



**L-GLUTAMİNAZ ÜRETİCİSİ BAKTERİLERİN
TOPRAKTAN TARANMASI, İZOLASYONU,
İDENTİFİKASYONU VE L-TEANİNİN
ENZİMATİK ÜRETİMİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

Esra AYGÜN

Danışman: Prof. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU
Doktora Tezi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı
2024

(Her hakkı saklıdır.)

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI

**L-GLUTAMİNAZ ÜRETİCİSİ BAKTERİLERİN TOPRAKTAN TARANMASI,
İZOLASYONU, İDENTİFİKASYONU VE L-TEANİNİN ENZİMATİK ÜRETİMİNİN
GELİŞTİRİLMESİ**

(Screening, Isolation and Identification of L-Glutaminase Producing Bacteria from Soil and
Development of Enzymatic Production of L-Theanine)

DOKTORA TEZİ

Esra AYGÜN

Danışman: Prof. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU

Erzurum
Temmuz, 2024

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü

TEZ KABUL VE ONAY TUTANAĞI

L-GLUTAMİNAZ ÜRETİCİSİ BAKTERİLERİN TOPRAKTAN TARANMASI,
İZOLASYONU, İDENTİFİKASYONU VE L-TEANİNİN ENZİMATİK ÜRETİMİNİN
GELİŞTİRİLMESİ

Prof. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU danışmanlığında, Esra AYGÜN tarafından hazırlanan bu çalışma, 14/06/2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Biyoteknoloji Bilim Dalı'nda Doktora Tezi tezi olarak **oybirliği / oy çokluğu** (3./3) ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Danışman:	Prof. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Prof.Dr. Bülent ÇETİN <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Prof.Dr. Kenan KARAGÖZ <i>Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Prof. Dr. Sevim Beyza Öztürk SARIKAYA <i>Gümüşhane Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır

Enstitü Yönetim
Kurulunun .../.../.... tarih
ve sayılı kararı.

Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

Prof.Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN
Enstitü Müdürü
Aslı Islak İmzalıdır

Bu çalışma Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) tarafından Doktora Tez Projesi kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: FDK-2022-9961

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ETİK VE BİLDİRİM VE BEYAN FORMU

Doktora Tezi olarak Prof. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU danışmanlığında sunulan “L-Glutaminaz Üreticisi Bakterilerin Toprakta Taranması, İzolasyonu, İdentifikasyonu ve L-Teaninin Enzimatik Üretiminin Geliştirilmesi” başlıklı çalışmanın tarafımdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	8	30
Kuramsal Temeller	1	30
Materyal ve Yöntem	26	35
Araştırma Bulguları ve Tartışma	4	20
Sonuçlar ve Öneriler	0	20
Tezin Geneli	14	25

Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olmaması gerekir.

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
Esra AYGÜN	Prof. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU
23.07.2024	23.07.2024
İmza: Aslı Islak İmzalıdır	İmza: Aslı Islak İmzalıdır

* Tez ile ilgili YÖKTEZ'de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

☐ Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun/.../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

☐ Enstitü Yönetim Kurulunun/.../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunulan bu çalışma, Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) tarafından FDK-2022-9961 nolu Doktora Tez Projesi kapsamında alınan destek ile Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında Sayın Prof. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU yöneticiliğinde hazırlanmıştır.

Doktora öğrenimim süresince sağladıkları burs imkânlarından dolayı Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu-Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı (TÜBİTAK-BİDEB) ve Yök 100/2000 doktora burs programı ile Yüksek Öğrenim Kurumu (YÖK) başta olmak üzere,

Doktora öğrenimim ve tez çalışmamın her aşamasında engin bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren, fikirlerimi önemseyip beni sürekli araştırmaya teşvik eden, başarabileceğime her zaman gönülden inanarak beni yüreklendiren, tezin hazırlanması sırasında yaptığım çalışmalarda benimle değerli fikirlerini paylaşan, özellikle tezimin son aşamalarında bana her türlü kolaylığı sağlayan ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen saygıdeğer Danışmanım Prof. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU'na,

Doktora öğrenimim süresince ilgisi, hassasiyeti ve yardımlarından dolayı Sayın Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL'e, tez çalışmamın deneysel aşamasında yaptığım çalışmanın iyileştirilmesi ve sorunların çözülmesinde verdiği değerli katkılardan dolayı Sayın Prof. Dr. Mesut TAŞKIN'a,

Tez dönemim boyunca tez izleme komitelerime sabırla katılan, engin bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren, kendisinden çok şey istifade ettiğim değerli jüri üyesi hocam Sayın Prof. Dr. Bülent ÇETİN'e,

Tez çalışmalarım süresince, kendisine başvurduğum her talebimde beni güler yüzle karşılayan, bilgi birikimini ve yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Sümeyya AKBULUT'a, tez çalışmamın farklı aşamalarında bana yardımcı olan Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Özkan BALTACI'ya,

Tüm laboratuvar çalışmamızı aynı ortamda geçirdiğim ve beraber çalışmaktan büyük keyif aldığım ekip arkadaşlarım; Selma SOULA, Gökseven GÖREN, Selinay Merve KILIÇ ve Şeyma ACARA'a, özellikle tezimin son aşamalarında ekibimize katılan, öğrenmeye gelişmeye hep açık ve iş bitiriliğiyle tüm çalışmalarımızı hızlandıran, değer katan ve varlığı benim için büyük destek olan Rahime ALTINTAS'a,

Hayatıma girdiği ilk günden itibaren beni her yönden destekleyen, hayat yükümü hafifleten ve tezimi bitirebilmem için ayrı illerde kalmayı kabul ederek büyük fedakârlıkta bulunan eşim Nusret AYGÜN'e ve hayatıma bir mucize gibi giren, bir gülüşüyle tüm stresimi sıkıntımı içimden vakumlayıp alan, ona ayırmam gereken zamandan kısım tezimi yazmama müsaade eden canım kızım Zeynep Vera AYGÜN'e,

Son olarak tüm hayatım boyunca sağladıkları maddi ve manevi tüm zenginliklerden dolayı ve özellikle akademik kariyerim için beni her daim yüreklendiren, varlıkları ve dualarıyla beni desteklemekten bir an olsun vazgeçmeyen babam Cemal ALÇİÇEK'e, annem Nebiye ALÇİÇEK'e ve ablalarım; Fatma BALTACI, Ayşe DEMİRAY ve Emine ŞEN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım

Esra AYGÜN

ÖZET

DOKTORA TEZİ

L-GLUTAMİNAZ ÜRETİCİSİ BAKTERİLERİN TOPRAKTAN TARANMASI, İZOLASYONU, İDENTİFİKASYONU VE L-TEANİNİN ENZİMATİK ÜRETİMİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Esra AYGÜN

Danışman: Prof. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU

Amaç: L-theanine (teanin), çaydaki umami tadını sağlayan ve birçok farmakolojik etkiye sahip olan bir aminoasittir. Enzimatik sentez yöntemi, L-teanin üretiminde yüksek verim, yüksek saflık ve düşük enerji tüketimi gibi avantajlar sunar ve endüstriyel üretim için uygundur. Ancak, L-teanin biyosentezi için gerekli enzimlerin mikrobiyal kaynakları sınırlıdır, bu yüzden daha fazla mikrobiyal kaynağın taranması ve enzimatik özelliklerinin incelenmesi gerekmektedir. Bu tez çalışmasında amaç, yüksek verimli L-teanin üretimi için literatürde belirtilen bakteri türleri dışında yeni bir bakteriyel tür veya suş taranması, bu izolatlardan L-glutaminaz enzimi üretimi ve bu enzim kullanılarak yüksek verimli L-teanin üretiminin sağlanmasıdır.

Yöntem: İlk olarak, Türkiye'nin farklı bölgelerinden temin edilen topraklardan L-glutaminaz ve L-teanin üretim potansiyeline sahip bakteri izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen suşlar kullanılarak L-glutaminaz enzimi üretildi. Enzim aktivitesini artırmak amacıyla, enzim üretim ortam koşulları istatistiksel optimizasyon programı (Plackett-Burman) kullanılarak optimize edildi. Daha sonra seçilen bakteri ve uygun besiyerinde üretilen L-glutaminaz kültür üst sıvısı kullanılarak L-teaninin enzimatik sentezi gerçekleştirildi. Son olarak L-teaninin biyotransformasyon veriminin artırılması amacıyla üretim koşulları, Yanıt Yüzeyi Metodolojisi (RSM) kullanılarak optimize edildi ve sonuçlar LC-MC analiziyle kantitatif olarak belirlendi.

Bulgular: Temin edilen toprak numunelerinden toplamda 132 adet bakteri izole edildi. Bu izolatlar bir dizi taramaya tabi tutuldu ve sonrasında en yüksek aktivitede L-glutaminaz ve en yüksek konsantrasyonda L-teanin üreten bakteriler seçilerek bu sayı 4'e düşürüldü. Daha sonra yapılan konvensiyonel ve moleküler analizler sonucunda seçilen bu 4 izolat (E-5: *Lysinibacillus parviboronicapiens* (Genbank No:PP819541), E-11: *Aeromonas media* (Genbank No:PP819513), E-12: *Bacillus arachidis* (Genbank No:PP819540), ve E-9: *Pseudomonas iridis* (Genbank No:PP828586),) tür düzeyinde tanımlandı. Yapılan taramalar sonucunda en yüksek verimde üretimi sağlayan E-9 kodlu bakteri seçilerek çalışmaya bu suşla devam edildi. Enzim üretim verimini arttırmak amacıyla besi yeri optimizasyonu yapıldı. Plackett-Burman tasarımıyla elde edilen verilere göre glutaminaz aktivitesi en iyi ortam şartları (İnkübasyon süresi: 40 saat, pH 7,0, sıcaklık 30°C, C kaynağı glukoz (2 g/L), N kaynağı amonyum sülfat (1 g/L), çalkalama hızı 130 rpm/dak) belirlendi. Belirlenen en iyi koşullarda üretilen enzim kullanılarak L-teaninin enzimatik sentezi gerçekleştirildi ve üretim parametreleri optimize edilerek (1:5 molar oran L-glutamin(donör):etilamin(aseptör, pH 11, sıcaklık 40 °C, enzim miktarı 3mL) LC-MC analiziyle %76,204 verimle (0,025g/L) L-teanin üretimi sağlandığı kaydedildi.

Sonuç: Bu tez kapsamında; mikrobiyal L-glutaminaz enzim üretimi ve L-teanin biyosentezi için en uygun bakteriyel suş araştırılmış ve daha önce literatürde bu amaçla kullanılmamış olan *Pseudomonas iridis* E-9 suşu izole edilerek L-glutaminaz ve L-teanin üretimi sağlanmıştır. Üretilen L-teaninin mikrobiyal kaynağının yeni olması ve üretim miktarının yüksek olması çalışmada geliştirilmiş olan bu ürünün patentlenme potansiyeli olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: L-teanin, L-glutaminaz, biyokataliz, biyotransformasyon, izolasyon, identifikasyon, LC-MC.

Temmuz 2024, 89 sayfa

ABSTRACT

DOCTORAL THESIS

SCREENING, ISOLATION AND IDENTIFICATION OF L-GLUTAMINASE PRODUCING BACTERIA FROM SOIL AND DEVELOPMENT OF ENZYMATIC PRODUCTION OF L-THEANINE

Esra AYGÜN

Supervisor: Prof. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU

Purpose: L-theanine is an amino acid that provides the umami flavor in tea and has many pharmacological effects. The enzymatic synthesis method offers advantages such as high yield, high purity and low energy consumption in the production of L-theanine and is suitable for industrial production. However, microbial sources of enzymes required for L-theanine biosynthesis are limited, so more microbial sources need to be screened and their enzymatic properties need to be studied. The aim of this thesis is to screen a new bacterial species or strain other than the bacterial species mentioned in the literature for high efficient L-theanine production, to produce L-glutaminase enzyme from these isolates and to ensure high efficient L-theanine production using this enzyme.

Method: Firstly, bacteria with L-glutaminase and L-theanine production potential were isolated from soils obtained from different regions of Turkey. L-glutaminase enzyme was produced using the isolated strains. In order to increase enzyme activity, enzyme production environmental conditions were optimized using statistical optimization program (Plackett-Burman). Then, enzymatic synthesis of L-theanine was performed using the selected bacteria and L-glutaminase culture supernatant produced in the appropriate medium. Finally, the production conditions were optimized using Response Surface Methodology (RSM) to increase the biotransformation efficiency of L-theanine and the results were quantitatively determined by LC-MC analysis.

Findings: A total of 132 bacteria were isolated from the soil samples. These isolates were subjected to a series of screenings and then the number was reduced to 4 by selecting the bacteria producing L-glutaminase with the highest activity and L-theanine with the highest concentration. These 4 isolates (E-55: *Lysinibacillus parviboronicapiens* (Genbank No: PP819541), E-11: *Aeromonas media* (Genbank No: PP819513), E-12: *Bacillus arachidis* (Genbank No: PP819540), and E-9: *Pseudomonas iridis* (Genbank No: PP828586)) were then identified to species level by conventional and molecular analysis. As a result of the screening, the E9 coded bacterium, which provided the highest production efficiency, was selected and the study was continued with this strain. Media optimization was performed to increase enzyme production efficiency. According to the data obtained in Plackett-Burman design, glutaminase activity was optimized with the best medium conditions (Incubation time: 40 h, pH 7.0, temperature 30°C, C source glucose (2 g/L), N source ammonium sulfate (1 g/L), shaking speed 130 rpm/min) were determined. Enzymatic synthesis of L-theanine was carried out using the enzyme produced under the best conditions determined and the production parameters were optimized (1:5 molar ratio L-glutamine (donor):ethylamine (acceptor, pH 11, temperature 40 °C, enzyme amount 3mL) and LC-MC analysis showed that L-theanine production was achieved with 76.204% yield (0.025g/L).

Results: In this thesis, the most suitable bacterial strain for microbial L-glutaminase enzyme production and L-theanine biosynthesis was investigated and *Pseudomonas iridis* E9 strain, which has not been used for this purpose in the literature before, was isolated and L-glutaminase and L-theanine production was achieved. The fact that the microbial source of L-theanine produced is new and the production amount is high shows that this product developed in this study has the potential to be patented.

Keywords: L-theanine, L-glutaminase, biocatalysis, biotransformation, isolation, identification, LC-MC.

June 2024, 89 pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI.....	i
ETİK VE BİLDİRİM VE BEYAN FORMU	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ	xii
GİRİŞ.....	1
L-Theanine (L-Teanin)	3
Teaninin Kimyasal Yapısı ve Fizikokimyasal Özellikleri	4
Teaninin Bulunduğu Kaynaklar	5
L-Teaninin Sağlık Üzerine Olumlu Etkileri.....	6
Teaninin Üretim Yöntemleri	9
L-Teaninin Çaydan Ekstraksiyonu.....	10
L- Teaninin Kimyasal Sentezi.....	10
L-Teaninin Biyoteknolojik Yöntemlerle Sentezi	10
Glutaminaz Enzimi	13
KURAMSAL TEMELLER.....	15
Tezin Amacı.....	21
MATERYAL VE METOD	22
Materyal	22
Mikroorganizma İzolasyonları	22
Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar	22
Tez çalışmasında kullanılan araç-gereç ve cihazlar	23
Tez çalışmasında kullanılan besiyerleri, çözeltiler ve tamponlar	24
Yöntem.....	25
Örnek toplanması	25
L-glutaminaz üreten bakteri izolasyonu.....	25
L-glutaminaz enziminin kalitatif analizi	25

L-glutaminaz enziminin sıvı kültürde üretimi	25
L-glutaminaz enziminin aktivite tayini	26
L-Glutaminaz Aktivitesi Hesaplamasında Kullanılan Amonyum Standart Grafiğinin Çizilmesi	26
L-teanin sentezi	26
L-teanin Tayin Yöntemleri.....	27
TLC ile L-teaninin kalitatif tayini	27
HPLC ile L-teanin kalitatif ve kantitatif tayini	27
Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometresi (LC-MS) ile L-Teanin Kalitatif ve Kantitatif Tayini	28
En Yüksek Konsantrasyonda L- Teanin Üretimini Sağlayan L-Glutaminaz Üreticisi İzolatların Morfolojik, Fizyolojik Ve Biyokimyasal Özelliklerinin Araştırılması	29
Gram boyama	29
İzolatların gelişebildikleri tuz konsantrasyonunun belirlenmesi	29
İzolatların gelişme sıcaklıklarının belirlenmesi	29
İzolatların gelişebildikleri pH aralıklarının belirlenmesi	30
Oksidaz testi.....	30
Katalaz testi.....	30
En Yüksek Konsantrasyonda L- Teanin Üretimini Sağlayan L-Glutaminaz Üreticisi İzolatların Moleküler İdentifikasyonu	31
Test izolatlarından DNA ekstraksiyonu	31
Test İzolatlarından Ekstrakte edilen DNA konsantrasyonlarının Ölçülmesi ve çalışma solüsyonlarının hazırlanması.....	31
DNA örneğinin ve çalışma solüsyonunun konsantrasyonunun belirlenmesi ($\mu\text{g/mL}$) ...	31
16S rRNA PCR İşlemi	32
16S rRNA PCR Ürünlerinin Jel Elektroforezi	33
Filogenetik Çalışmalar İçin Gen Amplifikasyonu ve Dizileme	33
En Yüksek Aktivitede L-Glutaminaz ve En Yüksek Konsantrasyonda L-Teanin Üretimi İçin Besiyeri Optimizasyonu.....	33
Fiziksel değişken optimizasyonu	33
Besiyeri içerik optimizasyonu.....	35
En Yüksek Konsantrasyonda L-Teanin Üretimi İçin Gerekli Parametrelerin Response Surface Methodology (RSM) ile İstatistiksel Optimizasyonu	36
İstatistiksel Analiz.....	37
ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	38

Mikroorganizmaların İzolasyonu	38
L-glutaminaz enziminin kalitatif analizi	38
L-Glutaminaz Enziminin sıvı kültürde üretimi	39
L-Glutaminaz Aktivitesi Hesaplamasında Kullanılan Amonyum Standart Grafiği	40
L-Teanin Biyosentezi	43
TLC ile L-Teaninin Kalitatif Tayini	43
HPLC ile L-Teaninin Kalitatif ve Kantitatif Tayini	44
En Yüksek Konsantrasyonda L- Teanin Üretimini Sağlayan L-Glutaminaz Üreticisi İzolatların Morfolojik, Fizyolojik Ve Biyokimyasal Özelliklerinin Araştırılması	49
En Yüksek Konsantrasyonda L- Teanin Üretimini Sağlayan L-Glutaminaz Üreticisi 4 İzolatın Moleküler İdentifikasyonu	49
Kullanılarak Üretilen L-Teaninin LC-MC ile Kalitatif ve Kantitatif Tayini	51
Optimizasyon Çalışmaları	52
Besiyeri optimizasyonu	52
Yüksek Konsantrasyonda L-Teanin Üretimi İçin Gerekli Parametrelerin Response Surface Methodology (RSM) ile İstatistiksel Optimizasyonu	60
SONUÇ ve ÖNERİLER	64
KAYNAKÇA	66
ÖZGEÇMİŞ	75

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 1. L-teanin Biyosentezinde Kullanılan L-Glutaminaz Enziminin Mikrobiyal Kaynakları, Üretim Koşulları, Biyotransformasyon Yüzdeleri.	13
Tablo 2. Tez Çalışmasında Kullanılan Kimyasallar / Markaları	22
Tablo 3. Tez Çalışmasında Kullanılan Araç-Gereç ve Cihazlar / Marka-Model	23
Tablo 4. Tez Çalışmasında Kullanılan Besiyerleri	24
Tablo 5. Enzim Aktivite Tayininde Kullanılan Çözeltiler.....	24
Tablo 6. Nessler Reaktifi Hazırlanmasında Kullanılan Çözeltiler.....	24
Tablo 7. İnce tabaka kromatografisi (TLC) Tayininde Kullanılan Çözelti ve Tamponlar	24
Tablo 8. Protein Tayininde Kullanılan Çözelti ve Tamponlar.....	25
Tablo 9. L-Teanin HPLC metot şartları, mobil fazları	28
Tablo 10. L- teanin HPLC ile analizi için kullanılan mobil fazlar için akış diyagramı.....	28
Tablo 11. L- teanin LC-MC ile analizi için kullanılan mobil fazlar için akış diyagramı	29
Tablo 12. PCR işlemi için Gerekli Reaktifler, Konsantrasyonları ve Miktarları.....	32
Tablo 13. PCR Programı Değerleri.....	32
Tablo 14. Box-Behnken Tasarım İle Test Edilen Faktörlerin Düzeyleri (L-Teanin Biyosentezi)	37
Tablo 15. İzole Edilen Bakteri Sayılarının Lokasyonlara Göre Dağılımı.	40
Tablo 16. En Yüksek Aktivitede Enzim Üretimi Sağlayan İzolatlar ve Analiz Sonuçları	42
Tablo 17. L-Teanin analizi için hazırlanan standart çözeltiler ve konsantrasyon oranları.	45
Tablo 19. İzolatların Morfolojik, Fizyolojik ve Biyokimyasal Test Sonuçları	49
Tablo 20. İzolatların 16S rRNA Dizi Analiz Sonuçları.....	50
Tablo 21. L-Teanin Analizi İçin Hazırlanan Standart Çözeltiler ve Konsantrasyon Oranları	51
Tablo 22. Süre Optimizasyon Sonuçları.	53
Tablo 23. pH Optimizasyon Sonuçları.....	54
Tablo 24 . Sıcaklık ve çalkalama hızı (rpm/dak) optimizasyon sonuçları.....	54
Tablo 26. L-Teanin Üretiminin Optimizasyonu İçin Box-Behnken Tasarımı İle Deneysel L-teanin miktarları ve Biyotransformasyon Yüzdeleri	61

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Teaninin çeşitli alanlardaki uygulamaları	4
Şekil 2. L-Teaninin Kimyasal Yapısı	4
Şekil 3. L-teanin, L-glutamate ve L-glutamine'in kimyasal yapısı	5
Şekil 4. Çay yapraklarındaki L-teanin içeriğini etkileyen faktörler	6
Şekil 5. L-teaninin sağlık üzerine olumlu etkileri.	6
Şekil 6. L-teanin üretimi, kimyasal sentez, çaydan izolasyon ve mikrobiyal biyotransformasyon için farklı yaklaşımların özeti.	9
Şekil 7. L-teaninin bakteriyel enzimler tarafından biyoteknolojik üretimi. GS ve GMAS, L- glutamik asit ve etilaminden L-teanin üretimini katalize eder ve GGT ve L- glutaminaz L-glutamin ve etilaminden L-teanini biyosentezler.	11
Şekil 8. L-glutaminaz tarafından katalize edilen reaksiyonlar. L-Glutaminazlar esas olarak L-glutamin'in L-glutamik aside ve serbest amonyağa hidrolizini katalizler (1), bazı L-glutaminazlar L-glutamin γ -glutamil kısmının hidroksilamine transferleri katalize e	13
Şekil 9. Glutaminaz enziminin yapısı.....	14
Şekil 10. L-Glutaminaz birincil tarama yönteminde l- glutaminaz üreticisi olduğu belirlenen suşların petri görüntüleri	38
Şekil 11. L-glutaminaz pozitif ve negatif bakteri petri görüntüsü.	39
Şekil 12. Bakterilerin izole edildikleri toprak ortamları ve izolat sayıları	40
Şekil 13. L-glutaminaz aktivitesi için standart amonyum grafiği	41
Şekil 14. Kantitatif protein tayini için kullanılan standart grafik.....	41
Şekil 15. L-teaninin kalitatif tayini, A: L-glutamin, B: L-Glutamik Asit, C: L-teanin L-teanin (+) numuneler (Sırasıyla E11, E5, E28, E9, E11, E12, E33 ve E37).	44
Şekil 16. L-Teanin analizi için hazırlanan standart çözeltiler baz alınarak çizilen kalibrasyon eğrisi	45
Şekil 17. E-5 kodlu suş kaynaklı L-glutaminaz kullanılarak üretilen L-teaninin HPLC kromotogramı.	47
Şekil 18. E9 kodlu suş kaynaklı L-glutaminaz kullanılarak üretilen L-teaninin HPLC kromotogramı.	47
Şekil 19. E-11 kodlu suş kaynaklı L-glutaminaz kullanılarak üretilen L-teaninin HPLC kromotogramı.	48

Şekil 20. E-12 kodlu suş kaynaklı L-glutaminaz kullanılarak üretilen L-teaninin HPLC kromotogramı.....	48
Şekil 21. 16S rRNA PCR jel görüntüsü	49
Şekil 22. Erzurum Uzundere’den alınan toprak örneğinden izole edilen E9 suşunun 16S rRNA gen analiz sonuçları esas alınarak oluşturulan Neighbor-joining filogenetik ağacı.....	50
Şekil 23. L-Teanin analizi için hazırlanan standart çözeltiler baz alınarak çizilen kalibrasyon eğrisi	52
Şekil 24. E9 kodlu suş kaynaklı L-glutaminaz kullanılarak üretilen L-teaninin LC - MC kromotogramı.....	52
Şekil 25. L-glutaminaz üretimi süre optimizasyon sonuç grafiği.	53
Şekil 26. pH optimizasyon sonuç grafiği.	54
Şekil 27. Sıcaklık ve çalkalama hızı (rpm) optimizasyon sonuç grafiği.....	55
Şekil 28. L-glutaminaz üretiminde C kaynağının etkisi.....	56
Şekil 29. L-glutaminaz üretiminde N kaynağının etkisi.....	56
Şekil 30. L-glutaminaz üretimi için besiyerine eklenmesi gereken glukoz miktar optimizasyonu.....	56
Şekil 31. L-glutaminaz üretimi için besiyerine eklenmesi gereken amonyum sülfat miktar optimizasyonu.....	57
Şekil 32. RSM analizinden 3 boyutlu yüzey grafikleri	59
Şekil 33. RSM analizinden 3 boyutlu yüzey grafikleri	62

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

μL	: Mikrolitre
AA	: Akrilamid
BSA	: Bovin Serum Albumin
CaCl_2	: Kalsiyum Klorür
Dk	: Dakika
DNS	: Dinitrosalisilik Asit
EtOH	: Etil Alkol
EU	: Enzim Ünitesi
g	: Gram
HCl	: Hidroklorik Asit
GS	: Glutaminaz
L	: Litre
M	: Molar
Mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
NaOH	: Sodyum Hidroksit
Nm	: Nanometre
$^{\circ}\text{C}$	: Santigrat Derece
OD	: Optik Dansite
Rpm	: Revolutions Per Minutes (Dakikada Dönüş Sayısı)
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
Sn	: Saniye
Tris-HCl	: Trizma Tamponu
TSA	: Tryptone Soy Agar
TSB	: Tryptone Soy Broth
L-the	: L-Teanin
W	: Volt

GİRİŞ

Besinlerin ve yenilebilir birçok bitkinin hastalıkları önleme yeteneğine sahip olduğu düşüncesi ve hastalıkların tedavisinde kullanılmaları günümüzden birkaç binyıl öncesine kadar uzanır. Bu şekilde kullanılan tüm besinler ve bitkiler fonksiyonel gıda olma niteliği taşımaktadır. Fonksiyonel gıdalar, temel beslenme gereksinimlerini karşılayanın yanı sıra vücut üzerinde özel fizyolojik etkileri olan ve hastalıkları önlemede veya tedavi etmede etkili olan gıdalar olarak tanımlanmaktadır. Fonksiyonel gıda terimi ilk defa 1984 yılında Japonya’da 90 bilim insanının katılımıyla gerçekleştirilen “Gıda Fonksiyonlarının Geliştirilmesi ve Sistemik Analizi (Systematic Analysis and Development of Food Functions)” isimli araştırma programında tanımlanmıştır (Pilase 2010). Fonksiyonel gıdaların tanımı konusunda farklı görüşler olsa da genel kabul gören görüş, fonksiyonel gıdaların fiziksel veya psikolojik olarak sağlığa olumlu katkı sağladığı, hastalıkların başlamasını önlediği veya tedavi etme potansiyeline sahip bir ürün olarak tanımlanabileceği yönündedir. Bir gıdanın fonksiyonel olabilmesi için probiyotik mikroorganizmalar, prebiyotik maddeler ve biyoaktif bileşenler gibi etkenlere sahip olması ve bu etkenlerin vücudun ilgili bölgesine yeterince gönderilebilmesi gereklidir. Çay bitkisi, sağlığa yararlılığıyla ve içerdiği biyoaktif bileşenleri ile en önemli fonksiyonel gıdalardan biridir (Sarica ve Özbay 2023, Gülbandılar ve ark. 2017).

Theaceae familyasına ait çay bitkisi, özellikle *Camellia sinensis* türü, dünya çapında yaygın olarak tüketilen bir içeceğin kaynağıdır. Son zamanlarda yapılan *in vivo*, *in vitro*, hayvan ve insan çalışmaları ile çayın kardiyovasküler, serebrovasküler hastalıklar, şeker hastaları, bazı kanser türleri, obezite vb. gibi bulaşıcı olmayan kronik hastalıklarda önemli sağlık etkileri olduğu belirtilmiştir (Vuong *et al.* 2011). Çayın sağlık etkileri ile ilgili birincil biyoaktif bileşenler; kateşinler ve kafein olarak bilinse de, çaya özgü proteinik olmayan bir amino asit olan teanin amino asidinin sağlık etkileri son yıllarda öne çıkmaktadır.

Sistematik olarak N-etil- γ -L-glutamin olarak adlandırılan L-teanin, çay yapraklarında bulunan serbest amino asitlerin %50'sinden fazlasını oluşturan, protein yapısına katılmayan, suda çözünebilen bir amino asittir. Çayın karakteristik bir amino asidi olan L-teanin, çayın taze umami tadını büyük ölçüde etkiler, kafeinin acı tadını giderir ve sağlık açısından da çeşitli faydaları vardır (Chen *et al.* 2023). L-teanin; gevşemenin arttırılması, konsantrasyon ve öğrenme yeteneğinin geliştirilmesi gibi etkilerle ilişkilidir. Bununla beraber, belirli

kanserlerin ve kardiyovasküler hastalıkların önlenmesi, kilo verme sürecinin hızlandırılması ve bağışıklık sisteminin yükseltilmesi gibi sağlık yararlarıyla da bağlantılıdır (Vuong *et al.* 2011).

L-teaninin küresel pazar değeri son yıllarda 54 milyon ABD doları olarak belirtilmiş olup, gelecekte bu talebin artması beklenmektedir. L-teanin genellikle çay bitkilerinden veya yeşil ve siyah çay gibi farklı çay türlerinden doğrudan ekstraksiyon ve izolasyon yoluyla elde edilmektedir. Ancak, çay yapraklarının L-teanin içeriği kuru ağırlığının yalnızca %1-2'si kadardır ve ekstrakte edilen L-teanin aynı zamanda kafein ve kateşinler gibi ayrılması zor olan diğer bileşenleri de içermektedir (Türközü & Şanlier 2017). Ek olarak, mevsim, toprak tipi ve bileşimi gibi çevresel koşullar da bitkilerdeki L-teanin içeriğini etkileyerek endüstriyel uygulamalarda verimin düşük olmasına ve üretim maliyetlerinin yüksek olmasına neden olmaktadır (Sharma *et al.* 2018). Son yıllarda, L-teaninin kimyasal sentezi büyük ölçekli uygulamalar için en uygun yöntem olarak değerlendirilmiştir. Ancak, bu yöntemin enantioselektivitesi düşük olduğundan verimlilik sorunları bulunmaktadır. Bu nedenle, yenilenebilir kaynaklardan L-teaninin verimli üretimi için mikroorganizmalara dayalı metabolik veya enzimatik yöntemler araştırılmaktadır (Liu *et al.* 2021). Mikrobiyal L-teanin biyosentezi, yüksek özgüllük, bilinen genetik yapı, işleme ve manipülasyon kolaylığı, sistem ve stereoseçicilik, yüksek hücre büyüme hızı, düşük enerji tüketimi ve düşük üretim maliyeti gibi avantajları nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır. L-teanin biyosentezi için ana enzimler arasında γ - glutamyltranspeptidaz (GGT, EC 2.3.2.2) (Suzuki *et al.* 2002; Shuai *et al.* 2011) glutamin sentetaz (EC 6.3.1.2) (Yamamoto *et al.* 2006), teanin sentaz (EC 6.3.1.6) (Deng *et al.* 2008) ve glutaminaz (EC 3.5.1.2) (Tachiki *et al.* 1998; Okada *et al.* 2007), bulunur. Ancak endüstriyel üretimde yalnızca GGT ve glutaminaz kullanılmaktadır.

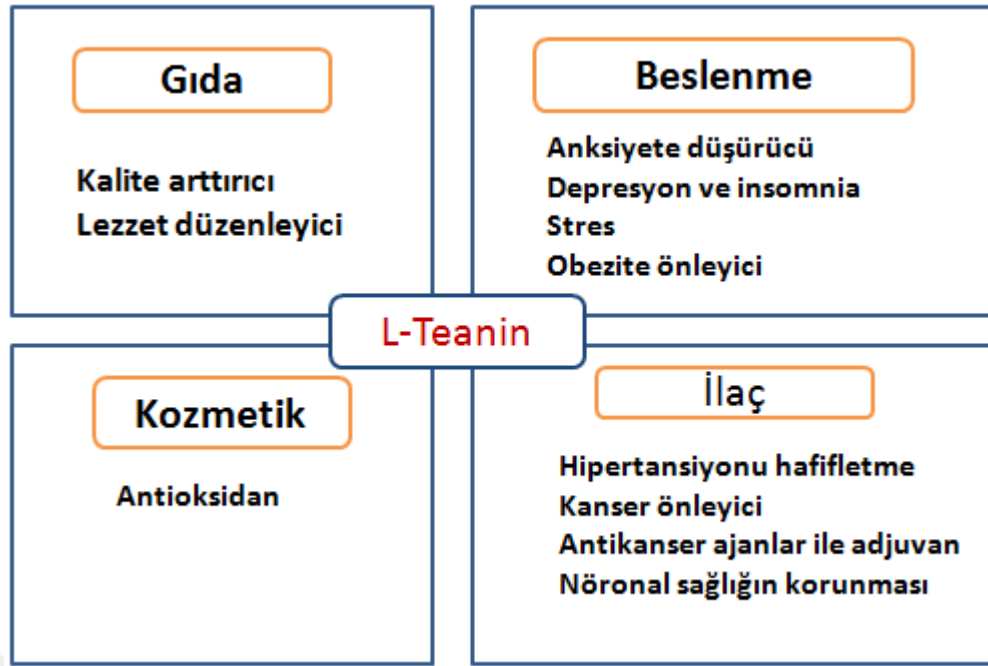
Çok çeşitli sağlık işlevlerine sahip olan L-teaninin, gıda ve ilaç endüstrilerinde çeşitli uygulamalarda ticari olarak kullanımı için enzimatik üretim prosesinin geliştirilmesi gerekmektedir. Geliştirilecek parametreler arasında L-teaninin biyotransformasyonunu gerçekleştirecek yeni ve/veya farklı bakterilerin bulunması; düşük maliyet ve yüksek verimle L-teanin üretimi bulunmaktadır. Bu amaç doğrultusunda, bu tez çalışmasında L-teaninin enzimatik sentezi için yüksek molar aktiviteye sahip ekstraselüler L-glutaminaz üretiminde kullanılmak üzere literatürde bildirilen bakteri türü dışında yeni bir bakteriyel tür veya suş araştırılması yapıldı ve daha önce çalışılmamış yeni bir suş olan *Pseudomonas iridis* E-9 kullanılarak L-glutaminaz enzimi üretildi. Daha sonra üretilen bu enzimin üretim koşulları optimize edildi ve en iyi koşullar belirlendi. Son olarak elde edilen L-glutaminaz enzim üst

sıvısı kullanılarak L-teaninin enzimatik sentezi gerçekleştirildi ve yüksek verimle L-teanin üretimi için optimizasyon çalışmaları yapıldı.

L-Theanine (L-Teanin)

Teanin → (γ - glutamiletilamid → veya → 5 - N - etil - glutamin, $C_7H_{14}N_2O_3$, MW = 174,2 g/mol), protein yapısına katılmayan ve çayın özel umami lezzetine katkıda bulunan bir amino asittir. L-teanin N5 pozisyonunda etillenmiş bir glutamin türevidir ve kimyasal olarak D - ve L- teanin olmak üzere iki kiral izomeri olan 2 - amino -4 -(etilkarbamoyl) bütirik asit olarak adlandırılır (Mindt *et al.* 2020). Doğadaki diğer amino asitlere benzer şekilde, teanin ağırlıklı olarak L-(S) enantiyomerik formunda ortaya çıkar (Sharma *et al.* 2018).

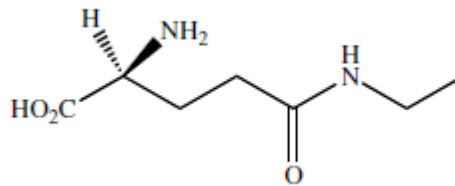
L- teanin, γ - etilamin ve L - glutamikasitten sentezlenen suda çözünür bir bileşiktir (Yu & Yang 2020). L- glutamine benzer bir yapıya sahip olan L- teanin, hücre zarlarının yüzeyindeki L- glutamin reseptörleri için L- glutamin ile rekabet edebilir. L-teaninin son yıllarda keşfedilen sağlık yararları arasında rahatlama, nöroprotektif etki, kan basıncının düzenlenmesi ve antitümör etki yer almaktadır (Liu *et al.* 2021). Ayrıca, L- teaninin çok sayıda güvenlik çalışmasına ve klinik denemelere dayanarak Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından Genel Olarak Güvenli Olarak Tanınmış (GRAS) olarak sertifikalandırılmıştır. Sağlık yararları ve güvenliği nedeniyle, L- teanin gıda, kozmetik, nutrasötik ve ilaç endüstrileri de dahil olmak üzere çeşitli endüstrilerde kullanılmıştır ve yaşam kalitesinin iyileştirilmesine büyük ölçüde katkıda bulunduğu bildirilmiştir (Alagawany *et al.* 2020; Türkozü ve Şanlıer 2017). L- teaninin ayrıca gıda kalitesini iyileştirdiği, gıda dokusunu veya yapısını değiştirdiği, gıda raf ömrünü uzattığı ve insanlarda mevcut gıda besin maddelerinin yeteneklerinin ötesinde avantajlı fizyolojik sonuçlar sağladığı, L- teanini yararlı bir gıda katkı maddesi, lezzet değiştirici ve fonksiyonel gıda bileşeni haline getirdiği gösterilmiştir (Şekil 1) (Alagawany *et al.* 2020; Kallscheuer *et al.* 2019). Ek olarak, L- teanin mükemmel işleme özelliklerine ve stabiliteye sahiptir ve gıda ürünlerinde (örneğin, meyve suları, kekler, ekmekler, şekerler, jöleler, spor içecekleri, çikolata çubukları, bitkisel olmayan çaylar, özel şişelenmiş su ve sakız) ve gıda dışı ürünlerde (örneğin, kozmetikler) yaygın olarak kullanılabilir (Alagawany *et al.* 2020; Williams *et al.* 2016). L- teanin ayrıca reçetesiz satılan bir besin takviyesi olarak da satılmaktadır (Sharma *et al.* 2018).



Şekil 1. Teaninin çeşitli alanlardaki uygulamaları (Liu *et al.* 2021).

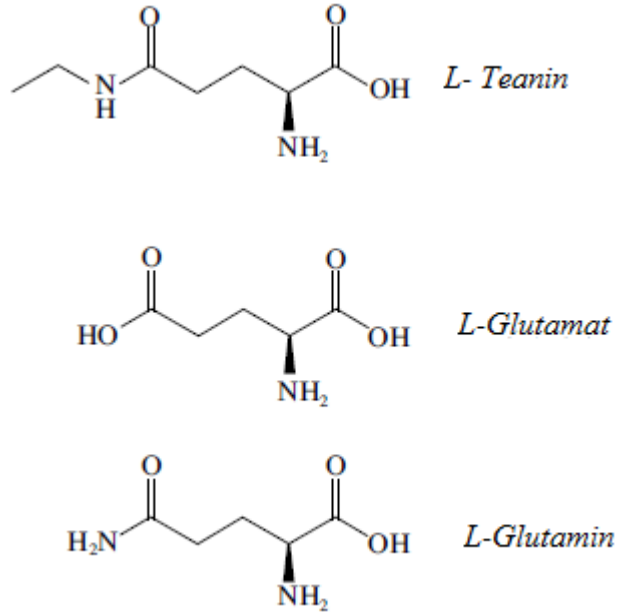
Teaninin Kimyasal Yapısı ve Fizikokimyasal Özellikleri

Teanin (γ -glutametiletülamid veya 5-N-etilglutamin), Uluslararası Saf ve Uygulamalı Kimya Birliği (IUPAC) tarafından 2-amino-4-(etükarbamüil)bütirik asit olarak adlandırılmıştır. Molekül formülü ve molekül ağırlığı sırasıyla $C_7H_{14}N_2O_3$ ve 174,2 g/mol'dür (Şekil 2). Diğer doğal olarak üluşan α -amino asitler gibi teaninin de asimetrik bir karbonu vardır, dolayısıyla teorik olarak iki kiral izomer vardır, D-teanin ve L-teanin. Teanin, bitkilerde L-glutamik asitten biyosentezlenir ve bu nedenle doğada L-enantiyomer formunda bulunur (W. Mu *et al.* 2015).



Şekil 2. L-Teaninin Kimyasal Yapısı (Vuöng *et al.* 2011).

L-theaninin kimyasal yapısı, nörotransmitter glutamat ve gama-aminobütirik asitin (GABA) kine benzer. L-teanin, glutamatın karboksil ucunun bir etil grubu ve ardından başka bir amino grubu ile değıştirilmesiyle üluşturulur (Altınkaynak 2018) (Şekil 3).

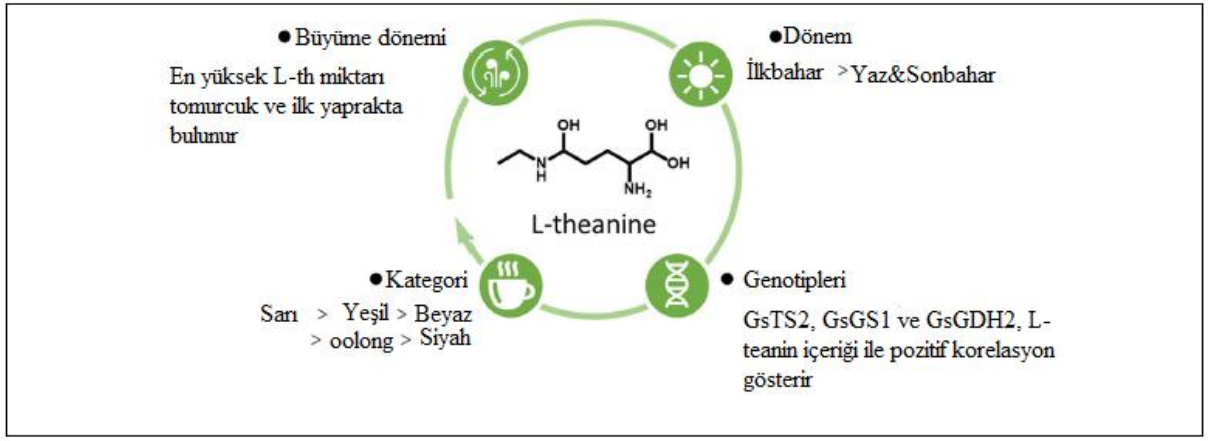


Şekil 3. L-teanin, L-glutamate ve L-glutamine'in kimyasal yapısı (Wang *et al.* 2022)

Teaninin Bulunduğu Kaynaklar

Teanin (γ -glutamil etilamid) ilk olarak 1949 yılında Japonya'da Sakado tarafından iki tip çay bitkisinde keşfedilmiş ve bir glutamik asit türevi tanımlanmıştır. 1964 yılında Japonya'da bir gıda maddesi olarak onaylanmıştır. Teanin, *Xerocomus badius* mantarında ve *Camellia*, *Camellia japonica* ve *Camellia sasanqua* gibi bazı çay türlerinde bulunabilir.

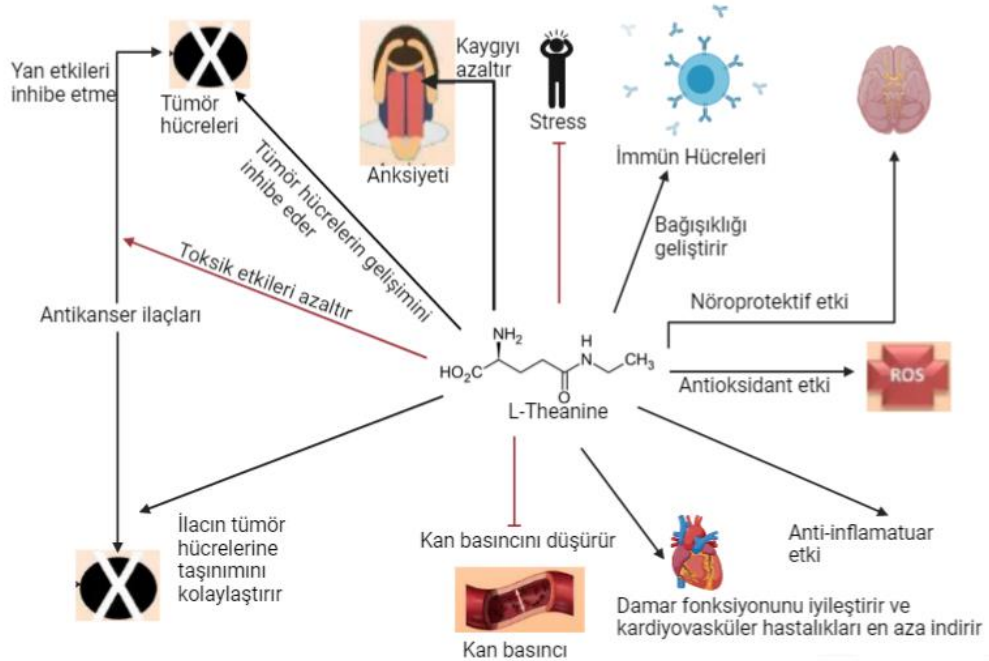
Çay yapraklarındaki teanin köklerde sentezlenmekte, çay yapraklarında yoğunlaşmakta ve burada güneş ışığı teanini polifenollere dönüştürmektedir (Şekil 4) (Thippeswamy *et al.* 2006). Etilamin birçok bitkinin köklerinde bulunur ve alaninin enzimatik dekarboksilasyonu ile üretilir (Deng *et al.*, 2008). Teanin biyosentezi, çay bitkisinin köklerinde, L-glutamik asit etilamin ligaz veya L-glutamat etilamin ligaz olarak da bilinen teanin sentetaz enzimi tarafından meydana gelir. Ortaya çıkan teanin daha sonra büyüyen sürgünlerin uçlarına yerleşir ve karbon çerçeve bileşenleri için çözünmüş nitrojenin ana kaynağı olarak görev yapar (Sarı 2010).



Şekil 4. Çay yapraklarındaki L-teanin içeriğini etkileyen faktörler (Li *et al.* 2022).

L-Teaninin Sağlık Üzerine Olumlu Etkileri

Psikolojik stres; depresyonun, ruh hali değişimlerinin, bağışıklık ve yaşa bağlı bozuklukların, kardiyovasküler hastalıkların ve farklı kanser türlerinin ana nedenidir (Rogers P.J. *et al.* 2008). İn vivo ve in vitro birçok çalışma yapılarak teanin'in etkileri incelenmiştir. L-teanin; uyku kalitesini artırma, rahatlamayı teşvik etme, öğrenme yeteneğini geliştirme, kan basıncını düşürme, depresyonu hafifletme yeteneği, antitümör ve nöroprotektif etki gibi olumlu fizyolojik ve farmakolojik aktiviteleri nedeniyle birçok gıda ürünüde (alkolsüz içecekler, çikolatalar ve tatlılar, vb.) fonksiyonel bir bileşen olarak kullanılmaktadır (Şekil 5).



Şekil 5. L-teaninin sağlık üzerine olumlu etkileri (Saeed *et al.* 2017).

○ ***L-Teaninin Antioksidan Aktivitesi***

L-teaninin in vitro ve in vivo olarak iyi antioksidan aktiviteler sergilediği birçok güncel çalışmada bildirilmiştir. Bu çalışmalardan birinde kadmiyum oksit ile uyarılmış bir nöronal benzeri sıçan feokromositoma hücre modelinde, L- teaninin, reaktif oksijen türlerinin (ROS) sentezini azalttığı ve antioksidan enzimlerin aktivitesini artırarak oksidatif hasarı zayıflatabildiği görülmüştür. L- teaninin antioksidan etkiler gösterdiği, katalaz (CAT) enzim aktivitesini ve mRNA ekspresyonunu artırdığı, süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz 1 (Gpx1) seviyelerini yükselttiği bildirilmiştir. Haloperidol (HAL) ile indüklenen orofasiyal diskinezi (OD) sıçan modellerinde, L- teaninin güçlü antioksidan özellikleri nedeniyle koruyucu etkileri olabileceği bulunmuştur. Başka bir çalışmada, L-teanin tedavisinin HAL ile indüklenen OD sıçan modellerinde lipid peroksit ve nitrik oksit (NO) seviyelerini azalttığı ve striatumun antioksidan kapasitesini artırdığı gözlemlenmiştir. Hayvan çalışmalarının mevcut kanıtları ile birleştirildiğinde, teaninin insan tardif diskinezi (TD) hastalığını klinik olarak antioksidan aktivitesi ve NO aktivitesini düzenleyerek tedavi edebileceği öne sürülmektedir (Li *et al.* 2022).

○ ***L-Teaninin Soğuk Algınlığı ve Gribin Önlenmesi Üzerine Etkisi***

L - teanin, soğuk algınlığına ve gribe karşı koruma sağladığı çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir. Randomize, çift kör, plasebo kontrollü olarak yapılan çalışmalar, sistin ve L - teanin takviyesi olan deneklerde soğuk algınlığı insidansının plasebo grubundakinden önemli ölçüde daha düşük olduğunu göstermiştir. Sağlık çalışanları üzerine yapılan bir çalışmada 5 ay boyunca L - teanin veya kateşin takviyesi verilen deneklerde L-teaninin influenzaya karşı önemli ölçüde koruduğu bildirilmiştir (Matsumoto *et al.* 2011). Başka bir çalışmada influenza aşısı vurulan yetişkin bireylerde aşılama öncesi L - teanin ve L - sistin takviyesi alanların almayanlara oranla influenza aşısına karşı bağışıklık tepkisinin arttığı, aşılama etkisini iyileştirdiği ve serumdaki düşük hemoglobin seviyelerine sahip yaşlıların bağışıklık koruma yeteneğini artırdığı bildirilmiştir (Miyagawa *et al.* 2008).

○ ***L-Teaninin Kardiyovasküler Korunma Üzerine Etkisi***

L-teanin'in kardiyovasküler sistem üzerinde olumlu bir etkisi vardır. L-teanin ve L-teanin'in, anjiyotensin II tarafından indüklenen kültürlenmiş vasküler düz kas hücrelerinin (VSMC) çoğalmasını ve göçünü önemli ölçüde engelleyebildiği rapor edilmiştir. L-teanin, sıçan karotis balon yaralanma modellerinde neointimal oluşumunu önemli ölçüde inhibe edebilir ve VSMC'nin kasılma tipinden sentetik tipe dönüşümünü önleyebilir. Diğer çalışmalar, L-teaninin, esas olarak mitojenle aktiveleştirilen protein kinaz 1 (MAPK-1)

fosforilasyonunu inhibe ederek neointimal hiperplazi ve ilişkili vasküler yeniden yapılanma üzerinde potansiyel etkilere sahip olduğunu ortaya çıkardı (Li *et al.* 2022)

○ ***L-Teaninin lipit düşürücü etkisi***

Çeşitli deneysel çalışmalar L-teanin lipit düşürücü özelliklere sahip olabileceğini göstermiştir. Zhang *et al.* (2002) sıçanlarda karaciğer tümörü kaynaklı hiperlipidemi üzerine teaninin etkisini araştırmış ve tüm lipit indekslerinde anlamlı bir azalma bulmuştur. İn vitro bilimsel çalışmalar, L-teaninin düşük yoğunluklu lipoproteinlerin peroksidasyonunu önleyebildiğini, dolayısıyla ateroskleroz olasılığını azalttığını göstermektedir. Bu nedenle teanin, genel bir lipit düşürücü etkiye katkıda bulunan küçük bir bileşen olduğu bildirilmiştir (Saeed *et al.* 2020).

○ ***L-Teaninin Hipotansiyona olan Etkisi***

Yetişkinlerde L-teanin, anti-stres etkileri olan kan basıncını düşürücü bir madde olarak görev yapabilir ve kortikal nöronal uyarılmanın engellenmesini, kaygının azaltılmasını ve yüksek basınç durumlarda kan basıncı artışlarının kontrol edilmesini etkiler. Teanin, spontan hipertansif sıçan üzerinde hipotansif etki göstermiştir. L-teanin, periferik sinir ve vasküler sistemlerin düzenlenmesi yoluyla 5-hidroksitriptamin (5-HT) seviyelerini artırarak antihipertansif etki gösterdiği ve bununla beraber teanin hayvan beyinde birikerek ve beyin 5-HT ve metaboliti 5-hidroksi indol asetik asit (5HIAA) seviyelerini azalttığı bildirilmiştir (Adhikary and Mandal 2017).

○ ***L-Teaninin Nöroprotektif etkisi***

L-teaninin nöro yaralanma üzerinde nöroprotektif etkileri olduğu bildirilmiştir. L-teanin, glutamat ile benzerliği nedeniyle uyarıcı bir nörotransmitter olan glutamata antagonist olarak etkileyerek nörokoruyucu etkiler gösterebileceği öngörülmüştür. Hayvanlarda, L-teaninin hipokampusdaki post-iskemik sinir ölümünü azalttığı, serebral enfarkt boyutunu küçülttüğü ve glutamatın kısa süreli maruziyetine bağlı sinir ölümünü inhibe ettiği bulunmuştur. Bu hayvan çalışmalarından elde edilen bulgular, L-teaninin inme gibi beyin yaralanmalarına karşı nörokoruyucu etkileri olabileceğini önermektedir. Ancak L-teaninin insanlarda nörokoruyucu etkilerini inceleyen çalışma bulunmamaktadır.

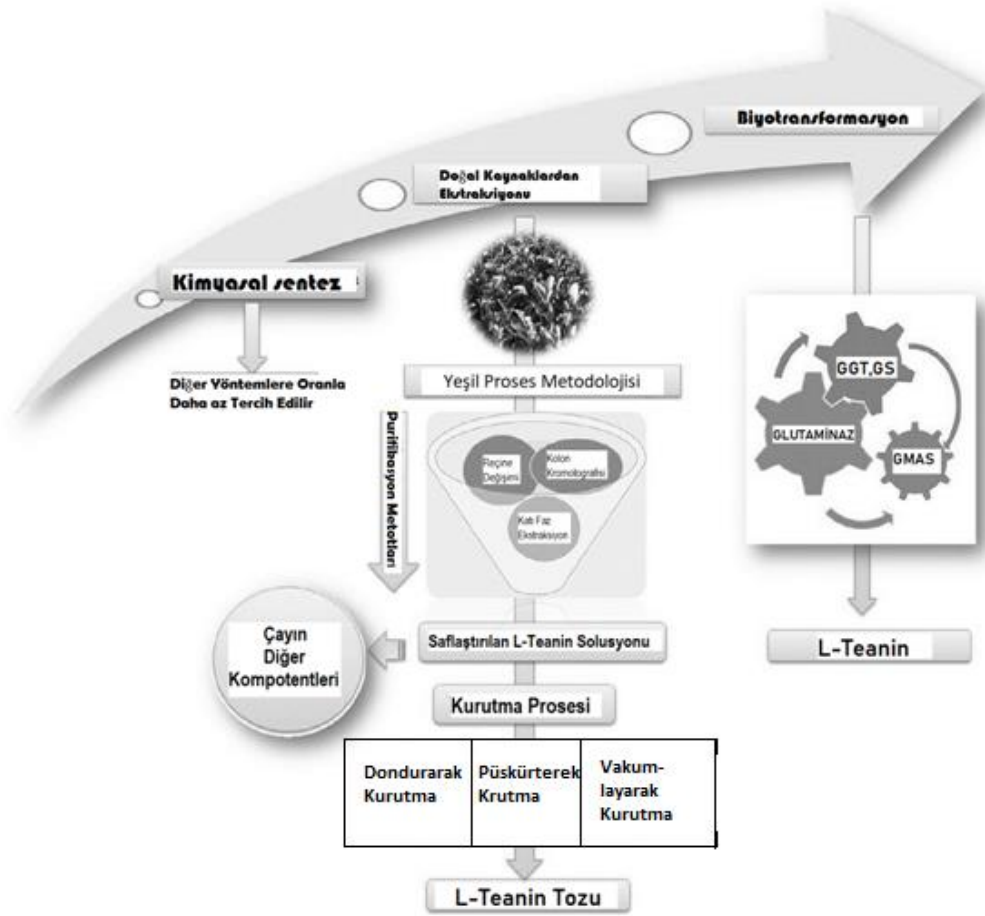
○ ***L-teaninin anti-kanser etkisi***

L-teaninin sağlık üzerine etkisinin araştırılması amacıyla yapılan güncel çalışmalar, hücre ve hayvan modellerinde L-teaninin anti-kanser aktivitesini ortaya koymuştur. Bu çalışmalardan birinde L-teanin ve etil 6-bromokumarin-3-karboksilil L-teanin (TBrC) gibi

türevleri, in vitro ve in vivo çalışmalarla doğrulanan yüksek metastatik insan servikal kanser hücrelerinin büyümesini ve göçünü önemli ölçüde inhibe edebildiği bildirilmiştir (Liu *et al.* 2016). Bu bileşikler ayrıca, servikal kanser hücrelerinde epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), Met, Akt ve NF- κ B'nin ekspresyonunu ve fosforilasyonunu azaltarak, HGF ve EGF tarafından aktive edilen EGFR/Met-Akt/NF- κ B sinyal yolunu tamamen inhibe edebilmektedir. Ayrıca, L-teanin ve TBrC'nin tümör taşıyan farelerde rahim ağzı kanserinin büyümesini önlediği ancak zararlı etkiler göstermediği gözlemlenmiştir. Yeni yapılan bir çalışma ise L-teaninin metastatik kanser için terapötik potansiyele sahip olabileceğini önermektedir (Fan *et al.* 2021).

Teaninin Üretim Yöntemleri

Geçmiş yıllarda araştırmacılar L-teaninin ekstraksiyonu ve üretimi için farklı yaklaşımlar (Şekil 6.) denemiş ancak, yöntemlerin çoğu sadece laboratuvar ölçeğinde umut verici olmuştur (Sharma E. *et al.*, 2018).



Şekil 6. L-teanin üretimi, kimyasal sentez, çaydan izolasyon ve mikrobiyal biyotransformasyon için farklı yaklaşımların özeti (Sharma *et al.* 2018).

L-Teaninin Çaydan Ekstraksiyonu

L-Teanin, çay yapraklarının kuru ağırlığının yaklaşık olarak 7-21 mg / g'ını oluşturur ve çay yapraklarından ekstraksiyonu zor bir iştir. L-teaninin sıcak suda (70 – 100 °C) yeşil çay ihtiva eden sıcak sudan L- Teaninin ekstraksiyonu biyolojik ekstraksiyon prosesi olarak kabul edilir ancak bu işlem sonrasında ekstraksiyon içerisinde L- Teanin ile birlikte ekstraksiyondan ayrılması zor olan çay, kafein ve fenoliklerin suda çözünür diğer bileşenlerini içermektedir. L-Teanin ihtiva eden reçine, nano ve ultra filtreleme yöntemleri kullanılarak % 88'e varan verimle elde edilebilmektedir. Bu proses yorucu, zaman alıcı ve ticari üretim için ekonomik değildir (Ekamayake&Li, 2007). Ekstraksiyon işlemindeki bu olumsuzlukları ortadan kaldırmak için birçok yeni teknikler (HPLC gibi) araştırılmış ve denenmiştir. Araştırmacılar, her ne kadar bu yeni teknikleri kullanarak doğal ekstraksiyon yöntemlerinin dezavantajlarını (çok fazla saflaştırma adımları, düşük verim ve düşük saflık v.b) iyileştirip yüksek verim elde etme yolunda çalışmalar yaptılar da yüksek maliyet ve ekstraksiyon çözücülerinin insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkisi gibi dezavantajlar bu teknikleri ticari üretim için kabul edilemez hale getirmiştir.

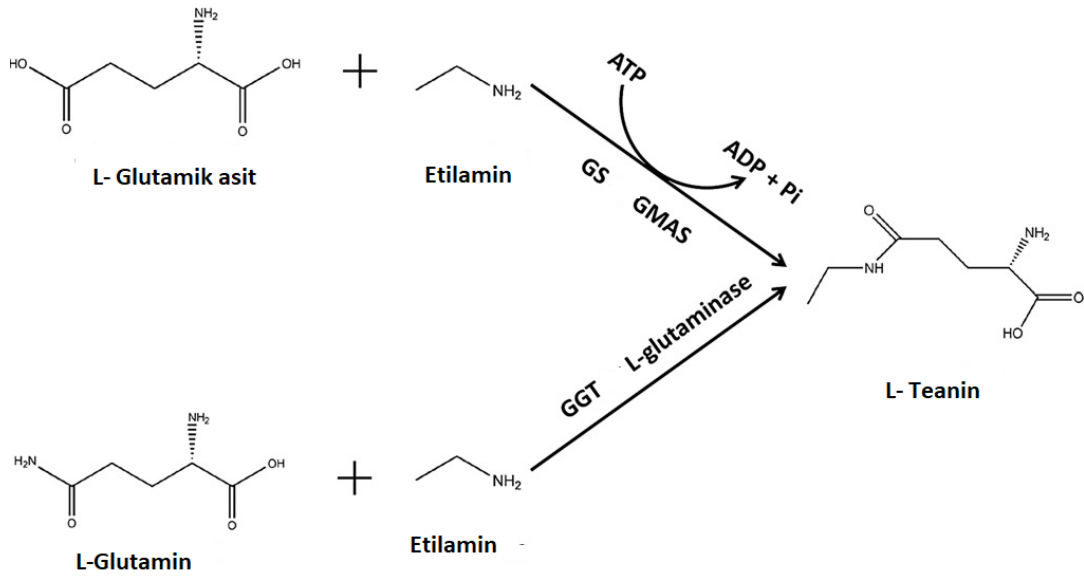
L- Teaninin Kimyasal Sentezi

Kimyasal sentez yöntemi L-Teaninin büyük ölçekli üretimi için basit ve uygun maliyetli bir yaklaşım sağlar. Fakat, bu yöntemin en büyük dezavantajı, Teaninin L- ve D-formlarının birlikte üretilmesidir ve bu formların saflaştırılması çok zordur. Ayrıca, üretim sırasında sağlığa zararlı olduğu rapor edilen kimyasalların kullanılması ve tüketicilerin doğal olana yönelimi kimyasal üretim yönteminin tercih edilmeme sebepleridir.

L-Teaninin Biyoteknolojik Yöntemlerle Sentezi

Mikrobiyal biyotransformasyonun; stereo seçicilik, yüksek özgüllük, kısa reaksiyon süresi, daha yüksek verim ve diğer üretim tekniklerine göre geri dönüştürülebilirlik gibi birçok avantajı vardır. Son zamanlarda araştırmacılar, süreci daha uygun maliyetli hale getirebilecek enzimler ve immobilize enzimler kullanarak üretimi artırmaya odaklanmaktadır.

Theanin üretimi için biyokatalizör potansiyeline sahip bulunan enzimler sırasıyla; GS (L-glutamil sentetaz), GMAS (γ -glutamilmetilamid sentetaz), GGT (γ -Glutamyl transpeptidase) ve glutaminaz enzimleridir.



Şekil 7. L-teaninin bakteriyel enzimler tarafından biyoteknolojik üretimi. GS ve GMAS, L-glutamik asit ve etilaminden L-teanin üretimini katalize eder ve GGT ve L-glutaminaz L-glutamin ve etilaminden L-teanini biyosentezler (W Mu *et al.* 2015).

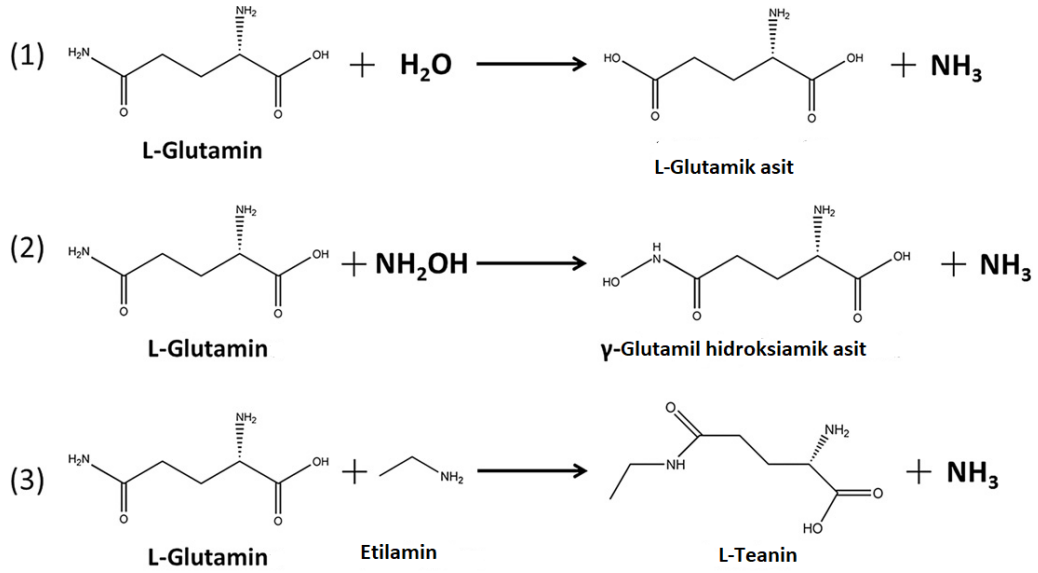
L-Teaninin GS Enzimiyle Üretimi: GS (L-glutamin sentetaz; L-glutamat: amonyak ligazı (ADPforming), EC 6.3.1.2) esas olarak adenosin trifosfat (ATP) kullanarak, L-glutamat'ı L-glutamine ve serbest amonyuma hidrolizinden sorumludur. GS, evrensel olarak yaşamın üç alanına dağılmıştır ve azot metabolizmasından ve L-glutamin sentezinden ve dolayısıyla amino asitlerin, şekerlerin ve glukozamin-6-fosfatın üretilmesinden sorumludur (McCarty, 1995). Memelilerde GS, nörotransmitter L-glutamatın metabolik düzenlenmesinde önemli bir rol oynar (Suarez *et al.* 2002). Bakteriyel GS; L-glutamat, amonyum klorür ve ATP'den, L -glutaminin üretimi için biyokatalizör olarak kullanılabilir (Tachiki *et al.* 1983; Wakisaka *et al.* 1998). Tachiki *et al.* (1986) önce *Micrococcus glutamicus* ATCC 13032'den alınan GS'nin, substrat olarak amonyanın etilamin ve metilamin ile muamele edildiğinde sırasıyla L-teanin ve γ -glutamilmetilamit (γ -GMA) üretebileceğini bildirmiştir. Daha sonra, *Pseudomonas taetrolens* Y-30'dan (Yamamoto *et al.* 2004) saflaştırılan GS'nin L-teanin üretme kabiliyetine sahip olduğu görülmüştür. Ancak bakteriyel GS tarafından katalize edilen ligasyon reaksiyonu, sürekli bir ATP beslemesi gerektirir. GS'nin endüstriyel uygulamaları için ATP'nin sürekli yenilenmesi gereklidir. Bu da bu enzimin L-Teanin biyotransformasyonunun kullanımını zorlaştırmaktadır.

L-Teaninin GMAS Enzimiyle Üretimi: L-glutamat ve metilaminden ATP'nin eş zamanlı hidrolizi ile katalize eden GMAS (γ -glutamilmetilamid sentetaz; L-glutamat: metilamin ligaz (ADP oluşturan), EC 6.3.4.12), L-glutamat'ı GS'den daha yüksek verimle L-glutamine ve serbest amonyuma hidrolize eder. Metilamin bazı bakteriyel büyüme için tek karbon ve azot kaynağı olarak kullanıldığında, bakteriyel GMAS, metilamin

metabolizmasında bir ara madde olarak γ -GMA'nın biyosentezinde önemli bir rol oynar (Kimura *et al.* 1990; Kung veWagner, 1969). Etilamine yönelik yüksek aktivitesi nedeniyle, GMAS'lar L-teanin biyosentezi için çalışıldı. Ancak tıpkı GS enziminde olduğu gibi GMAS enziminde de L-teanin sentezi için ATP beslemesi gerekir.

L-Teaninin GGT Enzimiyle Üretimi: GGT (γ -Glutamyl transpeptidase), bakterilerden memelilere kadar çeşitli organizmalarda yaygın olarak bulunur. GGT; memeli dokularında, glutatyon metabolizmasında ve γ -glutamil döngüsünde önemli bir rol oynar (Meister, 1973; Tate ve Meister, 1981). Bakteriyel GGT'nin transpeptidasyon aktivitesi, γ -glutamil donörlerine göre değişir ve teorik olarak, GGT tarafından L-teanin biyosentezi, çeşitli γ -glutamil donörleri kullanılarak denenebilir. L-teanin biyosentezi için; GS ve GMAS ile karşılaştırıldığında, GGT enziminin ATP gereksinimi olmaması, kolay reaksiyon koşulları ve uygun çalışma prosedürü gibi bariz avantajlara sahiptir (Wang *et al.* 2012). GGT tarafından L-teanin üretiminin dezavantajları, substrat L-glutaminden glutamil-glutamin (γ -Glu-Gln) otomatik transpeptidasyonu oluşumunun inhibe edilmesidir ve bunun yanı sıra L-teanin oluşumu için yüksek konsantrasyonda etilamin gerektirmesi ve reaksiyonun pH'sını optimize etmenin zor olması şeklinde sıralanabilir (Suzuki *et al.*, 2002a, 2002b).

L-Teaninin Glutaminaz Enzimi ile Üretimi: L-Glutaminaz (L-glutamin amidohidrolaz, EC 3.5.1.2) enzimi, L-glutamin amino asitinin γ -amido bağının L-glutamik asit ve serbest amonyak hidrolizini katalizleyen bir amidohidrolaz enzimidir (Mu, 2015). L-Glutaminase son zamanlarda hem ilaç hem de gıda endüstrilerindeki potansiyel uygulaması nedeniyle çok dikkat çeken bir enzim olmuştur. Mikrobiyal L- glutaminaz antitümör aktivitesi sergiler ve akut lenfositik lösemi tedavisi için potansiyel bir antileukemik ajan olarak kullanılabilir. L-glutaminaz, gıda endüstrisinde yüksek oranda L-glutamik asit üretme kabiliyeti nedeniyle, en önemli lezzet arttırıcı enzimlerden biri olarak kabul edilir. Birkaç L-glutaminazlar, Lglutamin'in hidrolitik deaminizasyonunu katalize etmenin yanı sıra, *E. Coli* ve *Pseudomonas aeruginos* kaynaklı L-glutaminaz ve *Pseudomonas nitroreducens* kaynaklı birkaç L-glutaminaz, L-glutaminin γ -glutamil kısmının hidroksilamine transferleri de katalize edebilmektedir. *P. nitroreducens* kaynaklı L-glutaminaz ayrıca alıcı molekül olarak metilamin ve etilamin ile transfer reaksiyonunu katalize ederek sırasıyla γ -glutamil metilamin ve L-teanin oluşturur (Şekil 8).



Şekil 8. L-glutaminaz tarafından katalize edilen reaksiyonlar. L-Glutaminazlar esas olarak L-glutamin'in L-glutamik aside ve serbest amonyağa hidrolizini katalizler (1), bazı L-glutaminazlar L-glutamin γ -glutamil kısmının hidroksilamine transferleri katalize eder (W Mu *et al.* 2015).

Tablo 1. L-teanin Biyosentezinde Kullanılan L-Glutaminaz Enziminin Mikrobiyal Kaynakları, Üretim Koşulları, Biyotransformasyon Yüzdeleri.

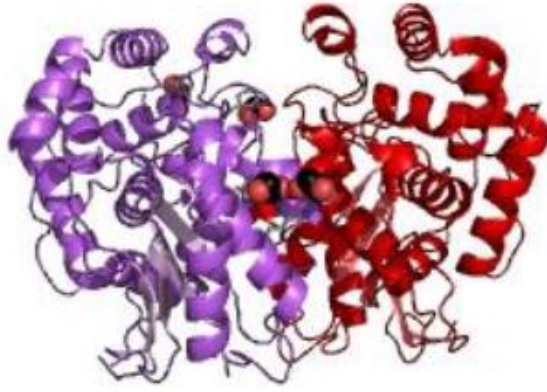
L-Glutaminaz Kaynağı	L-glutamin Kons. (M)	Etilamin Kons. (M)	Enzim Miktarı (U/mL)	Biyotransform. Oranı (%)	Referans
<i>P. nitroreducens</i> IFO 12694	0.7	1.5	0.5	39	Tachiki et al. 1998
<i>P. nitroreducens</i> SK16.004	0.3	1	1	42.9	Yang C., 2013
<i>P. nitroreducens</i> DSM 14399	0.3	1.5	0.3	40	Pu et al., 2013
<i>P. nitroreducens</i> SP.001	0.75	2.5	1.01	66.1	Shuai et al., 2019
<i>T. koningii</i> PTCC 5139	0.3	0.9	Belirtilmemiş	14.1	Sakhaei et al., 2017
Recombinant <i>B. licheniformis</i>	0.05	Tris-HCl-0.1	Belirtilmemiş	Belirtilmemiş	Sinsuwan et al., 2012
<i>P. citronellolis</i> GEA	Belirtilmemiş	Belirtilmemiş	Belirtilmemiş	Belirtilmemiş	EP1544306A1 (Patent)
<i>Bacillus</i> , küf ve mantar türleri	Belirtilmemiş	Belirtilmemiş	Belirtilmemiş	Belirtilmemiş	US8211674B2 (Patent)

Glutaminaz Enzimi

L-Glutaminaz (L-glutamin amidohidrolaz E.C 3.5.1.2), çeşitli azotlu metabolitlerin biyosentezinde ve organizmalarda glutamin/glutamat dengesinin korunmasında temel rol oynar ve aynı zamanda L-glutaminin L-glutamik asit ve amonyağa deamidasyonunu katalize eden enzimdir. L-glutaminazlar, terapötikten gıda endüstrisine kadar farklı sektörlerde potansiyel uygulamaları bulunan önemli bir endüstriyel enzimdir. Bakterilerde,

aktinomisetlerde, mayalarda ve mantarlarda yaygın olarak bulunur. Mikrobiyal L-glutaminazlar, antitümör aktivitesi sergilerler ve akut lenfositik lösemi tedavisi için potansiyel bir antilökemik ajan olarak kullanılabilir. Ayrıca L-glutaminazlar, memeli ve hibridom hücre kültüründe glutamin seviyesini izlemek için bir biyosensör olarak da yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. L-glutaminaz, gıda endüstrisinde yüksek oranda L-glutamik asit üretme kabiliyetinden dolayı en önemli lezzet artırıcı enzimlerden biri olarak kabul edilir.

L-glutaminazlar, L-glutaminin hidrolitik deaminizasyonunu katalize etmenin yanı sıra, *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginos* kaynaklı L-glutaminaz ve *Pseudomonas nitroreducens* kaynaklı birkaç L-glutaminaz, L-glutaminin γ -glutamil kısmının hidroksilamine transferlerini de katalize edebilmektedir. *P. nitroreducens* kaynaklı L-glutaminaz ayrıca alıcı molekül olarak metilamin ve etilamin ile transfer reaksiyonunu katalize ederek sırasıyla γ -glutamil metilamin ve L-teanin oluşturabilmektedir.



Şekil 9. Glutaminaz enziminin yapısı (Bülbül 2012).

KURAMSAL TEMELLER

L-teanin; uyku kalitesini artırma, rahatlama, öğrenme yeteneğini geliştirme, kan basıncını düşürme, depresyonu hafifletme yeteneği, antitümör ve nöroprotektif etki gibi olumlu fizyolojik ve farmakolojik aktiviteleri nedeniyle birçok gıda ürününde (alkolsüz içecekler, çikolatalar ve tatlılar, vb.) fonksiyonel bir bileşen olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle, L-teaninin büyük ölçekli üretimi, gıda takviyesi olarak pazarının karşılanması açısından önemlidir. Literatürde yüksek verimli L-teanin üretimi için farklı sentez yöntemlerinin araştırıldığı çalışmalar mevcuttur. Yapılan çalışmalarda L-teanin farklı ekstraksiyon yöntemleri denenerek bitkiden ekstrakte edilmiş ve üretim verimi arttırılarak büyük ölçekli üretim gereksinimi karşılanmaya çalışılmıştır. Ancak denenmiş olan birçok ekstraksiyon yönteminde yüksek maliyet, karmaşık üretim aşamaları ve düşük verim sorunlarının önüne geçilememiştir. Literatürde L-teaninin şu andaki endüstriyel üretiminin ana yollarından biri kimyasal sentez yöntemi olarak görülmektedir. Ancak kimyasal olarak sentezlenen L-teaninin saflığının düşük olması ve kimyasal üretimin gıda endüstrisinde kullanımının sınırlı olması bu yöntemin kullanılmasındaki en büyük engeldir. Bu bağlamda, biyokataliz, son yıllarda L-teanin üretimi için daha avantajlı bir yaklaşım haline gelmiştir. Bu nedenle yapılan bu tez çalışmasında biyokataliz yöntemi kullanılarak yüksek verimli L-teanin sentezi sağlanmıştır. Bu tez çalışmasında odaklanılan nokta yüksek konsantrasyonda L-teanin biyotransformasyonunu gerçekleştirebilen glutaminaz üreticisi yeni ve farklı bakteriyel türlerin araştırılması olduğundan, bakteri izolasyon spektrumu geniş tutulmuştur.

Günümüze kadar farklı kaynaklardan farklı yöntemler ve farklı enzimlerle L-teanin sentezlendiği ve farklı sağlık ve gıda uygulamalarında kullanıldığı birçok çalışma yapılmıştır. Bu tez çalışması kapsamında faydalanılan ulusal ve uluslararası literatürden yapılan ve tez konusuyla yakından ilgili olan araştırmalar tarih sırası göz önüne alınarak aşağıda özetlenmiştir.

Hanaa orabi *et al.* (2019), yaptıkları çalışmada bakteri kaynaklarından elde edilen L-glutaminaz enziminin kanserin tedavi edilmesinde, gıda endüstrisinde ve yüksek değere sahip kimyasallarda ekonomik ve etkili kullanıma sahip ajanlar olduğunu kanıtlamışlardır. Bu çalışmada yeni izole edilen bakteri suşu olan ve 16S rRNA genini kullanan *Bacillus subtilis* OHEM11 (MK389501)'in hücre dışı L-glutaminaz enzimini ürettiğini belirlemişlerdir. L-glutaminaz için optimum pH 6,5-7,0 olarak belirlenmiştir. 28 saatlik süre sonunda 35 °C sıcaklıkta ramnaz ve glutamin karbon ve nitrojen kaynağı olarak kullanmışlardır ve katı hal

fermantasyonu altında üretim gerçekleştirebilmesi için en iyi tetikleyici küspe olarak belirlemişlerdir. Saflaştırma için etanol çökeltmesi ve QFF iyon değişim kromatografisi yapılmıştır. L-glutaminaz enzimini 89,78 EU/mg spesifik aktiviteyle 2 kata kadar saflaştırmışlardır ve molekül ağırlığını yaklaşık 54,8 kDa olarak belirlemişlerdir. Maksimum enzim aktivitesi pH 8,2 ve 40°C sıcaklıkta ulaştığını ve enzim aktivitesinin yaklaşık %90'ını 1 saat boyunca koruduğunu belirlemişlerdir. Sonuç olarak L- glutaminaz enziminin farmasötik ve gıda işleme gibi biyoteknolojik uygulamalarda kullanılabileceğini göstermişlerdir.

Shuai *et al.* 2019'da yapmış oldukları bir çalışmada; yeni izole edilmiş glutaminaz üreten bir organizma kullanarak yüksek verimli L-teanin üretimi için etkili bir yöntem gerçekleştirmişlerdir. Yüksek verimli üretimin optimizasyonu ise ozmotik şok yöntemi kullanılarak *Pseudomonas nitroreducens* SP.001 permeabilize hücrelerle sağlanmıştır. 15,5'lik süktroz muamelesi ile permeabilize edilen hücrelerin glutaminaz aktivitesi, permeabilize edilmeyen hücrelere göre %239 daha yüksek olduğunu kaydetmişlerdir. Böylece, L teanin üretimi için koşullar permeabilize hücreler kullanılarak optimize edilmiştir (Shuai *et al.* 2019).

Fan *et al.* (2020), yaptıkları bu çalışmada; şekerler ve etilaminden tek adımlı fermentatif L-teanin üretimi için yabani tip *Escherichia coli*'nin yolak mühendisliğini tanımlamışlardır. İlk olarak, *Paracoccus aminovorans*'tan heterolog olarak yeni bir GMAS'ın tanımlanmasıyla L-teaninin sentetik yolunu oluşturmuşlardır. GMAS gen ifadesini artırmak ve kontrol etmek için ksiloz ile indüklenen T7 RNA polimeraz-PT7 promotör sistemi kullanılmıştır. Daha sonra araştırmacılar, öncül glutamat havuzu, doğal sitrat sentazının aşırı ifadesi ve *Corynebacterium glutamicum*'dan glutamat dehidrogenazın tanıtılarak arttırmışlardır. Çalışmanın sonraki aşamasında araştırmacılar; daha fazla karbon akışını teanin sentezine yönlendirmek için trikarboksilik asit döngüsü kesmişler ve piruvat karboksilaz, piruvattan oksaloasetat sağlayan bir yan yol olarak *C. glutamicum*'dan tanıtılmışlardır. Son olarak araştırmacılar, teanin sentezine ATP verimini artırmak için *Mannheimia succiniciproducens*'ten enerji tasarrufu sağlayan fosfoenolpiruvat karboksikinaz tanıtılmışlardır. Fed-batch fermentasyonunda etilamin hidroklorürün eklenme zamanı ve konsantrasyonu optimize edildikten sonra, rekombinant suş TH11, 5 litrelik bir biyoreaktörde 70,6 g/L - teanin üretilmiş ve verimlilik sırasıyla 0,42 g/g glukoz ve 2,72 g/L/saat olmuştur.

Ma H. *et al.* 2020'de yaptıkları bir çalışmada; çay bitkilerinde bulunan ve gıda bilimi ile insan beslenmesi açısından birçok işlevsel özelliğe sahip olan benzersiz bir protein dışı amino asit olan l-teanin incelemişlerdir. Bu çalışmada araştırmacılar, endüstriyel olarak güvenli bir konak olan *Corynebacterium glutamicum*'da fermentatif l- teanin üretimini

mühendislik yoluyla gerçekleştirmeyi amaçlamışlardır. L- teanin sentezi için, l-glutamat ve etilamini ATP bağımlı olarak birleştiren γ -glutamylmethyamide sentetaz (GMAS) kullanmışlardır. İlk olarak, çeşitli GMAS'lar, konaklara etilamin eklenmesiyle l- teanin üretmek üzere *C. glutamicum* yabani tipi ATCC 13032 suşunda ve l-glutamat aşırı üreten GDK-9 suşunda ifade edilmiştir. Daha sonra araştırmacılar, konak hücrelerindeki l-glutamat ihracatçısı bozularak GDK-9 hücrelerinde l- teanin miktarı önemli ölçüde artırmışlar ve kültür ortamında l-glutamat birikimi neredeyse tamamen ortadan kaldırmışlardır. Son olarak araştırmacılar, kromozomal olarak gmasMm ile entegre edilmiş bir l-alanin üreticisi oluşturmuşlar ve bitki kaynaklı l-serin/l-alanin dekarboksilazları ifade ederek etilaminin endojen olarak sentezlenmesini denemişler; ancak, bu enzimler deneysel koşullarımız altında l-alanin dekarboksilaz aktivitesi göstermediğini bildirmişlerdir. Sonuç olarak bu çalışma ile araştırmacılar, optimize edilen mühendislik ürünü suş, 5 litrelik fermentörde 19.6% verimle yaklaşık 42 g/L l- teanin üretmeyi başarmışlardır.

Feng *et al.* (2021) L-teanin biyosentezi için hücresiz protein sentez sisteminin uygulanmasını gerçekleştirmişlerdir. CFPS, *Camellia sinensis*'ten (CsTS2) L-teanin sentetaz 2'yi ifade ederken, sentez reaksiyonunun 32 saatinden sonra 11,31 μ M konsantrasyonda L-teanin üretebildiğini bulmuşlardır. *Escherichia coli*'den elde edilen γ -glutamilsistein sentetaz, 24 saatlik reaksiyondan sonra 302,96 μ M ile en yüksek konsantrasyonda L-teanin üretebildiğini belirlemişlerdir. Bunlar arasında, CsAD ve *Pseudomonas taetrolens*'ten (PtGS) L-glutamin sentetaz kombinasyonu, canlı hücrelerde L-teanin biyosentez yeteneğini daha da doğrulamak için CsAD ve PtGS'yi aşırı eksprese eden *E. coli* suşu 13,42 μ M'lik en yüksek konsantrasyonda L-teanin sentezleyebildiğini kaydetmişlerdir. Bu mühendislik ürünü *E. coli* suşu, 72 saatlik fermantasyondan sonra ortamdaki L-alanin ve L-glutamati 3,82 mM konsantrasyonda L-teanine dönüştürebildiğini bildirmişlerdir (Feng *et al.* 2021).

Shen *et al.* 2021'de yaptıkları bir çalışmada; ilaç ve gıda endüstrisinde önemli bir enzim olan L-Glutaminaz'ın işlevsel glutamyl bileşikler üretiminde, özellikle l-teanin üretiminde kullanımı ile ilgili çalışma yapmışlardır. Daha önce yaptıkları çalışmada *Pseudomonas nitroreducens* SP.001'in hücre içi L-glutaminaz aktivitesini araştırmışlar ve üç fiziksel permeabilizasyon yöntemi kullanılarak L-glutaminaz aktivitesini arttırmışlardır. Daha sonra sodyum aljinat kullanılarak gömülme ajanı olarak permeabilize hücrelerin bütün hücre immobilizasyon koşulları, enzimin stabilitesini ve yeniden kullanılabilirliğini artırmak için optimize etmişlerdir. Permeabilize hücreler ile karşılaştırıldığında immobilize hücrelerin özelliklerini araştırmışlardır. Yaptıkları çalışmada 155 g/L sukroz ile ozmotik şok kullanılarak hücre permeabilizasyonunun enzim aktivitesini önemli ölçüde artırdığını göstermişlerdir.

Permeabilize *P. nitroreducens* hücrelerinin immobilizasyonu için etkili bir prosedür geliştirmişlerdir. Hücre immobilizasyonu için optimum koşullar: 40 g/L sodyum aljinat, 30 g/L kalsiyum klorür, 100 g/L hücre kütlesi ve 3 saat kürlenme süresi olarak belirlenmiştir. Başarılı immobilizasyon sonrası karakterizasyon çalışmaları, immobilize hücrelerden elde edilen L-glutaminazın termostabilite ve pH direncinin permeabilize hücrelerden elde edilenlerden daha yüksek olduğunu ortaya koymuşlardır. Ayrıca, immobilize biyokatalizör 10 kez yeniden kullanılabildiğini ve aktivitesinin %80'ini koruyabildiğini bildirmişlerdir.

Soren *et al.* (2021); yaptıkları bir çalışmada ekstraselüler L-glutaminaz üreten bir toprak bakterisi taramışlar, *Acinetobacter calcoaceticus* PJB1 olarak karakterize etmişler ve yalnızca destekleyici substrat olarak şeker kamışı küspesi kullanılarak katı hal fermentasyonu altında geliştirmişlerdir. Optimum L-glutaminaz üretimi, başlangıç ortam pH'sı 10,0, inkübasyon sıcaklığı 35°C, inokulum konsantrasyonu %1,5 (v/v) ve 72 saatlik sürede elde etmişlerdir. Enzim üretiminin iyileştirilmesi yanıt yüzey yöntemi kullanılarak yapılan istatistiksel optimizasyon prosedürü ile gerçekleştirilmiş ve enzim üretimini 47,95 EU/mL'ye (2,38 kat artış) yükseltmişlerdir. Şeker kamışı küspesinin enzimatik bozunma modeli, Fourier dönüşüm infrared spektroskopisi ve ışık mikroskobu kullanılarak değerlendirilmiştir. Fermente hidrolizatın, *Lactobacillus sp.* ve *Bifidobacterium sp.* gibi probiyotik organizmaların büyümesini teşvik eden çok etkili bir büyüme indükleyicisi olduğunu, daha yüksek spesifik büyüme oranı, hacimsel büyüme oranı ve genel verim ile göstermişlerdir. Bu çalışma ile araştırmacılar, l-glutaminazın maliyet etkin üretimini ve aynı zamanda sağlık yararları sağlayan probiyotik organizmalar için büyümeyi destekleyen ajan olarak fermente atık ürünün kullanımını vurgulamışlardır.

Eman Zekaria Gomaa yaptığı bir çalışmada (2022), halofilik bakteriler tarafından üretilen L-glutaminazın antikanser aktivitesini incelemiştir. Gomaa bu çalışmada ekstraselüler L-glutaminaz üretimi için deniz suyu numunelerinden bakteri taraması gerçekleştirmiş ve taramalar sonucunda 15 adet halofilik bakteri izole etmiştir. İzole etmiş olduğu suşlar arasından en iyi üretim yapan suş olarak *Bacillus sp.* DV2-37 suşunu seçmiş ve enzim üretimi için optimize etmiştir. En güçlü suş ile fermentasyon sürecinin optimizasyonu, en yüksek enzim aktivitesinin (47.12 EU/mL) 1% (w/v) glikoz (karbon kaynağı olarak), 1% (w/v) pepton (azot kaynağı olarak), 5% (w/v) NaCl, başlangıç pH'sı 7.0, 37 °C sıcaklık ve 20% (v/v) inokulum yüzdesi kullanılarak 96 saatlik inkübasyon sonrası gözlemlendiğini ortaya koymuştur. Optimizasyon çalışmalarının sonrasında üretilen ham enzim, amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz ile kısmen saflaştırılmıştır. Gomaa son olarak üretilen enzimin antitümör aktivitesini de araştırmıştır. İnsan meme (MCF-7), hepatosellüler (HepG-2) ve

kolon (HCT-116) karsinoma hücre hatlarına karşı yapılan antitümör etkisi, *Bacillus sp.* DV2-37 tarafından üretilen L-glutaminazın, doz-bağımlı bir şekilde tüm test edilen hücre hatlarında güçlü sitotoksik aktivite gösterdiğini ve sırasıyla 3.5, 3.4 ve 3.8 µg/mL IC50 değerlerine sahip olduğunu ortaya koymuştur. Bu çalışmayla Goma, deniz bakterileri tarafından üretilen L-glutaminazın uygun özelliklere sahip olduğunu ve birçok terapötik uygulama için yüksek potansiyele sahip olduğunu bildirmiştir.

Okpalla *et al.* 2022'de yaptıkları bir çalışmada; *Pseudomonas* türü ALG3 tarafından L-glutaminaz üretimi için süreç parametrelerinin optimizasyonu rapor etmişlerdir. L-glutaminaz üreten bakteriyi, Anambra eyaletinde bulunan Chukwumemeka Odumegwu Ojukwu Üniversitesi, Uli'deki bir bölgeden temin edilen toprak numunelerinden izole etmişlerdir. İzole edilmiş olan bu bakteri suşunu biyokimyasal ve moleküler özellikler kullanılarak tanımlamışlardır. Araştırmacılar bu çalışmada L-glutaminaz üretim parametrelerinin optimizasyonu 250 ml erlen içerisine eklenen mineral tuz ortamında değerlendirilerek yapılmıştır. Parametreler arasında çeşitli bivalent metaller, pH, yüzey aktif maddeler, büyüme destekleyiciler, amino asitler ve fermantasyon süresi yer almıştır. Çalışmanın sonucunda FeSO₄ ilavesinin *Pseudomonas* türü ALG3 tarafından optimum L-glutaminaz verimini 38,36 EU/mL'ye çıkardığını, en düşük üretimin ise MnSO₄ ile gözlemlendiği gösterilmiştir. Enzim üretiminde pH'nın etkisi araştırılmış ve en yüksek pH 8,0'de 30,73 EU/mL L-glutaminaz verimi elde edilmiş, en düşük enzim üretimini ise pH 9,0'da gözlemlenmiştir. Buna ek olarak L-glutaminaz üretim ortamında sürfaktanların etkisi araştırılmış ve Tween-80 ile en yüksek L-glutaminaz üretimi 82,25 EU/mL olarak elde edilirken, en düşük verim stearik asit ile kaydedilmiştir. Üre, maksimum 43,82 EU/mL L-glutaminaz verimini teşvik ederken, minimum üretim pepton olduğunu gözlemlenmiştir. Prolin, en yüksek L-glutaminaz verimini 42,63 EU/mL olarak teşvik ederken, en düşük verim tirozin olduğunu gözlemlenmiştir. En yüksek L-glutaminaz verimi (91,88 EU/mL) 72 saat sonra gözlenmiş ve sonraki süreçte verimin azaldığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada sonuç olarak süreç parametrelerinin optimizasyonunun *Pseudomonas* türü ALG3'ün L-glutaminaz verimini önemli ölçüde artırdığını gösterilmiştir. Araştırmacılar *Pseudomonas* türlerinin tıp ve gıda endüstrisinde büyük potansiyele sahip L-glutaminazın büyük ölçekli üretimi için kullanılabileceğini önermişlerdir.

Zhu *et al.* (2022), yaptıkları bir çalışmada L-teanin üretimi için *Bacillus subtilis* BSFT-42' kaynaklı γ-glutamyltranspeptidazın (GGT) enzimini kullanmışlardır. En yüksek üretim için çay bitkisi rizosfer toprağından bakteri taraması yapmışlar ve izole ettikleri 50 *Bacillus* suşu arasında en yüksek L-teanin oluşturma aktivitesini gösteren suş olarak BSFT-42

suşunu seçmişlerdir. Seçilen suş kullanılarak GGT enzimi üretmişler ve bu enzimi kullanarak L-teanin üretimini sağlamışlardır. Üretilen L- teanin miktarını arttırmak amacıyla L-teaninin üretim parametrelerini optimize etmişlerdir. Optimize edilmiş koşullar altında, BSFT-42 suşunun fermantasyon besiyerinde 32 saatte elde edilen GGT, %87,45'ini verimle 17,49 mM L-teanin üretmişlerdir (Zhu ve ark 2022) .

Sara *et al.*, (2022), L-glutaminaz üretimi yönünden toplam 12 mikrobiyal suş taramışlardır. Enzimin üretimine etki eden faktörleri optimize etmişler ve enzimin sahip olduğu önemli özellikleri belirlemişlerdir. L-glutaminaz üretimi açısından test edilen mikroorganizmalar arasından en güçlü olan *Bacillus subtilis* NRRL 1315 suşunu seçmişlerdir. En yüksek glutaminaz üretimi 37 °C'de pH 7,5'de 5 g/L glikoz, 0,1 g/L sodyum nitrat ve 10 g/L L-glutamin ortamında 48 saat inkübasyon sonunda elde etmişlerdir. L-glutaminaz enzimi için optimum pH' 7,5, optimum sıcaklık 37 °C ve optimum enzim ve substrat konsantrasyonu 2 mg/mL olarak belirlenmiştir. Belirlenen şartlarda enzim 2,2'-difenil-1-pikrilhidraliz radikal temizleme aktivitesi göstermiştir.

Robescu *et al.* yaptıkları bir çalışmada (2023); L-teaninin enzimatik sentezini gerçekleştirmişlerdir. Bunun için glikoksil-agaroz üzerine kovalent olarak immobilize edilmiş olan *Bacillus subtilis*-GGT (γ -glutamil transferaz) enzimini kullanmışlardır. Bu çalışmada araştırmacılar L-teanin sentezi için reaksiyon sıvısı içerisine herhangi bir tampon veya katkı maddesi eklememişler ve reaksiyonu su içerisinde gerçekleştirmişlerdir. L- teanin üretimi için donör (verici) olarak L-glutamin ve aseptör (alıcı) olarak etilamin kullanmışlar ve reaksiyonu su içinde 25°C'de gerçekleştirmişlerdir. Araştırmacılar L-teanin üretim şartlarını optimize etmişler ve en iyi üretim şartlarını belirleyerek (1:8 molar oran L-Gln:etilamin, pH 11,6, 1 EU/ mL, 6 saat), %93 verimle (485 mg, 32.3 g/L) yüksek saflıkta (%99) L-teanin üretimini gerçekleştirmişlerdir. L-teaninin saflaştırılması immobilize biyokatalizörün basit filtrasyonu, uçucu maddelerin (reaksiyona girmemiş etilamin) damıtılması ve doğrudan liyofilizasyon ile gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada immobilize edilen BsGGT enzimi dört reaksiyon döngüsü boyunca %100 aktivitesini koruyarak tekrar kullanılmıştır. Bu çalışmada gerçekleştirilmiş olan enzimatik sentez, L-teanin üretimi için doğrudan, hızlı, yüksek verimli ve kolayca ölçeklenebilir bir yaklaşım sunmakta olup, aynı zamanda çevre dostu kimya metriklerine de sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Tezin Amacı

L-teanin; birçok sağlık yararına sahip serbest bir amino asittir ve son zamanlarda endüstride bu amino asit için potansiyel bir talep bulunmaktadır. Tıpta ve gıda endüstrisinde uygulama alanlarının artmasıyla birlikte, L-teaninin üretim teknolojisinin araştırılmasına yönelik çalışmalar büyük ilgi görmektedir. Son yıllarda, enzim kataliziyle L-teanin üretimi araştırmacıların büyük ilgisini çekmiş ve bu alanda birçok yeni çalışma yayınlanmıştır. Yapılan çalışmalarda L-teaninin yüksek verimli üretimi için farklı biyokatalizörler ve bu biyokatalizörler için farklı mikrobiyal kaynaklar bildirilmiştir. Bu konudaki güncel çalışmalar incelendiğinde L-teanin üretiminde kullanılan biyokatalizörler için gerekli mikrobiyal kaynak tür ve/veya suşlarının oldukça kısıtlı olduğu görülmektedir. Bu nedenle doktora tez çalışması olarak gerçekleştirdiğimiz bu çalışmada amaç; araştırma materyali olarak Türkiye'nin farklı coğrafi bölgelerinde bulunan farklı illerden toprak temin etmek, temin edilen bu toprak numunelerinden hedefe yönelik bakteri izolasyon yöntemiyle literatürde bildirilen bakteri türlerinden farklı yerel bir bakteriyel tür veya suş izole etmek ve bu izolat kullanılarak yüksek konsantrasyonda L-teanin üretimini sağlamaktır. Bu amaç doğrultusunda;

- Türkiye'nin farklı coğrafi bölgelerinde belirlenen farklı illerde farklı illerin çeşitli bölgelerinden (Adana, Erzurum, Gümüşhane, Manisa, Urfa, Trabzon, Van) temin edilen toprak numunelerinden glutamin amino asitini kullanabilme yeteneklerine bakılarak glutaminaz üreticisi yeni bakteriyel tür izole edildi,
- Elde edilen izolatlardan glutamin ve etilamini kullanabilen bakterilerin taranması ve bu bakterilerden en yüksek molar aktiviteyi veren glutaminaz üreticisi izolatlar belirlendi,
- Belirlenen bakteri izolatlarından yüksek molar aktiviteye sahip glutaminaz enzim üretimi ve üretilen glutaminaz enzimin biyokatalizörlüğünde yüksek verimde, düşük maliyetle yerel kaynaklı L-teanin biyotransformasyonu gerçekleştirildi.

MATERYAL VE METOD

Materyal

Mikroorganizma İzolasyonları

Mikroorganizma izolasyonları; Van-Özalp Dönerdere Mahallesiinde bulunan buğday ve arpa yetiştirilen arazi toprağından, Adana-Ceyhan Mercin Mahallesiinde bulunan ayçiçeğı yetiştirilen arazi toprağından, Manisa'nın Köprübaşı Mahallesiinde bulunan zeytin ağacı kök toprağından, Erzurum'un Uzundere ilçesinde bulunan ceviz ağacı kök toprağından, Erzurum'un Hınıs ilçesinde bulunan bahçe toprağından, Gümüşhane'nin Şiran ilçesinde bulunan bahçe toprağından ve Urfa Siverek ilçesinde bulunan bahçe toprağından alınan toprak numune örneklerinden yapıldı. Temin edilen numuneler aseptik koşullar altında laboratuvar ortamına getirildi ve izolasyon çalışmalarına başlandı.

Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar

Tablo 2. Tez Çalışmasında Kullanılan Kimyasallar / Markaları

Kimyasallar	Marka
Amonyum Sülfat	Merck
Coomassie Brilliant Blue G-250	Fluka
Etilamin	Sigma
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Sigma
Distile su	Thermo
Etil Alkol	Sigma
Asetik Asit	Sigma
Fenol Red	Sigma
Sodyum Klorür	Sigma
İzobütanol	Tekkim
Ninhidrin	AFG Bioscience
Hidrojen Peroksit	Sigma
Sodyum Hidroksit	Riedel de Haen
Sodyum Fosfat	Sigma
Cıva (II) Klorür	Sigma
Potasyum İyodür	Sigma
Triklorik Asit	Merck
L-Glutamin	Sigma
Magnezyum Sülfat	Sigma
PotasyumDihidrojen Fosfat	Sigma

Tablo 2. Devamı

Demir (II) Sülfat	Merck
Çinko Sülfat	Merck
Glikoz	İsolab
Maltoz	Merck
Galaktoz	Sigma
Nişasta	Sigma
Selüloz	Oxoid
Ksiloz	Oxoid
Laktoz	Oxoid
Üre	Sigma

Tez çalışmasında kullanılan araç-gereç ve cihazlar

Tablo 3. Tez Çalışmasında Kullanılan Araç-Gereç ve Cihazlar / Marka-Model

Araç-Gereç ve Cihazlar	Marka-Model
Etüv	Redline by-BINDER
Falkon Tüpler	Eppendorf
Hassas Terazı	Ohaus Pioneer
Isı Bloğu	Lab-Line
Isıtmalı Manyetik Karıştırıcı	Heidolph
Jel Görüntüleme Cihazı	Quantum Vilber Courma
Kar Makinesi	Angelantoni
Buzdolabı (+4/-20°C)	Vestel
Çalkalamalı İnkübatör	Zhicheng
Çeker ocak	TÜV-SÜD
Dondurucu (-86°C)	Glacier Ultralow Freezer
Kuvarz Küvetler	Merck
Mini Santrifüj	Hangzhou Allheng
Otoklav	Hmc Hiramaya
Mikropipet Takımı	Thermo Scientific ve Eppendorf
pH Metre	Mettler Toledo FiveEasy Plus
Saf Su Cihazı	Mp Minipure
Santrifüj Cihazı	Hettich Zentrifugen Mikro
Steril Kabin	Telstar Bio-II-A
Agaroz Jel Elektroforez Cihazı	Thermo EC
Nanodrop	Senso Quest-Labcycler
PCR Cihazı	Thermo – MultiscanGo

Tez çalışmasında kullanılan besiyerleri, çözeltiler ve tamponlar

Tablo 4. Tez Çalışmasında Kullanılan Besiyerleri

Tryptone Soy Agar (TSA): 3 g TSA tartıldı, 100 mL distile su içerisinde çözöldü ve 15 dakika otoklavlandı (121°C).
Tryptone Soy Broth (TSB): 3 g TSB tartıldı, 100 mL distile su içerisinde çözöldü ve 15 dakika otoklavlandı (121°C).
Luria Bertani (LB Broth): 2 g LB besiyeri tartıldı, 100 mL distile su içerisinde çözöldü ve 15 dakika otoklavlandı (121°C).
MSG (Minimal Salt Glutamin Medium) : 0,5 g/L MgSO ₄ , 0,5 g/L KH ₂ PO ₄ , 0,1 g/L CaCl ₂ , 10,0 g/L L-Glutamin, 10,0 g/L Yeast ekstrakt 1/10 oranında tartılarak 100 mL didistile su içerisinde çözöldü ve 15 dakika otoklavlandı (121°C).
MGA (Minimal Glutamin Agar): 0,5 g/L KCl, 0,5 g/L MgSO ₄ , 0,5 g/L KH ₂ PO ₄ , 0,1 g/L FeSO ₄ , 1,0 g/L ZnSO ₄ , 10,0 g/L L-Glutamin, 15,0 g/L Agar, 0,012 g/L fenol red tartılarak 1000 mL didistile su içerisinde çözöldü ve 15 dakika otoklavlandı (121°C).
MG (Minimal Glutamin Medium): 0,5 g/L KCl ,0,5 g/L MgSO ₄ , 0,5 g/L KH ₂ PO ₄ , 0,1 g/L FeSO ₄ , 1,0 g/L ZnSO ₄ 10,0 g/L L-Glutamin tartılarak 1000 mL didistile su içerisinde çözöldü ve 15 dakika otoklavlandı (121°C).
Stok Besiyeri: 9 g TSB tartılıp 100 mL distile su içerisinde çözöldüröldü ve üzerine 54 mL gliserol eklenerek son hacim distile su ile 300 mL tamamlandı. Hazırlanan besiyeri 15 dk otoklavlandıktan sonra 2’şer mL olacak şekilde cryo tüplere pipetlendi.

Tablo 5. Enzim Aktivite Tayininde Kullanılan Çözeltiler

Sodyum Fosfat Tampon Çözeltisi (50 mM pH 8,0): 5,75 g sodyum fosfat tuzu tartılarak, 90 mL distile su içerisinde çözöldü. Daha sonra pH değeri 8,0’a ayarlandıktan sonra son hacim distile su ile 100 mL’ye tamamlandı
L-Glutamin Çözeltisi (0,04 M): 5,85 g L-glutamin tartılarak, 1000 mL distile su içersine çözöldü.
Triklorik Asit (TCA) Çözeltisi (1,5 M): 24,5 g TCA tartılarak, 100 mL distile su içersine çözöldü.
Asetik Asit Çözeltisi (2N): 65,95 mL distile su üzerine % 98’lik Asetik asit çözeltisinden 34,05 mL damla damla eklendi.

Tablo 6. Nessler Reaktifi Hazırlanmasında Kullanılan Çözeltiler

Potasyum İyodür Çözeltisi (KI): 11 g KI tartılarak bir beher içersine alındı ve içersine 5 mL distile su eklenerek çözöldüröldü.
Cıva (II) Klorür (HgCl₂): 4,4 g HgCl ₂ tartılarak 70 mL distile su çersinde çözödürölererek hazırlandı.
Sodyum Hidroksit (NaOH) Çözeltisi (5M): 20 g NaOH tartılarak 100 mL distile su içersinde çözödüröldü.

Tablo 7. İnce tabaka kromatografisi (TLC) Tayininde Kullanılan Çözelti ve Tamponlar

%1’lik L-Teanin Çözeltisi: 1 g L-teanin 100 mL distile su içersinde çözödüröldü.
%1’lik L-Glutamik Asit Çözeltisi: 1 g L-glutamik asit 100 mL distile su içersinde çözödüröldü.
%1’lik L-Glutamin Çözeltisi: 1 g L-glutamin 100 mL distile su içersinde çözödüröldü.
%2’lik Ninhidrin Çözeltisi: 2 g Ninhidrin 100 mL aseton içersinde çözödüröldü.

Tablo 8. Protein Tayininde Kullanılan Çözelti ve Tamponlar

Bradford Çözeltisi: 0,1 g Coomassie Brilliant Blue G-250 tartılarak 50 mL %95 EtOH içerisinde çözöldü ve içerisinde 100 mL fosforik asit (%95) ilave edildi. Solüsyonun son hacmi distile su ile 1000 mL'ye tamamlanarak kullanılıncaya kadar oda sıcaklığında karanlıkta saklandı.

Standart Serum Albumin Çözeltisi (1 mg/mL): BSA'dan 1 mg tartılıp, 1 mL distile su içerisinde çözölerek hazırlandı.

Yöntem

Örnek toplanması

Yapılan tez çalışmasında L-glutaminaz üretimi için Türkiye'nin farklı bölgelerinden alınan rizosfer toprak örnekleri steril kap içerisinde muhafaza edilerek, aseptik koşullar altında laboratuvar ortamına getirildi ve araştırma yapılıncaaya kadar, oda ısısında kısa süre muhafaza edildi.

L-glutaminaz üreten bakteri izolasyonu

Türkiye'nin farklı bölgelerinden temin edilen toprak örneklerinden 5'er g tartılarak Tablo 4'te anlatıldığı şekilde hazırlanan 50 mL'lik MSG (Minimal Salt Glutamin Medium) besiyeri içerisinde eklendi ve 30°C'lik çalkalayıcıda 24 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin sonunda dilüsyon serileri hazırlanarak, tek koloni bakteriler elde edilinceye kadar saflaştırıldı. Elde edilen isolatlar L-glutaminaz üretim potansiyellerine bakılmak üzere kısa süreliğine +4°C'de muhafaza edildi.

L-glutaminaz enziminin kalitatif analizi

Topraktan izole edilerek +4°C'de muhafaza edilen bakteri isolatları, Tablo 4'te anlatıldığı şekilde hazırlanmış olan MGA (Minimal Glutamin Agar) petrilere yayma ekim yöntemine göre inoküle edilerek 30°C de 24-48 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin sonunda sarı renkli petrilere pembe renge dönüşen petrilere seçilerek L-glutaminaz üreticisi bakteriler belirlendi. Elde edilen saf koloniler Tablo 4'te anlatıldığı şekilde hazırlanan stok besiyeri içerisinde inoküle edilerek kullanılıncaya kadar -86 °C de muhafaza edildi.

L-glutaminaz enziminin sıvı kültürde üretimi

Glutaminaz üreten bakteri isolatlarından MGA katı besiyerinde, en iyi zon veren bakteri suşları seçildi ve bu bakteriler stoktan canlandırıldı. En yüksek zon veren suş TSB katı besiyerine inoküle edilip ön kültür hazırlandı. Hazırlanan ön kültürden 1 mL örnek alınarak L-glutamin ihtiva eden glutaminaz sıvı besiyerine inoküle edilip glutaminaz üretimi

sağlandı. Glutaminaz üretimi aktivite tayin yöntemlerine göre en yüksek aktiviteyi veren bakteri seçilerek L-teanin biyotransformasyonunda kullanılmak üzere +4'de muhafaza edildi.

L-glutaminaz enziminin aktivite tayini

L-glutaminaz enzim aktivite tayini NH_4^+ iyonlarının ölçümüne dayalı metod ile yapılmaktadır. Enzim aktivitesi için aşağıda sıralanan adımlar izlendi.

- 20 μL 0,04 M L-glutamin çözeltisi
- 20 μL 0,1 M fosfat tamponu (pH 8,0),
- 20 μL üretilen enzim homojenatı karıştırıldı ve 37 °C'da 15 dakika inkübe edildi.
- 15 dk sonunda üzerine 20 μL 2 N asetik asit eklendi ve 10 dk bekletildi.
- Bu sürenin sonunda karışımdan 20 μL alındı ve üzerine 740 μL destile su ve 40 μL Nessler reaktifi ilave edildi.
- Enzimatik reaksiyon sonucu oluşan olan NH_4^+ iyonları ile Nessler reaktifinin etkileşmesi için 10 dakika beklendi ve sonrasında oluşan renk şiddeti 450 nm'de spektrofotometrik olarak optik denstisitesi okunarak not alındı. (Mosallatpur *et al.* 2019).

L-Glutaminaz Aktivitesi Hesaplamasında Kullanılan Amonyum Standart Grafiğinin Çizilmesi

L-Glutaminaz aktivitesinin hesaplanması için amonyum standart grafiğinin çizilmesi gerekmektedir. Bu, enzimatik reaksiyon sonucunda oluşan NH_4^+ iyonlarının miktar hesabıyla yapılmaktadır. İlk adım olarak, 1,0 mg/mL'lik amonyum klorür (NH_4Cl) stok çözeltisi hazırlandı. Bu stok çözeltisi, daha sonra 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 ve 1,0 mg/mL'lik standart çözeltilere seyreltildi. Her bir standart çözeltiliden 0,1 mL alınarak, üzerine 3,7 mL distile su ve 0,2 mL Nessler reaktifi eklendi ve reaksiyonun gerçekleşmesi için 10 dakika beklendi. Sonrasında, her bir numune için 3,8 mL distile su ve 0,2 mL Nessler reaktifi eklenerek, 450 nm dalga boyunda UV spektrofotometresinde absorbans değerleri ölçüldü. Elde edilen absorbans değerleri, amonyum klorür konsantrasyonuna göre grafiğe aktarıldı ve standart eğrisi çizildi. Son olarak, aktivite tayini yapılan numuneler için standart grafik verileri kullanılarak miktar tayini gerçekleştirildi.

L-teanin sentezi

L - teanin'in biyokatalitik sentezi için 200 mM L - Gln, 1 M etilamin, 50 mM Tris-HCl tamponu (pH 10,5) ve 3 mL çalışma konsantrasyonunda bireysel enzim içeren bir reaksiyon karışımı (5 mL) hazırlandı. Her reaksiyon karışımı 30 °C'de 6 saat inkübe edildikten sonra

reaksiyon sonlandırıldı ve reaksiyon çözeltileri 6000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında elde edilen süpernatant L-teanin tayini için +4° C'de muhafaza edildi.

L-teanin Tayin Yöntemleri

TLC ile L-teaninin kalitatif tayini

İnce tabaka kromatografisi (TLC), bir karışımdaki bileşikleri ayırmak için kullanılan afinite temelli bir yöntemdir. TLC, hem kalitatif hem de kantitatif numune analizi için yaygın olarak kullanılan çok yönlü bir ayırma yöntemidir. Bu yöntem silika jel kaplanmış bir cam plakayla gerçekleştirildi. Bu plaka en alt kısmına ve en üst kısmına cetvel yardımıyla bir çizgi çizildi. Bu çizgi üzerine yürütülmesi planlanan madde kodları kurşun kalem yardımıyla işaretlendi ve her bir noktaya bir damla olacak şekilde (4 µL) spotlandı. Daha sonra plaka önceden hazırlanmış olan yürütücü çözelti (izobütanol/asetik asit/saf su (4:1:1)) bulunan tankın içerisine yerleştirildi. Yürütücü üst çizgiye ulaştığında plaka tanktan çıkarıldı ve üzerine aminoasit indikatörü olan ninhidrin solüsyonu püskürtüldü. Daha sonra plaka üzerinde pembe-mor noktalar görünür hale gelinceye kadar 95 ° C'lik kurutucuda kurutuldu ve oluşan lekelerin konumları ve çapları cetvel yardımıyla ölçüldü.

HPLC ile L-teanin kalitatif ve kantitatif tayini

L-Teanin'in doğru ve güvenilir bir şekilde tayin edilmesi, özellikle gıda ve farmasötik endüstrisinde büyük önem taşımaktadır. Bu amaçla L-glutaminaz enzimi yardımıyla L-glutamin ve etilaminden biyotransformasyonu sağlanan L-teaninin tayini için üretim sonunda elde edilen süpernatantlar Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) sistemi ile analiz edildi. HPLC ile teanin analiz metodu oluşturmak için $\geq$ % 96 saflıkta L-teanin ($C_7H_{14}N_2O_3$, SIGMA) aminoasit standardı kullanıldı. 10 mg L-Teanin 10 mL distile su içerisinde çözülerek 1 mg/mL stok çözelti hazırlandı. Stok çözeltiden uygun dilüsyonlar yapılarak 10, 50, 100, 200 ve 300 ppm konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlandı. Standart çözeltiler için kalibrasyon eğrisi çizildi.

L-teanin analizi, 20°C'de bir Inertsil ODS3 C18 kolonu (5 µm, 250 mm x 4.6 mm) ve RID detektör sistemi ile donatılmış bir Prominence LC-20A HPLC sistemi (Shimadzu, Japonya) ile gerçekleştirildi (Tablo 9). L-teanin analizi için HPLC mobil fazları hazırlanı ve bu mobil fazlar için akış diyagramı oluşturuldu (Tablo 10). HPLC analizi, Atatürk Üniversitesi Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (DAYTAM) tarafından hizmet alımı ile gerçekleştirildi.

Tablo 9. L-Teanin HPLC metot şartları, mobil fazları

Parametre	Değer
Kolon	Inertsil ODS-3 C18 (4.6 x 250 mm, 5µm)
Analiz süresi	40 dk
Mobil Faz-B	Asetonitril
Akış Hızı	1 ml/dk
Kolon fırını	20 °C
Mobil Faz-A	Ultra Saf Su
Dalgaboyu	190 nm
Gradien	

Tablo 10. L- teanin HPLC ile analizi için kullanılan mobil fazlar için akış diyagramı

Zaman (dk)	Mobil Faz A (%)	Mobil Faz B (%)
0	100	0
10	100	0
12	20	80
20	20	80
22	100	0
40	100	0

Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometresi (LC-MS) ile L-Teanin Kalitatif ve Kantitatif Tayini

İzolatların LC-MS analizleri, L-teaninin L-glutaminaz enzimi yardımıyla L-glutamin donörlüğünde ve etilamin varlığında biyotransformasyonu sonrasında elde edilen numuneler, TLC ve HPLC ile yapılan analizlerle L-teaninin miktar tayininin desteklenmesi amacıyla yapıldı. Üretim örnekleri santrifüj edilerek, içerisinde bulunan çökeltiler uzaklaştırıldı. Elde edilen örneklerden 1'er ml alınarak LC-MS analizleri için hazırlandı. LC-MS analizleri Agilent 6460 Triple Quadropol marka sıvı kromatografi cihazı ile gerçekleştirildi. L-teanin analizi için LC-MC mobil fazları hazırlandı (Mobil A: %100,0 asetonitril, Mobil B: %0,1 formik asit,) ve bu mobil fazlar için akış diyagramı oluşturuldu (Tablo 11). LC-MC analizi, Atatürk Üniversitesi Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (DAYTAM) tarafından hizmet alımı ile gerçekleştirildi.

Tablo 11. L- teanın LC-MC ile analizi için kullanılan mobil fazlar için akış diyagramı

Zaman (dk)	Mobil Faz A (%)	Mobil Faz B (%)
1	30	70
5	80	20
7	80	20
7,10	30	70

En Yüksek Konsantrasyonda L- Teanın Üretimini Sağlayan L-Glutaminaz Üreticisi İzolatların Morfolojik, Fizyolojik Ve Biyokimyasal Özelliklerinin Araştırılması

Gram boyama

İzolatların Gram özelliklerinin belirlenmesi amacıyla Gram boyama işlemi yapıldı. Bunun için bakteriler, TSA besiyerine çizgi ekim yöntemi ile ekildi ve 24 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. Gelişen bakteri kolonilerinden bir öze dolusu alınarak lam üzerine alınarak preparatlar hazırlandı. Daha sonra cam label bek alevinde ısıtılarak bakteriler lam üzerine fikse edildi ve kristal viyole boyası ile 1 dk muamele edildi. Ardından saf su ile yıkanarak fazla kristal viyole boyası uzaklaştırıldı. Daha sonra Kristal viyolenin bakterilere nüfuz etmesini sağlamak amacıyla prepatlar lügol solüsyonu ile kaplanarak, 1 dk bekletildi ve saf su ile yıkandı. Yıkama işleminin ardından preparatlar %96 etil alkol ile 15-20 saniye muamele edildi. Son olarak preparatların üzerine safranin boyası dökülerek 30-45 saniye bekletildi ve fazlası saf su ile yıkandı. Tamamlanan boyama işleminin ardından preparatlar ışık mikroskobu altında 40x'lik objektif kullanılarak incelendi. Mav-mor renkte olan bakteriler Gram pozitif, kırmızı-pembe renkte olan bakteriler Gram negatif olarak belirlendi.

İzolatların gelişebildikleri tuz konsantrasyonunun belirlenmesi

İzolatların gelişebildikleri tuz aralığının belirlenmesinde; farklı tuz konsantrasyonlarına (%5, %7 ve %9) sahip TSB besiyeri kullanıldı. Test suşları, ilgili besiyerine inoküle edildikten sonra, 30°C'ye ayarlı çalkalamalı inkübatörde 48 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon periyodunun sonunda bakterilerin çoğalabildikleri minimum ve maksimum tuz konsantrasyon değerleri spektrofotometre ile (OD600) tespit edildi.

İzolatların gelişme sıcaklıklarının belirlenmesi

Bakterilerin büyüme sıcaklıklarının belirlenmesinde TSB besiyerleri kullanıldı. Bu amaçla, bakteriler besiyerlerine inoküle edildi ve farklı sıcaklıklarda (25°C, 30°C, ve 45°C)

inkübasyona bırakıldı. 48 saatlik inkübasyon periyodunun sonunda spektrofotometrede (OD600) ölçümler gerçekleştirilerek, izolatların maksimum, minimum ve optimum büyüme sıcaklıkları belirlendi (Harley and Prescott 2002).

İzolatların gelişebildikleri pH aralıklarının belirlenmesi

İzolatların gelişebildikleri pH aralığının belirlenmesi amacıyla farklı pH değerlerine (pH:5-9) sahip TSB besiyerleri kullanıldı. İzolatlar, TSB besiyerlerine inoküle edildikten sonra 48 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda, spektrofotometrede (OD600) yapılan ölçümler sonucunda, izolatların gelişebildikleri maksimum, minimum ve optimum pH aralıkları belirlendi.

Oksidaz testi

Oksidaz testi, bakterilerin elektron transferinde rol oynayan bir protein olan sitokrom c'ye sahip olup olmadığını belirledi. Sitokrom c proteini (oksidaz c) solunuma katılır ve elektron taşıma sisteminde indirgen maddeler birbirleriyle reaksiyona girdiğinde hücresel enerjinin oluşmasına neden olur. Bu yöntem, bir organizmanın oksidasyon enzimi olduğunda mavi renk üretmesi prensibine dayanmaktadır. Bu testte ticari olarak satın alınan kitler kullanıldı. TSA ortamında 48 saat süreyle yetiştirilen bakteri kültürüne 1 damla oksidaz solüsyonu eklendi ve mavi renk oluşumu oksidaz pozitif olarak kabul edildi. Renk değişimi izlenmezse oksidaz negatif olarak kaydedildi (Harley and Prescott 2002).

Katalaz testi

Katalaz testi, izole edilen bakterilerin katalaz enzimi içerip içermediğini tespit etti. Bu enzim, elektron taşıma zincirinin sonunda açığa çıkan hidrojen peroksiti (H_2O_2) parçalayarak H_2O ve O_2 gazına dönüştürür ve kabarcıklar halinde O_2 gazının oluşumu gözlenir. Bu amaçla TSA ortamında geliştirilen 48 saatlik bakteri kültüründen bir öze alınarak cam bir lam üzerine yerleştirildi ve üzerine %3'lük H_2O_2 damlası eklendi. Kabarcık oluşturan bakteriler katalaz pozitif; hiçbir reaksiyon göstermeyen bakteriler katalaz negatif olarak kaydedildi.

En Yüksek Konsantrasyonda L- Teanin Üretimini Sağlayan L-Glutaminaz Üreticisi İzolatların Moleküler İdentifikasyonu

Test izolatlarından DNA ekstraksiyonu

İzolatlar ilk olarak stok kültürlerden TSA ortamına aktararak canlandırıldı. Canlandırılan bakteri kolonilerinden tek bir koloni seçildi ve önceden hazırlanıp otoklavda steril edilen 10 mL'lik TSB besiyeri içerisine inoküle edildi ve 30 °C 150 rpm'de büyümeye bırakıldı. İnkübasyon periyodundan sonra PromegaWizardR DNA saflaştırma kitine göre genomik DNA izolasyonu yapıldı ve PCR işleminde kullanılmak üzere +4 °C'de saklamaya bırakıldı (Prescott, 2002).

Test İzolatlarından Ekstrakte edilen DNA konsantrasyonlarının Ölçülmesi ve çalışma solüsyonlarının hazırlanması

Ekstrakte edilen DNA'nın konsantrasyonunu ölçmek, DNA'nın kalitesini ve miktarını belirlemek için önemlidir. Spektrofotometri yöntemi, DNA konsantrasyonunu ölçmek için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde, DNA miktarı, 260 nm'deki absorbans ölçümüyle belirlenirken, genetik materyalin protein kirliliği taşıyıp taşımadığı ise 280 nm'de okunan absorbans değeriyle tespit edildi. Kuvarz küvet içerisine 998 µL TE çözeltisi konularak 260 nm spektrofotometrede absorbans değeri ölçüldü ve okunan değer kör olarak kaydedildi. Daha sonra küvete 2 µL DNA ilave edilerek karışımın homojen olması sağlandı ve 260 nm'de köre karşı absorbans ölçüldü. Okunan bu değerden köre ait değer çıkarılarak DNA'nın absorbans değeri bulundu. Bu işlemlerin ardından aynı ölçümler 280 nm için de tekrarlandı. A_{260} ve A_{280} değerlerine kaydedildi ve $A_{260}/A_{280}=1-1,7$ olan örnekler çalışma solüsyonu hazırlamak için kullanıldı (Adıgüzel 2006).

DNA örneğinin ve çalışma solüsyonunun konsantrasyonunun belirlenmesi (µg/mL)

DNA konsantrasyonunu belirlemek için aşağıda verilen formül kullanıldı:

$$\text{DNA Konsantrasyonu (}\mu\text{g/mL)} = A_{260} \times \text{Seyreltme Faktörü} (500) \times 50$$

Burada; A_{260} , 260 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değeridir. 50, DNA'nın 1 absorbans biriminde 50 µg/mL olduğunu belirtmektedir.

DNA çalışma solüsyonunun konsantrasyonu için ise aşağıda verilen formül kullanıldı;

$$\text{İstenen Konsantrasyon (100ng/}\mu\text{L)} \times \text{İstenen Hacim (200 }\mu\text{L)} / \text{Stok DNA Konsantrasyonu (}\mu\text{g/mL)}$$

Hesaplanan değer stok DNA çözeltisinden alınarak, TE çözeltisi ile 200 µl'ye tamamlandı. 100 ng/µL konsantrasyondaki DNA çalışma solüsyonu olarak kullanıldı. DNA tüpleri -86°C'de sonraki çalışmalarda kullanılıncaya kadar muhafaza edildi (Adıgüzel 2006).

16S rRNA PCR İşlemi

16S rRNA PCR yöntemi, mikroorganizmaların tanımlanması ve filogenetik analizleri için yaygın olarak kullanılan bir moleküler biyoloji tekniğidir. 16S ribozomal RNA (rRNA) geni, bakteriler ve arkea gibi prokaryotik organizmalarda bulunur ve türler arasında yüksek derecede korunmuş bölgeler içerir. Bu özellikleri sayesinde 16S rRNA geni, mikroorganizmaların taksonomik sınıflandırılması ve filogenetik ağaçların oluşturulması için idealdir. Test izolatının genomik DNA'sından prokaryotik ribozomun evrimsel geni olan 16S rRNA, UNI16S-L: (50-ATTCTAGAGTTT GATCATGGCTCA-30) ileri primeri ve UNI16S-R ters primerleri kullanılarak Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile amplifiye edildi. Bu amaçla, her bir örnek için aşağıda tabloda (Tablo 12) verilen reaktiflerden her biri amplifiye edilecek izolat sayısına göre hesaplanıp bir karışım hazırlandı.

Tablo 12. PCR işlemi için Gerekli Reaktifler, Konsantrasyonları ve Miktarları.

Reaktif	Konsantrasyon	Kullanılan Miktar (μ L)
MgCl ₂	25 mM	1,8
27F	5 pmol	3
1492R	5 pmol	3
dNTP	25 mM	0,6
ddH ₂ O	-	14,1
DMSO	%99	1,2
Kalıp DNA	100 ng	3
Toplam	-	30

PCR işlemi için hazırlanmış olan solüsyon mini santrifüjde spinlenerek izolat kodlarının işaretlendiği her bir PCR tüpüne 27'şer μ L pipetlendi. Üzerlerine her bir örnek için izole edilmiş kalıp DNA'dan 3'er μ L eklenerek spinlendi ve PCR cihazına yerleştirildi. PCR cihazında Tablo 13'de verilen değerlere göre bir program oluşturuldu ve çalıştırıldı.

Tablo 13. PCR Programı Değerleri

Aşamalar	Sıcaklık (°C)	Süre(dk)	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	95	2	1
Denatürasyon	95	1	36
Bağlanma	52	1	36
Uzama	72	2	36
Son Uzama	72	5	1
Saklama	4	∞	

16S rRNA PCR Ürünlerinin Jel Elektroforezi

Jel elektroforez işlemi, PCR ürünlerini ayırtmak ve görselleştirmek için kullanılan yaygın bir laboratuvar tekniğidir. Bu tekniğin ilk aşaması olarak agaroz jel hazırlandı. %'lik agaroz jel hazırlamak amacıyla ilk olarak 0,8 g agaroz tartılarak mikrodalga fırına dayanıklı bir erlenmayer içerisine koyuldu ve daha sonra üzerine 80 mL 1X TAE tamponu ilave edildi. Agaroz tamamen çözülene kadar hazırlanmış olan karışım mikrodalgada ısıtıldı. Kabarcıkların çıkmasını önlemek için aralıklı olarak karıştırıldı. Çözülmüş agaroz, yaklaşık 50-60°C'ye kadar soğumaya bırakıldı ve karışım içerisine bir DNA boyası olan ethidium bromide (3 µg/mL) eklendi (Ethidium bromide toksik olduğundan dikkatli kullanılmalıdır.). Ethidium bromide eklenmiş agaroz jel solüsyonu önceden TAE ile ıslatılmış bir jel dökme küvetine döküldü ve hemen ardından jelin üst kısmına örnek kuyuları oluşturacak olan taraklar küvete yerleştirildi. Jelin tamamen katılaşması için oda sıcaklığında 30-35 dk bekletildi. Katılaşmış agaroz jel, tarakları dikkatlice çıkararak elektroforez tankına yerleştirildi ve üstü kapanacak şekilde 1X'lik TAE tamponu döküldü. Jeldeki ilk kuyucuğa, 10 kb DNA markırından [10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2000, 1500, 1200, 1000, 800, 900, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100] (Biolabs-N0550S) 3 µL yüklendi. diğer kuyulara ise her bir örnek için; 1 µL 6x yükleme tamponu (loading dye) ve 5 µL PCR ürünü karışımı yüklendi. Örnekler elektroforez jel düzeneği yardımıyla 120 voltta 120 dk yürütüldü. Jel üzerinde bulunan ve etidyum bromür ile boyanan DNA bantları jel dökümantasyon sistemi ile görüntülenerek bilgisayar ortamında (Quantum Vilber Lournat Gel Documentation System) incelendi ve kaydedildi.

Filogenetik Çalışmalar İçin Gen Amplifikasyonu ve Dizileme

16S rRNA gen bölgesi bakteri sistematigi açısından oldukça önemlidir ve evrimsel açıdan da korunmuş bölge olma özelliği taşımaktadır 16S rRNA gen dizilemesinin sonuçları, GenBank ve EzTaxon (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi> ve <http://www.eztaxon.org/>) sunucuları kullanılarak analiz edildi. Çalışmanın sonuçları dikkate alınarak, MEGA 4.0 yazılım paketi kullanıldı ve komşu birleştirme yöntemi ile bir filogenetik ağaç oluşturuldu.

En Yüksek Aktivitede L-Glutaminaz ve En Yüksek Konsantrasyonda L-Teanin Üretimi İçin Besiyeri Optimizasyonu

Fiziksel değişken optimizasyonu

Zaman optimizasyonu

L-glutaminaz üreticisi olarak seçilen izolat stok kültürlerden TSA ortamına aktarılarak canlandırıldı. Canlandırılan bakteri kolonilerinden tek bir koloni seçildi ve önceden hazırlanıp

otoklavda steril edilen 50 mL'lik TSB besiyeri içerisine inoküle edildi ve 30 °C 150 rpm'de büyümeye bırakıldı. 24 saat süreyle çoğaltılan L-glutaminaz üreticisi bakteri izolat n kültürlerinden 1 mL alınarak Tablo 4'te anlatıldığı Şekilde hazırlanmış ve steril edilmiş olan Minimal glutamin sıvı besiyerine inoküle edildi. İnokülasyonu gerçekleştirilen sıvı kültürler 30°C'lik çalkalayıcıda 130 rpm'de 4 gün boyunca üretime bırakıldı. Üretim süresi sırasında sıfırından itibaren 4. günün sonuna kadar (aktivite düşüşünü veya sabitlenişini görene kadar) her 12 saatte bir numunelerin enzim aktivitesi Nesslerizasyon yöntemi kullanılarak belirlendi. n kültürle aşılanmamış ortam, 450 nm'de optik yoğunluğu (OD) lmek için kontrol olarak kullanıldı.

pH optimizasyonu

Ortamın pH'sı bakterilerin büyümesi üzerinde önemli etki göstermektedir. Besiyeri ortamının pH'sının 6,0 ile 7,0 arasında olması mikroorganizmaların büyümesini kolaylaştırır. Bu bağlamda besiyeri fiziksel değişkeni olan pH optimizasyonu için beş farklı pH da (5, 6, 7, 8, 9) (100 ml) Minimal glutamin sıvı besiyeri hazırlanarak otoklavlandı ve bu besiyerleri önceden 24 saat süreyle büyütülen n kültür inoküle edildi ve 24 saatlik aralıklarla örnek alınarak aktivite tayini yapıldı. Bu işlem zaman optimizasyonunda en yüksek aktivite görülen saate kadar devam ettirildi.

Sıcaklık optimizasyonu

Sıcaklık enzim aktivitesini ve üretimini etkileyen önemli bir parametredir. Yüksek sıcaklıkta enzim denatürasyona uğramakta ve düşük sıcaklıklarda ise inaktif formda olmaktadır. Bazı mikroorganizmalar gerekli yan ürünleri düşük sıcaklıklarda, bazıları ise yüksek sıcaklıklarda üretmektedir. Besiyeri fiziksel değişkeni olan sıcaklık optimizasyonu için n kültür ile aşılanmış Minimal glutamin sıvı besiyeri 20 ila 40 °C arasındaki farklı sıcaklık aralıklarında (20, 25, 30, 35, 40) inkübe edildi. Zaman optimizasyonunda en yüksek aktivite görülen saate aktivite bakıldı ve elde edilen maksimum enzim aktivitesi hesaplanarak elde edilen verilerle en iyi sıcaklık belirlendi.

alkalama hızı (rpm/dak) optimizasyonu

Rpm, ortam bileşenlerini ortamda eşit Şekilde dağıtmak için kullanışlıdır. Düşük rpm, ortam bileşenlerini karıştırmazken, yüksek rpm, elde edilen ürünlere ve bakteri hücrelerine zarar verir. Bu amaçla üç farklı çalkalayıcıda 100, 130, 150 rpm ayarlandı ve rpm optimizasyon deneyleri yapıldı. Fiziksel değişkenlerin optimum aralıkları, fiziksel parametre optimizasyonundan sabitlendi.

Besiyeri içerik optimizasyonu

Karbon kaynağı optimizasyonu

Karbon kaynağı optimizasyonu için literatür bilgilerine göre belirlenen bazı monosakkaritler, disakkaritler ve polisakkaritler (Glikoz, Maltoz, Galaktoz, Nişasta, Selüloz, Ksiloz, Laktoz) kullanılarak farklı besiyerleri hazırlandı. Karbon kaynakları Minimal besiyeri içeriğine her bir C kaynağından 2 g/L eklendi önceden optimize edilerek belirlenen pH değerine göre pH ayarı yapıldı ve otoklavlandı. Herhangi bir C kaynağı bulunmayan minimal besiyeri kontrol olarak kullanıldı. Üretim oranını en çok arttıran karbon kaynağı belirlendi ve izolatın ihtiyaç duyduğu optimum konsantrasyonu bulmak amacıyla belirlenen C kaynağından farklı konsantrasyonlarda (0,5, 1, 1,5, 2, 2,5 g/L) hazırlanarak konsantrasyon miktarı optimize edildi.

Azot (N) kaynağı optimizasyonu

N kaynakları, mikroorganizmaların çoğalması için gerekli proteinleri sentezlemesine yardımcı olur. Bunun için N kaynaklarından maya ekstraktı, amonyum sülfat, üre ve L-Glutamin azot kaynaklarından 2 g/L tartılarak minimal besiyeri içerisine eklendi ve otoklavlandı. (Besiyeri ortamında bulunan L-Glutamin hem indükleyici hem de N kaynağı olarak görev yapar). Kaydedilen verilerle N kaynağı belirlendikten sonra belirlenen N kaynağı kullanılarak farklı konsantrasyonlarda (0,5, 1, 1,5, 2, 2,5 g/L) besiyeri hazırlanarak optimum konsantrasyonu belirlendi. Deney esnasında minimal besiyeri de hazırlandı ve kontrol olarak kullanıldı.

L-Glutamin konsantrasyon optimizasyonu

L-Glutamin, protein sentezinde yer alan, esansiyel olmayan nötr polar amino asittir ve L-Glutaminaz üretimi için indükleyici görevi görür. Konsantrasyonun artması veya azalması üretimi etkilemektedir. Maksimum L-Glutaminaz üretimi için gereken optimum konsantrasyonu belirlemek amacıyla farklı konsantrasyonlarda (1, 3, 6, 9 g/L) L-glutamin içeren besiyerleri hazırlanarak otoklavlandı. Hazırlanmış olan besiyerleri içerisine önceden çoğaltılmış olan L-glutaminaz üreticisi izolat ön kültüründen inoküle edildi ve uygun koşullarda üretim sağlandı. Optimize edilerek belirlenen sürenin sonunda aktivite tayini yapılarak en iyi konsantrasyon miktarı belirlendi.

Plackett-Burman optimizasyonu

Bu çalışmada, *Pseudomonas iridis* E9'den L- Glutaminaz üretimini en üst düzeye çıkarmak için Plackett - Burman yöntemi kullanıldı. İstatistiksel optimizasyon deneylerini

gerçekleştirmek için Minitab yazılımı kullanıldı. Deney üretmek için değişkenlerin alt ve üst sınırlarının verildiği iki seviyeli faktöriyel bir düzenele bir deney tasarımı oluşturuldu. Bir orta nokta ile 11 değişken kullanılarak 13 farklı besiyeri ortamı belirlendi. Orta nokta sayısındaki artış hatayı en aza indirmektedir. Değişkenler; Glukoz, L- Glutamin, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, NaCl, MgSO₄·7H₂O, maya ekstraktı, pH, Sıcaklık, rpm ve zaman olmak üzere 11 farklı parametre olarak belirlendi. Tasarım tablosundan üretilen deneyler için nesslerizasyon yapıldı ve L- Glutaminaz aktivitesi hesaplanarak uygun besiyeri ortamı belirlendi. Plackett-burman programının oluşturduğu denklem aşağıda verildi.

$$\begin{aligned} \text{Glutaminaz} &= (6,959 + 2,990 \text{ Glukoz(g/L)}) - (0,1483 \text{ L-glutamin(g/L)}) - \\ (\text{IU/mL}) & (0,7832 \text{ Na}_2\text{HPO}_4(\text{g/L})) \\ & - (1,134 \text{ KH}_2\text{PO}_4(\text{g/L})) + (0,7152 \text{ NaCl(g/L)}) \\ & + (0,8567 \text{ Mg(SO}_4\text{)7H}_2\text{O(g/L)}) \\ & - (0,5267 \text{ Maya(g/L)}) - (0,3045 \text{ pH}) + (0,05421 \text{ Sıcaklık(}^\circ\text{C)}) \\ & + (0,01976(\text{ rpm/dk})) \\ & + (0,1002 \text{ Zaman(saatt)}) \end{aligned}$$

En Yüksek Konsantrasyonda L-Teanin Üretimi İçin Gerekli Parametrelerin Response Surface Methodology (RSM) ile İstatistiksel Optimizasyonu

RSM, istenilen bir çözüm bulmak için değişkenler arasındaki etkileşimleri ölçmeye yardımcı olur. RSM yöntemleri kullanılarak istenen çözeltinin maksimizasyonu veya minimizasyonu elde edilebilir (Anderson ve Whitcomb, 2016). Üretimi optimize etmek için Box-Behnken deneysel tasarım yöntemi (BBD) kullanıldı. BBD ile 3 farklı faktörün -1, 0 ve +1 seviyelerinde yanıt yüzey tasarımı oluşturuldu ve araştırılan her bir faktörün seviyeleri ve kodlanmış değerleri belirlendi (Tablo 14). L-teanin biyosentezi için önemli parametrelerinden olan etilamin, L-glutaminaz miktarı, sıcaklık ve pH bağımsız değişkenleri; olarak belirlenirken L-teanin miktarı bağımlı değişkendir. Tasarımda toplam 27 deney oluşturuldu ve tekrarlanabilirliğini test etmek için merkez noktası birkaç kez tekrarlandı. Tüm deneyler üç tekrar halinde gerçekleştirildi. Deneysel tasarımda, katsayıların belirlenmesinde, veri analizi ve grafiklerin çizilmesinde minitab 18 deneme sürümü kullanıldı. Modele ait eşitlik aşağıdaki gibidir:

$$\begin{aligned} Y &= 217010 - 380A + 16877B - 34699D - 5845C \\ &+ 117,3(A^2) + 351(B^2) + 2357(D^2) + 84,6(C^2) \\ &+ 378 (A \times B) + 250 (A \times D) - 117,2 (A \times C) - 2190 (B \times D) \\ &- 72 (B \times C) + 62 (D \times C) \end{aligned}$$

Eşitlikte verilen Y değeri, tahmin edilen yanıt yüzey fonksiyonu (L-teanin miktarı), A, B, C ve D bağımsız değişkenleri göstermektedir;

Tablo 14. Box-Behnken Tasarım İle Test Edilen Faktörlerin Düzeyleri (L-Teanin Biyosentezi)

Sembol	Bağımsız değişkenler (L-Teanin)	Unit	Derecelerin kodlanmamış değerleri		
			-1	0	1
A	Etilamin	°C	0,5	5,0	10,0
B	L-glutaminaz miktarı		1	3	5
C	Sıcaklık		40	30	45
D	pH		8	9	11

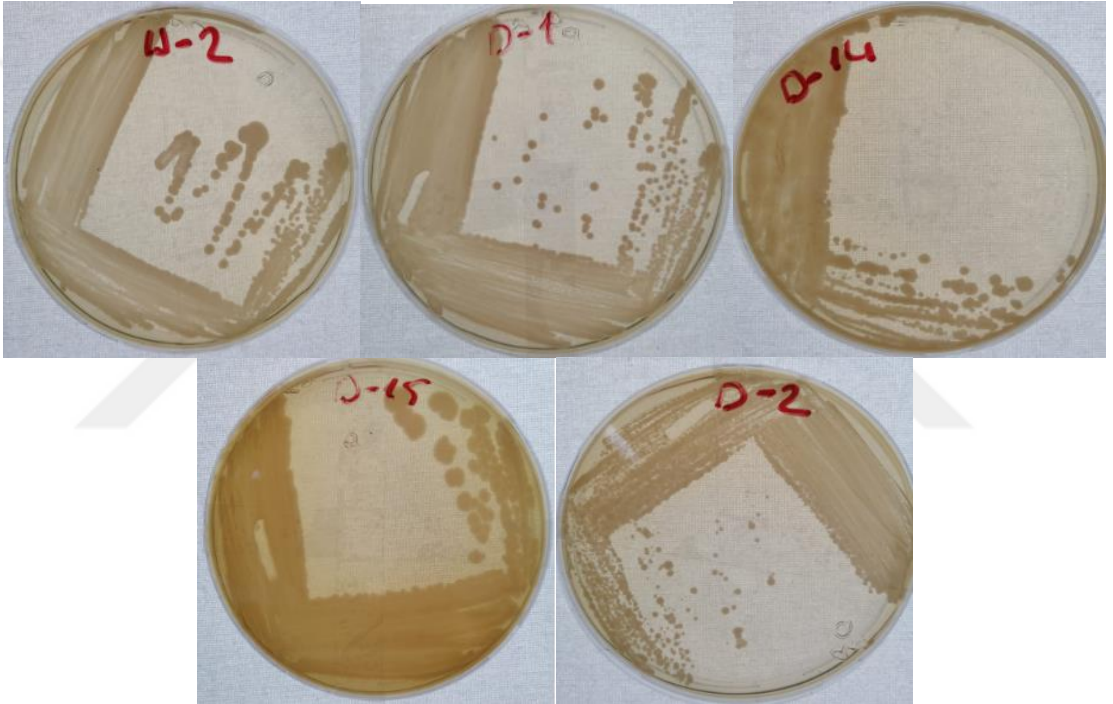
İstatistiksel Analiz

Besiyeri optimizasyon deney sonuçlarının istatistiksel değerlendirmesinde GraphPad Prism version 5.0 (GraphPad Software, San Diego California USA) istatistik programı kullanıldı. HPLC ve LC-MC analizleri hariç tüm analizler üç tekrarlı olacak şekilde yapıldı. Birbirinden bağımsız olarak yapılan üç deney tekrarının ortalaması ($\pm$) ve standart sapması (SD) olarak ifade edildi. İstatistiksel Optimizasyon verileri Plackett – Burman ve Response Surface Methodology (RSM) yöntemiyle deneme planı oluşturuldu ve Minitab 18 yazılımı kullanıldı.

ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Mikroorganizmaların İzolasyonu

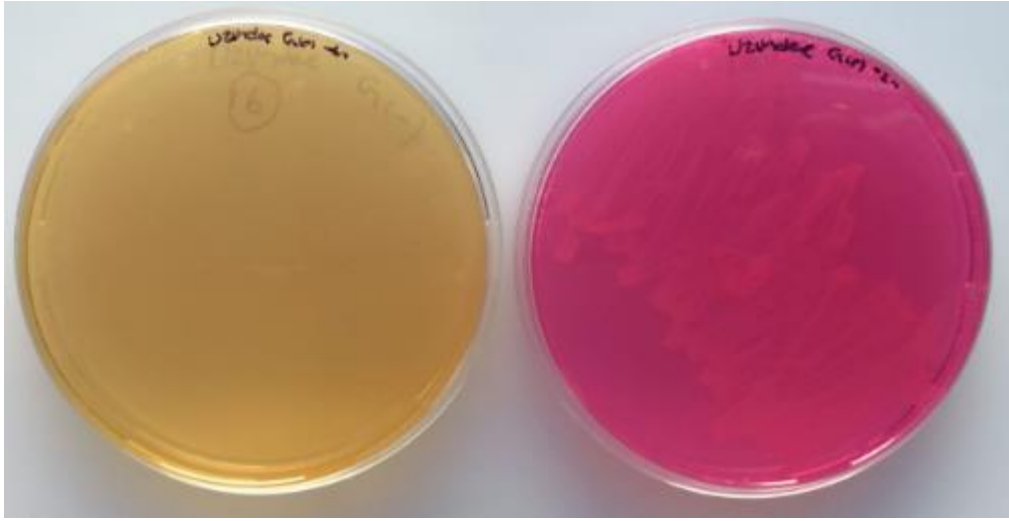
Bu çalışma kapsamında Türkiye'nin farklı bölgelerinde bulunan farklı illerin çeşitli bölgelerinden (Adana, Erzurum, Gümüşhane, Manisa, Urfa, Trabzon, Van) temin edilen toprak örneklerinden toplam 132 adet bakteri izole edildi. İzolatların L- glutaminaz üretim potansiyellerine bakılmak üzere her bir saf koloni fenol red içerikli petrilere inoküle edildi. Saf kültürleri izole edilen bakterilere ait bazı petri görüntüleri Şekil 10'da verildi.



Şekil 10. L-Glutaminaz Birincil Tarama Yönteminde L- Glutaminaz Üreticisi Olduğu Belirlenen Suşların Petri Görüntüleri

L-glutaminaz enziminin kalitatif analizi

Toprak numunelerinden izole edilen bakteriler Tablo 3'te anlatıldığı şekilde hazırlanan MSG besi yerlerine wel difüzyon metodu kullanılarak inoküle edildi ve 30°C'de 24-48 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. 24. saat ve 48. saat sonunda sarı renkten pembe renge dönüşen petrilerin görüntüleri kaydedildi. Yapılan incelemeler sonucunda, izole edilen 132 adet bakteriden 76 tanesinde belirgin renk dönüşümü olduğu gözlemlendi (Şekil 11).



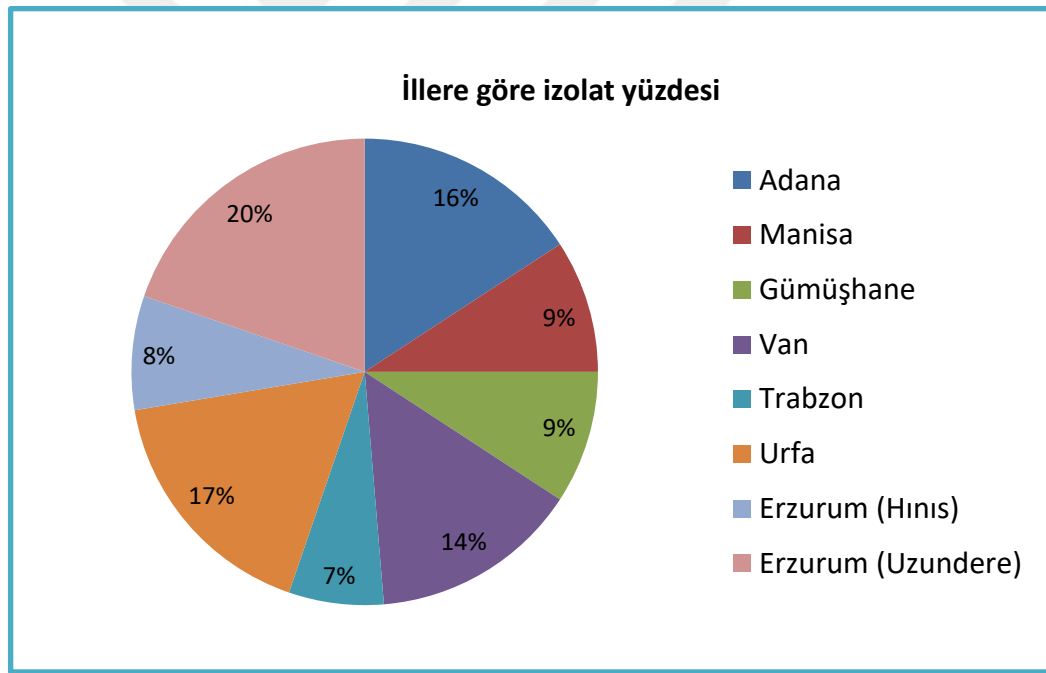
Şekil 11. L-glutaminaz pozitif ve negatif bakteri petri görüntüsü.

L-Glutaminaz Enziminin sıvı kültürde üretimi

Toprak numunelerinden izole edilen ve fenol red içerikli petrilere pembe renk dönüşümünü sağlayan izolatlar, rengin koyuluğu ve renk dönüşüm hızı göz önünde bulundurularak ayrıştırıldı. Seçilen izolatlar L-glutaminazın kantitatif analizinin belirlenmesi amacıyla Minimal Glutamin sıvı besiyerinde L-glutaminaz enzim üretimi sağlandı. Her bir kültür içinde 30°C’de 120 rpm’de çalkalamalı inkübatörde enzim üretimi sağlandı. Daha sonra bu kültür sıvılarından 24 saat aralıklarla 1’er mL örnek alınarak yöntem bölümünde anlatıldığı şekilde aktivite tayini yapıldı ve enzim miktarı kantitatif olarak analiz edildi. Bu işlem aktivite düşünceye kadar devam ettirildi. Yapılan kantitatif analizler sonucunda 76 olan izolat sayısı sıvı kültürde enzim üretim durumuna göre 40’a düşürüldü (Tablo 15). Bu taramalar sonucunda elde kalan toplam 40 adet bakteri izolatının her birine “E” ile başlayan kodlar verildi ve kullanılıncaya kadar -86 °C’de muhafaza edildi. Toprak numunelerinden izole edilen bakterilerin temin edildiği toprak ortam lokasyonları ve izolat sayıları Şekil 12’da verildi.

Tablo 15. İzole Edilen Bakteri Sayılarının Lokasyonlara Göre Dağılımı.

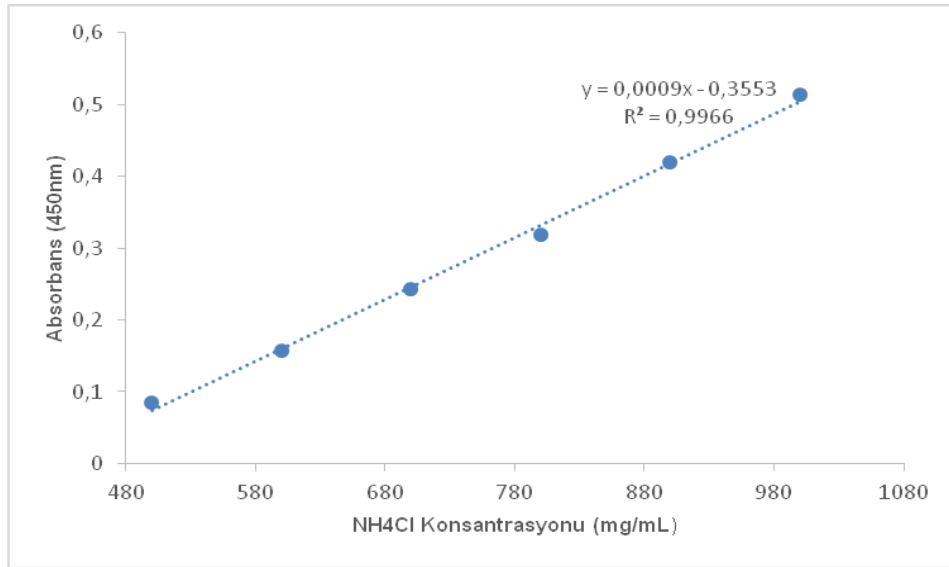
Lokasyon	Konum Koordinatları	İzolat Sayısı	L-GS (+) izolat sayısı (Kalitatif)	L-GS (+) izolat sayısı (Kantitatif)
Adana	37°02'43.5"N 35°49'26.1"E	15	12	6
Uzundere	40°32'10.9968"N 41°32'53.9952"E	16	6	5
Hınıs	39°21'34.7"N 41°42'33.9"E	21	15	10
Gümüşhane	40°11'22.0"N 39°07'36.0"E	13	7	3
Manisa	38°44'53.6"N 28°24'15.4"E	18	7	4
Urfa	37°45'00.0"N 39°19'00.0"E	17	13	4
Trabzon	40°37'09.5"N 40°17'42.0"E	9	5	2
Van	38°44'11.94"N 44°07'36.44"E	23	11	6
Toplam		132	76	40



Şekil 12. Bakterilerin izole edildikleri toprak ortamları ve izolat sayıları

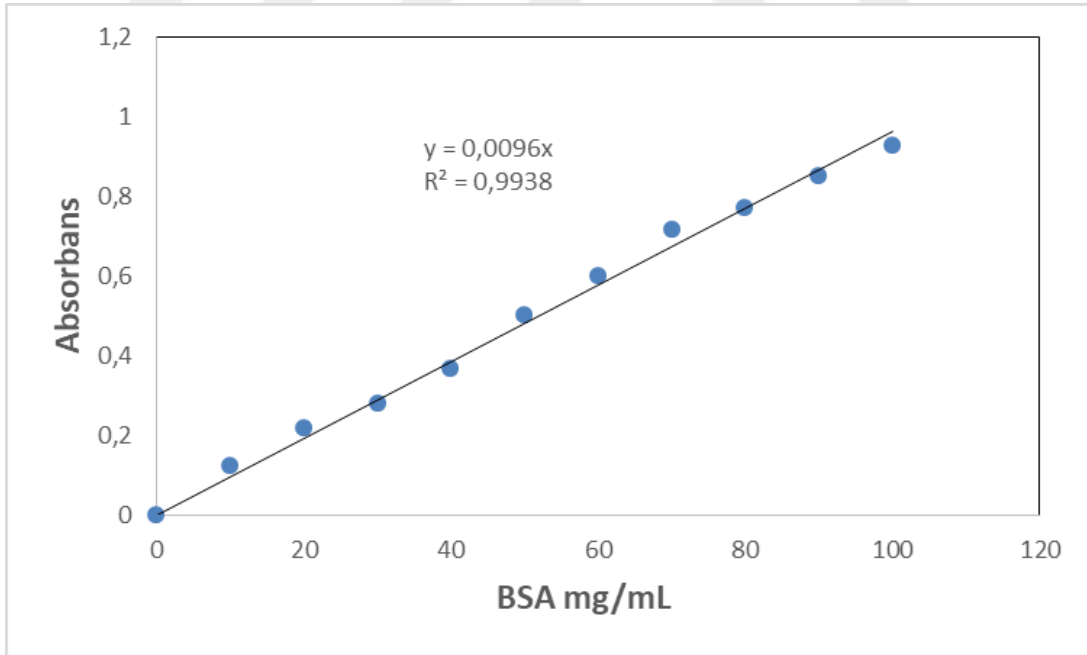
L-Glutaminaz Aktivitesi Hesaplamasında Kullanılan Amonyum Standart Grafiği

Enzim aktivitesinin hesaplanmasında kullanılan amonyum standart grafiği yöntem bölümünde anlatıldığı gibi hazırlanmış ve standart çözeltileri mg/mL amonyum klorüre (NH_4Cl) karşılık gelen absorbans değerleri kaydedilmiştir. Kaydedilen değerler ve amonyum klorür konsantrasyon miktarları kullanılarak bir lineer grafik çizildi ve bu grafiğin eğim değeri kullanılarak enzim ünite hesabı yapıldı (Şekil 13).



Şekil 13. L-glutaminaz aktivitesi için standart amonyum grafiği

Araştırma boyunca elde edilen enzim çözeltililerindeki kantitatif protein tayini Bradford yöntemiyle belirlendi. Bu amaçla yöntem bölümünde anlatıldığı gibi standart grafik hazırlandı. Protein tayinine ait standart grafik Şekil 14’de verilmiştir. Sıvı kültürde üretilen enzimlerin inkübasyon sonrası kültür üst sıvısı santrifüj edilerek ayrıştırılan homojenatların kantitatif protein tayini bu standart grafikten faydalanılarak hesaplandı.



Şekil 14. Kantitatif protein tayini için kullanılan standart grafik

Taramalar sonucu elde edilen bakteri izolatları L-teanin üretiminde kullanılmak üzere stoktan alınarak TSA petrilere well difüzyon yöntemiyle ekilerek canlandırıldı. Canlandırılan bakteriler TSB içerikli besiyerine aktararak ön kültür hazırlandı. Hücrelerin yeterli sayıya ulaştığı her bir ön kültür sıvısından 1’er mL alınarak MGM besiyerine inoküle

edildi ve 72 saat boyunca çalkalamalı inkübatörde enzim üretimi sağlandı. İnkübasyon süresinin sonunda her bir kültür sıvısı santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlardan enzim aktivitesi ve protein miktarı hesaplanarak kantitatif tayin yapıldı. Elde edilen sonuçlara göre enzim miktarı, protein miktarı ve spesifik aktivite hesaplandı. Belirlenen veriler değerlendirilerek en yüksek aktiviteyi veren izolatlar belirlenerek L-teanin üretiminde kullanılmak üzere ayrıldı. Ayrıştırılan izolat kodları, temin edildikleri lokasyonlar ve aktivite sonuçları Tablo 16’da verilmiştir.

Tablo 16. En Yüksek Aktivitede Enzim Üretimi Sağlayan İzolatlar ve Analiz Sonuçları

İzolat Kodu	Lokasyon	Kültür ortamı	OD(450nm)	Aktivite (EU/mL)	Protein Miktarı (mg protein/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg protein)
E1	Urfa	MGM	0,911	13,938	21,417	0,65
E2	Van	MGM	0,557	8,522	20,411	0,42
E5	Van	MGM	0,658	10,067	18,231	0,55
E6	Uzundere	MGM	0,666	10,189	10,211	1,00
E7	Uzndere	MGM	0,527	8,063	21,032	0,38
E9	Uzundere	MGM	1,047	16,019	25,321	0,63
E10	Hınıs	MGM	0,512	7,833	4,235	1,85
E11	Urfa	MGM	0,954	14,596	25,368	0,58
E12	Urfa	MGM	0,511	7,803	5,222	1,49
E15	Hınıs	MGM	0,531	8,109	5,698	1,42
E16	Adana	MGM	0,496	7,588	4,981	1,52
E17	Van	MGM	0,722	11,046	6,321	1,75
E20	Van	MGM	0,726	11,107	6,322	1,76
E23	Manisa	MGM	0,408	6,242	2,114	2,95
E24	Manisa	MGM	0,425	6,502	2,365	2,75
E26	Trabzon	MGM	0,455	6,961	2,658	2,62
E28	Giresun	MGM	0,425	6,502	3,012	2,16
E30	Adana	MGM	0,668	10,220	5,314	1,92
E32	Adana	MGM	0,756	11,566	6,325	1,83
E33	Adana	MGM	0,53	8,109	7,365	1,10
E34	Uzundere	MGM	0,756	11,566	8,001	1,45
E35	Uzundere	MGM	0,865	13,234	21,123	0,63
E36	Uzundere	MGM	0,756	11,566	20,114	0,58
E37	Van	MGM	0,635	9,715	11,258	0,86
E38	Uzundere	MGM	0,654	10,006	8,003	1,25

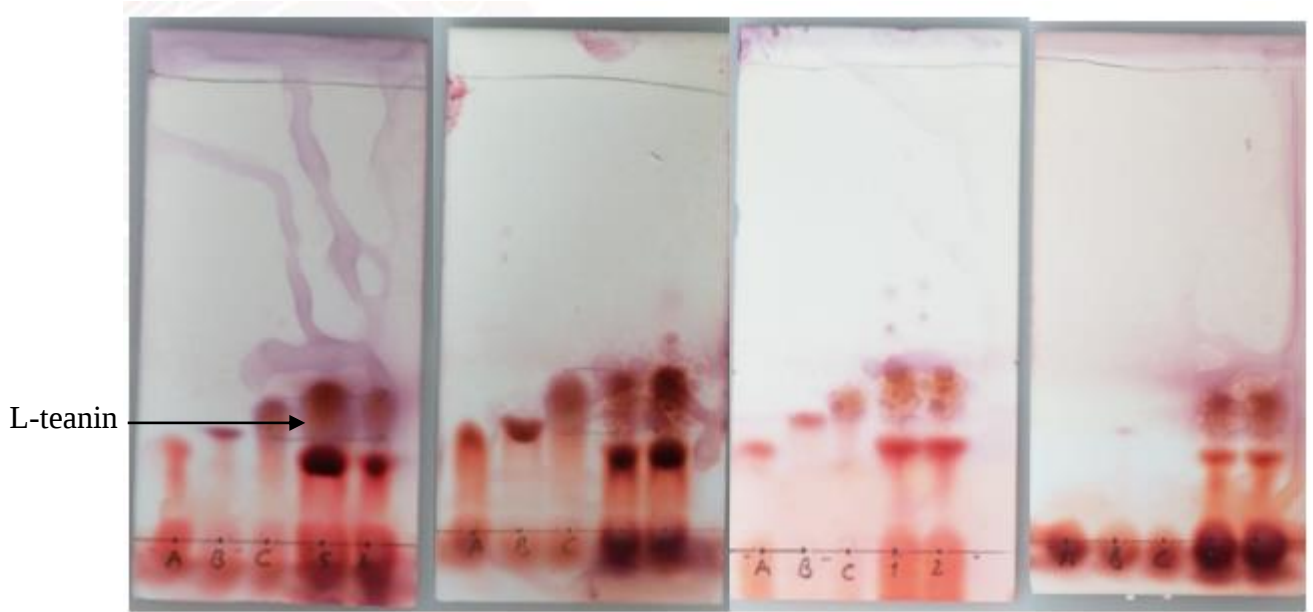
Bu tez çalışması kapsamında; Türkiye'nin farklı bölgelerinden temin edilen toprak numuneleri kullanılarak L-glutaminaz üreticisi yeni mikrobiyal kaynak araştırıldı. Yapılan petri taramaları sonucunda L-glutaminaz üretebilen 40 bakteri izole edildi. Bu bakteriler kullanılarak L-glutamin içeren sıvı besiyerinde kültüre edildi ve E9 kodlu bakterinin 16,019 EU/mL l-glutaminaz ekstraselüler olarak ürettiği kaydedildi. Literatürde benzer çalışmalar incelendiğinde Soren *et al.* (2020) yaptıkları bir çalışmada L-glutaminaz üretimi için Hindistanın Kharagpur kentinden temin ettikleri toprak numuneleri ile çalışmışlar ve PJB1 kodu verdikleri bakteriden sıvı kültürde 19,36 EU/mL l-glutaminaz üretmişlerdir. 2021'de yapılan başka bir çalışmada (Awad *et al.*) L-glutaminaz üreticisi mikroorganizma taraması için toprak numuneleri ile çalışmışlar ve Faesay kodu verdiği 6 adet mantar izole etmiş ve bu mantarlar kullanılarak katı hal fermentasyon yöntemiyle 11,23 EU/mL L-glutaminaz ekstraselüler olarak üretmişlerdir. Yine başka bir çalışmada Shuai *et al.* (2019) L-glutaminaz üreticisi bakteri izolasyonu için bir petrol sahasından (Jiangsu Petrol Sahası, Yancheng, Jiangsu, Çin) alınan petrol/salamura karışımı toprak numuneleri ile çalışmışlar ve SP kodları verdiği 12 adet bakteri izole etmişlerdir. Bu bakterilerden SP001 kodu verdikleri bakteri kullanarak 0,28 EU/mL L-glutaminaz ekstraselüler olarak üretmişlerdir. Literatürle karşılaştırıldığında bu çalışmada üretilen enzimin literatüre yakın ve bazı çalışmaların sonuçlarından yüksek olduğu görüldü.

L-Teanin Biyosentezi

Biyotransformasyon yoluyla L-teanin sentezi yapılan literatür incelemeleri sonucunda belirlenen biyotransformasyon şartlarında (3 mL enzim süpernatantı, 200 mM L-glutamin, 1 M g/L etilamin 5 mL Tris-HCl (pH 9,0) , 30 ° C de 150 rpm / dak çalkalamalı etüvde 8 saat) L-teanin biyosentez işlemi gerçekleştirildi. Bu işlem için önceden belirlenen 25 adet farklı izolatlardan izole edilen L-glutaminaz enzimi biyokatalizör olarak kullanıldı. Reaksiyon süresinin sonunda elde edilen süpernatantlar TLC ile kalitatif, HPLC ve LC-MC ile kantitatif olarak tayin edilmek üzere +4 ° C muhafaza edildi.

TLC ile L-Teaninin Kalitatif Tayini

İnce tabaka kromatografisi (TLC), bir karışımdaki bileşikleri ayırmak için kullanılan afinite temelli bir yöntemdir. TLC, hem kalitatif hem de kantitatif numune analizi için yaygın olarak kullanılan çok yönlü bir ayırma yöntemidir. Yötem sonucunda seçilen suşlardan L-teanin üretimi kalitatif (var-yok) olarak belirlendi (Şekil 15).



Şekil 15. L-teaninin kalitatif tayini, A: L-glutamin, B: L-Glutamik Asit, C: L-teanin L-teanin (+) numuneler (Sırasıyla E11, E5, E28, E9, E11, E12, E33 ve E37).

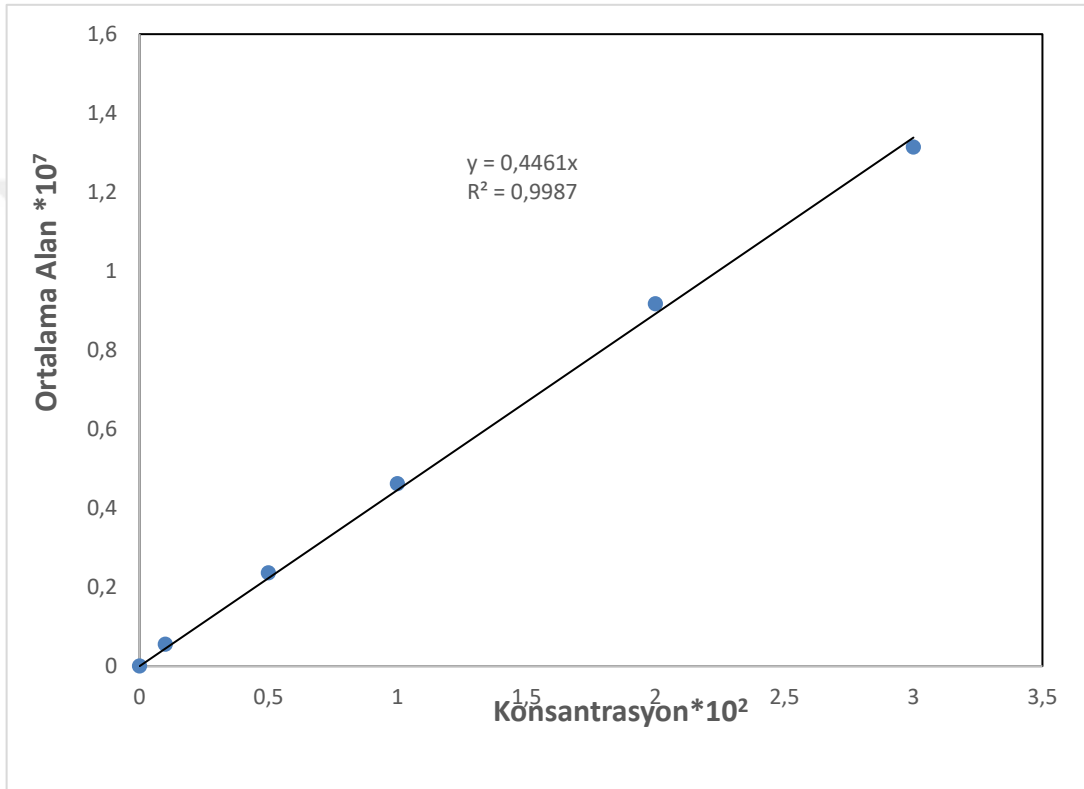
Yapılan TLC sonuçlarına göre kontrol olarak kullanılan L-teanin ile aynı konumda zon veren numuneler pozitif olarak kabul edildi ve zonların çap büyüklüğüne göre L-teanin miktarı değerlendirildi. Bu değerlendirmeler sonucunda 25 olan izolat sayısı 21'e düşürüldü ve 21 adet izolattan elde edilen L-glutaminaz enzimleri kullanılarak L-teanin biyosentezi gerçekleştirildi. Biyosentez süresinin sonunda üretim solüsyonu santrifüj edildi ve elde edilen süpernatantlar herbir izolat kodu ve sayısı ile etiketlenerek HPLC sisteminde değerlendirilmek üzere +4 °C'ye kaldırıldı.

HPLC ile L-Teaninin Kalitatif ve Kantitatif Tayini

İzolatların L-teanin üretim potansiyelleri, yapılan HPLC analizi sonucunda belirlendi. Bu amaçla öncelikle analizin gerçekleşebilmesi için standart kalibrasyon eğrisi hazırlandı. Standart olarak $\geq$ % 96 saflıktaki L-teanin standardı kullanıldı. Daha sonra yine L-teanine ait kromatogram görüntüsü elde edildi ve ölçümü yapılan izolatların da L-teanin içeriği kantitatif olarak hesaplandı. Bu doğrultuda referans olarak; L-teanin kalibrasyon eğrisi ve L-teanin standardına ait kromatogram görüntüsünden yararlanıldı. Sonuçlar; ppm olacak şekilde kantitatif bir değerle ortaya konuldu. Analiz; İlk taramalarla elde kalan 21 izolatlardan elde edilen enzim biyokatalizörlüğünde sentezlenen L-teanin reaksiyon çözeltilerine uygulandı. Bu 21 izolata ait L-teanin üretiminin HPLC ile belirlenen kantitatif sonuçları Tablo 18'de verildi. HPLC sonuçları incelendiğinde 21 numuneden 4 tanesinde standart numune ile aynı sürelerde pik verdiği ve yüksek konsantrasyonda üretim olduğu görüldü (Şekil 17-20). Seçilen bu 4 izolat konvansiyonel ve moleküler olarak tanılanmak üzere ayrıştırıldı.

Tablo 17. L-Teanin analizi için hazırlanan standart çözeltiler ve konsantrasyon oranları.

	Konsantrasyon	Ortalama Alan	Alan
1	10	55322	55322
2	50	23578	23578
3	100	461503	461503
4	200	916981	916981
5	300	131393	131393

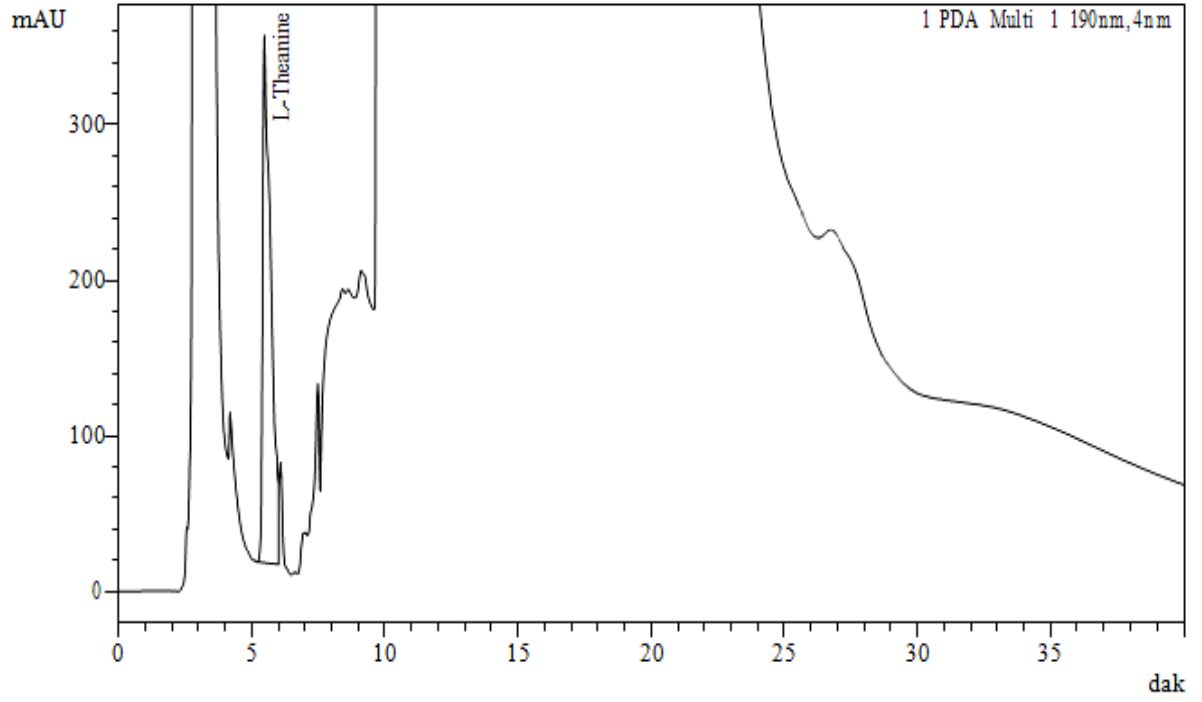


Şekil 16. L-Teanin analizi için hazırlanan standart çözeltiler baz alınarak çizilen kalibrasyon eğrisi

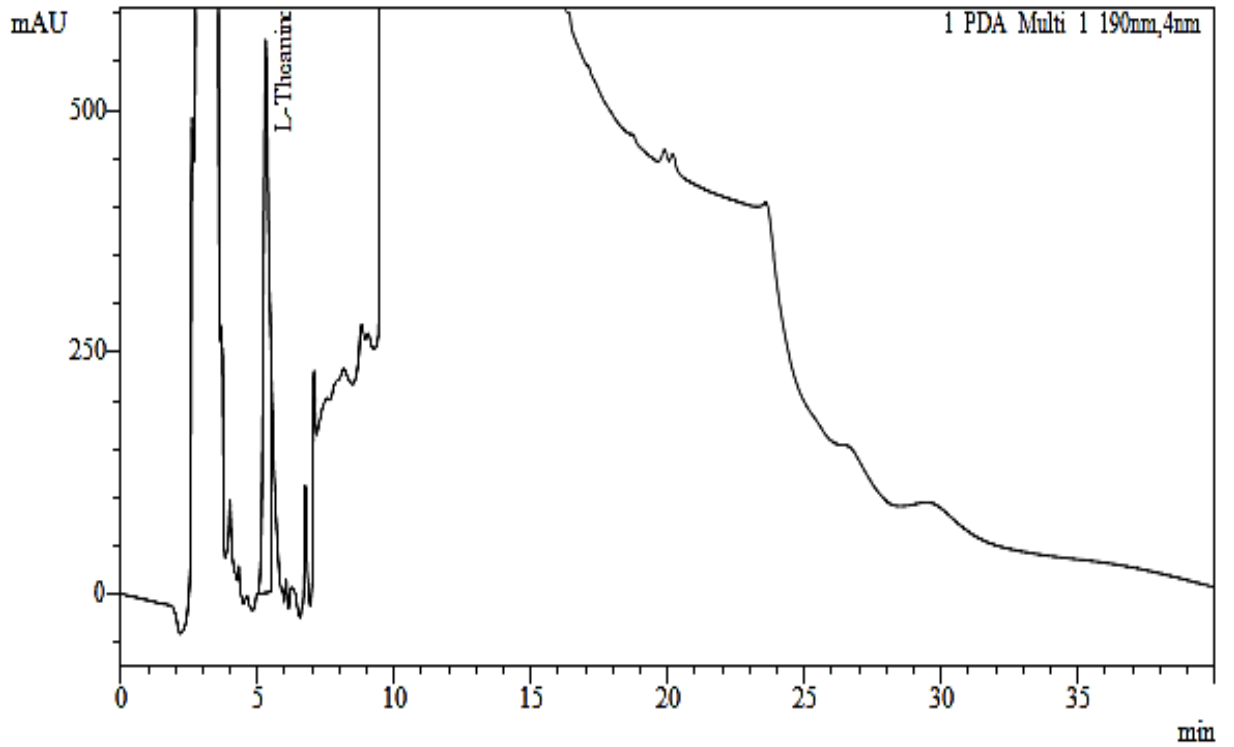
Tablo 18. Toprak numunelerinden izole edilen 21 farklı suş kullanılarak üretilen L-teaninin HPLC sonuçları.

İzolat Kodu	L-Teanin (ppm)
E-3	125,020
E-4	116,153
E-5	157,581
E-9	178,533
E-10	110,155
E-11	167,294
E-12	166,436
E-15	116,740
E-16	131,391
E-17	11,655
E-20	97,947
E-23	84,335
E-24	79,052
E-26	116,701
E-28	131,489
E-32	166,436
E-33	144,112
E-35	4,593
E-36	129,891
E-37	110,155
E-38	143,389
Avaraj	121,334
%RSD	30,654
Max	178,533
Min	4,593
Standart	37,194

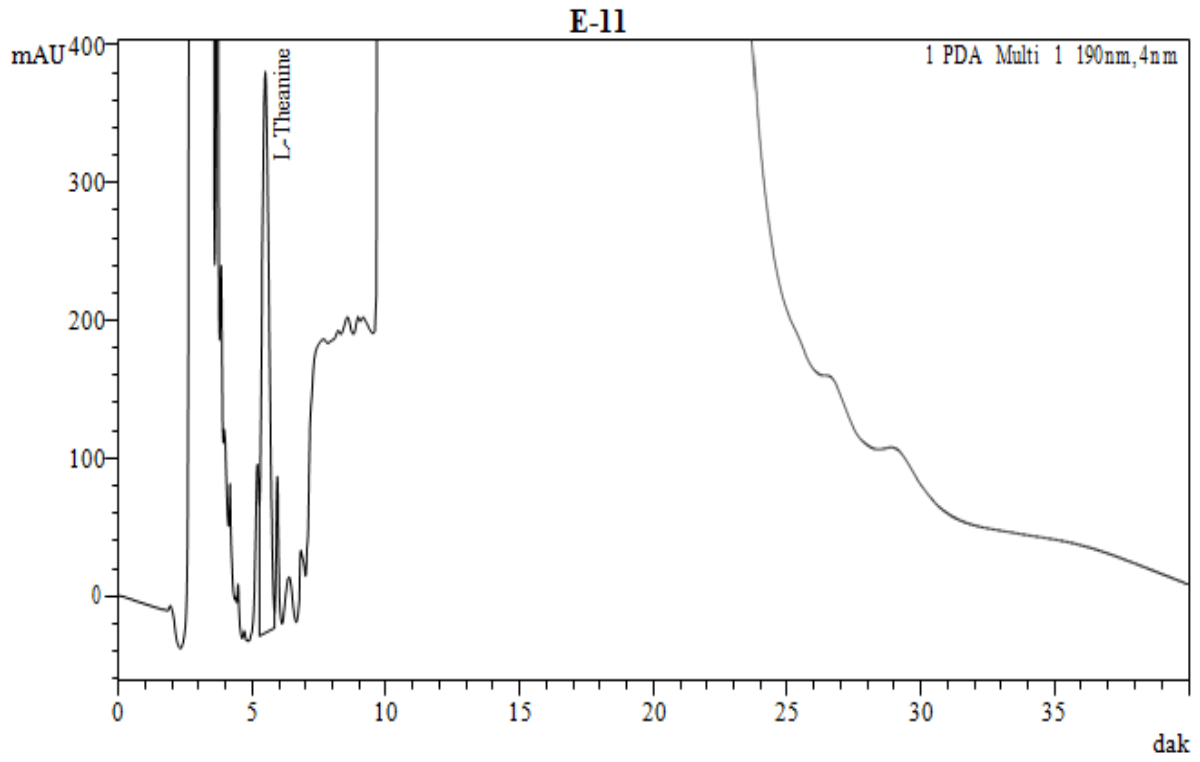
E-5



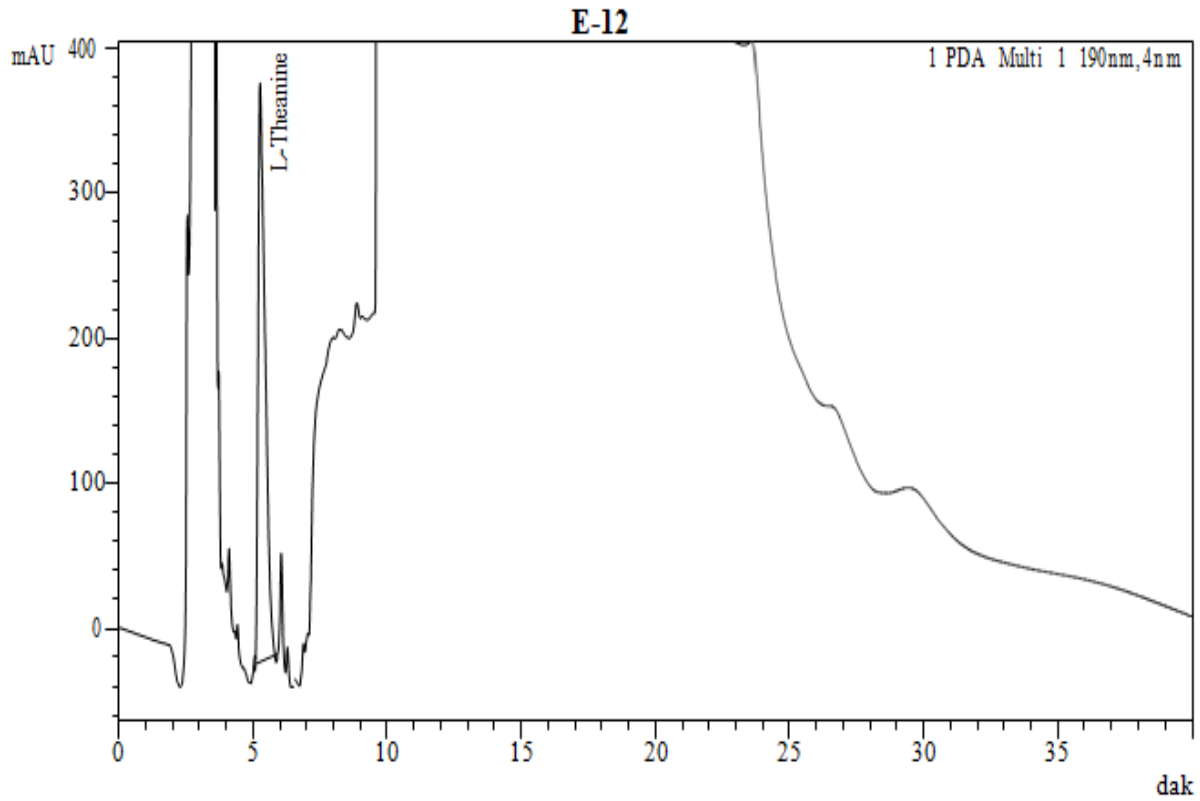
Şekil 17. E-5 kodlu suş kaynaklı L-glutaminaz kullanılarak üretilen L-teaninin HPLC kromotogramı.



Şekil 18. E9 kodlu suş kaynaklı L-glutaminaz kullanılarak üretilen L-teaninin HPLC kromotogramı.



Şekil 19. E-11 kodlu suş kaynaklı L-glutaminaz kullanılarak üretilen L-teaninin HPLC kromotogramı.



Şekil 20. E-12 kodlu suş kaynaklı L-glutaminaz kullanılarak üretilen L-teaninin HPLC kromotogramı.

En Yüksek Konsantrasyonda L- Teanin Üretimini Sağlayan L-Glutaminaz Üreticisi İzolatların Morfolojik, Fizyolojik Ve Biyokimyasal Özelliklerinin Araştırılması

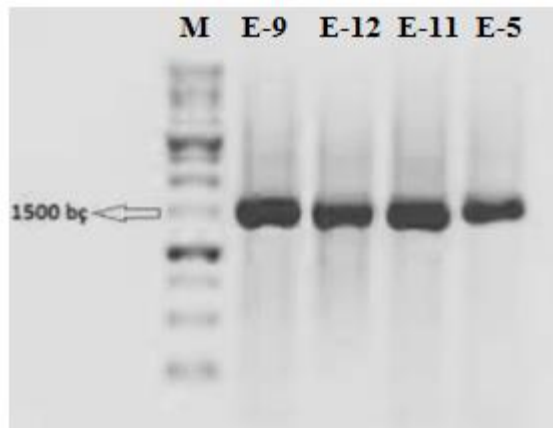
HPLC sonuçlarına göre belirlenen test suşlarının morfolojik görünüşleri tipik görünümüldür. Gram özelliklerine bakıldığında E-12 ve 5 kodlu izolatın Gram (+), E-11 ve 9 kodlu izolatların ise G(-) özellik gösterdiği görülmüştür. Gelişebildikleri tuz konsantrasyon sonuçlarına bakıldığında 4 izolatın da %5 ve %10 lik tuz konsantrasyon aralığında gelişebildiği görüldü. İzolatların gelişebildikleri sıcaklık değerlerinin 25-45 °C olduğu kaydedildi. İzolatların katalaz ve oksidaz özelliklerine bakıldığında E-5 kodlu bakteri hariç diğerlerinin (+) sonuç verdiği görüldü (Tablo 19).

Tablo 19. İzolatların Morfolojik, Fizyolojik ve Biyokimyasal Test Sonuçları

Stok kodu	Gram	Morfoloji	Tuz konsantrasyonu %	pH toleransı	Sıcaklık (°C)	Oksidaz	Katalaz
E-12	+	Çubuk	5-9	5-9	25-45	+	+
E-11	-	Çubuk	5-9	5-9	25-45	+	+
E-5	+	Çubuk	5-9	5-9	25-45	-	-
E-9	-	Çubuk	5-9	5-9	25-45	+	+

En Yüksek Konsantrasyonda L- Teanin Üretimini Sağlayan L-Glutaminaz Üreticisi 4 İzolatın Moleküler İdentifikasyonu

Tez kapsamında bu aşamaya kadar yürütülen çalışmalar sonucunda yüksek konsantrasyonda L-teanin üretimi sağlayan 4 izolat (E-12, E-11, E-5 ve E9) son olarak moleküler olarak identifiye edildi. Bu amaçla 16S rRNA dizi analizi yöntemi kullanıldı.

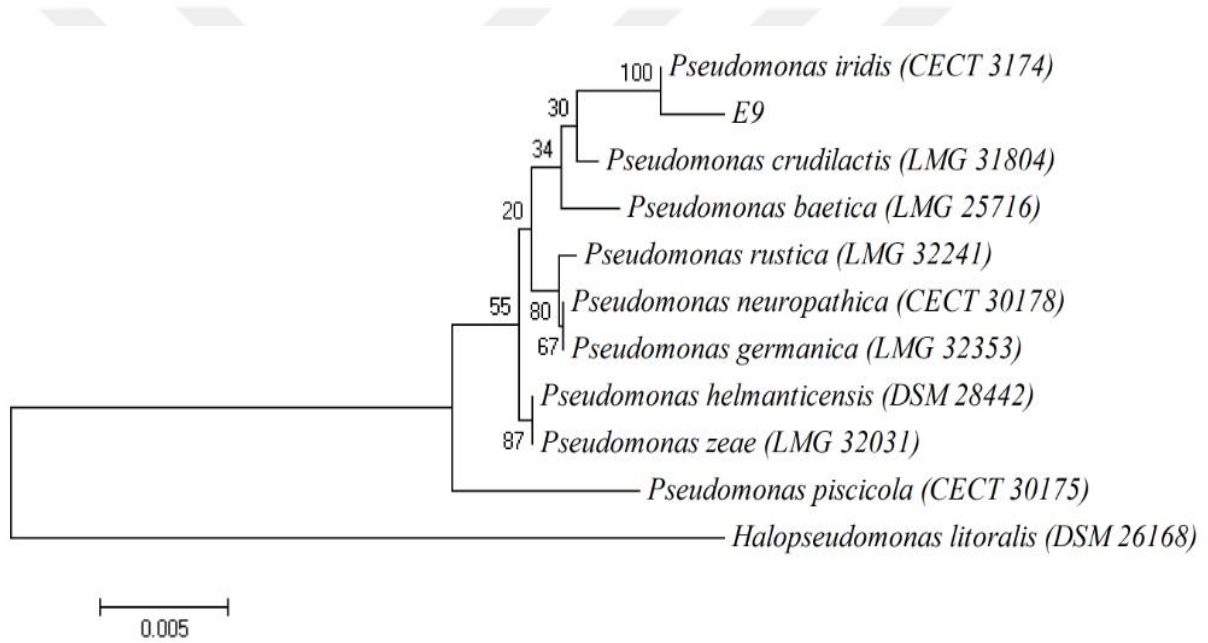


Şekil 21. 16S rRNA PCR jel görüntüsü

İzolatların identifiye edilebilmesi için 16S rRNA gen bölgesi çoğaltılarak sekansa gönderildi. Yapılan sekans okuması sonrasında bakteri tür düzeyinde tanımlandı (Tablo 20).

Tablo 20. İzolatların 16S rRNA Dizi Analiz Sonuçları

İzolat Kodu	İzolat İsmi	Benzerlik Oranı	Genbank Numaraları
ZV-1	<i>Bacillus arachidis</i>	%99	PP819540
ZV-11	<i>Aeromonas media</i>	%99	PP819513
ZV-15	<i>Lysinibacillus parviboronicapiens</i>	%99	PP819541
ZV-37	<i>Pseudomonas iridis</i>	%99	PP828586



Şekil 22. Erzurum Uzundere'den alınan toprak örneğinden izole edilen E9 suşunun 16S rRNA gen analiz sonuçları esas alınarak oluşturulan Neighbor-joining filogenetik ağacı.

Toprak numunelerinden izole edilen bakterilerin 16S rRNA dizi analiz sonuçları değerlendirildiğinde E-9 bakterisinin *Pseudomonas iridis* türüne %99 oranında benzerlik gösterdiği kaydedildi. *Pseudomonas iridis* E9 suşu kullanılarak L-teanin üretimi yapıldı. Literatürde benzer çalışmalar incelendiğinde Zhu *et al.* 20022'de yaptıkları bir çalışmada, topraktan bakteri taramışlar ve en yüksek (%87,45) verimde üretimi *Bacillus subtilis* BSFT suşu ile sağlamışlardır. 2019'da yapılmış başka bir çalışmada (Ma *et al.* 2019) fermentatif L-teanin üretimi için *Corynebacterium glutamicum* bakterisini kullanmışlar ve %19,6 verimle 42 g/L L-teanin üretmeyi başarmışlardır. Yao *et al.* 2020'de yaptıkları bir çalışmada *Escherichia coli* bakterisinden sentezlettikleri γ -Glutamylcysteine synthetase (γ -GCS)

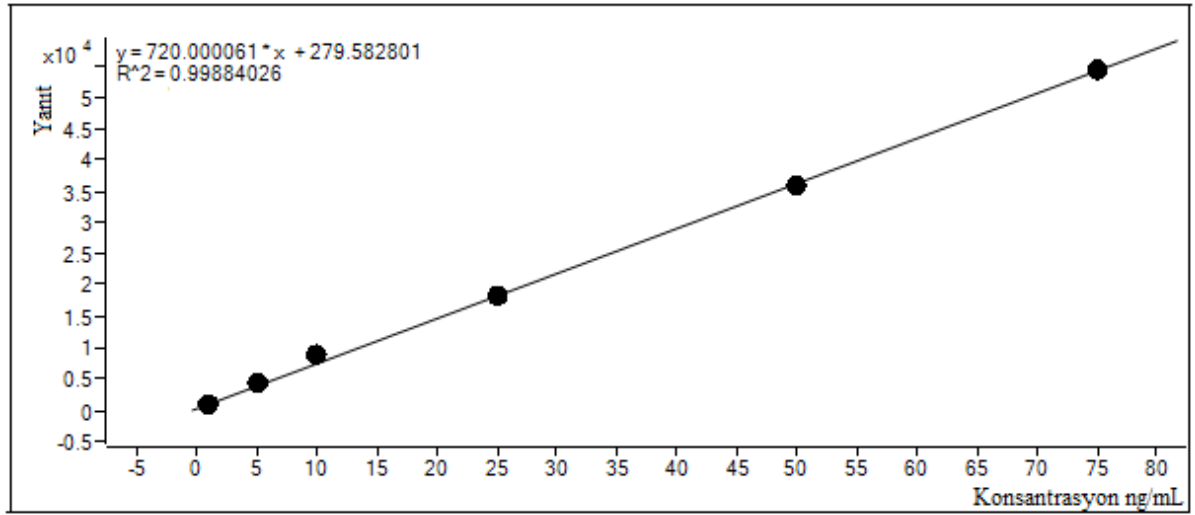
enzimini kullanarak %87,1 verimle L-teanin üretimini sağlamışlardır. Shuai *et al.* (2019) yaptıkları bir çalışmada topraktan izole ettikleri *Pseudomonas nitroreducens* SP.001 bakterisinin intraselüler olarak sentezlediği L-glutaminaz enzimini kullanarak %66,1 verimle 45,1 mmol/h.L L-teanin ürettiklerini bildirmişlerdir. Literatür incelendiğinde *Pseudomonas iridis* E-9 bakterisinin L-teanin üretimi için daha önce hiç kullanılmadığı ve ilk kez bu tez çalışması kapsamında çalışıldığı görüldü.

Kullanılarak Üretilen L-Teaninin LC-MC ile Kalitatif ve Kantitatif Tayini

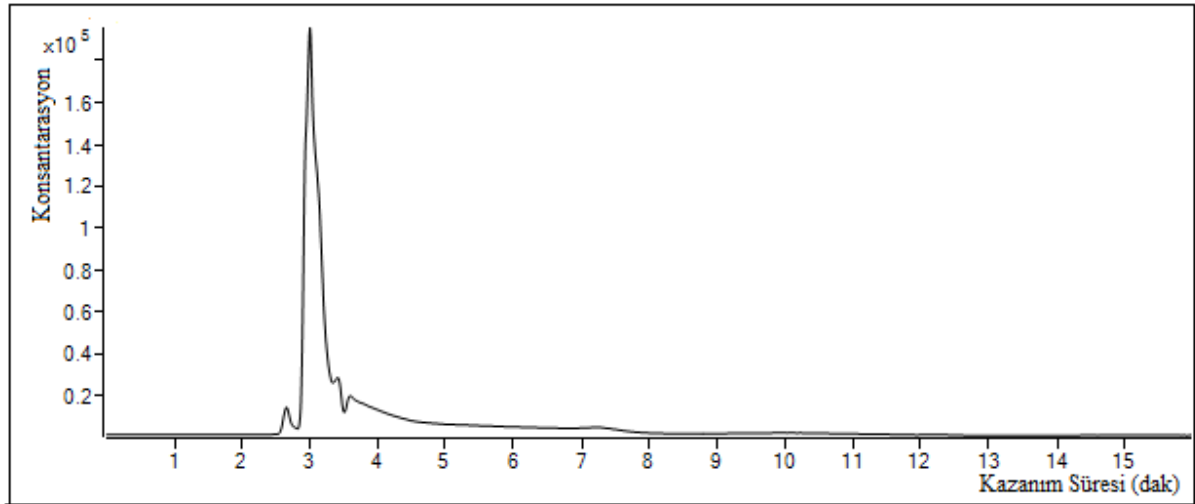
Pseudomonas iridis E9 bakterisi kullanılarak üretilen L-teaninin miktarı yapılan LC - MC analizi sonucunda belirlendi. Bu amaçla öncelikle analizin gerçekleştirilmesi için standart kalibrasyon eğrisi hazırlandı (Şekil 23). Standart olarak $\geq$ % 96 saflıktaki L-teanin standardı kullanıldı. Daha sonra L-teanine ait kromatogram görüntüsü elde edildi (Şekil 24) ve ölçümü yapılan izolatin da L-teanin içeriği kantitatif (ng/mL) olarak hesaplandı. Bu doğrultuda referans olarak; L-teanin kalibrasyon eğrisi ve L-teanin standardına ait kromatogram görüntüsünden yararlanıldı. Sonuçlar; ng/mL olacak şekilde kantitatif bir değerle ortaya konuldu. Analiz; *Pseudomonas iridis* E9 bakterisi ile üretilen enzim biyokatalizörlüğünde sentezlenen L-teanin reaksiyon çözeltilerine uygulandı. *Pseudomonas iridis* E9 bakterisine ait L-teanin üretiminin LC - MC ile belirlenen kantitatif sonuçları hesaplandı. LC – MC sonuçları incelendiğinde *Pseudomonas iridis* E9 bakterisi kullanılarak (0,025g/L) L-teanin üretimi sağlandığı kaydedildi. L- teaninin üretim miktarının ve üretim veriminin artırılması amacıyla besiyeri optimizasyonu ve üretim parametrelerinin optimizasyon çalışmaları yapıldı.

Tablo 21. L-Teanin Analizi İçin Hazırlanan Standart Çözeltiler ve Konsantrasyon Oranları

	Konsantrasyon	Yanıt	RF
1	1,0000	1008	1008,2008
2	5,0000	4529	905,7413
3	10,0000	8871	887,1144
4	25,0000	18359	734,3541
5	50,0000	35916	718,3199



Şekil 23. L-Teanin analizi için hazırlanan standart çözeltiler baz alınarak çizilen kalibrasyon eğrisi



Şekil 24. E9 kodlu suş kaynaklı L-glutaminaz kullanılarak üretilen L-teaninin LC - MC kromatogramı.

Optimizasyon Çalışmaları

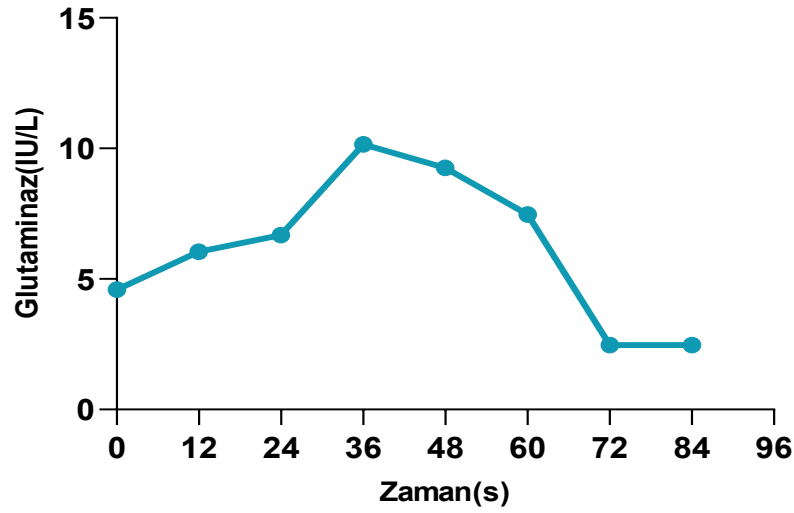
Besiyeri optimizasyonu

Fiziksel değişken optimizasyonu (Zaman, pH, Çalkalama Hızı (rpm/dak), Sıcaklık)

Fiziksel değişkenler (zaman, pH, RPM, sıcaklık) L-glutaminaz üretim verimini değiştiren önemli parametrelerdir ve optimize edilerek optimum koşullar belirlenmelidir. Bu tez çalışmasında L-glutaminaz verimini arttırmak maksimuma ulaştığı üretim zamanı ortam pH'sı, sıcaklığı ve çalkalayıcının RPM derecesi araştırıldı. Her bir parametre için ayrı ayrı deney düzeneği kuruldu. Deney sonuçları kaydedilerek optimum değerler belirlendi (Tablo 22-24).

Tablo 22. Süre Optimizasyon Sonuçları.

Süre(saat)	L-glutaminaz aktivitesi	
	OD(450)	U/mL
0	0,300	4,590
12	0,395	6,043
24	0,437	6,686
36	0,664	10,159
48	0,605	9,256
60	0,488	7,466
72	0,161	2,463
84	0,161	2,463

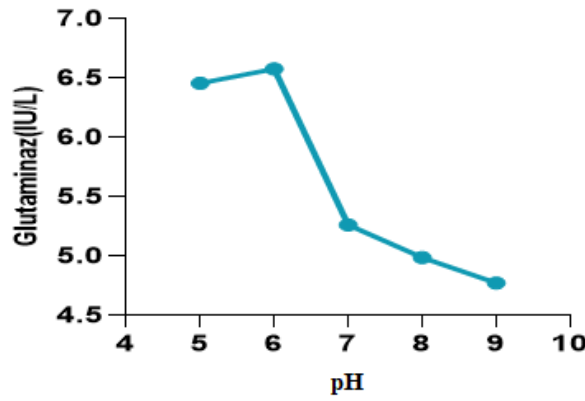


Şekil 25. L-glutaminaz üretimi süre optimizasyon sonuç grafiği.

Sıcaklık optimizasyon deney sonuçları incelendi ve sıfırıncı saatten itibaren sonuçlar değerlendirildiğinde aktivitenin süreyle doğru orantılı şekilde arttığı ancak 36. saat sonrasındaki süreçte giderek düştüğü görüldü (Tablo 22, Şekil 25). Bu değerlendirmeler ışığında L-glutaminaz üretimi için optimum inkübasyon süresinin 36 saat olduğu belirlendi.

Tablo 23. pH Optimizasyon Sonuçları

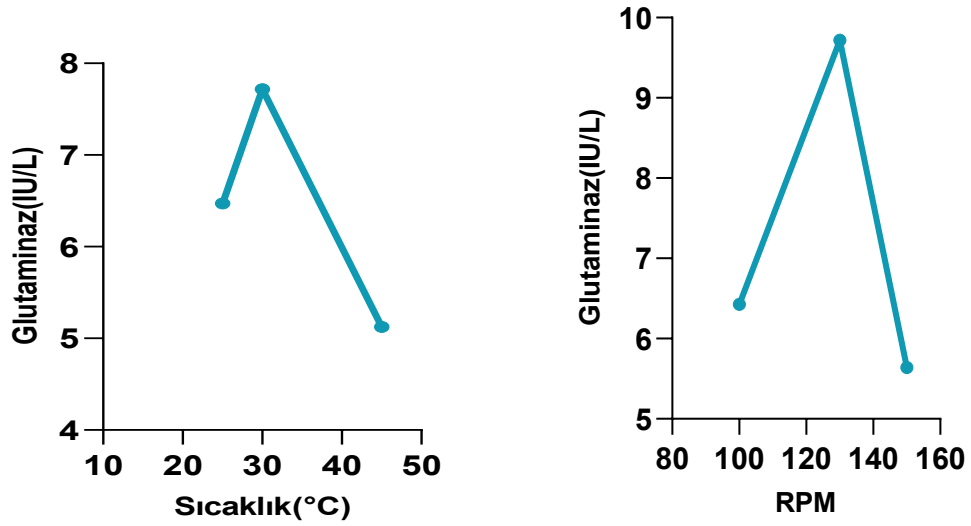
pH	L-glutaminaz aktivitesi	
	OD(450)	U/mL
5	0,422	6,456
6	0,430	6,579
7	0,344	5,263
8	0,326	4,988
9	0,312	4,774

**Şekil 26.** pH optimizasyon sonuç grafiği.

pH optimizasyon deney sonuçları değerlendirildiğinde *Pseudomonas iridis* E9 suşunun düşük pH'da L-glutaminaz enzim üretim potansiyelinin yüksek olduğu ve bazı pH'larda ise üretimin düştüğü görüldü. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde L-glutaminaz üretimi için optimum pH değerinin 6,0 olduğu belirlendi (Tablo 23, Şekil 26).

Tablo 24 . Sıcaklık ve çalkalama hızı (rpm/dak) optimizasyon sonuçları

Sıcaklık (°C)	L-glutaminaz aktivitesi	
	OD(450)	U/mL
25	0,422	6,426
30	0,439	6,717
45	0,630	9,639
Rpm		
100	0,422	6,426
130	0,439	6,717
150	0,630	9,639

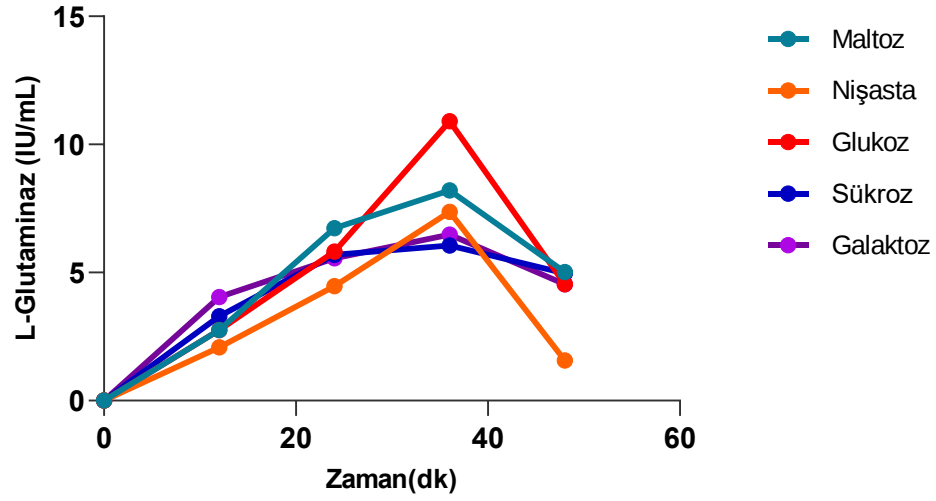


Şekil 27. Sıcaklık ve çalkalama hızı (rpm) optimizasyon sonuç grafiği.

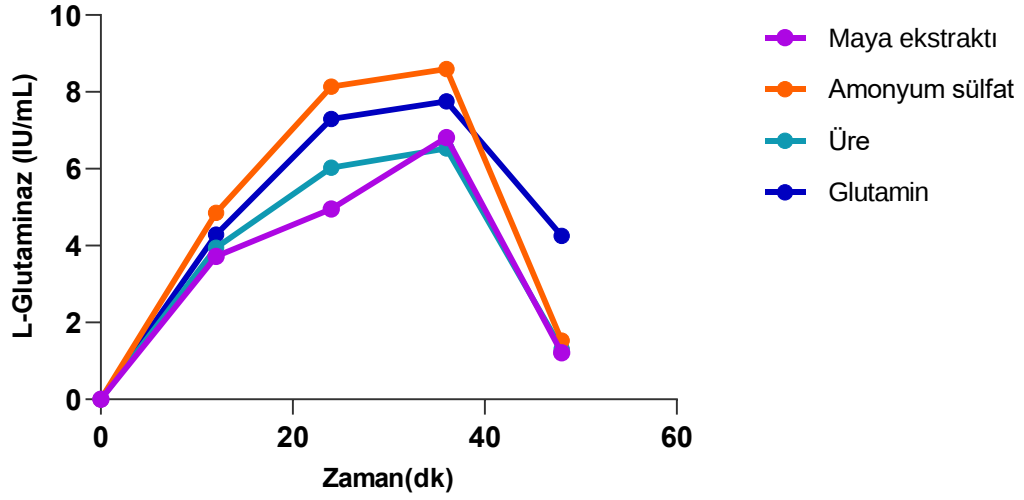
Elde edilen sonuçlar incelendiğinde *Pseudomonas İridis* E9 bakterisinin optimum üretim sıcaklığının 30 °C olduğu 30 °C'nin üstündeki değerlerde üretimin giderek düştüğü görüldü. Bakterinin düşük sıcaklıklarda aktif olması ve yüksek üretim sağlaması üretimde düşük maliyet açısından önemlidir. Fiziksel değişken optimizasyon parametresi olarak araştırılan son parametre olan rpm optimizasyon sonuçları değerlendirildiğinde optimum üretimin 150 rpm/dak olduğu belirlendi. Sonuçlar incelendiğinde optimizasyon deneylerinin aktivite için önemli olduğu açıkça görünmüştür (Şekil 27).

Besiyeri İçerik Optimizasyonu

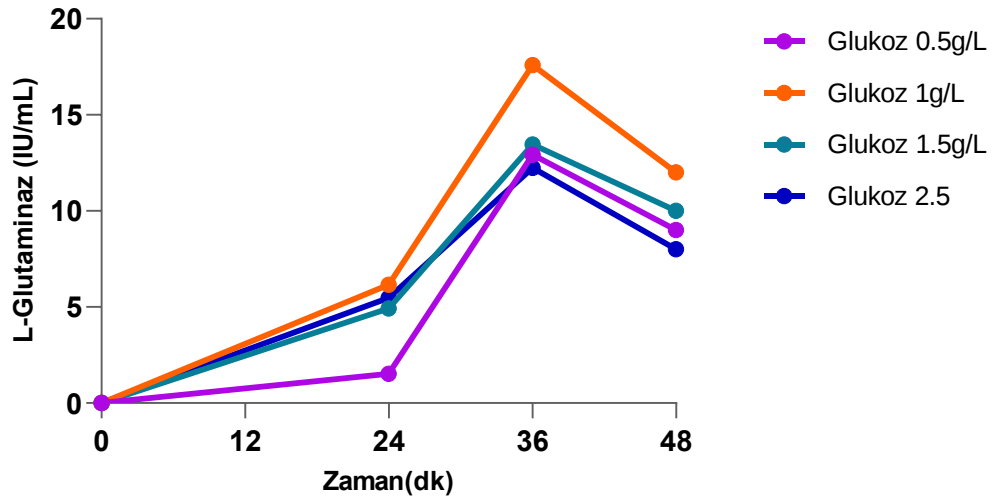
Besiyeri içeriğinde bulunan C kaynağı ve N kaynağı hem bakteri gelişimi için hem de enzim üretimi için önemlidir. Bu yüzden besiyerine eklenecek olan C kaynağının türü ve miktarı optimize edilerek deneylerle belirlendi (Şekil 28-31).



Şekil 28. L-glutaminaz üretiminde C kaynağının etkisi.

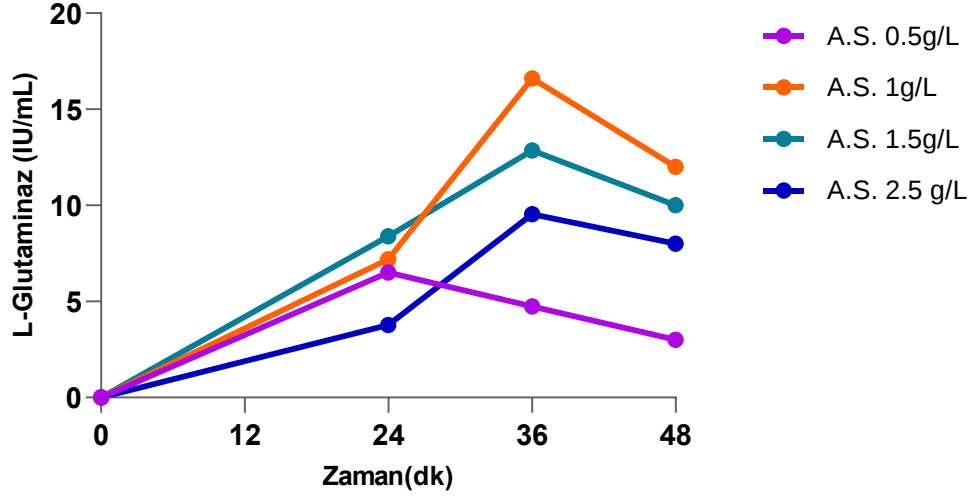


Şekil 29. L-glutaminaz üretiminde N kaynağının etkisi.



Şekil 30. L-glutaminaz üretimi için besiyerine eklenmesi gereken glukoz miktar optimizasyonu.

Elde edilen veriler incelendiğinde *Pseudomonas İridis* E9'nin enzim üretimi için en uygun C kaynağının glukoz olduğu ve N kaynağının ise amonyum sülfat olduğu kaydedildi. Enzim üretimi için C ve N kaynağı belirlendikten sonra herbir kaynak için besiyerine eklenmesi gereken miktar optimizasyonu yapıldı (Şekil 30 - 31).



Şekil 31. L-glutaminaz üretimi için besiyerine eklenmesi gereken amonyum sülfat miktar optimizasyonu.

Sonuçlar incelendiğinde yüksek aktiviteli enzim üretimi için gerekli glukoz miktarının 1g/L olduğu ve amonyum sülfat miktarının da yine 1g/L olduğu görüldü.

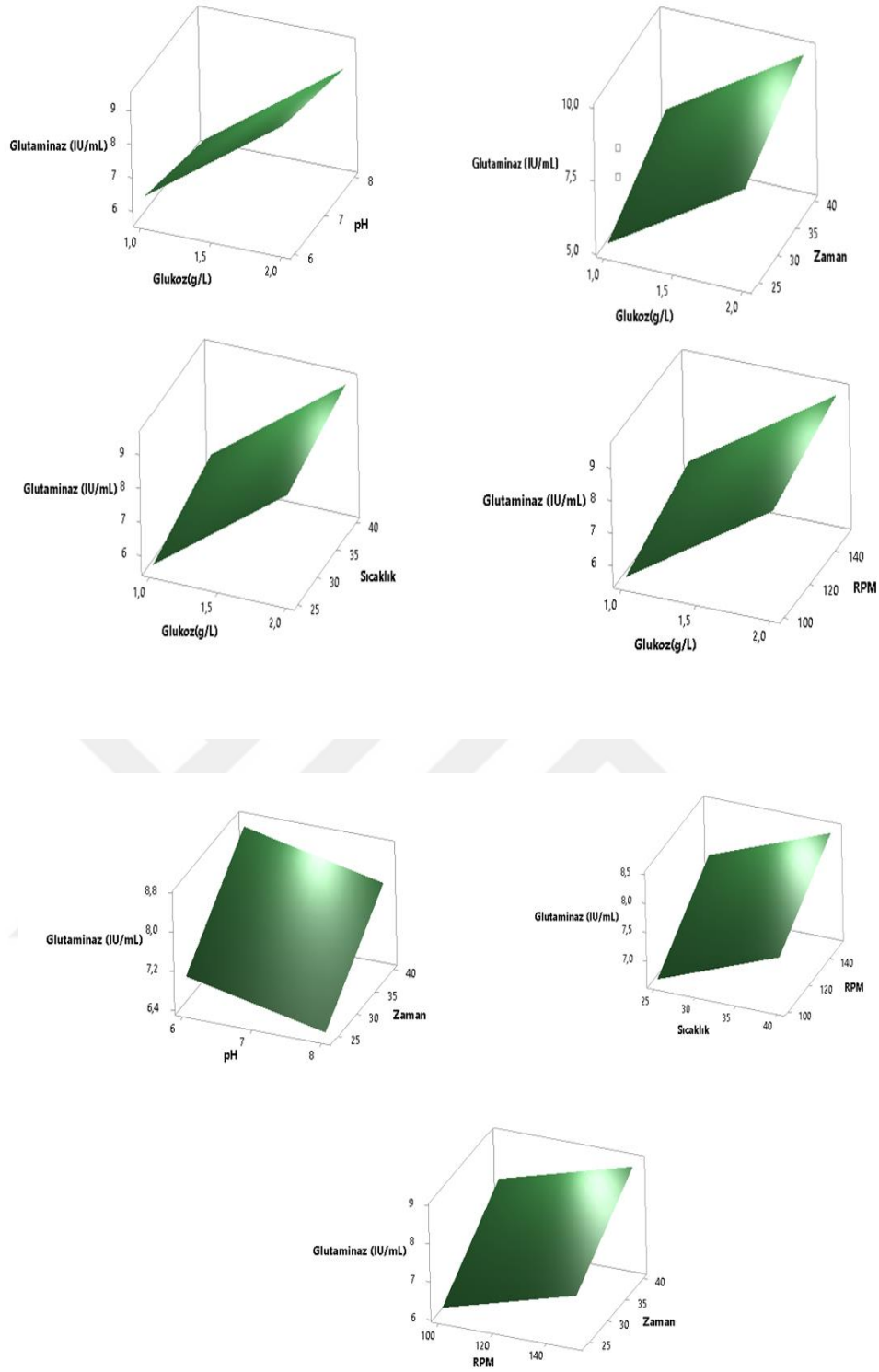
Yapılan tüm optimizasyon sonuçları değerlendirilerek Plackett-Burman tasarım tablosu oluşturuldu (Tablo 25).

Tablo 25. Plackett-Burman dizaynı

Sıra	Glukoz (g/L)	L- glutamin (g/L)	Na2HPO 4 (g/L)	KH2PO4 (g/L)	NaCl (g/L)	Mg(SO4) 7H2O (g/L)	Maya (g/L)	Ph	Sıcaklık (°C)	RPM	Zaman (saat)	Glutamin az (IU/mL)
1	1	5	7	4	0,1	0,1	1	8	25	150	40	9,0964
2	2	5	5	2	0,1	0,5	1	8	40	100	40	7,8336
3	2	5	7	2	0,1	0,1	3	6	40	150	24	8,4762
4	1	2	5	2	0,1	0,1	1	6	25	100	24	8,6861
5	2	2	5	2	0,5	0,1	3	8	25	150	40	11,3734
6	1	5	7	2	0,5	0,1	3	6	25	100	40	7,0074
7	1	2	5	4	0,1	0,5	3	6	40	150	40	9,1845
8	1	5	5	4	0,5	0,5	3	8	40	100	24	2,8305
9	1	2	7	2	0,5	0,5	1	8	40	150	24	2,7846
10	2	2	7	4	0,5	0,1	1	6	40	100	40	7,1757
11	2	2	7	4	0,1	0,5	3	8	25	100	24	8,1200
12	2	5	5	4	0,5	0,5	1	6	25	150	24	8,0053

Plackett-Burman tasarım tablosundan (Tablo 25) elde edilen 12 deney üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi ve elde edilen ortalama yanıt tasarım tablosunda gösterildi. L-Glutaminaz Aktivitesi üzerinde etkili olan faktörleri belirlemek için ANOVA regresyon analizi kullanıldı. Ortalama ve standart sapma her değişken için algoritma tarafından hesaplandı. Tablo 25'de gözlemlenen minimum ve maksimum aktiviteler sırasıyla 2.78 IU/ml ve 11,37 IU/ml'dir. 12,5 maksimum ve minimum aktivitelerde gözlenen orandır, bu nedenle daha ileri regresyon analizi için karekök dönüşümü uygulanmıştır. Faktör analizinden gözlemlenen ortalama ve standart sapma sırasıyla 7,54 ve 2,37'dir. Plackett-Burman tasarımında elde edilen nihai denklem aşağıda belirtilmiştir.

$$\begin{aligned}
&\text{Glutaminaz aktivitesi (IU/mL)} = -14,32 + 0,5304 \text{ Glukoz(g/L)} + 1,030 \text{ Na}_2\text{HPO}_4\text{(g/L)} \\
&\quad + 1,165 \text{ KH}_2\text{PO}_4\text{(g/L)} + 0,1402 \text{ NaCl (g/L)} - 1,575 \text{ Mg(SO}_4\text{)7H}_2\text{O(g/L)} \\
&\quad + 0,5151 \text{ Maya(g/L)} + 0,2167 \text{ pH} + 0,1584 \text{ Sıcaklık} - 0,01836 \text{ RPM} \\
&\quad + 0,01434 \text{ Zaman} + 0,7293 \text{ LL-Glutamin(g/L)}
\end{aligned}$$



Şekil 32. RSM analizinden 3 boyutlu yüzey grafikleri

Plackett-Burman tasarımında elde edilen sonuca göre glutaminaz aktivitesi en iyi ortam şartları zaman 40, Ph 7, sıcaklık 30°C, glukoz oranı 2 g/L, RPM 130 sağlandığında 14, 540 IU/mL enzim aktivitesi elde edilmesi beklenilmektedir. Literatürde benzer çalışmalar incelendiğinde Orabi *et al.* (2019) L-glutaminaz üretim verimini arttırmak için optimizasyon

çalışmaları yapmış ve optimum üretim (89,78 EU/mg) koşullarına ; pH 6.5–7.0 35° C’de 28 saatlik sürenin sonundave nitrojen kaynağı olarak glutamin ve karbon kaynağı olarak ramnoz kullanarak ulaştığını bildirdi. Yine 2019’da yapılmış olan bir çalışmada (Durthi *et al.* 2019) L-glutaminaz üretim koşullarını optimize edilmiş ve en yüksek üretim (24.585 EU/mL); İnkübasyon süresi: 36 saat, sıcaklık 33,4 °C, pH 7,19 karbon kaynağı oarak Galaktoz (2.52 g/L) ve nitrojen kaynağı olarak da maya ekstraktı (2 g/L) seçilerek yapılmıştır.

Yüksek Konsantrasyonda L-Teanin Üretimi İçin Gerekli Parametrelerin Response Surface Methodology (RSM) ile İstatistiksel Optimizasyonu

Çalışmada, BBD maksimum teanın üretimi sağlanan optimum parametre seviyelerini tanımlamak ve bu parametreler ile enzim aktiviteleri arasındaki ilişkileri anlamak için kullanıldı. Teanın üretiminin istatistiksel optimizasyonu için etilamin, enzim, sıcaklık ve pH parametreleri bağımsız değişkenler olarak seçildi ve BBD ile bir deney planı oluşturuldu. Elde edilen deneme planı ile 27 farklı deney düzeneği oluşturuldu ve 27 farklı koşullarda L-teaninin enzimatik üretimi sağlandı. Yapılan deney sonucunda elde edilen reaksiyon sıvıları santrifüj edildi üst sıvıda üretilen L-teanın miktarları LC-MC analizi ile kantitatif olarak belirlendi. Tayin sonucunda üst sıvıda belirlenen L-glutamin ve L-teanın miktarı ng/mL olarak kaydedildi. Kaydedilen veriler kullanılarak L-teaninin L-glutaminaz enzimi ile L-glutamin ve etilaminden enzimatik biyotransformasyon yüzdesi aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplandı ve elde edilen tüm veriler Tablo 26’ da verildi.

$$\text{Biyotransformasyon Yüzdesi} = \frac{\text{Üretilen L – Teanın Miktarı } (\frac{ng}{mL})}{\text{Kullanılan L – Glutamin Miktarı } (\frac{ng}{mL})} \times 100$$

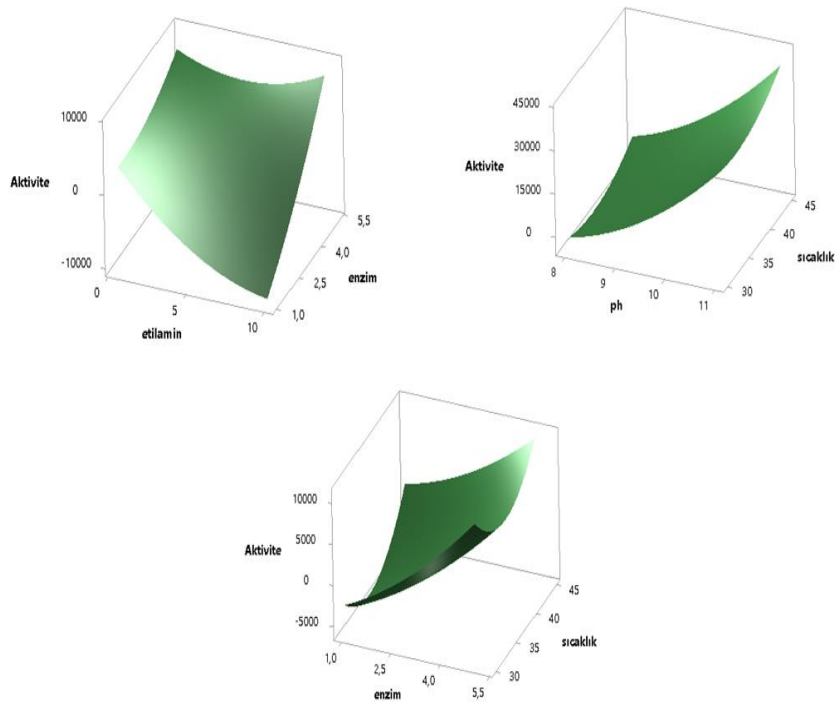
Tablo 26. L-Teanin Üretiminin Optimizasyonu İçin Box-Behnken Tasarımı İle Deneysel L-teanin miktarları ve Biyotransformasyon Yüzdeleri

Sayı	Etilamin	Enzim(IU/mL)	pH	Sıcaklık(°C)	L-teanin miktarı (ng/mL)	Biyotransformasyon Oranı (%)
1	5,0	3	9	40	5,7682	0,0230
2	5,0	3	11	45	25370,1449	76,204
3	5,0	5	11	40	10763,9599	12,352
4	5,0	3	11	40	0,0000	0
5	0,5	3	9	45	19850,8360	22,796
6	0,5	5	9	40	1,3123	0,0040
7	10,0	1	9	40	8,0618	0,1471
8	5,0	3	9	40	6,1962	0,0220
9	10,0	3	11	40	20617,3707	26,529
10	5,0	3	8	45	108,5969	0,2825
11	5,0	1	9	45	8168,1942	18,775
12	5,0	3	9	40	0,0000	0
13	0,5	3	8	40	17,9688	0,0488
14	5,0	3	11	30	20401,9785	28,355
15	5,0	5	9	30	711,4727	1,3045
16	10,0	3	8	40	0,0000	0
17	0,5	3	11	40	16464,3323	17,282
18	5,0	5	9	45	127,2641	0,2332
19	10,0	3	9	30	6487,3903	9,3180
20	5,0	1	11	40	36080,2053	48,709
21	0,5	3	9	30	2411,6339	4,9104
22	10,0	5	9	40	2117,0820	2,6990
23	10,0	3	9	45	3990,2426	5,7936
24	5,0	1	8	40	53,3394	0,1259
25	0,5	1	9	40	12123,6553	19,987
26	5,0	1	9	30	4543,9897	14,050
27	5,0	5	8	40	1,8615	0,0050

Bir modelin uygunluğunu gösteren önemli bir faktör, uyum eksiklik değerinin olmamasıdır. Anlamlı olmayan ($p>0.05$) bir model uyum değerinin bulunmaması, hatanın önemsiz olduğunu ve tepkilerin regresyon denklemi ile açıklanabileceğini gösterir. Bu bağlamda model uyumu açısından uyumsuzluğun istatistiksel olarak anlamlı olmaması gerekir (0,05'ten büyük olmalı) olmalıdır. Çalışmamızda elde edilen veriler sonucunda

uyumsuzluk değerinin anlamsız olduğu ($p>0,05$) bulunmuş ve modelin uygunluğu doğrulanmıştır.

Ayrıca, çalışmada modelin uygunluğu R^2 (regresyon katsayısı), $Adj-R^2$ (düzeltilmiş regresyon katsayısı), öngörülen çoklu belirleme katsayısı ($Pre-R^2$) kullanılarak değerlendirilmiştir. Alkalın proteaz aktivitesi için $Pre-R^2$ (0.99) ve $Adj-R^2$ (0.99) değerleri, R^2 (0.99) ile makul bir uyum içindedir. İdeal olarak $Adj-R^2$, R^2 değerine yakın olmalıdır. R^2 değerinin 1'e yakın olması modelin uygunluğunu yani deneysel ve tahmin edilen değerler arasında korelasyon olduğunu göstermektedir. Bu da deneylerin yüksek oranda güvenilir olduğu anlamına gelir (Garai & Kumar, 2013). Bu yüksek R^2 değeri deneysel sonuçlar ile seçilen model tahminlerinin oldukça uyumlu olduğunu göstermektedir. Optimizasyon sonuçları incelendiğinde L-teanin üretim veriminin düşük pH'larda azaldığı ve yüksek pH'larda arttığı görüldü. L-teanin aminoasiti bakterilerde ve enzimatik reaksiyonlarda strese bağlı üretilen bir aminoasit olduğundan dolayı yüksek pH da üretim olması beklenen bir durumdur. Elde edilen veriler incelendiğinde enzim miktarının 3 mL ve sıcaklığın 45 °C olduğu koşullarda biyotransformasyon yüzdesinin (%76,204) yüksek olduğu görülürken; enzim miktarının 1 mL ve sıcaklığı 40 °C olduğu koşullarda üretim miktarının (0,036 g/L) yüksek olduğu görüldü. Bu veriler ışığında yüksek konsantrasyonda üretim için 1:5 molar oran L-glutamin(donör):etilamin(aseptö), pH 11, sıcaklık 45 °C, enzim miktarı 3mL koşulları sağlanarak yapıldığında hem biyotransformasyon veriminin hem de üretim miktarının aynı doğrultuda artması beklenmektedir.



Şekil 33. RSM analizinden 3 boyutlu yüzey grafikleri

L- teaninin enzimatik üretiminin yapıldığı literatürde birçok çalışma incelenmiştir. Bu çalışmalara göre; *Tachiki ve arkadaşları* 1996 yılında, *P. nitroreducens* IFO12694 bakteri suşunu kullanarak ürettikleri L-glutaminazın biyokatalizörlüğünde ve L-glutamin (γ -glutamil donörü olarak) ve etilamin (γ -glutamil akseptörü olarak) varlığında pH 7,0-8,0 de %8 reaktiviteli L-teanin üretmeyi başarmışlardır. Yine *Tachiki ve arkadaşlarının* 1998 yılında yaptıkları başka bir çalışmada γ -glutamil donörü olarak kullandıkları L-glutamin ve γ -glutamil akseptörü olarak kullandıkları etilamin konsantrasyonun miktarını arttırdıklarında yüksek verimli L-teanin biyosentezini gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada araştırmacılar 0,7 M L-glutamin ve 1,5 M etilaminden 0,5 U/mL serbest enzim ile 7 saatlik reaksiyonundan sonra 47 g/L L-teaninin sentezlendiğini göstermişlerdir (Tachiki et al., 1998). Daha sonraki çalışmalarda kullanılan enzimin operasyonel stabilitesini ve yeniden kullanılabilirliğini arttırmak için çeşitli taşıyıcılara immobilizasyonu gerçekleştirilerek L-teanin biyosentez verimi arttırılmaya çalışılmıştır. Bu bağlamda *Matsuura ve arkadaşlarının* 2014'te yaptıkları bir çalışmada L-glutaminazın immobilizasyonu için mezogözenekli silika (MPS) kullanmışlar ve *P. nitroreducens*'dan izole edilen L-glutaminaz ve MPS'nin kompozit malzemelerini içeren, L-glutaminin L-teanine yüksek dönüşüm verimliliği sergileyen akış tipi bir mikroreaktör tasarlamışlardır (Matsuura et al., 2014). Son yıllarda, *P. nitroreducens* SK16.00436 (C. Y., 2013) ve DSM 1439937 (Pu et al., 2013) suşlarından elde edilen diğer iki L-glutaminazın, sırasıyla doğal ve rekombinant formları L-teanin üreten karaktere sahip olduğu yapılan çalışmalarda bildirilmiştir. L-teanin üretimi için tüm koşullar optimize edildikten sonra, *P. nitroreducens* SK16.00436 ve *P. nitroreducens* DSM 1439937 suşlarının L-glutaminazları ile, %42,9 ve %40 dönüşüm oranında ve sırasıyla 22,41 ve 21,8 g/L L-teanin biyosentezi sağlanmıştır.(Yang et al., 2013, Pu et al., 2013) Yapılan güncel bir çalışmada da araştırmacılar yine *P. nitroreducens* türünün başka bir suşu olan *P. nitroreducens* SP.001'i geçirgen (permeabilize) hale getirilerek L-teanin üretimi için oldukça verimli bir yöntem geliştirmişler ve geçirgenleştirilmiş hücrelerinden L-glutaminaz ile, %66.1 dönüşüm oranı ve 45,1 mM/sa.L üretim yoğunluğu ile 0,49 M L-teanine üretmeyi başarmışlardır (Shuai et al., 2019). Bu çalışmalara ek olarak, *Trichoderma koningii* tarafından üretilen mantar L-glutaminazları da L-teanini sentezlemek için değerlendirilmiştir (Sakhaei et al., 2017). Yapılan bu tez çalışmasında L-glutaminaz ve L-teanin sentezi için kullanılan mikrobiyal kaynağın literatürden farklıdır ve ilk kez bu alanda kullanılmıştır.

SONUÇ ve ÖNERİLER

L-teanin, yeşil çayda bulunan ve çayın umami tadını sağlayan non proteinik yapıda bir amino asit çeşididir. L-teaninin tat arttırıcı özellikleri ve sağlığa yararlarından dolayı gıda ve sağlık alanlarında kullanımı son yıllarda oldukça artmıştır. Bu tez kapsamında farklı bölgelerden toplanan toprak numunelerinden izole edilen *Pseudomonas iridis* E-9 suşundan L-glutaminaz enzimi sentezlendi ve bu enzim kullanılarak L-teanin üretimi için çalışmalar yapıldı. Yapılan çalışmalar ve elde edilen sonuçlar aşağıdaki gibidir;

- Türkiye'nin farklı bölgelerinde bulunan farklı illerden (Adana, Erzurum, Gümüşhane, Manisa, Urfa, Trabzon, Van) temin edilen toprak örneklerinden toplam 132 adet bakteri izole edildi.
- İzole edilen bakteriler L-glutaminazın kalitatif tayini için fenol red içeren katı besiyeri içerisine inokule edildi ve 24-48 saatlik bir inkübasyona tabii tutuldu. İnkübasyon süresinin sonunda petriler incelendi ve sarı renkten pembe renge dönüşen petriler L-glutaminaz üreticisi izolatlar olarak kabul edildi. Yapılan bu denemeler sonucunda toplamda 76 adet bakteri sıvı kültürde denenmek üzere ayrıştırıldı.
- İzole edilen 76 farklı izolat kullanılarak L-glutamin içerikli sıvı besi yeri içerisinde 72 saat süreyle üretim sağlandı ve en kısa sürede en yüksek aktivitede enzim sentezleyen izolatlar belirlendi. Elde edilen veriler değerlendirilerek 40 adet izolata "E" koduyla 1'den 40'a kadar sayılarla kodlar verilerek stoğa kaldırıldı.
- Stoğa alınan bakterilerden en yüksek aktiviteli üretim sağlayan 25 adet izolat seçildi ve L-teanin üreti için kullanıldı. Her bir suşun sentezlediği ekstraselüler L-glutaminaz enzimi kullanılarak l-teanin üretim reaksiyonu gerçekleştirildi ve reaksiyon üst sıvısı santrifüj edilerek L-teanin varlığı TLC ile kalitatif olarak belirlendi. Elde edilen TLC sonuçları değerlendirilerek üretim sağlayan 21 farklı izolattan elde edilen L-teanin üretim reaksiyon örnekleri HPLC'de kantitatif olarak analiz edilmek üzere ayrıştırıldı.
- HPLC sonuçları değerlendirilerek en yüksek konsantrasyonda üretim sağlayan 4 suş (E-5 157,581 mg/mL, E-9 178,533 mg/mL, E-11 167,294 mg/mL, ve E-12 166,736 mg/mL) seçilerek moleküler ve konvansiyonel olarak tanılandı.

- Seçilen 4 izolat (E-5: *Lysinibacillus parviboronicapiens* (Genbank No:PP819541), E-11: *Aeromonas media* (Genbank No:PP819513), E-12: *Bacillus arachidis* (Genbank No:PP819540), ve E-9: *Pseudomonas iridis* (Genbank No:PP828586),) tür düzeyinde tanımlandı. Tez çalışmasında; üretim potansiyeli, üretim hızı ve farklı tür olma özellikleri göz önünde bulundurularak *Pseudomonas iridis* E-9 bakterisi seçilerek sonraki çalışmalarda kullanıldı.
- *Pseudomonas iridis* E-9 bakterisinin L-glutaminaz üretim verimini arttırmak amacıyla üretim koşulları optimize edildi üretim için optimum koşullar (İnkübasyon süresi: 40 saat, pH 7,0, sıcaklık 30°C, C kaynağı glukoz (2 g/L), N kaynağı amonyum sülfat (1 g/L), çalkalama hızı 130 rpm/dak) belirlendi.
- Belirlenen optimum koşullarda üretilen L-glutaminaz enzimi kullanılarak L-teaninin enzimatik üretimi sağlandı. L-teanin üretim verimini arttırmak amacıyla ortam koşulları optimize edildi ve LC –MC cihazı kullanılarak elde edilen sonuçlara göre optimum koşullar (1:5 molar oran L-glutamin(donör):etilamin(aseptör, pH 11, sıcaklık 40 °C, enzim miktarı 3mL) belirlendi.
- Sonuç olarak topraktan izole edilen *Pseudomonas iridis* E-9 bakterisi kullanılarak optimum koşullar altında 9,18 EU/mL L-glutaminaz enzimi ekstraselüler olarak sentezlendi ve bu enzim kullanılarak, yapılan LC – MC analizleri sonucunda %76,204 biyotransformasyon verimiyle 0,0254 g/L L-teanin üretimi sağlandığı kaydedildi.

Yapılan tüm çalışmalardan elde edilen veriler incelendiğinde ve literatürle karşılaştırıldığında yapılan bu tez çalışmasında üretilen L-teaninin patentlenme potansiyelinin olduğu görüldü. Çalışmanın daha ileri seviyeye ulaştırılabilmesi amacıyla yüksek ölçekli üretim yapılması ve üretilen ürünün ticari olarak üretilmesi için yeni çalışmaların yapılması önerildi.

KAYNAKÇA

- Abelian, V. H., Tsutomu Okubo, I., Mutoh, Koj., Chu, D., KIMfl, M. A., & Takehiko Yamamoto, D. (1993). A Continuous Production Method for Theanine by Immobilized *Pseudomonas nitroreducens* Cells. *Journal of fermentation and bioengineering* (Vol. 76).
- Adhikary, R., & Mandal, V. (2017). September 1. L-theanine: A potential multifaceted natural bioactive amide as health supplement. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. Hainan Medical University.
- Adıgüzel, A., 2006. Bazı Termal Tesislerden Alınan Su Örneklerinden Ėzole Edilen Termofilik Bakterilerin Moleküler Karakterizasyonu, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Alagawany, M., Abd El-Hack, M. E., Farag, M. R., Shaheen, H. M., Abdel-Latif, M. A., Noreldin, A. E., & Khafaga, A. F. (2020). The applications of and its derivatives in human, ruminant and fish nutrition—a review. *Annals of Animal Science*, 20(2), 389-407.
- Almashhedy, L. A., Hadwan, M. H., Abbas khudhair, D., Kadhum, M. A., Hadwan, A. M., & Hadwan, M. M. (2023). An optimized method for estimating glutaminase activity in biological samples. *Talanta*, 253.
- Altınkaynak, Y., & Kural, B. (2018). L-Theaninin Doksorubisin Uygulanan Sıçanlarda Nefrotoksisite Üzerine Etkilerinin İncelenmesi. Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Trabzon.
- Amobonye, A., Singh, S., Mukherjee, K., Jobichen, C., Qureshi, I. A., & Pillai, S. (2022). Structural and functional insights into fungal glutaminase using a computational approach. *Process Biochemistry*, 117: 76–89.
- Ashihara, H. (2015). Occurrence, Biosynthesis and Metabolism of Theanine (γ -Glutamyl-L-ethylamide) in Plants: A Comprehensive Review. *Natural Product Communications* Vol. 10 (5).
- Awad, M. F., Fareed, &, El-Shenawy, S., Mervat, &, Abbas, M., El-Gendy, A., Ahmed, E., & El-Bondkly, M. (2021). Purification, characterization, and anticancer and antioxidant activities of L-glutaminase from *Aspergillus versicolor* Faesay4. *International Microbiology* 24:169–181
- Azizi, E., Farahmand, M., & Shahhosseini, M. H. (2018). International Journal of Molecular and Clinical Microbiology Isolation and Identification of extremophiles producing anticancer L-glutaminase and L-Methioninas enzymes from Yale Gonbad hot spring in Qazvin, Iran Article Info Abstract. *International Journal of Molecular and Clinical Microbiology* (Vol. 8).
- Baba, Y., Inagaki, S., Nakagawa, S., Kaneko, T., Kobayashi, M., & Takihara, T. (2021). Effects of l-Theanine on Cognitive Function in Middle-Aged and Older Subjects: A Randomized Placebo-Controlled Study. *Journal of Medicinal Food*, 24: 333–341.
- Bag, S., Mondal, A., Majumder, A., & Banik, A. (2022). Tea and its phytochemicals: Hidden health benefits & modulation of signaling cascade by phytochemicals. *Food Chemistry*, 371.
- Bağrıyanık D. B. (2011). Potansiyometrik Esaslı Glutamin Biyosensörü Tasarlanması Ve

Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

- Bindal, S., & Gupta, R. (2014). L-Theanine synthesis using γ -Glutamyl transpeptidase from bacillus licheniformis ER-15. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62: 9151–9159.
- Brimson, J. M., Brimson, S., Prasanth, M. I., Thitilertdecha, P., Malar, D. S., & Tencomnao, T. (2021). The effectiveness of *Bacopa monnieri* (Linn.) Wettst. as a nootropic, neuroprotective, or antidepressant supplement: analysis of the available clinical data. *Scientific Reports*, 11.
- Bulman, A., D’Cunha, N., Marx, W., Turner, M., McKune, A., & Naumovski, N. (2023). The Effects of L-Theanine Supplementation on Quality of Sleep: A Systematic Review. MDPI AG.
- Bülbül D., Karakuş E., 2013. Production And Optimization Of Lglutaminase Enzyme From *Hypocrea Jecorina* Pure Culture. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. 43:4, 385-397.
- Chatterjee, S. (2016). Environmental Biotechnology View project. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res* (Vol. 41).
- Chen, S., Kang, J., Zhu, H., Wang, K., Han, Z., Wang, L., Liu, J., Wu, Y., He, P., Tu, Y., & Li, B. (2023). May 1. L-Theanine and Immunity: A Review. *Molecules*. MDPI.
- Chen, X., Zhang, M., Xue, Y., Liang, D., An, W., Jia, G., Zhao, H., Liu, G., & Huang, Z. (2022). Effect of dietary L-theanine supplementation on skeletal muscle fiber type transformation in vivo. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 99.
- Chen, Z., Wang, Z., Yuan, H., & He, N. (2021). February 3. From Tea Leaves to Factories: A Review of Research Progress in l -Theanine Biosynthesis and Production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. American Chemical Society.
- Chergui, A., Kecha, M., Tighrine, A., Adrar, N., Bouzida, S., Titouche, Y., Boughani, L., Kadri, N., & Houali, K. (2018). Characterization and optimization of extracellular L-Asparaginase production by selected Actinomycete strain isolated from an algerian wheat bran. *Cellular and Molecular Biology*, 64: 53–60.
- Chi, M. C., Lin, M. G., Huang, Y. F., Chen, Y. Y., Wang, T. F., & Lin, L. L. (2019). Enzymatic synthesis of L-theanine from L-glutamine and ethylamine by *Bacillus licheniformis* γ -glutamyltranspeptidase and its mutants specialized in transpeptidase activity. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 22.
- Dasdelen, M. F., Er, S., Kaplan, B., Celik, S., Beker, M. C., Orhan, C., Tuzcu, M., Sahin, N., Mamedova, H., Sylla, S., Komorowski, J., Ojalvo, S. P., Sahin, K., & Kilic, E. (2022). A Novel Theanine Complex, Mg-L-Theanine Improves Sleep Quality via Regulating Brain Electrochemical Activity. *Frontiers in Nutrition*, 9.
- Deng W. W., Ogita S., and Ashihara H. 2008. Biosynthesis of theanine (γ -ethylamino-L-glutamic acid) in seedlings of *Camellia sinensis*. *Phytochem. Lett.* 1, 115 – 119.xc
- El-Sayed, A. S. A. (2009). L-glutaminase production by *Trichoderma koningii* under solid-state fermentation. *Indian Journal of Microbiology*, 49: 243–250.
- Evans, M., McDonald, A. C., Xiong, L., Crowley, D. C., & Guthrie, N. (2021). A Randomized, Triple-Blind, Placebo-Controlled, Crossover Study to Investigate the Efficacy of a Single Dose of AlphaWave® l-Theanine on Stress in a Healthy Adult Population. *Neurology and Therapy*, 10: 1061–1078.
- Fan, X., Zhang, T., Ji, Y., Li, J., Long, K., Yuan, Y., Li, Y., Xu, Q., Chen, N., & Xie, X.

- (2020). Pathway engineering of *Escherichia coli* for one-step fermentative production of L-theanine from sugars and ethylamine. *Metabolic Engineering Communications*, 11.
- Fan X, Zhou J, Bi X, Liang J, Lu S, Yan X, et al. (2021) L-theanine suppresses the metastasis of prostate cancer by downregulating MMP9 and Snail. *J Nutr Biochem*89:108556.
- Feng, J., Yang, C., Zhao, Z., Xu, J., Li, J., & Li, P. (2021). Application of Cell-Free Protein Synthesis System for the Biosynthesis of L-Theanine. *ACS Synthetic Biology*, 10: 620–631.
- Gomaa, E. Z. (2022). Production, characterization, and antitumor efficiency of L-glutaminase from halophilic bacteria. *Bulletin of the National Research Centre*, 46.
- Gong, Z., Liu, Q., Lin, L., Deng, Y., Cai, S., Liu, Z., Zhang, S., Xiao, W., Xiong, S., & Chen, D. (2018). L-Theanine prevents ETEC-induced liver damage by reducing intrinsic apoptotic response and inhibiting ERK1/2 and JNK1/2 signaling pathways. *European Journal of Pharmacology*, 818: 184–190.
- Gülbandılar, A., Okur, M., Dönmez, M., Üniversitesi-Altıntaş, D., Yüksekokulu-Kütahya, M., Üniversitesi, D., Fakültesi-Kütahya, M., Yazar, S., & Tarihi, G. (n.d.). Fonksiyonel Gıda Olarak Kullanılan Probiyotikler ve Özellikleri.
- Guo, W. L., Qu, W. R., Zeng, L. N., Qi, Z. P., Huang, C., Zhu, Z., & Li, R. (2019). L-Theanine and NEP1-40 promote nerve regeneration and functional recovery after brachial plexus root avulsion. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 508: 1126–1132.
- Hayat, K., Iqbal, H., Malik, U., Bilal, U., & Mushtaq, S. (2015). Tea and Its Consumption: Benefits and Risks. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55: 939–954.
- Hibi, T., Imaoka, M., Shimizu, Y., Itoh, T., & Wakayama, M. (2019). Crystal structure analysis and enzymatic characterization of γ -glutamyltranspeptidase from *Pseudomonas nitroreducens*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 83: 262–269.
- Hiremath, J., Jyothi, H., & Vandana, R. (2011). Production of L-Glutaminase by *Pseudomonas* VJ6. *Research Journal of Biotechnology* (Vol. 6).
- Ito, K., Umitsuki, G., Oguma, T., & Koyama, Y. (2011). Salt-tolerant and thermostable glutaminases of *Cryptococcus* species form a new glutaminase family. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 75: 1317–1324.
- Jeon, J. M., Lee, H. I., Han, S. H., Chang, C. S., & So, J. S. (2010). Partial purification and characterization of glutaminase from *Lactobacillus reuteri* KCTC3594. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162: 146–154.
- Kareem, S. O., Akpan, I., & Oduntan, S. B. (2009). Cowpea waste: A novel substrate for solid state production of amylase by *Aspergillus oryzae*. *African Journal of Microbiology Research*, 3: 974–977.
- Kaur, A., Basu, T., & Mittal, N. (2021). Evaluation Of Indian Kangra Green Tea (*Camellia Sinensis* (L) O Kuntze) Infused With Peels Of Local Fruits (Pomegranate, Lemon, Mosambi, Orange And Banana) As A Natural Source Of Antioxidants. *Journal of Advanced Scientific Research* (Vol. 12).
- Kumar, S. R., & Chandrasekaran, M. (2003). Continuous production of L-glutaminase by an immobilized marine *Pseudomonas* sp BTMS-51 in a packed bed reactor. *Process Biochemistry*, 38: 1431–1436.
- Lange, K. W., Nakamura, Y., Lange, K. M., & Zhao, H. (2022). Tea and depression-NC-ND

license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>). A R T I C L E I N F O.
Food Science and Human Wellness, 11: 476–482.

- Li, M. Y., Liu, H. Y., Wu, D. T., Kenaan, A., Geng, F., Li, H. Bin, Gunaratne, A., Li, H., & Gan, R. Y. (2022). April 4. L-Theanine: A Unique Functional Amino Acid in Tea (*Camellia sinensis* L.) With Multiple Health Benefits and Food Applications. *Frontiers in Nutrition*. Frontiers Media S.A.
- Li, P., Wan, X. C., Zhang, Z. Z., Li, J., & Shen, Z. J. (2005). A novel assay method for theanine synthetase activity by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 819: 81–84.
- Liu, J., Sun, Y., Zhang, H., Ji, D., Wu, F., Tian, H., Liu, K., Zhang, Y., Wu, B., & Zhang, G. (2016). Theanine from tea and its semi-synthetic derivative TBrC suppress human cervical cancer growth and migration by inhibiting EGFR/Met-Akt/NF- κ B signaling. *European Journal of Pharmacology*, 791: 297–307.
- Liu, S. H., Li, J., Huang, J. A., Liu, Z. H., & Xiong, L. G. (2021). August 1. New advances in genetic engineering for L-theanine biosynthesis. *Trends in Food Science and Technology*. Elsevier Ltd.
- Liu, X., Wang, C., Zhang, X., Zhang, G., Zhou, J., & Chen, J. (2022). Application Prospect of Protein-Glutaminase in the Development of Plant-Based Protein Foods. *Foods*, 11.
- Liu, Z. W., Li, H., Liu, J. X., Wang, Y., & Zhuang, J. (2020). Integrative transcriptome, proteome, and microRNA analysis reveals the effects of nitrogen sufficiency and deficiency conditions on theanine metabolism in the tea plant (*Camellia sinensis*). *Horticulture Research*, 7.
- Lu, J., Zhang, Y., Qi, D., Yan, C., Wu, B., Huang, J. H., Yao, J., Wu, E., & Zhang, G. (2022). An L-theanine derivative targets against SARS-CoV-2 and its Delta and Omicron variants. *Heliyon*, 8.
- Ma, H., Fan, X., Cai, N., Zhang, D., Zhao, G., Wang, T., Su, R., Yuan, M., Ma, Q., Zhang, C., Xu, Q., Xie, X., Chen, N., & Li, Y. (2020). Efficient fermentative production of l-theanine by *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104: 119–130.
- Malkoç, M., Patan, H., Yaman, S. Ö., Türedi, S., Ersöz, Ş., Kural, B. V., & Örem, A. (2022). The effect of L-theanine on the oxidant-antioxidant balance in serum and lung tissue in experimentally induced sepsis in rats. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics* (Vol. 59).
- Masuo, N., Yoshimune, K., Ito, K., Matsushima, K., Koyama, Y., & Moriguchi, M. (2005). *Micrococcus luteus* K-3-type glutaminase from *Aspergillus oryzae* RIB40 is salt-tolerant. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100: 576–578.
- Matsumoto, K.; Yamada, H.; Takuma, N.; Niino, H.; Sagesaka, Y.M. (2011) Effects of green tea catechins and theanine on preventing influenza infection among healthcare workers: A randomized controlled trial. *BMC Complement. Altern. Med.*, 11, 7.
- Mehmet, D., Beslenme, F., & Programı, B. (2007). Theanine Amino Asidinin Plazma Serbest Amino Asit Ve Antioksidan Kapasite Düzeyine Etkisi Üzerine Bir Çalışma.
- Mindt, M., Walter, T., Kugler, P., & Wendisch, V. F. (2020). Microbial engineering for production of N-functionalized amino acids and amines. *Biotechnology Journal*, 15, Article 1900451.
- Miyagawa, K.; Hayashi, Y.; Kurihara, S.; Maeda, A. (2008) Co-administration of l-cystine and l-theanine enhances efficacy of influenza vaccination in elderly persons:

Nutritional status-dependent immunogenicity. *Geriatr. Gerontol. Int.*, 8, 243–250.

- Mollazadeh Doç Ali Topcu, M. (N.D.). Yağı Azaltılmış Minyatür Ultrafiltre Beyaz Peynir Üretiminde Protein-Glutaminaz Kullanımı Ve Bunun Peynir Kalitesi Üzerine Etkisi Utilization Of Protein-Glutaminase In The Manufacture Of Reduced Fat Miniature Ultrafiltrated White Cheese And Its Effects On Cheese Quality.
- Moriguchi, M., Sakai, K., Tateyama, R., Furuta, Y., & Wakayama, M. (1994). Isolation and Characterization of Salt-Tolerant Glutaminases from Marine *Micrococcus luteus* K-3. *Journal Of Fermentation And Bioengineering* (Vol. 77).
- Mu, D., Li, H., Chen, Q., Zhu, J., Wu, X., Luo, S., Zhao, Y., Wang, L., Jiang, S., Li, X., & Zheng, Z. (2019). Secretion of *Bacillus amyloliquefaciens* γ -Glutamyltranspeptidase from *Bacillus subtilis* and Its Application in Enzymatic Synthesis of l -Theanine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67: 14129–14136.
- Mu, W., Zhang, T., & Jiang, B. (2015). May 1. An overview of biological production of L-theanine. *Biotechnology Advances*. Elsevier Inc.
- Mujahed Anis KHANFAR Mohammad Mujahed Anis Khanfar Supervisor, M., & Kiliç, A. (N.D.). Cloning And Characterization Of L-Glutamine Amidohydrolase (Ec 3.5.1.2; Glutaminase).
- Nandakumar, R., Yoshimune, K., Wakayama, M., & Moriguchi, M. (2003). September 1. Microbial glutaminase: Biochemistry, molecular approaches and applications in the food industry. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. Elsevier.
- Nathiya, K., Nath, S. S., Angayarkanni, J., & Palaniswamy, M. (2011). Optimised production of l-glutaminase: A tumour inhibitor from *aspergillus flavus* cultured on agroindustrial residues. *African Journal of Biotechnology*, 10: 13887–13894.
- Nobre, A. C., Rao Phd, A., & Owen, G. N. (2008). L-theanine, a natural constituent in tea, and its effect on mental state. *Asia Pac J Clin Nutr* (Vol. 17).
- Okpalla, J., Dim, L. O., Onyekuru, D. A., Duru, I. E., & Mba, T. O. (2022). Optimization of Process Parameters for L-Glutaminase Production by *Pseudomonas* Species ALG3. *Archives of Current Research International*, 35–45.
- Orabi, H., El-Fakharany, E., Abdelkhalek, E., & Sidkey, N. (2020). Production, optimization, purification, characterization, and anti-cancer application of extracellular L-glutaminase produced from the marine bacterial isolate. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 50: 408–418.
- Padma, I., & Singhal, R. S. (2010). Production of glutaminase (E.C. 3.2.1.5) from *Zygosaccharomyces rouxii* in solid-state fermentation and modeling the growth of *Z. rouxii* therein. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20: 737–748.
- Pandey, A., Selvakumar, P., Soccol, C. R., & Nigam, P. (1999). Current Science Association Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. Source: *Current Science* (Vol. 77).
- Park, S., Kim, D. S., Kang, S., & Kim, H. J. (2018). The combination of luteolin and L-theanine improved Alzheimer disease–like symptoms by potentiating hippocampal insulin signag and decreasing neuroinflammation and norepinephrine degradation in amyloid- β -infused rats. *Nutrition Research*, 60: 116–131.
- Paul, A., Pharm, I. J., Sci, B., Dubey, R., & Prity, N. (n.d.). Isolation, Production & Screening Of Anti-Cancer Enzyme L-Glutaminase From *Bacillus subtilis*. *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*.
- Perini, M., Pianezze, S., Ziller, L., & Camin, F. (2021). Characterization of l-theanine in tea

extracts and synthetic products using stable isotope ratio analysis. *Journal of Food and Drug Analysis*, 29: 311–318.

- Phumsombat, P., Sano, C., Ikezoe, H., Hayashi, J., Itoh, T., Hibi, T., & Wakayama, M. (2020). Efficient Production of L-Theanine Using Immobilized Recombinant *Escherichia coli* Cells Expressing a Modified γ -Glutamyltranspeptidase Gene from *Pseudomonas nitroreducens*. *Advances in Biological Chemistry*, 10: 157–171.
- Pilase, N., 2010. Gıda Destekleri Ve Eczaneler. Yüksek Lisans Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Potla Durthi, C., Pola, M., Kola, A. K., & Rajulapati, S. B. (2019). Screening, optimization of culture conditions and scale-up for production of the L-Glutaminase by novel isolated *Bacillus* sps. mutant endophyte using response surface methodology. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 18.
- Prescott, L. M. (2002). *Microbiology*.
- Rathakrishnan, D., & Gopalan, A. K. (2022). Screening for anti-neoplastic enzymes producing halophilic bacterial extract and their antioxidant activity due to carotenoid synthesis.
- Robescu, M. S., Alcántara, A. R., Calvio, C., Morelli, C. F., Speranza, G., Ubiali, D., & Bavaro, T. (2023). L-Theanine Goes Greener: A Highly Efficient Bioprocess Catalyzed by the Immobilized γ -Glutamyl Transferase from *Bacillus subtilis*. *ChemSusChem*, 16.
- Ross, S. M. (2014). L-Theanine (Suntheanine): Effects of L-Theanine, an amino acid derived from *Camellia sinensis* (green tea), on stress response parameters. *Holistic Nursing Practice*, 28: 65–68.
- Saeed, M., Khan, M. S., Kamboh, A. A., Alagawany, M., Khafaga, A. F., Noreldin, A. E., Kumar, M., Safdar, M., Hussain, M., Abd El-Hack, M. E., & Chao, S. (2020). November 1. L-theanine: an astounding sui generis amino acid in poultry nutrition. *Poultry Science*. Elsevier Inc.
- Saeed, M., Naveed, M., Arif, M., Kakar, M. U., Manzoor, R., Abd El-Hack, M. E., Alagawany, M., Tiwari, R., Khandia, R., Munjal, A., Karthik, K., Dhama, K., Iqbal, H. M. N., Dadar, M., & Sun, C. (2017). November 1. Green tea (*Camellia sinensis*) and L-theanine: Medicinal values and beneficial applications in humans—A comprehensive review. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. Elsevier Masson SAS.
- Saeed, M., Xu, Y., Zhang, T., Ren, Q., & Sun, C. (2019). 16S ribosomal RNA sequencing reveals a modulation of intestinal microbiome and immune response by dietary L-theanine supplementation in broiler chickens. *Poultry Science*, 98: 842–854.
- Sarı F., 2010. Çay İşlemede Teanin Miktarının Değişimi. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Sarica, V., & Özbay, G. (2023). Yenilebilir Otlarının Fonksiyonel Gıdalar Kapsamında Değerlendirilmesi. *Adıyaman Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü Dergisi Karadeniz Bölgesi*.
- Sathish, T., Uppuluri, K. B., Veera Bramha Chari, P., & Kezia, D. (2016). Sequential Optimization Methods for Augmentation of Marine Enzymes Production in Solid-State Fermentation: L-Glutaminase Production a Case Study. In: *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. 78). Academic Press Inc.: pp. 95–114.
- Sharma, E., Joshi, R., & Gulati, A. (2018). March 1. L-Theanine: An astounding sui generis

integrant in tea. *Food Chemistry*. Elsevier Ltd.

- She, G., Yu, S., Li, Z., Peng, A., Li, P., Li, Y., Chang, M., Liu, L., Chen, Q., Shi, C., Sun, J., Zhao, J., & Wan, X. (2022). Characterization of CsTSI in the Biosynthesis of Theanine in Tea Plants (*Camellia sinensis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70: 826–836.
- Shen, X., Hua, Y., Luo, Y., Zhang, T., Jiang, B., & Shuai, Y. (2021). Permeabilization and immobilization of whole-cell *Pseudomonas nitroreducens* SP.001 to improve its L-glutaminase performance. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101: 1301–1306.
- Shuai, Y., Zhang, T., Jiang, B., Hua, Y., & Mu, C. F. (2019). An efficient method for the high-yield production of L-theanine using a newly isolated glutaminase-producing organism. *Food Bioscience*, 28: 164–169.
- Shuai, Y., Zhang, T., Jiang, B., & Mu, W. (2010). Development of efficient enzymatic production of theanine by γ -glutamyltranspeptidase from a newly isolated strain of *Bacillus subtilis*, SK11.004. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90: 2563–2567.
- Singh, P., Shera, S. S., Banik, J., & Banik, R. M. (2013). Optimization of cultural conditions using response surface methodology versus artificial neural network and modeling of L-glutaminase production by *Bacillus cereus* MTCC 1305. *Bioresource Technology*, 137: 261–269.
- Soren, J. P., Paul, T., Banerjee, A., Mondal, K. C., & Mohapatra, P. K. Das. (2020). Exploitation of Agricultural Waste as Sole Substrate for Production of Bacterial L-Glutaminase Under Submerged Fermentation and the Proficient Application of Fermented Hydrolysate as Growth Promoting Agent for Probiotic Organisms. *Waste and Biomass Valorization*, 11: 4245–4257.
- Soung, H. S., Wang, M. H., Chang, K. C., Chen, C. N., Chang, Y., Yang, C. C., & Tseng, H. C. (2018). L-Theanine Decreases Orofacial Dyskinesia Induced by Reserpine in Rats. *Neurotoxicity Research*, 34: 375–387.
- Sun, L., Wen, S., Li, Q., Lai, X., Chen, R., Zhang, Z., Li, D., & Sun, S. (2021). L-theanine relieves acute alcoholic liver injury by regulating the TNF- α /NF- κ B signaling pathway in C57BL/6J mice. *Journal of Functional Foods*, 86.
- Tachiki, T., Yamada, T., Mizuno, K., Ueda, M., Shiode, J. I., & Fukami, H. (1998). γ -Glutamyl transfer reactions by glutaminase from *pseudomonas nitroreducens* IFO 12694 and their application for the syntheses of theanine and γ -glutamylmethanamide. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 62: 1279–1283.
- Tachiki, T., Yamada, T., Ueda, M., Naemura, Y., Imamura, N., Hamada, Y. I., & Shiode, J. I. (1996). Purification and some properties of glutaminase from *pseudomonas nitroreducens* IFO 12694. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 60: 1160–1164.
- Thiagarajah, K., Chee, H. P., & Sit, N. W. (2022). Effect of Alpha-S1-Casein Tryptic Hydrolysate and L-Theanine on Poor Sleep Quality: A Double Blind, Randomized Placebo-Controlled Crossover Trial. *Nutrients*, 14.
- Thippeswamy, R., Gouda, K. M., Rao, D. H., Martin, A., & Gowda, L. R. (2006). Determination of theanine in commercial tea by liquid chromatography with fluorescence and diode array ultraviolet detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(19), 7014–7019.
- Türközü, D., & Şanlıer, N. (2017). L-theanine, unique amino acid of tea, and its metabolism,

- health effects, and safety. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57: 1681–1687.
- Ueki, T., Noda, Y., Teramoto, Y., Ohba, R., & Ueda, S. (1994). Practical Soy Sauce Production Using a Mixed Koji-Making System. *Journal Of Fermentation And Bioengineering* (Vol. 78).
- Uyanga, V. A., Oke, E. O., Amevor, F. K., Zhao, J., Wang, X., Jiao, H., Onagbesan, O. M., & Lin, H. (2022). December 1. Functional roles of taurine, L-theanine, L-citrulline, and betaine during heat stress in poultry. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. BioMed Central Ltd.
- Vuong, Q. V., Bowyer, M. C., & Roach, P. D. (2011). August 30. L-Theanine: Properties, synthesis and isolation from tea. *Journal of the Science of Food and Agriculture*.
- Wang, H. Q., Yao, Z., Zhou, Z., Sun, Y., Wei, P., & Ouyang, P. (2012). Enzymatic synthesis of Theanine with L-glutamine-Zn(II) complexes. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 17: 1135–1139.
- Wang, L., Brennan, M., Li, S., Zhao, H., Lange, K. W., & Brennan, C. (2022). May 1. How does the tea L-theanine buffer stress and anxiety. *Food Science and Human Wellness*. Elsevier B.V.
- Wang, T., Cai, B., Ding, M., Su, Z., Liu, Y., & Shen, L. (2019). c-Myc Overexpression Promotes Oral Cancer Cell Proliferation and Migration by Enhancing Glutaminase and Glutamine Synthetase Activity. *American Journal of the Medical Sciences*, 358: 235–242.
- Williams, J., Kellett, J., Roach, P. D., McKune, A., Mellor, D., Thomas, J., & Naumovski, N. (2016). June 1. L-theanine as a functional food additive: Its role in disease prevention and health promotion. *Beverages*. MDPI AG.
- Wu, Y., Han, Z., Wen, M., Ho, C. T., Jiang, Z., Wang, Y., Xu, N., Xie, Z., Zhang, J., Zhang, L., & Wan, X. (2022). Screening of α -glucosidase inhibitors in large-leaf yellow tea by offline bioassay coupled with liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Science and Human Wellness*, 11: 627–634.
- Xiang, H., Sun-Waterhouse, D., Waterhouse, G. I. N., Cui, C., & Ruan, Z. (2019). Fermentation-enabled wellness foods: A fresh perspective. *Food Science and Human Wellness*, 8: 203–243.
- Xiao, S., Qian, R., Hu, S., Fu, Z., Bai, T., Wang, W., Cheng, J., & Zhang, J. (2023). June 1. Advances in the Production of Theanine by Plants and Microorganisms. *Fermentation*. MDPI.
- Xu, L., Han, F., Zhang, X., & Yu, Q. (2020). Ultrasound enhanced biosynthesis of L-theanine from L-glutamine and ethylamine by recombinant γ -glutamyltranspeptidase. *Bioresource Technology*, 307.
- Yamamoto, S., Wakayama, M., & Tachiki, T. (2007). Characterization of theanine-forming enzyme from *Methylovorus mays* No. 9 in respect to utilization of theanine production. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 71: 545–552.
- Yan, Q., Tong, H., Tang, S., Tan, Z., Han, X., & Zhou, C. (2017). L-Theanine administration modulates the absorption of dietary nutrients and expression of transporters and receptors in the intestinal mucosa of rats. *BioMed Research International*, 2017.
- Yang, J., Sun-Waterhouse, D., Cui, C., Zhao, H., & Dong, K. (2018). Gamma-glutamylation of the white particulates of sufu and simultaneous synthesis of multiple acceptor amino acids-containing γ -glutamyl peptides: Favorable catalytic actions of

glutaminase. *LWT*, 96: 315–321.

- Yang, T., Irene, K., Liu, H., Liu, S., Zhang, X., Xu, M., & Rao, Z. (2019). Enhanced extracellular gamma glutamyl transpeptidase production by overexpressing of PrsA lipoproteins and improving its mRNA stability in *Bacillus subtilis* and application in biosynthesis of L-theanine. *Journal of Biotechnology*, 302: 85–91.
- Yang, T., Liu, S., Liu, H., Long, M., Chen, P., Zhang, X., Xu, M., & Rao, Z. (2021). Semi-quantitative activity assays for high-throughput screening of higher activity gamma glutamyl transferase and enzyme immobilization to efficiently synthesize L-theanine. *Journal of Biotechnology*, 330: 9–16.
- Yano, S., Kamemura, A., Yoshimune, K., Moriguchi, M., Yamamoto, S., Tachiki, T., & Wakayama, M. (2006). Analysis of essential amino acid residues for catalytic activity of glutaminase from *Micrococcus luteus* K-3. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 102: 362–364.
- Yao, J., Li, J., Xiong, D., Qiu, Y., Shi, G., Jin, J. M., Tao, Y., & Tang, S. Y. (2020). Development of a highly efficient and specific l-theanine synthase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104: 3417–3431.
- Yazar, S., Faydaoğlu, E., Metin, V., & Sürücüoğlu, S. . EÜFBED-Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi Cilt-Sayı: 6-2 Yıl: 2013 233-265 Tıbbi Ve Aromatik Bitkilerin Antimikrobiyal, Antioksidan Aktiviteleri Ve Kullanım Olanakları Medical And Aromatic Plants' Antimicrobial, Antioxidant Activities And Use Opportunities.
- Yiğit, A., Ertürk, Ü., Korukluoğlu, M., Gör, A., Üniversitesi, U., Fakültesi, Z., Mühendisliği, G., Bursa, B., Doç, Y., & Bitkileri, B. (2005). Fonksiyonel Bir Gıda: Ceviz. *Bahçe Ceviz* (Vol. 34).
- Yu, Z., & Yang, Z. (2020). March 8. Understanding different regulatory mechanisms of proteinaceous and non-proteinaceous amino acid formation in tea (*Camellia sinensis*) provides new insights into the safe and effective alteration of tea flavor and function. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Taylor and Francis Inc.
- Zeng, W. J., Tan, Z., Lai, X. F., Xu, Y. N., Mai, C. L., Zhang, J., Lin, Z. J., Liu, X. G., Sun, S. L., & Zhou, L. J. (2018). Topical delivery of L-theanine ameliorates TPA-induced acute skin inflammation via downregulating endothelial PECAM-1 and neutrophil infiltration and activation. *Chemico-Biological Interactions*, 284: 69–79.
- Zhu, G., Yang, S., Xie, Z., & Wan, X. (2018). Synaptic modification by L-theanine, a natural constituent in green tea, rescues the impairment of hippocampal long-term potentiation and memory in AD mice. *Neuropharmacology*, 138: 331–340.
- Zhu, Y., He, X., Huang, R., Wang, W., Yu, Y., & Zhou, T. (2022). Screening *Bacillus subtilis* for Effective L-theanine Production from Tea Plant Rhizosphere Soil. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 58: 206–212.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	Esra AYGÜN
Doğum tarihi:	
Doğum Yeri:	
Adres:	
E-mail:	
Eğitim	
Lise:	
Lisans:	
Yüksek lisans:	
Doktora:	
Yabancı Dil Bilgisi	