

## Bölüm 2

# ***ERWİNİA HERBİCOLA*'NİN ENDÜSTRİYEL BİYOTEKNOLOJİDEKİ ÖNEMİ**

**Aslı GİRAY<sup>1</sup>**

### **GİRİŞ**

Günümüzde “omics” teknolojileri kullanılarak çeşitli seviyelerde biyolojik veriler detaylı olarak ortaya konulabilmektedir. Genetik ve çevresel faktörler hücrelerin metabolik akış dağılımlarının nasıl ve ne yönde olacağını belirler (1, 2). Son yıllarda yaygın olarak kullanılmaya başlanılan “metabolomik” terimi, belli zaman ve ortamda organizmadaki veya hücredeki metabolik olayların bir bütün olarak nasıl etkilendiğini ifade etmek için ortaya atılmıştır. Bu bağlamda, birçok mikroorganizmanın komple genom dizi bilgisinin aydınlatılmış olması, metabolit akış şemalarının ayrıntılı olarak oluşturulmasında önemli katkı sağlamıştır. Ayrıca, analitik teknolojilerdeki son gelişmeler hücre içi ve hücre dışı metabolit seviyelerinin kapsamlı bir şekilde ölçülebilmesini mümkün kılmıştır. Özellikle hücre dışı metabolitlerin belirlenmesi, karakterizasyonu ve kantitasyonunu mümkün kılan yaratıcı yaklaşımlarla hücrenin kendisine zarar verilmeden birçok canlının metabolizması konusunda önemli bilgiler elde edilebilmektedir. Bütün bunlar, çeşitli mikrobiyal ve ökaryotik mikroorganizmaların genom ölçekli metabolik ağlarının oluşturulmasına imkân tanımaktadır. Bir hücre tarafından metabolitlerin salgılanması, o hücrenin internal metabolik durumunu yansıtır. Diğer bir deyimle, genetik ve çevre şartlarındaki farklılıklara bağlı olarak metabolik akış şemalarında önemli dalgalanmalar ortaya çıkar (2).

Mikrobiyal ikincil metabolitler düşük moleküler ağırlıklı ürünler olup, mikroorganizmanın büyüme ve çoğalması için esas olmasalar da insan sağlığında önemli rolleri bulunmaktadır. Antibiyotikler, antitümör ajanlar, kolesterol düşürücü ilaçlar bu çeşit ürünler arasında sayılabilirler. Bu metabolitler olağandışı yapılarla sahip olup genellikle üretici mikroorganizmanın geç büyüme fazında (idiofaz) sentezlenirler. Her ne kadar ikincil metabolizmanın doğası genetik temelli ise de

---

<sup>1</sup> Dr. Öğr. Üyesi, Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, asli.giray@alanya.edu.tr

bu metabolizmanın ürünlerinin sentezi çevresel değişkenlerden önemli derecede etkilenir. Diğer bir deyimle, ikincil metabolitlerin sentezinde kültür için kullanılan besin karakteri ve atmosferik şartlar önemli rol oynar. İkincil metabolizmanın genellikle bir besin kıtlığı ve bunu takiben oluşan hücre büyüme ve çoğalmasındaki düşüştan kaynaklandığı bilinmektedir (3). Bu olaylar, hücre içinde belli sinyallerin oluşturulup bir seri düzenleyici mekanizmaların harekete geçmesini ve böylece türe özgü ikincil metabolizma ile çeşitli metabolitlerin üretimini sağlar. Genel olarak hemen tüm organizmaların paylaştığı intermediyer metabolik yollar varsa da özellikle bakteriler başta olmak üzere türe özgü bazı önemli metabolik yollar da bulunmaktadır. Bu metabolik yollarla yapılan birçok metabolitin önemli kullanım alanları mevcuttur. Genel veya özel olsun tüm metabolik yolların belli oran belirleyici reaksiyon basamakları ve anahtar metabolitleri vardır. Bu reaksiyon oranlarının belirlenmesi ve anahtar metabolitlerin kantitasyonu hücrenin o andaki durumu konusunda bize önemli bilgiler sunar. Örneğin, hücrenin metabolizmasının enerjetik ya da biyokütle oluşturma yönünde mi olduğu bu çeşit anahtar metabolit ve reaksiyonların oranlarının ölçülmesi ile anlaşılabilir (4). Böylece, çeşitli sanayilerde kullanımı bulunan metabolitlerin üretiminin hangi şartlarda daha iyi seviyelerde olacağı belirlenebilir.

Son yıllarda adını sıkça duyduğumuz “metabolik mühendislik” terimi böyle çalışmalarında içinde barındıran bir çalışma alanını ifade etmek için kullanılmakta olup, metabolik mühendislik denildiğinde akla ilk gelen en önemli ajanlardan biri önemli bir metabolik modülatör olan *Vitreoscilla* hemoglobini. Bakteriyel orijinli hemoglobinler arasında *Vitreoscilla* hemoglobini (VHb) ilk keşfedilen ve karakterizasyonu en iyi yapılmış olan hemoglobindir (5) [13]. Bu proteinin esas fonksiyonunun düşük konsantrasyonlarda bulunan ekstraselüler (hücre dışı) oksijeni bağlayarak onu terminal solunum oksidazlarına vermek ve böylece hipoksik şartlarda hücre solunuma katkıda bulunduğu sanılmaktadır (5). Gerçekten de vgb geni oksijenle negatif regüle olan bir promotora sahip olup, oksijen seviyesinin düşük olduğu (yaklaşık %2 O<sub>2</sub> içeren) ortamlarda genin ekspresyon düzeyi 50 kata varan oranlarda artmaktadır (6). Bu şartlarda, vgb rekombinant bakterilerinin oksijen alım seviyelerinin 5-10 kat arttığı rapor edilmiştir. *Vitreoscilla* hemoglobininin (VHb) ifade edildiği çeşitli rekombinant mikroorganizmalarda kontrollü bir oksijen alım ve salınımı sağlayarak yapımları bu şekilde mikroaerofilik bir ortam gerektiren ürünlerin sentezinde avantaj sağladığı bilinmektedir (7).

### **Erwinia herbicola**

Enterobacteriaceae familyasının bir üyesi olan *Erwinia herbicola* patojen olmayan, bitkilerin hava ile temas eden yüzeylerinde bulunan bir bakteri olup bitki-bakteri

ilişkisinin araştırılmasında bazı çalışmalara konu olmuştur. Aynı zamanda bitki lezyonlarında sekonder işgalci olarak bulunmaktadır. İnsan ve hayvanlar için patojen olan şuşları *Erwinia agglomerans* türüne aittir. Buna rağmen, *E. herbicola* ve *E. agglomerans*'ın toplam DNA homolojisi ve elektrofotik protein profili önemli oranda benzerlik göstermektedir (8). *E. herbicola* şekerleri ve alkolleri fermente edebilir ve bazı sebzelerde bulunan ramnoz, sellobioz, arabinoz ve mannitol gibi şekerleri kolaylıkla kullanabilir. Çoğu 37°C'de gelişme gösterirken bazı şuşlarının buzdolabında geliştiği belirlenmiştir. Boyutları 0.5 x 1.3 µm arasında değişmektedir. Bitkilerde protopektin halinde bulunan pektini, sahip oldukları protopektinaz enzimi ile parçalayarak yumuşak çürüklük hastalığına neden olurlar.

Ana metabolizması diğer birçok bakteriye benzese de Gram-negatif fakültatif anaerobik bir bakteri olan *E. herbicola* kendine özgü metabolik yolları ile L-DOPA, çeşitli antibiyotikler, karotenoidler ve indol-3-asetik asit (IAA) gibi çeşitli endüstrilerde kullanımı bulunan ürünleri sekonder metabolizmasının bir parçası olarak sentezleyen nadir bakterilerden biridir. Örneğin, diketoglukonik asit yolu esas olarak bu organizma tarafından kullanılmaktadır. Diketoglukonik asit diğer bir takım endüstriyel ürünlere (ör. glukonat ve C vitamini) kolayca çevrilebilen önemli bir prekürsördür (9).

*E. herbicola*'nın tipik olarak sarı karotenoid pigmentlerini içeren epifitik bir bakteri olmasının yansira üretmiş olduğu bazı antibiyotikler (herbikolinler, pantosinler, fenazinler, karbapenemler) sayesinde bitkiyi patojenlere karşı koruduğu da rapor edilmiştir. Bu bakteri aynı zamanda değişik kültür şartları altında birden çok antibiyotiği üretme potansiyelinde olan nadir bakterilerden biridir (10). Bakterinin diğer bir özelliği genellikle bitkiler tarafından yapılan bir bitki hormonu olan indolasetik asiti (IAA, bir çeşit oksin) üretme özelliğidir. Her ne kadar bakterinin bu hormonu bitki ile kurmuş olduğu bir ilişki ve bitkinin mikrobiyal savunma stratejisini bypass etmek için kullandığı ileri sürülmüşse de, IAA'nin bir sinyal molekülü olarak davrandığı ve bakteri fizyolojisi üzerinde doğrudan etkili olduğu sanılmaktadır (11).

*E. herbicola* tarafından üretilen bazı önemli sekonder metabolik ürünler, Oksin: İndol-3-asetik asit (IAA), karotenoidler (β-karoten, likopen, astaksantin), vitaminler (A, E, C vitamini), Antibiyotikler (Karbapenem, Herbikolin, Fenazin, Pantosin), Nörotransmitter maddeler (L-DOPA ve Dopamin) gibi metabolitlerdir.

### **İndol-3-asetik asit (IAA)**

Günümüzde sadece yüksek organizasyonlu bitkilerin değil fungusların, likenlerin, alglerin ve bakterilerin de indol-3-asetik asit (IAA) oluşturdukları saptan-

mıştır (12). Toprak mikroflorası içinde yer alan pek çok mikroorganizmanın IAA oluşturma yeteneğine sahip oldukları çok uzun zamandan beri bilinmektedir. Çeşitli bakteri türleri önemli bir fitohormon olan IAA üretme yeteneğine sahiptir. IAA biyosentezi, bitki ile ilişkili bakteriler arasında yaygın bulunan bir durum olup, bu hormonun üretimi için farklı biyosentetik yollar tanımlanmıştır. IAA üreten bakteri ve bitkiler arasındaki etkileşimler bitki lehinde olan bir durumdur ve patojenezden fitostimülasyona kadar çeşitli sonuçlara yol açmaktadır.

Farklı mikroorganizma ve bitki etkileşimlerinde IAA'nın önemli rolü bulunmaktadır. Bakteriler bu fitohormonu hem bazal bitki savunma mekanizması ve fitostimulasyonda hem de kendilerinin kolonizasyon stratejilerinin bir parçası olarak kullanılmaktadırlar. Ayrıca biyokimyasal bakteriyel IAA sentez yolları ve onların regülasyonu üzerinde yapılan moleküler çalışmalar IAA'nın aynı zamanda bir sinyal molekülü olabildiğini ve böylece bakteri fizyolojisi üzerinde doğrudan bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Özellikle son gelişmeler, IAA üreten mikroorganizmalarda IAA'nın bir sinyal molekülü olduğunu açıkça ortaya koymaktadır. IAA biyosentezi bitki üzerinde kolonizasyonda ve bakteriyel dirençte önemli rol oynamaktadır. Ayrıca bitki ve bakteri IAA biyosentezi büyük oranda benzerlik göstermektedir (12). Bakteri-bitki ilişkisinde bakteriyel IAA biyosentezi, konakçı üzerinde uyum ve kolonizasyona katkı sağlamaktadır. Diğer taraftan IAM yolağının inaktivasyonunun kolonizasyon yeteneğini etkilemediği belirlenmiştir. Bakteriler IAA'yı bitki dokularında proliferasyonu uyarmak için kendilerinin kolonizasyon stratejilerinin bir parçası olarak kullanırlar. Bitki savunması ve oksin sinyalleri arasındaki bağlantı, kolonizasyonda bakteriyel IAA'nın rolüne ekstra bir boyut kazandırmaktadır (13).

*E. herbicola*'da IAA biyosentezinde, ortamdaki bakteri yoğunluğu ve quorum-sensing (QS) sinyal molekülleri arasında önemli bir korelasyon bulunduğu bildirilmiştir (14). Gal oluşumunun hrp/hrc genleri, fitohormonlar ve QS sistemi tarafından kontrol edildiği bilinmektedir. İndol-3-asetik asit (IAA) (*iaaH*) ve sitokininin biyosentetik yolları, hem QS sistemi (*pagI*, *pagR*) hem de Hrp regülatör genlerinin (*hrpS*, *hrpXY*, *hrpL*) ekspresyonu ile pozitif yönde regüle olmaktadır. IAA yolağı (*ipdC*), Hrp regülasyonu ve QS sisteminin transkripsiyonunu negatif yönde regüle etmektedir. QS sistemi Hrp regülatör genlerinin ekspresyonunu indüklemektedir. Yüksek C4-HSL konsantrasyonları, Hrp reglonunu negatif etkilemektedir. Hücre oluşumu ve epifitik uyum bu üç sistem tarafında etkilenmektedir (15). Bakteriyel IAA sentezinde triptofan temel bir öncül olarak tanımlanmaktadır. IAA üretimi için öncül olarak triptofanın kullanıldığı beş farklı biyosentez yolağı bulunmaktadır: İndol-3-asetamid (IAM) yolağı, indol-3-pirüvat

(IPyA) yolağı, triptamin (TAM) yolağı, triptofan yan zincir oksidaz yolağı (TSO), indol-3-asetonitril (IAN) yolağı. *E. herbicola* IAA üretiminde indol-3-asetamid (IAM) ve indol-3-pirüvat (IPyA) yolağını kullanmaktadır.

### **İndol-3-asetamid (IAM) yolağı**

İndol-3-asetamid (IAM) yolağı, bakterilerde en iyi karakterize edilmiş olan yoldur. İki basamaklı bu yolda triptofan öncelikle *iaaM* geni tarafından kodlanan triptofan-2-monooksijenaz (*IaaM*) enzimi tarafından IAM'ye dönüştürülür. Triptofan-2-monooksijenaz enziminin katalizlediği bu reaksiyonda 1 mol triptofan ve 1 mol O<sub>2</sub> tüketilirken 1 mol indol-3-asetamid ve 1 mol CO<sub>2</sub> üretilmektedir. Enzimin çalıştığı optimum pH aralığı 7,2 ve 9,2 arasında değişmektedir (16). İkinci basamakta *iaaH* geni tarafından kodlanan IAM hidrolaz (*IaaH*) enzimi tarafından IAA'ya dönüştürülür. IAM yolu, önceleri sadece bakterilere özgü bir yol olarak tanımlanmıştır fakat daha sonraları IAM analizinde yüksek duyarlılıktaki HPLC ve GC-MS/MS tekniklerinin kullanılmasıyla beraber IAM'nin *Arabidopsis thaliana*'da endojen bir bileşik olduğu tespit edilmiştir (17).

### **İndol-3-pirüvat (IPyA) yolağı**

Bitkilerde IAA üretiminde indol-3-pirüvat (IPyA) yolağının oldukça önemli olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte bitkilerde bu yol ile ilgili anahtar gen veya enzimlerin henüz tanımlanmadığı rapor edilmiştir. Bu yoldaki ilk basamakta triptofan, bir aminotransferaz tarafından IPyA'ya dönüşmektedir. Oran sınırlayıcı basamakta, IPyA indol-3-pirüvat dekarboksilaz (IPDC) enzimi tarafından indol-3-asetaldehite (IAAId) dekarboksile olmaktadır. Son basamakta ise IAAId, IAA'ya okside edilmektedir (12). *Erwinia herbicola*'da belirlenen indol-3-asetik asit (IAA) biyosentetik yolağında, *iaaM*, *iaaH* ve *ipdC* sırasıyla triptofan-2-monooksijenaz, indol-3-asetamid hidrolaz ve indol-3-pirüvat dekarboksilaz enzimlerini kodlayan genlerdir (13).

Mikrobiyal bir metabolit ve sinyal molekülü olan IAA'nın fitopatogenik bakteriler tarafından gerçekleştirilen biyosentezinin, bu bakterilerin bitki yüzeylerinde canlı kalmalarına yardımcı olduğu belirtilmektedir. Ayrıca bakterilerde IAA üretimindeki biyosentetik yolların aynı zamanda triptofan analoglarının detoksifikasyonunda da gerekli olabildiği de rapor edilmiştir (18).

## **BETA-KAROTEN VE LİKOPEN**

Karotenoidler sarı veya kırmızı renkli lipofilik pigmentlerdir. Fototrofik organizmalarda gerekli olan karotenoidlerin fotooksidatif hasara karşı savunmada önem-

li rolleri bulunmaktadır. Karotenoidler izopreonid sınıfı metabolitlerin büyük bir grubu olup, de novo olarak bitki ve alglerde sentezlendiği gibi aynı zamanda bakteri ve fungus tarafından da sentezlenmektedirler (19). Bitkilerle olan epifitik uyumunun bir sonucu olarak *E. herbicola*'nın değişik karotenoidler sentezleyerek sarı-turuncu yelpazede bir pigmentasyon gösterdiği kaydedilmiştir. Pigmentasyon kaybının ve bunun sonucunda tiamin oksotrofinin ortaya çıkmasının nedeni olarak, bu bakterinin taşıdığı büyük (megadalton boyutlarda) plazmidlerin kaybı olduğu ileri sürülmüşse de bunun genetik mekanizması henüz tam aydınlatılmamıştır (20). Her ne kadar bu canlıların daha çok fotosentetik olanları tarafından ışığı soğurma, enerji transferi ve serbest radikal süpürücü bağlantılı olarak yapılsa da aynı özellikteki karotenoidler belli sayıda fotosentetik olmayan bakteri tarafından da sentezlenebilmektedir (21).

Likopenin kan-beyin bariyerini geçtiği ve düşük yoğunluklarda da olsa merkezi sinir sisteminde bulunabildiği keşfedilmiş, yine serum likopen düzeyleri ile Alzheimer, Parkinson ve vasküler dementia gibi nörodejeneratif hastalıklar arasında da sıkı bir bağlantı olduğu yakın zamanlarda rapor edilmiştir (22).

Doğada birçok bakteri, alg, ipliksi fungus ve mayanın yapısında beta karoten bulunmaktadır. Biyoteknolojik olarak en çok çalışma *Phycomyces blakeleeanus* (Mucoraceae) ve *Blakesleea trispora* (Choanopheraceae) fungusları üzerinde yapılmıştır. Bunun yanında *Mucor mucedo*, *Ustilago violaceae*, *Neurospora crassa*, *Fusarium aquaeductum*, *Choanophora cucurbitarum* fungusları, *Rhodotorula* mayaları, *Dunalinella salina* ve *Dunalinella bardawill* hipersalin mikroalglerinin de beta karoten sentezlediği belirtilmiştir (23).

$\beta$ -karoten'in, en önemli işlevi organizmaları fotooksidatif hasara karşı korumasıdır.  $\beta$ -karoten aynı zamanda memelilerde A vitaminin öncülü olarak işlev görür (24).  $\beta$ -karoten, likopen, karotenoidler enzimatik olmayıp, membran antioksidanları grubuna dahildirler. Likopen ve  $\beta$ -karoten gibi oksijenije edilmemiş karotenoidlerin genellikle membran ara yüzündeki C vitamini tarafından translokasyondan sonra ara yüze rejenere edilebildiği de bir hipotez olarak ileri sürülmektedir. Likopenin antioksidan özelliğinin  $\beta$ -karotenden iki kat daha fazla olduğu belirtilmektedir ve antikarsinojenik özellikleri ile bilinmektedir (22).

## KAROTENOİDLERİN BİYOSENTEZİ

Bütün karotenoidler izoprenoid (ya da terpenoid) yolundan türevlenmektedirler. Farklı türlerde gerçekleşen iki biyosentez yolağı bulunmaktadır. Karotenoid biyosentezi iki şekilde gerçekleşmektedir: Mevalonata bağlı yolak ve mevalonatsız yolak. Bu metabolik yolların her ikisi de farklı türlerde, ilk izoprenoid birimi olan

izopentil prifosfatın (IPP) oluşumunu sağlamaktadırlar. Mevalonatsız gerçekleşen biyosentez yolu son zamanlarda keşfedilmiştir. Bu yolun keşfine kadar karotenoid biyosentezinin sadece mevalonat yolu üzerinden IPP'den sentezlendiği düşünülmekteydi. Arkea, fungus, hayvan ve bitkilerde (plastidler hariç) IPP, başlangıç öncülü olarak asetil CoA ile birleşerek mevalonik asitten sentezlenmektedir. Eubakteria ve bitki plastidlerinde ise, IPP sentezi pürüvat ve gliseraldehit-3-fosfat arasındaki bir başlangıç kondensasyon reaksiyonu ile başlamaktadır. Bu yoldaki reaksiyonlar birkaç basamakta gerçekleşmekte olup bu reaksiyon basamaklarından bazıları ise henüz tanımlanmamıştır. Eubakterilerdeki non-mevalonat yolunun keşfi karotenogenik olmayan mikroorganizmalarda karotenoid verimliliğini arttırmak için izoprenoid akış mühendisliğini anlamayı sağlamıştır (25).

Oran sınırlayıcı izoprenoid ekspresyonunun dengelenmesi ve karotenoid biyosentetik enzimleri, enzimlerin aşırı ekspresyonunun sebep olduğu büyüme inhibisyonunu rahatlatarak karotenoid yolu ile mtabolik akışın artışında etkili olmuştur. Enzimlerin ekspresyon seviyelerinin modülasyonu, karotenoid yolu sayesinde metabolik akışın kontrol edilerek farklı oranlarda karotenoid ara ürünlerinin elde edilmesinde bir strateji olarak kullanılabilir. Fotosentetik bakteriler karotenoidleri iç membranlarında zaten yeterince sentezlemektedirler. Metabolik mühendisliğin amacı, karotenoidlerin heterolog üretimi için alternatif bir rota sağlamaktır. Non-karotenogenik mikroorganizmalarda rekombinant karotenoid üretimi, çeşitli karotenoid yapılarının üretimi için yeni yolların tasarlanmasına izin vermektedir. Farklı kaynaklardan karotenoid genlerinin kombinasyonu ve doğrudan evrim ile karotenoid enzim aktivitelerinin değişimi sayesinde yeni karotenoid yolları oluşmaktadır (25).

## **C VİTAMİNİ**

Vitaminlerin yararlı etkileri bulunmaktadır. Vitaminler, gıda ve yem uygulamaları başta olmak üzere yıllık 105 tondan daha fazla üretilmektedir. Fungus, bakteri veya mikroalg çalışma prosesleri ekonomik ve ekolojik açıdan uygulanabilir.

C vitamini olarak bilinen L-askorbik asit (L-AA) suda eriyen ve çeşitli fizyolojik işlevi olan vazgeçilmez bir vitamindir. İlk kez böbreküstü bezinde izole edilmiştir ve bitki dokularında karakteristiktir. L-AA insan, primatlar ve birkaç diğer memelide bu vitamin sentezi yapılamadığı için bu canlılar için C vitamini önemli bir besindir ve bunu dışarıdan almaktadırlar. Bu organizmalarda, L-gulonol-1,4-lakton oksidaz geninin biyosentezini katalizleyen son adım fonksiyonel değildir (26).

Metabolik fonksiyonu ve antioksidan öneminden dolayı L-AA insan diyetinde önemlidir. Buna ek olarak, L-AA'nın singlet oksijen ve süperoksit anyon gibi birçok reaktif oksijeni süpürücü etkisi bulunmaktadır. Bu nedenle, oldukça önemli bir işlevi olan zararlı oksidatif ürünlerden dokuları koruması kardiyovasküler hastalıklar da dahil olmak üzere birçok kronik hastalıkların ve kanserin oluşumunu engellemektedir.

L-Askorbik asit, yaklaşık 70 yıldan beri endüstriyel olarak üretilmektedir. Son iki yılda, çok sayıda yenilikçi biyolojik dönüşüm sistemini uzun süreli piyasa hakimiyetini kolaylaştırmak için Reichstein yöntemi önerilmiştir. L-askorbik asitin hala önemli bir bölümü kimyasal sentezle üretilmektedir. Yapılan çalışmalarla bakteri, maya ve mikroalg kullanılarak biyoteknolojik alternatifler açıklanmıştır. Ayrıca L-askorbik asitin doğrudan üretimi için yeni bakteriyel yollar da araştırılmaktadır.

Yılda yaklaşık tahmini 110,000 ton dünya üretimi ile C vitamini artan bir rekabete neden olmuştur. Sentetik üretilen L-AA ilaç sanayi (%50), gıda sanayi (%25), içecek sanayi (%15), ve yiyecek sanayi (%10) gibi farklı uygulamalar için kullanılmaktadır. Son 20 yıl içinde, L-AA'nın mevcut üretimini kolaylaştırmak için farklı bakteri suşları kullanılarak üretim yöntemleri araştırılmaktadır. 2-KLGA mikrobiyal üretimi *Gluconobacter*, *Acetobacter*, *Ketogulonicigenium*, *Pseudomonas*, *Erwinia* ve *Corynebacterium* cinslerine ait suşlar aracılığıyla D-glukoz, D-sorbitol veya L-sorbozdan elde edilebilir. Ayrıca karışık kültür rekombinant DNA teknolojisiyle geliştirilen suşlarla da üretilmektedir (26).

Kimyasal sentez ve biyotransformasyon birleşimi, antioksidan olarak kullanılan ve kantitatif olarak vitaminlerin en önemlisi olan C vitamini üretimi için uygulanmaktadır. En fazla beş proses adımına ihtiyaç vardır. Bunlardan biri *Gluconobacter sp* ile ve diğeri *Ketogulonicigenium sp.* prosedürüyle kolaylaştırarak katalizlenir. *Blakeslea trispora* veya *Dunaliella salina* kaynaklı endüstriyel  $\beta$ -karotenin sadece küçük bir oranı A vitaminin öncüsüdür. Her iki süreçte genetik mühendisliği olmadan klasik suşlar kullanılmıştır. Pigment olarak astaksantine ihtiyaç duyulur bu kimyasal sentezlenir ama bazı tüketiciler özellikle *Haematooccus pluvialis* veya *Xanthophyllomyces dendrorhous* elde edilen doğal ürünleri tercih ederler.

Çoklu doymamış yağ asitleri, örneğin, araşidonik asit, *Mortierella alpina* tarafından üretilmektedir. Ayrıca, bazı mikroalgler dokosaheksaenoik asiti biriktirirler. R-pantotenik asit için biyoproses endüstriyel gerçekleşmeye yakındır (27). C vitamininin biyosentetik üretimi için genetiği değiştirilmiş olan fermantasyon



mikroorganizmalar ve bitkiler kullanılmaktadır. Özellikle, askorbik asitin biyosentezik yolağına katılan enzimin aktivasyonunun arttırılması için genetik modifikasyonun kullanımı ile ilgilidir. Aynı zamanda, L-askorbik asit yolağı ve askorbik asitin biyosentezik üretimini arttırmak amacıyla GDP-D-rnannoz: GDP-L-galaktoz epirnerazı içeren epimerazların dizilerini kodlayan nükleotidin kullanımını içerir. Aynı zamanda bu biyoproses, L-askorbik asit üretimi için mikroalg suşları, bakteri, yararlı maya gibi genetiğı değıştirilmiş mikroorganizmaların kullanımıyla da ilgilidir. Neredeyse tüm yaşam formlarında, bitki ve hayvanlar, hem askorbik asit (C vitamini) sentezi hem de besin için gereklidir. Askorbik asitin insanların ve hayvanların beslenmesinde önemli yer tuttuğı ilk kez belirlenmiştir. Askorbik asit (C vitamini) demir absorpsiyonu, soğığa direnci, yaraları iyileşmesi, polisakarit ve kolojen sentezi, kıkırdak, kemik, dentin oluşumu, kapillerin onarımı ve antioksidan olarak kullanımıyla insan fonksiyonlarında son derece etkili bir yere sahiptir.

Askorbik asit *Acetobacter suboxidans* tarafından kalsiyum D-glukonatın oksidatif fermentasyonu ya da L-sorbozun kimyasal olarak oksidasyonu ile sentezinde doğal kaynak olarak izole edilebilir. Askorbik asitin fotosentez sırasında nötreleze enerjiti elektornların fonksiyonu ve fotosentezik mikroorganizmaların kroloplastlarında üretildiğı belirtilmiştir. Buna göre, fotosentezik organizmalarda askorbik asit üretiminin koruma mekanizması olarak işlev gördüğü bildirilmektedir (28).

## **ERWİNİA HERBİCOLA'DA ANTİBİYOTİK ÜRETİMİ**

*Erwinia* türlerinin zirai önemlerine ek olarak, iki *Erwinia* türünün bazı antibiyotikleri üretebildikleri tespit edilmiştir. Bunlardan *Erwinia herbicola* A 111 suşunun, lipopeptit antibiyotiklerden olan herbikolin A ve B'yi üretebildiğı bulunmuştur (29). *Erwinia carotovora*'nın bazı suşlarının ise bir  $\beta$ -laktam antibiyotiğı olan 1-karbapen-2-em-3-karboksilik asiti (karbapenem) üretebildiğı gösterilmiştir. Bu antibiyotiğın üretimiyle beraber antibiyotiğe karşı duyarlı olan bakterilerin sayısının azaltılarak rizosferdeki yaşama şansının arttığı düşünülmektedir (30).

Epifitik bir bakteri olan *E. herbicola* kendine özgü metabolik yolları ile çeşitli antibiyotikleri sekonder metabolizmasının bir parçası olarak sentezleyen nadir bakterilerden biridir. *E. herbicola*, üretmiş olduğı bazı antibiyotikler (herbikolinler, pantosinler, fenazinler, karbapenemler) sayesinde bitkiyi patojenlere karşı koruduğı rapor edilmiştir (9,10). *E. herbicola*'nın tek suşu birçok antibiyotiğı üretmektedir ve farklı suşları farklı yapıdaki birden fazla kompleks antibiyotiğı

üretme potansiyeline sahiptir. *E. herbicola* tarafından üretilen antibiyotiklerin biyolojiksel aktiviteleri ve kimyasal yapıları farklıdır. Bu antibiyotiklerinin moleküler doğasının oluşması kompleks bir biyosentetik model tarafından zorlaştırılmaktadır. Antibiyotiklerin çoğu ortak bir özelliği paylaşıyor gibi gözükse dahi ortama amino asit ilave edilmesi antibiyotik aktivitesini bastırılabilirdiği rapor edilmiştir. *E. herbicola* antibiyotiklerinin kompleksliği tam olarak bilinmemektedir çünkü antibiyotik aktivitesini bastıran amino asitler sadece karakterizasyonunda model teşkil etmektedirler (31). Bu çalışmada, *E. herbicola*'nın üretmiş olduğu antibiyotiklerden sadece karbapenem ve fenazın çalışılmıştır.

## FENAZİNLER

Fenazınlar, bakteriler tarafından üretilen büyük bir azot grubu içeren, fonksiyonel grupların tipi ve pozisyonu üzerinde kimyasal ve fiziksel özellikleri farklılık gösteren heterosiklik bileşiklerdir. Doğada 100'den fazla farklı fenazın yapısal türevidir tanımlanmıştır ve yapılarında merkezi bir parça olarak fenazın içeren 6.000'den fazla bileşik sentezlenmiştir. Bakteriler, bilinen tek doğal fenazın kaynaklarıdır. Birçok bakteri çok sayıda fenazın türevidir üretmektedir. Hem doğal ve hem de sentetik fenazın türevlerinin bakteri üzerindeki etkileşimleri ve biyoteknolojik prosesleri çalışılmıştır. Çeşitli bakteriler arasındaki fenazının biyosentetik genlerinin biyoinformatik olarak karşılaştırılması, fenazın biyosentezinde beş genin (phzB, phzD, phzE, phzF ve phzG) yüksek derecede korunduğunu göstermiştir. Bu genler, üç halkalı fenazın yapısının sentezinden sorumlu olan çekirdek genlerdir. Son çalışmalar bu biyosentetik çekirdek genlerin, çeşitli bakteri jenerasyonları arasında horizontal transmisyon aracılığı ile taşındığını göstermiştir. Fenazınlar alternatif terminal alıcılara elektron mekiği olarak işlev gören, hücrel redoks drumlarını modifiye eden, hücre sinyalleri olarak hareket eden, gen ekspresyonu düzenleyen, biyofilm oluşumuna katkıda bulunan ve bakterinin hayatta kalabilmesini sağlayan önemli antibiyotiklerdir. Fenazınlar, ökaryotik konak ve konakçı dokuları üzerinde konakçının hücrel yanıtları değiştirilmesi de dahil olmak üzere çeşitli etkilere sahiptirler. Fenazınlar bitkilerde büyümeyi etkileyebilir ve sistemik direncin indüklenmesini sağlarlar. Bu sekonder metabolitler çeşitli bakteriler tarafından özellikle *Pseudomonas* tarafından üretilmektedir ve virülans rolleri ile geniş spektrumlu antibiyotik özelliklerinden dolayı bu metabolitler yoğun bir şekilde çalışılmaktadırlar. Biyoteknolojik bir perspektiften bakıldığında, fenazınlar, oksidasyon-redüksiyon (redoks) özellikleri, parlak pigmentasyon, pH ve redoks renk değişikliğini de içeren fizikokimyasal özelliklerinden dolayı büyük ilgi görmektedirler. Fenazınlar çok çeşitli uygulamalarda elektron alıcısı ve vericisi olarak, yakıt

hücrelerinin bileşenleri olarak, çevre sensörleri ve biyosensörler olarak, antitümör bileşiklerin merkezi bileşenleri olarak kullanılmaya devam edilmektedirler (32).

## **FENAZİNİN YAPISAL TÜREVLERİ**

Bakteriyel sekonder metabolitler bakteri-konakçı ilişkilerinde birçok yönden önemli rol oynamaktadırlar. Virülans faktörler olarak işlev gören sekonder metabolitler, hastalık durumunda konakçı dokularının değiştirilmesinde merkezi bir rol oynar. Diğer sekonder metabolitler patojen bakterilerin sebep olduğu infeksiyonları önlemek için işlev gören faydalı bakteriler tarafından üretilirler. Böyle sekonder metabolitler, faydalı bakterinin patojen bakteri ile rekabet yeteneğini artırarak ve patojenleri aktivitesini inhibe ederek ya da konakçının savunma sistemini tetikleyerek patojenlerin sebep olduğu infeksiyonları önlemektedirler. Bu nedenle sekonder metabolitlerin düzenlenmesi, hastalıkların iyileştirilmesinde veya bastırılmasında önemlidir. Bakteriyel sekonder metabolitlerin regülasyonu, onların yararlı ya da zararlı olup olmadığı hususunda önemli ölçüde benzerlik gösterir. Örneğin RsmA/RsmB sistemi aracılığı ile translasyonun regülasyonunda olduğu gibi, LuxI/R homologları sayesinde quorum sensing ile gen ekspresyonunun aktivasyonunun hem patojen hem de faydalı bakterilerdeki işlevi yüksek oranda korunmuştur. Bu global regülatörler sekonder metabolitlerin uygun ekspresyonunu kontrol etmek için yolaktaki spesifik aktivatör ve represörlerle birlikte işlev görürler. Multiple regülatörler fenazinin üretimini kontrol etmektedir (33). PhzI ve PhzR quorum sensing sistemi, hücre yoğunluğuna bağlı bir durumda fenazinin üretimini regüle etmektedir. Quorum sensing genleri olan phzI ve phzR, fenazinin biyosentetik operonunun aktivasyonunda doğrudan sorumludurlar. PhzR geni fenazinin operonunun transkripsiyonel bir regülatörünü kodlarken, phzI ise N-hekzanoil homoserin lakton (HHL) sinyalinin sentezini yönlendiren AHL (N-açilhomoserin lakton) sentaz enzimini kodlamaktadır. Hücre yoğunluğuna bağlı olarak phzI tarafından üretilen N-hekzanoil Homoserin Lakton (HHL)'un birikimi fenazinin üretiminde önemli rol oynamaktadır [83]. HHL'nin bağlanmasıyla beraber PhzR aktive olmaya başlar ve böylece fenazinin genlerinin transkripsiyonu indüklenir. Fenazinin üretimini kontrolünde aynı zamanda iki bileşenli GacS ve GacA sinyal transdüksiyon sistemi de gereklidir. Bu kontrolü, kısmen phzI transkripsiyon regülasyonu üzerinden kısmen de diğer regülatör elementler aracılığı ile gerçekleştirmektedir (34).

Fenazinin birçok organizmada yüksek oranda korunmuş olan şikimik asit yolağından türevlenmektedirler. Krosmik asit, fenazinin biyosentezindeki ilk dal-

lanma noktasında fenazin genlerinin (phzABCDEFG) ifade edilmesinde işlev görmektedir. phzB, phzD, phzE, phzF ve phzG genleri fenazin biyosentezindeki çekirdek (core) genlerdir. PhzC, yani fenazin operonundaki üçüncü enzim, bir tip II-3-deoksi-D-arabinoheptulosonat-7-fosfattır (II-3-DAHP). Bu bileşik muhtemelen fenazin biyosentezinde şikimik asit yolağına doğru yeterli substrat sağlamaktadır (32).

## **KARBAPENEMLER**

$\beta$ -laktamlar ilk keşfedilen antibiyotik grubudur. İlk olarak ipliksi mantarlarda keşfedilmelerine rağmen daha sonra birçok Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilerde de buldukları tespit edilmiştir (35).  $\beta$ -laktam antibiyotikleri bakteri hücre duvarında bulunan peptidoglikan tabakasının biyosentezini engelleyici bir etkiye sahiptirler. Bakteriyel sitoplazmik membran üzerinde bulunan ve peptidoglikan biyosentezinde enzimatik rolleri olan Penisilin Bağlayan Proteinler (PBP), penisilinler ve diğer benzer antibiyotikler için direk hedef konumundadırlar.  $\beta$ -laktam grubu antibiyotikler günümüzde tıbbi tedavide kullanılan birçok antibiyotiği ihtiva ederler. Yüksek oranda etkili ve düşük toksisiteye sahiptirler.  $\beta$ -laktam antibiyotikleri penisilin, sefalosporin, sefamisin, klavam, monobaktam ve karbapenemlerdir. Penisilinler ve sefalosporinlerin, birçok hastane kaynaklı enfeksiyonun tedavisindeki başarıları ispatlanmıştır (36,37). Ancak bakteriyel patojenler arasında  $\beta$ -laktam direncinin artması, geniş spektrumlu yeni antibiyotiklere ihtiyaç olduğu gerçeğini ortaya çıkarmıştır. Karbapenemler, 1970'li yılların sonunda  $\beta$ -laktamazları inhibe eden yeni antibiyotikler bulmak amacıyla yürütülen böyle bir program çerçevesinde keşfedilmişlerdir (38). Karbapenemler, penisilin ve sefalosporinlerin etki edemediği anaerobik bakterilere karşı son derece yüksek aktivite gösterdiklerinden dolayı oldukça önemli bir gruptur. Geniş spektrumlu aktivitelere ilave olarak aerobik ve fakültatif Gram-pozitif basillerle karşı kullanıldıklarında post-antibiyotik bir etki gösterirler ve  $\beta$ -laktamazların varlığında kararlılıklarını koruyabilirler. Ancak Bacillus türleri, Xanthomonas maltophilia, bazı Pseudomonas cepacia izolatlarında ve nadiren bakteriosidlerde bulunan çinko aktiviteli  $\beta$ -laktamaz tarafından hidrolize edilirler [94]. Karbapenemler, kükürt atomunun yerini bir karbon atomunun alması ve ikinci ve üçüncü karbonlar arasında bir çift bağ bulunması ile penisilinlerden ayrılırlar (39). Bu grup, tienamisinler, olivanik asitler ve karpetimisinler gibi doğal ürünleri ihtiva ederler. Tienamisin ilk keşfedilen karbapenem antibiyotiği olup, Streptomces cattleya tarafından üretilmektedir. Bu antibiyotik Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere karşı çok geniş bir antibakteriyel spektruma sahiptir ve  $\beta$ -laktamazların

çoğuna direnç gösterir. *Streptomyces cattleya* tarafından üretilen tienamisin üzerinde yapılan radyoaktif izotop çalışmaları, tienamisin biyosentezinin penisilin ve sefalosporin biyosentezinde rol oynayan öncülerle ilişkili olmadığını göstermiştir (39). Sefalosporin ve penisilin üretiminde kullanılan öncülerle tienamisin sentezi için gerekli öncülerin farklı olması karbapenemin yeni bir biyosentetik yolla sentezlendiğinin düşünülmesine yol açmaktadır. Karbapenemler  $\beta$ -laktamazlara dirençli olmalarına karşın bazı dezavantajları da vardır. Katı ve sıvı halde kararsız halde olup böbrekte bulunan dehidropeptidaz-I enzimi tarafından kolayca parçalanabilirler. Bu dezavantajlar yeni ve daha gelişmiş karbapenem arayışına neden olmuştur. Keşiflerinden yaklaşık on yıl kadar sonra ilk ticari karbapenem olan imipenem (bir tienamisin türevi) ticari olarak satışa sunulmuştur. Ancak bu da bir böbrek enzimi olan dehidropeptidaz tarafından kararsız hale dönüştürülebilmekteydi. Bu problem dehidropeptidaz-I' in etkili bir inhibitörü olan kilastatin ile çözülmüştür (40). Karbapenem antibiyotiklerinin yeni bir üyesi olan meropenemin, imipeneme göre kararlı ve dehidropeptidaz-I'e daha dirençli olduğu bulunmuştur. Meropenem tıbbi öneme sahip olan Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere karşı geniş spektrumlu bir aktiviteye sahiptir (41). Karbapenemler esasen *Streptomyces* türlerinden izole edilmişlerdir. Ancak, bu organizmada karbapenem biyosentezi üzerine yapılan araştırmalar; *Streptomyces* lerin yavaş üremesi, az ürün vermesi ve genetik çalışmalara yatkın olmaması, düşük üretim titresine sahip olması nedeniyle son derece sınırlı kalmıştır (39).

Bazı *Erwinia* türlerinden izole edilen karbapenem antibiyotiği doğal olarak sentezlenen antibiyotiklerdendir (30, 42). Bu antibiyotik oldukça kararsız olup aktivitesi, donma veya yüksek konsantrasyon gibi koşullarda çabuk kaybolan bir maddedir. Ancak, bu antibiyotiğe duyarlı bir *E. coli* suşu kullanılarak kolayca tespit edilebilir. Bu antibiyotik *Streptomyces*'ler deki çoklu antibiyotik üretiminin aksine *Serratia* ve *Erwinia* tarafından üretilen tek antibiyotiktir. Bu organizmalar tarafından üretilen tek antibiyotik olması, ayrıca hızlı üremeleri ve genetik çalışmalara yatkın olmaları nedeniyle karbapenem antibiyotik üretiminin çalışmalarında *Serratia* ve *Erwinia* türlerini cazip hale getirmiştir (30). *E. herbicola*'da karbapenem üretimi, ortamdaki bakteri yoğunluğuna ve N-(3-oksoheksanol)-L-homoserin lakton (OHHL) adı verilen bir sinyal molekülünün varlığına bağlıdır (42).

Ecc'de OHHL moleküllerinin varlığının tespit edilmesi bu bakteride de karbapenem biyosentezinin, *Vibrio fischeri*' de biyoışma oluşumu ile benzer bir yolla gerçekleşebileceği fikrini ortaya çıkarmıştır. Daha sonraki çalışmalar bu fikri doğrulamıştır. Biyoışmada olduğu gibi karbapenem üretimi de hücre yoğunluğuna

bağımlıdır. Yapılan deneysel çalışmalar, antibiyotik üretiminin, hücre yoğunluğunun en yüksek düzeyde olduğu logaritmik fazın sonu ile durgun fazın başlarında gerçekleştiğini göstermiştir. Üreme ortamında OHHL konsantrasyonu belli bir eşik değere ulaştığında bu molekül CarR proteinine bağlanır ve karbapenem oluşumundan sorumlu genleri aktive eder. Çevreyi algılama sistemi ile kontrol edilen fizyolojik işlemler genellikle çevresel faktörler tarafından da etkilenirler. Örneğin; katabolit baskılaması, besin ve oksijen yetersizliği, sıcaklık şoku ve demir limitasyonunun, *V. fischeri*'de lux sisteminin ekspresyonu üzerinde etkili olduğu bilinmektedir. Lux sistemine analog olması nedeniyle, karbapenem üretimininde de çevresel faktörlerden etkilenip etkilenmediğinin tespiti önemlidir (43).

## KAYNAKÇA

1. Whitman WB, Coleman DC, and Wiebe WJ. Prokaryotes: The unseen majority. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998;95:12 p. 6578-6583.
2. Kell DB, et al., Metabolic footprinting and systems biology: The medium is the message. Nature Reviews Microbiology, 2005;3:7 p. 557-565.
3. Ruiz B, et al., Production of microbial secondary metabolites: regulation by the carbon source. Crit Rev Microbiol, 36:2 (2010) p. 146-67.
4. Z.H. Zhang, et al., Effects of oxygen limitation on xylose fermentation, intracellular metabolites, and key enzymes of *Neurospora crassa* AS31602, Applied Biochemistry and Biotechnology, 2008;145:1-3 p. 39-51.
5. Dikshit KL, and Webster DA. Cloning, characterization and expression of the bacterial globin gene from *Vitreoscilla* in *Escherichia coli*, Gene, 1988;70(2): p. 377-386.
6. Dikshit KL, et al., Oxygen inhibition of globin gene-transcription and bacterial hemoglobin-synthesis in *Vitreoscilla*, Journal of General Microbiology, 1989;135 p. 2601-2609.
7. Chen HX, et al., Intracellular expression of *Vitreoscilla* hemoglobin improves S-adenosylmethionine production in a recombinant *Pichia pastoris*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007;74:6 p. 1205-1212.
8. Vanneste JL, Yu J and Beer SV. Role of antibiotic production by *Erwinia herbicola* Eh252 in biological control of *Erwinia amylovora*. Journal of Bacteriology, 1992;174:9 p. 2785-2796.
9. Liu ST, et al., Cloning of an *Erwinia herbicola* gene necessary for gluconic acid production and enhanced mineral phosphate solubilization in *Escherichia-Coli* Hb101- nucleotide-sequence and probable involvement in biosynthesis of the coenzyme pyrroloquinoline quinone, Journal of Bacteriology, 1992;174:18 p. 5814-5819.
10. Ishimaru CA, Klos EJ, and Brubaker RR. Multiple antibiotic production by *Erwinia herbicola*, Phytopathology, 1988;78:6 p. 746-750.
11. Brandl MT, and Lindow SE. Cloning and characterization of a locus encoding an indolepyruvate decarboxylase involved in indole-3-acetic acid synthesis in *Erwinia herbicola*, Applied and Environmental Microbiology, 1996;62:11 p. 4121-4128.
12. Stijn S, Jos V and Roseline R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling, FEMS Microbiol Rev, 2000 p. 1-24.
13. Manulis M, et al., Differential involvement of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in pathogenicity and epiphytic fitness of *Erwinia herbicola* pv, *gypsophila*, Molecular Plant-Microbe Interactions, 1998;11:7 p. 634-642.
14. Gürel F and Şerbetçi T. Production of n-(3-oxo-hexanoyl)-l-homoserine lactones (ohhl) responsible for "quorum-sensing" In *Pseudomonas syringae* Pv. *Savastanoi*, Turkish Microbiological Society, 2009;39:3-4: p. 58-61.

15. Chalupowicz L, et al., Regulatory Interactions Between Quorum-Sensing, Auxin, Cytokinin, and the Hrp Regulon in Relation to Gall Formation and Epiphytic Fitness of *Pantoea agglomerans* pv. *Gypsophilae*. The American Phytopathological Society, 2009; 22:7: p. 849–856.
16. Kosque T, Heskett MG, and Wilson EE. Microbial synthesis and degradation of Indole-3-acetic acid “The conversion of l-tryptophan to indole-3-acetamide by an enzyme system from *Pseudomonas savastanoi*, The Journal of Biological Chemistry, 1966;241:16 p. 3738-3744.
17. Pollmann S, et al., Occurrence and formation of indole-3-acetamide in *Arabidopsis thaliana*, *Planta Med*, 2002;216: p. 155–161.
18. Yang S, et al., Global effect of indole-3-acetic acid biosynthesis on multiple virulence factors of *Erwinia chrysanthemi*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007;73:4 p. 1079-1088.
19. Georg S, Norihiko M, and Gerhard S. Expression, purification and properties of *Erwinia uredovora*, *Biochem. J.*, 1996;315: p. 869-874
20. Gantotti BV and Beer SV, Plasmid-borne determinants of pigmentation and thiamine prototrophy in *Erwinia herbicola*, *Journal of Bacteriology*, 1982;151:3 p. 1627-1629.
21. Iwata-Reuyl D, et al., Bacterial phytoene synthase: Molecular cloning, expression, and characterization of *Erwinia herbicola* phytoene synthase. *Biochemistry*, 42(11) (2003) p. 3359-3365.
22. Johnson J, Do carotenoids serve as transmembrane radical channels? *Free Radic Biol & Med* 2009;47: p. 321-23.
23. M. Kahyaoglu and M. Kivanç, Endüstriyel Atık Maddelerden Mikrobiyal Yolla Beta Karoten Üretimi, *J. Agric. Sci.*, 2007;17(2): p. 61-66.
24. Nrihoko O, et al., Elucidation of pathway the *Erwinia uredovora* carotenoid biosynthetic by functional analysis of gene products expressed in *Escherichia coli*, *Journal of Bacteriology*, 1990;172:12 p. 6704-6712.
25. Lee PC and Schmidt-Dannert C. Metabolic engineering towards biotechnological production of carotenoids in microorganisms, *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002;60: p. 1-11.
26. Bremus C, et al., The use of microorganisms in l-ascorbic acid production *Journal of Biotechnology*, 2006;124: p. 196–205.
27. Berstenhorsta SM, Hohmannb HP, and Stahmannc KP. Vitamins and vitamin-like compounds: microbial production, *Encyclopedia of Microbiology*, 2009: p. 549-561.
28. Berry A, et al., Vitamine C production in microorganisms and plants, *Patent Application Publication*, 2002.
29. Greiner M and Winkelmann G. Fermentation and isolation of herbicolin A, a peptide antibiotic produced by *Erwinia herbicola* strain A 111, *Appl Microbiol Biotechnol*, 1991;34: p. 565-569.
30. Parker WL, et al., A simple carbapenem produced by species of *Serratia* and *Erwinia*, *J. Antibiotics*, 1982; 35: p. 653-660.
31. Sutton AE and Clardy J. Synthesis and Biological Evaluation of Analogues of the Antibiotic Pantocin B, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001;123: p. 9935-9946.
32. Leland SPI and Elizabeth AP. Metabolism and function of phenazines in bacteria: impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes, *Appl Microbiol Biotechnol* 2010; 86: p.1659-1670.
33. Whistler CA, and Pierson LS. Repression of Phenazine Antibiotic Production in *Pseudomonas aureofaciens* Strain 30-84 by RpeA, *Journal of Bacteriology*, 2003;185:13: p. 3718–3725.
34. Zhongge Z, and Pierson SL. A Second quorum-sensing system regulates cell surface properties but not phenazine antibiotic production in *Pseudomonas aureofaciens*, *Applied and Environmental Microbiology*, 67:9 (2001) p. 4305-4315.
35. Sykes RB, et al., Monocyclic beta-lactam antibiotics produced by bacteria. *Nature*, 1981; 291:5815 p. 489-491.
36. Aharonowitz Y and Cohen G. Penicillin and cephalosporin biosynthesis genes: structure, organization, regulation, and evolution, *Annu. Rev. Microbiol.*, 1992; 46: p. 461-495.
37. Matsumoto T, Kumazawa J and Nagayama A. Sensitivities to four carbapenems of bacteria isolated from patients with refractory complicated urinary tract infections and the detection of

## *Biyosistem Mühendisliği IV*

- carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1996;38(2):p. 322-324.
38. Jean SS, et al., In vitro activities of doripenem and other carbapenems against clinically important bacteria isolated in intensive care units: nationwide data from the SMART Programme, *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2010;29:4:p. 471-475.
  39. Williamson JM, et al., Biosynthesis of the beta-lactam antibiotic, thienamycin, by streptomyces-cattleya, *Journal of Biological Chemistry*, 1985;260:8 p. 4637-4647.
  40. Kahan FM, et al., Thienamycin- development of imipenem cilastatin, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1983; 12: p. 1-35.
  41. Moellering RC, Eliopoulos GM, and Sentochnik DE. The carbapenems: new broad spectrum beta-lactam antibiotics, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1989;24: p. 1-7.
  42. McGowan SJ, et al., Molecular genetics of carbapenem antibiotic biosynthesis, *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 1999; 75:1-2: p. 135-141.
  43. McGowan S, et al., Carbapenem antibiotic production in *Erwinia carotovora* is regulated by CarR, a homologue of the LuxR transcriptional activator. *Micfobiology*, 1995;141: p. 541-550.