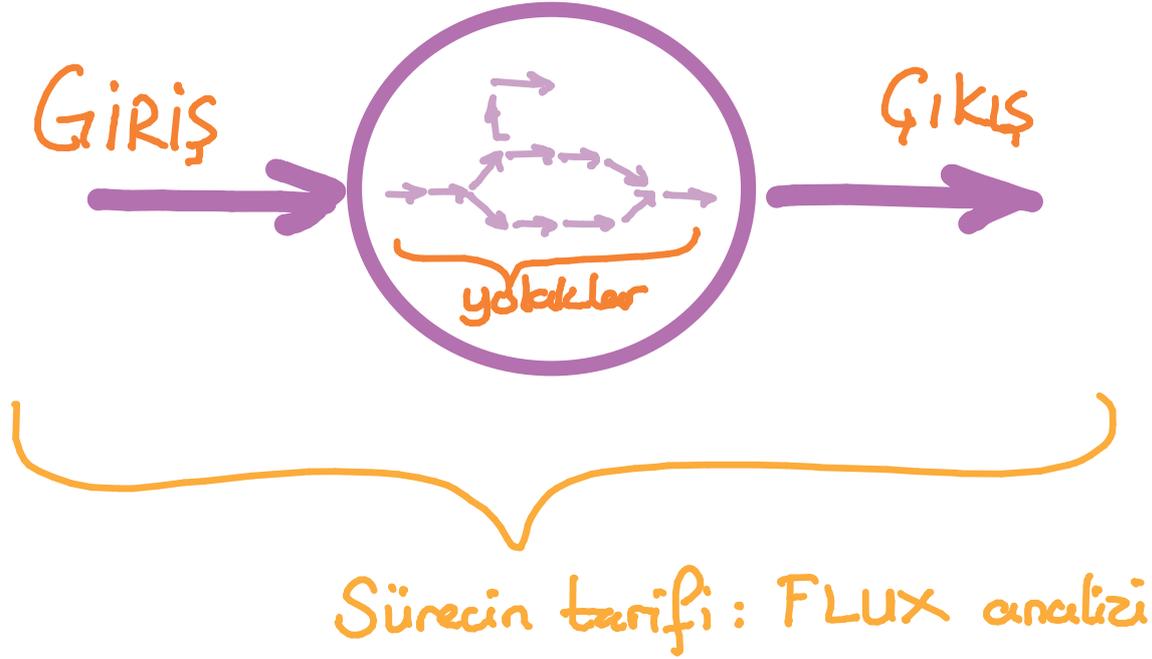


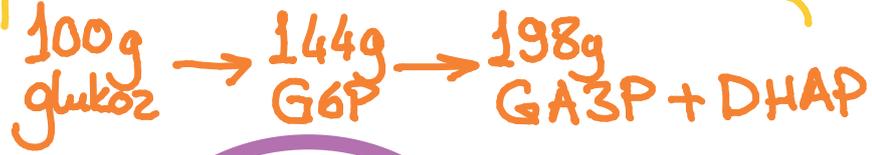
Metabolik Akı Analizi

Fermentasyon sırasında metabolizmanın
"gidişatı" ile ilgili KANTİTATİF
olarak ilişkilendirilmiş veriler...

Fermentasyon sırasında "aslında"
ne dokular dönüyor...

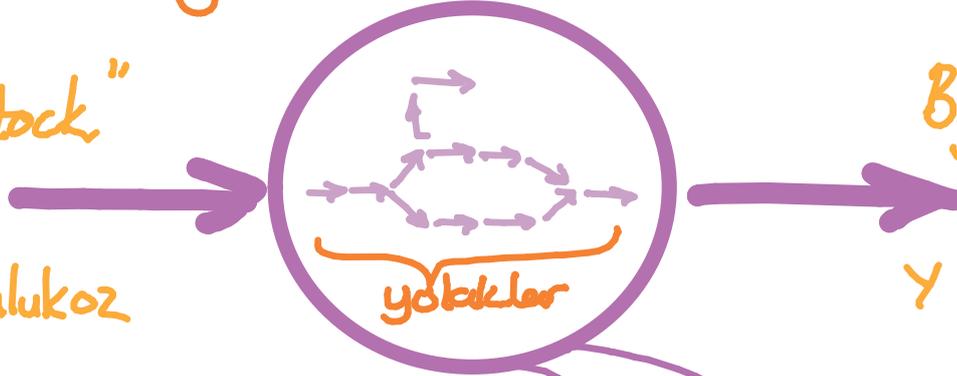


ara bileşik havuzunun büyüklükleri...



"Feedstock"

X kg Glukoz



Biyokütle

Y kg biyokütle (kuru)

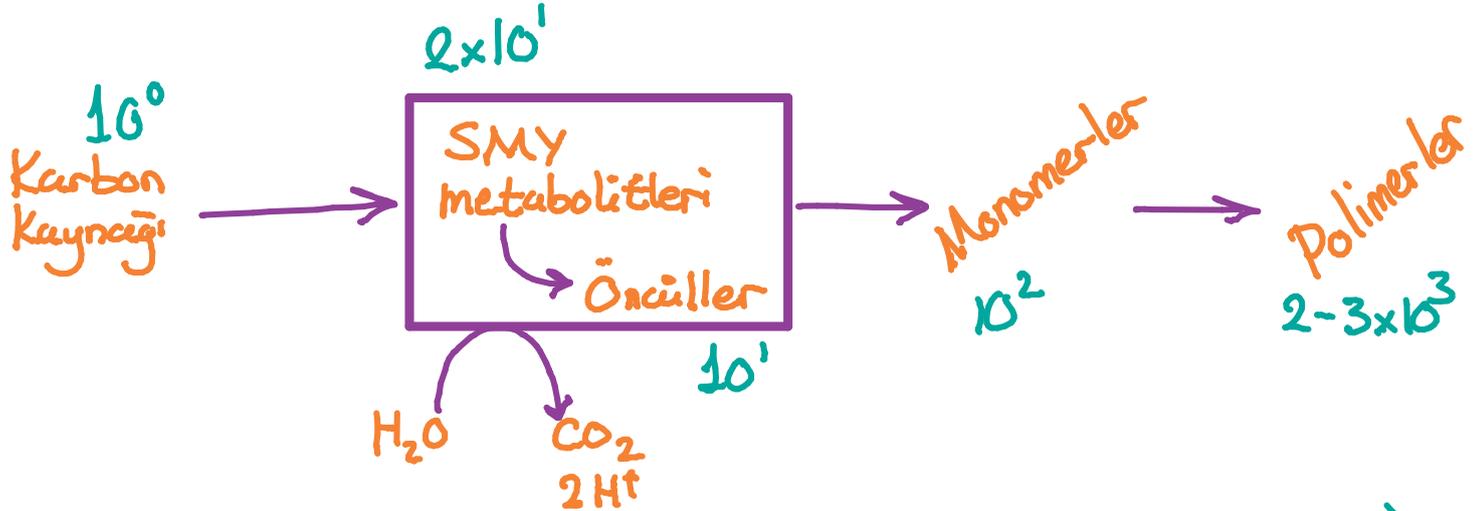
CO₂

asetat

μ

Özgül üreme hızı

Santral Metabolik Yolaklar



artan molekül çeşitliliği →

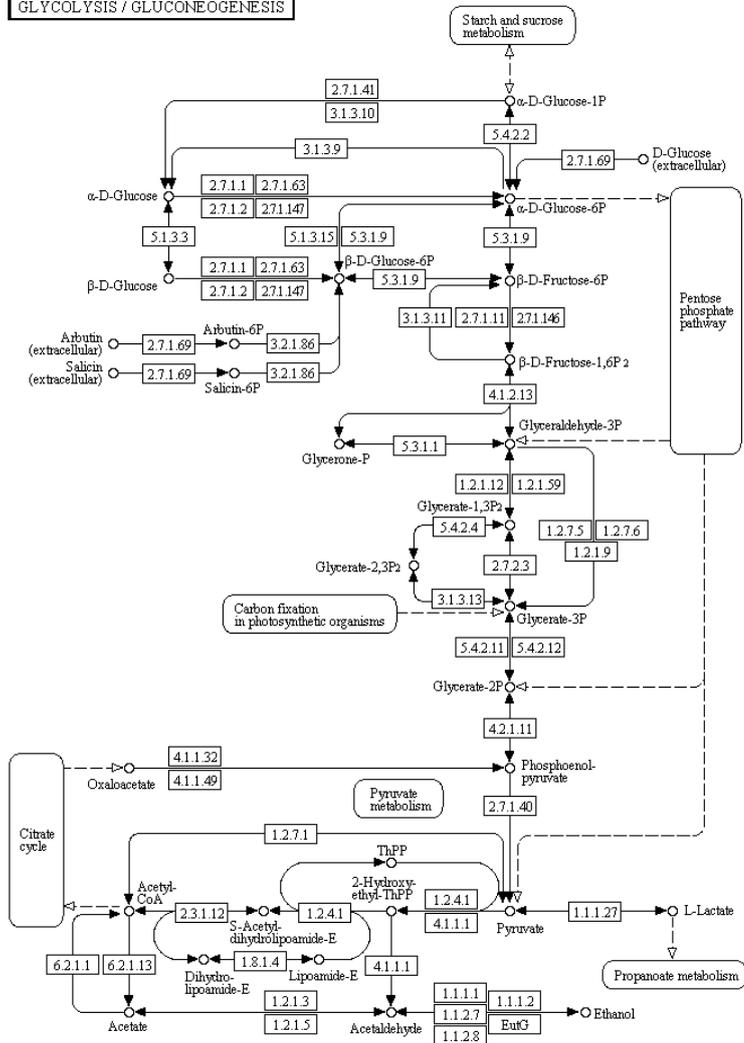
PPP

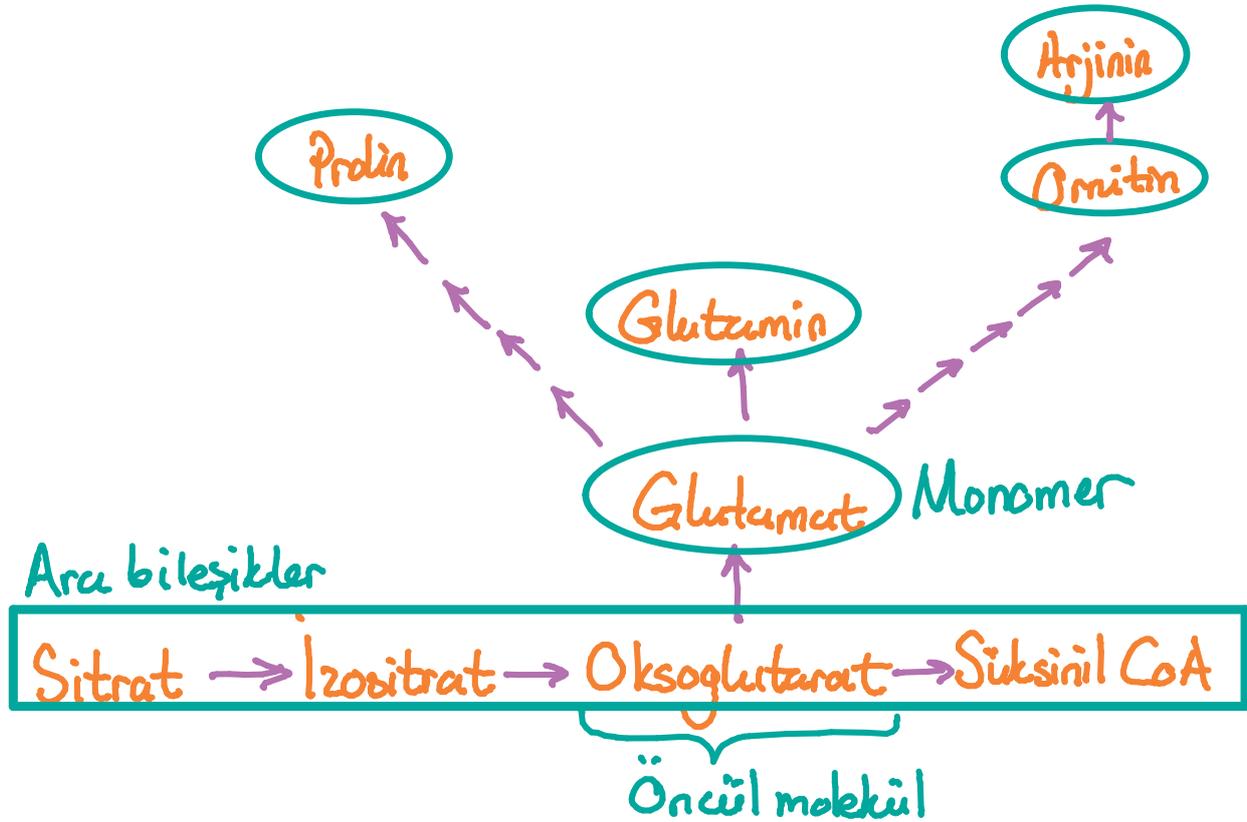
PEP karboksilaz

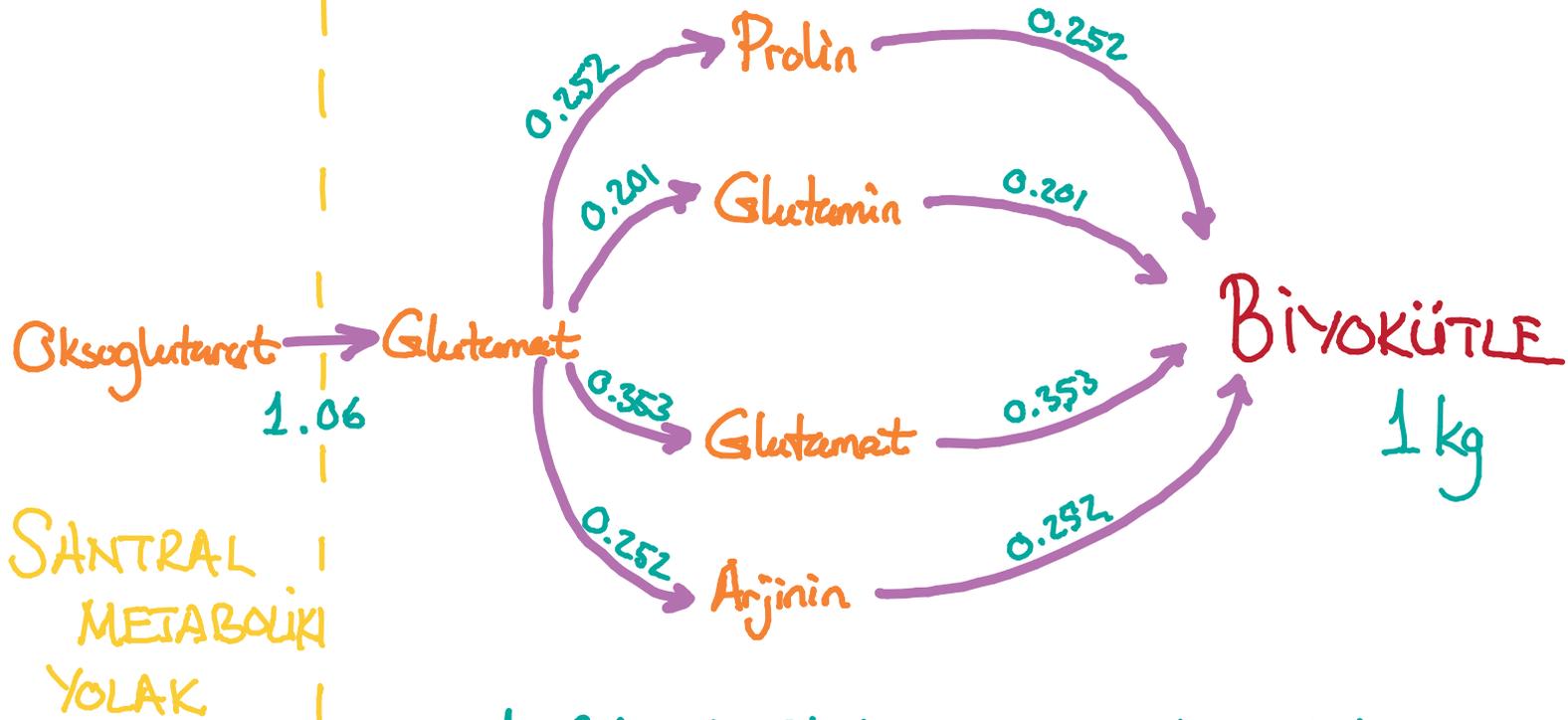
Privat dehidrogenaz

Krebs döngüsü

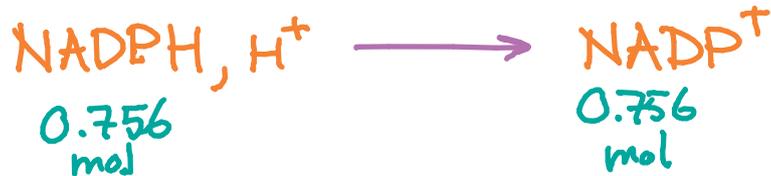
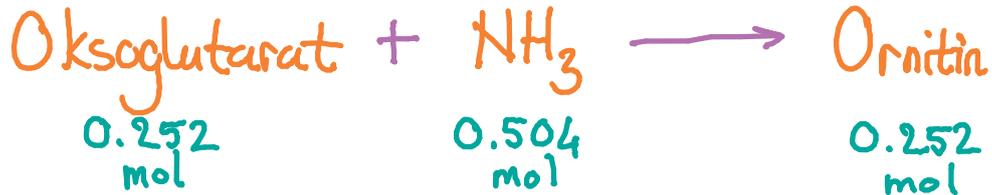
GLYCOLYSIS / GLUCONEOGENESIS







1,06 mol Glutamat sentezlenmelidir,
1 kg kuru biyokütle için...



Biyosentetik (amfibolik)

Öncüller

Glukoz 6 Fosfat

Trioz Fosfat

Fosfogliserat

Fosfo Enol Pirüvat

Pirüvat

Oksaloasetat

Oksaloglutarat

Asetil KoA

Monomerler

Ala Arg Asp Asn

Cys Glu Gln Gly

His Ile Leu Lys

Met Phe Pro Ser

Thr Trp Tyr Val

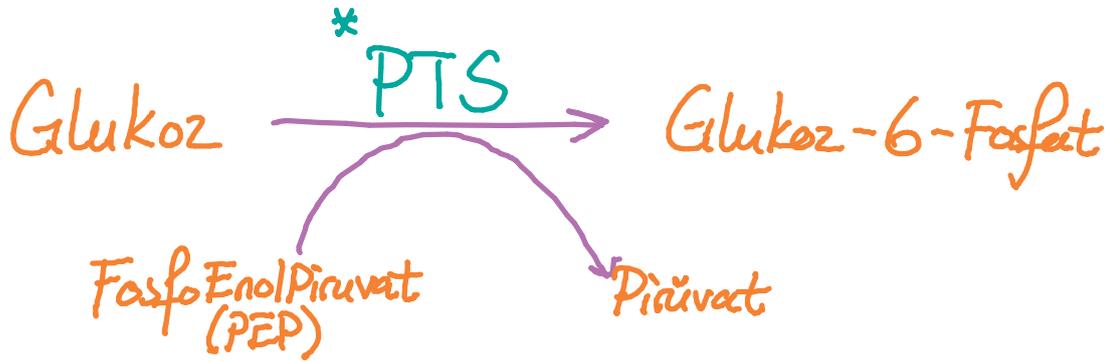
AMP dAMP GMP dGMP

CMP dCMP UMP dUMP

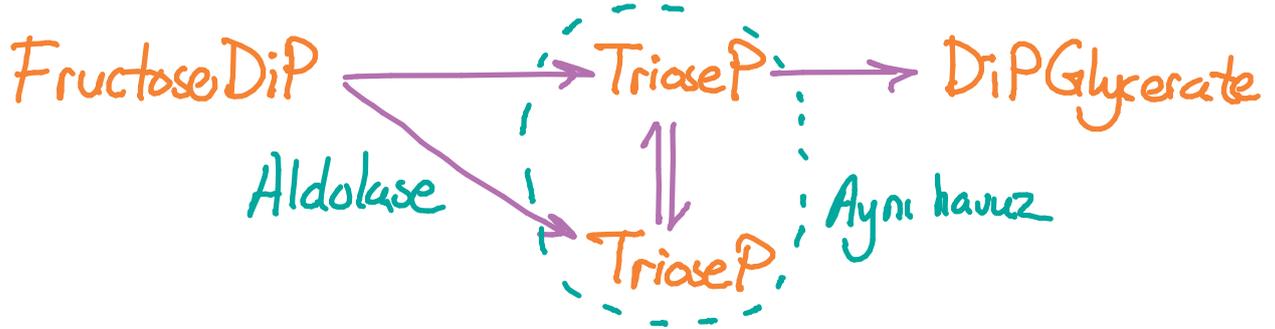
C₁₆ Yağ Asitleri Gliserofosfat

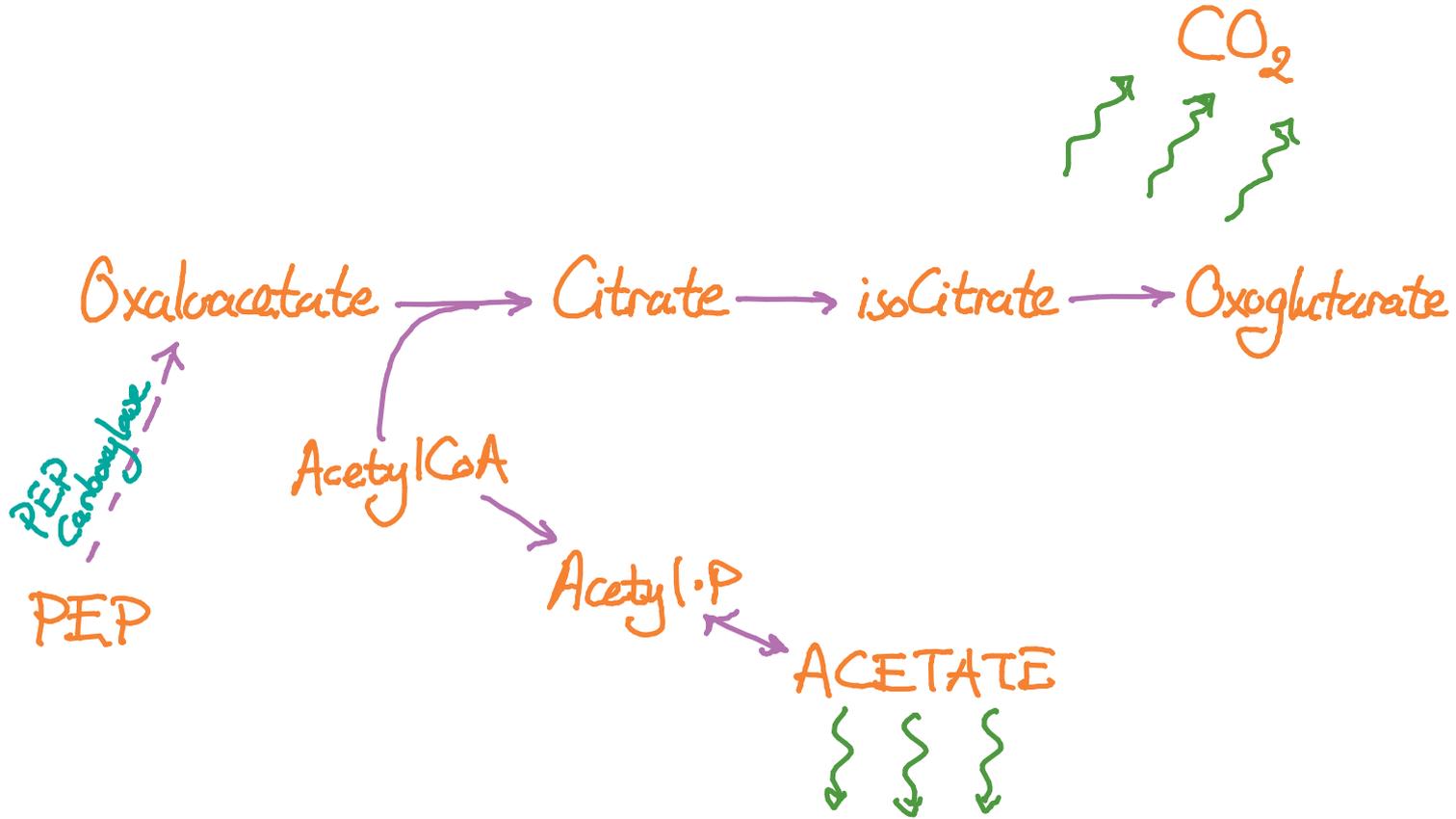
Karbohidrat (Glukoz olarak)

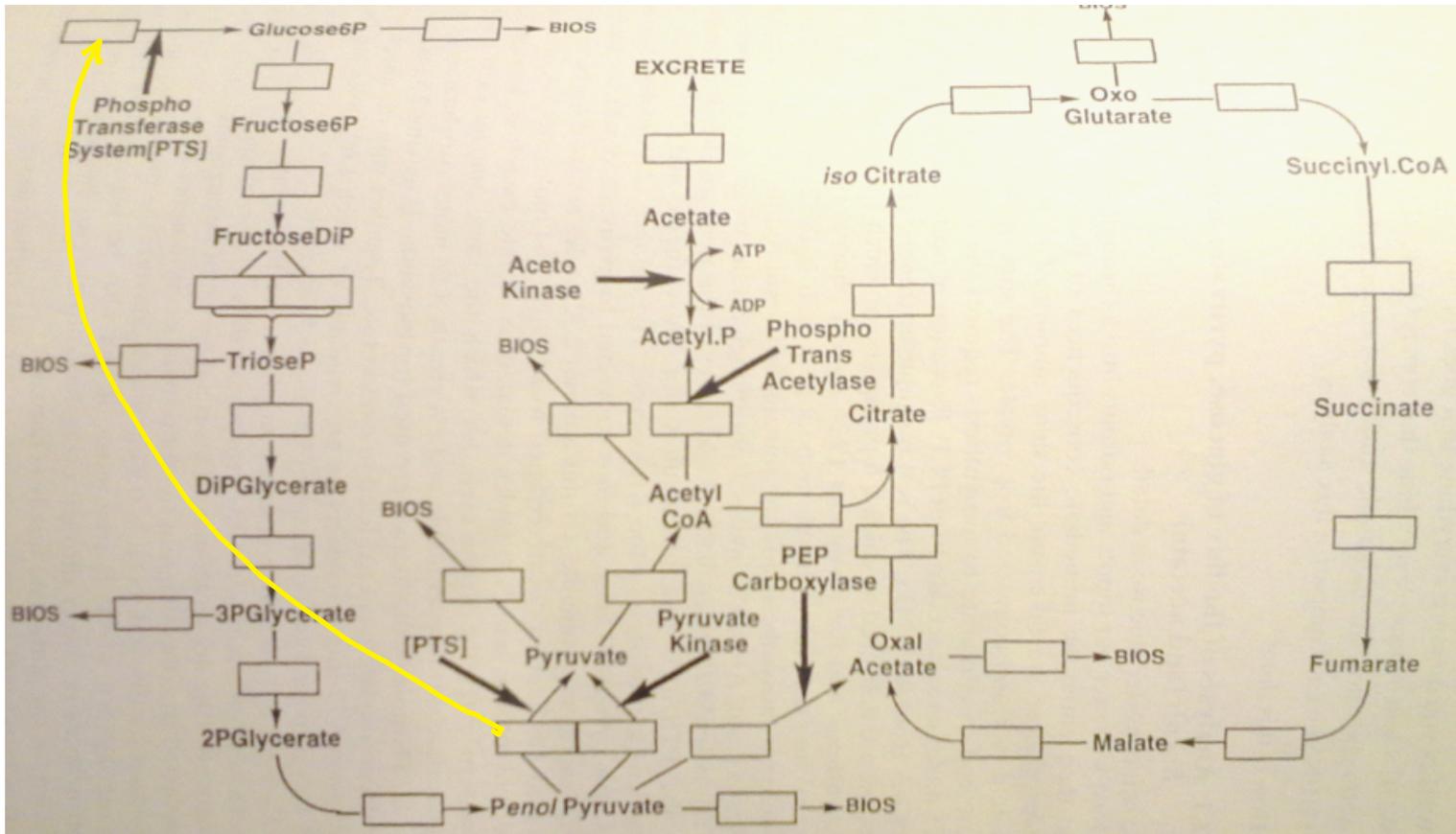
#1



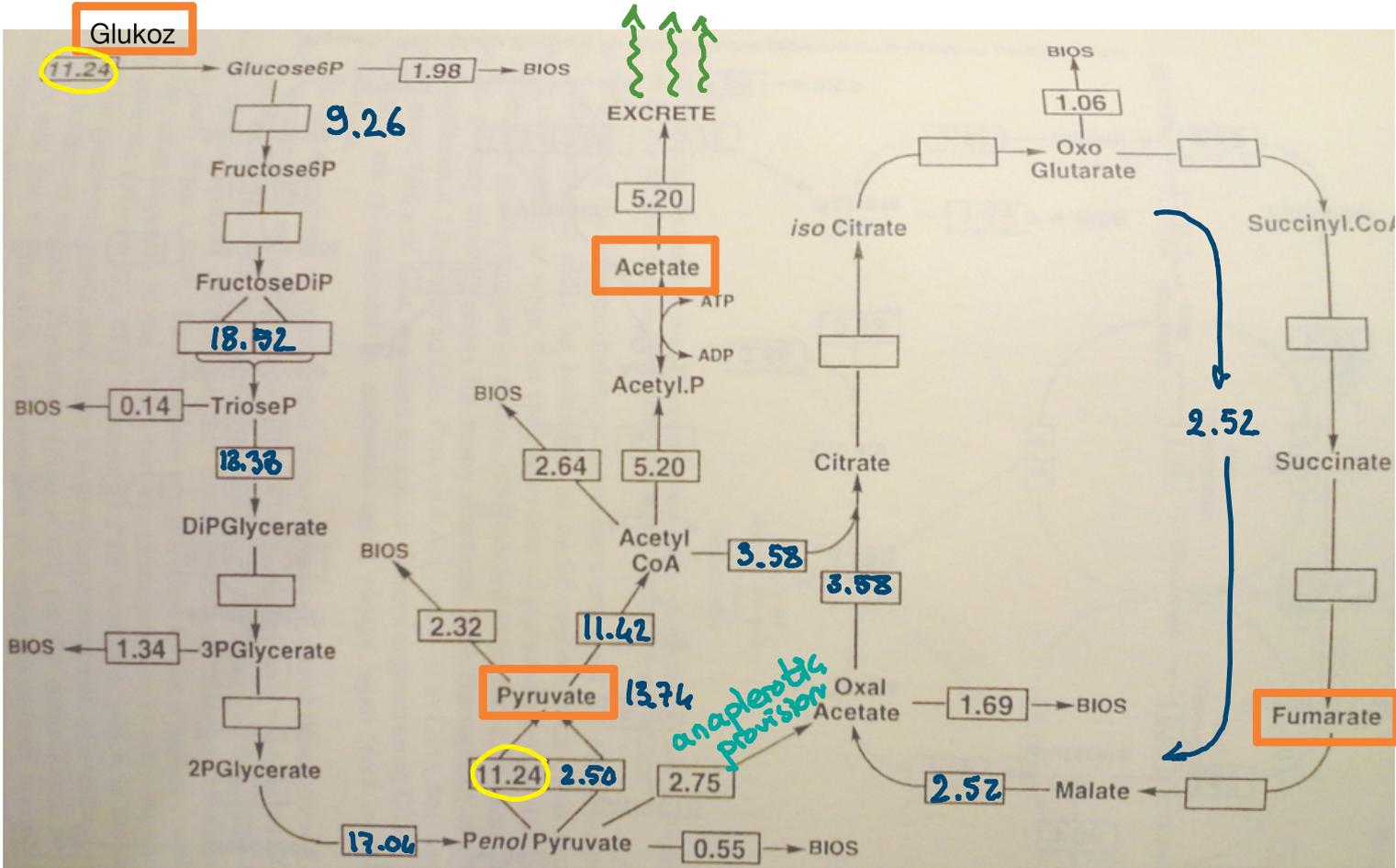
#2



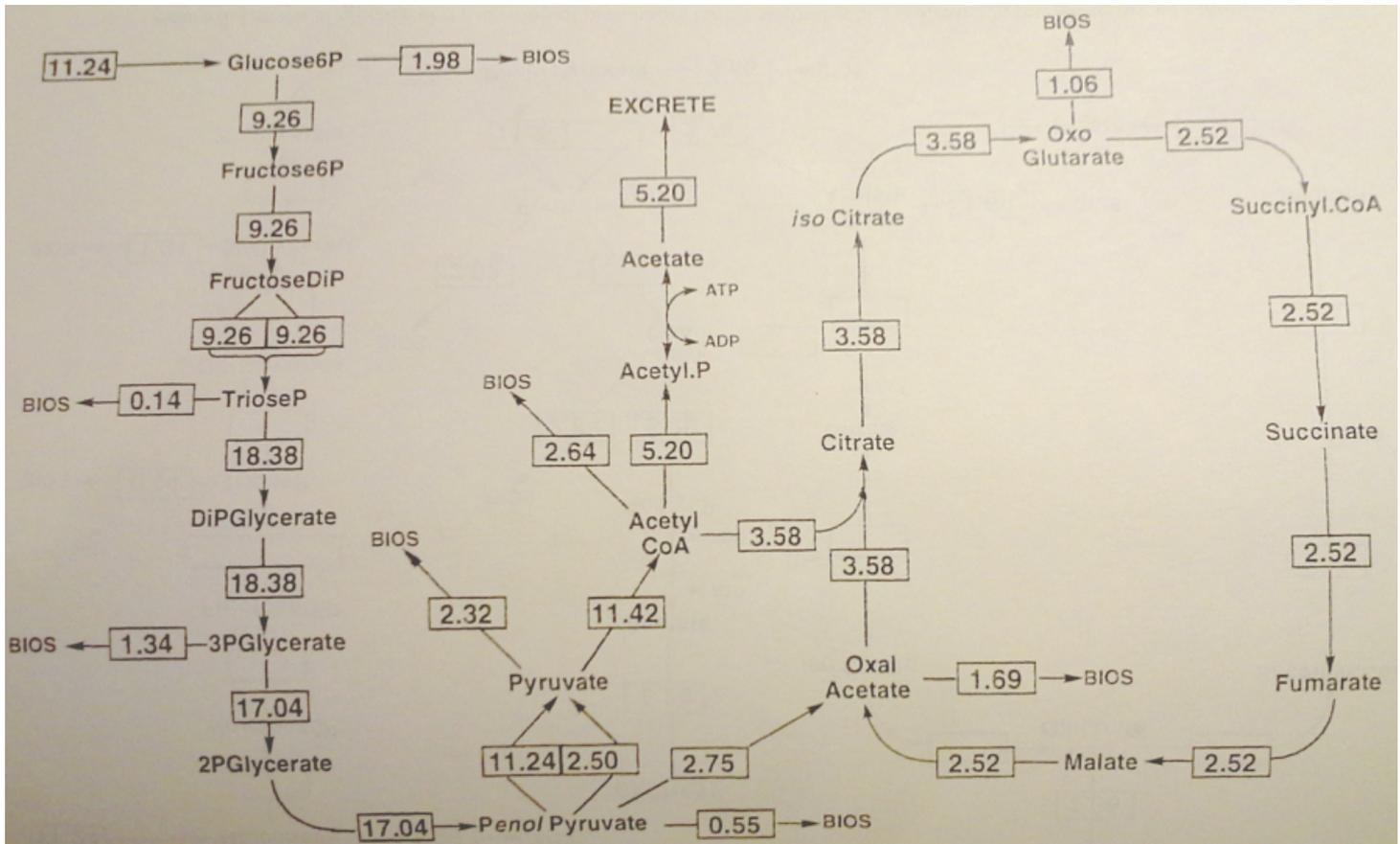




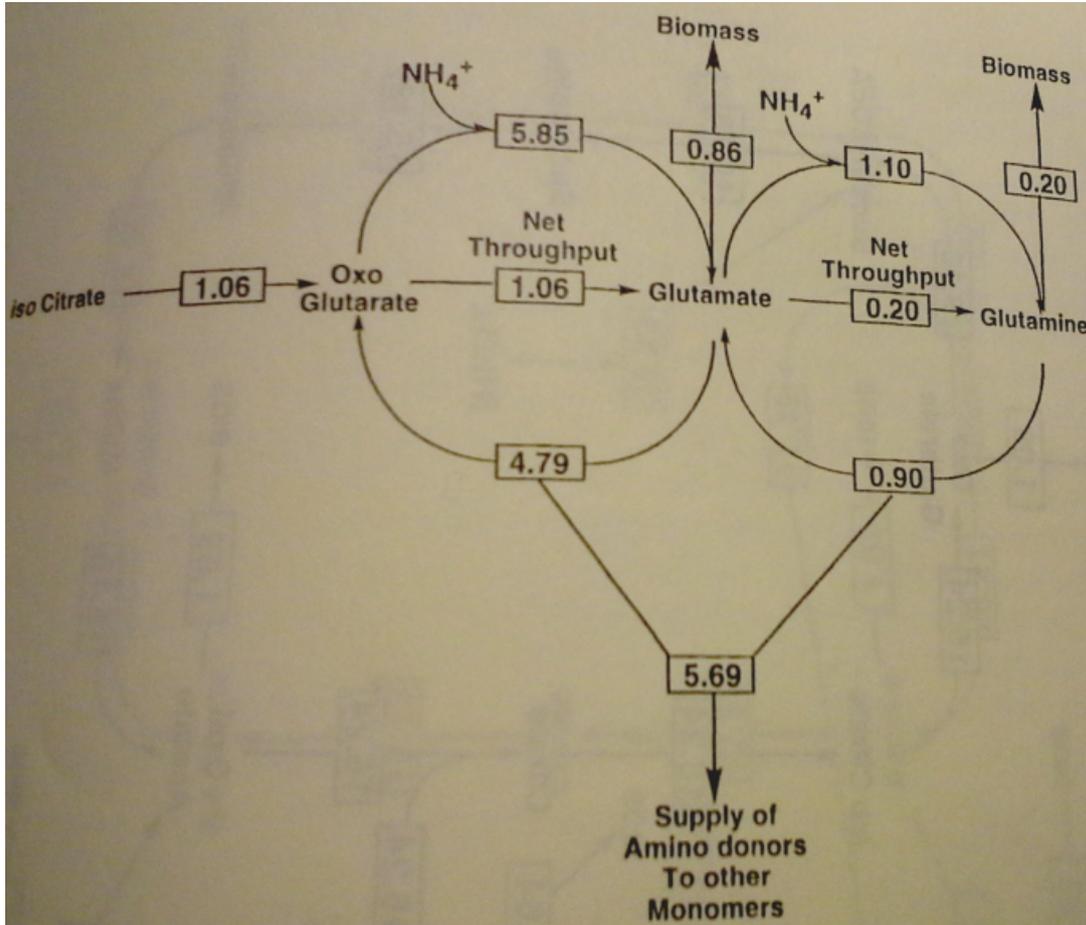
E. coli'de biyosentez için Santral Metabolik Yoldan çıkan öncüller
Glukoz kullanan kültür..



Glukoz, Pirüvat, Fumarat ve Asetat Fluxları...



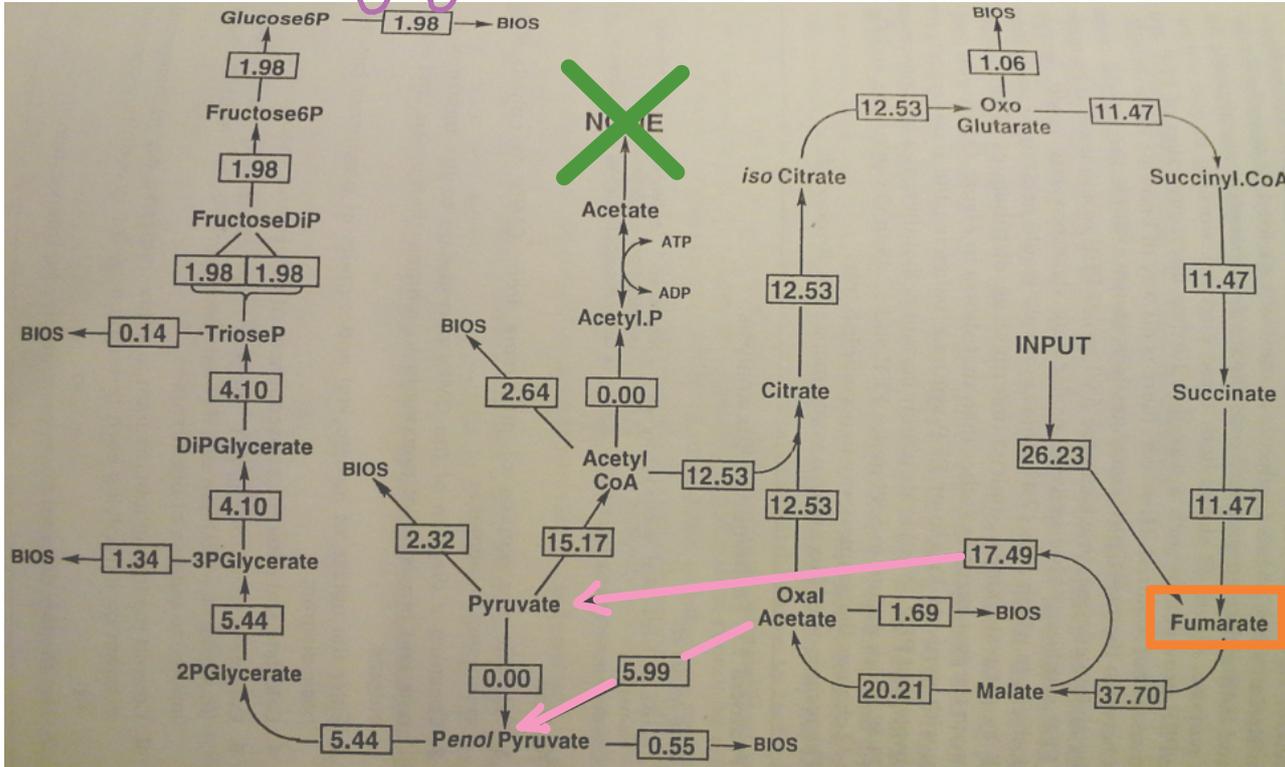
Escherichia coli ML308 glukoz "batch" kültür
 Tüm karbonların CO_2 'e oksitlenmesi koşulu ile geçerli



Oxoglutarate'tan
kaynaklanan
monomerler

mol/kg kuru biyokütle
E.coli ML308

Tek karbon kaynağı olarak FUMARAT kullanılırsa:



Doğrudan Krebs döngüsü

$C_4 \rightarrow C_3$

- PEP synthase
- Pyruvate kinase

Feedstock uptake
Özgül üreme hızı μ
Biyokütle monomer komp.
Diğer çıktılar

Sentral
Metabolik
Yolak
↓
Öncül moleküller

ÇIKTILAR

BIYOKÜTLE
MONOMERLERİ

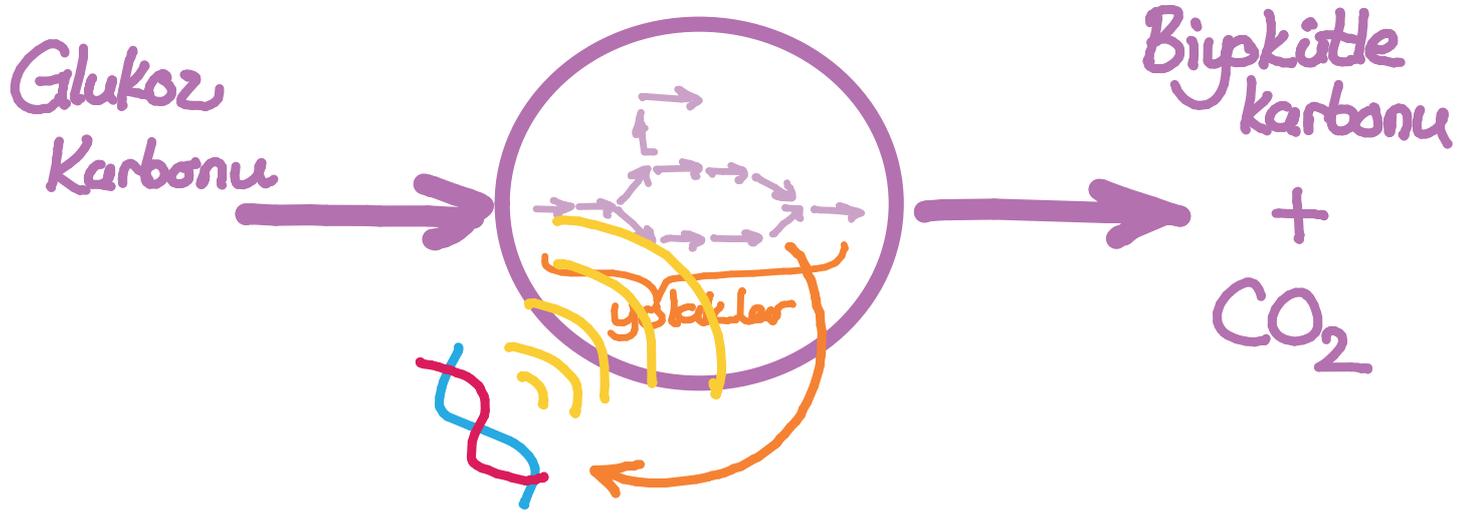
Girdiler
Öncül provizyonları
Biyokütle monomerleri
Çıktılar

Diyafram haline getir

Feedstock girdileri
Öncül çıktılar
Anaplerosis
Enzim "throughput"ları

Throughput $\times \mu$
↓
FLUX
mol/kg kuru biyoküt/saat

FLUX DİYAGRAMI



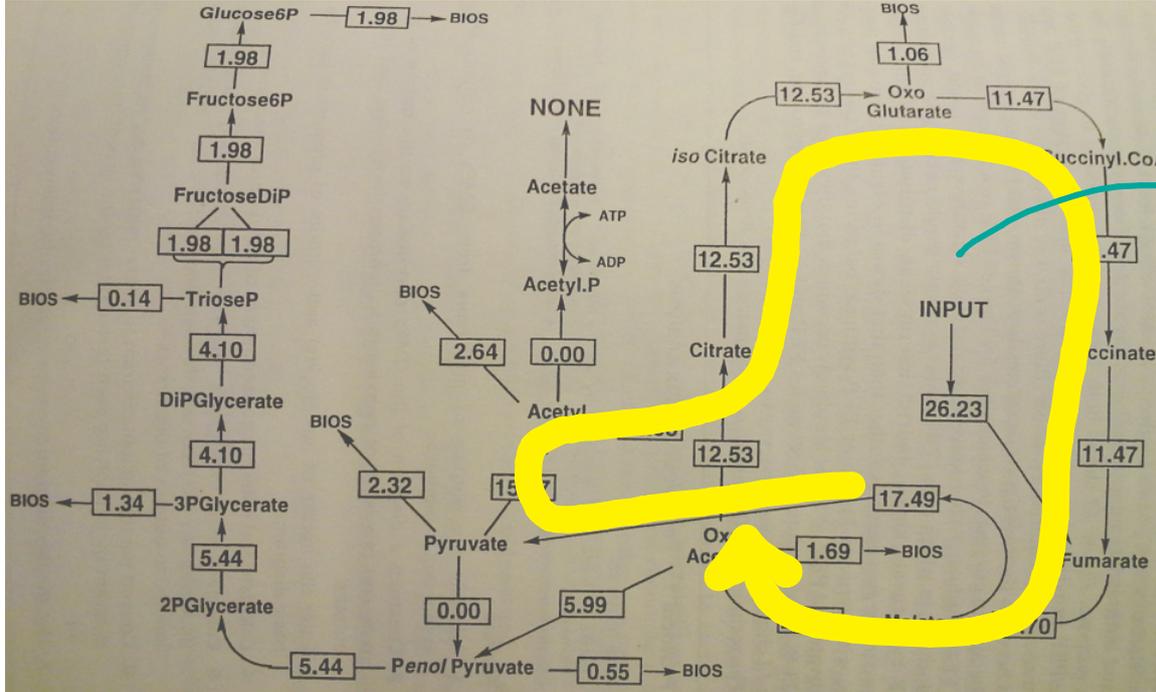
- Gereksinim fazlası ara metabolitler polimerize edilir (Glikojen)
- Oksidatif metabolizma \Rightarrow ENERJİ
 - Fazladan Karbon \rightsquigarrow CO₂
 - Fazladan Enerji \rightsquigarrow ISI
- SMY surplus ara metabolitler \rightsquigarrow
 - Düşük molekül ağırlıklı bileşikler
 - EKSKRASYON

ASETAT EKSKRESYONU

- Çok fazla feedstock alınması
- Çok fazla AcetylCoA oluşumu
- Asetat ekskresyonu açık bir kapı...

- Glukoz ile üreyen kültürlerde
Oksaloasetat ve oksaloglutarat flux'ı
diğer bileşenlere göre daha düşük
- 

Fumarat kullanan kültür:



SMYA feedstocktan katılan fumarat

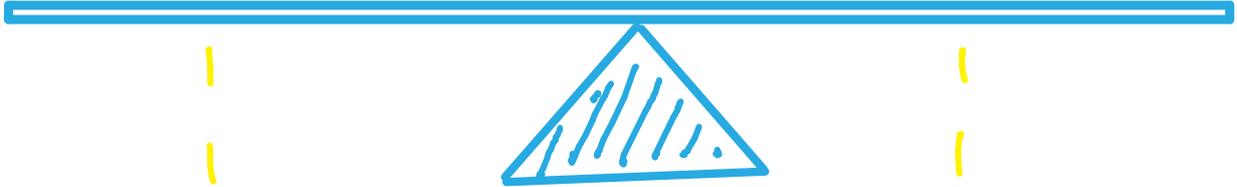
→ Öncül molekül çıktısı

→ CO₂'ye oksidasyon

Fumarat alımı ↓
μ kısıtlanır

Fumarat alımı dengeli

Fumarat alımı ↑
Fazla karbon
→ CO₂



Fumarate Feedstock!

Flux analizi ile,

Glukoz ve Pürivat ile üretilen
kültürlerde asetat ekskresyonu
modüle edilebilir...

- Bu arada, asetat ekskresyonu kötü mü?
- Evet! Biyokütleye dönüşmesini istediğimiz karboncuklar asetat olarak atılıyor
- O halde ne duruyorsun! Birşeyler yapsana...

Glucose-limited vs Glucose-excess

Steady State

- Prekürsör çıktıları aynı
- Krebs döngüsü throughput'ları aynı
- Glikoliz throughput'ları Glucose-limited durumda DÜŞER
- PEP \rightarrow Pyruvate \gg PTS'ye gidiş - Glukoz alımı
Glucose-limited durumda Pyruvate Kinase aktivitesi neredeyse sıfır!

Asetat ekskresyonunun enzim inhibisyonu ile azaltılması

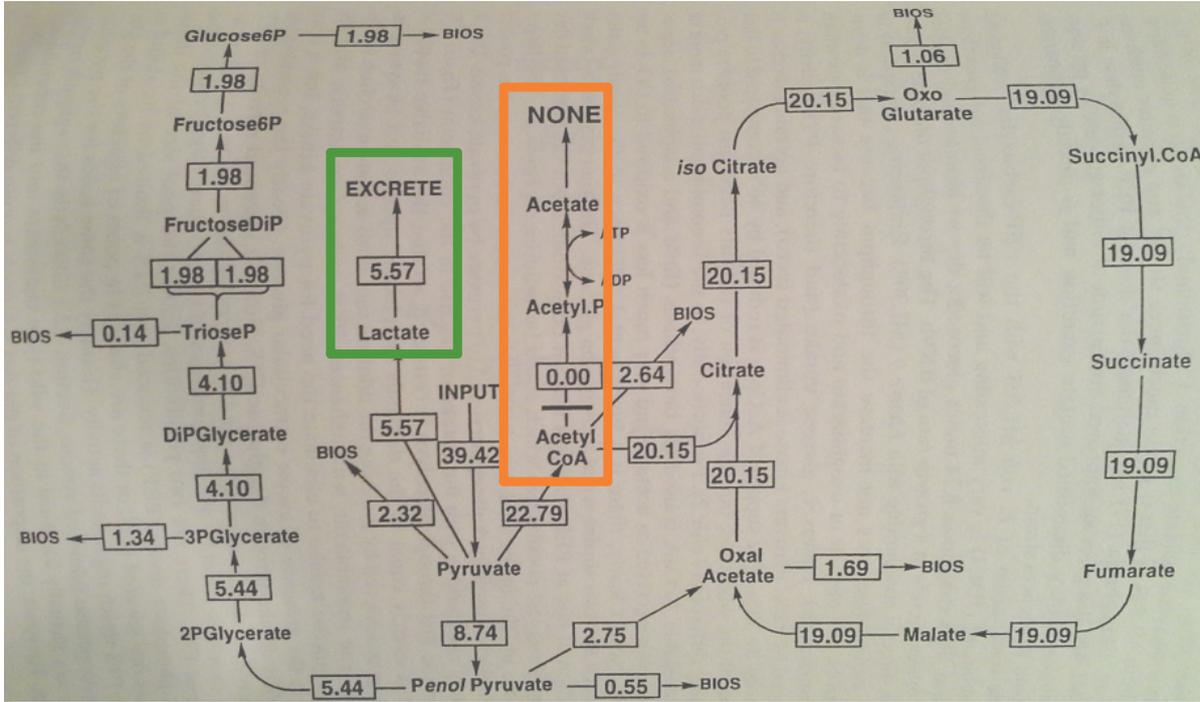
Bromopürivat \longrightarrow Pürivat dehidrogenaz
50 μ M total inhibisyon yapar

Gen manipülasyonu ile asetat ekskresyonunun azaltılması

Floroasetat \longrightarrow Florositrat (toksik)

Floroasetat ile asetokinaz / fosfoasetilaz
mutantlarının seçilmesi

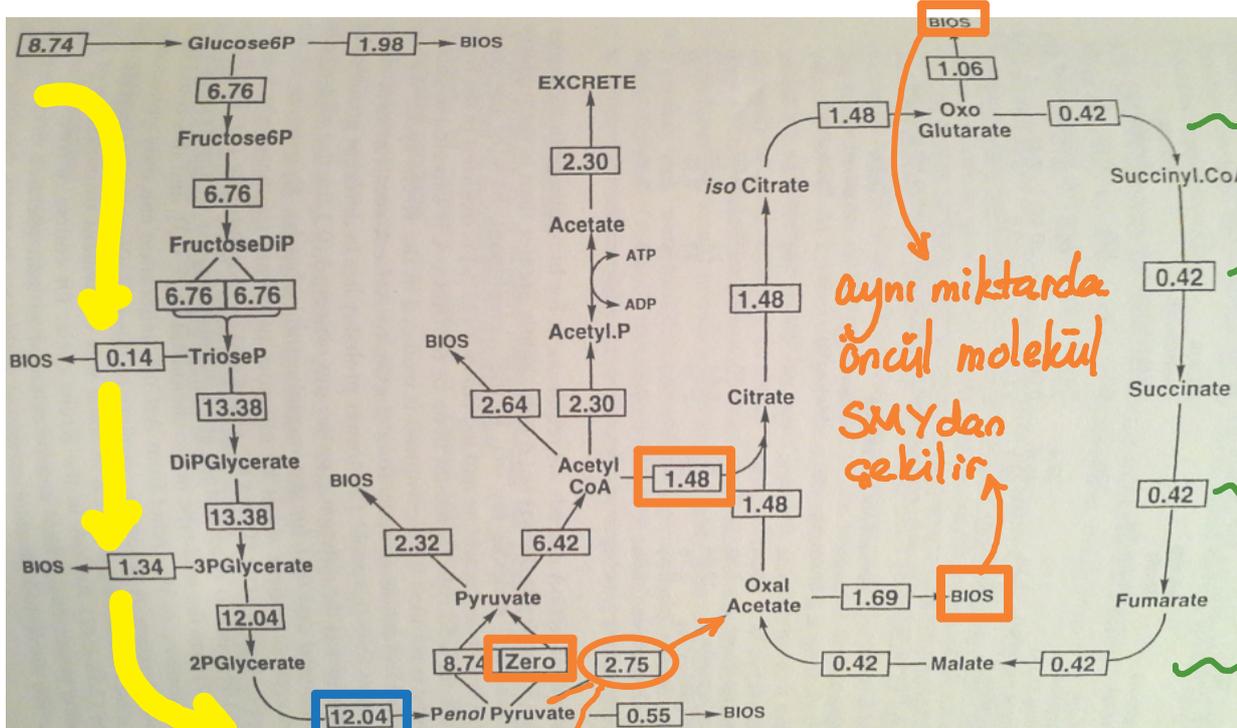
Acetokinase / Phosphotransacetylase mutantları



Ortamdan pirüvat alımı azalar
SMY öncül bileşik çıktıları aynı
Laktat ekskresyonu artar

Krebs döngüsünde okside olan
Acetyl CoA artar

Öncül (prekürsör) pevizyonlarının iyileştirilmesi ile asetat sekresyonunun azaltılması



Daha az glukoz ile aynı biyokütle!

aynı miktarda öncül molekül SMYdan çekilir

Daha düşük CO₂ salınımı

PEP Carboxylase overexpression mutanlığı
Glukoz alımı ↓ Acetyl CoA oluşumu ↓
Pyruvate Kinase(-)

PEP Carboxylase "overexpressing" mutantı,

Excess glukoz durumunda SINIRLI glukoz alır!

↑PEP Carboxylase

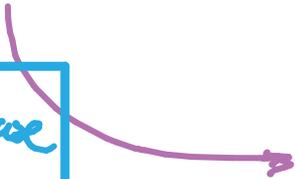
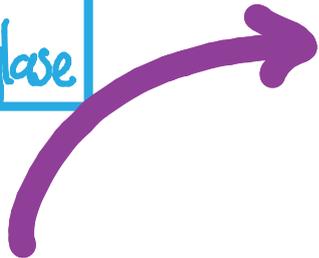
Oxaloacetate

Biyosentetik prekürsör ihtiyacı sabit olduğundan PEP Carboxylase throughput'u çok artmaz!

PEP

Pyruvate Kinase

PTS



Asetat ekskresyonunu önlemede/azaltmada diğer bazı yöntemler:

- Small excess glucose + turbidostat + fumarate

asetat ekskresyonu
sıfırlanana kadar artır

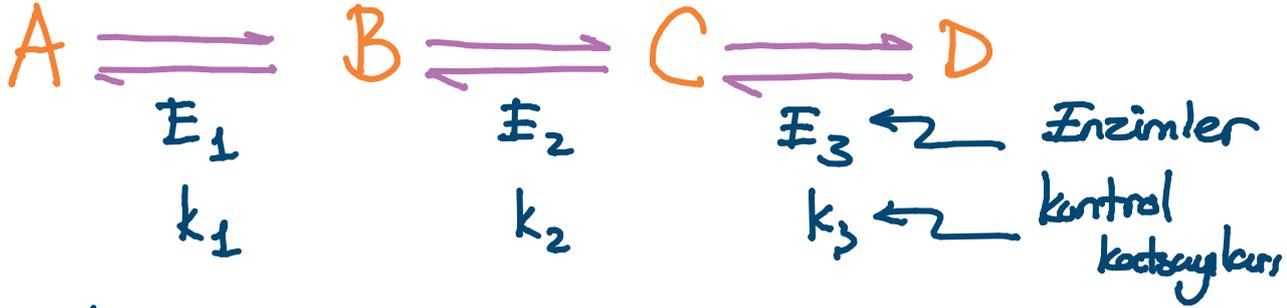
- "Carbon Sink" *E. coli*'de glikojen sentezini indükle

- Flux analizi faydalı - strateji geliřtirmek
- Primer C kaynağının alımı, çıktılar ile ilişkili
- Asetat ekskresyonu bazen çok yüksek olabilir, bu da alımı indükleyebilir
- Müdahale \longleftrightarrow Gözlem OPTİMİZASYON
- Sistemin "ne yaptığı" biliniyorsa strateji geliştirilebilir

Flux'in kontrolu

Kacser & Porteous:

Sonlu kontrol



$$k_1 + k_2 + k_3 = 1$$

1 (%100)'e yakın kontrol katsayısına sahip enzimler nadir

kontrol katsayıları negatif de olabilir !

Steady state → allosterik enzimler de diğerleri kadar katkıda bulunur

Crabtree & Newsholme : allosterik kontrol



Steady state'in aniden bozulduğu durumlarda
allosterik enzimler organizma için hayat kurtarıcı

Ör: C ya da O_2 aniden kesilirse,

ATP depleasyonu \rightarrow Ölüm

* Allosterik kontrol bu depleasyonun derinleşmesini önler

Flux'a ne karar verir?

E. coli (ve diğer birçok mikroorganizma)
çok geniş bir "koşullar yelpazesinde" hayatta
kalmaya programlı

Bunu yapabilmek için GÜVENLİK VANALARına ihtiyaç var

Ör: Karbonun SMY'a akışı gereksinimden fazlaysa
asetat olarak atmak faydalı

Flux analizi steady state'in tam bir tarifini
yapılmasını sağlar

Farklı bir steady state'e gitmek için gereken
etkinin saptanması

Her steady state durumu μ_{max} ya da optimal
feedstock \rightarrow biyokütle çevirimi sağlamak
zorunda değil

