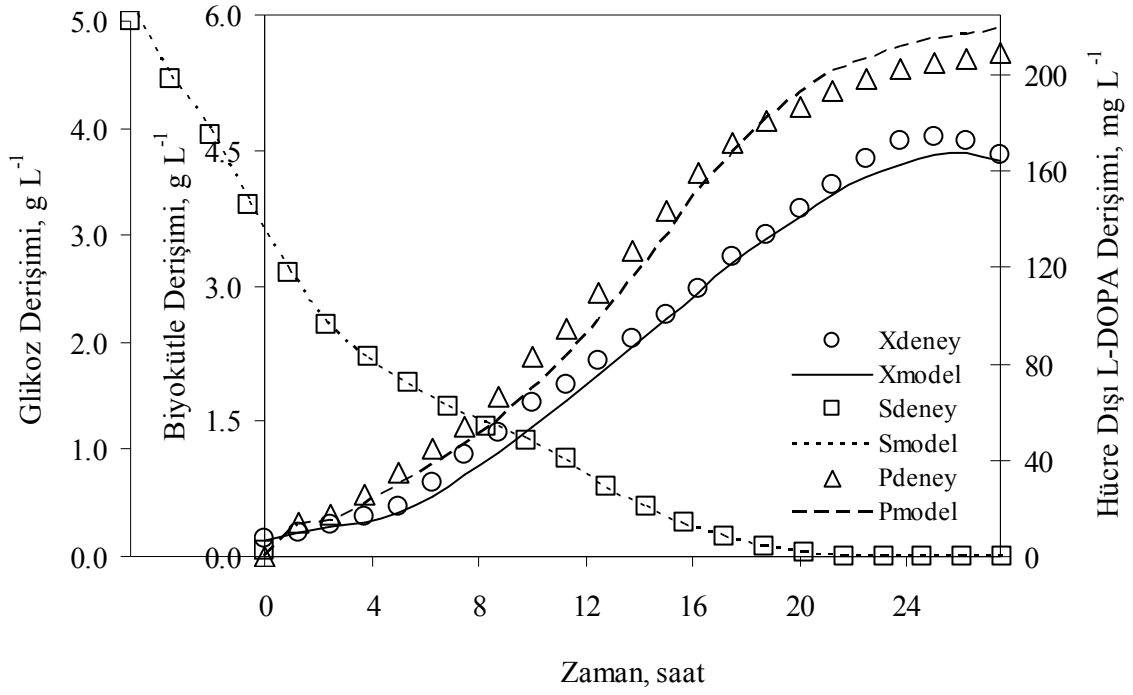
Şekil 7.27. 0.5 g L⁻¹ glikoz derişimindeki fermantasyon ortamında deneysel olarak elde edilen sonuçlarla Yapay Sinir Ağı (YSA) modelinden elde edilen sonuçların zamanla değışimi (pH_b:7, Ekim oranı: % 2.5 v v⁻¹, Karıştırma hızı: 500 rpm, Sıcaklık: 30 °C, Hava giriş hızı: 0.6 vvm).



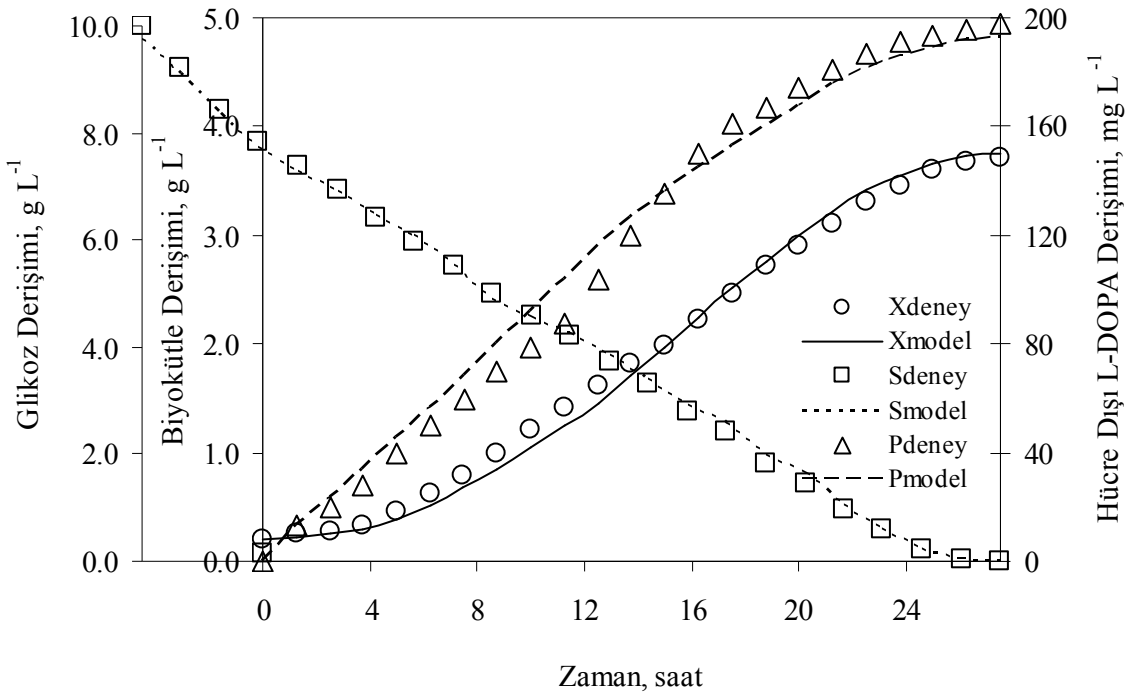
Şekil 7.28. 1.0 g L⁻¹ glikoz derişimindeki fermantasyon ortamında deneysel olarak elde edilen sonuçlarla Yapay Sinir Ağı (YSA) modelinden elde edilen sonuçların zamanla değışimi (pH_b:7, Ekim oranı: % 2.5 v v⁻¹, Karıştırma hızı: 500 rpm, Sıcaklık: 30 °C, Hava giriş hızı: 0.6 vvm).



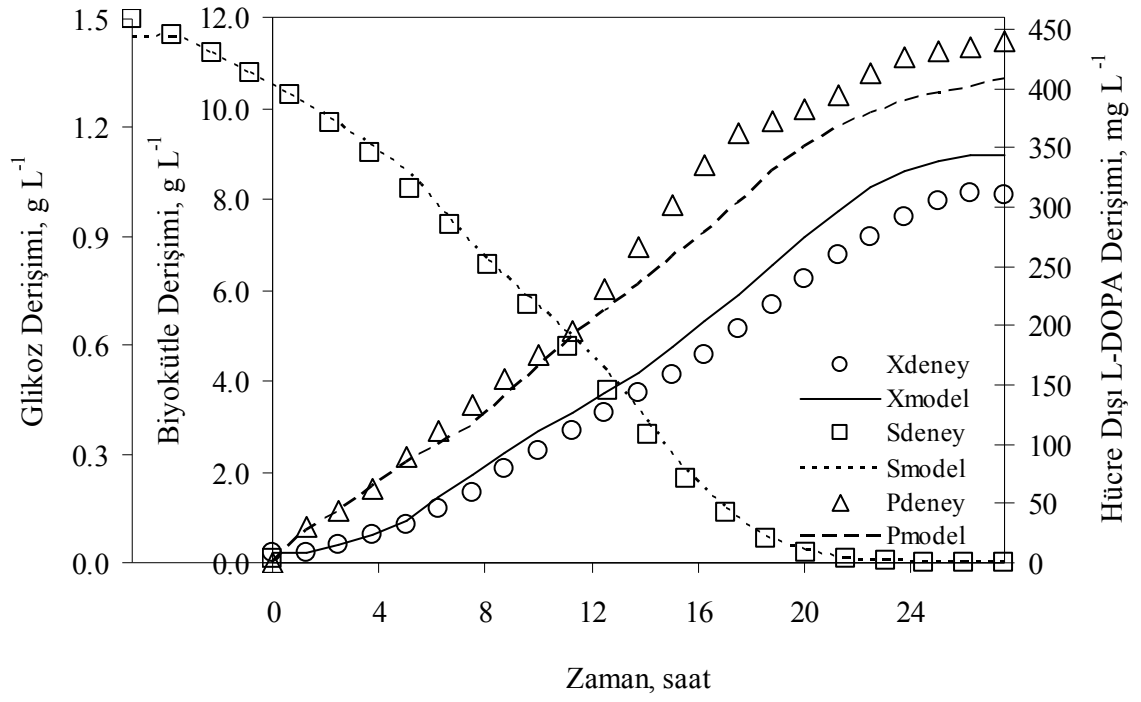
Şekil 7.29. 2.5 g L⁻¹ glikoz derişimindeki fermantasyon ortamında deneysel olarak elde edilen sonuçlarla Yapay Sinir Ağı (YSA) modelinden elde edilen sonuçların zamanla değışimi (pH_b:7, Ekim oranı: % 2.5 v v⁻¹, Karıştırma hızı: 500 rpm, Sıcaklık: 30 °C, Hava giriş hızı: 0.6 vvm).



Şekil 7.30. 5.0 g L⁻¹ glikoz derişimindeki fermantasyon ortamında deneysel olarak elde edilen sonuçlarla Yapay Sinir Ağı (YSA) modelinden elde edilen sonuçların zamanla değışimi (pH_b:7, Ekim oranı: % 2.5 v v⁻¹, Karıştırma hızı: 500 rpm, Sıcaklık: 30 °C, Hava giriş hızı: 0.6 vvm).



Şekil 7.31. 10.0 g L⁻¹ glikoz derişimindeki fermantasyon ortamında deneysel olarak elde edilen sonuçlarla Yapay Sinir Ağı (YSA) modelinden elde edilen sonuçların zamanla değışimi (pH_b:7, Ekim oranı: % 2.5 v v⁻¹, Karıştırma hızı: 500 rpm, Sıcaklık: 30 °C, Hava giriş hızı: 0.6 vvm).

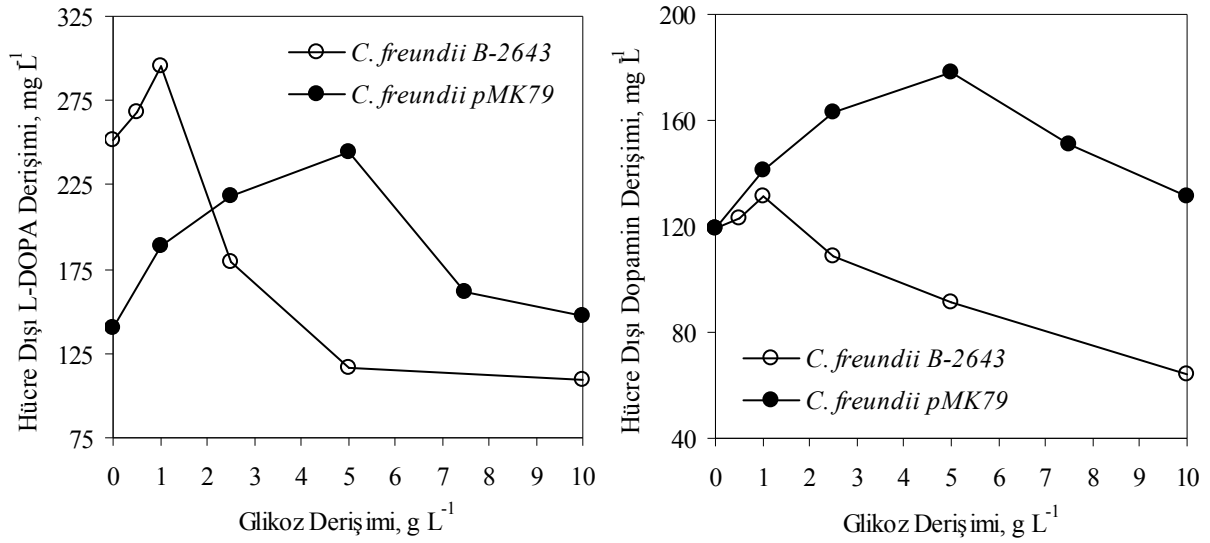


Şekil 7.32. 1.5 g L⁻¹ glikoz derişimindeki fermantasyon ortamında deneysel olarak elde edilen sonuçlarla Yapay Sinir Ağı (YSA) modelinden elde edilen sonuçların zamanla değışimi (pH_b:7, Ekim oranı: % 2.5 v v⁻¹, Karıştırma hızı: 500 rpm, Sıcaklık: 30 °C, Hava giriş hızı: 0.6 vvm).

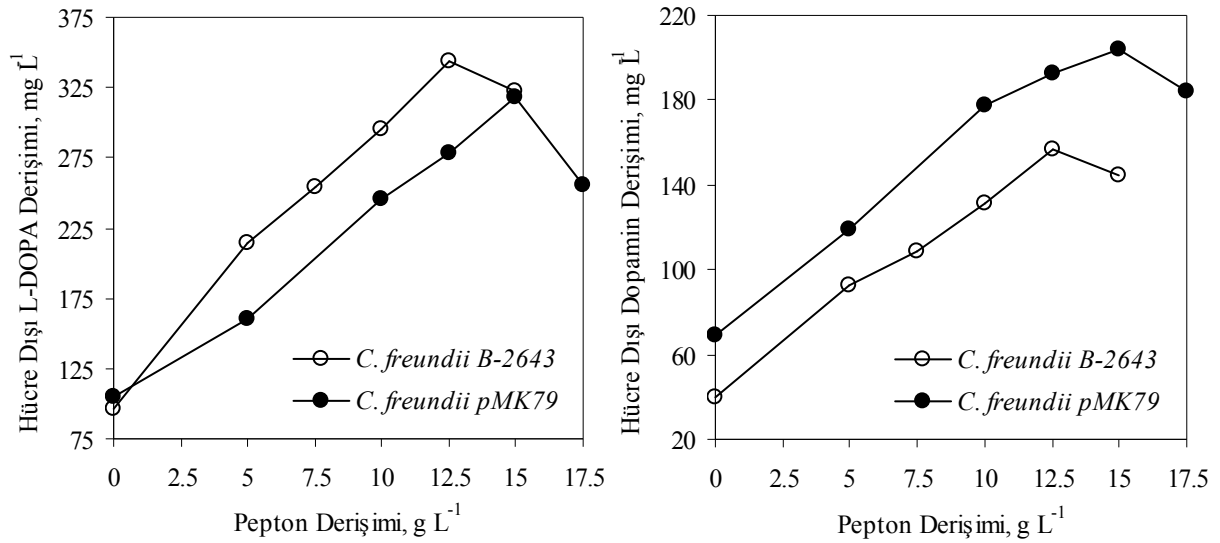
8. GENEL SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Citrobacter freundii (NRRL B-2643) ve *Erwinia herbicola* (NRRL B-3466) yabanıl suşları ile birlikte bu iki gram negatif bakterinin *vgb* genini taşımayan (*vgb*⁻) (*Citrobacter freundii* pMK57 ve *Erwinia herbicola* pUC8) ve *vgb* genini taşıyan (*vgb*⁺) (*Citrobacter freundii* pMK79 ve *Erwinia herbicola* pUC8:15) rekombinantlarından L-DOPA ve Dopamin'in eş zamanlı olarak üretiminin amaçlandığı bu çalışmada aşağıdaki genel sonuçlar elde edilmiştir.

1. *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ve rekombinantları ile LB ortamında yapılan deneylerde ulaşılan L-DOPA ve Dopamin üretim düzeylerinin *Erwinia herbicola* (NRRL B-3466) ve rekombinantları ile yapılan deneylere göre daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlardan hareketle deneylere *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ve rekombinantları ile devam edilmiştir.
2. LB ortamında erlenlerde yapılan deneylerde farklı derişimlerde glikoz kullanılmıştır. Maksimum L-DOPA ve Dopamin üretimi, *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) için 1.0 g L⁻¹ glikoz derişiminde, *Citrobacter freundii* pMK79 için 5.0 g L⁻¹ glikoz derişiminde elde edilmiştir (Şekil 8.1.). Ayrıca hem yabanıl hem de rekombinant suşlar için yüksek glikoz derişimlerinde katabolik represyon etkisiyle ürün oluşumu ve mikroorganizma büyümesinin inhibe olduğu sonucuna varılmıştır.
3. *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ve rekombinant suşlarından L-DOPA ve Dopamin üretiminin azot kaynaklarına oldukça bağlı olduğu sonucuna varılmıştır. Organik azot kaynaklarından pepton derişiminin incelendiği deneylerde maksimum L-DOPA ve Dopamin üretimi, *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) için 12.5 g L⁻¹ pepton derişiminde, *Citrobacter freundii* pMK79 için 15.0 g L⁻¹ pepton derişiminde elde edilmiştir (Şekil 8.2.).

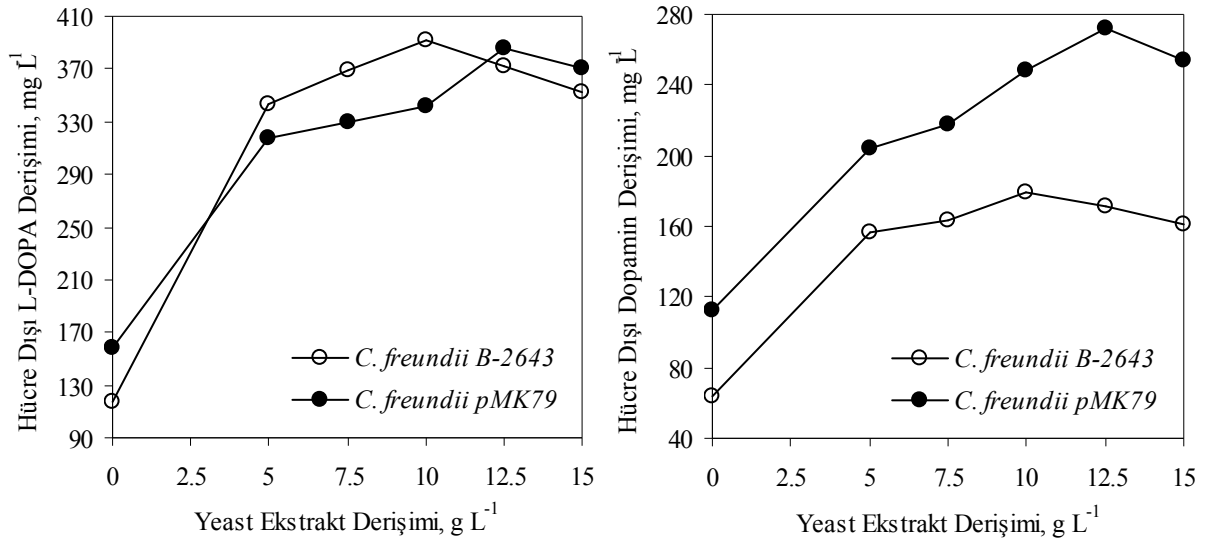


Şekil 8.1. Farklı glikoz derişimlerinde *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ve *Citrobacter freundii* pMK79 ile yapılan deneylerde elde edilen maksimum hücre dışı L-DOPA ve Dopamin derişimleri (Şartlar: 10.0 g L⁻¹ pepton, 5.0 g L⁻¹ Y.E., 10 g L⁻¹ NaCl, pH_b: 7.0; Ekim oranı: % 1 v/v; Karıştırma hızı: 150 rpm; Ortam sıcaklığı: 37 °C).



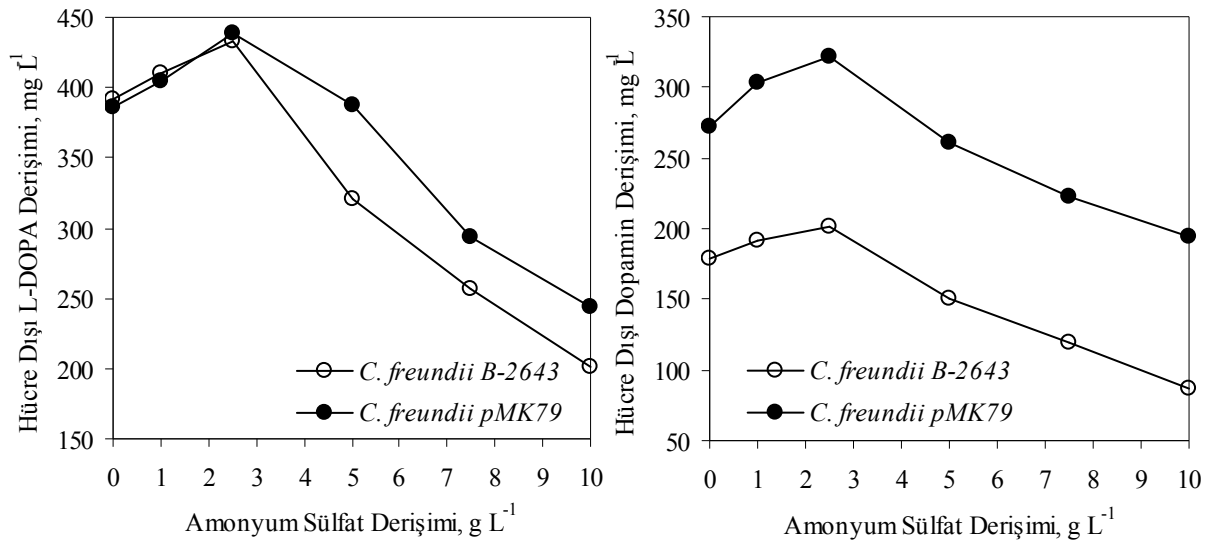
Şekil 8.2. Farklı pepton derişimlerinde *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ve *Citrobacter freundii* pMK79 ile yapılan deneylerde elde edilen maksimum hücre dışı L-DOPA ve Dopamin derişimleri (Şartlar: 1.0 g L⁻¹ glikoz (Cf B-2643 için), 5.0 g L⁻¹ glikoz (Cf pMK79 için), 5.0 g L⁻¹ Y.E., 10 g L⁻¹ NaCl, pH_b: 7.0; Ekim oranı: % 1 v/v; Karıştırma hızı: 150 rpm; Ortam sıcaklığı: 37 °C).

4. Organik azot kaynaklarından yeast ekstrakt derişiminin L-DOPA ve Dopamin üretimi üzerine etkisinin incelendiği deneylerde maksimum ürün eldesi, *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) için 10.0 g L⁻¹ yeast ekstrakt derişiminde, *Citrobacter freundii* pMK79 için 12.5 g L⁻¹ yeast ekstrakt derişiminde elde edilmiştir (Şekil 8.3.). Üre'nin ise, *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ve rekombinant suşlarından L-DOPA ve Dopamin üretimi üzerine pozitif yönde bir etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır.



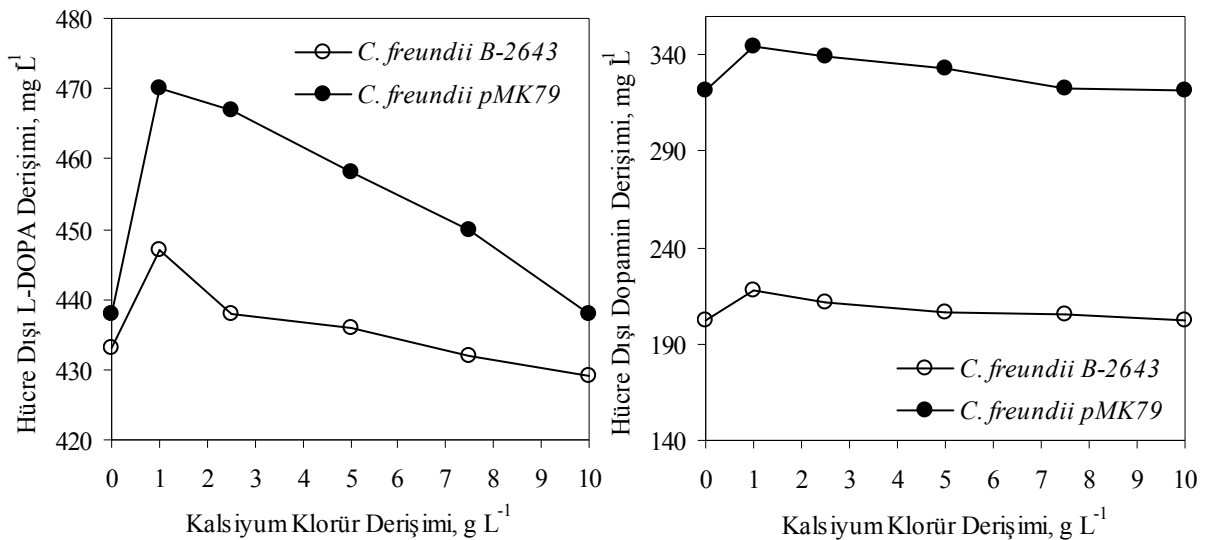
Şekil 8.3. Farklı yeast ekstrakt derişimlerinde *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ve *Citrobacter freundii* pMK79 ile yapılan deneylerde elde edilen maksimum hücre dışı L-DOPA ve Dopamin derişimleri (Şartlar: 1.0 g L⁻¹ glikoz (Cf B-2643 için), 5.0 g L⁻¹ glikoz (Cf pMK79 için), 12.5 g L⁻¹ pepton (Cf B-2643 için), 15.0 g L⁻¹ pepton (Cf pMK79 için), 10 g L⁻¹ NaCl, pH_b: 7.0; Ekim oranı: % 1 v/v; Karıştırma hızı: 150 rpm; Ortam sıcaklığı: 37 °C).

5. İnorganik azot kaynağı olarak fermentasyon ortamına ilave edilen amonyun sülfat ve sodyum nitrat'tan sadece amonyum sülfat'ın L-DOPA ve Dopamin üretimini artırdığı sonucuna varılmıştır. Maksimum L-DOPA ve Dopamin üretimi, *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ve *Citrobacter freundii* pMK79 için 2.5 g L⁻¹ amonyum sülfat derişiminde elde edilmiştir (Şekil 8.4.).

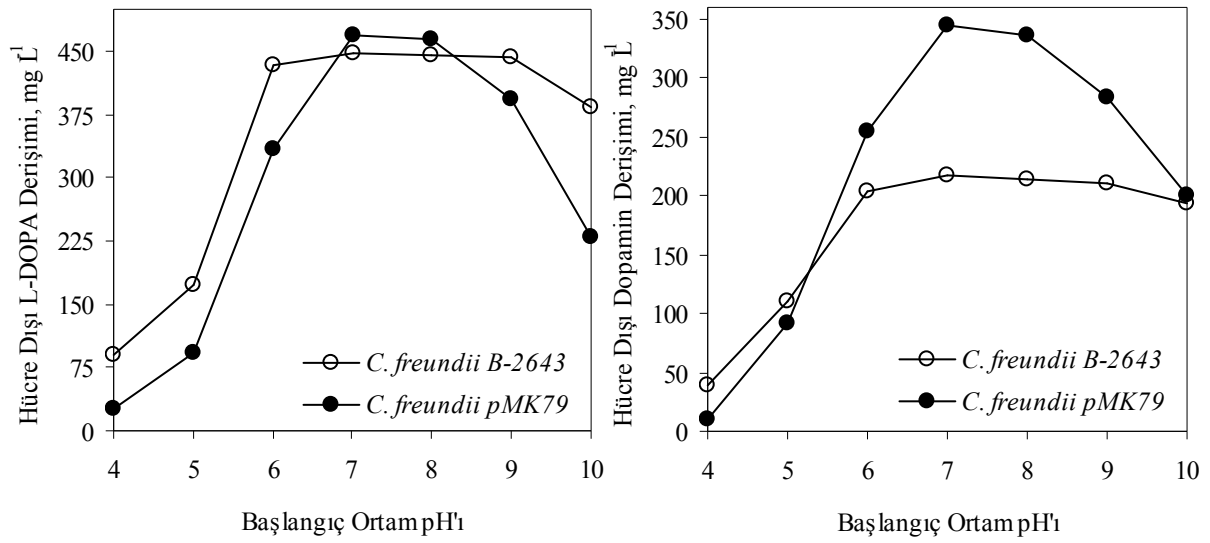


Şekil 8.4. Farklı amonyum sülfat derişimlerinde *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ve *Citrobacter freundii* pMK79 ile yapılan deneylerde elde edilen maksimum hücre dışı L-DOPA ve Dopamin derişimleri (Şartlar: 1.0 g L⁻¹ glikoz (Cf B-2643 için), 5.0 g L⁻¹ glikoz (Cf pMK79 için), 12.5 g L⁻¹ pepton (Cf B-2643 için), 15.0 g L⁻¹ pepton (Cf pMK79 için), 10.0 g L⁻¹ Y.E. (Cf B-2643 için), 12.5 g L⁻¹ Y.E. (Cf pMK79 için) 10 g L⁻¹ NaCl, pH_b: 7.0; Ekim oranı: % 1 v/v; Karıştırma hızı: 150 rpm; Ortam sıcaklığı: 37 °C).

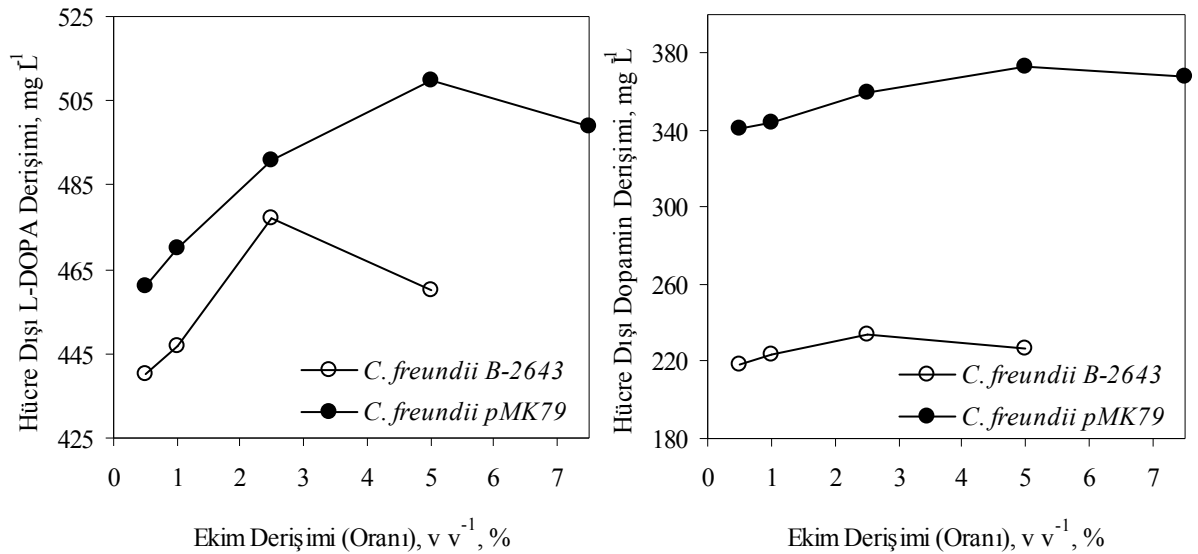
6. Erlenlerde gerçekleştirilen deneylerde fermantasyon ortamındaki derişimleri denenen NaCl ve CaCl₂'den sadece CaCl₂'nin L-DOPA ve Dopamin üretimini artırdığı belirlenmiştir. Maksimum L-DOPA ve Dopamin üretimi, *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ve *Citrobacter freundii* pMK79 için 1.0 g L⁻¹ CaCl₂ derişiminde elde edilmiştir (Şekil 8.5.).
7. Başlangıç ortam pH'sının L-DOPA ve Dopamin üretimi üzerine etkisinin incelendiği deneylerde nötr, hafif asidik ve hafif bazik ortamlarda maksimum L-DOPA ve Dopamin üretiminin oldukça yakın olduğu buna karşın başlangıç pH'ının düşük ve yüksek değerlerinde L-DOPA ve Dopamin üretiminin olumsuz etkilendiği ve diğer ortamlara göre üretimin düşük seviyelerde kaldığı belirlenmiştir. Maksimum L-DOPA ve Dopamin üretimi, *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ve *Citrobacter freundii* pMK79 için pH 7.0 olan fermantasyon ortamında elde edilmiştir (Şekil 8.6.).
8. *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ve rekombinant suşlarından L-DOPA ve Dopamin üretiminin ekim derişiminden (oranının) fazla etkilenmediği belirlenmiştir. Maksimum L-DOPA ve Dopamin üretimi, *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) için % 2.5 v v⁻¹ ekim derişiminde, *Citrobacter freundii* pMK79 için % 5.0 v v⁻¹ ekim derişiminde elde edilmiştir (Şekil 8.7.).



Şekil 8.5. Farklı kalsiyum klorür derişimlerinde *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ve *Citrobacter freundii* pMK79 ile yapılan deneylerde elde edilen maksimum hücre dışı L-DOPA ve Dopamin derişimleri (Şartlar: 1.0 g L⁻¹ glikoz (Cf B-2643 için), 5.0 g L⁻¹ glikoz (Cf pMK79 için), 12.5 g L⁻¹ pepton (Cf B-2643 için), 15.0 g L⁻¹ pepton (Cf pMK79 için), 10.0 g L⁻¹ Y.E. (Cf B-2643 için), 12.5 g L⁻¹ Y.E. (Cf pMK79 için), 2.5 g L⁻¹ amonyum sülfat, pH₀: 7.0; Ekim oranı: % 1 v/v; Karıştırma hızı: 150 rpm; Ortam sıcaklığı: 37 °C).

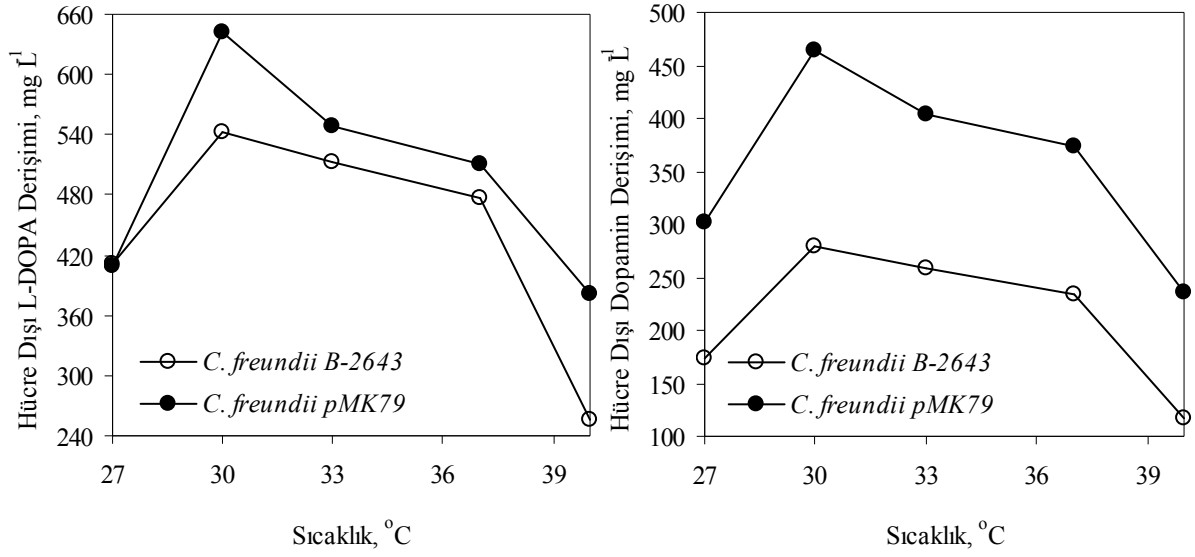


Şekil 8.6. Farklı başlangıç ortam pH'larında *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ve *Citrobacter freundii* pMK79 ile yapılan deneylerde elde edilen maksimum hücre dışı L-DOPA ve Dopamin derişimleri (Şartlar: 1.0 g L⁻¹ glikoz (Cf B-2643 için), 5.0 g L⁻¹ glikoz (Cf pMK79 için), 12.5 g L⁻¹ pepton (Cf B-2643 için), 15.0 g L⁻¹ pepton (Cf pMK79 için), 10.0 g L⁻¹ Y.E. (Cf B-2643 için), 12.5 g L⁻¹ Y.E. (Cf pMK79 için), 2.5 g L⁻¹ amonyum sülfat, 1.0 g L⁻¹ CaCl₂, Ekim oranı: % 1 v/v; Karıştırma hızı: 150 rpm; Ortam sıcaklığı: 37 °C).



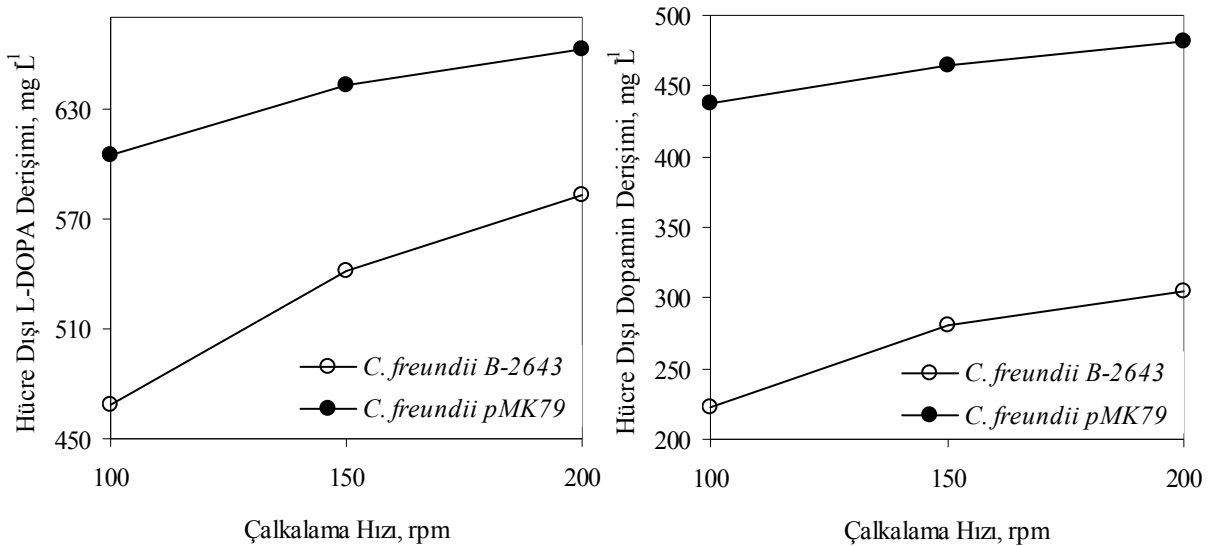
Şekil 8.7. Farklı ekim derişim (oranı)'lerinde *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ve *Citrobacter freundii* pMK79 ile yapılan deneylerde elde edilen maksimum hücre dışı L-DOPA ve Dopamin derişimleri (Şartlar: 1.0 g L⁻¹ glikoz (Cf B-2643 için), 5.0 g L⁻¹ glikoz (Cf pMK79 için), 12.5 g L⁻¹ pepton (Cf B-2643 için), 15.0 g L⁻¹ pepton (Cf pMK79 için), 10.0 g L⁻¹ Y.E. (Cf B-2643 için), 12.5 g L⁻¹ Y.E. (Cf pMK79 için), 2.5 g L⁻¹ amonyum sülfat, 1.0 g L⁻¹ CaCl₂, pH₀: 7.0; Karıştırma hızı: 150 rpm; Ortam sıcaklığı: 37 °C).

9. Fermantasyon sıcaklığının L-DOPA ve Dopamin üretimini etkileyen en önemli parametrelerden biri olduğu belirlenmiştir. Fermantasyon sıcaklığının 37 °C'den 30 °C'ye düşürülmesiyle maksimum ürün üretiminde önemli bir artış gözlemlenmiştir. Maksimum L-DOPA ve Dopamin üretimi, *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ve *Citrobacter freundii* pMK79 için 30 °C'de elde edilmiştir (Şekil 8.8.).



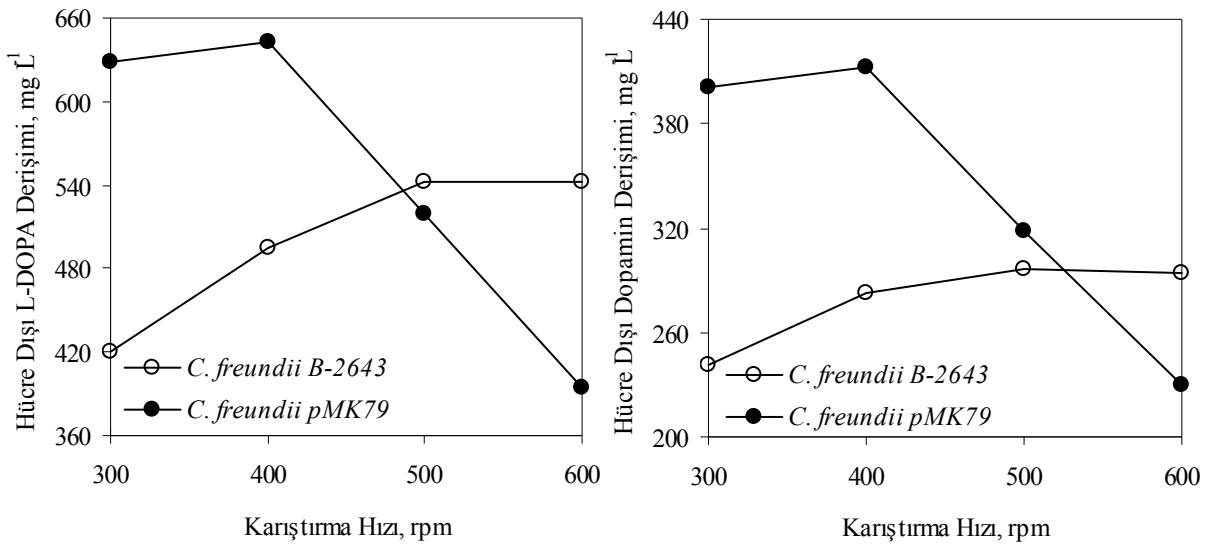
Şekil 8.8. Farklı ortam sıcaklıklarında *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ve *Citrobacter freundii* pMK79 ile yapılan deneylerde elde edilen maksimum hücre dışı L-DOPA ve Dopamin derişimleri (Şartlar: 1.0 g L⁻¹ glikoz (Cf B-2643 için), 5.0 g L⁻¹ glikoz (Cf pMK79 için), 12.5 g L⁻¹ pepton (Cf B-2643 için), 15.0 g L⁻¹ pepton (Cf pMK79 için), 10.0 g L⁻¹ Y.E. (Cf B-2643 için), 12.5 g L⁻¹ Y.E. (Cf pMK79 için), 2.5 g L⁻¹ amonyum sülfat, 1.0 g L⁻¹ CaCl₂, Ekim oranı: % 2.5 v v⁻¹ (Cf B-2643 için), % 5.0 v v⁻¹ (Cf pMK79 için), pH_b: 7.0; Karıştırma hızı: 150 rpm).

10. Çalkalama hızının L-DOPA ve Dopamin üretimini etkileyen bir diğer önemli parametre olduğu belirlenmiştir. Hem *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) yabancı suşu hemde rekombinant suşlar için optimum çalkalama hızı 200 rpm olarak bulunmuştur (Şekil 8.9.).

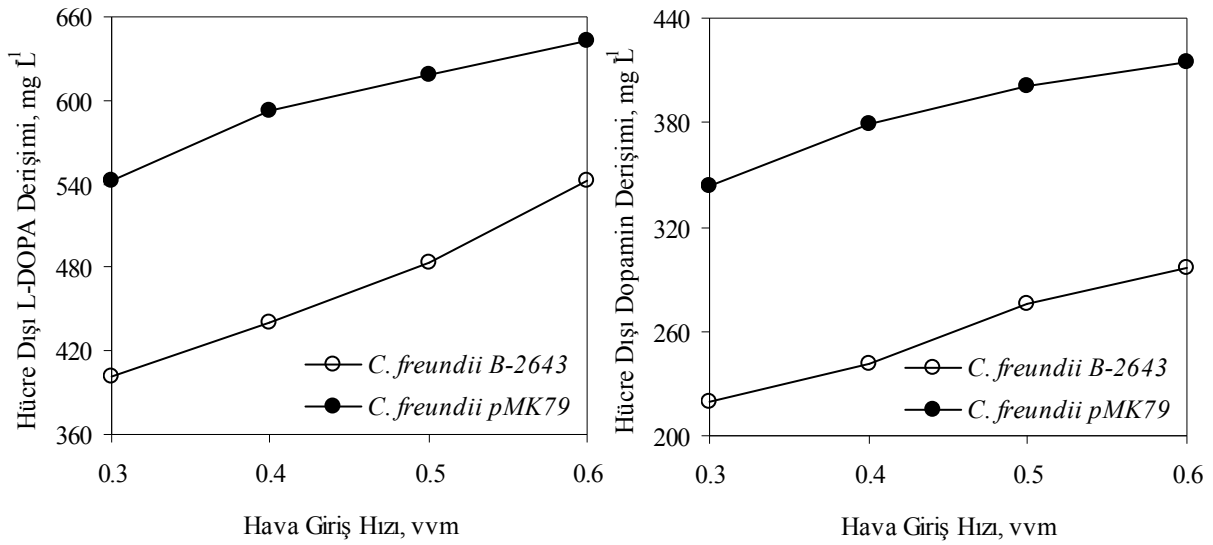


Şekil 8.9. Farklı çalkalama hızlarında *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ve *Citrobacter freundii* pMK79 ile yapılan deneylerde elde edilen maksimum hücre dışı L-DOPA ve Dopamin derişimleri (Şartlar: 1.0 g L⁻¹ glikoz (Cf B-2643 için), 5.0 g L⁻¹ glikoz (Cf pMK79 için), 12.5 g L⁻¹ pepton (Cf B-2643 için), 15.0 g L⁻¹ pepton (Cf pMK79 için), 10.0 g L⁻¹ Y.E. (Cf B-2643 için), 12.5 g L⁻¹ Y.E. (Cf pMK79 için), 2.5 g L⁻¹ amonyum sülfat, 1.0 g L⁻¹ CaCl₂, Ekim oranı: % 2.5 v v⁻¹ (Cf B-2643 için), % 5.0 v v⁻¹ (Cf pMK79 için), pH_b: 7.0; Sıcaklık: 30 °C).

11. Optimizasyon sonrasında Tirozin Fenol Liyaz (TPL) enzimi aktivitesi, fermentasyon ortamında kullanılan yabanil ve rekombinant suşlarda optimizasyon öncesine göre yaklaşık iki kat artmıştır.
12. Biyoreaktörde optimize edilmiş fermentasyon ortamında kesikli sistemde yapılan deneylerde farklı derişimlerde glikoz kullanılmış ve erlenlerde elde edilen sonuçlara benzer durum gözlenmiştir.
13. Biyoreaktörde optimize edilmiş fermentasyon ortamında kesikli sistemde yapılan deneylerde maksimum L-DOPA ve Dopamin üretimi *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) yabanil suşu için 500 rpm karıştırma hızında, *Citrobacter freundii* pMK79 için ise 400 rpm karıştırma hızında elde edilmiştir (Şekil 8.10.). Maksimum ürün üretimine her iki mikroorganizma içinde yüksek hava giriş hızlarında elde edilmiştir (Şekil 8.11.).



Şekil 8.10. Biyoreaktörde farklı karıştırma hızlarında *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ve *Citrobacter freundii* pMK79 ile yapılan deneylerde elde edilen maksimum hücre dışı L-DOPA ve Dopamin derişimleri (Şartlar: 1.0 g L⁻¹ glikoz (Cf B-2643 için), 5.0 g L⁻¹ glikoz (Cf pMK79 için), 12.5 g L⁻¹ pepton (Cf B-2643 için), 15.0 g L⁻¹ pepton (Cf pMK79 için), 10.0 g L⁻¹ Y.E. (Cf B-2643 için), 12.5 g L⁻¹ Y.E. (Cf pMK79 için), 2.5 g L⁻¹ amonyum sülfat, 1.0 g L⁻¹ CaCl₂, Ekim oranı: % 2.5 v v⁻¹ (Cf B-2643 için), % 5.0 v v⁻¹ (Cf pMK79 için), pH_b: 7.0; Sıcaklık: 30 °C, Havalandırma hızı: 0.6 vvm).



Şekil 8.11. Biyoreaktörde farklı hava giriş hızlarında *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ve *Citrobacter freundii* pMK79 ile yapılan deneylerde elde edilen maksimum hücre dışı L-DOPA ve Dopamin derişimleri (Şartlar: 1.0 g L⁻¹ glikoz (Cf B-2643 için), 5.0 g L⁻¹ glikoz (Cf pMK79 için), 12.5 g L⁻¹ pepton (Cf B-2643 için), 15.0 g L⁻¹ pepton (Cf pMK79 için), 10.0 g L⁻¹ Y.E. (Cf B-2643 için), 12.5 g L⁻¹ Y.E. (Cf pMK79 için), 2.5 g L⁻¹ amonyum sülfat, 1.0 g L⁻¹ CaCl₂, Ekim oranı: % 2.5 v v⁻¹ (Cf B-2643 için), % 5.0 v v⁻¹ (Cf pMK79 için), pH_b: 7.0; Sıcaklık: 30 °C, Karıştırma hızı: 500 rpm (Cf B-2643 için), 400 rpm (Cf pMK79 için)).

14. Biyoreaktörde optimize edilmiş fermantasyon ortamında kesikli sistemde yapılan deneylerde karıştırma ve hava giriş hızı arttıkça *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) yabani suşu için oksijen tüketim hızı (r_o) ve sıvı faz hacimsel kütle aktarım katsayısı (k_La) değeri artarken, *Citrobacter freundii* pMK79 için 500 ve 600 rpm karıştırma hızlarında r_o değeri düşmüştür.

L-DOPA ve Dopamin Üretiminin Modellenmesi Çalışmalarında Elde Edilen Sonuçlar;

15. Farklı glikoz derişimlerinde optimize edilen fermantasyon besi ortamındaki mikrobiyal büyüme, ürün oluşumu ve substrat tüketimini modellemek amacıyla iki farklı yöntem kullanılmıştır. Birinci yöntemde; literatürde mevcut modellerin katsayıları, Genetik Algoritma Toolbox'ı ile optimizasyon yapılarak belirlenmiş, ancak test edilen modellerden hiç birinin sistemi bir bütün olarak tanımlayamadığı sonucuna varılmıştır. Elde edilen sonuçlar ışığında, düşük glikoz derişimlerinde (0.5 ve 1.0 g L⁻¹) Teissier modeli, yüksek glikoz derişimlerinde (2.5, 5.0 ve 10.0 g L⁻¹) ise Andrews-Noack modeli sistemi en iyi tanımlayan model olarak seçilmiştir. İkinci yöntemde ise; fermantasyon ortamının davranışı, oluşturulan YSA modeli ile tanımlanmıştır. YSA

modelinin, Genetik algoritma Toolbox'ı ile optimum katsayıları belirlenen modellere göre sistemin davranışını daha iyi açıkladığı görülmüştür.

Öneriler;

1. Daha sonra yapılacak çalışmalarda L-DOPA ve Dopaminin fermantasyon ortamından saflaştırılması incelenebilir.
2. Özellikle genetiği değiştirilmiş olan rekombinant mikroorganizmanın morfolojisini etkilemeyecek biyoreaktör sistemleri üzerine çalışmalar yapılabilir.
3. Sürekli sistemde L-DOPA ve Dopamin üretimi gerçekleştirilebilir, ürün üretim ve mikroorganizma gelişim ortamı modellenenbilir.
4. Tutuklanmış mikroorganizmalar ile L-DOPA ve Dopamin üretimi incelenebilir.
5. Daha ekonomik farklı karbon kaynakları araştırılarak L-DOPA ve Dopamin üretimi gerçekleştirilebilir.

9. KAYNAKLAR

- [1] **Demain, A.L. and Vaishnav, P.**, 2009. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms, *Biotechnology Advances*, **27**, 297-306.
- [2] **Tang, Y.J. and Zhong, J.J.**, 2003. Role of oxygen supply in submerged fermentation of *Ganoderma lucidum* for production of *Ganoderma* polysaccharide and ganoderic acid, *Enzyme and Microbial Technology*, **32**, 478-484.
- [3] **Nussbaum, R.L.**, 2003. Alzheimer's disease and Parkinson's disease, *New England Journal of Medicine*, **348**, 2588-2588.
- [4] **Erenler, S.O., Gencer, S., Geckil, H., Stark, B.C. and Webster, D.A.**, 2004. Cloning and expression of the *Vitreoscilla* hemoglobin gene in *Enterobacter aerogenes*: Effect on cell growth and oxygen uptake, *Applied Biochemistry and Microbiology*, **40**, 241-248.
- [5] **Pekin, B.**, 1980. Biyokimya Mühendisliği, Birinci Kitap İkinci Kısım, *Ege Üniv., İzmir*.
- [6] **Selen, V.**, 2007. Fındık küspesinden *Bacillus amyloliquefaciens* kullanılarak alfa amilaz enzimi üretiminin katı substrat fermantasyonu ile incelenmesi, *Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ*.
- [7] **Bulut, Ş.**, 2007. Marinal bakteri *teredinobacter turnirae*'den proteaz üretimi, *Doktora tezi, Fırat Üniversitesi, Elazığ*.
- [8] **Rehm, J., Reed, G., Kennedy, J.F.**, 1987. Biotechnology, *Vch. New York*, 7a, 5-100.
- [9] **Topal, S.**, 1985. Enzimler, Mikrobiyolojik Yolla Enzim Üretimi ve Bu Teknolojide Rennin'in Yeri, *Gıda*, **10**, 25-37.
- [10] **Ooijkaas, L.P., Weber, F.J., Buitelaar, R.M., Tramper, J., Rinzema, A.**, 2000. Defined media and inert supports: their potential as solid-state fermentation production systems, *Tibtech*, **18**, 356-360.
- [11] **Orhan, A.**, 2002. *Rhizopus arrhizus*'dan Katı Hal Fermantasyonu ile Lipaz Üretimi, *Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi, Elazığ*.
- [12] **Aiba, S.S., Humphrey, A.E., Milles, N.F.**, 1973. Biochemical Engineering, *Academic Press Inc. New York*.
- [13] **Wang, D.I.C., Cooney, C.L., Demain, A., Dunnill, P., Humphrey, A.E. ve Lilly, M.D.**, 1979. Fermentation and Enzyme Technology, *J. Wiley & Sons*.
- [14] **Van't Riet, K.**, 1983. Mass transfer in fermentation, *Trens in Biotechnology*, **1**, 113-119.
- [15] **Rainer, B.W.**, 1990. Determination methods of the volumetric oxygen transfer k_{La} in bioreactors, *Chem. Biochem. Eng.*, **4**, 185-186.
- [16] **Nagatsu, T. and Sawada, M.**, 2009. L-dopa therapy for Parkinson's disease: Past, present, and future, *Parkinsonism & Related Disorders*, **15**, S3-S8.
- [17] **Hornykiewicz, O.**, 2002. L-DOPA: From a biologically inactive amino acid to a successful therapeutic agent, *Amino Acids*, **23**, 65-70.
- [18] **Katzenschlager, R. and Lees, A.J.**, 2002. Treatment of Parkinson's disease: levodopa as the first choice, *Journal of Neurology*, **249**, 19-24.
- [19] <http://www.nobelprize.org/chemistry/laureates>.
- [20] **Montgomery, E.B.**, 1992. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Levodopa, *Neurology*, **42**, 17-22.
- [21] **Koyanagi, T., Katayama, T., Suzuki, H., Nakazawa, H., Yokozeki, K. and Kumagai, H.**, 2005. Effective production of 3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine

- (L-DOPA) with *Erwinia herbicola* cells carrying a mutant transcriptional regulator TyrR, *Journal of Biotechnology*, **115**, 303-306.
- [22] **Kruk, Z.L. and Pycock, C.J.**, 1991. Dopamine. In: Neurotransmitters and drugs, *Suffolk, UK: St. Edmundsbury Press*, **3rd ed.**, 87-115.
- [23] **Ganong, W.F.**, 1995. Review of Medical Physiology, *Appleton & Lange*, **17th edition**, 89-93.
- [24] **Lisbon, A.**, 2003. Dopexamine, dobutamine, and dopamine increase splanchnic blood flow - What is the evidence?, *Chest*, **123**, 460s-463s.
- [25] **Özer, U.**, 2006. L-DOPA ve dopaminin bakteriyel biyosentezi, *Yüksek Lisans Tezi*, İnönü Üniversitesi, MALATYA.
- [26] **Growdon, J.H., Melamed, E., Logue, M., Hefti, F. and Wurtman, R.J.**, 1982. Effects of Oral L-Tyrosine Administration on Csf Tyrosine and Homovanillic-Acid Levels in Patients with Parkinsons-Disease, *Life Sciences*, **30**, 827-832.
- [27] **Aytan, E.**, 2009. Vitreoscilla hemoglobin geninin *Erwinia herbicola*'ya klonlanması ve L-DOPA üretimi üzerine etkisi, *Yüksek Lisans Tezi*, İnönü Üniversitesi, MALATYA.
- [28] **H.D. Patton, A.F.F., B. Hille, A.M. Scher, R. Steiner**, 1989. Textbook of Physiology. Circulation, Respiration, Body Fluids, Metabolism and Endocrinology, *21st edition, W. B. Saunders International Edition*.
- [29] **Lee, S.G., Hong, S.P. and Sung, M.H.**, 1999. Development of an enzymatic system for the production of dopamine from catechol, pyruvate, and ammonia, *Enzyme and Microbial Technology*, **25**, 298-302.
- [30] **Elsworth, J.D. and Roth, R.H.**, 1997. Dopamine synthesis, uptake, metabolism, and receptors: Relevance to gene therapy of Parkinson's disease, *Experimental Neurology*, **144**, 4-9.
- [31] **Kurt, A.G., Aytan, E., Ozer, U., Ates, B., Geckil, H.**, 2009. Production of L-DOPA and dopamine in recombinant bacteria bearing the Vitreoscilla hemoglobin gene, *Biotechnology Journal*, **4**, 1077-1088.
- [32] **Kumagai, H., Matsui, H., Ohkishi, H. and Ogata, K.**, 1970. Tyrosine Phenol Lyase .1. Purification, Crystallization, and Properties, *Journal of Biological Chemistry*, **245**, 1767-&.
- [33] **Antson, A.A., Demidkina, T.V., Gollnick, P., Dauter, Z., Vontersch, R.L., Long, J., Berezhnoy, S.N., Phillips, R.S., Harutyunyan, E.H. and Wilson, K.S.**, 1993. 3-Dimensional Structure of Tyrosine Phenol-Lyase, *Biochemistry*, **32**, 4195-4206.
- [34] **Kim, J.H., Song, J.J., Kim, B.G., Sung, M.H. and Lee, S.C.**, 2004. Enhanced stability of tyrosine phenol-lyase from *Symbiobacterium toebii* by DNA shuffling, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **14**, 153-157.
- [35] **Luetke-Eversloh, T., Santos, C.N.S. and Stephanopoulos, G.**, 2007. Perspectives of biotechnological production of L-tyrosine and its applications, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **77**, 751-762.
- [36] **H. Kumagai, H.M., H. Ohgishi, K. Ogata, H. Yamada, T. Ueno, H. Fukami**, 1969. Synthesis of 3,4-dihydroxyphenyl-l-alanine from l-tyrosine and pyrocatechol by crystalline β -tyrosinase, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **34**, 266-270.
- [37] **Yamada, H., Torii, H., Enei, H., Kashima, N., Okumura, S. and Kumagai, H.**, 1972. Synthesis of L-Tyrosine from Pyruvate, Ammonia and Phenol by

Crystalline Tyrosine Phenol Lyase, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **46**, 370-&.

- [38] **Enei, H., Okumura, S., Yamashit.K, Yamada, H. and Matsui, H.**, 1972. Microbiological Synthesis of L-Tyrosine and 3,4-Dihydroxyphenyl-L-Alanine .1. Distribution of Tyrosine Phenol Lyase in Microorganisms, *Agricultural and Biological Chemistry*, **36**, 1861-&.
- [39] **Yamada, H., Kumagai, H.**, 1975. Synthesis of L-tyrosine-related amino acids by beta-tyrosinase, *Advances in Applied Microbiology*, **19**, 249-288.
- [40] **Lee, S.G., Hong, S.P., Choi, Y.H., Chung, Y.J. and Sung, M.H.**, 1997. Thermostable tyrosine phenol-lyase of *Symbiobacterium* sp. SC-1: Gene cloning, sequence determination, and overproduction in *Escherichia coli*, *Protein Expression and Purification*, **11**, 263-270.
- [41] **Lee, S.G., Ro, H.S., Hong, S.P., Kim, E.H. and Sung, M.H.**, 1996. Production of L-DOPA by thermostable tyrosine phenol-lyase of a thermophilic *Symbiobacterium* species overexpressed in recombinant *Escherichia coli*, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **6**, 98-102.
- [42] **Smith, H.Q. and Somerville, R.L.**, 1997. The *tpl* promoter of *Citrobacter freundii* is activated by the TyrR protein, *Journal of Bacteriology*, **179**, 5914-5921.
- [43] **Demidkina, T.V., Myagkikh, I.V. and Azhayev, A.V.**, 1987. Transamination Catalyzed by Tyrosine Phenol-Lyase from *Citrobacter-Intermedius*, *European Journal of Biochemistry*, **170**, 311-316.
- [44] **Kumagai, H., Matsui, H., Ohkishi, H. and Ogata, K.**, 1970. Tyrosine Phenol Lyase .2. Cofactor Requirements, *Journal of Biological Chemistry*, **245**, 1773-&.
- [45] **Ali, S. and Haq, I.**, 2010. Production of 3,4-dihydroxy L-phenylalanine by a newly isolated *Aspergillus niger* and parameter significance analysis by Plackett-Burman design, *Bmc Biotechnology*, **10**.
- [46] **Ros, J.R., Rodriguezlopez, J.N. and Garcianovos, F.**, 1993. Effect of L-Ascorbic-Acid on the Monophenolase Activity of Tyrosinase, *Biochemical Journal*, **295**, 309-312.
- [47] **Coyne, V.E. and Alharthi, L.**, 1992. Induction of Melanin Biosynthesis in *Vibrio-Cholerae*, *Applied and Environmental Microbiology*, **58**, 2861-2865.
- [48] **Ikram-ul-Haq, Ali, S. and Qadeer, M.A.**, 2002. Biosynthesis of L-DOPA by *Aspergillus oryzae*, *Bioresource Technology*, **85**, 25-29.
- [49] **Mayer, A.M.**, 1987. Polyphenol Oxidases in Plants - Recent Progress .2., *Phytochemistry*, **26**, 11-20.
- [50] **Prota, G. and Thomson, R.H.**, 1976. Melanin Pigmentation in Mammals, *Endeavour*, **35**, 32-38.
- [51] **Hearing, V.J. and Jimenez, M.**, 1989. Analysis of Mammalian Pigmentation at the Molecular-Level, *Pigment Cell Research*, **2**, 75-85.
- [52] **Bell, A.A. and Wheeler, M.H.**, 1986. Biosynthesis and Functions of Fungal Melanins, *Annual Review of Phytopathology*, **24**, 411-451.
- [53] **Dellacioppa, G., Garger, S.J., Sverlow, G.G., Turpen, T.H. and Grill, L.K.**, 1990. Melanin Production in *Escherichia-Coli* from a Cloned Tyrosinase Gene, *Bio-Technology*, **8**, 634-638.
- [54] **Cabrera-Valladares, N., Martinez, A., Pinero, S., Lagunas-Munoz, V.H., Tinoco, R., de Anda, R., Vazquez-Duhalt, R., Bolivar, F. and Gosset, G.**, 2006. Expression of the *mela* gene from *Rhizobium etli* CFN42 in *Escherichia coli* and characterization of the encoded tyrosinase, *Enzyme and Microbial Technology*, **38**, 772-779.

- [55] **Ganong, W.F.**, 1995. Review of Medical Physiology, 17th edition, *Appleton&Lange*, 390-391.
- [56] **Murray, R.K., Mayes, P.A., Granner, D.K., Rodwell, V.W.**, 1991. Harper's Biochemistry, 22nd Edition *Appleton & Lange*, **33**.
- [57] **Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M.**, 1993. Principles of Biochemistry, *Worth Publishers, Inc.*, 713-714.
- [58] **Eisenhofer, G., Tian, H., Holmes, C., Matsunaga, J., Roffler-Tarlov, S. and Hearing, V.J.**, 2003. Tyrosinase: a developmentally specific major determinant of peripheral dopamine, *Faseb Journal*, **17**, 1248-1255.
- [59] **Vandermeer, J.R., Devos, W.M., Harayama, S. and Zehnder, A.J.B.**, 1992. Molecular Mechanisms of Genetic Adaptation to Xenobiotic Compounds, *Microbiological Reviews*, **56**, 677-694.
- [60] **Belay, T. and Sonnenfeld, G.**, 2002. Differential effects of catecholamines on in vitro growth of pathogenic bacteria, *Life Sciences*, **71**, 447-456.
- [61] **Lenard, J. and Vanderoef, R.**, 1995. A Novel Bacteristatic Action of Bovine and Porcine Serum That Is Reversed by Norepinephrine, *Life Sciences*, **57**, 443-447.
- [62] **Lyte, M. and Ernst, S.**, 1992. Catecholamine Induced Growth of Gram-Negative Bacteria, *Life Sciences*, **50**, 203-212.
- [63] **Johnston, J.B. and Renganathan, V.**, 1987. Production of Substituted Catechols from Substituted Benzenes by a *Pseudomonas* Sp, *Enzyme and Microbial Technology*, **9**, 706-708.
- [64] **Stoyanovsky, D.A., Goldman, R., Claycamp, H.G. and Kagan, V.E.**, 1995. Phenoxyl Radical-Induced Thiol-Dependent Generation of Reactive Oxygen Species - Implications for Benzene Toxicity, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **317**, 315-323.
- [65] **Schweigert, N., Zehnder, A.J.B. and Eggen, R.I.L.**, 2001. Chemical properties of catechols and their molecular modes of toxic action in cells, from microorganisms to mammals, *Environmental Microbiology*, **3**, 81-91.
- [66] **Hermida-Ameijeiras, A., Mendez-Alvarez, E., Sanchez-Iglesias, S., Sanmartin-Suarez, C. and Soto-Otero, R.**, 2004. Autoxidation and MAO-mediated metabolism of dopamine as a potential cause of oxidative stress: role of ferrous and ferric ions, *Neurochemistry International*, **45**, 103-116.
- [67] **Lancaste.Ga and Sourkes, T.L.**, 1972. Purification and Properties of Hog Kidney 3,4-Dihydroxyphenylalanine Decarboxylase, *Canadian Journal of Biochemistry*, **50**, 791-&.
- [68] **Andoyamamoto, M., Hayashi, H., Sugiyama, T., Fukui, H., Watanabe, T. and Wada, H.**, 1987. Purification of L-Dopa Decarboxylase from Rat-Liver and Production of Polyclonal and Monoclonal-Antibodies against It, *Journal of Biochemistry*, **101**, 405-414.
- [69] **Anderson, W.A., Mooyoung, M. and Legge, R.L.**, 1992. Development of a Multienzyme Reactor for Dopamine Synthesis .1. Enzymology and Kinetics, *Biotechnology and Bioengineering*, **39**, 781-789.
- [70] **Frey, A.D. and Kallio, P.T.**, 2003. Bacterial hemoglobins and flavohemoglobins: versatile proteins and their impact on microbiology and biotechnology, *Fems Microbiology Reviews*, **27**, 525-545.
- [71] **Frey, A.D. and Kallio, P.T.**, 2005. Nitric oxide detoxification - a new era for bacterial globins in biotechnology?, *Trends in Biotechnology*, **23**, 69-73.

- [72] **Elvers, K.T., Wu, G.H., Gilberthorpe, N.J., Poole, R.K. and Park, S.F.**, 2004. Role of an inducible single-domain hemoglobin in mediating resistance to nitric oxide and nitrosative stress in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*, *Journal of Bacteriology*, **186**, 5332-5341.
- [73] **Farres, J., Rechsteiner, M.P., Herold, S., Frey, A.D. and Kallio, P.T.**, 2005. Ligand binding properties, of bacterial hemoglobins and flavohemoglobins, *Biochemistry*, **44**, 4125-4134.
- [74] **Bruns, C.M. and Karplus, P.A.**, 1995. Refined Crystal-Structure of Spinach Ferredoxin Reductase at 1.7 Angstrom Resolution - Oxidized, Reduced and 2'-Phospho-5'-Amp Bound-States, *Journal of Molecular Biology*, **247**, 125-145.
- [75] **Dikshit, K.L., Spaulding, D., Braun, A. and Webster, D.A.**, 1989. Oxygen Inhibition of Globin Gene-Transcription and Bacterial Hemoglobin-Synthesis in *Vitreoscilla*, *Journal of General Microbiology*, **135**, 2601-2609.
- [76] **Ross, E.J.H.**, 2002. Plant nonsymbiotic hemoglobins: hexacoordinated hemoglobins involved in hormonally-regulated cell differentiation, *PhD thesis, University of Nebraska, Lincoln, Nebraska*.
- [77] **Wakabayashi, S., Matsubara, H. and Webster, D.A.**, 1986. Primary Sequence of a Dimeric Bacterial Hemoglobin from *Vitreoscilla*, *Nature*, **322**, 481-483.
- [78] **Woese, C.R., Weisburg, W.G., Paster, B.J., Hahn, C.M., Tanner, R.S., Krieg, N.R., Koops, H.P., Harms, H. and Stackebrandt, E.**, 1984. The Phylogeny of Purple Bacteria - the Beta-Subdivision, *Systematic and Applied Microbiology*, **5**, 327-336.
- [79] **Khosla, C. and Bailey, J.E.**, 1988. Heterologous Expression of a Bacterial Hemoglobin Improves the Growth-Properties of Recombinant *Escherichia-Coli*, *Nature*, **331**, 633-635.
- [80] **Perutz, M.F.**, 1990. Mechanisms Regulating the Reactions of Human Hemoglobin with Oxygen and Carbon-Monoxide, *Annual Review of Physiology*, **52**, 1-25.
- [81] **Wittenberg, J.B. and Wittenberg, B.A.**, 1990. Mechanisms of Cytoplasmic Hemoglobin and Myoglobin Function, *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*, **19**, 217-241.
- [82] **Takagi, T.**, 1993. Hemoglobins from Single-Celled Organisms, *Current Opinion in Structural Biology*, **3**, 413-418.
- [83] **Andersson, C.R., Jensen, E.O., Llewellyn, D.J., Dennis, E.S. and Peacock, W.J.**, 1996. A new hemoglobin gene from soybean: A role for hemoglobin in all plants, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**, 5682-5687.
- [84] **Vinogradov, S.N., Walz, D.A., Pohajdak, B., Moens, L., Kapp, O.H., Suzuki, T. and Trotman, C.N.A.**, 1993. Adventitious Variability - the Amino-Acid-Sequences of Nonvertebrate Globins, *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*, **106**, 1-26.
- [85] **Kapp, O.H., Moens, L., Vanfleteren, J., Trotman, C.N.A., Suzuki, T. and Vinogradov, S.N.**, 1995. Alignment of 700 Globin Sequences - Extent of Amino-Acid Substitution and Its Correlation with Variation in Volume, *Protein Science*, **4**, 2179-2190.

- [86] **Hardison, R.C.**, 1996. A brief history of hemoglobins: Plant, animal, protist, and bacteria, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**, 5675-5679.
- [87] **Moens, L., Vanfleteren, J., VandePeer, Y., Peeters, K., Kapp, O., Czeluzniak, J., Goodman, M., Blaxter, M. and Vinogradov, S.**, 1996. Globins in nonvertebrate species: Dispersal by horizontal gene transfer and evolution of the structure-function relationships, *Molecular Biology and Evolution*, **13**, 324-333.
- [88] **Vasudevan, S.G., Armarego, W.L.F., Shaw, D.C., Lilley, P.E., Dixon, N.E. and Poole, R.K.**, 1991. Isolation and Nucleotide-Sequence of the Hmp Gene That Encodes a Hemoglobin-Like Protein in Escherichia-Coli-K-12, *Molecular & General Genetics*, **226**, 49-58.
- [89] **Ramandeep, Hwang, K.W., Raje, M., Kim, K.J., Stark, B.C., Dikshit, K.L. and Webster, D.A.**, 2001. Vitreoscilla hemoglobin - Intracellular localization and binding to membranes, *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 24781-24789.
- [90] **Dikshit, R.P., Dikshit, K.L., Liu, Y.X. and Webster, D.A.**, 1992. The Bacterial Hemoglobin from Vitreoscilla Can Support the Aerobic Growth of Escherichia-Coli Lacking Terminal Oxidases, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **293**, 241-245.
- [91] **Kallio, P.T., Kim, D.J., Tsai, P.S. and Bailey, J.E.**, 1994. Intracellular Expression of Vitreoscilla Hemoglobin Alters Escherichia-Coli Energy-Metabolism under Oxygen-Limited Conditions, *European Journal of Biochemistry*, **219**, 201-208.
- [92] **Roos, V., Andersson, C.I.J. and Bulow, L.**, 2004. Gene expression profiling of Escherichia coli expressing double Vitreoscilla haemoglobin, *Journal of Biotechnology*, **114**, 107-120.
- [93] **Geckil, H., Barak, Z., Chipman, D.M., Erenler, S.O., Webster, D.A. and Stark, B.C.**, 2004. Enhanced production of acetoin and butanediol in recombinant Enterobacter aerogenes carrying Vitreoscilla hemoglobin gene, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, **26**, 325-330.
- [94] **Park, K.W., Kim, K.J., Howard, A.J., Stark, B.C. and Webster, D.A.**, 2002. Vitreoscilla hemoglobin binds to subunit I of cytochrome bo ubiquinol oxidases, *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 33334-33337.
- [95] **Liu, S.C., Webster, D.A., Wei, M.L. and Stark, B.C.**, 1996. Genetic engineering to contain the Vitreoscilla hemoglobin gene enhances degradation of benzoic acid by Xanthomonas maltophilia, *Biotechnology and Bioengineering*, **49**, 101-105.
- [96] **Patel, S.M., Stark, B.C., Hwang, K.W., Dikshit, K.L. and Webster, D.A.**, 2000. Cloning and expression of Vitreoscilla hemoglobin gene in Burkholderia sp strain DNT for enhancement of 2,4-dinitrotoluene degradation, *Biotechnology Progress*, **16**, 26-30.
- [97] **Gardner, P.R.**, 2005. Nitric oxide dioxygenase function and mechanism of flavohemoglobin, hemoglobin, myoglobin and their associated reductases, *Journal of Inorganic Biochemistry*, **99**, 247-266.
- [98] **Frey, A.D., Oberle, B.T., Farres, J. and Kallio, P.T.**, 2004. Expression of Vitreoscilla haemoglobin in tobacco cell cultures relieves nitrosative stress in vivo and protects from NO in vitro, *Plant Biotechnology Journal*, **2**, 221-231.

- [99] **Fish, P.A., Webster, D.A. and Stark, B.C.**, 2000. Vitreoscilla hemoglobin enhances the first step in 2,4-dinitrotoluene degradation in vitro and at low aeration in vivo, *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, **9**, 75-82.
- [100] **Lin, J.M., Stark, B.C. and Webster, D.A.**, 2003. Effects of Vitreoscilla hemoglobin on the 2,4-dinitrotoluene (2,4-DNT) dioxygenase activity of Burkholderia and on 2,4-DNT degradation in two-phase bioreactors, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **30**, 362-368.
- [101] **Chung, J.W., Webster, D.A., Pagilla, K.R. and Stark, B.C.**, 2001. Chromosomal integration of the Vitreoscilla hemoglobin gene in Burkholderia and Pseudomonas for the purpose of producing stable engineered strains with enhanced bioremediating ability, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **27**, 27-33.
- [102] **Somerville, C.C., Nishino, S.F. and Spain, J.C.**, 1995. Purification and Characterization of Nitrobenzene Nitroreductase from Pseudomonas Pseudoalcaligenes Js45, *Journal of Bacteriology*, **177**, 3837-3842.
- [103] **Boerman, S.J. and Webster, D.A.**, 1982. Control of Heme Content in Vitreoscilla by Oxygen, *Journal of General and Applied Microbiology*, **28**, 35-43.
- [104] **Khosla, C. and Bailey, J.E.**, 1989. Evidence for Partial Export of Vitreoscilla Hemoglobin into the Periplasmic Space in Escherichia-Coli - Implications for Protein Function, *Journal of Molecular Biology*, **210**, 79-89.
- [105] **Koskenkorva, T., Frey, A.D. and Kallio, P.T.**, 2006. Characterization of heterologous hemoglobin and flavohemoglobin promoter regulation in Escherichia coli, *Journal of Biotechnology*, **122**, 161-175.
- [106] **Magnolo, S.K., Leenutaphong, D.L., Demodena, J.A., Curtis, J.E., Bailey, J.E., Galazzo, J.L. and Hughes, D.E.**, 1991. Actinorhodin Production by Streptomyces-Coelicolor and Growth of Streptomyces-Lividans Are Improved by the Expression of a Bacterial Hemoglobin, *Bio-Technology*, **9**, 473-476.
- [107] **Farres, J. and Kallio, P.T.**, 2002. Improved cell growth in tobacco suspension cultures expressing Vitreoscilla hemoglobin, *Biotechnology Progress*, **18**, 229-233.
- [108] **Geckil, H., Stark, B.C. and Webster, D.A.**, 2001. Cell growth and oxygen uptake of Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa are differently effected by the genetically engineered Vitreoscilla hemoglobin gene, *Journal of Biotechnology*, **85**, 57-66.
- [109] **Joshi, M. and Dikshit, K.L.**, 1994. Oxygen-Dependent Regulation of Vitreoscilla Globin Gene - Evidence for Positive Regulation by Fnr, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **202**, 535-542.
- [110] **Wei, M.L., Webster, D.A. and Stark, B.C.**, 1998. Genetic engineering of Serratia marcescens with bacterial hemoglobin gene: Effects on growth, oxygen utilization, and cell size, *Biotechnology and Bioengineering*, **57**, 477-483.
- [111] **Liu, S.C., Webster, D.A. and Stark, B.C.**, 1995. Cloning and expression of the Vitreoscilla hemoglobin gene in pseudomonads: Effects on cell growth, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **44**, 419-424.
- [112] **Hardison, R.**, 1998. Hemoglobins from bacteria to man: Evolution of different patterns of gene expression, *Journal of Experimental Biology*, **201**, 1099-1117.

- [113] **Bulow, L., Holmberg, N., Lilius, G. and Bailey, J.E.**, 1999. The metabolic effects of native and transgenic hemoglobins on plants, *Trends in Biotechnology*, **17**, 21-24.
- [114] **Suthar, D.H. and Chattoo, B.B.**, 2006. Expression of Vitreoscilla hemoglobin enhances growth and levels of alpha-amylase in Schwanniomyces occidentalis, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **72**, 94-102.
- [115] **Chien, L.J. and Lee, C.K.**, 2005. Expression of bacterial hemoglobin in the yeast, *Pichia pastoris*, with a low O₂-induced promoter, *Biotechnology Letters*, **27**, 1491-1497.
- [116] **Demodena, J.A., Gutierrez, S., Velasco, J., Fernandez, F.J., Fachini, R.A., Galazzo, J.L., Hughes, D.E. and Martin, J.F.**, 1993. The Production of Cephalosporin-C by Acremonium-Chrysogenum Is Improved by the Intracellular Expression of a Bacterial Hemoglobin, *Bio-Technology*, **11**, 926-929.
- [117] **Kallio, P.T. and Bailey, J.E.**, 1996. Intracellular expression of Vitreoscilla hemoglobin (VHb) enhances total protein secretion and improves the production of alpha-amylase and neutral protease in *Bacillus subtilis*, *Biotechnology Progress*, **12**, 31-39.
- [118] **Nasr, M.A., Hwang, K.W., Akbas, M., Webster, D.A. and Stark, B.C.**, 2001. Effects of culture conditions on enhancement of 2,4-dinitrotoluene degradation by Burkholderia engineered with the Vitreoscilla hemoglobin gene, *Biotechnology Progress*, **17**, 359-361.
- [119] **Pendse, G.J. and Bailey, J.E.**, 1994. Effect of Vitreoscilla Hemoglobin Expression on Growth and Specific Tissue-Plasminogen Activator Productivity in Recombinant Chinese-Hamster Ovary Cells, *Biotechnology and Bioengineering*, **44**, 1367-1370.
- [120] **Nilsson, M., Kallio, P.T., Bailey, J.E., Bulow, L. and Wahlund, K.G.**, 1999. Expression of Vitreoscilla hemoglobin in Escherichia coli enhances ribosome and tRNA levels: A flow field-flow fractionation study, *Biotechnology Progress*, **15**, 158-163.
- [121] **Sander, F.C., Fachini, R.A., Hughes, D.E., Galazzo, J.L. and Bailey, J.E.**, 1994. Expression of Vitreoscilla Hemoglobin in Corynebacterium-Glutamicum Increases Final Concentration and Yield of L-Lysine, *Ecb6: Proceedings of the 6th European Congress on Biotechnology, Pts I and II*, **9**, 607-610.
- [122] **Khosravi, M., Webster, D.A. and Stark, B.C.**, 1990. Presence of the Bacterial Hemoglobin Gene Improves Alpha-Amylase Production of a Recombinant Escherichia-Coli Strain, *Plasmid*, **24**, 190-194.
- [123] **Chung, Y.J., Kim, K.S., Jeon, E.S., Park, K.I. and Park, C.U.**, 1998. Effects of the Vitreoscilla hemoglobin gene on the expression of the ferritin gene in Escherichia coli, *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, **31**, 503-507.
- [124] **Ramirez, M., Valderrama, B., Arredondo-Peter, R., Soberon, M., Mora, J. and Hernandez, G.**, 1999. Rhizobium etli genetically engineered for the heterologous expression of Vitreoscilla sp hemoglobin: Effects on free-living and symbiosis, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **12**, 1008-1015.
- [125] **Chen, W., Hughes, D.E. and Bailey, J.E.**, 1994. Intracellular Expression of Vitreoscilla Hemoglobin Alters the Aerobic Metabolism of Saccharomyces-Cerevisiae, *Biotechnology Progress*, **10**, 308-313.

- [126] **Brunker, P., Minas, W., Kallio, P.T. and Bailey, J.E.**, 1998. Genetic engineering of an industrial strain of *Saccharopolyspora erythraea* for stable expression of the *Vitreoscilla haemoglobin* gene (vhb), *Microbiology-Uk*, **144**, 2441-2448.
- [127] **Minas, W., Brunker, P., Kallio, P.T. and Bailey, J.E.**, 1998. Improved erythromycin production in a genetically engineered industrial strain of *Saccharopolyspora erythraea*, *Biotechnology Progress*, **14**, 561-566.
- [128] **Wei, M.L., Webster, D.A. and Stark, B.C.**, 1998. Metabolic engineering of *Serratia marcescens* with the bacterial hemoglobin gene: Alterations in fermentation pathways, *Biotechnology and Bioengineering*, **59**, 640-646.
- [129] **Bailey, J.E., Shurlati, A., Hatzimanikatis, V., Lee, K., Renner, W.A. and Tsai, P.S.**, 1996. Inverse metabolic engineering: A strategy for directed genetic engineering of useful phenotypes, *Biotechnology and Bioengineering*, **52**, 109-121.
- [130] **Khleifat, K.M., Abboud, M.M. and Al-Mustafa, A.H.**, 2006. Effect of *Vitreoscilla* hemoglobin gene (vgb) and metabolic inhibitors on cadmium uptake by the heterologous host *Enterobacter aerogenes*, *Process Biochemistry*, **41**, 930-934.
- [131] **Geckil, H., Gencer, S. and Uckun, M.**, 2004. *Vitreoscilla* hemoglobin expressing *Enterobacter aerogenes* and *Pseudomonas aeruginosa* respond differently to carbon catabolite and oxygen repression for production of L-asparaginase, an enzyme used in cancer therapy, *Enzyme and Microbial Technology*, **35**, 182-189.
- [132] **Sinclair, C.G.**, 1987. Microbial Process Kinetics, *Basic Biotechnology*, London, 75-131.
- [133] **Dunn, I.J., Heinzle, E., Ingham, J., Prenosil, I.E.**, 1992. Biological Reaction Engineering, *VCH Weinheim*.
- [134] **Türker, M.**, 2005. Biyoreaksiyon Mühendisliği, *Su Vakfı Yayınları*.
- [135] **Moser, A.**, 1985. Kinetic of Batch Fermentations, *Biotechnology*, *VCH Weinheim*, **2**.
- [136] **Andrews, J.F.**, 1968. A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrates, *Biotechnology and Bioengineering*, **10**, 707-723.
- [137] **Luong, J.H.T.**, 1987. Generalization of Monod Kinetics for Analysis of Growth Data with Substrate-Inhibition, *Biotechnology and Bioengineering*, **29**, 242-248.
- [138] **Mulchandani, A. and Luong, J.H.T.**, 1989. Microbial Inhibition-Kinetics Revisited, *Enzyme and Microbial Technology*, **11**, 66-73.
- [139] **Gaden, E.L.**, 1959. Fermentation process kinetics, *Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering*, **1**, 413-429.
- [140] **Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and K., S.**, 2005. Current Protocols in Molecular Biology, *John Wiley & Sons, Inc.*
- [141] **Abdallah, R. and Taha, S.**, 2012. Biosorption of methylene blue from aqueous solution by nonviable *Aspergillus fumigatus*, *Chemical Engineering Journal*, **195**, 69-76.
- [142] **Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J.**, 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- [143] **Lyte, M.**, 1993. The Role of Microbial Endocrinology in Infectious-Disease, *Journal of Endocrinology*, **137**, 343-345.

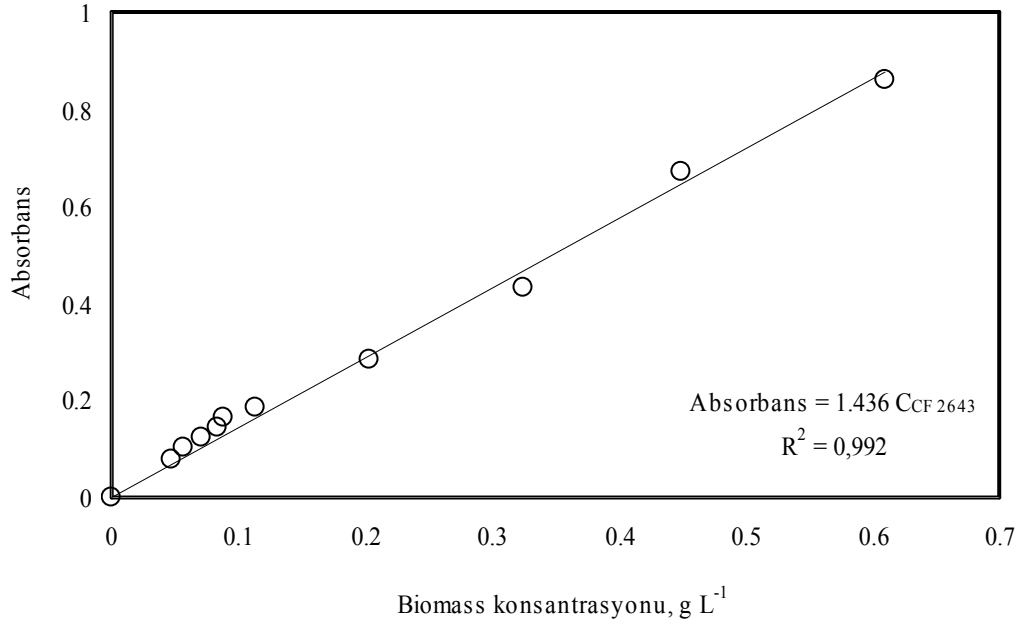
- [144] **Bertani, G.**, 1951. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*, *Journal of Bacteriology*, **62**, 293-300.
- [145] **Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.**, 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- [146] **Miller, G.L.**, 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar, *Analytical Chemistry*, **31**, 426-428.
- [147] **Wriston, J.C., Jr**, 1970. Asparaginase, *Method. Enzymol.*, **17**, 732-742.
- [148] **Van't Riet, K.**, 1983. Mass transfer in fermentation, *Trends in Biotechnology*, **1**, 113-119.
- [149] **Rehm, J., Reed, G. and Kennedy, J.F.**, 1987. Biotechnology, *Vch. New York*, **7a**, 5-100.
- [150] **Prudende, K.W., Katz, A., Sugrue, J.A. and Thomson, A.**, 1989. The effect of glucose on the expression of a cloned *Bacillus amyloliquefaciens* α -amylase gene in strains *Bacillus subtilis*, *Current Microbiology*, **18**, 27-31.
- [151] **Yun, J.S. and Ryu, H.W.**, 2001. Lactic acid production and carbon catabolite repression from single and mixed sugars using *Enterococcus faecalis* RKY1, *Process Biochemistry*, **37**, 235-240.
- [152] **Shuler, M.L. and Kargi, F.**, 2002. Bioprocess Engineering: Basic Concepts, *Prentice-Hall International Series in the Physical and Chemical Engineering Sciences*, **2nd Edition**.
- [153] **Farezvidal, M.E., Fernandezvivas, A. and Arias, J.M.**, 1992. Production of Alpha-Amylase by *Myxococcus-Corallodes-D*, *Journal of Applied Bacteriology*, **73**, 148-156.
- [154] **Ülger, C.**, 1997. Production of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens* alpha-amylase in aqueous two phase systems, *Hacettepe Ün. Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi*, Ankara.
- [155] **Hamilton, L.M., Kelly, C.T. and Fogarty, W.M.**, 1999. Production and properties of the raw starch-digesting alpha-amylase of *Bacillus* sp IMD 435, *Process Biochemistry*, **35**, 27-31.
- [156] **Jin, F.X., Cheng, X.M., Shi, Y.F. and Zhang, C.Z.**, 1990. Isolation of New Thermophilic Aerobic-Bacteria Which Produce Thermostable Alpha-Amylase, *Journal of General and Applied Microbiology*, **36**, 415-424.
- [157] **Cheng, C.Y., Yabe, I. and Toda, K.**, 1989. Predominant Growth of Alpha-Amylase Regulation Mutant in Continuous Culture of *Bacillus-Calduolyticus*, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **67**, 176-181.
- [158] **Tanyıldızı, M.Ş.**, 2005. Çeşitli Bakteri Türleriyle Farklı Ortam ve Çalışma Şartlarında α -Amilaz Üretiminin İncelenmesi, *Doktora tezi, Fırat Üniversitesi, Elazığ*.
- [159] **Manning, G.B., Campbell, L.L.**, 1961. Thermostable alpha-amylase of *Bacillus stearothermophilus*. I. Crystallization and some general properties, *The Journal of Biological Chemistry*, **236**, 2952-2957.
- [160] **Sodhi, H.K., Sharma, K., Gupta, J.K. and Soni, S.K.**, 2005. Production of a thermostable alpha-amylase from *Bacillus* sp PS-7 by solid state fermentation and its synergistic use in the hydrolysis of malt starch for alcohol production, *Process Biochemistry*, **40**, 525-534.
- [161] **Prakasham, R.S., Rao, C.S., Rao, R.S. and Sarma, P.N.**, 2005. Alkaline protease production by an isolated *Bacillus circulans* under solid-state fermentation using agroindustrial waste: Process parameters optimization, *Biotechnology Progress*, **21**, 1380-1388.

- [162] **Krishnaveni, R., Rathod, V., Thakur, M.S. and Neelgund, Y.F.**, 2009. Transformation of L-Tyrosine to L-Dopa by a Novel Fungus, *Acremonium rutilum*, Under Submerged Fermentation, *Current Microbiology*, **58**, 122-128.
- [163] **McDaniel, L.E., Bailey, E.G.**, 1969. Effect of Shaking Speed and Type of Closure on Shake Flask Cultures, *Applied Microbiology*, **17**, 286-290.
- [164] **Nadeem, M., Qazi, J.I. and Baig, S.**, 2009. Effect of Aeration and Agitation Rates on Alkaline Protease Production by *Bacillus licheniformis* UV-9 Mutant, *Turkish Journal of Biochemistry-Turk Biyokimya Dergisi*, **34**, 89-96.
- [165] **Bailey, J.E. and Ollis, D.F.**, 1986. Biochemical Engineering and Biotechnology, 2nd Edition, *Mc Graw Hill, New York*.
- [166] **Calik, P., Calik, G. and Ozdamar, T.H.**, 1998. Oxygen transfer effects in serine alkaline protease fermentation by *Bacillus licheniformis*: Use of citric acid as the carbon source, *Enzyme and Microbial Technology*, **23**, 451-461.
- [167] **Ozer, D. and Elibol, M.**, 2000. Effects of some factors on lipase production by *Rhizopus arrhizus*, *Journal of Food Science and Technology-Mysore*, **37**, 661-664.
- [168] **Ozergin-Ulgen, K. and Mavituna, F.**, 1998. Oxygen transfer and uptake in *Streptomyces coelicolor* A3(2) culture in a batch bioreactor, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **73**, 243-250.
- [169] **Bilir, E.**, 2002. Rekombinant Proteaz Üretiminde Biyoreaktör İşletim Parametrelerinin Hücre içi Tepkime Hızlarına ve Verime Etkisi, *Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara*.
- [170] **Pehlivan, N.**, 2001. Rekombinant *Bacillus Türleri* ile Serin Alkali Proteaz Üretimi İçin Kompleks Ortamda Oksijen Aktarım Etkilerinin Araştırılması, *Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara*.
- [171] **Yılmaz, Ö.D.**, 2008. Metabolik Mühendislik ve Reaksiyon Mühendisliği Prensipleriyle Hücre-Dışı Rekombinant İnsan Büyüme Hormonu Üretimi, *Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara*.
- [172] **Erçek, E.**, 2010. Yarı kesikli bir polimerizasyon reaktörünün genetik algoritma kullanılarak geliştirilmiş öngörmeli kontrolü, *Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Ankara*.
- [173] **Ülker, E.O.**, 2008. Genetik algoritma kullanarak bilgisayar destekli moleküler tasarım, *Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara*.
- [174] **Sivanandam, S.N. and Deepa, S.N.**, 2008. Introduction to Genetic Algorithms, *Springer*.
- [175] **Goldberg, D.E.**, 1989. Genetic Algorithms in Search, Optimization, and Machine Learning, *Addison-Wesley*.
- [176] **Altay, A.**, 2007. Genetik algoritma ve bir uygulama, *Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul*.
- [177] **Özkan, R.**, 2003. Tek modellenli deterministik montaj hattı dengeleme problemlerine genetik algoritma ile çözüm yaklaşım, *Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul*.
- [178] **Sakawa, M.**, 2002. Genetic Algorithms and Fuzzy Multi objective Optimization, *Kluwer Academic Publishers*.
- [179] **Deb, K.**, 2001. Multi-Objective Optimization using Evolutionary Algorithms, *John Wiley & Sons Ltd., England*.
- [180] **Vural, M.**, 2005. Genetik Algoritma Yöntemi İle Toplu Üretim Planlama, *Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul*.

- [181] **Man, K.F., Tang, K.S. and Kwong, S.**, 1999. Genetic Algorithms, *Springer Publishing*.
- [182] **Villadsen, J., Nielsen, J. and Liden, G.**, 2011. Bioreaction Engineering Principles, *Springer Publishing*, **3 rd Edition**.

10. EKLER

EK-1. *Citrobacter freundii* (NRRL B-2633) Derişimi İçin alışma Doğrusu

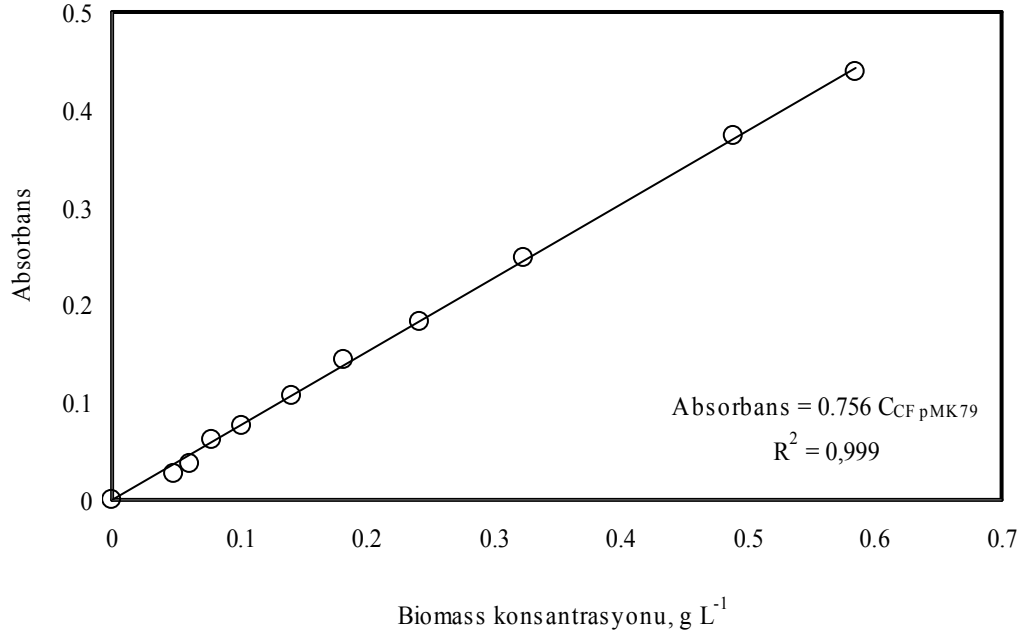


şekil E1.1. 600 nm’de *Citrobacter freundii* (NRRL B-2633) Konsantrasyonu İçin alışma Doğrusu

Citrobacter freundii (NRRL B-2633) konsantrasyonunu belirlemek için

$C_{CF\ 2643} = \left(\frac{\text{Absorbans}}{1.436} \right) \times \text{Seyreltme Faktörü}$ alışma doğrusu eşitliği kullanılmıştır.

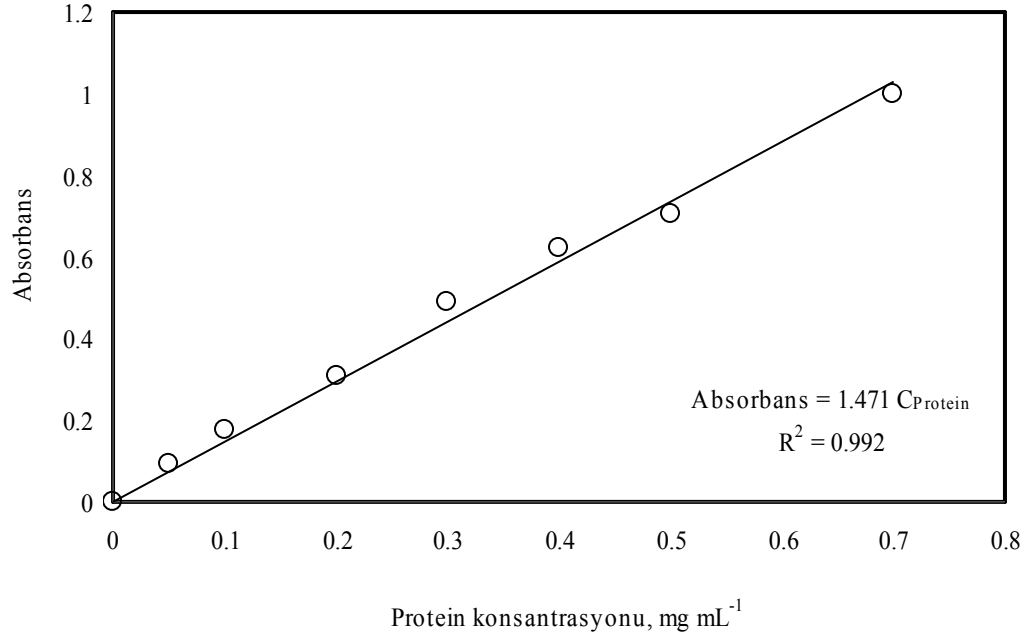
EK-2. *Citrobacter freundii* pMK79 Derişimi İçin alışma Doğrusu



şekil E2.1. 600 nm’de *Citrobacter freundii* pMK79 Konsantrasyonu İçin alışma Doğrusu

Citrobacter freundii pMK79 konsantrasyonunu belirlemek için $C_{CF\ pMK79} = \left(\frac{\text{Absorbans}}{0.756} \right) \times \text{Seyreltme Faktörü}$ alışma doğrusu eşitliği kullanılmıştır.

EK-3. Toplam Protein Derişimi İçin alışma Doğrusu

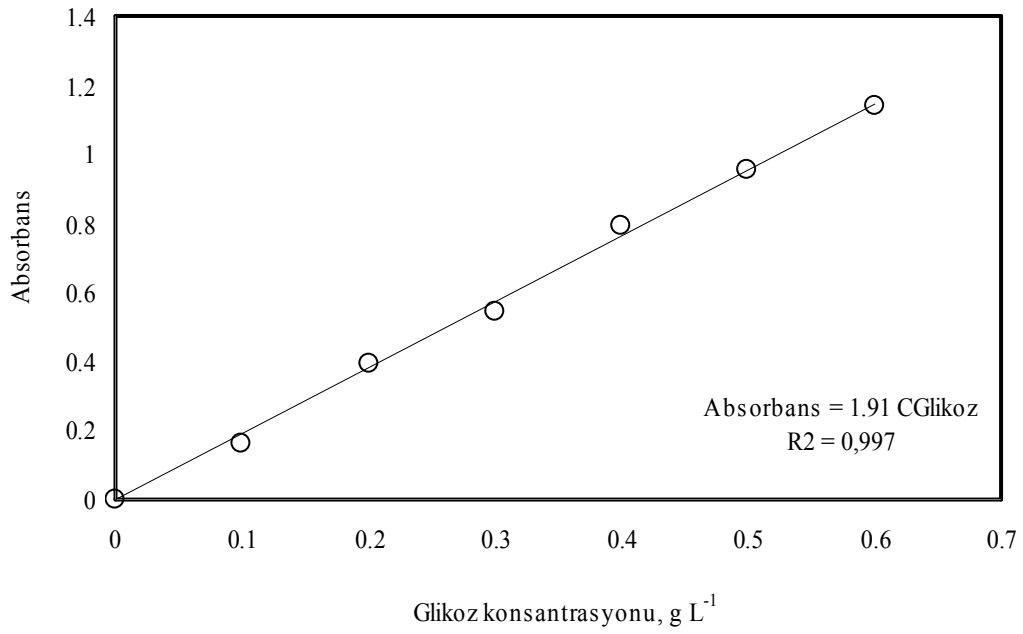


şekil E3.1. 660 nm’de protein konsantrasyonu çalışma doğrusu

Toplam protein konsantrasyonunun tayini için $C_{\text{Protein}} = \left(\frac{\text{Absorbans}}{1.471} \right) \times \text{Seyreltme Faktörü}$ alışma doğrusu eşitliği kullanılmıştır.

EK-4. Dinitrosalisilikasit (DNS) Metodu ile Glikoz Derişimi Tayini İçin Çalışma Doğrusu

Glikoz konsantrasyonu dinitrosalisilikasit (DNS) yöntemi kullanılarak ölçülmüştür. Bu bağlamda konsantrasyonu bilinen miktarlarda glikoz içeren ortamlar kullanılarak çalışma doğrusu hazırlanmıştır.



Şekil E4.1. 550 nm’de glikoz çalışma doğrusu.

Fermantasyon ortamındaki harcanmadan ortamda kalan glikoz konsantrasyonunu bulmak

için $C_{\text{Glikoz}} = \left(\frac{\text{Absorbans}}{1.910} \right) \times \text{Seyreltme Faktörü}$ çalışma doğrusu eşitliği kullanılmıştır.

EK-5. Dinitrosalisilikasit (DNS) Metodu ile Glikoz Analizi İçin Reaktiflerin Hazırlanması

1. *i.* 880 cm³ % 1 ağırlıkça DNS çözeltisi hazırlanır.
8.8 g DNS tartılarak 880 cm³ distile suda çözündürülür.

ii. 225 g ROCHELLE tuzu (sodyum potasyum tartarat) çözeltiye eklenerek karıştırılır.

iii. Bu çözeltiye 300 cm³ % 4.5'luk NaOH çözeltisi eklenir.
% 4.5'luk NaOH çözeltisi, 13.5 g NaOH 300 cm³ distile suda çözündürülür.
2. *i.* 22 cm³ % 10'luk NaOH çözeltisi hazırlanır.
2.2 g NaOH 22 cm³ distile suda çözündürülür.

ii. Çözeltiye 10 g kristalize fenol katılır ve karışıma 100 cm³ distile su ilave edilir.

iii. Bu alkali fenol karışımından 60 cm³ alınarak 6.9 g NaHCO₃ ile karıştırılır.

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

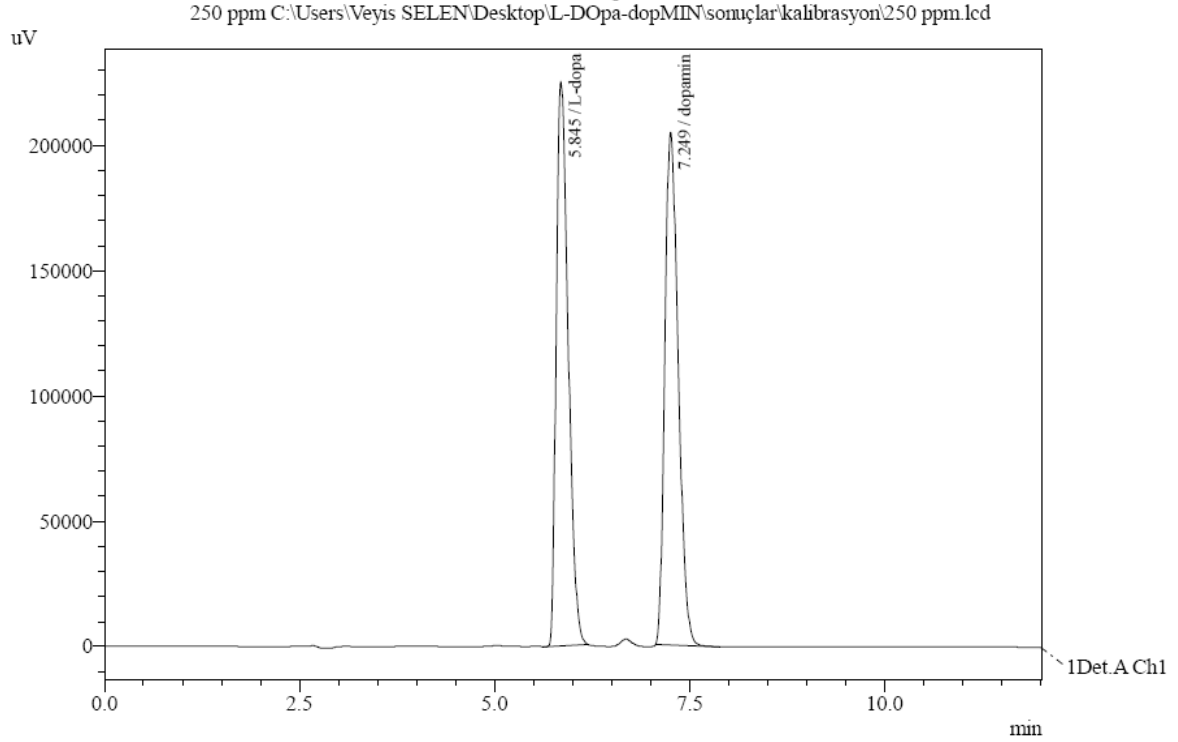
EK-6. L-DOPA ve Dopamin İçin HPLC Spektrumları

FIRAT ÜNİVERSİTESİ KİMYA MÜHENDİSLİĞİ BÖLÜMÜ

Sample Information

Acquired by : Veyis SELEN
Sample Name : 250 ppm
Sample ID :
Tray# : 1
Vial# : 4
Injection Volume : 20 uL
Data Filename : 250 ppm.lcd
Method Filename : DOPA-DOPAMİN.lcm
Batch Filename : kalibrasyon mx.lcb
Report Filename : Default.lcr

Chromatogram



Quantitative Results

Detector A

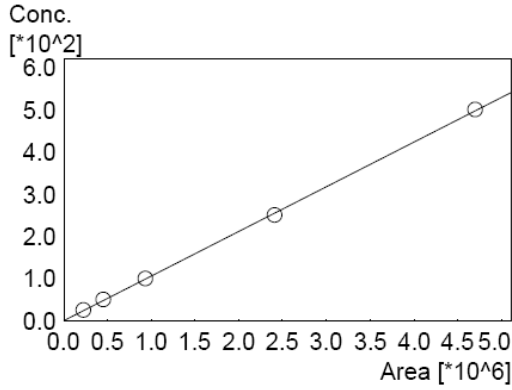
ID#	Name	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Units
1	L-dopa	5.845	2397879	225320	253.930	ppm
2	dopamin	7.249	2440943	204632	254.452	ppm

EK-7. L-DOPA ve Dopamin İçin HPLC Çalışma Doğruları

==== Shimadzu LCsolution Calibration Curve ====

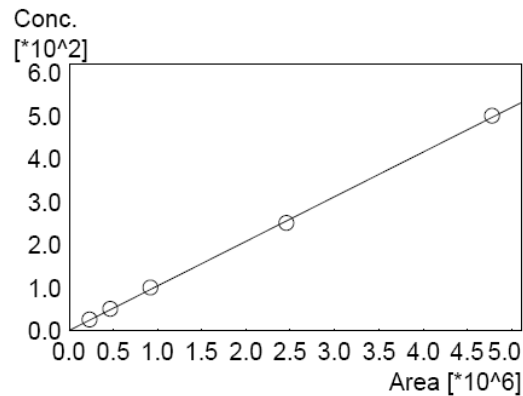
<Calibration Curve>

ID# : 1
 Name : dopa
 Quantitative Method : External Standard
 Function : $f(x)=0.000106047 \cdot x - 0.117154$
 Rr1=0.9998880 Rr2=0.9997760
 MeanRF:0.000106887 RFSD:1.98866e-006 RFRSD:1.86054
 FitType : Linear
 ZeroThrough : Not Through
 WeightedRegression : None
 Detector Name : Detector A



#	Conc (Ratio)	Area	Area
1	25.000	230448.4	230448
2	50.000	459214.8	459215
3	100.000	937345.0	937345
4	250.000	2406886.0	2406886
5	500.000	4694187.5	4694187

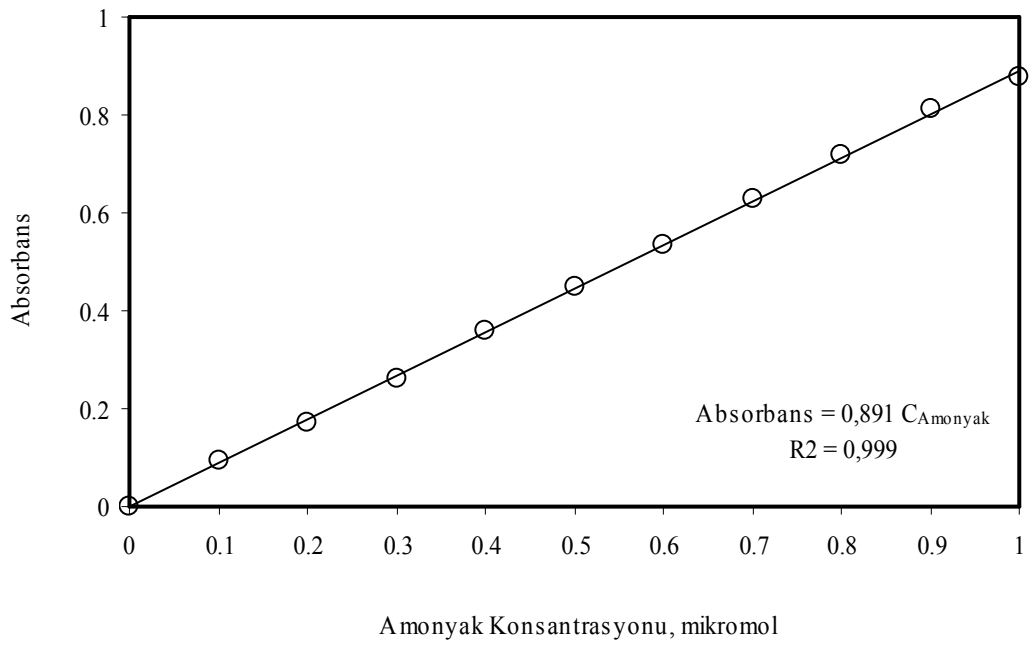
ID# : 2
 Name : dopamin
 Quantitative Method : External Standard
 Function : $f(x)=0.000104023 \cdot x + 0.640015$
 Rr1=0.9998159 Rr2=0.9996318
 MeanRF:0.000105537 RFSD:2.46612e-006 RFRSD:2.33674
 FitType : Linear
 ZeroThrough : Not Through
 WeightedRegression : None
 Detector Name : Detector A



#	Conc (Ratio)	Area	Area
1	25.000	235045.4	235045
2	50.000	468437.2	468437
3	100.000	924487.0	924487
4	250.000	2457731.9	2457732
5	500.000	4775798.5	4775799

EK-8. Tirozin Fenol Liyaz (TPL) Enzimi İçin Amonyak Çalışma Doğrusu

Tirozin fenol liyaz (TPL) enzim aktivitesi, bu enzim tarafından L-tirozinin fenol, pirüvat ve amonyağa yıkılmasından açığa çıkan amonyağın belirlenmesine dayanan ve yaygın olarak kullanılan Nessler reaksiyonuyla belirlenmiştir.



Şekil E9.1. 480 nm’de amonyak çalışma doğrusu.

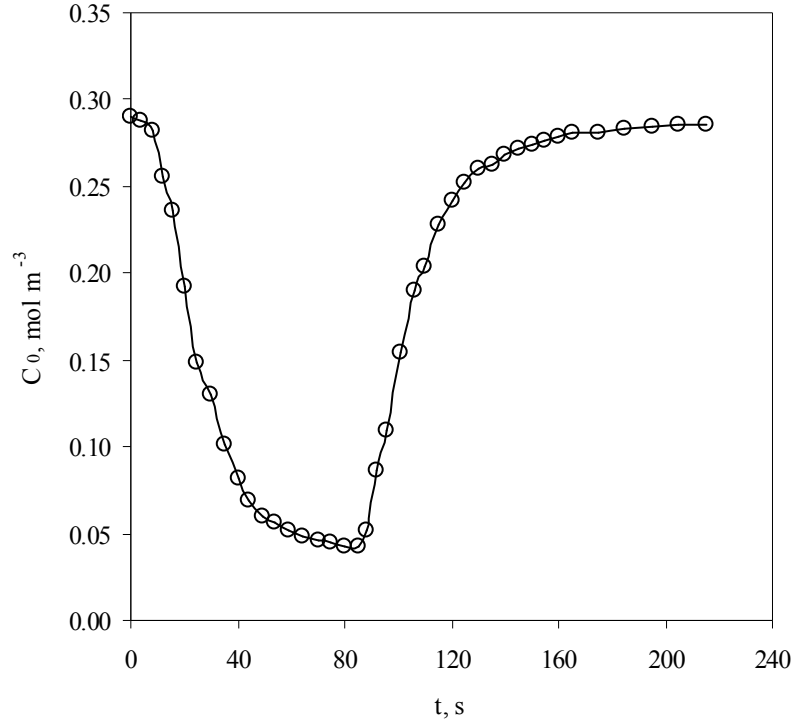
Fermantasyon ortamındaki amonyak konsantrasyonunu bulmak için

$$C_{\text{Amonyak}} = \left(\frac{\text{Absorbans}}{0.819} \right) \times \text{Seyreltme Faktörü}$$

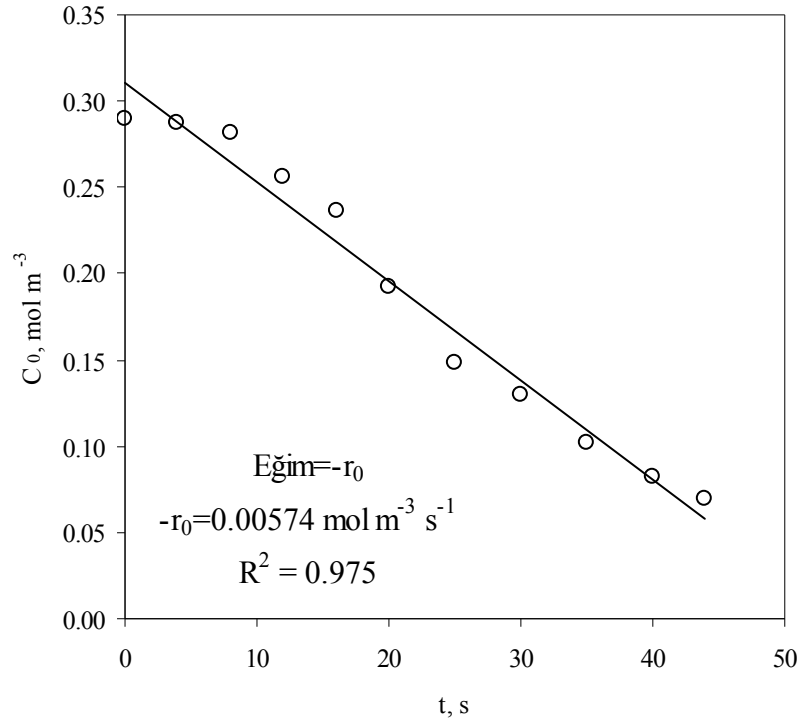
çalışma doğrusu eşitliği kullanılmıştır.

EK-9. Dinamik Yöntem İle Sıvı Faz Kütle Aktarım Katsayısı (k_La) ve Mikroorganizmanın Oksijen Tüketim Hızının ($-r_o$) Belirlenmesi

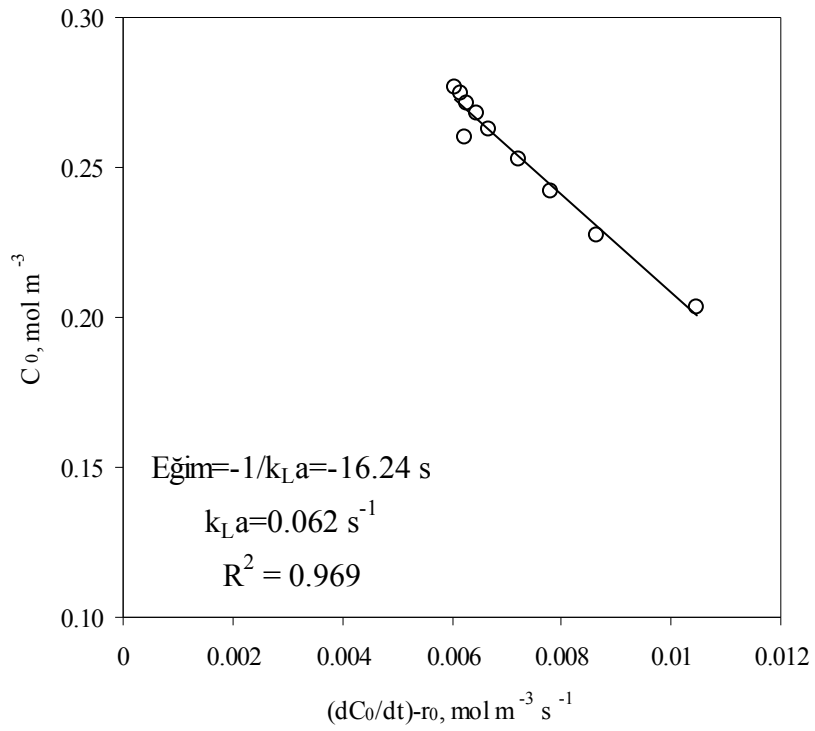
Biyoreaktöre gönderilen havanın kısa süreli olarak kesilmesi sonucunda çözünmüş oksijen derişiminde azalmanın gözlemlendiği (t, C_o) grafiğinde (Şekil E6.1.), azalan doğrusal ilişkiden r_o değeri bulunmuştur. $\{(dC_o/dt-r_o); C_o\}$ grafiği çizilerek buradaki eğimden $-1/k_La$ değeri bulunmuş ve k_La hesaplanmıştır. Aşağıda *Citrobacter freundii* (NRRL B-2633) yabani suşunun kullanıldığı fermantasyon ortamında ve 500 rpm karıştırma hızı, 0.6 vvm hava giriş hızı biyoreaktör koşulları için $t=24$ st'deki r_o ve k_La değerlerinin hesabı örnek olarak sırasıyla Şekil E6.2. ve Şekil E6.3.'de gösterilmiştir.



Şekil E6.1. Çözünmüş oksijen derişiminin kalma süresi ile değışimi.



Şekil E6.2. Mikroorganizmanın Oksijen Tüketim Hızının Belirlenmesi.



Şekil E6.3. Sıvı Faz Kütle Aktarım Katsayısının $k_L a$ 'nın Belirlenmesi

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Veyis SELEN
Doğum Yeri ve Tarihi : Elmadağ-ANKARA - 02.07.1982

EĞİTİM DURUMU

İlkokul :Barut Fabrikası İlköğretim Okulu (Elmadağ-ANKARA, 1988–1993).
Ortaokul :Elmadağ Lisesi (Elmadağ-ANKARA, 1993–1996).
Lise :Elmadağ Lisesi (Elmadağ-ANKARA, 1996–1999).
Lisans :Fırat Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, (ELAZIĞ, 1999–2003).
Yüksek Lisans :Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, (ELAZIĞ, 2003–2006).

YAYINLANMIŞ ESERLER

a) Uluslararası Hakemli Dergilerdeki Yayınlar:

1. M. Şaban TANYILDIZI, Veyis SELEN and Dursun ÖZER, *Optimization of α -Amylase Production in Solid Substrate Fermentation*, **The Canadian Journal Of Chemical Engineering**, Volume:87, Issue:3, Pages:493-498, 2009.
2. M. Şaban TANYILDIZI, Şule BULUT, Veyis SELEN and Dursun ÖZER, *Optimization of lactic acid production with immobilized *Rhizopus oryzae**, **African Journal of Biotechnology**, Volume: 11, Issue: 34, Pages: 8546-8552, 2012.
3. Veyis SELEN, Dursun ÖZER, Ahmet ÖZER, *A Study on the Removal of Cr(VI) Ions by Sesame (*Sesamum indicum*) Stems Dehydrated with Sulfuric Acid*, **The Arabian Journal for Science and Engineering**, Volume: 39, Issue: 8, Pages: 5895-5904, 2014.
4. Ömer GÜLER, Ertan EVİN, Seval H. GÜLER, Veyis SELEN, Sinan YARDIMCI, Ali KELEŞ, *Synthesis of C-BN hybride nano structures*, **Journal of Optoelectronics and Advanced Materials**, Volume: 17, Issue: 5-6, Pages: 795-798, 2015.
5. Veyis SELEN, Ömer GÜLER, Dursun ÖZER, Ertan EVİN, *Synthesized Multi-walled Carbon Nanotubes as a Potential Adsorbent for the Removal of Methylene Blue Dye: Kinetics, Isotherms, and Thermodynamics*, **Desalination and Water Treatment**, DOI: 10.1080/19443994.2015.1025851, in press.

b) Ulusal Hakemli Dergilerdeki Yayınlar:

1. Veyis SELEN, M. Şaban TANYILDIZI, Dursun ÖZER, *Fındık Küspesi Kullanarak Bacillus amyloliquefaciens'den α -Amilaz Üretiminin İncelenmesi*, **Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi**, Cilt: 10, Sayı: 1, Sayfa: 73-82, 2011.
2. Veyis SELEN, M. Şaban TANYILDIZI, Dursun ÖZER, *Sülfürik Asitle Dehidrate Edilmiş Soya (Glycine max) Küspesi ile Sulu Çözeltilerden Cr(VI) İyonlarının Uzaklaştırılması*, **Fırat Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi**, Cilt: 23, Sayı: 2, Sayfa: 77-86, 2011.
3. Veyis SELEN, Dursun ÖZER, *Reactive Blue 19 Boyarmaddesinin Sulu Çözeltilerden Uzaklaştırılması*, **Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi**, Cilt: 24, Sayı: 2, Sayfa: 63-75, 2012.
4. Ali YARAŞ, Veyis SELEN, Dursun ÖZER, *Bacillus Amyloliquefaciens Kullanılarak α -Amilaz Üretimine Substrat Partikül Boyutunun Etkisi*, **Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi**, Cilt: 9, Sayı: 1, Sayfa: 1-5, 2014.
5. Ali YARAŞ, Veyis SELEN, Dursun ÖZER, *Synergistic Effects of Agro-Industrial Wastes on Alpha Amylase Production by Bacillus Amyloliquefaciens NRRL B-645 in Semi Solid Substrate Fermentation*, **Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi**, DOI: 10.5505/pajes.2015.60783, Baskıda.

c) Uluslararası Konferans ve Sempozyumlar:

1. Veyis SELEN, M. Şaban TANYILDIZI, Dursun ÖZER, *Removal of reactive yellow 138/1 dye from aqueous solution using soybean cake*, **International Symposium on Engineering and Architectural Sciences of Balkan, Caucasus and Turkic Republics**, 2009, ISPARTA, TURKEY.
2. M. Şaban TANYILDIZI, Veyis SELEN, *Removal of reactive black b from aqueous solution by shell of peanut using a response surface methodological approach*, **International Symposium on Engineering and Architectural Sciences of Balkan, Caucasus and Turkic Republics**, 2009, ISPARTA, TURKEY.
3. Ali YARAŞ, Veyis SELEN, Dursun ÖZER, *Production of α -amylase in semi solid substrate fermentation by Bacillus amyloliquefaciens*, **European Biotechnology Congress**, 2011, İSTANBUL, TURKEY.
4. Veyis SELEN, M. Şaban TANYILDIZI, Dursun ÖZER, *Modeling of Reactive Yellow 145 Dye Adsorption by Wheat bran using Response Surface Methodology*, **2nd International Conference on Environmental Science and Technology (ICOEST)**, May 14-17, 2014, ANTALYA, TURKEY.
5. Veyis SELEN, Ömer GÜLER, Özlem SELEN, Seval H. GÜLER, *Removal of Methylene Blue, a Basic Dye from Aqueous Solutions by Multiwalled Carbon Nanotubes (MWCNTs)*, **2nd International Conference on Environmental Science and Technology (ICOEST)**, May 14-17, 2014, ANTALYA, TURKEY.
6. Veyis SELEN, Tuğba DİPİ, Gülbeyi DURSUN, *Photocatalytic Degradation of Astrazon Golden Yellow 7GL by UV/TiO₂ Process*, **1st International Conference on Organic Electronic Material Technologies (OEMT2015)**, March 25-28, 2015, ELAZIĞ, TURKEY.
7. Ömer GÜLER, Fatih SARIHAN, S. Hale GÜLER, Veyis SELEN, Ertan EVİN, *The Investigation for Photoactivity Properties of TiO₂ (anatase)-Carbon Nanotube Composites*, **1st International Conference on Organic Electronic Material Technologies (OEMT2015)**, March 25-28, 2015, ELAZIĞ, TURKEY.

8. **Veyis SELEN**, Şeyda TAŞAR, Meltem ÇAKMAK, Dursun ÖZER, Ahmet ÖZER, *Adsorption of Methylene Blue Dye on Multi-walled Carbon Nanotubes (MWCNTs) - A Response Surface Methodology (RSM) approach*, **International Conference on Civil and Environmental Engineering (ICOCEE – Cappadocia 2015)**, May 20-23, 2015, NEVŞEHİR, TURKEY.
9. Meltem ÇAKMAK, Şeyda TAŞAR, **Veyis SELEN**, Ahmet ÖZER, Dursun ÖZER, *Removal of Astrazon Golden Yellow 7GL from Colored Wastewater Using Activated Clay*, **International Conference on Civil and Environmental Engineering (ICOCEE – Cappadocia 2015)**, May 20-23, 2015, NEVŞEHİR, TURKEY.

d) Ulusal Konferans ve Sempozyumlar:

1. Şule BULUT, M.Şaban TANYILDIZI, **Veyis SELEN**, Murat ELİBOL, Dursun ÖZER, *Kabak Lifi (Luffa Cylindrica) ile Tutuklanmış Rhizopus Oryzae'den Lipaz Üretimi*, PSM-17, **6. Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi**, 2004, İZMİR.
2. **Veyis SELEN**, M. Şaban TANYILDIZI, *Fındık Küspesi Kullanılarak Bacillus Amyloliquefaciens'den a-Amilaz Üretimi*, BT-17, **7. Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi**, 2006, ESKİŞEHİR.
3. **Veyis SELEN**, M. Şaban TANYILDIZI, Şule BULUT, *Fındık Küspesi'nden a-Amilaz Üretiminin Yüzey-Tepki Yöntemi İle Optimizasyonu*, BT-18, **7. Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi**, 2006, ESKİŞEHİR.
4. **Veyis SELEN**, Ahmet ÖZER, Dursun ÖZER, *Sülfürik Asitle Muamele Edilen Susam Sapları ile Cr(VI) İyonlarının Adsorpsiyonu (Kinetik ve Adsorpsiyon İzotermi)*, ÇDT-33, **8. Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi**, 2008, MALATYA.
5. **Veyis SELEN**, M. Şaban TANYILDIZI, Dursun ÖZER, *Soya Küspesi ile C.I. Reactive Orange 4 Boyarmaddesinin Giderimi*, **9. Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi**, 2010, ANKARA.
6. **Veyis SELEN**, Ali YARAŞ, Cansu YILMAZ, M. Şaban TANYILDIZI, Dursun ÖZER, *Sülfürik Asitle Muamele Edilen Fıstık Kabukları ile Cr(VI) İyonlarının Adsorpsiyonu*, **9. Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi**, 2010, ANKARA.
7. Zümra BAKICI, **Veyis SELEN**, M. Şaban TANYILDIZI, *Soya Küspesi'nin C.I. Reactive Black 5 Boyarmaddesinin Gideriminde Kullanımı*, **9. Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi**, 2010, ANKARA.
8. Musa BÜYÜKADA, Filiz YILDIZ, Bahar ÖKSÜZ, **Veyis SELEN**, *Ultrases Destekli Sistemlerde Boyarmadde Giderimi*, **10. Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi**, 2012, İSTANBUL.
9. **Veyis SELEN**, Musa BÜYÜKADA, Dursun ÖZER, Gülbeyi DURSUN, *Reactive Red 195 Boyarmaddesinin Ultrases Destekli Gideriminde Kinetik ve Termodinamik Parametrelerin Araştırılması*, **10. Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi**, 2012, İSTANBUL.
10. **Veyis SELEN**, Musa BÜYÜKADA, *Reactive Yellow 145'in Sulu Çözeltilerden Uzaklaştırılması*, **10. Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi**, 2012, İSTANBUL.
11. **Veyis SELEN**, Özlem SELEN, Esra ZÖĞ, Dursun ÖZER, *Fındık Küspesi ile Sulu Çözeltilerden Boyarmadde Giderimi*, **10. Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi**, 2012, İSTANBUL.
12. **Veyis SELEN**, Ali YARAŞ, M. Şaban TANYILDIZI, *Doğal Substratlar ile a-Amilaz Üretiminin Cevap Yüzey Yöntemiyle Optimizasyonu*, **10. Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi**, 2012, İSTANBUL.
13. Kenan YÜKSEL, Helin DOĞAN, Mustafa ORAL, Tuğba DİPİ, Çağla AYDAŞ, **Veyis SELEN**, Gülbeyi DURSUN, *C.I. Basic Yellow 51 Boyarmaddesinin Fotokatalitik Degradasyonu*, **11. Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi**, 2014, ESKİŞEHİR.

14. **Veyis SELEN**, Özlem SELEN, Meltem ÇAKMAK, Dursun ÖZER, *Ayçiçeği Küspesi ile Sulu Çözeltilerden Boyarmadde Giderimi*, **11. Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi**, 2014, ESKİŞEHİR.
15. Özlem SELEN, **Veyis SELEN**, Dursun ÖZER, *C.I. Reactive Red 195 Boyarmaddesinin Sulu Çözeltilerden Ayçiçeği Küspesi Kullanılarak Giderimi*, **11. Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi**, 2014, ESKİŞEHİR.
16. **Veyis SELEN**, Özlem SELEN, Dursun ÖZER, *Katı Substrat Fermantasyonunda Bacillus amyloliquefaciens İle α -Amilaz Üretiminin Cevap Yüzey Yöntemi Kullanılarak Optimizasyonu*, **11. Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi**, 2014, ESKİŞEHİR.
17. **Veyis SELEN**, Şeyda TAŞAR, Meltem ÇAKMAK, Ahmet ÖZER, Dursun ÖZER, *Evsel Atık Nitelikli Çay Posasından Aktif Karbon Üretimi ve Karakterizasyonu*, **27. Ulusal Kimya Kongresi**, 2015, ÇANAKKALE.
18. **Veyis SELEN**, Meltem ÇAKMAK, Şeyda TAŞAR, Ahmet ÖZER, Dursun ÖZER, *Modifiye Edilmiş Soya Küspesi ile Basic Blue 3 Boyar Maddesinin Sulu Çözeltilerden Giderimi*, **27. Ulusal Kimya Kongresi**, 2015, ÇANAKKALE.