

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

METABOLİK AKI ANALİZİ TEKNİKLERİNİ
KULLANARAK HÜCRENİN BİYOLOJİK
AMACININ İNCELENMESİ

FATİH TARLAK
YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI

GEBZE

2012

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

METABOLİK AKI ANALİZİ TEKNİKLERİNİ
KULLANARAK HÜCRENİN BİYOLOJİK
AMACININ İNCELENMESİ

FATİH TARLAK
YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Hasan SADIKOĞLU
Yrd. Doç. Dr. Tunahan ÇAKIR

GEBZE

2012



YÜKSEK LİSANS TEZİ JÜRİ ONAY SAYFASI

G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 16.01.2012 tarih ve 2012/02 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 18.01.2012 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Fatih TARLAK'ın tez çalışması Kimya Mühendisliği Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Doç. Dr. Hasan SADIKOĞLU

ÜYE

(2. TEZ DANIŞMANI) : Yrd. Doç. Dr. Tunahan ÇAKIR

ÜYE

: Prof. Dr. Mehmet A. HASTAOĞLU

ÜYE

: Doç. Dr. Ferruh ÖZCAN

ÜYE

: Yrd. Doç. Dr. Fatih Erdoğan SEVİLGİN

ONAY

G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/...../20... tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

TEZİN BAŞLIĞI: METABOLİK AKI ANALİZİ TEKNİKLERİNİ KULLANARAK HÜCRENİN BİYOLOJİK AMACININ İNCELENMESİ

YAZAR ADI: Fatih TARLAK

Yapılan bu tez çalışmasındaki genel amaç, Aşağıdan Yukarı Sistem Biyolojisi yaklaşımlarından olan Akı Dengesi Analizi ve Kontrol-etkili Akı Analizi matematiksel yöntemlerini kullanarak *Escherichia coli* ve *Saccharomyces cerevisiae* mikroorganizmalarının farklı ortamlardaki davranışlarının ardında yatan biyolojik amacın ne olduğunu anlayabilmek ve bu mikroorganizmalar için bütün ortamlarda geçerli olabilen temel amaç (maksimum biyokütle üretimi) ve ikincil amaç (minimum enzim üretme) fonksiyonları önererek bir simülasyon çalışması yapmaktır. Bu amaç doğrultusunda, her iki mikroorganizma için de iki farklı boyutta (küçük boyut ve genom boyut) metabolik modeller kullanılarak elde edilen metabolik akı dağılımları, organizmalara ait farklı üç ortamdaki (kesikli oksijenli, sürekli oksijenli ve oksijensiz büyüme) literatürden elde edilen deneysel akı dağılımları ile karşılaştırıldı. Yapılan bu çalışma sayesinde, önerilen temel ve ikincil amaç fonksiyonlarının üç farklı ortamda da mikroorganizmaların gerçekteki davranışını ne kadar yansıttığı, kullanılan farklı boyuttaki metabolik modellerin mikroorganizmaları ne kadar temsil ettiği ve kullanılan matematiksel metotların mikroorganizmaların gerçek davranışını tahmin etmedeki analiz kabiliyeti test edilmiş oldu. Bu doğrultuda elde edilen başlıca sonuçlar; (a) En iyi sonuçların Akı Dengesi Analizi ile elde edilmesi, (b) Minimum enzim üretimini matematiksel olarak en iyi ifade eden fonksiyonun hücre içi akıların karelerinin toplamının minimizasyonu olması, (c) Akı dağılımı hesaplamalarında canlının esnek davranma eğiliminin dikkate alınması gerektiği şeklinde özetlenebilir.

SUMMARY

TITLE OF THE THESIS: INVESTIGATION OF BIOLOGICAL OBJECTIVE OF THE CELL BY USING METABOLIC FLUX ANALYSIS TECHNIQUES

AUTHOR: Fatih TARLAK

The main goal of this study is to understand biological objective of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* microorganisms in different environments by using two mathematical methods of bottom-up systems biology: Flux Balance Analysis and Control Effective Flux Analysis. It is also aimed to perform a simulation study by suggesting primary objective (maximum biomass production) and secondary objective (minimum enzyme production) functions for these microorganisms in any condition. Within this scope, metabolic flux distributions obtained by using two different (small size and genome size) metabolic models are compared with literature-based findings in three different conditions (aerobic chemostat, aerobic batch and anaerobic media) for both microorganisms. This study enabled the investigation of how (i) different scale metabolic models, (ii) suggested objective functions, and (iii) different mathematical methods represent microorganism behavior in three different conditions. Among others, the following main conclusions were obtained: a) Flux Balance Analysis gives closest results to the experimental data, b) the best function that represent microorganism behavior is the minimization of the sum of square of all intracellular fluxes, c) the flexibility of microorganisms have to be taken into account in simulation studies.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca benden ilgisini, bilgisini ve hoşgörüsünü eksik etmeyen değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Tunahan ÇAKIR'a ve bu tez çalışmasında bana çalışma fırsatı veren değerli hocam Doç Dr. Hasan SADIKOĞLU'na tüm samimiyetimle teşekkür ederim.

Tezin nihai şeklini almasında katkıda bulunan jürideki tüm saygıdeğer hocalarıma ayrı ayrı şükranlarımı sunarım. Ayrıca bu çalışmayı 110M464 nolu projeyle maddi olarak destekleyen TUBİTAK'a da teşekkürlerimi bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iv
SUMMARY	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xiii
1 GİRİŞ	1
2 KURAMSAL TEMELLER	3
2.1 Sistem Biyolojisi	3
2.2 Metabolizma	4
2.2.1 Glikoliz Yolu	6
2.2.2 Pentoz Fosfat Yolu	6
2.2.3 TCA (Krebs) Döngüsü	7
2.2.4 Oksidatif Fosforilasyon Evresi	8
2.3 Sistem Biyolojisi Hesaplamaları	8
2.3.1 Yukarıdan Aşağı (“Top-Down”) Yaklaşım	9
2.3.2 Aşağıdan Yukarı (“Bottom-Up”) Yaklaşım	9
2.4 Akı Dengesi Analizi (“Flux Balance Analysis”)	10
2.4.1 Akı Dengesi Analizi Aşamaları	11
2.4.2 Akı Dengesi Analizi’nin Matematiksel İfadesi	14
2.5 Kontrol-etkili Akı Analizi (“Control-effective Flux Analysis”, CEF)	15
2.6 Metabolik Modellerde Alternatif Optimumlar	19
2.6.1 Akı Değişkenliği Analizi Metodu (“Flux Variability Analysis”)	20
2.6.2 Alternatif Optimumlar ve Minimum Enzim Üretimi Eğilimi	22
2.6.3 Minimum Reaksiyon Basamağı	23
2.6.4 Hücre İçi Akıların Mutlak Değerlerinin Toplamının Minimizasyonu	26
2.6.5 Hücre İçi Akıların Karelerinin Toplamının Minimizasyonu	27

2.6.6 Geometrik Açıdan FBA	27
2.7 Mikroorganizmaların İkincil Amacı ve Akı Dengesi Analizi Aşamaları	28
2.8 Tahminin Doğruluğu Hesabı (“Predictive Fidelity”, PF)	32
3 <i>E.COLI</i> MİKROORGANİZMASI İÇİN YAPILAN ÇALIŞMALAR	33
3.1 Akı Dengesi Analizi Hesaplamaları Yapılırken Amaç Fonksiyonları ve Deney Ortam Özelliklerinin Modele Entegre Edilmesi	36
3.2 Küçük Model İçin Yapılan Hesaplamalar	37
3.2.1 Küçük Model Kullanılarak Yapılan Akı Dengesi Analizi Hesaplamaları	40
3.2.2 Küçük Model Kullanılarak Yapılan Kontrol-etkili Akı Analizi Hesaplamaları	43
3.3 iAF1260 Genom Model Kullanılarak Yapılan Hesaplamalar	47
3.3.1 iAF1260 Genom Model Kullanılarak Yapılan Akı Dengesi Analizi Hesaplamaları	48
4 <i>S.CEREVISIAE</i> MİKROORGANİZMASI İÇİN YAPILAN ÇALIŞMALAR	53
4.1 Akı Dengesi Analizi Hesaplamaları Yapılırken Amaç Fonksiyonları ve Deney Ortam Özelliklerinin Modele Entegre Edilmesi	55
4.2 Küçük Model İçin Yapılan Hesaplamalar	57
4.2.1 Küçük Model Kullanılarak Yapılan Akı Dengesi Analizi Hesaplamaları	59
4.2.2 Küçük Model Kullanılarak Yapılan Kontrol-etkili Akı Analizi Hesaplamaları	62
4.3 İFF708 Genom Model İçin Kullanılarak Yapılan Hesaplamalar	65
4.3.1 İFF708 Genom Model Kullanılarak Yapılan Akı Dengesi Analizi Hesaplamaları	66
5 TARTIŞMA VE YORUM	70
5.1 Kullanılan İkincil Amaç Fonksiyonlarının Sonuçlara Etkisi	71
5.2 Kullanılan Matematiksel Yöntemlerin Analiz Kabiliyeti	72
5.3 Kullanılan Metabolik Modelin Sonuçlara Etkisi	73
5.4 Kullanılan Esneklik ve Kısıt Hesaplamalarının Sonuçlara Etkisi	74
5.5 Yapılan Hesaplamaların Farklı Ortamlardaki Analiz Kabiliyeti	75
5.6 Yapılan Hesaplamaların Mikroorganizma Açısından Kabiliyeti	77

5.7 Literatürdeki Benzer Hesaplamalarla Karşılaştırma	78
6 SONUÇLAR	81
7 ÖNERİLER	82
KAYNAKLAR	83
ÖZGEÇMİŞ	87
EKLER	
EK 1: MİNİMUM REAKSİYON BASAMAĞI FONKSİYONUNU	
EK 2: HÜCRE İÇİ AKILARIN MUTLAK DEĞERLERİNİN TOPLAMININ MİNİMİZASYONU FONKSİYONU	
EK 3: KÜÇÜK <i>E.COLI</i> MİKROORGANİZMASI METABOLİK MODELİ REAKSİYONLARI	
EK 4: KÜÇÜK <i>S.CEREVISIAE</i> MİKROORGANİZMASI METABOLİK MODELİ REAKSİYONLARI	
EK 5: <i>E.COLI</i> MİKROORGANİZMASI İÇİN YAPILAN TÜM AKI DENGESİ ANALİZİ HESAPLAMALARI	
EK 6: <i>S.CEREVISIAE</i> MİKROORGANİZMASI İÇİN YAPILAN TÜM AKI DENGESİ ANALİZİ HESAPLAMALARI	
EK 7: TÜM HESAPLAMALARDAN ELDE EDİLEN PF DEĞERLERİNİN AYNIKOŞULLARDAKİ SONUÇLARLA KARŞILAŞTIRMALARI	

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ADA, FBA	: Akı Dengesi Analizi
KEAA, CEF	: Kontrol-etkili Akı Analizi
FVA	: Akı Değişkenliği Analizi
EFM	: Temel Akı Tipi
S	: Stokiyometrik Matris
PF	: Tahminin Doğruluğunu Gösteren Terim
mmol	: Milimol
gDw	: Hücre Ağırlığı
h	: Saat
f	: Amaç Fonksiyonunu gösteren Vektör
v	: Akı Vektörü
Lb	: Aranılan Akı Vektöründeki Alt Sınır
Ub	: Aranılan Akı Vektöründeki Üst Sınır

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>		<u>Sayfa</u>
2.1	Sistem biyolojisinin sistematik gösterimi	3
2.2	Sistem biyolojisi terimini içeren makale sayısının yıllara göre dağılımını gösteren grafik	4
2.3	Metabolizmanın evreleri ve şekilsel gösterimi	5
2.4	Glikoliz yolunun basitleştirilmiş şematik gösterimi	6
2.5	Pentoz Fosfat yolunun basitleştirilmiş şematik gösterimi	7
2.6	TCA döngüsü şematik gösterimi	7
2.7	Aşağıdan Yukarı Hesaplamalı Sistem biyolojisinin şekilsel gösterimi	9
2.8	Yukarıdan Aşağı Hesaplamalı Sistem biyolojisinin şekilsel gösterimi	10
2.9	Basit bir sistem için sınırın tanımlanması	11
2.10	Optimizasyon yapılmış sistem	15
2.11	11 reaksiyonlu 6 hücre içi metabolite sahip basit bir ağyapı	16
2.12	Akı değişkenliği analizi için sistem	20
2.13	Reaksiyonu kontrol eden mekanizmanın şematik gösterimi	23
2.14	Geometrik açıdan FBA Fonksiyonun davranışının şekilsel gösterimi	28
2.15	Mikroorganizmanın temel amacı ve ikincil amacı	29
2.16	Akı Dengesi Analizi Yaparken Takip Edilen Algoritma	30
3.1	Çalışılan <i>E.coli</i> bakterisi merkezi karbon metabolizmasına ait glikoz, pentoz fosfat, TCA döngüsü, oksidatif fosforilasyon evrelerinin şekilsel gösterimi	37
3.2	R7 oranı için izositrat metaboliti etrafındaki akı dağılımı	38
3.3	FBA ve CEF metotlarıyla elde edilen ayrılma oranlarının tanımlanması	43
4.1	<i>S.cerevisiae</i> mikroorganizması için merkezi karbon metabolizmasına Ait metabolik ağyapının şekilsel gösterimi	57
5.1	Enzim fonksiyonları bazında tüm mikroorganizmalar ve modeller kullanılarak elde edilen PF değerlerinin şekilsel gösterimi	72
5.2	Akı dengesi Analizi ve Kontrol-etkili Akı Analizi hesaplamalarından elde edilen PF değerlerinin şekilsel gösterimi	73

5.3	Küçük ve genom boyutlu model kullanılarak iki mikroorganizma için yapılan hesaplamalardan elde edilen PF değerlerinin şekilsel gösterimi	74
5.4	Tüm modeller ve mikroorganizmalar için yapılan hesaplamalarda kullanılan esneklik ve kısıtlar sonucu elde edilen PF değerlerinin şekilsel gösterimi	75
5.5	Farklı ortamlar için yapılan tüm hesaplamalardan elde edilen PF değerlerinin şekilsel gösterimi	76
5.6	Miroorganizma bazında tüm hesaplamalardan elde edilen PF değerlerinin şekilsel gösterimi	77

1 GİRİŞ

Sistem biyolojisi, hücre içindeki genlerin, proteinlerin ve biyokimyasal reaksiyonların etkileşimi ile oluşan karmaşık yapıyı matematiksel modellere dökerek tüm sistem hakkında bilgi edinmeyi amaçlayan yeni ve disiplinlerarası bir bilim dalıdır [Klipp et al, 2005]. Bu yeni bilim dalının odaklandığı noktalardan bir tanesi, mikroorganizmaların farklı çevresel koşullarda nasıl davranış sergilediğinin anlaşılmasıdır. Bu amaç doğrultusunda sistem biyolojisi hücre içi biyolojik ağyapıların çalışma prensiplerini anlamaya çalışır. Bunun için de, iki farklı tür hesaplama yönteminden yararlanır. Bunlardan Yukarıdan Aşağı (“Top-Down”) Yaklaşım, hiçbir hücresel ağyapı bilgisi kullanmadan, sadece hücre içi biyomoleküllerin miktarını veren deneysel verileri istatistik, optimizasyon ve bayez ağlar yöntemleri yardımıyla analiz eder. Ve ilgili koşulda aktif olan hücresel ağyapının ortaya çıkarılmasını amaçlar. İki türlü sistem biyolojisi yaklaşımından diğeri olan Aşağıdan Yukarı Yaklaşım (“Bottom-Up”) ise, literatürden derlenmiş genel hücre ağyapısı bilgisini kullanarak, ağyapıdaki ilgili koşulda aktif olan reaksiyonların optimizasyon veya lineer cebir hesaplamalarıyla bulunması olarak tanımlanır.

Hücrenin yaşamsal faaliyetlerini devam ettirebilmesi ve büyüebilmesi amacıyla gerçekleşen tüm reaksiyonlara metabolizma denir. Bu bağlamda metabolik olaylar hücrenin can damarıdır. Metabolizmanın incelenmesi doğrultusunda kullanılan en yaygın hesaplama metodu Akı Dengesi Analizi (“Flux Balance Analysis”) metodudur. Ayrıca Kontrol-Etkili Akı Dengesi Analizi (“Control-effective Flux Analysis”) isimli başka bir metot da önerilmiştir. Bu iki Aşağıdan Yukarı Yaklaşım metodu metabolik akı dağılımını, yani metabolik ağyapıyı oluşturan reaksiyonların belli bir koşulda aktif olanlarını, belirlemeyi amaçlayan matematiksel yöntemlerdir. Akı Dengesi Analizi hesabı doğrusal programlama, karesel programlama ve karma tam sayılı doğrusal programlama gibi optimizasyon algoritmalarına dayanır. Kontrol-Etkili Akı Analizi ise doğrusal cebir tabanlı hesaplamalar içerir.

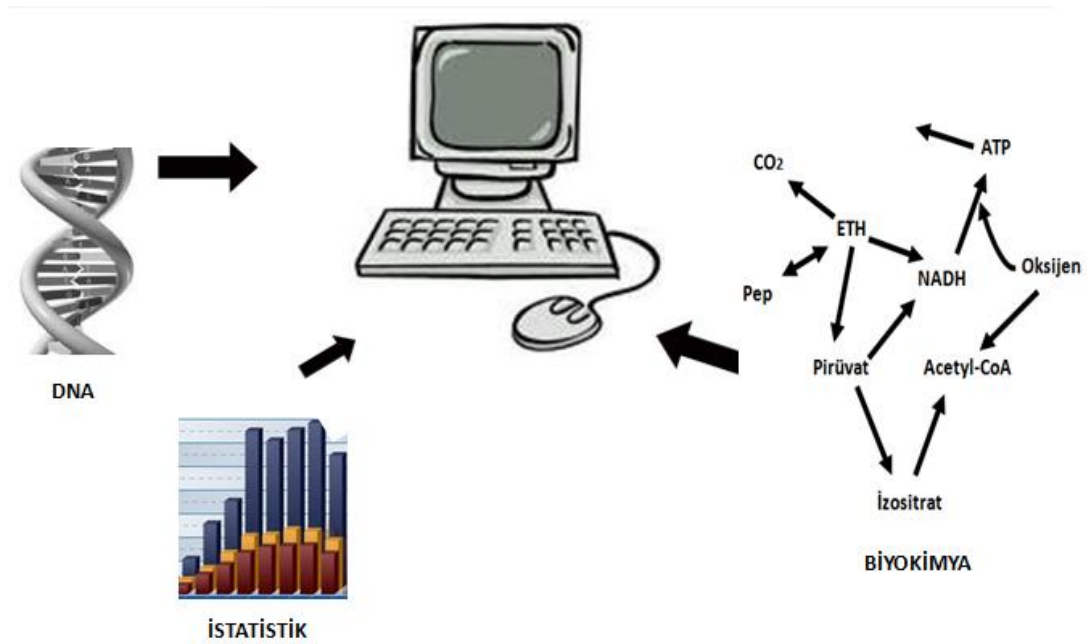
Yapılan çalışmada Aşağıdan Yukarı Yaklaşım sistemi ve bu kapsamda her iki hesaplama metoduna odaklanılarak, *Escherichia coli* ve *Saccharomyces cerevisiae* mikroorganizmalarının farklı ortamlarda metabolik açıdan nasıl davranış sergilediğinin ve bu davranışın ardındaki biyolojik amacın ne olduğunun incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, her iki mikroorganizma için de biri 50-100 tepkimeden oluşan küçük metabolik model, diğeri 1000'den fazla tepkimeden oluşan genom-boyutlu metabolik model olmak üzere iki farklı boyutta modeller kullanılarak metabolik akı dağılımları elde edilmiştir. Elde edilen akı dağılımları, organizmalara ait farklı üç ortamdaki (kesikli oksijenli, sürekli oksijenli, ve oksijensiz büyüme) deneysel akı değerleri ile karşılaştırılmıştır.

Çalışmada kullanılan Akı Dengesi Analizi ve Kontrol-Etkili Akı Dengesi Analizi metotları, kullanılan amaç fonksiyonları ve sistemin modellenmesi aşamaları hakkında ayrıntılı bilgi tezin ikinci bölümünde verilmiştir. Tezin üçüncü bölümünde *Escherichia coli* mikroorganizması için iki farklı boyutta metabolik model kullanılarak yapılan hesaplamalar, tezin dördüncü bölümünde ise *Saccharomyces cerevisiae* mikroorganizması için iki farklı boyutta metabolik model kullanılarak yapılan hesaplamalar ayrıntılı olarak verilmiştir. Beşinci bölüm, bulguların tartışma ve yorumlanmasına ayrılmıştır. Son bölümde ise tez çalışmasının ana sonuçları ve öneriler verilmektedir.

2 KURAMSAL TEMELLER

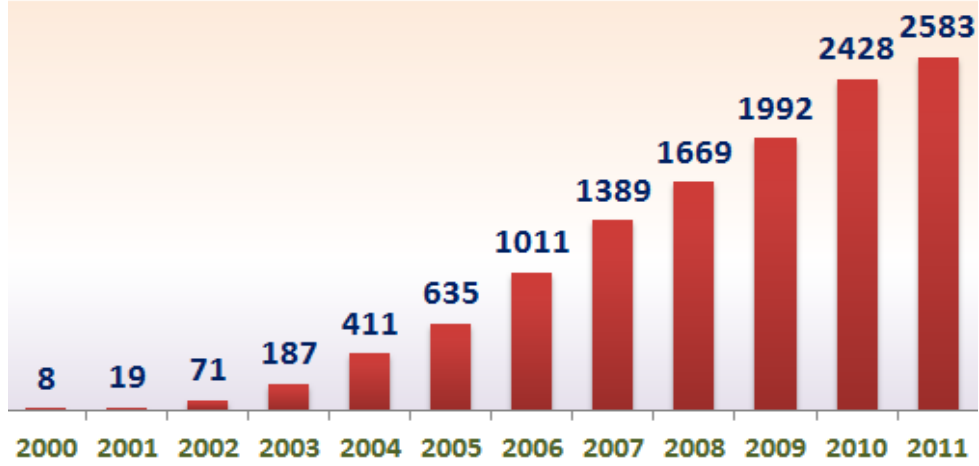
2.1 Sistem Biyolojisi

Sistem biyolojisi, genlerin, proteinlerin ve biyokimyasal reaksiyonların oluşturduğu ağıyapısal sistemin bütünleşik olarak incelenmesini amaçlayan çok disiplinli bir bilim dalıdır [Klipp et al., 2005]. Bu bilim dalı elde ettiği verileri matematiksel modellere dökerek tüm sistemin yapısı hakkında bilgi edinmeyi hedefler.



Şekil 2.1 Sistem biyolojisinin sistematik gösterimi

Şekil 2.1’de gösterildiği gibi sistem biyolojisi deneylerle elde edilmiş verilerin toplanmasını, sayısal tahminleri elde etmek için matematiksel denklemlerin bilgisayar destekli çözümlerini, denklem çözümlerine göre yeni matematiksel modellerin önerilmesini ve deneysel verilerle sayısal simülasyonların karşılaştırılmasıyla hücrenin davranışlarını en iyi şekilde gösterilebilen modellerin oluşturulmasını kapsar.



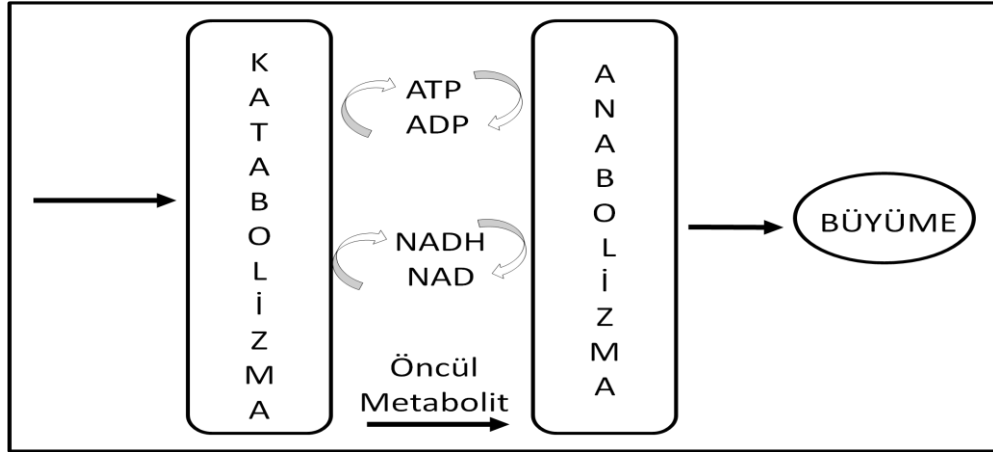
Şekil 2.2 Sistem biyolojisi terimini içeren makale sayısının yıllara göre dağılımını gösteren grafik (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed)

Şekil 2.2’de görüldüğü gibi sistem biyolojisi oldukça yeni bir bilim dalı olmasına rağmen bu bilim dalına ilgi hızla ivme kazanmaktadır. Bu yeni bilim dalının odaklandığı hücresel sistemlerden bir tanesi de hücre metabolizmasıdır. Bundan dolayı metabolizma hakkında bilgi sahibi olunması önemlidir.

2.2 Metabolizma

Hücrenin yaşamsal faaliyetlerini devam ettirebilmesi ve büyüyebilmesi amacıyla gerçekleşen tüm reaksiyonlara metabolizma denir. Glikozun ve besinlerin hücre içine alınarak parçalanması veya birleşmesiyle elde edilen kimyasal maddelere de metabolit denir [Demain, 1980]. Her organizma, büyüme, gelişme, ısı, hareket, üreme gibi yaşamsal etkinlikleri sürdürebilmek için dış çevreden bazı maddeler ve enerji almak zorundadır. Bu maddeler yaşamsal etkinliklerin sürdürülebilmesi için gereken organik moleküllerin sentezlenmesinde kullanılacaktır. Dış çevreden alınan organik ya da inorganik moleküller, ya önce parçalanarak, yıkıma uğratılır ya da yıkıma gerek kalmadan gerekli moleküllerin sentezlenmesinde kullanılır. Bu açıdan metabolizma hücresel fabrika (“cellular factory”) olarak da tanımlanır [Stephanopoulos et al., 1998].

Metabolizma genel olarak iki evrede gerçekleşir. Hücreye dışarıdan alınan 6 karbonlu glikozun veya diğer besinlerin daha düşük karbonlu ve daha basit yapıdaki moleküllere dönüşmesi evresine katabolizma denir. Anabolizma ise, hücrenin büyümesi için ve tüm faaliyetlerinin gerçekleştirebilmesi amacıyla katabolizma sonucu oluşan basit yapıdaki moleküllerden daha büyük yapıdaki molekülerin sentezlenmesi olaylarının gerçekleştiği evredir.



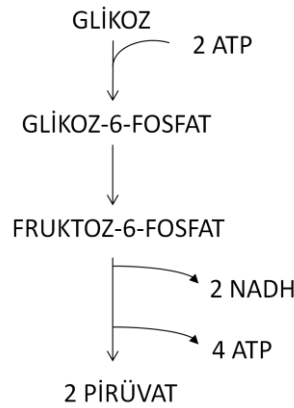
Şekil 2.3 Metabolizmanın evreleri ve şekilsel gösterimi

Şekil 2.3'te görüldüğü gibi hücreye dışarıdan besin alınır, ardından katabolik olaylarla çeşitli metabolitlere dönüştürülür. Bu metabolitlerin birçok reaksiyonla bir araya gelmesi sonucu anabolizmada hücrenin büyüebilmesi için gerekli makromoleküller oluşturulur. Bu makromoleküllerin oluşmasında önemli rol oynayan metabolitlere öncül metabolit denir. Bu öncül metabolitler sayesinde hücreyi oluşturan makromoleküller (Yağ, DNA ve RNA, Karbonhidrat ve Protein) meydana gelir. Büyüme (growth) dediğimiz olay da, hücrenin kendisi için gerekli makromolekülleri üretmesidir. Bu şekilde anabolizma evresi sonucunda hücre büyümesi gerçekleşecektir.

Katabolizmadaki yıkım olayları süreci kendi içinde farklı aşamalar halinde gerçekleşir. Bu aşamalara yol izleri ("pathways") denir. Bunlar, Glikoliz yolu, Pentoz fosfat yolu, TCA (Krebs) döngüsü ve Oksidatif fosforilasyon evreleridir.

2.2.1 Glikoliz Yolu

Hücreye dışarıdan besin alımıyla başlayan glikoliz yolu hücrenin sitoplazmasında gerçekleşir. Glikozun enzimlerle pirüvik asite (pirüvat) kadar yıkılması olayıdır.



Şekil 2.4 Glikoliz yolunun basitleştirilmiş şematik gösterimi

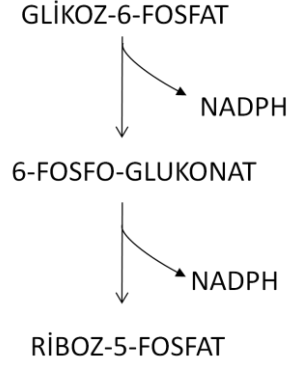
Bütün canlılarda glikoliz reaksiyonları hemen hemen aynı şekilde gerçekleşir. Çünkü olaylar için tüm canlılarda aynı enzimler görevlidir. Şekil 2.4'te görüldüğü gibi başlangıçta glikozu aktive etmek için 2 ATP (Adenozin-tri-fosfat) harcanır ve Fruktöz-6-fosfat meydana gelir. Takip eden glikoliz reaksiyonları sırasında ise 4 ATP ve 2 NADH oluşur. Yani, bu yolda toplam net kazanç 2 ATP ve 2 NADH üretimidir.

Oluşan NADH'lar oksijenli solunumda elektron taşıma sistemine aktarılır ve oksijenle birleşerek hücre için gerekli enerjiyi sağlamak amacıyla ATP'ye dönüşebilir. Oksijensiz solunumda ise NADH'lar etil alkol, asetat gibi oluşmasında NADH ihtiyacı olan yan ürünlerin üretiminde kullanılarak hücre içi NADH dengesi sağlanmış olur.

2.2.2 Pentoz Fosfat Yolu

Pentoz fosfat yolu glikoliz yoluna alternatif bir yan yoldur. Glikoliz yolu gibi hücrenin sitoplazmasında gerçekleşir. Bu evrede ATP hiç üretilmez veya tüketilmez.

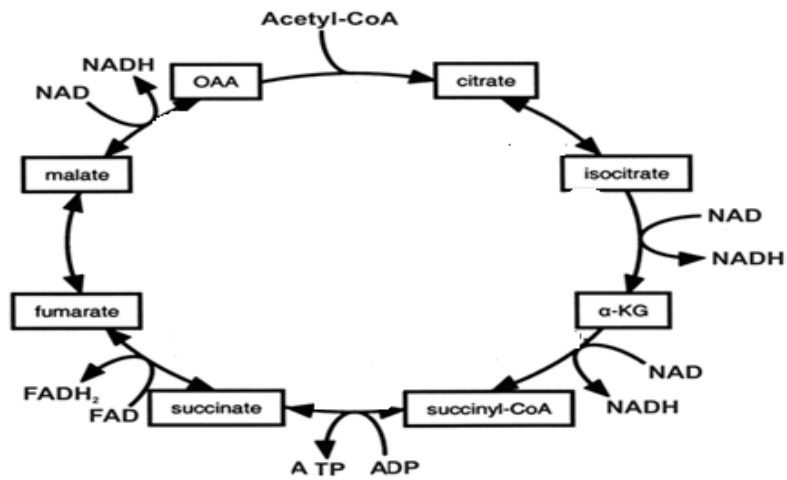
Şekil 2.5'te görüldüğü gibi bu evrenin asıl amacı hücre için gerekli anabolik reaksiyonlarda görev yapan NADPH'nin üretilmesidir.



Şekil 2.5 Pentoz Fosfat yolunun basitleştirilmiş şematik gösterimi

2.2.3 TCA (Krebs) Döngüsü

Glikoliz yolunda üretilen pirüvat oksaloasetat (OAA) ve Asetil-Koenzim-A (Acetyl-CoA)'ya dönüştürülür. Krebs döngüsü de denen TCA (tri-karboksilik asit) döngüsü, bunların birleşmesi sonucu sitrat oluşumu ile başlayan ve son olarak tekrar oksaloasetat oluşarak devam eden döngüdür. Bu evre mitokondride gerçekleşir. Şekil 2.6'da görüldüğü gibi TCA döngüsünde 1 ATP, 1 FADH ve 3 NADH üretilmektedir. Bunlar 1 molekül pirüvattan oluşan miktarlardır. 1 molekül glikozdan 2 molekül pirüvat üretildiğinden dolayı (Şekil 2.4) hücre içine alınan 1 molekül glikoz için TCA döngüsünde 2 ATP, 2 FADH ve 6 NADH üretilir.



Şekil 2.6 TCA döngüsü şematik gösterimi (www.biochem.oulu.fi)

2.2.4 Oksidatif Fosforilasyon Evresi

Oksidatif fosforilasyon, oksijenli solunumun son evresini teşkil eder. Glikoliz ve Krebs döngüsü sırasında oluşan bileşiklerdeki NADH ve FADH'ın, mitokondri zarının üzerinde bulunan elektron taşıma sisteminden (ETS) geçirilmesi sırasında oksijenle birleşerek Eşitlik (2.1) ve (2.2)'deki gibi ATP oluşturma olayıdır.



Bunlara ek olarak 2 piruvattan 2 Asetil-Koenzim-A oluşması reaksiyonu sırasında da 2 NADH üretilir. Sonuç olarak, hücre merkezi metabolizmasını oluşturan katabolik yol izlerinde, Tablo 2.1'de görüldüğü gibi toplam 38 ATP üretilir.

Tablo 2.1 Oksijenli ortamda hücrenin üretebileceği ATP miktarı

Yoluz	Üretilen	Toplam ATP Kazancı
Glikoliz	2 ATP ve 3 NADH	8
Pentoz Fosfat	-	0
2 Pirüvat → 2 Acetyl-CoA	2 NADH	6
TCA	2ATP, FADH, 6 NADH	24

Oksijensiz solunumda ise, sadece glikoliz yoluyla 2 ATP üretilir. TCA döngüsü çok aktif değildir. Oksidatif fosforilasyon da olmadığı için NADH'lar ATP'ye çevrilemez. Hücre NADH dengesini sağlamak için etil alkol, asetat gibi yan ürünler üretir.

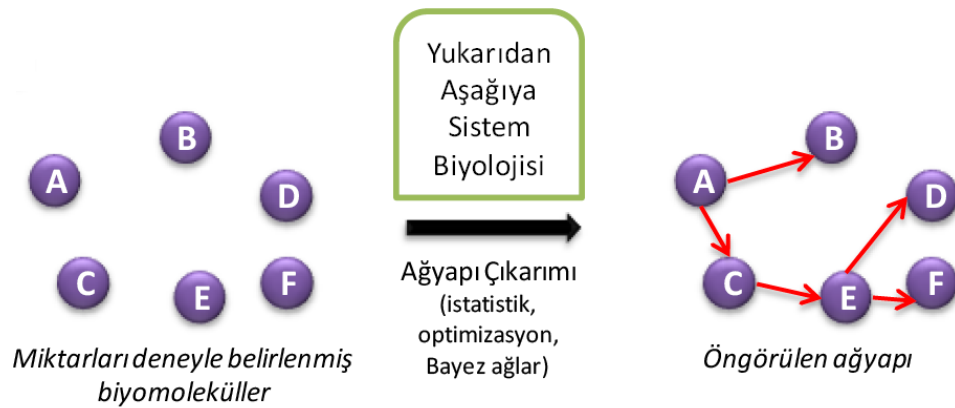
2.3 Sistem Biyolojisi Hesaplamaları

Metabolik olayların tümünün (anabolizmada ve katabolizmada gerçekleşen tüm reaksiyonlar) ağyapısal gösterimine metabolik ağyapı denir. Sistem biyolojisinin odaklandığı noktalardan bir tanesi de mikroorganizmaların metabolik ağyapılarının

farklı çevresel koşullarda nasıl davranış sergilediğinin anlaşılmasıdır. Bu amaç doğrultusunda sistem biyolojisi iki farklı hesaplama sisteminden yararlanır. Bu yaklaşım yöntemleri şunlardır. (1) Yukarıdan Aşağı (“Top-Down”) Yaklaşım, (2) Aşağıdan Yukarı (“Bottom-Up”) Yaklaşım

2.3.1 Yukarıdan Aşağı (“ Top-Down”) Yaklaşım

Yukarıdan Aşağı Yaklaşım Şekil 2.7’de görüldüğü gibi, hiçbir hücresel ağyapı bilgisini kullanmadan, sadece hücre içi biyomoleküllerin miktarını veren deneysel verileri istatistik, optimizasyon ve bayez ağlar yöntemleriyle analiz ederek aktif olan hücresel ağyapının ortaya çıkarılmasını amaçlar. Bu yöntem literatürde ağyapı bilgisine ulaşamadığımız durumlarda oldukça yardımcı olur.

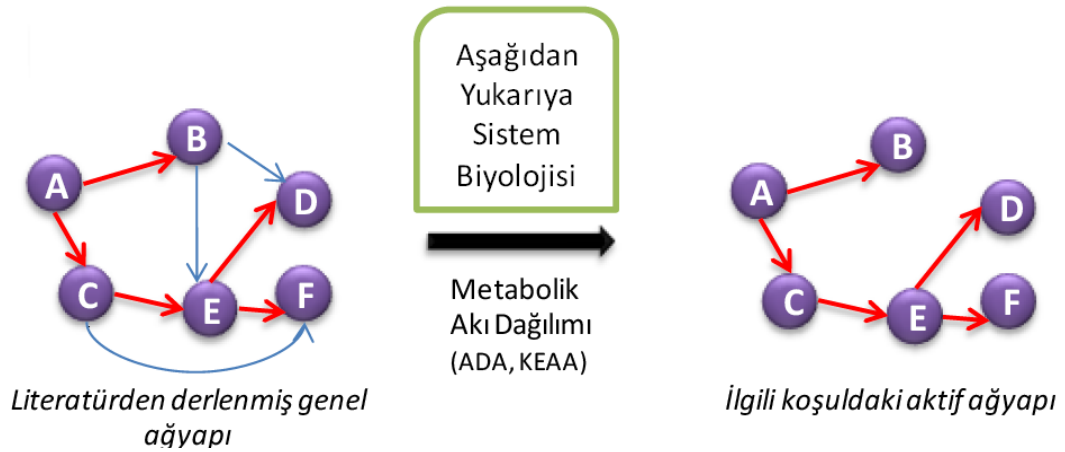


Şekil 2.7 Yukarıdan Aşağı Hesaplamalı Sistem biyolojisinin şekilsel gösterimi [Çakır, 2010]

2.3.2 Aşağıdan Yukarı (“Bottom-Up”) Yaklaşım

İki türlü sistem biyolojisi yaklaşımından diğeri olan aşağıdan yukarı yaklaşım, Şekil 2.8’de görüldüğü gibi literatürden derlenmiş genel ağyapı sistemini kullanarak, ağyapıdaki ilgili koşulda aktif olan reaksiyonların bulunması olarak tanımlanır.

Aşağıdan Yukarıya Yaklaşımında kullanılan ve metabolik akı dağılımını (yani metabolik ağyapıyı oluşturan reaksiyonların belli bir koşulda aktif olanlarını) belirlemeyi amaçlayan matematiksel yöntemler iki grupta incelenebilir. Metabolizmada optimum davranışa sahip aktif tek bir akı dağılımı olduğu varsayımıyla optimizasyon kullanarak bu akı dağılımını hesaplamayı hedefleyen Akı Dengesi Analizi, birinci grupta yer alan en yaygın yöntemdir. Bu tek akı dağılımına odaklanan yöntem alternatif olarak, hücrenin esnek davranma eğilimini de dikkate alan ve bu nedenle birden çok akı dağılımını bir arada inceleyen yöntemler de vardır. Stelling ve arkadaşları (2002) tarafından önerilen Kontrol-etkili akı analizi bunlardandır. Bu tez çalışmasında Aşağıdan Yukarı yaklaşım sistemine ayrıntılı olarak odaklanılacaktır.



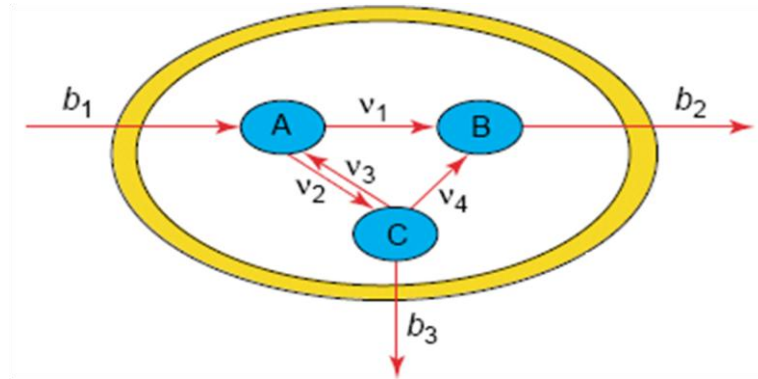
Şekil 2.8 Aşağıdan Yukarı Hesaplamalı Sistem biyolojisinin şekilsel gösterimi [Çakır, 2010]

2.4 Akı Dengesi Analizi (“Flux Balance Analysis”)

Metabolik reaksiyonların hızlarını hesaplamaya yarayan ve bu şekilde serbestlik derecesi sıfırdan büyük denklem sistemlerini optimizasyon yöntemleri kullanarak inceleyen bir yöntemdir. Akı (“Flux”), hücre içerisinde gerçekleşen reaksiyonların hız ifadesine denir. Akı Dengesi Analizi metodunu daha iyi anlayabilmek için yapılan işlemler basamaklar halinde gösterilmiştir.

2.4.1 Akı Dengesi Analizi Aşamaları

1. Basamak: Sistemin tanımlanması: Akı dengesi analizi için öncelikle sistemdeki bütün metabolitlerin ve reaksiyonların tanımlanmasına ihtiyaç vardır. Yani, sistem sınırları içerisine giren, içeride olan ve içeriden çıkan bütün metabolitler ve bu metabolitler arasında gerçekleşen reaksiyonlar belirlenmelidir.



Şekil 2.9 Basit bir sistem için sınırın tanımlanması [Kauffman et al., 2003]

Şekil 2.9’da görüldüğü gibi basit bir sistem tanımlanmıştır. Bu sistemde, b_1 giriş akısını, b_2 ve b_3 çıkış akılarını temsil etmektedir. Ayrıca bu akılara değişim (“exchange”) reaksiyonları da denir. v_1 , v_2 , v_3 ve v_4 sistem içerisindeki akıları temsil eder. Bu akılara hücre içi (“internal”) reaksiyonlar denir. A, B ve C ise hücre içindeki metabolitleri temsil etmektedir. Ayrıca bu aşamada reaksiyonların tek yönlü ve çift yönlü olup olmadığının da tanımlanması gereklidir. Örneğin A ve C metabolitleri arasında çift yönlü reaksiyon A ve B, B ve C metabolitleri arasında ise tek yönlü reaksiyon gerçekleşmektedir.

2. Basamak: Kütle denkliği (Eşitlik Kısıtı, "Equality constraint"): Sistem tanımlandıktan sonra elde edilen metabolik ağyapıda yer alan metabolitler için kütle denkliği oluşturulur. Bütün metabolitler etrafında giren çıkan akılar belirlenir ve stokiyometrik katsayılardan diferansiyel denklem takımları elde edilir. Örneğin, A metaboliti etrafında kütle denkliği yapıldığında A metabolitini oluşturan akılar v_3 ve b_1 çıkan akı ise v_1 ve v_2 olduğu için Eşitlik (2.3)’teki gibi ifade edilir.

$$(dA/dt) = -v_1 - v_2 + v_3 + b_1 \quad (2.3)$$

Eşitlik (2.3), (2.4) ve (2.5)'teki denklemler Eşitlik (2.6)'daki gibi matris formatına dönüştürülür

$$(dB/dt) = v_1 + v_4 - b_2 \quad (2.4)$$

$$(dB/dt) = v_2 - v_3 - v_4 - b_3 \quad (2.5)$$

$$\begin{bmatrix} \frac{dA}{dt} \\ \frac{dB}{dt} \\ \frac{dC}{dt} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -1 & -1 & 1 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 0 & 1 & 0 & -1 & 0 \\ 0 & 1 & -1 & -1 & 0 & 0 & -1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} v_1 \\ v_2 \\ v_3 \\ v_4 \\ b_1 \\ b_2 \\ b_3 \end{bmatrix} \quad (2.6)$$

Burada S stokiyometrik matrisi, $\mathbf{v}$ ise aranan akılar değerlerinden oluşan bir vektörü temsil etmektedir. Stokiyometrik matris elde edilirken matrisi oluşturan satırlar metabolitleri, sütunlar ise reaksiyonları ifade eder. Şöyle ki, S matrisinin birinci satırı ve birinci sütunundaki katsayı (-1) dir. Bu katsayı birinci satır yani birinci metabolit olan A metabolitinin, birinci sütun yani birinci reaksiyon olan v_1 reaksiyonundaki katsayısıdır. Bu şekilde (3x7) boyutunda, 3 metabolitten ve 7 reaksiyondan oluşan S sitokiyometrik matrisi elde edilir. Sitokiyometrik matris ile aranan akı vektörünü çarptığımızda Adi diferansiyel denklemlerle ifade edilen konsantrasyon vektörü (dA/dt) , (dB/dt) , (dC/dt) elde edilir. Bu aşamada elde edilen konsantrasyon vektörü değerleri, incelenen sistemin kararlı durum (“steady-state”) olduğu varsayımı yaparak sıfıra eşitlenebilir. Buradaki amaç Eşitlik (2.7)’de görülen denklem sistemindeki $v_1, v_2 \dots, b_3$ akı vektörünün hesaplamasıdır.

$$\begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} = \begin{bmatrix} -1 & -1 & 1 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 0 & 1 & 0 & -1 & 0 \\ 0 & 1 & -1 & -1 & 0 & 0 & -1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} v_1 \\ v_2 \\ v_3 \\ v_4 \\ b_1 \\ b_2 \\ b_3 \end{bmatrix} \quad (2.7)$$

3. Basamak: Reaksiyonların Yön Kısıtı (“Reversibility Constraint”): Kütle denkliği basamağında oluşturulan denklemlerdeki bilinmeyenler ($\mathbf{v}$) için kolaylıkla reaksiyon yön kısıtı tanımlanabilir. Bu kısıtın genel ifadesi şu şekildedir. $\mathbf{Lb} \leq \mathbf{v} \leq \mathbf{Ub}$. Burada $\mathbf{Lb}$ değeri reaksiyonun alabileceği minimum değeri, $\mathbf{Ub}$ değeri ise reaksiyonun alabileceği maksimum değeri göstermektedir. Bu aşamada reaksiyonların tek yönlü ve çift yönlü olanlarının belirlenmesi gerekir. Örneğin,

$A \longrightarrow B$ gibi gerçekleşen bir reaksiyon için $0 \leq \mathbf{v} \leq \infty$,

$A \longleftrightarrow B$ gibi gerçekleşen bir reaksiyon için $-\infty \leq \mathbf{v} \leq \infty$ değerler alır.

4. Basamak: Ölçüm Kısıtları (“Measurement Constraint”): Bu aşamada sistemde yer alan akılardan deneysel olarak değerleri bilinenler sabitlenebilir. Bu şekilde, sisteme daha uygun modeller üretilebilir. Örneğin, Şekil 2.9’daki sistemi temel aldığımızda $C \rightarrow B$ (v_4) reaksiyonunun akısı için elimizde deneysel elde edilmiş bir ölçüm varsa bu ölçüm kısıt olarak kullanılabilir.

5. Basamak: Optimizasyon: Akı Dengesi Analizinin son aşaması optimizasyon aşamasıdır. Akı Dengesi Analizi yaparken optimizasyon aşaması olmasının sebebi şudur; bir denklem sisteminin çözülebilmesi için (tek çözümü olabilmesi için) denklem sisteminin serbestlik derecesinin 0 olması gereklidir. Yani denklem sistemindeki denklem sayısı ile bilinmeyen sayısının aynı olması gerekir. Fakat metabolik ağyapılardan oluşan denklem sisteminde metabolit sayısı (denklem sayısı) reaksiyon sayısına (bilinmeyen sayısına) göre her zaman daha azdır. Yani sistemin serbestlik derecesi her zaman 0’dan büyüktür. Bu tür sistemlere tanımlanmamış (“underdetermined”) sistemler denir. Örneğin Şekil 2.9’da bulunan sistemi baz aldığımızda bu sistem için 3 denklem (metabolit) ve 7 reaksiyon bulunmaktadır. Bu sistemin serbestlik derecesi ($7-4=3$) pozitifdir ve matematiksel olarak bu denklem sisteminin tek çözümü yoktur. Fakat 3 tane ölçülmüş veri daha olursa serbestlik derecesi 0 olacak ve sistem tanımlı (“determined”) hale gelecektir. Ölçülmüş veri yoksa veya 3’ten az ise sistemin birçok çözümü vardır. Bu çözümler arasından optimizasyon yöntemini kullanarak sistemi temsil eden tek bir model (çözüm) elde etmek amaçlanır. Akı dengesi analizi, işte tüm bu basamaklar takip edilerek metabolik reaksiyon akılarının optimizasyonla belirlenmesi yöntemidir.

Optimizasyon şu iki parametre kullanılarak yapılır: Kısıtlar ve Amaç fonksiyonu. Kısıtlar, daha önce bahsedildiği gibi üç çeşittir. (a) Stokiyometrik matris eşitliğinden kaynaklanan kısıtlar, (b) Reaksiyonların yön durumundan kaynaklanan kısıtlar, (c) Deneysel ölçülmüş verilerden kaynaklanan kısıtlar. Amaç fonksiyonu (“Objective function”) ise, optimizasyonu hangi amaç için yaptığımızı gösteren fonksiyondur. Sistemdeki değişkenlerin lineer veya nonlineer kombinasyonlarının minimizasyonu veya maksimizasyonu olarak seçilir. Örneğin, mikroorganizmaların en temel hedefi büyümek olduğu için optimizasyon yaparken seçilen en yaygın amaç fonksiyonu biyokütlenin oluşumunu gösteren reaksiyonun maksimizasyonudur [Varma and Palsson, 1993; Burgard and Maranas, 2003]. Biyokütlenin maksimizasyonu demek, canlının büyümesinin maksimizasyonu demektir. Yukarıda bulunan bu 5 basamak (Akı Dengesi Analizi yaparken uygulanan basamak) tamamlandıktan sonra sistem modellenmiş olur.

2.4.2 Akı Dengesi Analizi’nin Matematiksel İfadesi

Akı Dengesi Analizi, matematiksel olarak, aşağıdaki denklemlerin çözülmesi olarak özetlenebilir;

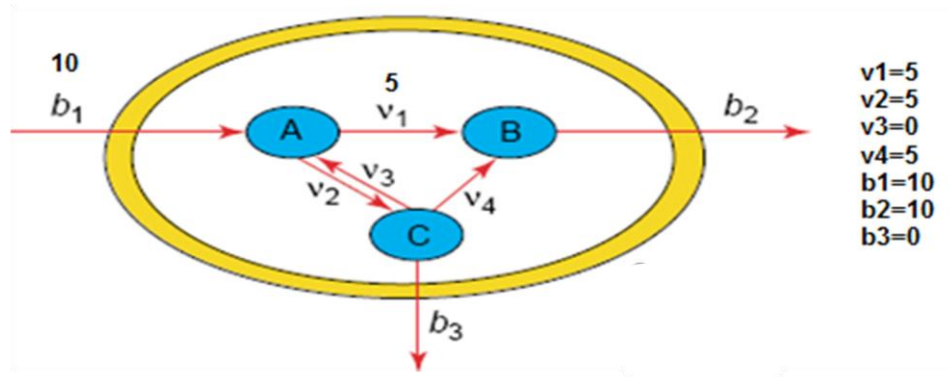
$$S \cdot \mathbf{v} = 0 \quad (2.8)$$

$$\mathbf{Lb} \leq \mathbf{v}_i \leq \mathbf{Ub} \quad (2.9)$$

$$\text{Objective function } \mathbf{f}^T \cdot \mathbf{v} \quad (2.10)$$

Burada S Stokiyometrik matrisi, $\mathbf{v}$ aranan akı vektörünü, $\mathbf{f}$ amaç fonksiyonu (“objective function”) vektörünü $\mathbf{Lb}$ aranan akı vektörü için alt sınırı $\mathbf{Ub}$ aranan akı vektörü için üst sınırı göstermektedir.

Örneğin, Şekil 2.9’daki sistem için, deneysel ölçüm kısıtı v_1 akısı 5 ve b_1 akısı 10 olarak verilmiş olsun. Bunlardan başka hiçbir ölçüm kısıtı olmasın. Amaç fonksiyonu da b_2 ‘nin maksimizasyonu olarak seçilsin. Bu iki parametre (deneysel ölçüm kısıtı ve amaç fonksiyonu) baz alınıp optimizasyon yapıldığında Şekil 2.10’daki sonuçlar elde edilmektedir.



Şekil 2.10 Optimizasyon yapılmış sistem [Kauffman et al., 2003]

2.5 Kontrol-etkili Akı Analizi (“Control-effective Flux Analysis”, CEF)

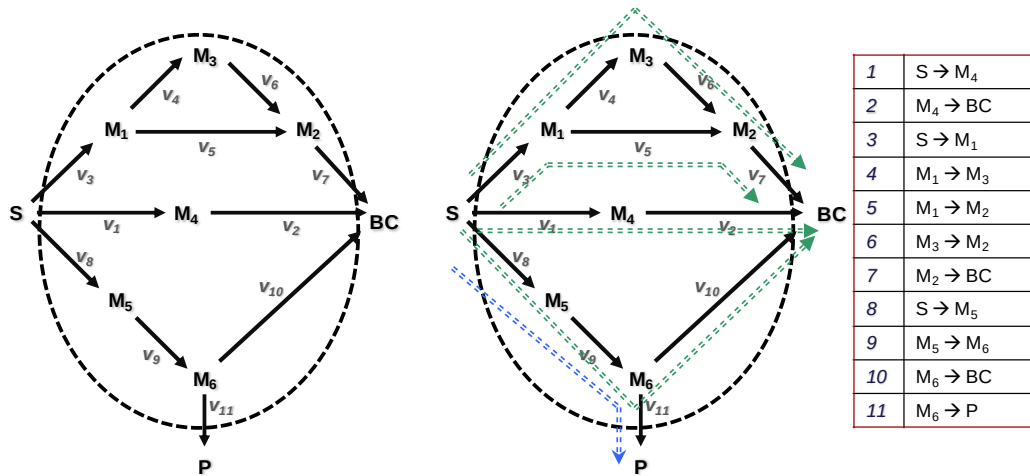
Hücresinin sadece optimum davranma eğilimine odaklanan Akı Dengesi Analizine karşılık Stelling ve arkadaşları [Stelling et al., 2002] tarafından Nature dergisinde önerilen Kontrol-etkili Akı Analizi, hücre modellenirken esnek davranma eğiliminin de dikkate alınması gerektiğini vurgulamıştır. Bu amaçla geliştirdikleri matematiksel yöntem, esneklik prensibini sağlamak adına tek bir akı dağılımına odaklanmak yerine doğrusal cebir kullanarak hesaplanan hücre içindeki muhtemel birçok akı dağılımını dikkate alır. Bu akı dağılımlarının her birine Temel Akı Tipi (“Elementary Flux Mod”, EFM) denir [Schuster et al., 2000].

Kontrol-etkili Akı Analizine temel teşkil eden ve hücrenin belli koşuldaki tüm muhtemel akı dağılımı davranışlarını gösteren set, doğrusal cebire dayalı bir hesaplama yöntemi ile hesaplanmaktadır [Schuster et al., 2000]. METATOOL [von Kamp and Schuster, 2006] ve FluxAnalyzer [Klamt et al., 2003], bu hesaplamayı gerçekleştiren programlardır. Bu tez çalışmasında, olası bütün Temel Akı Tip’leri METATOOL 5.1 programı kullanılarak hesaplandı.

Kontrol-etkili Akı Analizi sayesinde her bir reaksiyonun hücre için ne kadar önem teşkil ettiği belirlenir. Şekil 2.11’deki sistem baz alındığında sistemdeki hücre dışı metabolitlerden biri olan BC’nin üretilmesi için 4 yol, P’nin üretilmesi için tek 1

yol vardır. Şekil 2.11’de görüldüğü gibi BC’nin üretilmesi için en kısa yol v_1 ve v_2 reaksiyonlarını kullanılırken, en uzun yol v_3 , v_4 , v_6 , v_7 reaksiyonları üzerinden BC üretir.

Şekil 2.11’deki sistemde, optimum miktarda BC üreten 4 ayrı yol (akı dağılımı) bulunmaktadır. Bu sistem için BC’nin üretilmesi amaç fonksiyonu seçilip Akı Dengesi Analizi yapılırsa, optimum BC üreten bu akı dağılımlarından sadece biri elde edilecektir. Kontrol-etkili Akı Analizi ise, optimum alternatif akı dağılımlarının hepsini EFM hesabı sayesinde dikkate alarak, hücrenin esnek davranma eğilimini de göz önünde bulundurur.



Şekil 2.11 11 reaksiyonlu 6 hücre içi metabolite sahip basit bir ağyapı [Stelling et al., 2002]

Kontrol-etkili Akı Analizini daha iyi anlayabilmek için yapılan işlemler basamaklar halinde gösterilmiştir. Bu işlemler Şekil 2.11’deki sistem ve BC’nin üretimi dikkate alınarak yapılmıştır.

1. Basamak: Temel Akı Tiplerinin (“Elementary Flux Mod”, EFM) bulunması: Olası bütün Temel Akı Tipleri METATOOL programı kullanılarak hesaplanır. Şekil 2.11’de de görüldüğü gibi BC’nin üretilmesi için 4 EFM P’nin üretilmesi için 1 EFM olmak üzere toplam 5 EFM vardır. Bu EFM’ler matris formatında Tablo 2.2’de gösterilmiştir.

Tablo 2.2 Şekil 2.11'deki reaksiyon sistemi için CEF hesaplaması [Stelling et al., 2002]

	Reaksiyon	EFM 1	EFM 2	EFM 3	EFM 4	EFM 5	CEF
R1	$S \rightarrow M_4$	1	0	0	0	0	0.35
R2	$M_4 \rightarrow BC$	1	0	0	0	0	0.35
R3	$S \rightarrow M_1$	0	1	1	0	0	0.41
R4	$M_1 \rightarrow M_3$	0	1	0	0	0	0.18
R5	$M_1 \rightarrow M_2$	0	0	1	0	0	0.24
R6	$M_3 \rightarrow M_2$	0	1	0	0	0	0.18
R7	$M_2 \rightarrow BC$	0	1	1	0	0	0.41
R8	$S \rightarrow M_5$	0	0	0	1	1	0.24
R9	$M_5 \rightarrow M_6$	0	0	0	1	1	0.24
R10	$M_6 \rightarrow BC$	0	0	0	1	0	0.24
R11	$M_6 \rightarrow P$	0	0	0	0	1	0.00
	Verimlilik:	1/2	1/4	1/3	1/3	0	

2. Basamak: EFM'lerin verimliliğinin bulunması: Elde edilen her bir Temel Akı tipinin verimliliği j reaksiyon sayısını, i EFM sayısını göstermek üzere Eşitlik 2.11'deki denklem yardımıyla hesaplanır. Yani EFM i 'deki biyokütle akısı EFM i 'deki tüm reaksiyonların akılarının toplamına bölünür.

$$\varepsilon_i = \frac{v_{biyokütle,i}}{\sum_j v_{j,i}} \quad (2.11)$$

Çünkü hücre için reaksiyon demek, enzim üretmek demektir. Bu üretim de hücreye yük teşkil etmektedir. Yani daha az reaksiyonla biyokütle üreten EFM'nin daha verimli çalıştığı varsayılmaktadır. Bu konu Bölüm 2.6.2'de (Alternatif Optimumlar

ve Minimum Enzim Üretimi Eğilimi) ayrıntılı olarak anlatılacaktır. EFM'nin verimliliği; dikkate alınan (BC) ürününün üretim akısı değerinin, onu oluşturan bütün akı değerlerinin toplamına bölünmesiyle bulunur. Örneğin, Tablo 2.2'deki EFM 1 için BC üretimi açısından verimliliğini hesaplayalım. Bu EFM'de BC ürününü üreten tek reaksiyon R3 ($M4 \rightarrow BC$) reaksiyonudur. Bu reaksiyonun akı değeri 1'dir. BC ürünü oluşurken sadece R1 ve R2 reaksiyonları aktif olmaktadır. Bu reaksiyonların toplam akı değeri ise 2'dir. Yani bu şekilde birinci EFM'nin BC üretimi açısından verimliliği ($1/2=0,5$) olarak bulunur. Aynı şekilde, Tablo 2.2'deki ikinci EFM 2 için de verimlilik hesaplayalım. Bu EFM'de BC ürününü üreten tek reaksiyon R7 ($M2 \rightarrow BC$) reaksiyonudur. Bu reaksiyonun akı değeri 1'dir. BC ürünü oluşurken R3, R4, R6 ve R7 reaksiyonları aktif olmaktadır. Bu reaksiyonların toplam akı değeri ise 4'tür. Yani EFM 2'nin BC üretimi açısından verimliliği ($1/4=0,25$) olarak bulunur. Görüldüğü gibi her iki EFM için de BC ürününü üreten reaksiyonların akı değerleri 1'dir. Fakat birinci EFM'de iki reaksiyon aktifken, ikinci EFM'de 4 reaksiyon aktiftir. Bir başka deyişle, her iki Temel Akı Tipi de aynı miktarda ürün üretirken, birincisi iki reaksiyon, ikincisi 4 reaksiyon kullanır. Bu şekilde daha az reaksiyonu aktif olan (birinci) Temel Akı Tipinin verimliliği daha çok reaksiyon kullanan (ikinci) Temel Akı Tipinin verimliliğinden daha büyük olmaktadır.

3. Basamak: CEF'lerin hesaplanması: Kontrol-etkili Akı Analizi'nin son aşaması olan CEF hesaplaması Eşitlik 2.12'deki denklem yardımıyla hesaplanır.

$$CEF_j = \frac{\sum \varepsilon_i v}{\max v_{biyokütle} \cdot \sum \varepsilon_i} \quad (2.12)$$

Örneğin, CEF(3) için üçüncü reaksiyona ait EFM matrisi satır vektörü, EFM verimliliğini gösteren satır vektörü ile nokta çarpım yapılır. Bu değer, elde edilen bütün Temel Akı Tipleri içindeki maksimum biyokütle üretim akısı miktarının bu Temel Akı Tiplerinden elde edilen toplam verimlilikle çarpımına bölünür. Bu şekilde CEF değerleri hesaplanır. [Stelling et al., 2002].

$CEF(3)=(0 \times 0,5 + 1 \times 0,25 + 1 \times 0,33 + 0 \times 0,33 + 0 \times 0)/(0,5 + 0,25 + 0,33 + 0,33 + 0)=0,41$ olarak bulunur. Bu şekilde tüm reaksiyonların CEF değerleri Tablo 2.2'deki gibi hesaplanır.

Kontrol-etkili Akı Analizi yapmanın avantajlarından biri bütün Temel Akı Tiplerinin hesaplanmasıdır. Ayrıca bütün reaksiyonların hücre için ne kadar önem arz ettiğinin değerlendirilmesine de imkan sağlamaktadır. Bir reaksiyonun CEF değeri ne kadar büyükse, o reaksiyon hücre için o kadar önemlidir. Örneğin, Şekil 2.11'deki sistem için en yüksek CEF değerlerine sahip reaksiyonlar R3 ve R7'dir. Bir başka deyişle, bu sistem için en fazla önem teşkil eden reaksiyonlar R3 ve R7'dir. Çünkü bu reaksiyonlara bir şey olursa sistem BC üretimi için 2 yolunu birden kaybedecektir. R11 ise hiç önemli olmayan reaksiyondur. Çünkü Şekil 2.11'e bakıldığında R11 reaksiyonunun sisteme BC üretimi açısından hiçbir katkısı yoktur. Sistemdeki bir reaksiyonun CEF değerinin büyük çıkması, o reaksiyonun sistemde çıkması dikkate alınan ürüne ulaşmada en kısa yollardan biri üzerinde olduğunu ve alternatif birçok yol arasından o yolun hücre tarafından daha çok seçilme ihtimalinin olduğunu gösterir.

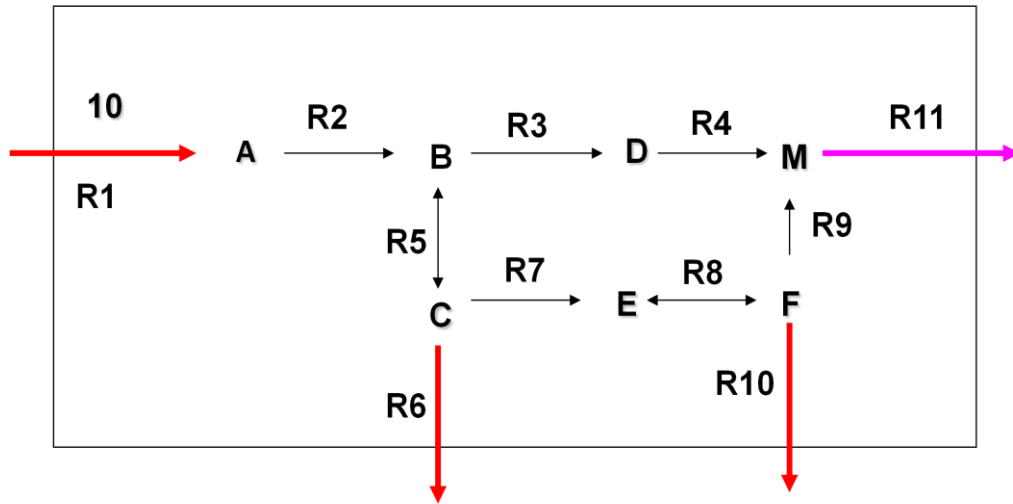
2.6 Metabolik Modellerde Alternatif Optimumlar

Bir denklem sisteminin tek çözümü olabilmesi için denklem sisteminin serbestlik derecesinin 0 olması gereklidir. Yani denklem sistemindeki bağımsız denklem sayısı ile bilinmeyen sayısının aynı olması gerekir. Fakat Akı dengesi analizi metodunun optimizasyon basamağında da ayrıntılı olarak anlatıldığı gibi metabolik model sistemleri eksik belirtilmiş (underdetermined) yapıda olduğundan bu sistemler için tek bir sonuç yoktur. Aranan sonuca optimizasyon yaparak ulaşırız. Metabolik modellerde alternatif birçok optimum sonucun olduğu [Mahadevan and Schilling, 2003] tarafından öngörülen Akı Değişkenliği Analizi Metodu ("Flux Variability Analysis", FVA) ile gündeme gelmiştir. Alternatif optimum, aynı optimum akı değerine sahip birden fazla akı dağılımı olması durumudur. Akı Dengesi Analizi Metodu ile elde edilen sonuç, alternatif optimumlardan sadece biridir. Yani, sistemde kısmen Şekil 2.12'de gösterildiği gibi alternatif optimumlar varsa, Akı Dengesi Analizi yapılarak elde edilen reaksiyon akısı değerlerine güvenilmez. Burada tek güvenilir akı değeri, optimize edilen fonksiyon akısına ait sonuçtur. Bu yüzden Akı Dengesi Analizi yapıldıktan sonra Akı Değişkenliği

Analizine veya hücrenin minimum enzim üretimi eğilimine dayanan benzer yöntemlere ihtiyaç vardır.

2.6.1 Akı Değişkenliği Analizi Metodu (“Flux Variability Analysis”)

Akı değişkenliği analizi yöntemi, belirli bir optimum noktada hücre içi akıların her birinin alabileceği minimum ve maksimum değerleri bulmaya yarayan bir yöntemdir [Mahadevan and Schilling, 2003]. Sadece Akı dengesi analizi ile model üretmenin eksikliğini daha iyi anlayabilmek için Şekil 2.12’deki gibi bir sistem ele alalım. M metabolitinin maksimum üretilmesi (R11 reaksiyonu) amaç fonksiyonu olarak seçildiğinde optimizasyon sonucu sadece amaç fonksiyonu olan reaksiyon için kesin bir akı değeri verecektir. Fakat sistemin akı dağılımını görmek açısından sadece bu değer yeterli değildir.



Şekil 2.12 Akı değişkenliği analizi için sistem

Akı Değişkenliği Analizi metodunun matematiksel ifadesi

İlk olarak Bölüm 2.4.1’de anlatıldığı gibi akı dengesi analizi yapılır. Akı dengesi analizi yaparken Eşitlik (2.8), (2.9) ve (2.10) sağlanmalıdır. Sonra Akı Dengesi Analizi ile elde edilen amaç fonksiyonu değeri sabitlenir. Akı Değişkenliği Analizi metodu ile sistemdeki bütün reaksiyonlar için ayrı ayrı reaksiyonların

minimum alabileceği değer ile maksimum alabileceği değer hesaplanır. Yani maksimum ve minimum olarak toplam $2n$ tane optimizasyon gerçekleştirilmiş olur. Matematiksel olarak ifade edilirse, Eşitlik (2.8) ve (2.9)'a ek olarak;

$$\mathbf{f}^T \cdot \mathbf{v} = Z_{obj} \quad (2.13)$$

a) maksimum v_i

$$\max \sum_j^n f_j \cdot v_i \quad f(i=j) = -1, \quad f(i \neq j) = 0 \quad (2.14)$$

b) minimum v_i

$$\min \sum_j^n f_j \cdot v_i \quad f(i=j) = 1, \quad f(i \neq j) = 0 \quad (2.15)$$

Burada n toplam reaksiyon sayısını, Z_{obj} bir önceki aşamada (Akı dengesi analizi) elde edilen optimum amaç fonksiyonunu, j reaksiyon sayısı indisini ve i döngü sayısını göstermektedir.

Şekil 2.12'deki sistem için R1, R6 ve R10 reaksiyonlarının akıları optimizasyon yaparken ölçüm kısıtı olarak sırasıyla 10, 1 ve 2 girilmiştir. R11 sistemin amaç fonksiyonudur. Akı Dengesi Analizi sonucuyla elde edilen optimizasyon sonuçları ve Akı Değişkenliği Analizi ile elde edilen sonuçlar karşılaştırmalı olarak Tablo 2.3'de verilmiştir.

Tablo 2.3'de görüldüğü gibi koyu yazılan reaksiyonlar Akı Değişimi Analizi sonucu farklı değerler alan reaksiyonlardır. Bu yüzden Akı Değişkenliği Analizine ihtiyaç duyulmaktadır. Yukarıda da anlatıldığı gibi Akı Dengesi Analizi ile optimizasyon yaparken güvenilecek tek sonuç amaç fonksiyonu için elde edilen değerdir. Yani ilgili sistem için M metabolitinin maksimum alabileceği en büyük akı değerinin (R11) 7 olduğudur. Tablo 2.3'deki sonuçlardan da açıkça görüldüğü gibi aynı optimum sonucu veren farklı alternatif sonuçlar elde etmek mümkündür. Örneğin, Akı Dengesi Analizi R8 reaksiyonuna ait akı değerini 9 verirken, Akı

Değişkenliği Analizi sayesinde bu akı değerinin aslında 2 ile 9 arasında değişebileceği görülmüştür.

Tablo 2.3 Şekil 2.12'deki sistem için elde edilen sonuçlar

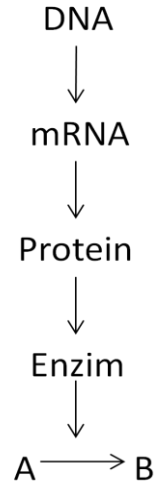
REAKSİYON	Akı Dengesi Analizi ile elde edilen akı dağılımı	Akı Değişkenliği Analizi İle elde edilen akı dağılımı	
		Minimum	Maksimum
R1	10	10	10
R2	10	10	10
R3	0	0	7
R4	0	0	7
R5	10	3	10
R6	1	1	1
R7	9	2	9
R8	9	2	9
R9	7	0	7
R10	2	2	2
R11	7	7	7

2.6.2 Alternatif Optimumlar ve Minimum Enzim Üretimi Eğilimi

Bilindiği gibi hücrenin içerisinde DNA bulunmaktadır. DNA üzerinde bulunan yüzlerce genin belli bir koşulda aktif olup olmadığını gösteren aktiflik derecesi o genden kodlanan mRNA seviyelerinin ölçülmesi ile tespit edilebilir. Proteinler ise mRNA'lardaki kod bilgileri kullanılarak sentezlenir. Proteinler; aminoasitlerden oluşan polimerik yapılardır. Toplam 21 aminoasit vardır ve proteinler bunların farklı kombinasyonlarda bir araya gelmesiyle oluşur. Proteinlerden katalitik aktivitesi olanlar (enzimler) hücre içindeki reaksiyonları gerçekleştirir.

Mikroorganizmalar için, hücrenin en temel hedefinin maksimum büyümek olduğu literatürde kanıtlanmış bir gerçektir [Varma and Palsson, 1993]. Hücre maksimum büyüme hedefindeyken aynı zamanda kendisi için yük teşkil eden parametreleri de en aza düşürmek amacındadır. Şekil 2.13'te görüldüğü gibi bir reaksiyonun gerçekleşebilmesi için ilgili reaksiyonu kontrol eden enzimin üretilmesi

gerekir. Bu üretim hücre için yük teşkil etmektedir. Bu nedenle, hücrenin maksimum büyümeyi gerçekleştirirken aynı zamanda enzim üretimini de minimuma düşürecek bir davranış içinde olması muhtemeldir.



Şekil 2.13 Reaksiyonu kontrol eden mekanizmanın şematik gösterimi

Bu tez çalışmasında, akı dağılımlarını güvensiz kılan alternatif optimum problemine çözüm olarak, hücrenin minimum enzim üretimi eğiliminden yola çıkarak mikroorganizmalar için farklı ikincil amaç fonksiyonları önerilmiştir. Önerilen ve aşağıda detaylandırılan bu ikincil amaç fonksiyonlarının temel mantığı hücre için yük teşkil eden parametrelerin en aza indirilmesidir.

2.6.3 Minimum Reaksiyon Basamağı

İsminden de anlaşılacağı gibi bu fonksiyon, hücre optimum büyümek hedefindeyken aynı zamanda bu büyümeyi en az reaksiyonla gerçekleştirmek eğiliminde olması ihtimali için önerilmiştir. Bir başka deyişle, önerilen bu fonksiyon hücrenin yüzlerce alternatif yoldan temel hedefine ulaşabilmesine rağmen, en kısa yolu seçebileceği ihtimali göz önünde bulundurularak önerilmiştir [Malendez- Hevia and Isidoro, 1985]. Çünkü reaksiyonun gerçekleşmesi, hücrenin ilgili reaksiyonu kontrol eden enzimi üretmesiyle mümkündür. Bu üretim de hücre için yük teşkil etmektedir.

Bu amaç fonksiyonunun çözümü için, iki farklı çözüm yolu kullanılmıştır. (1) En fazla 100-150 (bilinmeyen) reaksiyon sistemine sahip olan optimizasyon problemlerinin çözümü için karma tamsayılı karışık programlama (“mix integer programming”) kullanıldı. Bu amaçla, IBM Şirketinin geliştirdiği optimizasyon paketi CPLEX’in 2010 sürümünde yer alan MATLAB programıyla uyumlu cplexmilp fonksiyonu kullanıldı. Modellenen sistem Eşitlik (2.8)’in yanında, Eşitlik (2.16), (2.17) ve (2.18) de sağlamalıdır.

$$y_i \in \{0,1\} \quad (2.16)$$

$$y_i \cdot \mathbf{Lb}_i \leq \mathbf{v}_i \leq y_i \cdot \mathbf{Ub}_i \quad (2.17)$$

$$\text{minimum} \sum_{i=1}^n y_i \quad (2.18)$$

Burada, n reaksiyon sayısını, y ise aranan akı vektöründe reaksiyonun aktif yada pasif olduğunu göstermektedir. Reaksiyon aktifse y değeri 1, pasifse 0 olacaktır. cplexmilp fonksiyonu kullanılarak minimum reaksiyon basamağı fonksiyonunun matematiksel ifadesi, MATLAB programı formatında ayrıntılı olarak Ek 1’de verilmiştir.

(2) Karma tamsayılı karışık programlama kullanılarak çok fazla bilinemeyene sahip optimizasyon problemlerinin çözümü saatlerce sürmektedir. Genom boyutlu modeller gibi 500 ve üzeri reaksiyona sahip olan sistemler için minimum reaksiyon basamağına denk gelen akı dağılımı, bu boyuttaki sistemler için daha hızlı çalışan genetik algoritma kullanılarak elde edilebilir [Patil et al., 2005]. Bu tez çalışmasında, Akı Dengesi Analiziyle minimum reaksiyon basamağı fonksiyonunun elde ettiği akı dağılımı, genom boyutlu model için cplexmilp fonksiyonu yerine genetik algoritma kullanılarak edildi. Aşağıda genetik algoritmanın basamakları verilmiştir.

1. Çözümlerin kodlanması: Genetik algoritma mantığının ilk aşaması olan “Çözümlerin kodlanması” için sistemdeki tepkime sayısına eşit 0 ve 1 değerlerinden oluşan vektörler oluşturuldu. Bu vektörlerin her birine kromozom, vektörün

elemanlarından her birine ise gen denilmektedir. Bu vektörlerin toplamına ise popülasyon adı verilmektedir. İlk popülasyonun oluşturulması için 0 ve 1'den oluşan rastgele sayılar üretilmiştir. Bu üretilen sayılardan 0 olanlar, reaksiyonun aktif olmadığını yani reaksiyonun değerinin 0 olduğunu 1 olanlar ise, reaksiyonun aktif olduğunu yani 0 haricinde herhangi bir değer alabileceğini ifade etmektedir. Örneğin, kromozomdaki (vektördeki) onbirinci gen için rastgele üretilen sayı 0 olsun. Bu, reaksiyon sistemi içindeki onbirinci reaksiyonun değerinin 0'a sabitlenmesi anlamına gelir. Bundan sonra onbirinci reaksiyonun 0'a eşit olması Akı Dengesi Analizi çözümünde bir kısıt olarak kullanılarak, bu durumda çözüm olup olmadığına bakılır.

2. "Fitness" değerlerinin hesaplanması: "Fitness" değeri, genetik algoritma optimizasyonundaki amaç fonksiyonunun alacağı değerdir. Bizim sistemimiz için fitness değeri, amaç fonksiyonu olarak minimum aktif reaksiyon sayısı kullanıldığından dolayı değerleri 0'a eşit olan reaksiyonların sayısıdır. Yani üretilen kromozomlarda sistem için çözümü olan ve 0'a eşit olan elemanlar ne kadar fazla ise o kromozomun fitness değeri o kadar fazladır. Örneğin, 3 kromozomdan oluşan küçük bir popülasyon düşünürsek, birinci kromozom 50, ikinci kromozom 30, üçüncü kromozom 40 tane 0'dan oluşan gene sahip bir birey olsun. Bu durumda, fitness değerlerine bakıldığında bu açıdan en iyi kromozom birinci kromozomdur. Yani, en fazla sıfırdan oluşan akı dağılımı (minimum aktif reaksiyon sayısı) bu kromozoma denk gelmektedir.

3. Parça değişimi ("Cross-over") ve mutasyon aşaması: Bir popülasyonda genel olarak 40-50 kadar kromozom oluşturulur. Daha sonra, bu popülasyon, genetik algoritma kapsamında cross-over ve mutasyon işlemlerine tabi tutularak bir sonraki popülasyon oluşturulur. Burada, temel olarak kromozomlar birbirleri ile karıştırılırlar ve böylece sıfır sayısı daha fazla ve denklem sisteminin çözebildiği yeni kromozomlar oluşturulması amaçlanır. Bu şekilde, her seferinde oluşturulan yeni popülasyondaki kromozomların sıfır sayısına bakılarak, maksimum sıfırı içeren (yani minimum aktif reaksiyon sayısına denk gelen) kromozomlar takip edilir. Eğer yeni popülasyonlar sonucunda fitness sonuçları sabit kalıyorsa o sistemi sağlayan optimum kromozoma ulaşılmış demektir.

2.6.4 Hücre İçi Akıların Mutlak Değerlerinin Toplamının Minimizasyonu

Hücre içi akıların mutlak değerlerinin toplamının minimizasyonu fonksiyonu, hücrenin optimum büyüme amacını gerçekleştirirken aynı zamanda gerçekleştirdiği reaksiyon akılarının mutlak değerleri toplamının olabildiğince küçük olması eğiliminde bir yol izlemesi ihtimaline karşılık önerilmiştir. Çünkü hücrenin gerçekleştirdiği reaksiyon akılarının toplamı ne kadar küçük olursa, hücre ilgili reaksiyonları kontrol eden enzimleri o kadar daha az üretecektir. Böylece hücre kendisi için yük teşkil eden en az parametre ile optimum büyüme amacına ulaşmış olacaktır. Ayrıca, hücre içi akıların toplamının minimizasyonu yerine hücre içi akıların mutlak değerlerinin minimizasyonu seçilmesi gayet mantıklıdır. Çünkü, hücre içinde çift yönlü reaksiyonlar olabilir. Yani reaksiyonların değerleri eksi veya artı olabilir. Önerilen bu fonksiyon sayesinde mikroorganizmanın simülasyonu yapılırken, hücredeki reaksiyonların yönüne müdahale etmeden hücrenin temel amacına ulaşmasına imkan verilmektedir. Bu amaç fonksiyonunun çözümü yapılırken doğrusal programlama ("linear programming") kullanıldı. Bu amaçla, IBM Şirketinin geliştirdiği optimizasyon paketi CPLEX'in 2010 sürümünde yer alan MATLAB programıyla uyumlu cplexlp fonksiyonu kullanıldı.

Modellenen sistem Eşitlik (2.8) ve (2.9)'un yanında (2.19), (2.20) ve (2.21)'i de sağlamalıdır.

$$\mathbf{q}_i, \mathbf{z}_i > 0 \quad (2.19)$$

$$\mathbf{v}_i = \mathbf{q}_i - \mathbf{z}_i \quad (2.20)$$

$$\min \sum_{i=1}^n q_i + z_i \quad (2.21)$$

Burada n reaksiyon sayısını, $\mathbf{v}$ ise aranan akı dağılımını göstermektedir. Böylece $\mathbf{v}$ vektörü, iki pozitif vektörün farkı olarak tanımlanmış, bu iki vektörün toplamının minimum yapılmasıyla reaksiyon hızlarının mutlak değerlerinin toplamının minimum olması sağlanmıştır.

Hücre içi akıların mutlak değerlerinin toplamının minimizasyonu fonksiyonunun matematiksel ifadesi, MATLAB programı formatında ayrıntılı olarak Ek 2’de verilmiştir.

2.6.5 Hücre İçi Akıların Karelerinin Toplamının Minimizasyonu

Önerilen bu ikincil amaç fonksiyonu da 2.6.3 ve 2.6.4’teki bölümlerde daha önceden önerilmiş amaç fonksiyonları ile aynı mantık temelindedir. Bir başka deyişle, bu fonksiyon hücrenin kendisi için yük teşkil eden parametreleri minimum düzeyde tutmak eğiliminde olabileceği düşüncesiyle önerilmiştir. Aynen hücre içi akılarının mutlak değerlerinin toplamının minimizasyonu (Bölüm 2.6.4) fonksiyonundaki mantıkla, mikroorganizmanın simülasyonu çalışmasında, hücredeki olabilecek çift yönlü (artı veya eksi değer alabilen) reaksiyonların yönüne müdahale etmeden hücrenin temel amacına ulaşmasına yönelik önerilmiştir [Bonarius et al., 1996]. Bu amaç fonksiyonunun Bölüm 2.6.4’teki amaç fonksiyonundan tek farkı, “Hücre İçi Akıların Karelerinin Toplamının Minimizasyonu” fonksiyonunun doğrusal olmayan (karesel,”quadratic”) formatta olmasıdır. Bu amaç fonksiyonunun çözümü yapılırken IBM Şirketinin geliştirdiği optimizasyon paketi CPLEX’in 2010 sürümünde yer alan MATLAB programıyla uyumlu cplexqp fonksiyonu kullanıldı

Modellenen sistem Eşitlik (2.8) ve (2.9)’un yanında, Eşitlik (2.22)’yi de sağlamalıdır.

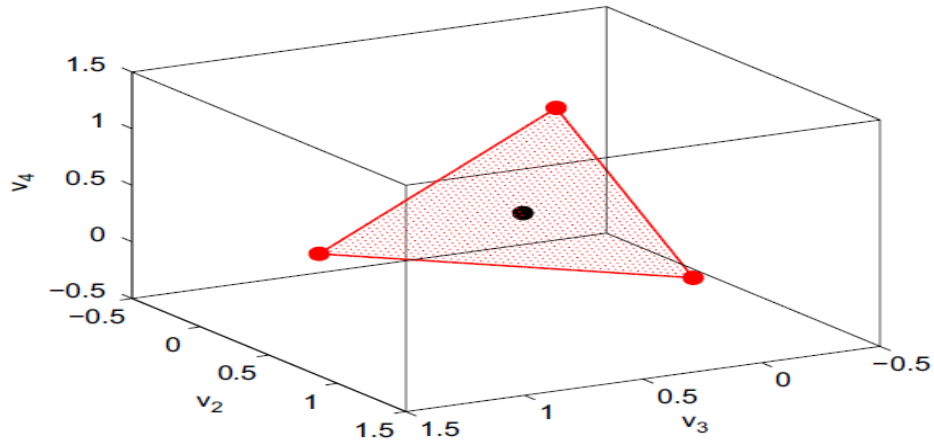
$$\min \sum_{i=1}^n v_i^2 \quad (2.22)$$

Burada n reaksiyon sayısını, v ise aranan akı dağılımını göstermektedir.

2.6.6 Geometrik Açıdan FBA

Geometrik açıdan FBA fonksiyonu, hücrenin optimum büyüme amacını gerçekleştirirken kullanabileceği birçok alternatif yol arasından Şekil 2.14’te

gösterildiği gibi geometrik açıdan bakıldığında merkezdeki yolu seçmesi ihtimalini baz alarak öne sürülmüştür [Smallbone and Simeonidis, 2009]. Önerilen bu fonksiyonun çözümü, sistem biyolojisi hesaplamaları için geliştirilen MATLAB tabanlı COBRA yazılım paketinde [Becker et al., 2007] yer alan uniqueLP fonksiyonu kullanılarak yapıldı.



Şekil 2.14 Geometrik açıdan FBA Fonksiyonun davranışının şekilsel gösterimi. Bu yöntem, alternatif optimum akı dağılımlarının geometrik olarak ortasında kalanı seçmektedir [Smallbone and Simeonidis, 2009].

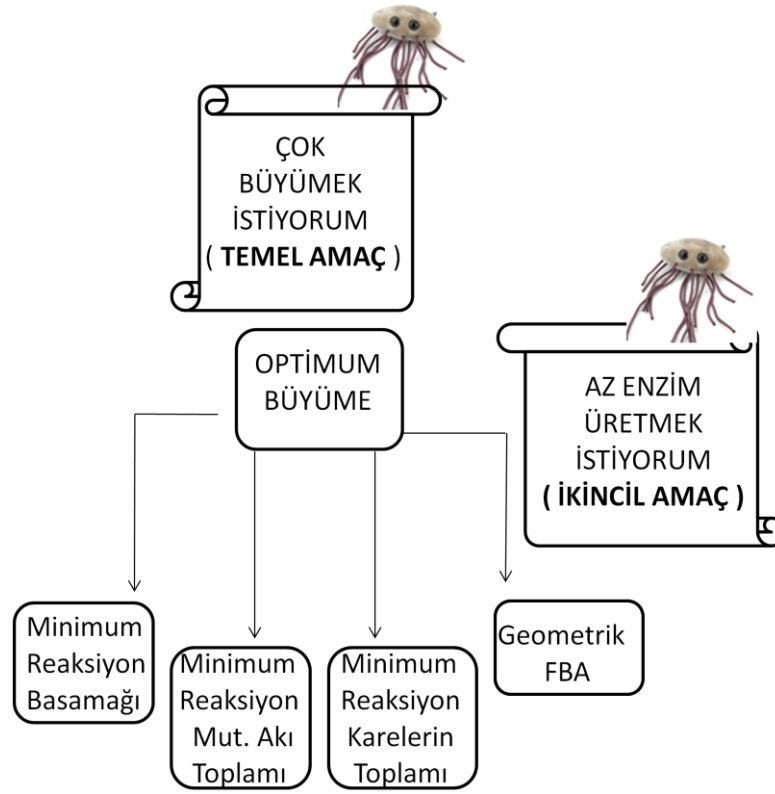
2.7. Mikroorganizmaların İkincil Amacı ve Akı Dengesi Analizi Aşamaları

Yapılan bu tez çalışmasında yukarıda anlatıldığı gibi hücrenin minimum enzim üretim isteğini de dikkate alan ikincil amaç fonksiyonları önerildi. Bu şekilde, mikroorganizmanın temel amacı olan maksimum büyümeye ek olarak, Şekil 2.15'te görüldüğü gibi mikroorganizmanın ikincil amacı (minimum enzim üretme) da modelleme çalışması yaparken göz önünde bulunduruldu.

Şekil 2.15'te görüldüğü ve bir önceki bölümde de ayrıntılandırıldığı gibi hesaplama yapılırken kullanılan ikincil amaç fonksiyonları şunlardır.

1. Minimum Reaksiyon Basamağı Fonksiyonu

2. Hücre İçi Akıların Mutlak Değerlerinin Toplamının Minimizasyonu
3. Hücre İçi Akıların Karelerinin Toplamının Minimizasyonu
4. Geometrik Açıdan FBA Fonksiyonu



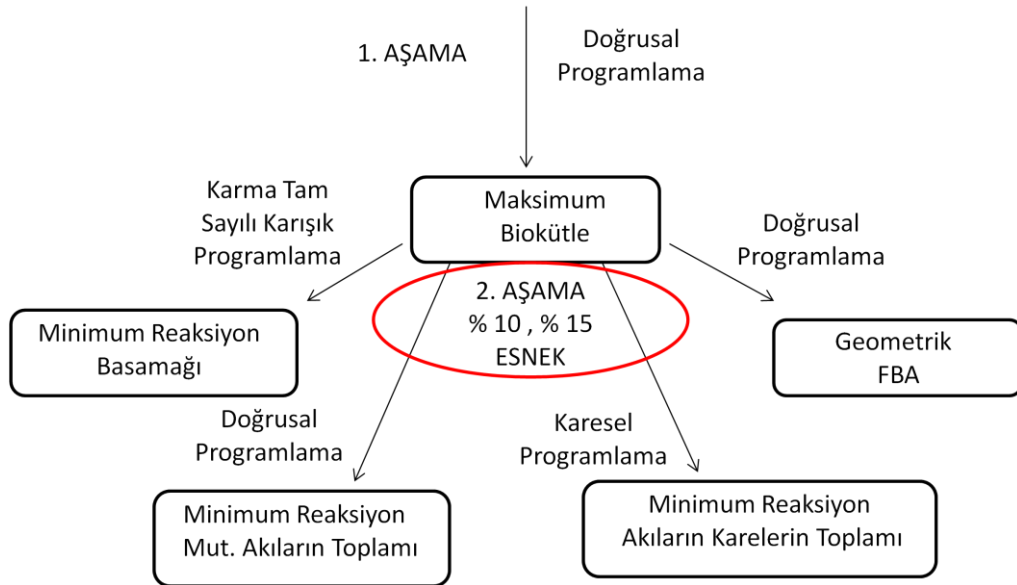
Şekil 2.15 Mikroorganizmanın temel amacı ve ikincil amacı

Bölüm 3 ve 4'te yapılan hesaplamaların sonuçları tablolar halinde gösterilirken estetik bir görüntü elde etmek için, ikincil amaç fonksiyonlarının isimleri (1) Minimum Reaksiyon Basamağı Fonksiyonu için “1. Enzim Fonksiyonu”, (2) Hücre İçi Akıların Mutlak Değerlerinin Toplamının Minimizasyonu fonksiyonu için “2. Enzim Fonksiyonu”, (3) Hücre İçi Akıların Karelerinin Toplamının Minimizasyonu fonksiyonu için “3. Enzim Fonksiyonu”, (4) Geometrik Açıdan FBA Fonksiyonu için “4. Enzim Fonksiyonu” olarak değiştirilmiştir.

Daha önceden Akı Dengesi Analizi metodu anlatılırken optimizasyon basamağında ayrıntılı olarak bahsedildiği gibi, optimizasyon yaparken 2 temel parametre dikkate alınır. Bu parametreler amaç fonksiyonu ve optimizasyon

kısıtlarıdır (Bkz. Bölüm 2.4.1). Akı Dengesi Analizi hesaplamaları maksimum büyüme olarak seçilen temel amaç fonksiyonu ve belirtilen 4 farklı alternatif ikincil amaç fonksiyonu kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 2.16). Kısıt olarak (a) Eşitlik Kısıtı olarak Eşitlik 2.8, (b) Yön Kısıtı olarak Eşitlik 2.9, (c) Ölçüm Kısıtı olarak ise hücre içerisine alınan glikoz ve oksijenin yanında, opsiyonlu olarak hücre içerisinde gerçekleşen ve bakım-onarım (“maintenance”) reaksiyonu olarak bilinen reaksiyon kullanıldı.

Bakım-onarım reaksiyonunun biyolojik anlamı, hücrenin gerçekleştirdiği büyüme dışı tüm faaliyetler için gerekli olan enerji (ATP) tüketimini göstermesidir. Bu değer *Escherichia coli* mikroorganizması için, $7,6 \frac{mmol}{gDw.h}$ olarak [Varma and Palsson, 1994] *Saccharomyces cerevisiae* mikroorganizması için ise, $1 \frac{mmol}{gDw.h}$ olarak tanımlanmıştır [Förster et al., 2003].



Şekil 2.16 Akı Dengesi Analizi Yaparken Takip Edilen Algoritma

Şekil 2.16’da verilen algorithma görüldüğü gibi Akı Dengesi Analizi hesaplamaları iki aşamada gerçekleştirildi. Toplam 7 farklı hesaplama Tablo 2.4’te görüldüğü gibi yapılmıştır.

Tablo 2.4 Verilen esneklik bazında yapılan hesaplamaların tablo halinde gösterimi

	Optimum Biyokütle Esnekliği	Bakım-onarım Reaksiyonu Esnekliği
1.	Yok	Yok
2.	10 %	Kullanılmadı*
3.	15 %	Kullanılmadı*
4.	10 %	10 %
5.	15 %	10 %
6.	10 %	15 %
7.	15 %	15 %

Kullanılmadı*: Bakım-onarım Reaksiyonu Esnekliği Kullanılmadı yazan hesaplamalar ilgili reaksiyonunun deneysel değerinin hesaplamaya katılmadığını göstermektedir.

İlk aşamada, bu mikroorganizmanın üretebileceği maksimum biyokütle miktarı doğrusal programlama kullanılarak hesaplandı. Bu hesaplama yapılırken ölçüm kısıtı olarak hücre içerisine alınan glikoz (sürekli ortamlar için biyokütle büyüme hızı) ve oksijenin yanında, hücre içerisinde gerçekleşen ve bakım-onarım reaksiyonu olarak bilinen reaksiyon akısı da opsiyonlu olarak kullanıldı. İkinci aşamada ise mikroorganizmanın ikincil amaç fonksiyonu olan en az enzim üretme eğilimi de dört farklı alternatif yol kullanılarak hesaplamalara dahil edildi. Birinci aşamadan ikinci aşamaya geçerken, ilk aşamada hesaplanan optimum biyokütle değeri belirli bir esneklikte sabit tutuldu. Optimum biyokütle değerine %10 ve %15 gibi esneklik payları verilmesinin sebebi, hücrenin maksimum biyokütle miktarını katı-katıya sağlayamayacağı düşüncesidir. Ayrıca böyle yaparak, mikroorganizmanın maksimum biyokütleyle çok yakın ama daha avantajlı akı dağılımını seçebilme ihtimali de hesaplamalara katılmış oldu. Aynı şekilde, ölçüm kısıtı olarak bakım-onarım reaksiyonu kullanılan hesaplamalarda da reaksiyon değerini *Escherichia coli* ve *Saccharomyces cerevisia* mikroorganizmaları için sırasıyla 7.6 ve 1'e sabitlemek yerine küçük esneklik payları verildi. Bunu sebebi ise, bakım-onarım reaksiyonu olarak bilinen bu reaksiyonun çok genel bir biyolojik anlamı (hücrenin gerçekleştirdiği büyüme dışı tüm faaliyetler için gerekli olan enerji) olmasından kaynaklanmaktadır. Bir başka deyişle, mikroorganizmaların farklı popülasyonları arasında bu değer küçük farklılıklar gösterebilir. Bundan dolayı optimum biyokütle

üretim akısı miktarına verilen %10 ve %15 gibi esneklik payları, bakım-onarım reaksiyonu akı değerine de verilmiştir.

2.8 Tahminin Doğruluğu Hesabı (“Predictive Fidelity”, PF)

Tahminin doğruluğu hesabı, literatürden elde edilen deneysel akı değerlerini ve modelle hesaplanan akı değerlerini karşılaştırmada kullanılan bir yöntemdir [Schuetz et al., 2007]. Bu karşılaştırmayı yaparken deneysel hata değerlerini (standart sapma) dikkate alır. Böylece üretilen modelin ve kullanılan amaç fonksiyonlarının gerçeği ne kadar yansıttığı sayısal olarak ifade edilebilir. Bu hesaplama temel olarak deneysel ve modelle elde edilen değerler arasındaki fark kullanılarak yapıldığı için PF değeri ne kadar 0’a yakın olursa hesaplanan sonuç o kadar gerçeğe yakındır.

R_{exp} Deneysel akı değerleri, R_{comp} Akı Dengesi Analizi veya Kontrol-etkili Akı Analizi sonucunda hesaplanan akı değerleri ve σ_{exp} deneysel hata oranları (standart sapma) olmak üzere;

$$\mathcal{E} = R_{exp} - R_{comp} \quad (2.23)$$

$$w_{i,i} = \frac{1}{\sigma_i^{exp}} \left(\sum_i \frac{1}{\sigma_i^{exp}} \right)^{-1} \quad (2.24)$$

$$PF = \mathcal{E}^T \cdot w \cdot \mathcal{E} \quad (2.25)$$

Tez kapsamında, tüm amaç fonksiyonlarıyla yapılan hesaplamaların doğruluğu PF değeri baz alınarak yorumlanmıştır.

3 *E.COLİ* MİKROORGANİZMASI İÇİN YAPILAN ÇALIŞMALAR

Bu tez çalışmasında genel amaç, Aşağıdan Yukarı Sistem Biyolojisi yaklaşımlarından olan Akı Dengesi Analizi ve Kontrol-etkili Akı Analizi matematiksel yöntemlerini kullanarak *Escherichia coli* ve *Saccharomyces cerevisiae* mikroorganizmalarının farklı ortamlardaki davranışlarının ardında yatan biyolojik amacın ne olduğunu anlayabilmek ve bu mikroorganizmalar için bütün ortamlarda geçerli olabilen amaç fonksiyonları önererek bir simülasyon çalışması yapmaktır. Tezin bu bölümünde *Escherichia coli* mikroorganizması için yapılan çalışmalardan bahsedilecektir.

Mikroorganizmalar için yapılan deneyler yaygın olarak iki farklı ortamda gerçekleştirilir. Bunlardan bir tanesi sürekli (“Chemostat”) ortamdır. Diğeri ise kesikli (“Batch”) ortamdır. Sürekli ortamın adından anlaşılacağı gibi, bu iki ortam arasındaki en büyük farklardan biri sürekli ortamda deney yapılırken hücrenin büyüme oranının (“dilution rate”) sabit tutulmasıdır. Bu çalışmada *Escherichia coli* mikroorganizması için, 2 kesikli (oksijenli ve oksijensiz ortam) [Perrenoud and Sauer, 2005] ve 1 sürekli oksijenli ortam [Nanchen et al., 2006] olmak üzere toplam 3 farklı ortam için literatürden alınan hücre içi deneysel akı verileri modelleme sonucu elde edilen akı değerlerinin doğruluğunu belirlemede referans olarak kullanılmıştır.

Tez çalışmasının tamamında hücrede gerçekleşen tüm reaksiyon akılarına odaklanmak yerine farklı ortamlarda hücrenin temel davranışını temsil eden ve biyolojik anlamı olan ayrılma oranlarına (“split ratio”) odaklanılmıştır (Tablo 3.1). Bu ayrılma oranları Schuetz ve arkadaşları tarafından [Schuetz et al., 2007] önerilmiştir. Yapılan bu çalışmada, tanımlanan oranlar sayesinde tüm sistemin akı dağılımına bakmak yerine sadece tanımlanan ayrılma oranlarına bakarak sistemin tamamı hakkında bilgi sahibi olmak amaçlandı.

Tablo 3.1 *E.coli* mikroorganizması için tanımlanan ve tüm sistemin temel davranışını temsil eden ayrılma oranlarının fiziksel anlamları [Schuetz et al., 2007]

R1	Glikoliz Yoluna Giren Akı Oranı
R2	Doudoroff Yoluna Giren Akı Oranı
R3	Methylgloxal Yoluna Giren Akı Oranı
R4	PEP'ten Pirüvata Giden Akı Oranı
R5	Pirüvat'tan Asetil-Koenzim-A'ya Giden Akı Oranı
R6	TCA Döngüsüne Giren Akı Oranı
R7	Glyoxlate Metabolitine Giden Akı Oranı
R8	Oksaloasetat'tan PEP'e Giden Akı Oranı
R9	Asetat Salgısına Giden Akı Oranı
R10	Etil alkol Salgısına Giden Akı Oranı

Tablo 3.1 ve Tablo 3.2'deki ayrılma oranlarının fiziksel anlamlarına ve bu oranların deneysel değerlerine bakarak *Escherichia coli* mikroorganizmasının farklı ortamlardaki biyolojik amacı doğrultusunda şu yorumları yapabiliriz.

(1) R2 oranına (Doudoroff Yoluna Giren Akı Oranı) bakıldığında oksijenli ortamlarda hücre bu yolu çok az tercih etmesine rağmen oksijensiz ortamda dağılan akının % 86 gibi çok büyük bir bölümü bu yolu tercih etmiştir.

(2) R6 oranına (TCA Döngüsüne Giren Akı Oranı) bakıldığında bu yolu hücre oksijensiz ortamda hemen hemen hiç tercih etmemesine rağmen, oksijenli kesikli ortamda akının yaklaşık %25'i, oksijenli sürekli ortamda ise akının % 65 gibi büyük bir bölümü bu yolu tercih etmiştir. Daha önceden katabolizmadaki yıkım olayları sürecinde de anlatıldığı gibi, TCA döngüsü oksijensiz ortamda çok az aktiftir. Bu bağlamda, hücrenin oksijensiz ortamda bu yolu hemen hemen hiç seçmemesi oldukça mantıklıdır.

(3) R7 (Glyoxlate metabolitine Giden Akı Oranı) ve R8 (Oksaloasetat'tan PEP'e Giden Akı Oranı) oranlarına beraber bakıldığında oksijensiz ve oksijenli

kesikli ortamlarda hücre bu yolları hiç tercih etmezken oksijenli sürekli ortamda ise akının bir miktarı bu yolu tercih etmiştir.

(4) R9 oranına (Asetat Salgısına Giden Akı Oranı) bakıldığında oksijenli sürekli ortamda hücre bu yolu hiç tercih etmezken oksijenli kesikli ortamda yaklaşık akının %60'ı, oksijensiz ortamda ise yaklaşık %35'i bu yolu tercih etmiştir.

(5) R10 oranına (Etil alkol Salgısına Giden Akı Oranı) bakıldığında oksijenli sürekli ortam ve oksijenli kesikli ortamlarda hücre bu yolu hiç tercih etmemiştir. Buna karşılık, oksijensiz ortamda ise akının yaklaşık % 60 gibi büyük bir bölümü bu yolu tercih etmiştir. Daha önceden katabolizmadaki yıkım olayları sürecinde anlatıldığı gibi hücre oksijensiz solunumda NADH dengesini sağlayabilmek için, oluşumunda NADH ihtiyacı olan etil alkol üretimine yönelmiştir.

Tablo 3.2 Tablo 3.1'de *E.coli* mikroorganizması için tanımlanan (R) oranlarının deneysel değerleri [Schuetz et al., 2007]

Ayrılma Oranları (R)	Oksijenli Sürekli Ortam	Oksijenli Kesikli Ortam	Oksijensiz Kesikli Ortam
R1	0,69 $\pm$ 0,12	0,70 $\pm$ 0,02	0,90 $\pm$ 0,05
R2	0,23 $\pm$ 0,20	0,13 $\pm$ 0,06	0,86 $\pm$ 0,94
R3	0,00 $\pm$ 0,05	0,00 $\pm$ 0,05	0,00 $\pm$ 0,05
R4	0,84 $\pm$ 0,14	0,78 $\pm$ 0,02	0,94 $\pm$ 0,05
R5	0,91 $\pm$ 0,21	0,81 $\pm$ 0,03	0,96 $\pm$ 0,09
R6	0,64 $\pm$ 0,13	0,24 $\pm$ 0,02	0,02 $\pm$ 0,01
R7	0,46 $\pm$ 0,13	0,00 $\pm$ 0,05	0,00 $\pm$ 0,05
R8	0,35 $\pm$ 0,08	0,00 $\pm$ 0,05	0,00 $\pm$ 0,05
R9	0,00 $\pm$ 0,05	0,58 $\pm$ 0,03	0,34 $\pm$ 0,01
R10	0,00 $\pm$ 0,05	0,00 $\pm$ 0,05	0,61 $\pm$ 0,04

3.1 Akı Dengesi Analizi Hesaplamaları Yapılırken Amaç Fonksiyonları ve Deney Ortam Özelliklerinin Modele Entegre Edilmesi

Tablo 3.2'ye bakıldığında bazı ayrılma oranları benzer özellik (artma ve azalma) gösterirken bazılarının üç ortamda da oldukça farklı özellik gösterdiği görülür. Yani, ortamların değişimi hücrenin davranışında farklılıklara yol açmıştır. Tezin bu bölümünde ortam değişimlerinin *Escherichia coli* mikroorganizmasının davranışında yol açtığı farklılıklara Akı Dengesi Analizi hesaplaması yaparak ulaşılması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, Akı Dengesi Analizi hesaplamaları Şekil 2.18'de verilen Akı Dengesi Analizi aşamaları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Modele Entegre Edilen Ortamların Özellikleri:

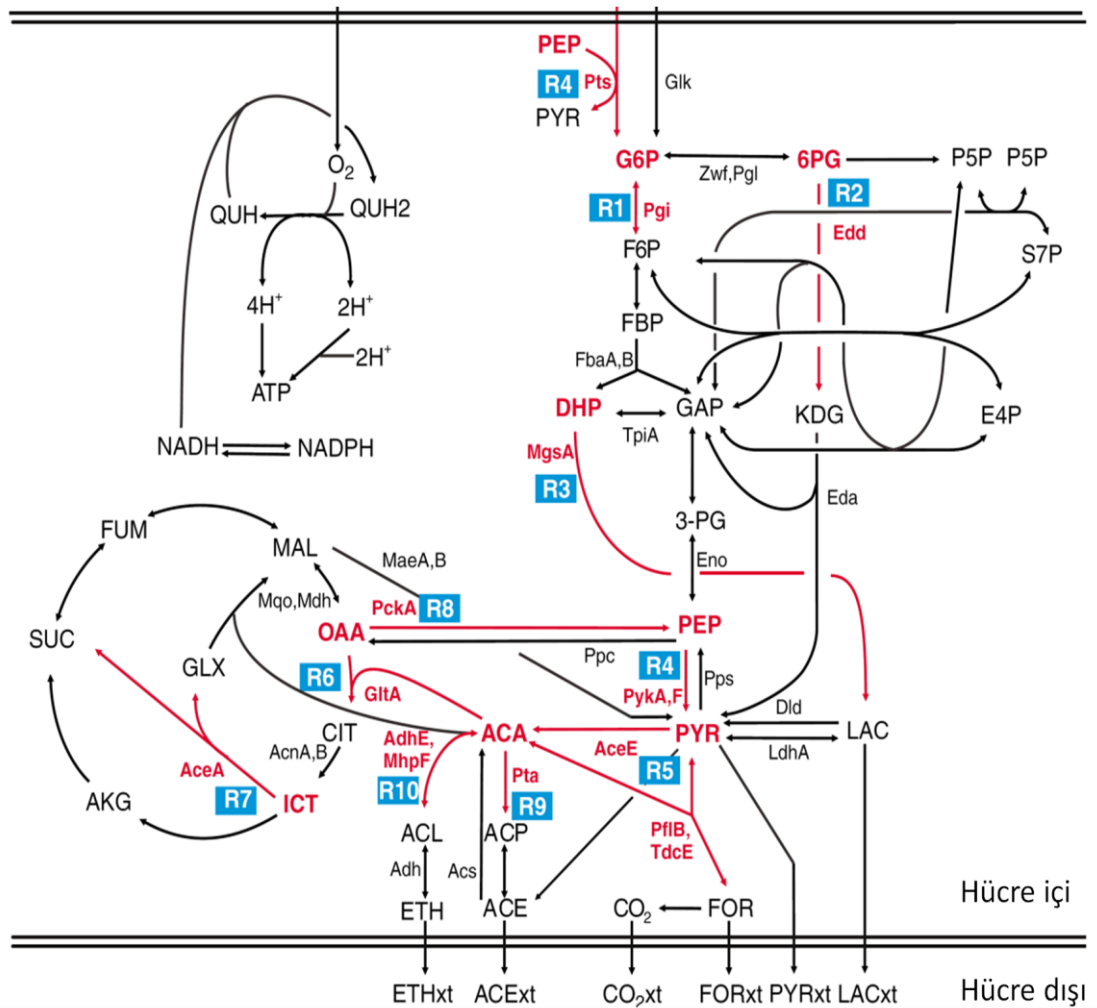
(1) Oksijenli Sürekli (“Chemostat”) Ortam: (a) Deneysel olarak hücrenin büyüme oranı $0,1 h^{-1}$ olarak sabitlenmiştir [Nanchen et al., 2006]. (b) Hücre içerisine alınan oksijenin değeri, yapılan literatür taraması sonucu hücre içerisine alınan glikozun değerinin en fazla 3,8 katı olacak şekilde sınırlandırılmıştır [Alexeeva et al., 2000; Fischer and Sauer, 2003; Kayser et al., 2005].

(2) Oksijenli Kesikli (“Batch”) Ortam: (a) Deneysel olarak hücre içerisine alınan glikozun değeri $7,7 \frac{mmol}{gDw.h}$ olarak sabitlenmiştir [Perrenoud and Sauer, 2005]. (b) Hücre içerisine alınan oksijenin değeri, yapılan literatür taraması sonucu hücre içerisine alınan glikozun değerinin en fazla 1,45 katı olacak şekilde sınırlandırılmıştır [Alexeeva et al., 2000; Schuetz et al., 2007].

(3) Oksijensiz Kesikli (“Batch”) Ortam: (a) Deneysel olarak hücre içerisine alınan glikozun değeri $7,7 \frac{mmol}{gDw.h}$ olarak sabitlenmiştir [Perrenoud and Sauer, 2005]. (b) Hücre içerisine alınan oksijen değeri 0 olarak sabitlenmiştir.

Escherichia coli mikroorganizması için 2 farklı metabolik model kullanılarak hesaplamalar yapıldı. Bunlardan bir tanesi 49 metabolitten ve 100 reaksiyondan oluşan metabolik modeldir [Schuetz et al., 2007]. Bu model, bu tezde *Escherichia coli* bakterisi için oluşturulmuş küçük model olarak adlandırılacaktır. Diğeri ise, 1668 metabolitten ve 2382 reaksiyondan oluşan genom boyutlu bir modeldir [Feist et al., 2007]. Bu model de, tezde *Escherichia coli* bakterisi için oluşturulmuş iAF1260-genom model olarak adlandırılacaktır.

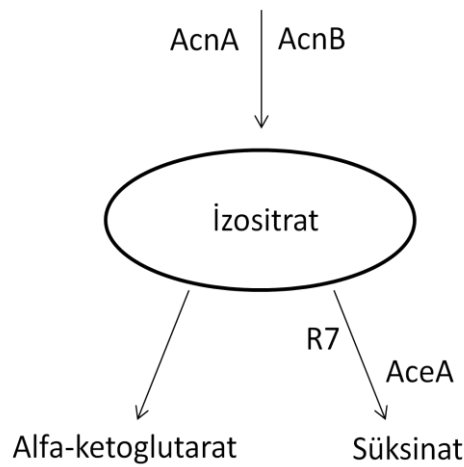
3.2 Küçük Model İçin Yapılan Hesaplamalar



Şekil 3.1 Çalışılan *E.coli* bakterisi merkezi karbon metabolizmasına ait glikoliz, pentoz fosfat, TCA döngüsü, oksidatif fosforilasyon evrelerinin şekilsel gösterimi [Schuetz et al., 2007]

Escherichia coli mikroorganizması için üretilen küçük model, Şekil 3.1’de görüldüğü gibi besin olarak glikoz tüketen ve yan ürün olarak da etil alkol, asetat, laktik asit, pirüvat, formik asit, suksinat üreten; glikoliz yolu, pentoz fosfat yolu, TCA döngüsü ve oksidatif fosforilasyon yollarına sahip bir modeldir.

Schuetz ve arkadaşlarının (2007) tanımladığı ayrılma oranlarını küçük modele entegre etmek için, Tablo 3.1’deki ayrılma oranlarının fiziksel anlamlarından yola çıkarak Şekil 3.2’de gösterilen mantıkla ayrılma oranları (“split ratio”) tanımlandı.



Şekil 3.2 R7 oranı için izositrat metaboliti etrafındaki akı dağılımı

Bu oranlar ilgili metabolit etrafında ayrılan bir akının giren akıların toplamına bölünmesiyle elde edilir. Örneğin Şekil 3.2’deki izositrat metaboliti etrafında R7 oranına bakıldığında ilgili metabolite giren akılar AcnA ve AcnB enzimleriyle adlandırılan akılardır. Bu metabolitten çıkan (metaboliti tüketen) akılar ise AceA ve İcd enzimleriyle adlandırılan akılardır. Bu oran bize izositrat metabolitin ne kadarının suksinat metabolitine dönüştüğü hakkında bilgi verir. Bu şekilde R7 oranı $v_{AceA}/(v_{AcnA}+v_{AcnB})$ olarak tanımlanır. Dolayısıyla bu tanımlanan R 0 ve 1 arasında değerler alır. Bu şekilde hesaplama yaparak küçük modeldeki reaksiyonlar için elde edilen R eşitlikleri Tablo 3.2’dedir. Örneğin, Tablo 3.2’deki R1 oranı glikoliz ve pentoz fosfat yolu ayrımında glikoliz yoluna giren akı oranını göstermektedir. R oranlarının tanımlanmasında kullanılan kısaltmalar (örneğin R1 oranının belirlenmesinde kullanılan pgi, glk, pts kısaltmaları) reaksiyonların

gerçekleştirilmesinde görev alan enzimlerin kısaltmalarıdır. *Escherichia coli* bakterisi için oluşturulmuş küçük modelin reaksiyon listesi ilgili enzim isimleriyle birlikte EK 4'te verilmiştir. Sistemin serbestlik derecesini gösteren R değerlerinin Tablo 3.1'de verilen tanımlar doğrultusunda küçük *E.coli* modeli için elde edilen matematiksel ifadeler Eşitlik (3.1)-(3.10)'da verilmiştir [Schuetz et al., 2007].

$$R1 = \frac{v_{Pgi}}{v_{glk} + v_{pts}} \quad (3.1)$$

$$R2 = \frac{v_{edd}}{v_{pgl}} \quad (3.2)$$

$$R3 = \frac{v_{mgsa}}{v_{fbaA} + v_{FbaB}} \quad (3.3)$$

$$R4 = \frac{v_{pykA} + v_{pykF} + v_{pts}}{v_{eno} + v_{pps} + v_{pckA}} \quad (3.4)$$

$$R5 = \frac{v_{aceE} + v_{pflB} + v_{tdcE}}{v_{pykA} + v_{pykF} + v_{maeA,B} + v_{dld} + v_{ldhA} + v_{eda} + v_{pts}} \quad (3.5)$$

$$R6 = \frac{v_{gltA} + v_{prpC}}{v_{aceE} + v_{pflB} + v_{tdcE} + v_{acs}} \quad (3.6)$$

$$R7 = \frac{v_{aceA}}{v_{acnA} + v_{acnB}} \quad (3.7)$$

$$R8 = \frac{v_{pckA}}{v_{mdh} + v_{mqo} + v_{ppc}} \quad (3.8)$$

$$R9 = \frac{v_{pta}}{v_{aceE} + v_{pflB} + v_{tdcE} + v_{acs}} \quad (3.9)$$

$$R10 = \frac{v_{adhe} + v_{mhpF}}{v_{aceE} + v_{pflB} + v_{tdcE} + v_{Acs}} \quad (3.10)$$

3.2.1 Küçük Model Kullanılarak Yapılan Akı Dengesi Analizi Hesaplamaları

Üç ayrı deney ortamının her biri için (oksijenli sürekli ortam, oksijenli kesikli ortam, oksijensiz kesikli ortam) küçük model kullanılarak Tablo 2.4'te özetlendiği gibi bakım-onarım reaksiyonuna ve maksimum biyokütleyle % 10, % 15 esneklik payları verilerek 7 farklı Akı Dengesi Analizi hesaplaması yapılmıştır. Bu analizler Şekil 2.18'de verilen Akı Dengesi Analizi aşamaları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yani, küçük model kullanılarak toplam 84 adet (3 ortam, 4 ikincil amaç fonksiyonu, 7 esneklik kombinasyonu) Akı Dengesi Analizi hesaplaması yapıldı. Sonuçlar incelendiğinde deneysel verilere en yakın sonucun, bakım-onarım reaksiyonu ölçüm kısıtı olarak kullanılan reaksiyona %10 ve maksimum biyokütleyle (minimum glikoz) %10 esneklik payı verilen hesaplamalardan elde edildiği gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar Tablo 3.3, 3.4 ve 3.5'te verilmiştir. Diğer esneklik hesaplarına ait sonuçlar ise, ayrıntılı olarak EK 5'te verilmiştir. Bu 84 hesaplamanın tümünün yorumu için kullanılan PF değerleri de Tablo 3.6, 3.7 ve 3.8'de verilmiştir.

Tablo 3.3 Oksijenli Sürekli Ortam için bakım-onarım reaksiyonu ölçüm kısıtı olarak kullanılan reaksiyona %10 ve minimum glikoza % 10 esneklik payı verilen küçük *E.coli* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Deneysel Veriler
R1	0,00	0,16	0,91	0,25	0,69 ± 0,12
R2	0,06	0,88	0,00	0,72	0,23 ± 0,20
R3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R4	0,57	0,93	0,81	0,93	0,84 ± 0,14
R5	0,56	0,84	0,82	0,82	0,91 ± 0,21
R6	0,35	0,48	0,63	0,61	0,64 ± 0,13
R7	0,00	0,19	0,00	0,17	0,46 ± 0,13
R8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,35 ± 0,08
R9	0,00	0,18	0,18	0,00	0,00 ± 0,05
R10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05

Tablo 3.4 Oksijenli Kesikli Ortam için bakım-onarım reaksiyonu ölçüm kısıtı olarak kullanılan reaksiyona %10 ve maksimum biyokütleyle % 10 esneklik payı verilen küçük *E.coli* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Deneysel Veriler
R1	0,00	0,00	0,52	0,05	0,70 ± 0,02
R2	0,00	0,58	0,64	0,35	0,13 ± 0,06
R3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R4	0,71	0,59	0,69	0,64	0,78 ± 0,02
R5	0,41	0,74	0,73	0,69	0,81 ± 0,03
R6	0,35	0,15	0,47	0,19	0,24 ± 0,02
R7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R9	0,00	0,55	0,22	0,45	0,58 ± 0,03
R10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05

Tablo 3.5 Oksijensiz Ortam için bakım-onarım reaksiyonu ölçüm kısıtı olarak kullanılan reaksiyona % 10 ve maksimum biyokütleyle % 10 esneklik payı verilen küçük *E.coli* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Deneysel Veriler
R1	0,76	0,62	0,65	0,63	0,90 ± 0,05
R2	0,00	0,86	1,00	0,90	0,86 ± 0,94
R3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R4	0,94	0,92	0,91	0,92	0,94 ± 0,05
R5	0,95	0,95	0,95	0,95	0,96 ± 0,09
R6	0,03	0,02	0,02	0,02	0,02 ± 0,01
R7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R9	0,32	0,44	0,45	0,44	0,34 ± 0,01
R10	0,60	0,49	0,48	0,49	0,61 ± 0,04

Tablo 3.6 Oksijenli Sürekli Ortamda yapılan tüm küçük *E.coli* model hesaplamalarının PF değerleri

Glikoz Esneklik	Bakım-onarım Esneklik	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu
Yok	Yok	0,033	0,155	0,033	0,034
10 %	Kullanılmadı	0,085	0,114	0,052	0,070
15 %	Kullanılmadı	0,085	0,139	0,065	0,070
10 %	10 %	0,080	0,066	0,040	0,045
15 %	10 %	0,087	0,079	0,051	0,045
10 %	15 %	0,080	0,069	0,040	0,044
15 %	15 %	0,087	0,081	0,049	0,044

Tablo 3.7 Oksijenli Kesikli Ortamda yapılan tüm küçük *E.coli* model hesaplamalarının PF değerleri

Biyokütle Esneklik	Bakım-onarım Esneklik	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu
Yok	Yok	0,099	0,099	0,142	0,099
10 %	Kullanılmadı	0,131	0,101	0,051	0,097
15 %	Kullanılmadı	0,134	0,101	0,045	0,108
10 %	10 %	0,135	0,097	0,043	0,076
15 %	10 %	0,093	0,095	0,038	0,096
10 %	15 %	0,135	0,096	0,044	0,079
15 %	15 %	0,093	0,097	0,036	0,096

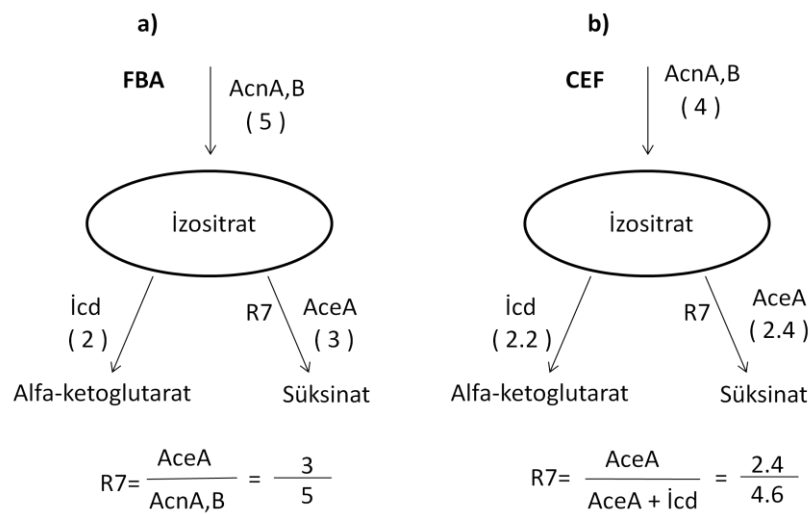
Tablo 3.8 Oksijensiz Ortamda yapılan tüm küçük *E.coli* model hesaplamalarının PF değerleri

Biyokütle Esneklik	Bakım-onarım Esneklik	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu
Yok	Yok	0,008	0,008	0,081	0,008
10 %	Kullanılmadı	0,010	0,014	0,014	0,014
15 %	Kullanılmadı	0,010	0,025	0,021	0,019
10 %	10 %	0,004	0,008	0,009	0,009
15 %	10 %	0,004	0,014	0,014	0,012
10 %	15 %	0,004	0,009	0,009	0,009
15 %	15 %	0,004	0,014	0,014	0,012

3.2.2 Küçük Model Kullanılarak Yapılan Kontrol-etkili Akı Analizi Hesaplamaları

Bölüm 2.5'te ayrıntılı olarak anlatıldığı gibi, Kontrol-etkili Akı Analizi, sistemdeki bütün Temel Akı Tiplerinin elde edilmesi ve bütün reaksiyonların sistem için ne kadar önem arz ettiğinin bulunması hesabına dayanan matematiksel bir metot olarak tanımlanabilir. Akı Dengesi Analizi metodu sistemdeki reaksiyonların akı değerlerine odaklanırken, Kontrol-etkili Akı Analizi metodu, reaksiyonların sistem için ne kadar önem teşkil ettiğine odaklanır.

Akı Dengesi Analizi hesaplamalarında kullanılan ayrılma oranları, Şekil 3.3a'da gösterildiği gibi ilgili metabolitten çıkan akının bu metabolite giren toplam akıya oranlanmasıyla elde edilmiştir. Fakat Kontrol-etkili Akı Analizi ile elde edilen akı dağılımlarında ilgili metabolitlere giren CEF değerlerinin toplamı o metabolitten çıkan CEF değerlerinin toplamına eşit olmayabilir. Çünkü CEF değerleri tek bir akı dağılımına değil, birçok akı dağılımının ortalamasına dayanır. Dolayısıyla, bu ortalama değerler yüzünden katı katıya bir kütle dengesinden söz edilemez. Bu sebeple, 3.3b'de görüldüğü gibi Kontrol-etkili Akı Analizi hesaplamalarında ayrılma oranları, ilgili metabolitten çıkan akının bu metabolitten çıkan toplam akıya oranlanması olarak tanımlandı.



Şekil 3.3 FBA ve CEF metotlarıyla elde edilen ayrılma oranlarının tanımlanması

Kontrol-etkili Akı Analizi metoduyla sistem analiz edilirken, üç ayrı deneysel ortam (oksijenli sürekli ortam, oksijenli kesikli ortam, oksijensiz kesikli ortam) özelliklerinin modele entegre edilmesi amacıyla aşağıdaki şu dört basamak takip edildi.

(1) Oksijensiz ortamda, oksijene ihtiyacı olan reaksiyonlar aktif olamayacağı için bu reaksiyonlar Temel Akı Tipleri bulunurken sistemden kaldırıldı. Böylece oksijensiz ve oksijenli ortam ayrımı yapılmış oldu.

(2) Temel Akı Tipleri elde edildikten sonra glikoz tüketim akısı her temel akı tipinde 1 birim olacak şekilde normalizasyon yapıldı. Yani, bütün Temel Akı Tiplerindeki glikozun akı değeri 1 birim olacak şekilde yeniden düzenlendi. Bu şekilde Temel Akı Tipleri karşılaştırılabilir hale getirildi.

(3) Oksijenli ortamda kesikli ve sürekli ortamların farkını modele yansıtmak için, oksijenli kesikli ortamda Akı Dengesi Analizi yapılırken kullanılan (oksijen/glikoz, 11/7,7) oran, aynı şekilde Kontrol-etkili Akı Analizinde de kullanılarak bu orandan daha büyük orana sahip oksijen içeren Temel Akı Tipleri hesaplama dışı bırakıldı. Buna paralel olarak oksijenli sürekli ortamda ise (oksijen/glikoz, 2,5/1) oranı kullanılarak bu orandan daha büyük orana sahip oksijen içeren Temel Akı Tipleri hesaplama dışı bırakıldı. Böylece oksijenli ortam için kesikli ve sürekli ayrımı da yapılmış oldu.

(4) Akı Dengesi Analizi yaparken maksimum biyokütle % 10 ve % 15 esneklik payı uygulanması hesaplamalarıyla aynı doğrultuda, bütün ortam hesaplamaları için elde kalan Temel Akı Tiplerindeki maksimum biyokütle üretim akıları bulundu. Ve bu biyokütle üretim akılarından en fazla % 10 ve % 15 daha küçük biyokütleyle sahip Temel Akı Tipleri hesaba katıldı. Bu orandan daha düşük biyokütleyle sahip Temel Akı Tipleri ise hesaplama dışı bırakıldı. Bu şekilde Akı Dengesi Analizi yaparken kullanılan %10 ve %15 esneklik payları hesaplamaya dahil edilmiş oldu.

İzlenen bu 4 basamak sayesinde hem deneysel ortam farklılıkları modele yansıtılmış oldu, hem de Akı Dengesi Analizi yaparken maksimum biyokütleyle verilen % 10 ve % 15 esneklik kullanılmış oldu. Akı Dengesi Analizi yapılırken kullanılan bakım-onarım reaksiyonu ise Kontrol-etkili Akı Analizi hesaplamalarında kullanılmadı. Bunun sebebi, gerçekleştirilen bu 4 basamaktan sonra kalan tüm Temel Akı Tiplerinde bakım-onarım reaksiyonunun akı değerlerinin 0 olarak bulunmasıdır.

Bu şekilde yapılan Kontrol-etkili Akı Analizi hesaplamalarında her üç ortam için ilk elde edilen ve kontroller sonrası kalan Temel Akı Tipi sayıları Tablo 3.9’da, tüm hesaplamalar sonucu elde edilen ayrılma oranları ise Tablo 3.10, 3.11 ve 3.12’de verilmiştir.

Tablo 3.9 Küçük *E.coli* modeli için Kontrol-etkili Akı Analizi hesaplamaları yapılırken elde edilen Temel Akı Tipi sayıları

	Oksijenli Sürekli Ortam		Oksijenli Kesikli Ortam		Oksijensiz Ortam	
Biyokütle Esneklik	%10	% 15	%10	% 15	%10	% 15
İlk Hesaplanan Temel Akı Tipi	186.490 (Adet)	186.490 (Adet)	186.490 (Adet)	186.490 (Adet)	22.527 (Adet)	22.527 (Adet)
Oksijen Kontrolü Sonrası Kalan Temel Akı Tipi	61.686 (Adet)	61.686 (Adet)	7.538 (Adet)	7.538 (Adet)	-	-
Biyokütle Kontrolü Sonrası Kalan Temel Akı Tipi	2.214 (Adet)	5.990 (Adet)	1702 (Adet)	2108 (Adet)	10 (Adet)	48 (Adet)

Tablo 3.10 Oksijenli Sürekli Ortam için maksimum biyokütle % 10 ve % 15 esneklik payı verilerek küçük *E.coli* modeli için yapılan KEAA hesaplamaları

Ayrılma Oranı	Maksimum Biyokütle % 10 Esnek	Maksimum Biyokütle % 15 Esnek	Deneyisel Veriler
R1	0,22	0,14	0,69 ± 0,12
R2	0,34	0,37	0,23 ± 0,20
R3	0,32	1,00	0,00 ± 0,05
R4	0,23	0,21	0,84 ± 0,14
R5	0,21	0,21	0,91 ± 0,21
R6	0,66	0,70	0,64 ± 0,13
R7	0,49	0,37	0,46 ± 0,13
R8	0,02	0,07	0,35 ± 0,08
R9	0,02	0,04	0,00 ± 0,05
R10	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
PF değeri	0,091	0,255	

Tablo 3.11 Oksijenli Kesikli Ortam için maksimum biyokütle % 10 ve % 15 esneklik payı verilerek küçük *E.coli* modeli için yapılan KEAA hesaplamaları

Ayrılma Oranı	Maksimum Biyokütle % 10 Esnek	Maksimum Biyokütle % 15 Esnek	Deneyisel Veriler
R1	0,29	0,28	0,70 ± 0,02
R2	0,32	0,32	0,13 ± 0,06
R3	0,12	0,14	0,00 ± 0,05
R4	0,26	0,25	0,78 ± 0,02
R5	0,21	0,21	0,81 ± 0,03
R6	0,66	0,65	0,24 ± 0,02
R7	0,47	0,47	0,00 ± 0,05
R8	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R9	0,03	0,04	0,58 ± 0,03
R10	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
PF değeri	0,187	0,186	

Tablo 3.12 Oksijensiz Ortam için maksimum biyokütle % 10 ve % 15 esneklik payı verilerek küçük *E.coli* modeli için yapılan KEAA hesaplamaları

Ayrılma Oranı	Maksimum Biyokütle % 10 Esnek	Maksimum Biyokütle % 15 Esnek	Deneyisel Veriler
R1	0,95	0,87	0,90 ± 0,05
R2	0,00	0,15	0,86 ± 0,94
R3	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R4	0,64	0,62	0,94 ± 0,05
R5	0,46	0,45	0,96 ± 0,09
R6	0,08	0,07	0,02 ± 0,01
R7	0,00	0,15	0,00 ± 0,05
R8	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R9	0,37	0,38	0,34 ± 0,01
R10	0,55	0,54	0,61 ± 0,04
PF değeri	0,017	0,018	

3.3 iAF1260 Genom Model Kullanılarak Yapılan Hesaplamalar

Genom-bilim çalışmaları ile hücrenin DNA'sı incelenerek, sahip olduğu bütün genler belirlenebilmektedir. Dolayısıyla gen enzim ilişkisinden yararlanarak (Şekil 2.13) genlerin metabolik ağdaki reaksiyonlarla bağlantıları kurulabilir. Genom boyutlu metabolik modeller, bu şekilde oluşturulmaktadır. Tezde *Escherichia coli* için kullanılan bu metabolik model, 1668 metabolitten, 1260 genden ve 304'ü hücre dışına doğru gerçekleşen ("exchange") reaksiyon olmak üzere toplam 2382 reaksiyondan oluşan genom boyutlu bir modeldir. Genom boyutlu modeller, sırasıyla modelin hesaplamalı ("in silico") model olduğunu temsil eden i harfi, modelin ilk olarak gündeme geldiği makaledeki baş yazar adının ve soyadının ilk harfi ve modelin içerdiği gen sayısı kullanılarak adlandırılır. Bu çalışmada *Escherichia coli* için kullanılan bu metabolik model Adam M Feist ve arkadaşları tarafından

geliştirilen 1260 gene sahip bir metabolik model olduğu için tez yazımı boyunca bu model iAF1260-genom model olarak adlandırılacaktır [Feist et al., 2007].

Küçük boyutlu model kullanılarak yapılan Akı Dengesi Analizi hesaplamalarının tümü, genom boyutlu model kullanılarak tekrarlandı. Böylece hücre metabolizmasını çok daha gerçekçi bir şekilde ele alan model kullanmanın deney sonuçlarını daha iyi tahmin etmedeki rolü incelendi. Bu hesaplamaların küçük model kullanılarak yapılan Akı Dengesi Analizi hesaplamalarından tek farkı, Bölüm 2.6.3'te (Minimum Reaksiyon Basamağı) ayrıntılı olarak anlatıldığı gibi CPLEX tabanlı karma tam sayılı karışık programlama algoritmasının çok fazla bilinmeyene (reaksiyon sayısına) sahip iAF1260-genom model gibi optimizasyon problemlerinin çözümü için çok yavaş çalışmasından dolayı, minimum reaksiyon basamağına denk gelen akı dağılımının bu boyuttaki sistemler için daha hızlı çalışan genetik algoritma esasına dayanarak programlanmasıdır.

Kontrol-etkili Akı Analizi hesaplamaları ise iAF1260-genom modeli için yapılmamıştır. Bunun sebebi, EFM hesabının 100-150 reaksiyona sahip sistemlerden daha komplike sistemler (iAF1260-genom model) için mümkün olmamasıdır.

3.3.1 iAF1260 Genom Model Kullanılarak Yapılan Akı Dengesi Analizi Hesaplamaları

Tablo 3.1'de verilen ayrılma oranlarının fiziksel anlamlarından yola çıkarak, bu oranlar küçük modelde olduğu gibi iAF1260-genom modeli için de matematiksel olarak ifade edildi. Bu matematiksel ifadeler Eşitlik (3.11)-(3.20)'de verilmiştir.

$$R1 = \frac{v_{pgl}}{v_{ffsd} + v_{pts} + v_{frulysds} + v_{ab6pgh} + v_{hex1} + v_{glcptsp} + v_{tre6ph}} \quad (3.11)$$

$$R2 = \frac{v_{edd}}{v_{pgl} + v_{gnk}} \quad (3.12)$$

$$R3 = \frac{v_{msga}}{v_{rmpa} + v_{fba} + v_{dhapt} + v_{g3pd\ 2,5,6,7} + v_{tgbpa}} \quad (3.13)$$

$$R4 = \frac{v_{pyk} + v_{frupts,2pp} + v_{gam,galt,fru,glc,acmum,acman,acga,acsb_ptspp} + v_{dhapt}}{v_{eno} + v_{pps} + v_{ppck}} \quad (3.14)$$

$$R5 = \frac{v_{pfl} + v_{pdh}}{v_{pyk} + v_{me1} + v_{oaddc} + v_{tre,acga,acmum,man,ml,galt} + v_{alata2} + v_{pts}} \quad (3.15)$$

$$R6 = \frac{v_{cs}}{v_{acs} + v_{pfl} + v_{acald} + v_{maltatr} + v_{acs} + v_{kat_1..8} + v_{glctatr}} \quad (3.16)$$

$$R7 = \frac{v_{icl}}{v_{icdhyr} + v_{acontb}} \quad (3.17)$$

$$R8 = \frac{v_{ppck}}{v_{cyl} + v_{mdh2} + v_{ppc} + v_{tartd}} \quad (3.18)$$

$$R9 = \frac{v_{ptar}}{v_{acs} + v_{kat_1..8} + v_{pdh} + v_{pfl}} \quad (3.19)$$

$$R10 = \frac{v_{acald}}{v_{acs} + v_{kat_1..8} + v_{pfl} + v_{pdh}} \quad (3.20)$$

Bu Eşitlik serisindeki R oranlarının tanımlanmasında kullanılan kısaltmalar ilgili reaksiyonların gerçekleşmesinde rol alan enzimlerin kısaltmalarıdır. *E.coli* için oluşturulmuş iAF1260-genom modelinin reaksiyon listesi, ilgili enzim isimleriyle birlikte <http://www.nature.com/msb/journal/v3/n1/supinfo> sitesinden elde edilebilir.

Küçük model hesaplamaları bölümünde verilen Tablolara paralel olarak, her bir ortamdaki hesaplamalardan deneysel verilere en yakın sonucun bakım-onarım reaksiyonu ölçüm kısıtı olarak kullanılan reaksiyona %10 ve maksimum biyokütle (minimum glikoz) %10 esneklik payı verilen hesaplamalardan elde edildiği gözlemlenmiştir. Bu hesaplamalar Tablo 3.13, 3.14 ve 3.15'te verilmiştir. Diğer esneklik hesaplarına ait sonuçlar ise, ayrıntılı olarak EK 5'te verilmiştir. Bu 84 hesaplamanın tümünün yorumu için kullanılan PF değerleri de Tablo 3.16, 3.17 ve 3.18'de verilmiştir.

Tablo 3.13 Oksijenli Sürekli Ortam için bakım-onarım reaksiyonu ölçüm kısıtı olarak kullanılan reaksiyona %10 ve minimum glikoza % 10 esneklik payı verilen iAF1260-genom *E.coli* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Deneyisel Veriler
R1	0,97	0,00	0,89	0,47	0,69 ± 0,12
R2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,23 ± 0,20
R3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R4	0,85	0,96	0,85	0,75	0,84 ± 0,14
R5	0,86	0,84	0,85	0,73	0,91 ± 0,21
R6	0,79	0,37	0,70	0,54	0,64 ± 0,13
R7	0,00	0,48	0,00	0,00	0,46 ± 0,13
R8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,35 ± 0,08
R9	0,00	0,22	0,08	0,00	0,00 ± 0,05
R10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05

Tablo 3.14 Oksijenli Kesikli Ortam için bakım-onarım reaksiyonu ölçüm kısıtı olarak kullanılan reaksiyona %10 ve maksimum biyokütleyle % 10 esneklik payı verilen iAF1260-genom *E.coli* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Deneyisel Veriler
R1	0,91	0,56	0,49	0,54	0,70 ± 0,02
R2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13 ± 0,06
R3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R4	0,82	0,80	0,80	0,76	0,78 ± 0,02
R5	0,83	0,80	0,80	0,76	0,81 ± 0,03
R6	0,34	0,40	0,30	0,59	0,24 ± 0,02
R7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R9	0,40	0,28	0,37	0,00	0,58 ± 0,03
R10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05

Tablo 3.15 Oksijensiz Ortam için bakım-onarım reaksiyonu ölçüm kısıtı olarak kullanılan reaksiyona % 10 ve maksimum biyokütleyle % 10 esneklik payı verilen iAF1260-genom *E.coli* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Deneysel Veriler
R1	0,92	0,81	0,83	0,88	0,90 ± 0,05
R2	0,00	0,73	0,67	0,00	0,86 ± 0,94
R3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R4	0,97	0,96	0,96	0,97	0,94 ± 0,05
R5	0,75	0,97	0,92	0,68	0,96 ± 0,09
R6	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02 ± 0,01
R7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R9	0,20	0,21	0,25	0,18	0,34 ± 0,01
R10	0,75	0,74	0,70	0,76	0,61 ± 0,04

Tablo 3.16 Oksijenli Sürekli Ortamda yapılan tüm iAF1260-genom *E.coli* modeli hesaplamalarının PF değerleri

Glikoz Esneklik	Bakım-onarım Esneklik	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu
Yok	Yok	0,258	0,155	0,236	0,236
10 %	Kullanılmadı	0,040	0,046	0,037	0,032
15 %	Kullanılmadı	0,040	0,053	0,040	0,032
10 %	10 %	0,038	0,065	0,035	0,036
15 %	10 %	0,038	0,072	0,039	0,036
10 %	15 %	0,072	0,072	0,034	0,038
15 %	15 %	0,053	0,072	0,039	0,038

Tablo 3.17 Oksijenli Kesikli Ortamda yapılan tüm iAF1260-genom *E.coli* modeli hesaplamalarının PF değerleri

Biyokütle Esneklik	Bakım-onarım Esneklik	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu
Yok	Yok	0,167	0,046	0,167	0,167
10 %	Kullanılmadı	0,061	0,106	0,011	0,061
15 %	Kullanılmadı	0,061	0,120	0,010	0,061
10 %	10 %	0,014	0,017	0,013	0,061
15 %	10 %	0,061	0,087	0,011	0,061
10 %	15 %	0,120	0,070	0,010	0,061
15 %	15 %	0,087	0,014	0,012	0,061

Tablo 3.18 Oksijensiz Ortamda yapılan tüm iAF1260-genom *E.coli* modeli hesaplamalarının PF değerleri

Biyokütle Esneklik	Bakım-onarım Esneklik	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu
Yok	Yok	0,184	0,010	0,184	0,184
10 %	Kullanılmadı	0,014	0,007	0,003	0,004
15 %	Kullanılmadı	0,014	0,008	0,003	0,011
10 %	10 %	0,011	0,007	0,003	0,014
15 %	10 %	0,030	0,028	0,003	0,014
10 %	15 %	0,030	0,006	0,003	0,014
15 %	15 %	0,030	0,030	0,004	0,014

4 *S.CEREVISIAE* MİKROORGANİZMASI İÇİN YAPILAN ÇALIŞMALAR

Tezin bu bölümü *Saccharomyces cerevisiae* mikroorganizması için yapılan çalışmaları içermektedir. *Escherichia coli* mikroorganizması için yapılan ve 3. Bölüm’de ayrıntılı olarak anlatılan tüm hesaplamalar paralel olarak *Saccharomyces cerevisiae* mikroorganizması için de tekrarlandı.

Schuetz ve arkadaşları (2007) tarafından önerilen ayrılma oranlarının fiziksel anlamlarına paralel olarak bu tez çalışmasında *Saccharomyces cerevisiae* mikroorganizması için toplam sekiz ayrılma oranları tanımlandı. Tanımlanan oranların biri haricindeki (gliserol salgısına giden akı oranı) toplam yedi oran *Escherichia coli* mikroorganizması için tanımlanan oranlarla aynı fiziksel anlama sahiptir. *Escherichia coli* mikroorganizmasında olup da *Saccharomyces cerevisiae* mikroorganizmasında olmayan iki akı oranı (Doudoroff yoluna giren akı oranı ve Methylgloxal yoluna giren akı oranı) burada tanımlanmadı. Ayrıca *Escherichia coli* mikroorganizmasında asetat salgısına giden akı oranı tanımlanmasına rağmen *Saccharomyces cerevisiae* mikroorganizması için tanımlanmamasının sebebi, bu mikroorganizmanın her üç durumda da hemen hemen hiç asetat üretmemesidir. Çıkarılan 3 ayrılma oranının yerine *Saccharomyces cerevisiae* mikroorganizmasına özgü oksijensiz ve oksijenli kesikli ortamlarda üretilen gliserol salgısına giden akı oranı dahil edildi. Bu şekilde tanımlanan toplam 8 oran (hücrenin temel davranışını temsil eden ayrılma oranları) sayesinde tüm sistemin akı dağılımına bakmak yerine sadece bu ayrılma oranlarına bakarak sistemin tamamı hakkında bilgi sahibi olmak amaçlandı. *Saccharomyces cerevisiae* mikroorganizması için tanımlanan ayrılma oranlarının fiziksel anlamları Tablo 4.1’de görülmektedir.

Tablo 4.2’de görüldüğü gibi *Saccharomyces cerevisiae* mikroorganizması için, 2 sürekli oksijenli ve oksijensiz ortam [Jouhten et al., 2008] ve 1 kesikli oksijenli ortam [Gombert et al., 2001; Blank et al., 2005; Heyland et al., 2009; Fendt and Sauer, 2010] olmak üzere toplam 3 farklı ortam için deneysel akı verisi elde edilip Tablo 4.1’de fiziksel anlamları verilen ayrılma oranları hesaplanmıştır.

Tablo 4.1 *S.cerevisiae* mikroorganizması için tanımlanan ve tüm sistemin temel davranışını temsil eden ayrılma oranlarının fiziksel anlamları

R1	Glikoliz Yoluna Giren Akı Oranı
R2	PEP'ten Pirüvata Giden Akı Oranı
R3	Pirüvat'tan Asetil-Koenzim-A'ya Giden Akı Oranı
R4	TCA Döngüsüne Giren Akı Oranı
R5	Oksaloasetat'tan PEP'e Giden Akı Oranı
R6	Glyoxlate Metabolitine Giden Akı Oranı
R7	Etil alkol Salgısına Giden Akı Oranı
R8	Gliserol Salgısına Giden Akı Oranı

Tablo 4.1 ve Tablo 4.2'deki ayrılma oranlarının fiziksel anlamlarına ve bu oranların deneysel değerlerine bakarak *Saccharomyces cerevisiae* mikroorganizmasının farklı ortamlardaki biyolojik amacı doğrultusunda şu yorumları yapabiliriz.

(1) R1 oranına (Glikoliz Yoluna Giren Akı Oranı) bakıldığında oksijenli sürekli ortamda hücre bu yolu az tercih etmemesine rağmen oksijenli kesikli ve oksijensiz ortamlarda dağılan akının çok büyük bir bölümü bu yolu tercih etmiştir.

(2) R4 oranına (TCA Döngüsüne Giren Akı Oranı) bakıldığında oksijenli sürekli ve kesikli ortamlarda hücre bu yolları yaklaşık % 80-85 gibi büyük bir oranla tercih ederken, oksijensiz ortamda ise akının % 37'si bu yolu tercih etmiştir. Hücrenin böyle bir davranışta bulunması, daha önceden katabolizmadaki yıkım olayları sürecinde anlatılanları (TCA döngüsü oksijensiz ortamda çok az aktiftir) doğrular niteliktedir.

(3) R7 oranına (Etil alkol Salgısına Giden Akı Oranı) bakıldığında oksijenli kesikli ve oksijensiz ortamda akının % 94-99 gibi çok büyük bir bölümü bu yolu tercih etmiştir. Buna karşılık, oksijenli sürekli ortamda ise hücre bu yolu hiç tercih etmemiştir. Yani oksijenli sürekli ortamda hücre hiç etil alkol üretmemiştir.

(4) R8 oranına (Gliserol Salgısına Giden Akı Oranı) bakıldığında oksijenli sürekli ortamda hücre bu yolu hiç tercih etmezken oksijenli kesikli ve oksijensiz ortamda ise akının % 10-19 gibi bir bölümü bu yolu tercih etmiştir.

Tablo 4.2 Tablo 4.1’de *S.cerevisiae* mikroorganizması için tanımlanan (R) oranlarının deneysel değerleri

Ayrılma Oranları (R)	Oksijenli Sürekli Ortam	Oksijenli Kesikli Ortam	Oksijensiz Sürekli Ortam
R1	$0,49 \pm 0,25$	$0,85 \pm 0,03$	$0,88 \pm 0,13$
R2	$0,96 \pm 0,52$	$0,99 \pm 0,00$	$0,99 \pm 0,18$
R3	$0,58 \pm 0,32$	$0,01 \pm 0,02$	$0,02 \pm 0,07$
R4	$0,80 \pm 0,45$	$0,86 \pm 0,16$	$0,37 \pm 0,62$
R5	$0,09 \pm 0,04$	$0,20 \pm 0,30$	$0,00 \pm 0,08$
R6	$0,00 \pm 0,05$	$0,00 \pm 0,05$	$0,00 \pm 0,05$
R7	$0,00 \pm 0,05$	$0,94 \pm 0,01$	$0,99 \pm 0,01$
R8	$0,00 \pm 0,05$	$0,10 \pm 0,04$	$0,19 \pm 0,00$

4.1 Akı Dengesi Analizi Hesaplamaları Yapılırken Amaç Fonksiyonları ve Deney Ortam Özelliklerinin Modele Entegre Edilmesi

Tablo 4.2’ye bakıldığında bazı ayrılma oranları benzer özellik (artma ve azalma) gösterirken bazılarının üç ortamda da oldukça farklı özellik gösterdiği görülür. Yani, ortamların değişimi, hücrenin davranışında farklılıklara yol açmıştır. Tezin bu bölümünde ortam değişimlerinin *Saccharomyces cerevisiae* mikroorganizmasının davranışında yol açtığı farklılıklara, Akı Dengesi Analizi hesaplaması yaparak ulaşılması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, Akı Dengesi

Analizi hesaplamaları Şekil 2.16’da verilen Akı Dengesi Analizi aşamaları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Deney Ortam Özelliklerinin Modele Entegre Edilmesi

(1) Oksijenli Sürekli (“Chemostat”) Ortam: (a) Deneysel olarak hücrenin büyüme oranı $0,1 \text{ h}^{-1}$ olarak sabitlenmiştir [Jouhten et al., 2008]. (b) Hücre içerine alınan oksijenin maksimum değeri $2,7 \frac{\text{mmol}}{\text{gDw.h}}$ olarak sınırlandırılmıştır [Jouhten et al., 2008].

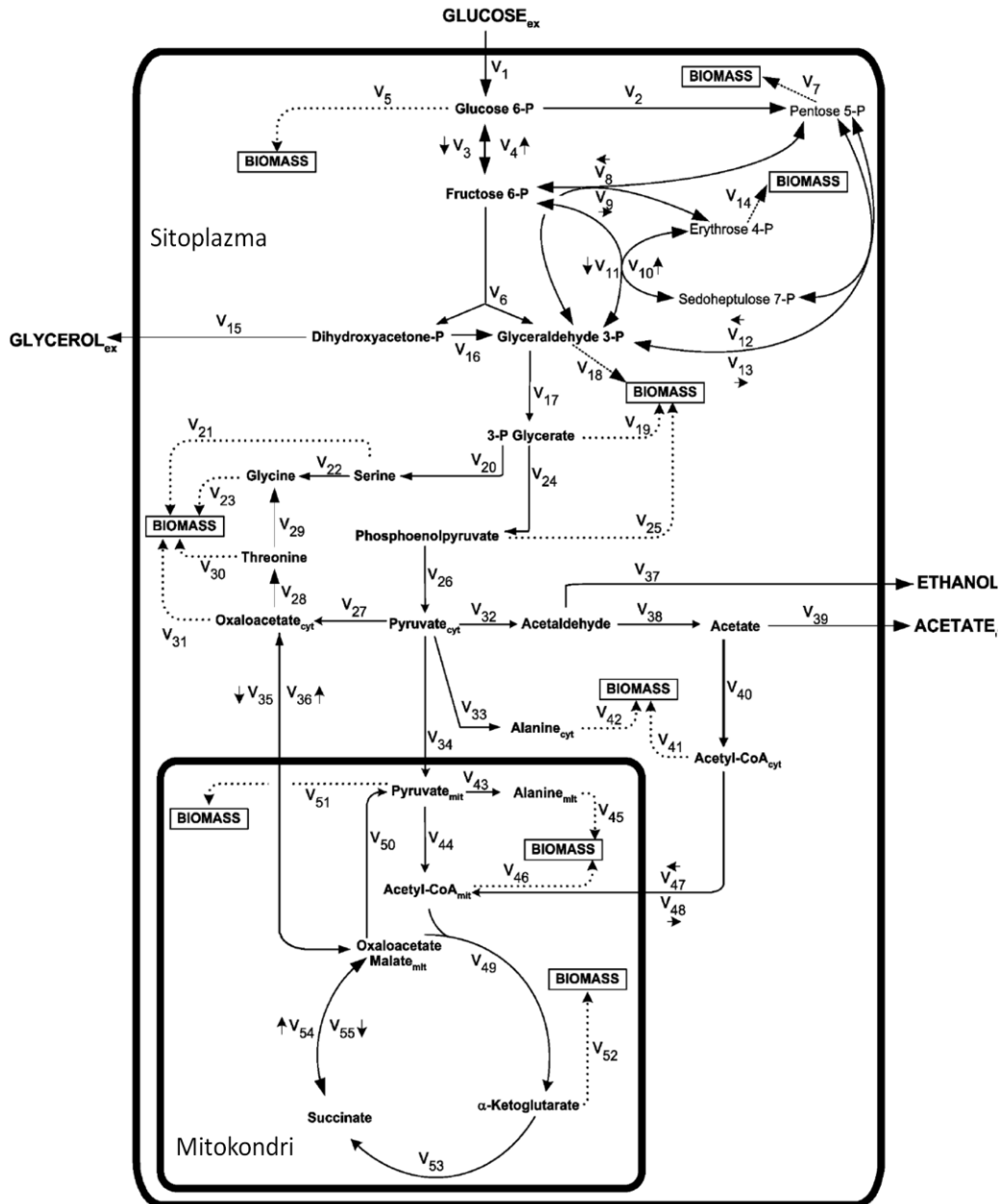
(2) Oksijenli Kesikli (“Batch”) Ortam: (a) Deneysel olarak hücre içerine alınan glikozun değeri $15,3 \frac{\text{mmol}}{\text{gDw.h}}$ olarak sabitlenmiştir [Famili et al., 2003]. (b) Hücre içerine alınan oksijenin maksimum değeri $2,4 \frac{\text{mmol}}{\text{gDw.h}}$ olarak sınırlandırılmıştır [Famili et al., 2003].

(3) Oksijensiz Sürekli (“Chemostat”) Ortam: (a) Deneysel olarak hücrenin büyüme oranı $0,1 \text{ h}^{-1}$ olarak sabitlenmiştir [Jouhten et al., 2008]. (b) Hücre içerine alınan oksijen değeri 0 olarak sabitlenmiştir.

Saccharomyces cerevisiae mikroorganizması için de *Escherichia coli* mikroorganizmasında olduğu gibi 2 farklı boyutta metabolik model kullanılarak hesaplamalar yapıldı. Bunlardan bir tanesi 50 metabolitten ve 53 reaksiyondan oluşan metabolik modeldir [Çakır et al, 2007]. Bu model, bu tezde *Saccharomyces cerevisiae* mikroorganizması için oluşturulan “küçük model” olarak adlandırılacaktır. Diğer ise, 825 metabolitten ve 1175 reaksiyondan oluşan genom boyutlu bir modeldir [Förster et al, 2002]. Bu model de, tezde *Saccharomyces cerevisiae* mikroorganizması için oluşturulan iFF708-genom model olarak adlandırılacaktır.

4.2 Küçük Model İçin Yapılan Hesaplamalar

Saccharomyces cerevisiae mikroorganizması için üretilen küçük model, Şekil 4.1'de görüldüğü gibi besin olarak glikoz tüketen ve yan ürün olarak da gliserol, asetat ve etil alkol üreten; glikoliz yolu pentoz fosfat yolu TCA döngüsü, gloxylate yolu ve oksidatif fosforilasyon yollarına sahip bir modeldir [Çakır et al., 2007].



Şekil 4.1 *S.cerevisiae* mikroorganizması için merkezi karbon metabolizmasına ait metabolik ağyapının şekilsel gösterimi [Frick and Wittmann, 2005]

Bölüm 3.2’de anlatıldığı gibi Schuetz ve arkadaşlarının (2007) tanımladığı ayrılma oranları mantığından yola çıkarak bu tez çalışmasında *Saccharomyces cerevisiae* mikroorganizması için Tablo 4.1’de verilen sistemin temel davranışını temsil eden ayrılma oranlarını tanımlandı. Bu mantıkla küçük model için elde edilen deneysel R değerleri Eşitlik (4.1)-(4.8)’de gösterilmiştir. Bu Eşitlik serisinde aynen *Escherichia coli* bakterisinde olduğu gibi Tablo 4.3’teki R1 oranı da glikoliz ve pentoz fosfat yolu ayrımında glikoliz yoluna giren akı oranını göstermektedir. R oranlarının tanımlanmasında kullanılan kısaltmalar örneğin R1 oranının belirlenmesinde kullanılan *pgi1*, *glk1*, *pyk1* kısaltmaları reaksiyonların gerçekleştirilmesinde görev alan enzimlerin kısaltmalarıdır. *Saccharomyces cerevisiae* mikroorganizması için oluşturulmuş küçük modelin reaksiyon listesi EK 4’te verilmiştir.

$$R1 = \frac{v_{pgl1}}{v_{glk1}} \quad (4.1)$$

$$R2 = \frac{v_{pyk1,2}}{v_{eno1,2} + v_{pck1}} \quad (4.2)$$

$$R3 = \frac{v_{pdab}}{v_{pyk1,2} + v_{mae1}} \quad (4.3)$$

$$R4 = \frac{v_{cit1,3} + v_{cit2}}{v_{cat2} + v_{pda,b} + v_{acs1,2}} \quad (4.4)$$

$$R5 = \frac{v_{pck1}}{v_{pyc1,2} + v_{mdh2} + v_{mdh1}} \quad (4.5)$$

$$R6 = \frac{v_{icl1}}{v_{aco1}} \quad (4.6)$$

$$R7 = \frac{v_{adh1,4}}{v_{pdc1,2,5}} \quad (4.7)$$

$$R8 = \frac{v_{gpd1,2}}{v_{fba1} + v_{tp1}} \quad (4.8)$$

4.2.1 Küçük Model Kullanılarak Yapılan Akı Dengesi Analizi Hesaplamaları

Üç ayrı deney ortamı (oksijenli sürekli ortam, oksijenli kesikli ortam, oksijensiz kesikli ortam) için, küçük model kullanılarak Tablo 2.4'te özetlendiği gibi bakım-onarım reaksiyonuna ve maksimum biyokütleyle % 10, % 15 esneklik payları verilerek 7 farklı Akı Dengesi Analizi hesaplaması yapılmıştır. Bu analizler Şekil 2.18'de verilen Akı Dengesi Analizi aşamaları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yani, küçük model kullanılarak toplam 84 adet (3 ortam, 4 ikincil amaç fonksiyonu, 7 esneklik kombinasyonu) Akı Dengesi Analizi hesaplaması yapıldı. Sonuçlar incelendiğinde *Escherichia coli* mikroorganizmasında olduğu gibi deneysel verilere en yakın sonucun, bakım-onarım reaksiyonu ölçüm kısıtı olarak kullanılan reaksiyona %10 ve maksimum biyokütleyle (minimum glikoz) % 10 esneklik payı verilen hesaplamalardan elde edildiği gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar Tablo 4.3, 4.4 ve 4.5'te verilmiştir. Diğer esneklik hesaplarına ait sonuçlar ise, ayrıntılı olarak EK 6'da verilmiştir. Bu 72 hesaplamanın tümünün yorumu için kullanılan tahminin doğruluğu hesabı değerleri de Tablo 4.6, 4.7 ve 4.8'de verilmiştir.

Tablo 4.3 Oksijenli Sürekli Ortam için bakım-onarım reaksiyonu ölçüm kısıtı olarak kullanılan reaksiyona %10 ve minimum glikoza % 10 esneklik payı verilen küçük *S.cerevisiae* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	DeneySEL Veriler
R1	0,86	0,42	0,42	0,42	0,49 ± 0,25
R2	0,97	0,96	0,96	0,96	0,96 ± 0,52
R3	0,49	0,57	0,57	0,57	0,58 ± 0,32
R4	0,00	0,79	0,79	0,80	0,80 ± 0,45
R5	0,00	0,00	0,14	0,00	0,09 ± 0,04
R6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05

Tablo 4.4 Oksijenli Kesikli Ortam için bakım-onarım reaksiyonu ölçüm kısıtı olarak kullanılan reaksiyona %10 ve maksimum biyokütleyle % 10 esneklik payı verilen küçük *S.cerevisiae* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Deneyisel Veriler
R1	0,96	0,86	0,86	0,92	0,85 ± 0,03
R2	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99 ± 0,00
R3	0,00	0,04	0,04	0,02	0,01 ± 0,02
R4	0,26	0,56	0,56	0,39	0,86 ± 0,16
R5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20 ± 0,30
R6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R7	0,86	0,97	0,97	0,88	0,94 ± 0,01
R8	0,06	0,10	0,10	0,09	0,10 ± 0,04

Tablo 4.5 Oksijensiz Ortam için bakım-onarım reaksiyonu ölçüm kısıtı olarak kullanılan reaksiyona %10 ve minimum glikoza % 10 esneklik payı verilen küçük *S.cerevisiae* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Deneyisel Veriler
R1	0,98	0,95	0,89	0,95	0,88 ± 0,13
R2	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99 ± 0,18
R3	0,00	0,02	0,02	0,02	0,02 ± 0,07
R4	0,00	0,11	0,16	0,39	0,37 ± 0,62
R5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,08
R6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R7	0,91	0,93	0,98	0,93	0,99 ± 0,01
R8	0,16	0,18	0,18	0,18	0,19 ± 0,00

Tablo 4.6 Oksijenli Sürekli Ortamda yapılan tüm küçük *S.cerevisiae* modeli hesaplamalarının PF değerleri

Glikoz Esneklik	Bakım-onarım Esneklik	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu
Yok	Yok	0,004	0,052	0,070	0,006
10 %	Kullanılmadı	0,023	0,004	0,004	0,003
15 %	Kullanılmadı	0,023	0,004	0,004	0,003
10 %	10 %	0,023	0,002	0,002	0,002
15 %	10 %	0,024	0,002	0,001	0,002
10 %	15 %	0,023	0,003	0,002	0,003
15 %	15 %	0,024	0,003	0,002	0,003

Tablo 4.7 Oksijenli Kesikli Ortamda yapılan tüm küçük *S.cerevisiae* modeli hesaplamalarının PF değerleri

Biyokütle Esneklik	Bakım-onarım Esneklik	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu
Yok	Yok	0,001	0,001	0,003	0,001
10 %	Kullanılmadı	0,002	0,001	0,001	0,001
15 %	Kullanılmadı	0,002	0,001	0,001	0,001
10 %	10 %	0,002	0,001	0,001	0,001
15 %	10 %	0,002	0,001	0,001	0,001
10 %	15 %	0,002	0,001	0,001	0,001
15 %	15 %	0,002	0,001	0,001	0,001

Tablo 4.8 Oksijensiz Ortamda yapılan tüm küçük *S.cerevisiae* modeli hesaplamalarının PF değerleri

Biyokütle Esneklik	Bakım-onarım Esneklik	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu
Yok	Yok	0,005	0,007	0,007	0,007
10 %	Kullanılmadı	0,000	0,000	0,000	0,000
15 %	Kullanılmadı	0,000	0,002	0,002	0,002
10 %	10 %	0,001	0,000	0,000	0,000
15 %	10 %	0,001	0,000	0,000	0,000
10 %	15 %	0,001	0,000	0,000	0,000
15 %	15 %	0,001	0,000	0,000	0,000

4.2.2 Küçük Model Kullanılarak Yapılan Kontrol-etkili Akı Analizi Hesaplamaları

Bölüm 3.2.2’de ayrıntılı olarak anlatıldığı gibi, Kontrol-etkili Akı Analizi hesaplamalarında ayrılma oranları, ilgili metabolitten çıkan akının bu metabolitten çıkan toplam akıya oranlanması olarak tanımlandı (Bkz. Şekil 3.3).

Kontrol-etkili Akı Analizi metoduyla *Saccharomyces cerevisiae* mikroorganizması sistemi analiz edilirken, üç ayrı deney ortamı (oksijenli sürekli ortam, oksijenli kesikli ortam, oksijensiz sürekli ortam) özelliklerinin modele entegre edilmesi amacıyla şu basamaklar takip edildi.

(1) Oksijensiz ortamda, oksijene ihtiyacı olan reaksiyonlar aktif olamayacağı için bu reaksiyonlar Temel Akı Tipleri bulunurken sistemden kaldırıldı. Böylece oksijensiz ve oksijenli ortam ayrımı yapılmış oldu.

(2) Temel Akı Tipleri elde edildikten sonra glikoz tüketim akısı 1 birim olacak şekilde tüm Temel Akı Tipleri yeniden hesaplandı. Yani, Temel Akı Tipleri karşılaştırılabilir hale getirildi.

(3) Oksijenli ortamda kesikli ve sürekli ortamların farkını modele yansıtmak için, oksijenli kesikli ortamda *Saccharomyces cerevisiae* mikroorganizması için Akı Dengesi Analizi yapılırken kullanılan (oksijen/glikoz, 2,4/15,3) oran, aynı şekilde Kontrol-etkili Akı Analizinde de kullanılarak bu orandan daha büyük orana sahip oksijen içeren Temel Akı Tipleri hesaplama dışı bırakıldı. Buna paralel olarak oksijenli sürekli ortamda ise (oksijen/glikoz, 2,6/1) oranı kullanılarak bu orandan daha büyük orana sahip oksijen içeren Temel Akı Tipleri hesaplama dışı bırakıldı. Böylece oksijenli ortam için kesikli ve sürekli ayrımı da yapılmış oldu.

(4) Akı Dengesi Analizi yaparken maksimum biyokütle % 10 ve % 15 esneklik payı uygulanması hesaplamalarıyla aynı doğrultuda, bütün ortam hesaplamaları için elde kalan Temel Akı Tiplerindeki maksimum biyokütle üretim

akısı miktarları bulundu. Ve bu biyokütle üretim akısı miktarlarından en fazla % 10 ve % 15 daha küçük biyokütleyle sahip Temel Akı Tipleri hesaba katıldı. Bu orandan daha düşük biyokütleyle sahip Temel Akı Tipleri ise hesaplama dışı bırakıldı.

İzlenen bu 4 basamak sayesinde hem deney ortam farklılıkları modele yansıtılmış oldu, hem de Akı Dengesi Analizi yaparken maksimum biyokütleyle verilen % 10 ve % 15 esneklik kullanılmış oldu. Akı Dengesi Analizi yapılırken kullanılan bakım-onarım reaksiyonu ise *Escherichia coli* mikroorganizmasında olduğu gibi Kontrol-etkili Akı Analizi hesaplamalarında kullanılmadı. Bunun sebebi, gerçekleştirilen bu 4 basamaktan sonra kalan tüm Temel Akı Tiplerinde bakım-onarım reaksiyonunun akı değerleri 0 olarak bulunmasıdır.

Tablo 4.9 Küçük *S.cerevisiae* modeli için Kontrol-etkili Akı Analizi hesaplamaları yapılırken elde edilen Temel Akı Tipi sayıları

	Oksijenli Sürekli Ortam		Oksijenli Kesikli Ortam		Oksijensiz Kesikli Ortam	
Biyokütle Verilen Esneklik	%10	% 15	%10	% 15	%10	% 15
İlk Hesaplanan Temel Akı Tipi	8.080 (Adet)	8.080 (Adet)	8.080 (Adet)	8.080 (Adet)	344 (Adet)	344 (Adet)
Oksijen Kontrolü Sonrası Kalan	7.652 (Adet)	7.652 (Adet)	2.090 (Adet)	2.090 (Adet)	-	-
Biyokütle Kontrolü Sonrası Kalan	104 (Adet)	115 (Adet)	3 (Adet)	3 (Adet)	97 (Adet)	182 (Adet)

Bu şekilde *Saccharomyces cerevisiae* mikroorganizması için yapılan Kontrol-etkili Akı Analizi hesaplamalarında her üç ortam için ilk elde edilen ve kontroller sonrası kalan Temel Akı Tipi sayıları Tablo 4.9’da, tüm hesaplamalar sonucu elde edilen ayrılma oranları ise Tablo 4.10, 4.11 ve 4.12’de verilmiştir.

Tablo 4.10 Oksijenli Sürekli Ortam için maksimum biyokütle % 10 ve % 15 esneklik payı verilerek yapılan Kontrol-etkili Akı Analizi küçük *S.cerevisiae* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	Maksimum Biyokütle % 10 Esnek	Maksimum Biyokütle % 15 Esnek	Deneyisel Veriler
R1	0,90	0,90	0,49 ± 0,25
R2	0,50	0,50	0,96 ± 0,52
R3	0,59	0,55	0,58 ± 0,32
R4	0,00	0,00	0,80 ± 0,45
R5	0,05	0,04	0,09 ± 0,04
R6	1,00	0,99	0,00 ± 0,05
R7	0,00	0,01	0,00 ± 0,05
R8	0,01	0,01	0,00 ± 0,05
PF değeri	0,239	0,237	

Tablo 4.11 Oksijenli Kesikli Ortam için maksimum biyokütle % 10 ve % 15 esneklik payı verilerek yapılan Kontrol-etkili Akı Analizi küçük *S.cerevisiae* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	Maksimum Biyokütle % 10 Esnek	Maksimum Biyokütle % 15 Esnek	Deneyisel Veriler
R1	0,91	0,91	0,85 ± 0,03
R2	0,50	0,50	0,99 ± 0,00
R3	0,00	0,00	0,01 ± 0,02
R4	1,00	1,00	0,86 ± 0,16
R5	0,00	0,00	0,20 ± 0,30
R6	0,05	0,05	0,00 ± 0,05
R7	0,95	0,95	0,94 ± 0,01
R8	0,00	0,00	0,10 ± 0,04
PF değeri	0,21	0,21	

Tablo 4.12 Oksijensiz Ortam için maksimum biyokütle % 10 ve % 15 esneklik payı verilerek yapılan Kontrol-etkili Akı küçük *S.cerevisiae* modeli Analizi hesaplamaları

Ayrılma Oranı	Maksimum Biyokütle % 10 Esnek	Maksimum Biyokütle % 15 Esnek	DeneySEL Veriler
R1	0,96	0,97	0,88 ± 0,13
R2	0,50	0,50	0,99 ± 0,18
R3	0,00	0,00	0,02 ± 0,07
R4	0,45	0,47	0,37 ± 0,62
R5	0,00	0,00	0,00 ± 0,08
R6	0,06	0,08	0,00 ± 0,05
R7	0,94	0,92	0,99 ± 0,01
R8	0,27	0,29	0,19 ± 0,00
PF değeri	0,006	0,010	

4.3 iFF708 Genom Model İçin Kullanılarak Yapılan Hesaplamalar

Bu tezde *Saccharomyces cerevisiae* mikroorganizması için kullanılan bu metabolik model, 137 tanesi hücre dışı metabolit olmak üzere toplam 825 metabolitten, 708 genden ve 348'i hücre dışına doğru gerçekleşen ("exchange") reaksiyon olmak üzere toplam 1174 reaksiyondan oluşan genom boyutlu bir modeldir. Bölüm 3.3'te de anlatıldığı gibi *Saccharomyces cerevisiae* için kullanılan bu metabolik model Förster ve arkadaşları (2003) tarafından üretilen 708 gene sahip bir metabolik model olduğu için tez boyunca bu model iFF708-genom model olarak adlandırılacaktır [Förster et al., 2003].

Saccharomyces cerevisiae mikroorganizması için küçük boyutlu model kullanılarak yapılan Akı Dengesi Analizi hesaplamalarının tümü, genom boyutlu model kullanılarak tekrarlandı. Bu hesaplamaların, küçük model kullanılarak yapılan Akı Dengesi Analizi hesaplamalarından tek farkı, Bölüm 2.6.3'te (Minimum

Reaksiyon Basamağı) ayrıntılı olarak anlatıldığı gibi CPLEX tabanlı karma tam sayılı karışık programlama algoritmasının çok fazla bilinemeyene sahip iFF708-genom model gibi optimizasyon problemlerinin çözümü için çok yavaş çalışmasından dolayı, minimum reaksiyon basamağına denk gelen akı dağılımının bu boyuttaki sistemler için daha hızlı çalışan genetik algoritma esasına dayanarak programlanmasıdır.

4.3.1 iFF708 Genom Model Kullanılarak Yapılan Akı Dengesi Analizi Hesaplamaları

Tablo 4.1’de verilen ayrılma oranlarının fiziksel anlamlarından yola çıkarak, bu oranlar küçük modelde olduğu gibi iFF708-genom modeli için de matematiksel olarak ifade edildi. Bu matematiksel ifadeler Eşitlik (4.9)-(4.10)’da verilmiştir.

$$R1 = \frac{v_{pgl1,2} + v_{u44}}{v_{glk1} + v_{hck1,2,3,4} + v_{zwf1} + v_{pgm1}} \quad (4.9)$$

$$R2 = \frac{v_{pyk1,2} + v_{cdc19}}{v_{eno1,2} + v_{pck1} + v_{err1} + v_{ctp1}} \quad (4.10)$$

$$R3 = \frac{v_{pda1}}{v_{pyk1} + v_{mae1} + v_{cdc19} + v_{trp2,3,4} + v_{cha1} + v_{jen1}} \quad (4.11)$$

$$R4 = \frac{v_{cit1,3} + v_{cit2}}{v_{cat2} + v_{pda1} + v_{acs1,2} + v_{pot1} + v_{hmgs} + v_{yat1}} \quad (4.12)$$

$$R5 = \frac{v_{pck1}}{v_{pyc1,2} + v_{mdh2} + v_{mdh1}} \quad (4.13)$$

$$R6 = \frac{v_{icl1} + v_{icl2}}{v_{ctp1}} \quad (4.14)$$

$$R7 = \frac{v_{adh1,4} + v_{sfa1}}{v_{pdc1,5,6}} \quad (4.15)$$

$$R8 = \frac{v_{hor2} + v_{rh2}}{v_{ba1} + v_{tp1} + v_{tkl1,2} + v_{trp5}} \quad (4.16)$$

Bu Tablodaki R oranlarının tanımlanmasında kullanılan kısaltmalar (örneğin R6 oranının belirlenmesinde kullanılan tcl1, tcl2 ve ctp1 kısaltmaları) reaksiyonların gerçekleşmesinde rol alan enzimlerin kısaltmalarıdır. *Saccharomyces cerevisiae* mikroorganizması için oluşturulmuş iFF708-genom modelinin reaksiyon listesi ilgili enzim isimleriyle birlikte <http://www.sysbio.se/BioMet> sitesinden temin edilebilir.

Küçük model hesaplamaları bölümünde verilen tablolara paralel olarak, her bir ortamdaki hesaplamalardan deneysel verilere en yakın sonucun bakım-onarım reaksiyonu ölçüm kısıtı olarak kullanılan reaksiyona %10 ve maksimum biyokütleyle (minimum glikoz) %10 esneklik payı verilen hesaplamalardan elde edildiği gözlemlenmiştir. Bu hesaplamalar Tablo 4.13, 4.14 ve 4.15'te verilmiştir. Diğer esneklik hesaplarına ait sonuçlar ise, ayrıntılı olarak EK 6'da verilmiştir. Bu 84 hesaplamanın tümünün yorumu için kullanılan tahminin doğruluğu hesabı değerleri de Tablo 4.16, 4.17 ve 4.18'de verilmiştir.

Tablo 4.13 Oksijenli Sürekli Ortam için bakım-onarım reaksiyonu ölçüm kısıtı olarak kullanılan reaksiyona %10 ve minimum glikoza % 10 esneklik payı verilen iFF708-genom *S.cerevisiae* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Deneysel Veriler
R1	0,50	0,70	0,62	0,70	0,49 ± 0,25
R2	0,00	0,97	0,97	0,97	0,96 ± 0,52
R3	0,65	0,42	0,34	0,42	0,58 ± 0,32
R4	0,88	0,87	0,85	0,87	0,80 ± 0,45
R5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,09 ± 0,04
R6	0,33	0,33	0,29	0,33	0,00 ± 0,05
R7	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05

Tablo 4.14 Oksijenli Kesikli Ortam için bakım-onarım reaksiyonu ölçüm kısıtı olarak kullanılan bu reaksiyona %10 ve maksimum biyokütleyle % 10 esneklik payı verilen iFF708-genom *S.cerevisiae* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Deneyisel Veriler
R1	0,50	0,92	0,89	0,89	0,85 ± 0,03
R2	0,01	0,99	0,99	0,99	0,99 ± 0,00
R3	0,03	0,03	0,03	0,03	0,01 ± 0,02
R4	0,53	0,56	0,56	0,56	0,86 ± 0,16
R5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20 ± 0,30
R6	0,23	0,33	0,33	0,33	0,00 ± 0,05
R7	1,00	0,95	0,93	0,91	0,94 ± 0,01
R8	0,00	0,00	0,06	0,06	0,10 ± 0,04

Tablo 4.15 Oksijensiz Ortam için bakım-onarım reaksiyonu ölçüm kısıtı olarak kullanılan bu reaksiyona %10 ve minimum glikoza % 10 esneklik payı verilen iFF708-genom *S.cerevisiae* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Deneyisel Veriler
R1	0,50	0,93	0,91	0,96	0,88 ± 0,13
R2	0,00	0,99	0,99	0,99	0,99 ± 0,18
R3	0,00	0,00	0,01	0,00	0,02 ± 0,07
R4	0,38	0,41	0,52	0,40	0,37 ± 0,62
R5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,08
R6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R7	1,00	0,98	0,99	0,98	0,99 ± 0,01
R8	0,00	0,08	0,11	0,05	0,19 ± 0,00

Tablo 4.16 Oksijenli Sürekli Ortamda yapılan tüm iFF708-genom *S.cerevisiae* modeli hesaplamalarının PF değerleri

Glikoz Esneklik	Bakım-onarım Esneklik	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu
Yok	Yok	0,256	0,178	0,020	0,236
10 %	Kullanılmadı	0,256	0,026	0,021	0,026
15 %	Kullanılmadı	0,256	0,026	0,021	0,026
10 %	10 %	0,256	0,028	0,023	0,028
15 %	10 %	0,256	0,028	0,024	0,028
10 %	15 %	0,256	0,027	0,022	0,027
15 %	15 %	0,256	0,027	0,023	0,027

Tablo 4.17 Oksijenli Kesikli Ortamda yapılan tüm iFF708-genom *S.cerevisiae* modeli hesaplamalarının PF değerleri

Biyokütle Esneklik	Bakım-onarım Esneklik	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu
Yok	Yok	0,810	0,055	0,002	0,002
10 %	Kullanılmadı	0,810	0,002	0,002	0,002
15 %	Kullanılmadı	0,810	0,002	0,002	0,002
10 %	10 %	0,810	0,002	0,002	0,002
15 %	10 %	0,810	0,002	0,002	0,002
10 %	15 %	0,810	0,002	0,002	0,002
15 %	15 %	0,810	0,002	0,002	0,002

Tablo 4.18 Oksijensiz Ortamda yapılan tüm iFF708-genom *S.cerevisiae* modeli hesaplamalarının PF değerleri

Biyokütle Esneklik	Bakım-onarım Esneklik	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu
Yok	Yok	0,035	0,016	0,008	0,020
10 %	Kullanılmadı	0,035	0,011	0,006	0,018
15 %	Kullanılmadı	0,035	0,010	0,007	0,018
10 %	10 %	0,035	0,012	0,007	0,020
15 %	10 %	0,035	0,012	0,008	0,020
10 %	15 %	0,035	0,012	0,007	0,020
15 %	15 %	0,035	0,011	0,008	0,027

5 TARTIŞMA VE YORUM

Bu tez çalışmasındaki genel amaç, Aşağıdan Yukarı Sistem Biyolojisi yaklaşımlarından olan Akı Dengesi Analizi ve Kontrol-etkili Akı Analizi matematiksel yöntemlerini kullanarak *Escherichia coli* ve *Saccharomyces cerevisiae* mikroorganizmalarının farklı ortamlardaki davranışlarının ardında yatan biyolojik amacın ne olduğunu anlayabilmek ve bu mikroorganizmalar için bütün ortamlarda geçerli olabilen amaç fonksiyonları önererek bir simülasyon çalışması yapmaktır. Bu amaç doğrultusunda, her iki mikroorganizma için de iki farklı boyutta (küçük boyut ve genom boyut) metabolik modeller kullanılarak elde edilen metabolik akı dağılımları, organizmalara ait farklı üç ortamdaki (kesikli oksijenli, sürekli oksijenli ve oksijensiz büyüme) deneysel akı dağılımları ile karşılaştırıldı.

Tezin amacı kapsamında Akı Dengesi Analizi hesaplaması olarak aşağıdaki opsiyonlardan doğan toplam 336 adet akı dağılımı hesaplaması yapılmıştır.

- 2 Mikroorganizma: *Escherichia coli* ve *Saccharomyces cerevisiae*
- 2 Farklı boyutta metabolik model: Küçük boyut ve genom boyut
- 3 Farklı ortam: Kesikli oksijenli, sürekli oksijenli ve oksijensiz büyüme
- 4 Farklı ikincil amaç fonksiyonu: 4 Enzim fonksiyonu
- 7 Esneklik opsiyonundan doğan hesaplama

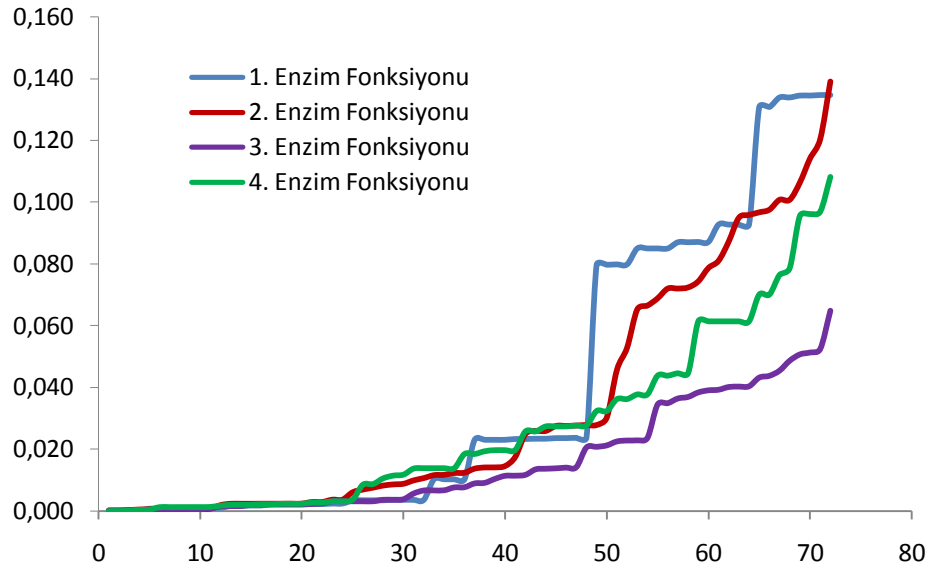
Kontrol-etkili Akı Analizi hesaplaması olarak ise aşağıdaki opsiyonlardan doğan toplam 12 adet akı dağılımı hesaplaması yapılmıştır.

- 2 Mikroorganizma: *Escherichia coli* ve *Saccharomyces cerevisiae*
- 3 Farklı ortam: Kesikli oksijenli, sürekli oksijenli ve oksijensiz büyüme
- 2 Esneklik hesaplaması: % 10 ve % 15 büyükötleyle verilen esneklik

Elde edilen toplam 348 farklı hesaplamanın gerçeği yansıtırma bakımından birbirlerine göre avantajlı veya dezavantajlı olduğu durumlar vardır. Bu bağlamda tüm hesaplamalar alt başlıklar altında değerlendirildi. Bu değerlendirmeler yapılırken daha önceden Bölüm 2.8’de anlatıldığı gibi PF değerleri baz alındı.

5.1 Kullanılan İkincil Amaç Fonksiyonlarının Sonuçlara Etkisi

Kullanılan ikincil amaç fonksiyonları dikkate alınarak hesaplamalara bakıldığında, *Escherichia coli* mikroorganizması için hemen hemen her durumda 3. Enzim fonksiyonu olan “Hücre içi akıların karelerinin toplamının minimizasyonu” fonksiyonunun gerçeği daha iyi yansıttığı görülmektedir. *Saccharomyces cerevisiae* mikroorganizmasında gerçeği yansıtması bakımından küçük model bazlı bütün fonksiyonlar oldukça iyi sonuçlar vermiştir. Genom boyutlu modelde ise aynen *Escherichia coli* mikroorganizmasında olduğu gibi 3. Enzim fonksiyonu diğerlerinden çok daha iyi gerçeği yansıtmıştır. Yani her iki mikroorganizma da enzim üretme açısından, hücre içi akıların karelerinin toplamının minimizasyonu fonksiyonuna daha yakın davranış sergilemiştir. Şekil 5.1’deki x-ekseni ilgili enzim fonksiyonu bazında yapılan tüm Akı Dengesi Analizi hesaplamalarını göstermektedir. Yani her enzim fonksiyonu için 84 tane olmak üzere toplam 336 adet hesaplama yapılmıştır.

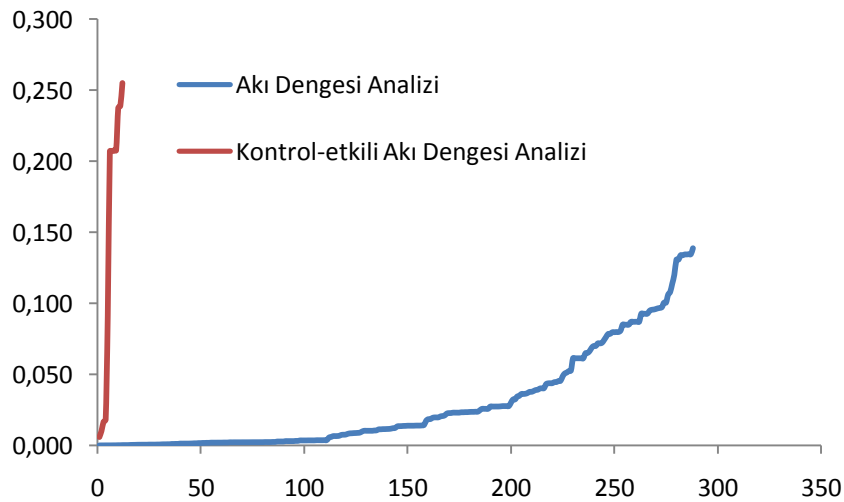


Şekil 5.1 Enzim fonksiyonları bazında tüm mikroorganizmalar ve modeller kullanılarak elde edilen PF değerlerinin şekilsel gösterimi

Şekil 5.1’de görüldüğü gibi enzim fonksiyonları ve onların PF değerlerine (y-ekseni) bakıldığında, fonksiyonlarından en büyük PF değerine sahip fonksiyonun 1. Enzim fonksiyonu en küçük PF değerine sahip fonksiyonun ise 3. Enzim fonksiyonu olduğu görülmektedir. Bir başka deyişle, 3. Enzim fonksiyonu en başarılı 1. Enzim fonksiyonu ise simülasyon çalışmasındaki en başarısız fonksiyondur. Şekil 5.1’deki grafik bütün enzim fonksiyonlarının PF değerleri küçükten büyüğe sıralanarak elde edilmiştir. En iyi enzim fonksiyonu olan 3. Enzim fonksiyonunun PF değerleri küçükten büyüğe sıralanması ve diğer enzim fonksiyonlarının aynı şarta denk gelen PF değerlerinin noktasal gösterimi EK 7’de verilmiştir.

5.2 Kullanılan Matematiksel Yöntemlerin Analiz Kabiliyeti

Bu çalışmada 336 adet Akı Dengesi Analizi hesaplaması 12 adet Kontrol-etkili Akı Analizi hesaplaması gerçekleştirildi. Yapılan toplam bu 348 hesaplama, kullanılan matematiksel yöntem dikkate alınarak değerlendirildiğinde gerçeği yansıtması bakımından Akı Dengesi Analizi hesaplamaları, Kontrol-etkili Akı analizi hesaplamalarına göre (özellikle oksijenli ortamlarda) Şekil 5.2’de görüldüğü gibi, daha başarılıdır.

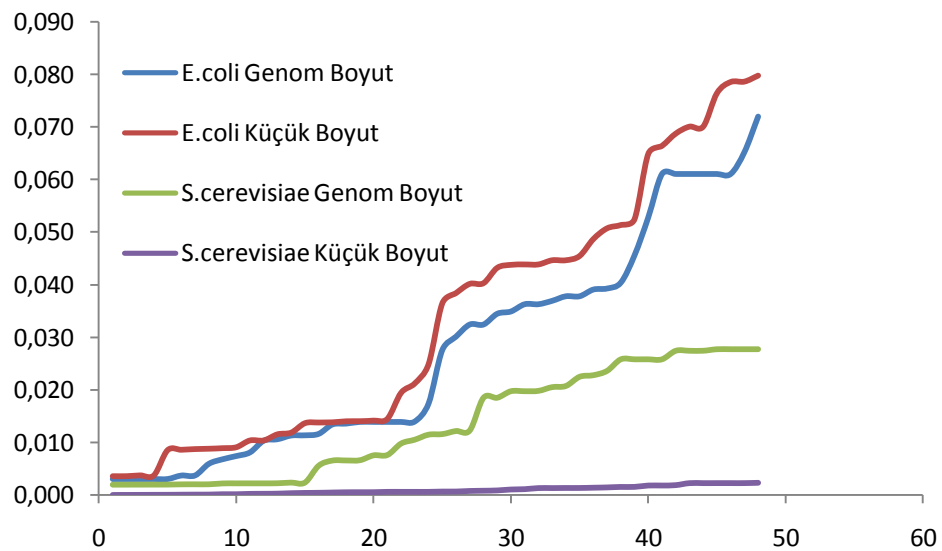


Şekil 5.2 Akı dengesi Analizi ve Kontrol-etkili Akı Analizi hesaplamalarından elde edilen PF değerlerinin şekilsel gösterimi

Kontrol-etkili Akı analizi hesaplamaları reaksiyonların hücre için teşkil ettiği önem baz alınarak yapılır. Bir başka deyişle, bu yöntem temelde hücrenin ilgili reaksiyonu kullanma ihtimalinin daha çok veya daha az olmasına göre yapılan bir hesaplama yöntemidir. Bir nevi olasılık hesabı da denilebilir. Bu açıdan sistemle ilgili hiçbir akı değerinin olmadığı durumda, bu yöntem sistemin davranışını tahmin etmek için oldukça yararlıdır. Fakat elimizde glikozun hücre içine alınan akı değeri, oksijenin hücre içine alınan akı değeri, hücre içinde gerçekleşen bakım onarım reaksiyonunun akı değeri gibi bilinen parametreler olduğu için Akı Dengesi Analizi hesaplamaları Kontrol-etkili Akı analizi hesaplamalarına göre daha gerçekçi sonuçlar vermiştir

5.3 Kullanılan Metabolik Modelin Sonuçlara Etkisi

İki mikroorganizma için de biri küçük boyutlu biri genom boyutlu olmak üzere iki model için hesaplamalar yapıldı. Hesaplamaların genom boyutlu metabolik model kullanılarak tekrarlanmasıyla, hücre metabolizmasını çok daha gerçekçi bir şekilde ele alan model (genom boyutlu model) kullanmanın deney sonuçlarını daha iyi tahmin etmedeki rolü incelenmiş oldu.



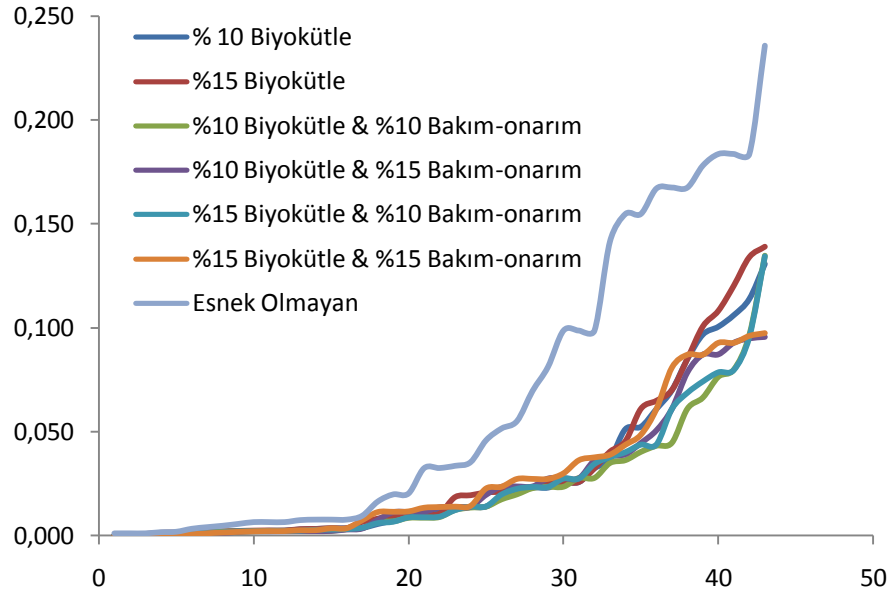
Şekil 5.3 Küçük ve genom boyutlu model kullanılarak iki mikroorganizma için yapılan tüm hesaplamalardan elde edilen PF değerlerinin şekilsel gösterimi

Elde edilen tüm sonuçlara hesaplamalarda kullanılan metabolik modellerin boyutlarına odaklanarak Şekil 5.3'teki PF değerlerine bakıldığında, *Escherichia coli* mikroorganizmasının genom boyutlu modelle elde edilen sonuçlarının küçük modelle elde edilen sonuçlardan çok daha fazla gerçeğe yakın olduğu görülmektedir. Bu da oldukça mantıklıdır. Çünkü hücrede gerçekleşen reaksiyonlar ne kadar çok sayıda bilinirse hücrenin davranışı o kadar daha iyi tahmin edilebilir. *Saccharomyces cerevisiae* mikroorganizmasının genom boyutlu modeli özellikle oksijenli ortamlarda beklenenin aksine küçük boyutlu modelden daha kötü sonuçlar vermektedir. Bunun en büyük sebebi, gloxylate'e giden akının gerçekte inaktif olmasına rağmen İFF708-genom modelle elde edilen sonuçta bu akının aktif olmasıdır. Bu modelin oksijensiz ortamdaki en büyük zaafı ise, gerçekte üretilenden daha az gliserol üretmesidir. Şekil 5.3'teki grafik bütün metabolik modellerin PF değerleri küçükten büyüğe sıralanarak elde edilmiştir. *E. coli* ve *S. cerevisiae* mikroorganizmalarının metabolik modellerinden elde edilen aynı şartlardaki PF değerlerinin noktasal gösterimi EK 7'de verilmiştir.

5.4 Kullanılan Esneklik ve Kısıt Hesaplamalarının Sonuçlara Etkisi

Şekil 5.4'te görüldüğü gibi tüm sonuçların PF değerlerine esneklikten ve kısıtlardan doğan hesaplamalar bazında bakıldığında, hemen hemen tüm sonuçlar için bakım-onarım reaksiyonu ölçüm kısıtı olarak kullanılan reaksiyona %10 ve maksimum biyokütleyle % 10 esneklik payı verilen hesaplamaların daha gerçekçi sonuç verdiği görülmektedir. Buna karşılık, hiç esnek olmayan sonuçların diğerlerinden oldukça kötü olduğu görülmektedir. Daha önceden de anlatıldığı gibi hücre esnek davranma eğilimindedir. Farklı esneklik payları verilerek yapılan bu çalışmayla hücrenin simülasyonu yapılırken esnek davranma eğiliminin de dikkate alınması gerektiği kanıtlanmıştır. Tüm esneklik kombinasyonlarından doğan sonuçlardan, “mikroorganizmalar (*Escherichia coli* ve *Saccharomyces cerevisiae*) temel amaçlarından ve tüm aktivitelerini gerçekleştirmek için gerekli enerjiyi (ATP) üreten bakım-onarım reaksiyonunun deneysel değerinden çok fazla sapma eğilimi göstermeyecek şekilde davranır” yorumu yapılabilir. Ayrıca Şekil 5.4'e bakıldığında bakım-onarım reaksiyonu kısıt olarak kullanılan hesaplamaların bakım-onarım

reaksiyonu kısıt olarak kullanılmayan hesaplamalara göre daha gerçekçi sonuç verdiği görülmektedir. Yani, bakım-onarım reaksiyonunun hesaplama yaparken kullanılması sonuçlara pozitif yönde bir etki etmiştir.



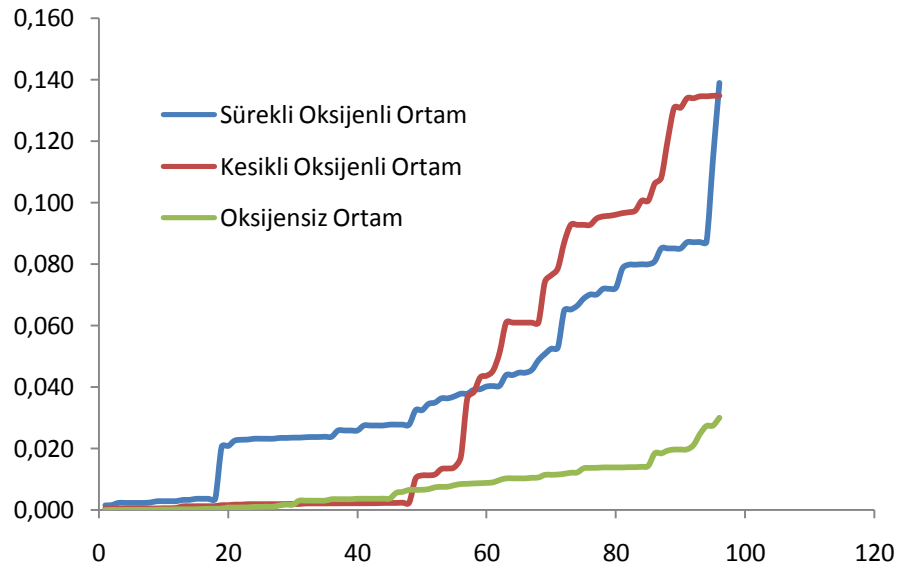
Şekil 5.4 Tüm modeller ve mikroorganizmalar için yapılan hesaplamalarda kullanılan esneklik ve kısıtlar sonucu elde edilen PF değerlerinin şekilsel gösterimi

Şekil 5.4'teki grafik bütün esneklik hesaplamalarının PF değerleri küçükten büyüğe sıralanarak elde edilmiştir. En iyi sonuca sahip olan %10 biyokütle ve bakım-onarım reaksiyonuna verilen esneklik hesaplamalarının küçükten büyüğe sıralanması ve diğer hesaplamaların aynı şartlara denk gelen PF değerlerinin noktasal gösterimi EK 7'de verilmiştir.

5.5 Yapılan Hesaplamaların Farklı Ortamlardaki Analiz Kabiliyeti

Şekil 5.5'te görüldüğü gibi hesaplamalardan elde edilen PF değerlerine yapılan ortam bazında bakıldığında, oksijensiz ortam hesaplama sonuçlarının açık ara diğer iki ortama (oksijenli sürekli, oksijenli kesikli) göre daha gerçekçi sonuçlar

verdiği görülmektedir. Bu da oldukça mantıklıdır. Çünkü örneğin 100 reaksiyona sahip bir metabolik model düşünülürse bu metabolik modelin oksijenli ortamda 80 reaksiyonu aktif oluyorken, oksijensiz ortamda ise bu sayı 30-40 reaksiyona kadar düşmektedir. Yani oksijensiz ortamda tahmin edilecek reaksiyon sayısı her zaman için oksijenli ortama göre daha azdır. Bir başka deyişle, oksijenli ortamda sistemi simüle etmek oksijensiz ortama göre oldukça komplikedir. Oksijenli ortamda yapılan simülasyonlar karşılaştırıldığında ise, genel olarak kesikli ortam simülasyonlarının daha düşük PF değerleri verdikleri, yani deneysel verilere daha yakın oldukları gözlemlenmiştir. Çünkü sürekli ortam deneyleri kontrollü ve daha güvenilir deneylerdir.

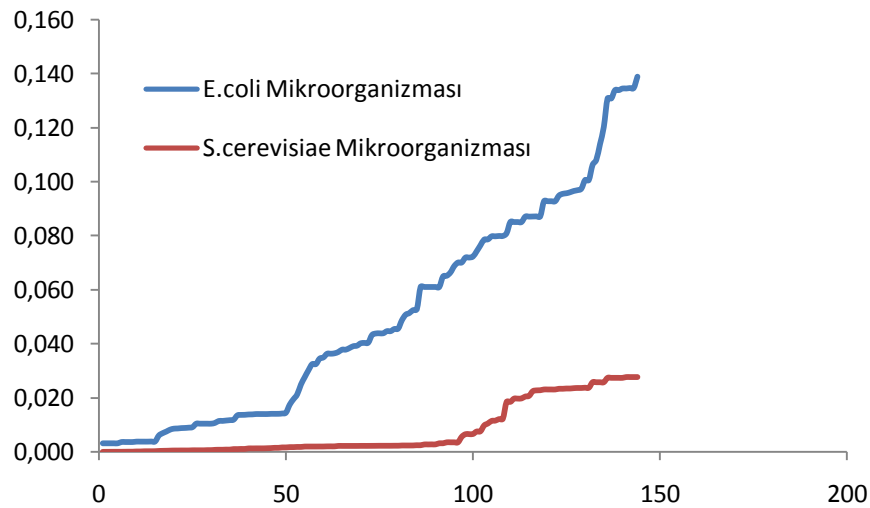


Şekil 5.5 Farklı ortamlar için yapılan tüm hesaplamalardan elde edilen PF değerlerinin şekilsel gösterimi

Şekil 5.5'teki grafik bütün ortam hesaplamalarının PF değerleri küçükten büyüğe sıralanarak elde edilmiştir. En iyi sonuca sahip olan oksijensiz ortam hesaplamalarının PF değerlerinin küçükten büyüğe sıralanması ve diğer hesaplamaların aynı şartlara denk gelen PF değerlerinin noktasal gösterimi EK 7'de verilmiştir.

5.6 Yapılan Hesaplamaların Mikroorganizma Açısından Analiz Kabiliyeti

Escherichia coli ve *Saccharomyces cerevisiae* mikroorganizmaları için yapılan tüm hesaplamalara bakıldığında, *Saccharomyces cerevisiae* mikroorganizması için yapılan similasyon çalışmalarının hemen hemen her hesaplama için *Escherichia coli* mikroorganizmasından daha gerçekçi sonuçlar verdiği görülmektedir. Ayrıca Şekil 5.6'ya bakıldığında *Saccharomyces cerevisiae* mikroorganizması için yaklaşık 100 hesaplamamanın PF değeri 0'a çok yakındır. Bir başka deyişle, *Saccharomyces cerevisiae* mikroorganizması için yapılan yaklaşık 50 simülasyon çalışması birebir mikroorganizmanın davranışını göstermektedir.



Şekil 5.6 Mikroorganizma bazında tüm hesaplamalardan elde edilen PF değerlerinin şekilsel gösterimi

Şekil 5.6'daki grafik her iki mikroorganizma için hesaplanan PF değerleri küçükten büyüğe sıralanarak elde edilmiştir. En iyi sonuca sahip olan *Saccharomyces cerevisiae* mikroorganizması hesaplamalarından elde edilen PF sonuçları küçükten büyüğe sıralanması ve *Escherichia coli* mikroorganizması için yapılan hesaplamaların aynı şartlara denk gelen PF değerlerinin noktasal gösterimi EK 7'de verilmiştir.

5.7 Literatürdeki Benzer Hesaplamalarla Karşılaştırma

Schuetz ve arkadaşları (2007) *Escherichia coli* mikroorganizması için oksijenli sürekli, oksijenli kesikli ve oksijensiz ortamlarda 11 farklı amaç fonksiyonu ve 8 farklı kısıt kullanarak hesaplamalar gerçekleştirmiştir. Bu hesaplamalar, tezde yapılan hesaplamalara paralel olarak oksijenli sürekli, oksijenli kesikli ve oksijensiz ortamlarda yapıldığı için birebir tez çalışmasında elde edilen sonuçlarla karşılaştırılabilir.

Oksijenli sürekli ortam için yaptıkları simülasyonlarda gerçeğe en yakın sonuç veren hesaplamaları akı başına düşen biyokütle'nin maksimizasyonu amaç fonksiyonunu seçip bakım-onarım reaksiyonunu kısıt kullanarak elde etmişlerdir. Oksijenli kesikli ortam için yaptıkları çalışmada gerçeğe en yakın sonuç veren hesaplamayı maksimum ATP üretimi amaç fonksiyonu seçip oksijenin hücre içerisine giriş akısını $14,75 \frac{mmol}{gDw.h}$ olarak sınırlandırarak bulmuşlardır. Oksijensiz ortam için en iyi buldukları sonuç ise, maksimum ATP üretimi amaç fonksiyonu seçip bütün 8 farklı kısıtı kullanarak elde ettikleri sonuçtur. Bu tez çalışmasında maksimum biyokütle ve bakım-onarım reaksiyonuna % 10 esneklik verilip 3. Enzim fonksiyonu ile elde edilen hesaplama sonuçları, Schuetz ve arkadaşlarının (2007) elde ettiği hesaplama sonuçlarının gerçeğe en yakın olanları sürekli oksijenli ortam için Tablo 5.1'de, kesikli oksijenli ortam için Tablo 5.2'de ve oksijensiz ortam için Tablo 5.3'te karşılaştırmalı olarak verilmiştir.

Tablo 5.1, 5.2 ve 5.3'teki değerlere (PF ve ayrılma oranlarına) bakıldığında, Bu tez çalışmasında sadece maksimum biyokütle ve bakım-onarım reaksiyonu kullanılarak yapılan simülasyon hesaplamalarından elde edilen sonuçların (özellikle genom model), Schuetz ve arkadaşlarının (2007) 11 farklı amaç fonksiyonu ve 8 farklı kısıt kullanarak elde ettiği simülasyon çalışmalarından daha iyi oldukları görülmektedir.

Tablo 5.1 Oksijenli Sürekli Ortam için en iyi elde edilen sonuçların karşılaştırması

Ayrılma Oranı	Schuetz ve arkadaşları (2007)	Tez Çalışmasındaki Küçük model	Tez Çalışmasındaki Genom model	Deneyisel Veriler
R1	0,75	0,89	0,89	0,69 $\pm$ 0,12
R2	0,00	0,00	0,00	0,23 $\pm$ 0,20
R3	0,00	0,00	0,00	0,00 $\pm$ 0,05
R4	0,80	0,81	0,85	0,84 $\pm$ 0,14
R5	0,72	0,81	0,85	0,91 $\pm$ 0,21
R6	0,58	0,62	0,70	0,64 $\pm$ 0,13
R7	0,00	0,00	0,00	0,46 $\pm$ 0,13
R8	0,00	0,00	0,00	0,35 $\pm$ 0,08
R9	0,17	0,19	0,08	0,00 $\pm$ 0,05
R10	0,02	0,00	0,00	0,00 $\pm$ 0,05
PF Değeri	0,038	0,040	0,035	

Tablo 5.2 Oksijenli Kesikli Ortam için en iyi elde edilen sonuçların karşılaştırması

Ayrılma Oranı	Schuetz ve arkadaşları (2007)	Tez Çalışmasındaki Küçük model	Tez Çalışmasındaki Genom model	Deneyisel Veriler
R1	0,69	0,52	0,49	0,70 $\pm$ 0,02
R2	0,61	0,64	0,00	0,13 $\pm$ 0,06
R3	0,00	0,00	0,00	0,00 $\pm$ 0,05
R4	0,79	0,69	0,80	0,78 $\pm$ 0,02
R5	0,82	0,73	0,80	0,81 $\pm$ 0,03
R6	0,26	0,47	0,30	0,24 $\pm$ 0,02
R7	0,00	0,00	0,00	0,00 $\pm$ 0,05
R8	0,00	0,00	0,00	0,00 $\pm$ 0,05
R9	0,55	0,22	0,37	0,58 $\pm$ 0,03
R10	0,00	0,00	0,00	0,00 $\pm$ 0,05
PF Değeri	0,013	0,043	0,013	

Tablo 5.3 Oksijensiz Ortam için en iyi elde edilen sonuçların karşılaştırması

Ayrılma Oranı	Schuetz ve arkadaşları (2007)	Tez Çalışmasındaki Küçük model	Tez Çalışmasındaki Genom model	Deneyisel Veriler
R1	0,77	0,65	0,83	0,90 ± 0,05
R2	0,00	1,00	0,67	0,86 ± 0,94
R3	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R4	0,96	0,91	0,96	0,94 ± 0,05
R5	0,96	0,95	0,92	0,96 ± 0,09
R6	0,02	0,02	0,01	0,02 ± 0,01
R7	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R8	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R9	0,35	0,45	0,25	0,34 ± 0,01
R10	0,60	0,48	0,70	0,61 ± 0,04
PF Değeri	0,003	0,009	0,003	

6 SONUÇLAR

Tez çalışması boyunca yapılan bütün hesaplamalar değerlendirilerek, elde edilen sonuçlar şunlardır:

- Akı Dengesi Analizi metodunun mikroorganizmaların davranışını tahmin etmede Kontrol-etkili Akı Analizi metoduna göre daha başarılı olduğu bulundu.
- Mikroorganizmanın temel amacına ek olarak ikincil amaç olarak önerilen dört farklı minimum enzim üretme fonksiyonundan hücrenin davranışını en iyi yansıtan fonksiyonun hücre içi akıların karelerinin toplamının minimizasyonu fonksiyonu olduğu bulundu. Minimum reaksiyon basamağı ise en kötü performans sergileyen fonksiyon olarak tespit edildi.
- *E.coli* mikroorganizması için genom boyutlu modelin küçük modele göre çok daha gerçekçi sonuç verdiği bulundu. *E.coli* mikroorganizmasında olduğu gibi genom boyutlu modelin küçük boyutlu modele göre daha iyi sonuç vermesi beklenirken, *S.cerevisiae* mikroorganizmasında bu beklenti gerçekleşmedi.
- Hesaplamalarda ölçüm kısıtı olarak bakım onarım reaksiyonunun kullanılmasının daha gerçekçi sonuç verdiği gözlemlendi. %10 biyokütle esnekliği %15 esnekliğe göre daha iyi sonuçlar verdiği için hücrenin temel amacı olan maksimum biyokütle üretme hedefinden çok fazla sapma yapmadığı tespit edildi.
- Biri prokaryot ve diğeri ökaryot olan *E.coli* ve *S.cerevisiae* mikroorganizmalarının bu büyük hücrel farklılığa rağmen metabolizmalarını aynı biyolojik amaç doğrultusunda şekillendirdiği görüldü.

Bunlara dayanarak, Akı Dengesi Analizi yönteminin mikroorganizmaların deneysel metabolik akılarını tespit etmede, uygun amaç fonksiyonları kullanıldığında, başarılı bir yöntem olduğu gösterildi.

7 ÖNERİLER

Çalışmada mikroorganizmanın temel amacının maksimum büyüme olduğu ve ikincil amaç olarak minimum enzim üretme eğiliminde olduğu varsayımında bulunarak, hesaplamalar gerçekleştirildi. Başka amaç fonksiyonları denenerek gerçeğe daha yakın sonuç veren biyolojik amaçların olup olmadığı araştırılabilir. Örneğin, mikroorganizmanın minimum enerji kullanarak maksimum büyüme isteği amaç fonksiyonu önerilebilir.

Gerçekleştirilen çalışmada bu iki mikroorganizmanın hesaplama yapılan ortamlarda önerilen temel amaç olan maksimum büyüme ve ikincil amaç olan minimum enzim üretme eğiliminde olduğu kanıtlanmıştır. Fakat önerilen bu iki amaç fonksiyonunun bütün mikroorganizmalar için ve her türlü ortam koşulunda uygun olup olmadığı konusunda bir genelleme yapmak mümkün değildir. Literatürden farklı ortamda yapılmış birçok deneysel veri elde edilip ve farklı mikroorganizmaların (örneğin, *B.subtilis*) metabolik modelleri kullanılarak farklı simülasyon çalışmaları yapılabilir.

S. cerevisiae mikroorganizması için kullanılan iFF708 genom boyutlu metabolik modeli, bu organizma için ilk oluşturulan genom boyutlu metabolik modeldi. Elde edilen bulguların kesinliğini teyit etmek açısından literatürde mevcut olan en yeni genom boyutlu metabolik modeller kullanılabilir.

KAYNAKLAR

1. Klipp, E., Herwig, R., Kowald, A., Wierling, C. Lehrach, H., (2005), *Systems Biology in Practice*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
2. Demain, A.L., (1980), "Microbial production of primary metabolites", *Naturwissenschaften*, 67, 582-587
3. Stephanopoulos, G., Aristidou A.A, Nielsen, J., (1998), *Metabolic Engineering-Principles and Methodologies*, Academic Press, San Diego.
4. Palsson, B.O., (2005), *Systems Biology: Properties of Reconstructed Networks*, Cambridge University Press, Cambridge.
5. Çakır, T., (2010), "Hücrenin Metabolik Davranışlarının Ardında Yatan Biyolojik Amacın 'Aşağıdan-Yukarı' Ve 'Yukarıdan-Aşağı' Sistem Biyolojisi Yaklaşımlarıyla Bütünleşik İncelenmesi: İnsan Ve Mikroorganizma Metabolizmalarına Uygulamaları", *Tübitak 110M464 Proje Gelişme Raporu*.
6. Kauffman, K.J, Prakash, P., Edwards, J.E., (2004), "Advances in flux balance analysis", *Current Opinion in Biotechnology*, 14, 491-496.
7. Varma, A., Palsson, B.O., (1993), "Metabolic Capabilities of *Escherichia coli* II. Optimal Growth Patterns", *Journal of Theoretical Biology*, 165, 503-522.
8. Burgard, A.P., Maranas, C.D., (2003), "Optimization-based framework for inferring and testing hypothesized metabolic objective functions", *Biotechnology & Bioengineering*, 82, 670-677.
9. Stelling, J., Klamt, S., Bettenbrock, K., Schuster, S., Gilles, E.D., (2002), "Metabolic network structure determines key aspects of functionality and regulation", *Nature*, 420, 190-193.
10. Schuster, S., Fell, D.A., Dandekar, T., (2000), "A general definition of metabolic pathways useful for systematic organization and analysis of complex metabolic networks", *Nature Biotechnology*, 18, 326-332.
11. Von Kamp, A., Schuster, S., (2006), "Metatool 5.0: fast and flexible elementary modes analysis", *Bioinformatics*, 22, 1930-1931.
12. Klamt, S., Stelling, J., Ginkel, M., Gilles, E.D., (2003), "Flux Analyzer: Exploring structure, pathways and flux distributions in metabolic networks on interactive flux maps", *Bioinformatics*, 19, 261-269.

13. Mahadevan, R., Schilling, C.H., (2003), "The effects of alternate optimal solutions in constraint-based genome-scale metabolic models", *Metabolic Engineering*, 5, 264-276.
14. Malendez-Hevia, E., Isidoro, A., (1985), "The game of the pentose phosphate cycle", *Journal of Theoretical Biology*, 117, 251-263.
15. Patil, K.R., Rocha, I., Förster, J., Nielsen, J., (2005), "Evolutionary programming as a platform for in silico metabolic engineering", *BMC Bioinformatics*, 6, 308.
16. Bonarius, H.P.J., Hatzimanikatis, V., Meesters, K.P.H., de Gooijer, C.D, Schmid, G., Tramper, J., (1996), "Metabolic Flux Analysis of Hybridoma cells in different culture media using mass balances", *Biotechnology & Bioengineering*, 50, 299-318.
17. Smallbone, K., Simeonidis, E., (2009), "Flux balance analysis: A geometric perspective", *Journal of Theoretical Biology*, 258, 311-315.
18. Varma, A., Palsson, B.O., (1994), "Stoichiometric flux balance models quantitatively predict growth and metabolic by-product secretion in wild-type *Escherichia coli* W3110", *Applied and environmental microbiology*, 60, 3724-3731.
19. Förster, J., Famili, I., Fu, P., Palsson, B.O., Nielsen, J., (2003), "Genome-scale reconstruction of the *Saccharomyces cerevisiae* metabolic network", *Genome Research*, 13, 244-253.
20. Schuetz, R., Kuepfer, L., Sauer, U., (2007), "Systematic evaluation of objective functions for predicting intracellular fluxes in *Escherichia coli*", *Molecular Systems Biology*, 3:119.
21. Alexeeva, S., de Kort, B., Sawers, G., Hellingwerf, J.K., de Mattos, M.J.T., (2000), "Effect of Limited Aeration and of the ArcAB System on Intermediary Pyruvate Catabolism in *Escherichia coli*", 182, 4934-4940
22. Fischer, E., and Sauer, U., (2003), "A Novel Metabolic Cycle Catalyzes Glucose Oxidation and Anaplerosis in Hungry *Escherichia coli*", *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 46446- 46451
23. Kayser, A., Weber, J., Hecht, V., Rinas, U., (2005), "Metabolic flux analysis of *Escherichia coli* in glucose-limited continuous culture. I. Growth-ratedependent metabolic efficiency at steady state", 151, 693-706

24. Perrenoud, A., and Sauer U., (2005), "Impact of Global Transcriptional Regulation by ArcA, ArcB, Cra, Crp, Cya, Fnr, and Mlc on Glucose Catabolism in *Escherichia coli*", *Journal of Bacteriology*, 187, 3171-3179.
25. Nanchen, A., Schicker, A., Sauer, U., (2006), "Nonlinear dependency of intracellular fluxes on growth rate in miniaturized continuous cultures of *Escherichia coli*", *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 1164–1172.
26. Feist, A.M., Henry, C.S., Reed, J.L., Krummenacker, M., Joyce, A.R., Karp, P.D., Broadbelt, L.J., Hatzimanikatis, V., Palsson, B.O., (2007), "A genome-scale metabolic reconstruction for *Escherichia coli* K-12 MG1655 that accounts for 1260 ORFs and thermodynamic information", *Molecular Systems Biology*, 3:121.
27. Jouhten, P., Rintala, E., Huuskonen, A., Tamminen, A., Toivari, M., Wiebe, M., Ruohonen, L., Penttillä, M., Maaheimo, H., (2008), "Oxygen dependence of metabolic fluxes and energy generation of *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK113-1A", *BMC Systems Biology*, 2:60.
28. Gombert, A.K., dos Santos, M.M., Christensen, B., Nielsen, J., (2001), "Network identification and flux quantification in the central metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* under different conditions of glucose repression", *Journal of Bacteriology*, 183, 1141-1451.
29. Blank, L.M., Kuepfer, L., Sauer, U., (2005), "Large-scale ¹³C-flux analysis reveals mechanistic principles of metabolic network robustness to null mutations in yeast", *Genome Biology*, 6:49
30. Heyland, J. and Fu, J., Blank, L.M., (2009), "Correlation between TCA cycle flux and glucose uptake rate during respiro-fermentative growth of *Saccharomyces cerevisiae*", *Microbiology*, 155, 3827–3837
31. Fendt, S.M., and Sauer, U., (2010), "Transcriptional regulation of respiration in yeast metabolizing differently repressive carbon substrates", *BMC Systems Biology*, 4:12
32. Famili, I., Förster, J., Nielsen, J., Palsson, B.O., (2003), "*Saccharomyces cerevisiae* phenotype can be predicted by using constraint-based analysis of a genome-scale reconstructed metabolic network", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 13134-13139.

33. Çakır, T., Önsan, Z.I., Kırdar, B., Ülgen, K.O., Nielsen, J., (2007), “Effect of carbon source perturbations on transcriptional regulation of metabolic fluxes in *Saccharomyces cerevisiae*”, *BMC Systems Biology*, 1:18.
34. Frick, O., and Wittmann, C., (2005), “Characterization of the metabolic shift between oxidative and fermentative growth in *Saccharomyces cerevisiae* by comparative ¹³C flux analysis”, *Microbial Cell Factories*, 4:30

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Fatih TARLAK
İletişim Bilgileri : tarlak__fatih@hotmail.com, ftarlak@gmail.com
Doğum Tarihi : 24.04.1987
Mesleği : Kimya Mühendisi
Öğrenim Durumu :Yüksek Lisans Mezunu

Derece	Alan	Üniversite	Yıl
Lisans	Kimya Mühendisliği	Gazi Üniversitesi Çorum Mühendislik Fakültesi	2005-2009
Yüksek Lisans	Kimya Mühendisliği	Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü	2010-2012
Doktora			

EK 1: MİNİMUM REAKSİYON BASAMAĞI FONKSİYONUNU

Bölüm 2.6.3'te ayrıntılı olarak anlatıldığı gibi mikroorgaznimanın minimum enzim üretmesi öngörüsünden yola çıkarak minimum reaksiyon basamağı fonksiyonu önerilmiştir. MATLAB dosyası formatındaki matematiksel ifadesi aşağıda verilmiştir.

```
function R=mixinteger(f,A_ineq,b_ineq,b_eq,stoich,lb,ub)
boyut=size(stoich); % stoich Akı Dengesi Analizi Aşamalarında anlatılan
stokiyometrik matrisi temsil eder.
metname=boyut(1);%stokiyometrik matriste metabolit (sıra) sayısını
göstermektedir.
rxnname=boyut(2);%stokiyometrik matriste reaksiyon(sıra) sayısını
göstermektedir.
a=zeros((metname),(rxnname));
A_eq=[stoich a]; % Eşitlik matrisinin düzenlenmiş hali
x=eye(rxn);
y=zeros(rxnname,rxnname);
for i=1:(rxnname); % Bu döngü sayesinde üst sınır vektörü matris formatına
y(i,i)=-1*(ub(i)); % dönüştürülür.
end;
z=zeros(rxnname,rxnname);
for i=1:(rxnname); % Bu döngü sayesinde alt sınır vektörü matris formatına
z(i,i)=-1*(lb(i)); % dönüştürülür.
end
B_ineq=[x y];
C_ineq=[x z];
t=zeros((rxnname),1);
u=zeros((rxnname),1);
b_ineq=[t; -u];
A_ineq=[B_ineq; -C_ineq]; %Eşitsizlik matrisinin düzenlenmiş hali
f_stoich=zeros((rxnname),1);
f_integer=ones((length(rxnname)),1);
f_internal=ones(...,1); % "... " alan hücre içi akıların kaç tane olduğunu gösterir.
f_external=zeros(...,1); % "... " alan hücre dışı akıların kaç tane olduğunu gösterir.
f_integer=[f_internal;f_external];
f=[f_stoich; f_integer] ; % toplam amaç fonksiyonunu gösterir.
noninteger='C'; % tam sayı olmayan değerleri temsil eder.
non=repmat(noninteger,1,(rxnname));
integer='B'; % sadece 0 ve 1 alabilen değerleri temsil eder.
int=repmat(integer,1,(rxnname));
ctype=[non int];
[r, fval, exitflag, output] = cplexmilp (f, A_ineq,b_ineq, A_eq, b_eq, [ ], [ ], [ ], lb,
ub, ctype);
R=r;
```

EK 2: HÜCRE İÇİ AKILARIN MUTLAK DEĞERLERİNİN TOPLAMININ MINİMİZASYONU FONKSİYONU

Bölüm 2.6.4'te ayrıntılı olarak anlatıldığı gibi mikroorgaznimanın minimum enzim üretmesi öngörüsünden yola çıkarak hücre içi akıların mutlak değerlerinin minimizasyonu fonksiyonu önerilmiştir. MATLAB dosyası formatındaki matematiksel ifadesi aşağıda verilmiştir.

```
function [r,fopt]=mutlak_liner(f,stoich,B,lb,ub)
boyut=size(stoich); % stoich Akı Dengesi Analizi Aşamalarında anlatılan
stokkiyometrik matrisi temsil eder.
metname=boyut(1); %stokiyometrik matriste metabolit (sıtır) sayısını
göstermektedir.
rxnname=boyut(2); %stokiyometrik matriste reaksiyon(sütun) sayısını
göstermektedir.
B=zeros((rxnname+metname),1); % Eşitlik vektörünün düzenlenmiş hali.
v1=stoich; %stokiyometrik matris kısıtları
q1=zeros(metname,rxnname); %Eşitlik 2.19'daki q vektörünü temsil eden matris.
z1=zeros(metname,rxnname); %Eşitlik 2.19'daki z vektörünü temsil eden matris.
v2=(-eye(rxnname,rxnname));
q2=eye(rxnname,rxnname);
z2=-eye(rxnname,rxnname);
w=[v1 q1 z1;v2 q2 z2]; % Eşitlik matrisinin düzenlenmiş son hali.
[r,fopt]=cplexlp(f,[],[],w,B,lb,ub);
```

EK 3: KÜÇÜK *E.COLI* MİKROORGANİZMASI METABOLİK MODELİ REAKSİYONLARI

Çalışmada hesaplamaları yapılan küçük *E.coli* mikroorganizmasına ait reaksiyonlar ve onları gerçekleştiren enzimlerin isimleri aşağıda verilmiştir.

Enzim İsmi	Reaksiyon
glk	GLC + ATP -> G6P
pgi	G6P <-> F6P
pfkA	F6P + ATP -> FDP
pfkB	F6P + ATP -> FDP
fbaA	FDP <-> DHAP + GA3P
fbaB	FDP <-> DHAP + GA3P
tpiA	DHAP <-> GA3P
gapA	GA3P <-> NADH + 13DPG
pgk	13DPG <-> 3PG + ATP
gpmA	3PG <-> 2PG
ytjCgpmB	3PG <-> 2PG
eno	2PG <-> PEP
pykF	PEP -> PYR + ATP
pykA	PEP -> PYR + ATP
aceEFlpd	PYR -> ACCOA + CO ₂ + NADH
maeB	MAL -> PYR + NADPH + CO ₂
sfcA	MAL -> PYR + NADH + CO ₂
pck	OAA + ATP -> PEP + CO ₂
fbp	FDP -> F6P
glpX	FDP -> F6P
pps	PYR + 2 ATP -> PEP
zwf	G6P <-> D6PGL + NADPH
pgl	D6PGL -> 6PGC
gnd	6PGC -> NADPH + CO ₂ + RL5P
rpiA	RL5P <-> R5P
rpiB	RL5P <-> R5P
rpe	RL5P <-> X5P
tktA	R5P + X5P <-> GA3P + S7P
tkkB	R5P + X5P <-> GA3P + S7P
tktA	X5P + E4P <-> F6P + GA3P
tkkB	X5P + E4P <-> F6P + GA3P
talA	GA3P + S7P <-> E4P + F6P
talB	GA3P + S7P <-> E4P + F6P
gltA	ACCOA + OAA -> CIT
prpC	ACCOA + OAA -> CIT
acnA	CIT <-> CAC
acnA	CAC <-> ICIT
acnB	CIT <-> CAC
acnB	CAC <-> ICIT
icd	ICIT <-> CO ₂ + NADPH + AKG

frdABCD	SUCC <-> FUM + FADH
fumA-B	FUM <-> MAL
aceA	ICIT <-> GLX + SUCC
aceB	GLX + ACCOA -> MAL
ppc	PEP + CO ₂ -> OAA
pntAB	NADH + H -> NADPH
udhA	NADPH -> NADH
atp	4 H -> ATP
nuo	NADH + Q -> QH ₂ + 4 H
ndh	NADH + Q -> QH ₂
cyoABCD	QH ₂ + 0.5 O ₂ -> Q + 4 H
cydAB	QH ₂ + 0.5 O ₂ -> Q + 2 H
narGHI	QH ₂ + NO ₃ -> Q + NO ₂ + 2 H
poxB	PYR + Q -> AC + QH ₂ + CO ₂
sdhABCD	SUCC + Q <-> FUM + QH ₂
sdhABCD	FADH + Q <-> QH ₂
pflB	PYR <-> ACCOA + FOR
tdcE	PYR <-> ACCOA + FOR
fdhF	FOR -> CO ₂ + NADH
fdoGHI	FOR -> CO ₂ + NADH
fdnGHI	FOR -> CO ₂ + NADH
adhE	ACCOA + NADH <-> ACAL
mhpF	ACCOA + NADH <-> ACAL
adhE1	ACAL + NADH <-> ETH
mhpF	ACCOA + NADH <-> ACAL
adhE1	ACAL + NADH <-> ETH
adhP	ACAL + NADH <-> ETH
adhC	ACAL + NADH <-> ETH
pta	ACCOA -> ACTP
ackA	ACTP <-> ATP + AC
ackB	ACTP <-> ATP + AC
tdcD	ACTP <-> ATP + AC
purT	ACTP <-> ATP + AC
acs	AC + 2 ATP -> ACCOA
dld	LAC -> FADH + PYR
ldhA	LAC <-> PYR + NADH
edd	6PGC -> 2KD6PG
eda	2KD6PG -> GA3P + PYR
mgsA	DHAP -> LAC
ptsGHI	GLCXT + PEP -> G6P + PYR
extco2	CO ₂ -> EXT
exto2	EXT -> O ₂
extno3	EXT -> NO ₃
extglca	EXT -> GLCXT
Biyokütle	0.33 G6P + 0.07 F6P + 0.96 R5P + 0.36 E4P + 0.12 GA3P + 0.86 3PG + 0.77 PEP + 2.94 PYR + 2.41 ACCOA + 1.65 OAA + 1.28 AKG + 15.7 NADPH + 40.2 ATP -> BM + 3 NADH

EK 4: KÜÇÜK *S.CEREVISIAE* MİKROORGANİZMASI METABOLİK MODELİ REAKSİYONLARI

Çalışmada hesaplamaları yapılan küçük *S.cerevisiae* mikroorganizmasına ait reaksiyonlar ve onları gerçekleştiren enzimlerin isimleri aşağıda verilmiştir.

Enzim İsmi	Reaksiyon
GLK1	GLC + ATP -> G6P + ADP
PGL1	G6P <-> F6P
PFK1,2	F6P + ATP -> F2P + ADP
FBP1	F2P -> F6P
FBA1	F2P <-> GA3P + DHAP
TPL1	DHAP <-> GA3P
TDH1,2,3	GA3P + NADCYT <-> P13G + NADHCYT
PGK1	P13G + ADP <-> P3G + ATP
GPM1,2,3	P3G <-> P2G
ENO1,2	P2G <-> PEP
PYK1,2	PEP + ADP -> PYR + ATP
GPD1,2	DHAP + NADHCYT -> GOH3P + NADCYT
GPP	GOH3P -> GOH
PDC1,2,5	PYR -> ACAL + CO2
ADH1,4	ACAL + NADHCYT -> ETOH + NADCYT
ALD6	ACAL + NADPCYT -> AC + NADPHCYT
ALD4	ACAL + NADMİT -> AC + NADHMİT
ACS1,2	AC + 2 ATP -> ACCOACYT + 2 ADP
PDA,B	PYR + NADMİT -> ACCOAMİT + NADHMİT + CO2
PYC1,2	PYR + ATP + CO2 -> OAC + ADP
PCK1	OAC + ATP -> PEP + ADP + CO2
ZWF1	G6P + NADPCYT -> G15L + NADPHCYT
SOL1,2,3	G15L -> P6G
GND1,2	P6G + NADPCYT -> RIBL5P + NADPHCYT + CO2
RKL1	RIBL5P <-> RIB5P
RPE1	RIBL5P <-> XYL5P
TKL	RIB5P + XYL5P <-> SED7P + GA3P
TAL1	SED7P + GA3P <-> F6P + E4P
TK1	XYL5P + E4P <-> F6P + GA3P
CIT1,3	OAC + ACCOAMİT -> CIT
ACO1	CIT <-> ISOCIT
IDH1,2	ISOCIT + NADMİT -> AKG + NADHMİT + CO2
IDP1	ISOCIT + NADPMİT -> AKG + NADPHMİT + CO2
IDP2	ISOCIT + NADPCYT -> AKG + NADPHCYT + CO2
KDG1,2	AKG + NADMİT -> SUCCOA + NADHMİT + CO2
LSC1,2	SUCCOA + ADP <-> SUC + ATP
SDH1,2,3	SUC + FAD -> FUM + FADH2
OSM1	FUM + FADH2 -> SUC + FAD

MDH1	MAL + NADMİT <-> OAC + NADHMİT
MAE1	MAL + NADPMİT -> PYR + CO2 + NADPHMİT
CAT2	ACCOACYT -> ACCOAMİT
CIT2	OAC + ACCOACYT -> CIT
ICL1	ISOCIT -> GLYO + SUC
MLS1	GLYO + ACCOACYT -> MAL
MDH2	MAL + NADCYT <-> OAC + NADHCYT
NADHX	24 ADP + 20 NADHMİT + 10 O2 -> 24 ATP + 20 NADMİT
FADHX	24 ADP + 20 FADH2 + 10 O2 -> 24 ATP + 20 FAD
MAINT	ATP -> ADP
ETOHEX	ETOH -> EXT
GOHEX	GOH -> EXT
ACEX	AC -> EXT
BMEX	BM -> EXT
GLCEX	EXT -> GLC
O2EX	EXT -> O2
CO2EX	CO2 -> EXT
SUCEX	SUC -> EXT
ETOHEX	ETOH -> EXT
GOHEX	GOH -> EXT
CCM	RIB5P + P3G + 8 ATP + NADMİT + NADCYT + 2 NADPHCYT -> NADHMİT + NADHCYT + 2 NADPCYT + 8 ADP + AICAR
Biyokütle	2.226 PYR + 1.247 OAC + 1.299 AKG + 0.669 P3G + 1.630 ACCOACYT + 0.377 ACCOAMİT + 0.304 RIB5P + 0.337 E4P + 0.673 PEP + 1.667 G6P + 0.071 GOH3P + 0.076 AICAR + 10.855 NADPHCYT + 1.167 NADPHMİT + 1.915 NADCYT + 0.650 NADMİT + 68.296 ATP -> 1.915 NADHCYT + 0.650 NADHMİT + 10.855 NADPCYT + 1.167 NADPMİT + 68.296 ADP + 2.199 CO2 + BM

EK 5: *E.COLİ* MİKROORGANİZMASI İÇİN YAPILAN TÜM AKI DENGESİ ANALİZİ HESAPLAMALARI

Bölüm 3'te ayrıntılı olarak anlatılan Akı Dengesi Analizi hesaplamaları tablolar halinde aşağıda görülmektedir. Toplam 42 adet Tablo bulunmaktadır. Tablo E5-1 ve E5-21 arasındakiler, *Escherichia coli* mikroorganizması için 49 metabolitten ve 100 reaksiyondan oluşan metabolik model (küçük boyutlu model) kullanılarak yapılan hesaplamaları göstermektedir. Tablo E5-22 ve E5-42 arasındakiler ise *Escherichia coli* mikroorganizması için 1668 metabolitten ve 2382 reaksiyondan oluşan metabolik model (genom boyutlu model) kullanılarak yapılan hesaplamaları göstermektedir.

Tablo E5-1 Oksijenli Sürekli Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılmayan sadece minimum glikoza % 10 esneklik payı verilen küçük *E.coli* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Deneyisel Veriler
R1	0,00	0,00	0,45	0,09	0,69 ± 0,12
R2	0,24	0,48	0,66	0,00	0,23 ± 0,20
R3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R4	0,42	0,55	0,66	0,64	0,84 ± 0,14
R5	0,56	0,68	0,71	0,56	0,91 ± 0,21
R6	0,35	0,21	0,47	0,35	0,64 ± 0,13
R7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,46 ± 0,13
R8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,35 ± 0,08
R9	0,00	0,40	0,19	0,00	0,00 ± 0,05
R10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05

Tablo E5-2 Oksijenli Sürekli Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılmayan sadece minimum glikoza % 15 esneklik payı verilen küçük *E.coli* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Deneysel Veriler
R1	0,00	0,00	0,43	0,09	0,69 ± 0,12
R2	0,24	0,65	0,72	0,00	0,23 ± 0,20
R3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R4	0,42	0,48	0,67	0,64	0,84 ± 0,14
R5	0,56	0,71	0,73	0,56	0,91 ± 0,21
R6	0,35	0,17	0,41	0,35	0,64 ± 0,13
R7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,46 ± 0,13
R8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,35 ± 0,08
R9	0,00	0,50	0,29	0,00	0,00 ± 0,05
R10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05

Tablo E5-3 Oksijenli Sürekli Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılan hem reaksiyona hem de minimum glikoza % 10 esneklik payı verilen küçük *E.coli* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Deneysel Veriler
R1	0,00	0,16	0,91	0,25	0,69 ± 0,12
R2	0,06	0,88	0,00	0,72	0,23 ± 0,20
R3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R4	0,57	0,93	0,81	0,93	0,84 ± 0,14
R5	0,56	0,84	0,82	0,82	0,91 ± 0,21
R6	0,35	0,48	0,63	0,61	0,64 ± 0,13
R7	0,00	0,19	0,00	0,17	0,46 ± 0,13
R8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,35 ± 0,08
R9	0,00	0,18	0,18	0,00	0,00 ± 0,05
R10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05

Tablo E5-4 Oksijenli Sürekli Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılan reaksiyona % 10 ve minimum glikoza % 15 esneklik payı verilen küçük *E.coli* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Deneysel Veriler
R1	0,00	0,13	0,88	0,25	0,69 ± 0,12
R2	0,06	0,89	0,00	0,72	0,23 ± 0,20
R3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R4	0,76	0,93	0,82	0,93	0,84 ± 0,14
R5	0,28	0,85	0,83	0,82	0,91 ± 0,21
R6	0,35	0,41	0,52	0,61	0,64 ± 0,13
R7	0,00	0,21	0,00	0,17	0,46 ± 0,13
R8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,35 ± 0,08
R9	0,00	0,28	0,31	0,00	0,00 ± 0,05
R10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05

Tablo E5-5 Oksijenli Sürekli Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılan reaksiyona %15 ve minimum glikoza % 10 esneklik payı verilen küçük *E.coli* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Deneysel Veriler
R1	0,00	0,13	0,89	0,24	0,69 ± 0,12
R2	0,06	0,89	0,00	0,68	0,23 ± 0,20
R3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R4	0,58	0,93	0,81	0,93	0,84 ± 0,14
R5	0,56	0,84	0,81	0,82	0,91 ± 0,21
R6	0,35	0,48	0,62	0,60	0,64 ± 0,13
R7	0,00	0,19	0,00	0,18	0,46 ± 0,13
R8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,35 ± 0,08
R9	0,00	0,18	0,19	0,00	0,00 ± 0,05
R10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05

Tablo E5-6 Oksijenli Sürekli Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılan hem bu reaksiyona hem de minimum glikoza % 15 esneklik payı verilen küçük *E.coli* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Deneysel Veriler
R1	0,00	0,10	0,86	0,24	0,69 ± 0,12
R2	0,06	0,89	0,15	0,68	0,23 ± 0,20
R3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R4	0,75	0,93	0,82	0,93	0,84 ± 0,14
R5	0,28	0,85	0,82	0,82	0,91 ± 0,21
R6	0,35	0,40	0,50	0,60	0,64 ± 0,13
R7	0,00	0,22	0,00	0,18	0,46 ± 0,13
R8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,35 ± 0,08
R9	0,00	0,28	0,31	0,00	0,00 ± 0,05
R10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05

Tablo E5-7 Oksijenli Sürekli Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılan hem bu reaksiyona hem de minimum glikoza esneklik payı verilmeden küçük *E.coli* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Deneysel Veriler
R1	0,63	1,00	0,63	0,79	0,69 ± 0,12
R2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,23 ± 0,20
R3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R4	0,78	1,00	0,78	0,82	0,84 ± 0,14
R5	0,78	1,00	0,79	0,82	0,91 ± 0,21
R6	0,77	1,00	0,78	0,82	0,64 ± 0,13
R7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,46 ± 0,13
R8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,35 ± 0,08
R9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05

Tablo E5-8 Oksijenli Kesikli Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılmayan sadece maksimum biyokütleyle % 10 esneklik payı verilen küçük *E.coli* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Deneysel Veriler
R1	0,00	0,00	0,44	0,00	0,70 ± 0,02
R2	0,00	0,52	0,67	0,50	0,13 ± 0,06
R3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R4	0,68	0,53	0,66	0,57	0,78 ± 0,02
R5	0,47	0,68	0,72	0,69	0,81 ± 0,03
R6	0,35	0,20	0,46	0,20	0,24 ± 0,02
R7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R9	0,00	0,42	0,22	0,43	0,58 ± 0,03
R10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05

Tablo E5-9 Oksijenli Kesikli Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılmayan sadece maksimum biyokütleyle % 15 esneklik payı verilen küçük *E.coli* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Deneysel Veriler
R1	0,00	0,00	0,42	0,00	0,70 ± 0,02
R2	0,00	0,52	0,75	0,72	0,13 ± 0,06
R3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R4	0,70	0,53	0,67	0,54	0,78 ± 0,02
R5	0,42	0,68	0,74	0,73	0,81 ± 0,03
R6	0,35	0,20	0,37	0,16	0,24 ± 0,02
R7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R9	0,00	0,42	0,32	0,55	0,58 ± 0,03
R10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05

Tablo E5-10 Oksijenli Kesikli Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılan hem bu reaksiyona hem de maksimum biyokütleyle % 10 esneklik payı verilen küçük *E.coli* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Deneyisel Veriler
R1	0,00	0,00	0,52	0,05	0,70 ± 0,02
R2	0,00	0,58	0,64	0,35	0,13 ± 0,06
R3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R4	0,71	0,59	0,69	0,64	0,78 ± 0,02
R5	0,41	0,74	0,73	0,69	0,81 ± 0,03
R6	0,35	0,15	0,47	0,19	0,24 ± 0,02
R7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R9	0,00	0,55	0,22	0,45	0,58 ± 0,03
R10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05

Tablo E5-11 Oksijenli Kesikli Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılan reaksiyona % 10 ve maksimum biyokütleyle % 15 esneklik payı verilen küçük *E.coli* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Deneyisel Veriler
R1	0,00	0,00	0,52	0,04	0,70 ± 0,02
R2	0,00	0,50	0,64	0,36	0,13 ± 0,06
R3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R4	0,71	0,59	0,69	0,64	0,78 ± 0,02
R5	0,41	0,71	0,73	0,69	0,81 ± 0,03
R6	0,35	0,26	0,48	0,19	0,24 ± 0,02
R7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R9	0,00	0,39	0,22	0,45	0,58 ± 0,03
R10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05

Tablo E5-12 Oksijenli Kesikli Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılan reaksiyona %15 ve maksimum biyokütleyle % 10 esneklik payı verilen küçük *E.coli* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Deneyisel Veriler
R1	0,24	0,00	0,49	0,00	0,70 ± 0,02
R2	0,00	0,48	0,73	0,58	0,13 ± 0,06
R3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R4	0,73	0,60	0,70	0,60	0,78 ± 0,02
R5	0,37	0,70	0,76	0,74	0,81 ± 0,03
R6	0,35	0,25	0,41	0,15	0,24 ± 0,02
R7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R9	0,00	0,40	0,33	0,56	0,58 ± 0,03
R10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05

Tablo E5-13 Oksijenli Kesikli Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılan hem bu reaksiyona hem de maksimum biyokütleyle % 15 esneklik payı verilen küçük *E.coli* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Deneyisel Veriler
R1	0,24	0,00	0,49	0,00	0,70 ± 0,02
R2	0,00	0,59	0,73	0,58	0,13 ± 0,06
R3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R4	0,73	0,58	0,70	0,60	0,78 ± 0,02
R5	0,37	0,74	0,76	0,74	0,81 ± 0,03
R6	0,35	0,15	0,36	0,15	0,24 ± 0,02
R7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R9	0,00	0,55	0,33	0,56	0,58 ± 0,03
R10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05

Tablo E5-14 Oksijenli Kesikli Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılan hem bu reaksiyona hem de maksimum biyokütleyle esneklik payı verilmeden küçük *E.coli* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Deneyisel Veriler
R1	0,13	0,13	0,51	0,13	0,70 ± 0,02
R2	0,00	0,00	1,00	0,00	0,13 ± 0,06
R3	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00 ± 0,05
R4	0,72	0,72	1,00	0,72	0,78 ± 0,02
R5	0,63	0,63	0,56	0,63	0,81 ± 0,03
R6	0,39	0,39	0,00	0,39	0,24 ± 0,02
R7	0,17	0,17	0,00	0,17	0,00 ± 0,05
R8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R9	0,00	0,00	0,65	0,00	0,58 ± 0,03
R10	0,00	0,00	0,35	0,00	0,00 ± 0,05

Tablo E5-15 Oksijensiz Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılmayan sadece maksimum biyokütleyle % 10 esneklik payı verilen küçük *E.coli* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Deneyisel Veriler
R1	0,66	0,46	0,51	0,48	0,90 ± 0,05
R2	0,00	0,86	1,00	0,90	0,86 ± 0,94
R3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R4	0,90	0,88	0,86	0,87	0,94 ± 0,05
R5	0,92	0,92	0,92	0,92	0,96 ± 0,09
R6	0,04	0,04	0,04	0,04	0,02 ± 0,01
R7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R9	0,22	0,40	0,43	0,41	0,34 ± 0,01
R10	0,66	0,49	0,47	0,48	0,61 ± 0,04

Tablo E5-16 Oksijensiz Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılmayan sadece maksimum biyokütle % 15 esneklik payı verilen küçük *E.coli* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Deneyisel Veriler
R1	0,66	0,40	0,38	0,40	0,90 ± 0,05
R2	0,00	1,00	1,00	1,00	0,86 ± 0,94
R3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R4	0,90	0,88	0,82	0,88	0,94 ± 0,05
R5	0,92	0,93	0,93	0,83	0,96 ± 0,09
R6	0,04	0,04	0,03	0,04	0,02 ± 0,01
R7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R9	0,22	0,43	0,43	0,43	0,34 ± 0,01
R10	0,66	0,47	0,47	0,47	0,61 ± 0,04

Tablo E5-17 Oksijensiz Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılan hem bu reaksiyona hem de maksimum biyokütle % 10 esneklik payı verilen küçük *E.coli* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Deneyisel Veriler
R1	0,76	0,62	0,65	0,63	0,90 ± 0,05
R2	0,00	0,86	1,00	0,90	0,86 ± 0,94
R3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R4	0,94	0,92	0,91	0,92	0,94 ± 0,05
R5	0,95	0,95	0,95	0,95	0,96 ± 0,09
R6	0,03	0,02	0,02	0,02	0,02 ± 0,01
R7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R9	0,32	0,44	0,45	0,44	0,34 ± 0,01
R10	0,60	0,49	0,48	0,49	0,61 ± 0,04

Tablo E5-18 Oksijensiz Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılan reaksiyona % 10 ve maksimum biyokütleyle % 15 esneklik payı verilen küçük *E.coli* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Deneyisel Veriler
R1	0,76	0,58	0,53	0,58	0,90 ± 0,05
R2	0,00	1,00	1,00	1,00	0,86 ± 0,94
R3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R4	0,94	0,93	0,92	0,93	0,94 ± 0,05
R5	0,95	0,95	0,95	0,89	0,96 ± 0,09
R6	0,03	0,02	0,02	0,02	0,02 ± 0,01
R7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R9	0,32	0,46	0,46	0,45	0,34 ± 0,01
R10	0,60	0,48	0,48	0,48	0,61 ± 0,04

Tablo E5-19 Oksijensiz Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılan reaksiyona %15 ve maksimum biyokütleyle % 10 esneklik payı verilen küçük *E.coli* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Deneyisel Veriler
R1	0,76	0,61	0,64	0,62	0,90 ± 0,05
R2	0,00	0,86	1,00	0,90	0,86 ± 0,94
R3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R4	0,93	0,92	0,91	0,92	0,94 ± 0,05
R5	0,94	0,95	0,95	0,95	0,96 ± 0,09
R6	0,03	0,02	0,02	0,02	0,02 ± 0,01
R7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R9	0,32	0,44	0,45	0,44	0,34 ± 0,01
R10	0,61	0,49	0,48	0,49	0,61 ± 0,04

Tablo E5-20 Oksijensiz Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılan hem bu reaksiyona hem de maksimum biyokütleyle % 15 esneklik payı verilen küçük *E.coli* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Deneyisel Veriler
R1	0,76	0,57	0,52	0,57	0,90 ± 0,05
R2	0,00	1,00	1,00	1,00	0,86 ± 0,94
R3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R4	0,93	0,93	0,91	0,93	0,94 ± 0,05
R5	0,94	0,95	0,95	0,88	0,96 ± 0,09
R6	0,03	0,02	0,02	0,02	0,02 ± 0,01
R7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R9	0,32	0,46	0,46	0,45	0,34 ± 0,01
R10	0,61	0,48	0,48	0,48	0,61 ± 0,04

Tablo E5-21 Oksijensiz Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılan hem bu reaksiyona hem de maksimum biyokütleyle esneklik payı verilmeden küçük *E.coli* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Deneyisel Veriler
R1	0,99	0,99	0,45	0,99	0,90 ± 0,05
R2	0,00	0,00	1,00	0,00	0,86 ± 0,94
R3	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00 ± 0,05
R4	0,88	0,88	0,85	0,88	0,94 ± 0,05
R5	0,94	0,94	0,81	0,94	0,96 ± 0,09
R6	0,03	0,03	0,00	0,03	0,02 ± 0,01
R7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R9	0,45	0,45	0,50	0,45	0,34 ± 0,01
R10	0,48	0,48	0,50	0,48	0,61 ± 0,04

Tablo E5-22 Oksijenli Sürekli Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılmayan sadece minimum glikoza % 10 esneklik payı verilen iAF1260-genom *E.coli* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Deneysel Veriler
R1	1,00	0,29	0,95	0,58	0,69 ± 0,12
R2	0,00	0,52	0,00	0,00	0,23 ± 0,20
R3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R4	0,86	0,80	0,86	0,77	0,84 ± 0,14
R5	0,87	0,86	0,86	0,77	0,91 ± 0,21
R6	0,82	0,68	0,72	0,62	0,64 ± 0,13
R7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,46 ± 0,13
R8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,35 ± 0,08
R9	0,00	0,10	0,08	0,00	0,00 ± 0,05
R10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05

Tablo E5-23 Oksijenli Sürekli Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılmayan sadece minimum glikoza % 15 esneklik payı verilen iAF1260-genom *E.coli* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Deneysel Veriler
R1	1,00	0,31	0,92	0,58	0,69 ± 0,12
R2	0,00	0,60	0,00	0,00	0,23 ± 0,20
R3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R4	0,86	0,81	0,86	0,77	0,84 ± 0,14
R5	0,87	0,87	0,87	0,77	0,91 ± 0,21
R6	0,82	0,58	0,63	0,62	0,64 ± 0,13
R7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,46 ± 0,13
R8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,35 ± 0,08
R9	0,00	0,21	0,19	0,00	0,00 ± 0,05
R10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05

Tablo E5-24 Oksijenli Sürekli Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılan hem reaksiyona hem de minimum glikoza % 10 esneklik payı verilen iAF1260-genom *E.coli* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Deneysel Veriler
R1	0,97	0,00	0,89	0,47	0,69 ± 0,12
R2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,23 ± 0,20
R3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R4	0,85	0,96	0,85	0,75	0,84 ± 0,14
R5	0,86	0,84	0,85	0,73	0,91 ± 0,21
R6	0,79	0,37	0,70	0,54	0,64 ± 0,13
R7	0,00	0,48	0,00	0,00	0,46 ± 0,13
R8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,35 ± 0,08
R9	0,00	0,22	0,08	0,00	0,00 ± 0,05
R10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05

Tablo E5-25 Oksijenli Sürekli Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılan reaksiyona % 10 ve minimum glikoza % 15 esneklik payı verilen iAF1260-genom *E.coli* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Deneysel Veriler
R1	0,97	0,02	0,86	0,47	0,69 ± 0,12
R2	0,00	0,92	0,00	0,00	0,23 ± 0,20
R3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R4	0,85	0,93	0,85	0,75	0,84 ± 0,14
R5	0,86	0,87	0,86	0,73	0,91 ± 0,21
R6	0,79	0,53	0,60	0,54	0,64 ± 0,13
R7	0,00	0,22	0,00	0,00	0,46 ± 0,13
R8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,35 ± 0,08
R9	0,00	0,00	0,19	0,00	0,00 ± 0,05
R10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05

Tablo E5-26 Oksijenli Sürekli Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılan reaksiyona %15 ve minimum glikoza % 10 esneklik payı verilen iAF1260-genom *E.coli* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Deneysel Veriler
R1	0,02	0,02	0,88	0,44	0,69 ± 0,12
R2	0,92	0,92	0,00	0,00	0,23 ± 0,20
R3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R4	0,93	0,93	0,84	0,74	0,84 ± 0,14
R5	0,87	0,87	0,85	0,72	0,91 ± 0,21
R6	0,53	0,53	0,69	0,52	0,64 ± 0,13
R7	0,23	0,23	0,00	0,00	0,46 ± 0,13
R8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,35 ± 0,08
R9	0,00	0,00	0,09	0,00	0,00 ± 0,05
R10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05

Tablo E5-27 Oksijenli Sürekli Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılan hem bu reaksiyona hem de minimum glikoza % 15 esneklik payı verilen iAF1260-genom *E.coli* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Deneysel Veriler
R1	0,31	0,02	0,85	0,44	0,69 ± 0,12
R2	0,60	0,92	0,00	0,00	0,23 ± 0,20
R3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R4	0,81	0,93	0,85	0,74	0,84 ± 0,14
R5	0,87	0,87	0,86	0,72	0,91 ± 0,21
R6	0,58	0,53	0,60	0,52	0,64 ± 0,13
R7	0,00	0,23	0,00	0,00	0,46 ± 0,13
R8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,35 ± 0,08
R9	0,21	0,00	0,19	0,00	0,00 ± 0,05
R10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05

Tablo E5-28 Oksijenli Sürekli Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılan hem bu reaksiyona hem de minimum glikoza esneklik payı verilmeden iAF1260-genom *E.coli* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Deneysel Veriler
R1	1,00	1,00	0,92	0,92	0,69 ± 0,12
R2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,23 ± 0,20
R3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R4	0,86	1,00	0,84	0,84	0,84 ± 0,14
R5	0,87	1,00	0,85	0,85	0,91 ± 0,21
R6	0,82	1,00	0,78	0,78	0,64 ± 0,13
R7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,46 ± 0,13
R8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,35 ± 0,08
R9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05

Tablo E5-29 Oksijenli Kesikli Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılmayan sadece maksimum biyokütleyle % 10 esneklik payı verilen iAF1260-genom *E.coli* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Deneysel Veriler
R1	0,54	0,42	0,50	0,55	0,70 ± 0,02
R2	0,00	0,84	0,00	0,00	0,13 ± 0,06
R3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R4	0,76	0,94	0,80	0,76	0,78 ± 0,02
R5	0,76	0,85	0,80	0,76	0,81 ± 0,03
R6	0,59	0,60	0,29	0,60	0,24 ± 0,02
R7	0,00	0,29	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R9	0,00	0,00	0,40	0,00	0,58 ± 0,03
R10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05

Tablo E5-30 Oksijenli Kesikli Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılmayan sadece maksimum biyokütleyle % 15 esneklik payı verilen iAF1260-genom *E.coli* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Deneyisel Veriler
R1	0,54	0,35	0,47	0,55	0,70 ± 0,02
R2	0,00	0,93	0,00	0,00	0,13 ± 0,06
R3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R4	0,76	0,94	0,81	0,76	0,78 ± 0,02
R5	0,76	0,81	0,82	0,76	0,81 ± 0,03
R6	0,59	0,61	0,17	0,60	0,24 ± 0,02
R7	0,00	0,27	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R9	0,00	0,00	0,55	0,00	0,58 ± 0,03
R10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05

Tablo E5-31 Oksijenli Kesikli Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılan hem bu reaksiyona hem de maksimum biyokütleyle % 10 esneklik payı verilen iAF1260-genom *E.coli* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Deneyisel Veriler
R1	0,91	0,56	0,49	0,54	0,70 ± 0,02
R2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13 ± 0,06
R3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R4	0,82	0,80	0,80	0,76	0,78 ± 0,02
R5	0,83	0,80	0,80	0,76	0,81 ± 0,03
R6	0,34	0,40	0,30	0,59	0,24 ± 0,02
R7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R9	0,40	0,28	0,37	0,00	0,58 ± 0,03
R10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05

Tablo E5-32 Oksijenli Kesikli Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılan reaksiyona % 10 ve maksimum biyokütleyle % 15 esneklik payı verilen iAF1260-genom *E.coli* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Deneyisel Veriler
R1	0,54	0,02	0,86	0,47	0,70 ± 0,02
R2	0,00	0,92	0,00	0,00	0,13 ± 0,06
R3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R4	0,76	0,93	0,85	0,75	0,78 ± 0,02
R5	0,76	0,87	0,86	0,73	0,81 ± 0,03
R6	0,59	0,53	0,60	0,54	0,24 ± 0,02
R7	0,00	0,22	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R9	0,00	0,00	0,19	0,00	0,58 ± 0,03
R10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05

Tablo E5-33 Oksijenli Kesikli Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılan reaksiyona %15 ve maksimum biyokütleyle % 10 esneklik payı verilen iAF1260-genom *E.coli* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Deneyisel Veriler
R1	0,35	0,02	0,88	0,44	0,70 ± 0,02
R2	0,93	0,92	0,00	0,00	0,13 ± 0,06
R3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R4	0,94	0,93	0,84	0,74	0,78 ± 0,02
R5	0,81	0,87	0,85	0,72	0,81 ± 0,03
R6	0,61	0,53	0,69	0,52	0,24 ± 0,02
R7	0,27	0,23	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R9	0,00	0,00	0,09	0,00	0,58 ± 0,03
R10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05

Tablo E5-34 Oksijenli Kesikli Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılan hem bu reaksiyona hem de maksimum biyokütleyle % 15 esneklik payı verilen iAF1260-genom *E.coli* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Deneyisel Veriler
R1	0,00	0,02	0,85	0,44	0,70 ± 0,02
R2	0,00	0,92	0,00	0,00	0,13 ± 0,06
R3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R4	0,79	0,93	0,85	0,74	0,78 ± 0,02
R5	0,62	0,87	0,86	0,72	0,81 ± 0,03
R6	0,12	0,53	0,60	0,52	0,24 ± 0,02
R7	0,00	0,23	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R9	0,44	0,00	0,19	0,00	0,58 ± 0,03
R10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05

Tablo E5-35 Oksijenli Kesikli Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılan hem bu reaksiyona hem de maksimum biyokütleyle esneklik payı verilmeden iAF1260-genom *E.coli* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Deneyisel Veriler
R1	0,54	0,54	0,54	0,54	0,70 ± 0,02
R2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13 ± 0,06
R3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R4	0,78	0,77	0,78	0,78	0,78 ± 0,02
R5	0,77	0,77	0,77	0,77	0,81 ± 0,03
R6	0,00	0,54	0,00	0,00	0,24 ± 0,02
R7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R9	0,99	0,08	0,99	0,99	0,58 ± 0,03
R10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05

Tablo E5-36 Oksijensiz Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılmayan sadece maksimum biyokütleyle % 10 esneklik payı verilen iAF1260-genom *E.coli* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Deneyisel Veriler
R1	0,88	0,79	0,86	0,99	0,90 ± 0,05
R2	0,00	0,96	0,58	0,00	0,86 ± 0,94
R3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R4	0,97	0,97	0,97	0,97	0,94 ± 0,05
R5	0,68	0,88	0,93	0,97	0,96 ± 0,09
R6	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02 ± 0,01
R7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R9	0,18	0,47	0,26	0,29	0,34 ± 0,01
R10	0,76	0,48	0,70	0,66	0,61 ± 0,04

Tablo E5-37 Oksijensiz Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılmayan sadece maksimum biyokütleyle % 15 esneklik payı verilen iAF1260-genom *E.coli* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Deneyisel Veriler
R1	0,88	0,78	0,80	0,92	0,90 ± 0,05
R2	0,00	0,96	0,96	0,00	0,86 ± 0,94
R3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R4	0,97	0,97	0,97	0,97	0,94 ± 0,05
R5	0,68	0,79	0,88	0,75	0,96 ± 0,09
R6	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02 ± 0,01
R7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R9	0,18	0,47	0,27	0,20	0,34 ± 0,01
R10	0,76	0,48	0,69	0,75	0,61 ± 0,04

Tablo E5-38 Oksijensiz Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılan hem bu reaksiyona hem de maksimum biyokütleyle % 10 esneklik payı verilen iAF1260-genom *E.coli* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Deneyisel Veriler
R1	0,92	0,81	0,83	0,88	0,90 ± 0,05
R2	0,00	0,73	0,67	0,00	0,86 ± 0,94
R3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R4	0,97	0,96	0,96	0,97	0,94 ± 0,05
R5	0,75	0,97	0,92	0,68	0,96 ± 0,09
R6	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02 ± 0,01
R7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R9	0,20	0,21	0,25	0,18	0,34 ± 0,01
R10	0,75	0,74	0,70	0,76	0,61 ± 0,04

Tablo E5-39 Oksijensiz Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılan reaksiyona % 10 ve maksimum biyokütleyle % 15 esneklik payı verilen iAF1260-genom *E.coli* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Deneyisel Veriler
R1	0,78	0,79	0,77	0,88	0,90 ± 0,05
R2	0,91	0,91	1,00	0,00	0,86 ± 0,94
R3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R4	0,96	0,96	0,96	0,97	0,94 ± 0,05
R5	0,97	0,97	0,86	0,68	0,96 ± 0,09
R6	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02 ± 0,01
R7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R9	0,06	0,07	0,27	0,18	0,34 ± 0,01
R10	0,90	0,88	0,69	0,76	0,61 ± 0,04

Tablo E5-40 Oksijensiz Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılan reaksiyona %15 ve maksimum biyokütleyle % 10 esneklik payı verilen iAF1260-genom *E.coli* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Deneysel Veriler
R1	0,78	0,80	0,82	0,88	0,90 ± 0,05
R2	0,91	0,78	0,69	0,00	0,86 ± 0,94
R3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R4	0,96	0,96	0,96	0,97	0,94 ± 0,05
R5	0,97	0,97	0,91	0,68	0,96 ± 0,09
R6	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02 ± 0,01
R7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R9	0,06	0,22	0,25	0,18	0,34 ± 0,01
R10	0,90	0,73	0,70	0,76	0,61 ± 0,04

Tablo E5-41 Oksijensiz Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılan hem bu reaksiyona hem de maksimum biyokütleyle % 15 esneklik payı verilen iAF1260-genom *E.coli* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Deneysel Veriler
R1	0,78	0,78	0,77	0,88	0,90 ± 0,05
R2	0,91	0,91	1,00	0,00	0,86 ± 0,94
R3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R4	0,96	0,96	0,96	0,97	0,94 ± 0,05
R5	0,97	0,97	0,85	0,68	0,96 ± 0,09
R6	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02 ± 0,01
R7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R9	0,06	0,06	0,26	0,18	0,34 ± 0,01
R10	0,90	0,90	0,69	0,76	0,61 ± 0,04

Tablo E5-42 Oksijensiz Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılan hem bu reaksiyona hem de maksimum biyokütleyle esneklik payı verilmeden iAF1260-genom *E.coli* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Deneyisel Veriler
R1	1,00	1,00	1,00	1,00	0,90 $\pm$ 0,05
R2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,86 $\pm$ 0,94
R3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 $\pm$ 0,05
R4	0,97	0,96	0,97	0,97	0,94 $\pm$ 0,05
R5	0,01	0,97	0,01	0,01	0,96 $\pm$ 0,09
R6	0,00	0,01	0,00	0,00	0,02 $\pm$ 0,01
R7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 $\pm$ 0,05
R8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 $\pm$ 0,05
R9	0,99	0,47	0,99	0,99	0,34 $\pm$ 0,01
R10	0,01	0,48	0,01	0,01	0,61 $\pm$ 0,04

EK 6: *S.CEREVISIAE* MİKROORGANİZMASI İÇİN YAPILAN TÜM AKI DENGESİ ANALİZİ HESAPLAMALARI

Bölüm 4'te ayrıntılı olarak anlatılan Akı Dengesi Analizi hesaplamaları tablolar halinde aşağıda görülmektedir. Toplam 42 adet Tablo bulunmaktadır. Tablo E6-1 ve E6-21 arasındakiler, *Saccharomyces cerevisiae* mikroorganizması için 50 metabolitten ve 53 reaksiyondan oluşan metabolik model (küçük boyutlu model) kullanılarak yapılan hesaplamaları göstermektedir. Tablo E6-22 ve E6-42 arasındakiler ise *Saccharomyces cerevisiae* mikroorganizması için 825 metabolitten ve 1175 reaksiyondan oluşan metabolik model (genom boyutlu model) kullanılarak yapılan hesaplamaları göstermektedir.

Tablo E6-1 Oksijenli Sürekli Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılmayan sadece minimum glikoza % 10 esneklik payı verilen küçük *S.cerevisiae* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Oksijenli Sürekli Ortam
R1	0,85	0,33	0,33	0,33	0,49 ± 0,25
R2	0,96	0,95	0,95	0,95	0,96 ± 0,52
R3	0,47	0,53	0,53	0,53	0,58 ± 0,32
R4	0,00	0,68	0,68	0,77	0,80 ± 0,45
R5	0,00	0,00	0,30	0,00	0,09 ± 0,04
R6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R8	0,00	0,01	0,01	0,01	0,00 ± 0,05

Tablo E6-2 Oksijenli Sürekli Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılmayan sadece minimum glikoza % 15 esneklik payı verilen küçük *S.cerevisiae* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Oksijenli Sürekli Ortam
R1	0,85	0,33	0,33	0,33	0,49 ± 0,25
R2	0,96	0,95	0,95	0,95	0,96 ± 0,52
R3	0,47	0,53	0,53	0,53	0,58 ± 0,32
R4	0,00	0,68	0,68	0,77	0,80 ± 0,45
R5	0,00	0,00	0,31	0,00	0,09 ± 0,04
R6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R8	0,00	0,01	0,01	0,01	0,00 ± 0,05

Tablo E6-3 Oksijenli Sürekli Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılan hem reaksiyona hem de minimum glikoza % 10 esneklik payı verilen küçük *S.cerevisiae* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Oksijenli Sürekli Ortam
R1	0,86	0,42	0,42	0,42	0,49 ± 0,25
R2	0,97	0,96	0,96	0,96	0,96 ± 0,52
R3	0,49	0,57	0,57	0,57	0,58 ± 0,32
R4	0,00	0,79	0,79	0,80	0,80 ± 0,45
R5	0,00	0,00	0,14	0,00	0,09 ± 0,04
R6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05

Tablo E6-4 Oksijenli Sürekli Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılan reaksiyona % 10 ve minimum glikoza % 15 esneklik payı verilen küçük *S.cerevisiae* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Oksijenli Sürekli Ortam
R1	0,87	0,42	0,42	0,42	0,49 ± 0,25
R2	0,97	0,96	0,96	0,96	0,96 ± 0,52
R3	0,47	0,57	0,57	0,57	0,58 ± 0,32
R4	0,00	0,79	0,79	0,80	0,80 ± 0,45
R5	0,00	0,00	0,16	0,00	0,09 ± 0,04
R6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05

Tablo E6-5 Oksijenli Sürekli Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılan reaksiyona %15 ve minimum glikoza % 10 esneklik payı verilen küçük *S.cerevisiae* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Oksijenli Sürekli Ortam
R1	0,86	0,35	0,35	0,35	0,49 ± 0,25
R2	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96 ± 0,52
R3	0,49	0,56	0,56	0,56	0,58 ± 0,32
R4	0,00	0,77	0,77	0,79	0,80 ± 0,45
R5	0,00	0,00	0,15	0,00	0,09 ± 0,04
R6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05

Tablo E6-6 Oksijenli Sürekli Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılan hem bu reaksiyona hem de minimum glikoza % 15 esneklik payı verilen küçük *S.cerevisiae* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Oksijenli Sürekli Ortam
R1	0,87	0,35	0,35	0,35	0,49 ± 0,25
R2	0,97	0,96	0,96	0,96	0,96 ± 0,52
R3	0,47	0,56	0,56	0,56	0,58 ± 0,32
R4	0,00	0,77	0,77	0,79	0,80 ± 0,45
R5	0,00	0,00	0,17	0,00	0,09 ± 0,04
R6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05

Tablo E6-7 Oksijenli Sürekli Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılan hem bu reaksiyona hem de minimum glikoza esneklik payı verilmeden küçük *S.cerevisiae* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Oksijenli Sürekli Ortam
R1	0,71	0,79	0,78	0,78	0,49 ± 0,25
R2	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96 ± 0,52
R3	0,56	0,54	0,60	0,60	0,58 ± 0,32
R4	0,80	0,82	0,82	0,82	0,80 ± 0,45
R5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,09 ± 0,04
R6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R7	0,00	0,46	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05

Tablo E6-8 Oksijenli Kesikli Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılmayan sadece maksimum biyokütleyle % 10 esneklik payı verilen küçük *S.cerevisiae* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Oksijenli Kesikli Ortam
R1	0,96	0,86	0,86	0,92	0,85 ± 0,03
R2	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99 ± 0,00
R3	0,00	0,04	0,04	0,02	0,01 ± 0,02
R4	0,26	0,56	0,56	0,39	0,86 ± 0,16
R5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20 ± 0,30
R6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R7	0,85	0,97	0,97	0,88	0,94 ± 0,01
R8	0,07	0,10	0,10	0,10	0,10 ± 0,04

Tablo E6-9 Oksijenli Kesikli Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılmayan sadece maksimum biyokütleyle % 15 esneklik payı verilen küçük *S.cerevisiae* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Oksijenli Kesikli Ortam
R1	0,96	0,88	0,83	0,94	0,85 ± 0,03
R2	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99 ± 0,00
R3	0,00	0,05	0,05	0,03	0,01 ± 0,02
R4	0,26	0,62	0,56	0,45	0,86 ± 0,16
R5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20 ± 0,30
R6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R7	0,84	0,97	0,97	0,86	0,94 ± 0,01
R8	0,09	0,15	0,15	0,14	0,10 ± 0,04

Tablo E6-10 Oksijenli Kesikli Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılan hem bu reaksiyona hem de maksimum biyokütleyle % 10 esneklik payı verilen küçük *S.cerevisiae* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Oksijenli Kesikli Ortam
R1	0,96	0,86	0,86	0,92	0,85 ± 0,03
R2	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99 ± 0,00
R3	0,00	0,04	0,04	0,02	0,01 ± 0,02
R4	0,35	0,56	0,56	0,39	0,86 ± 0,16
R5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20 ± 0,30
R6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R7	0,86	0,97	0,97	0,88	0,94 ± 0,01
R8	0,06	0,10	0,10	0,09	0,10 ± 0,04

Tablo E6-11 Oksijenli Kesikli Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılan reaksiyona % 10 ve maksimum biyokütleyle % 15 esneklik payı verilen küçük *S.cerevisiae* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Oksijenli Kesikli Ortam
R1	0,96	0,88	0,86	0,94	0,85 ± 0,03
R2	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99 ± 0,00
R3	0,00	0,05	0,05	0,03	0,01 ± 0,02
R4	0,26	0,62	0,60	0,45	0,86 ± 0,16
R5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20 ± 0,30
R6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R7	0,86	0,97	0,97	0,86	0,94 ± 0,01
R8	0,06	0,14	0,14	0,13	0,10 ± 0,04

Tablo E6-12 Oksijenli Kesikli Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılan reaksiyona %15 ve maksimum biyokütleyle % 10 esneklik payı verilen küçük *S.cerevisiae* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Oksijenli Kesikli Ortam
R1	0,96	0,86	0,86	0,92	0,85 ± 0,03
R2	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99 ± 0,00
R3	0,00	0,04	0,04	0,02	0,01 ± 0,02
R4	0,26	0,56	0,56	0,39	0,86 ± 0,16
R5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20 ± 0,30
R6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R7	0,86	0,97	0,97	0,88	0,94 ± 0,01
R8	0,06	0,10	0,10	0,09	0,10 ± 0,04

Tablo E6-13 Oksijenli Kesikli Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılan hem bu reaksiyona hem de maksimum biyokütleyle % 15 esneklik payı verilen küçük *S.cerevisiae* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Oksijenli Kesikli Ortam
R1	0,96	0,88	0,86	0,94	0,85 ± 0,03
R2	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99 ± 0,00
R3	0,02	0,05	0,05	0,03	0,01 ± 0,02
R4	0,39	0,62	0,60	0,45	0,86 ± 0,16
R5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20 ± 0,30
R6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R7	0,86	0,97	0,97	0,86	0,94 ± 0,01
R8	0,11	0,14	0,14	0,13	0,10 ± 0,04

Tablo E6-14 Oksijenli Kesikli Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılan hem bu reaksiyona hem de maksimum biyokütleyle esneklik payı verilmeden küçük *S.cerevisiae* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Oksijenli Kesikli Ortam
R1	0,86	0,86	0,85	0,86	0,85 ± 0,03
R2	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99 ± 0,00
R3	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01 ± 0,02
R4	0,39	0,39	0,00	0,39	0,86 ± 0,16
R5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20 ± 0,30
R6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R7	0,96	0,96	0,97	0,96	0,94 ± 0,01
R8	0,00	0,00	0,01	0,00	0,10 ± 0,04

Tablo E6-15 Oksijensiz Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılmayan sadece maksimum biyokütleyle % 10 esneklik payı verilen küçük *S.cerevisiae* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Oksijensiz Sürekli Ortam
R1	0,97	0,94	0,88	0,94	0,88 ± 0,13
R2	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99 ± 0,18
R3	0,00	0,02	0,02	0,02	0,02 ± 0,07
R4	0,00	0,12	0,18	0,39	0,37 ± 0,62
R5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,08
R6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R7	0,90	0,92	0,98	0,92	0,99 ± 0,01
R8	0,17	0,20	0,20	0,20	0,19 ± 0,00

Tablo E6-16 Oksijensiz Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılmayan sadece maksimum biyokütleyle % 15 esneklik payı verilen küçük *S.cerevisiae* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Oksijensiz Sürekli Ortam
R1	0,97	0,97	0,89	0,97	0,88 ± 0,13
R2	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99 ± 0,18
R3	0,00	0,02	0,03	0,02	0,02 ± 0,07
R4	0,00	0,11	0,23	0,39	0,37 ± 0,62
R5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,08
R6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R7	0,90	0,88	0,98	0,88	0,99 ± 0,01
R8	0,18	0,23	0,23	0,23	0,19 ± 0,00

Tablo E6-17 Oksijensiz Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılan hem bu reaksiyona hem de maksimum biyokütleyle % 10 esneklik payı verilen küçük *S.cerevisiae* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Oksijensiz Sürekli Ortam
R1	0,98	0,95	0,89	0,95	0,88 ± 0,13
R2	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99 ± 0,18
R3	0,00	0,02	0,02	0,02	0,02 ± 0,07
R4	0,00	0,11	0,16	0,39	0,37 ± 0,62
R5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,08
R6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R7	0,91	0,93	0,98	0,93	0,99 ± 0,01
R8	0,16	0,18	0,18	0,18	0,19 ± 0,00

Tablo E6-18 Oksijensiz Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılan reaksiyona % 10 ve maksimum biyokütleyle % 15 esneklik payı verilen küçük *S.cerevisiae* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Oksijensiz Sürekli Ortam
R1	0,98	0,98	0,90	0,98	0,88 ± 0,13
R2	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99 ± 0,18
R3	0,00	0,01	0,03	0,02	0,02 ± 0,07
R4	0,00	0,10	0,21	0,39	0,37 ± 0,62
R5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,08
R6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R7	0,91	0,90	0,98	0,89	0,99 ± 0,01
R8	0,16	0,21	0,20	0,21	0,19 ± 0,00

Tablo E6-19 Oksijensiz Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılan reaksiyona %15 ve maksimum biyokütleyle % 10 esneklik payı verilen küçük *S.cerevisiae* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Oksijensiz Sürekli Ortam
R1	0,97	0,95	0,89	0,95	0,88 ± 0,13
R2	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99 ± 0,18
R3	0,00	0,02	0,02	0,02	0,02 ± 0,07
R4	0,00	0,11	0,16	0,39	0,37 ± 0,62
R5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,08
R6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R7	0,91	0,93	0,98	0,93	0,99 ± 0,01
R8	0,16	0,18	0,18	0,18	0,19 ± 0,00

Tablo E6-20 Oksijensiz Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılan hem bu reaksiyona hem de maksimum biyokütleyle % 15 esneklik payı verilen küçük *S.cerevisiae* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Oksijensiz Sürekli Ortam
R1	0,98	0,98	0,90	0,98	0,88 ± 0,13
R2	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99 ± 0,18
R3	0,00	0,02	0,03	0,02	0,02 ± 0,07
R4	0,00	0,10	0,21	0,39	0,37 ± 0,62
R5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,08
R6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R7	0,91	0,89	0,98	0,89	0,99 ± 0,01
R8	0,16	0,21	0,21	0,21	0,19 ± 0,00

Tablo E6-21 Oksijensiz Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılan hem bu reaksiyona hem de maksimum biyokütleyle esneklik payı verilmeden küçük *S.cerevisiae* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Oksijensiz Sürekli Ortam
R1	0,91	0,92	0,92	0,92	0,88 ± 0,13
R2	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99 ± 0,18
R3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02 ± 0,07
R4	0,35	0,35	0,35	0,35	0,37 ± 0,62
R5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,08
R6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R7	0,96	0,97	0,97	0,97	0,99 ± 0,01
R8	0,12	0,11	0,11	0,11	0,19 ± 0,00

Tablo E6-22 Oksijenli Sürekli Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılmayan sadece minimum glikoza % 10 esneklik payı verilen iFF708-genom *S.cerevisiae* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Oksijenli Sürekli Ortam
R1	0,50	0,61	0,42	0,61	0,49 ± 0,25
R2	0,00	0,96	0,96	0,96	0,96 ± 0,52
R3	0,65	0,64	0,52	0,64	0,58 ± 0,32
R4	0,88	0,88	0,86	0,88	0,80 ± 0,45
R5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,09 ± 0,04
R6	0,33	0,33	0,29	0,33	0,00 ± 0,05
R7	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05

Tablo E6-23 Oksijenli Sürekli Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılmayan sadece minimum glikoza % 15 esneklik payı verilen iFF708-genom *S.cerevisiae* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Oksijenli Sürekli Ortam
R1	0,50	0,61	0,42	0,61	0,49 ± 0,25
R2	0,00	0,96	0,96	0,96	0,96 ± 0,52
R3	0,65	0,64	0,52	0,64	0,58 ± 0,32
R4	0,88	0,88	0,86	0,88	0,80 ± 0,45
R5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,09 ± 0,04
R6	0,33	0,33	0,29	0,33	0,00 ± 0,05
R7	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05

Tablo E6-24 Oksijenli Sürekli Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılan hem reaksiyona hem de minimum glikoza % 10 esneklik payı verilen iFF708-genom *S.cerevisiae* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Oksijenli Sürekli Ortam
R1	0,50	0,70	0,62	0,70	0,49 ± 0,25
R2	0,00	0,97	0,97	0,97	0,96 ± 0,52
R3	0,65	0,42	0,34	0,42	0,58 ± 0,32
R4	0,88	0,87	0,85	0,87	0,80 ± 0,45
R5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,09 ± 0,04
R6	0,33	0,33	0,29	0,33	0,00 ± 0,05
R7	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05

Tablo E6-26 Oksijenli Sürekli Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılan reaksiyona % 10 ve minimum glikoza % 15 esneklik payı verilen iFF708-genom *S.cerevisiae* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Oksijenli Sürekli Ortam
R1	0,50	0,70	0,57	0,70	0,49 ± 0,25
R2	0,00	0,97	0,98	0,97	0,96 ± 0,52
R3	0,65	0,42	0,31	0,42	0,58 ± 0,32
R4	0,88	0,87	0,84	0,87	0,80 ± 0,45
R5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,09 ± 0,04
R6	0,33	0,33	0,29	0,33	0,00 ± 0,05
R7	1,00	0,00	0,06	0,00	0,00 ± 0,05
R8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05

Tablo E6-26 Oksijenli Sürekli Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılan reaksiyona %15 ve minimum glikoza % 10 esneklik payı verilen iFF708-genom *S.cerevisiae* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Oksijenli Sürekli Ortam
R1	0,50	0,69	0,61	0,69	0,49 ± 0,25
R2	0,00	0,97	0,97	0,97	0,96 ± 0,52
R3	0,65	0,44	0,36	0,44	0,58 ± 0,32
R4	0,88	0,87	0,86	0,87	0,80 ± 0,45
R5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,09 ± 0,04
R6	0,33	0,33	0,29	0,33	0,00 ± 0,05
R7	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05

Tablo E6-27 Oksijenli Sürekli Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılan hem bu reaksiyona hem de minimum glikoza % 15 esneklik payı verilen iFF708-genom *S.cerevisiae* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Oksijenli Sürekli Ortam
R1	0,50	0,69	0,56	0,69	0,49 ± 0,25
R2	0,00	0,97	0,98	0,97	0,96 ± 0,52
R3	0,65	0,44	0,32	0,44	0,58 ± 0,32
R4	0,88	0,87	0,85	0,87	0,80 ± 0,45
R5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,09 ± 0,04
R6	0,33	0,33	0,29	0,33	0,00 ± 0,05
R7	1,00	0,00	0,03	0,00	0,00 ± 0,05
R8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05

Tablo E6-28 Oksijenli Sürekli Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılan hem bu reaksiyona hem de minimum glikoza esneklik payı verilmeden iFF708-genom *S.cerevisiae* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Oksijenli Sürekli Ortam
R1	0,50	0,70	1,00	0,90	0,49 ± 0,25
R2	0,00	0,97	1,00	0,50	0,96 ± 0,52
R3	0,68	0,46	1,00	0,55	0,58 ± 0,32
R4	0,89	0,88	1,00	0,00	0,80 ± 0,45
R5	0,00	0,00	0,00	0,04	0,09 ± 0,04
R6	0,33	0,33	0,00	0,99	0,00 ± 0,05
R7	1,00	0,84	0,02	0,01	0,00 ± 0,05
R8	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00 ± 0,05

Tablo E6-29 Oksijenli Kesikli Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılmayan sadece maksimum biyokütleyle % 10 esneklik payı verilen iFF708-genom *S.cerevisiae* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Oksijenli Kesikli Ortam
R1	0,50	0,92	0,88	0,89	0,85 ± 0,03
R2	0,01	0,99	0,99	0,99	0,99 ± 0,00
R3	0,03	0,03	0,03	0,03	0,01 ± 0,02
R4	0,53	0,56	0,56	0,56	0,86 ± 0,16
R5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20 ± 0,30
R6	0,23	0,33	0,33	0,33	0,00 ± 0,05
R7	1,00	0,95	0,93	0,91	0,94 ± 0,01
R8	0,00	0,00	0,06	0,06	0,10 ± 0,04

Tablo E6-30 Oksijenli Kesikli Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılmayan sadece maksimum biyokütleyle % 15 esneklik payı verilen iFF708-genom *S.cerevisiae* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Oksijenli Kesikli Ortam
R1	0,50	0,94	0,88	0,89	0,85 ± 0,03
R2	0,01	0,99	0,99	0,99	0,99 ± 0,00
R3	0,03	0,03	0,03	0,03	0,01 ± 0,02
R4	0,53	0,56	0,56	0,56	0,86 ± 0,16
R5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20 ± 0,30
R6	0,23	0,33	0,33	0,33	0,00 ± 0,05
R7	1,00	0,94	0,92	0,85	0,94 ± 0,01
R8	0,00	0,01	0,07	0,10	0,10 ± 0,04

Tablo E6-31 Oksijenli Kesikli Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılan hem bu reaksiyona hem de maksimum biyokütleyle % 10 esneklik payı verilen iFF708-genom *S.cerevisiae* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Oksijenli Kesikli Ortam
R1	0,50	0,92	0,89	0,89	0,85 ± 0,03
R2	0,01	0,99	0,99	0,99	0,99 ± 0,00
R3	0,03	0,03	0,03	0,03	0,01 ± 0,02
R4	0,53	0,56	0,56	0,56	0,86 ± 0,16
R5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20 ± 0,30
R6	0,23	0,33	0,33	0,33	0,00 ± 0,05
R7	1,00	0,95	0,93	0,91	0,94 ± 0,01
R8	0,00	0,00	0,06	0,06	0,10 ± 0,04

Tablo E6-32 Oksijenli Kesikli Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılan reaksiyona % 10 ve maksimum biyokütleyle % 15 esneklik payı verilen iFF708-genom *S.cerevisiae* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Oksijenli Kesikli Ortam
R1	0,50	0,94	0,88	0,90	0,85 ± 0,03
R2	0,01	0,99	0,99	0,99	0,99 ± 0,00
R3	0,03	0,03	0,03	0,03	0,01 ± 0,02
R4	0,53	0,56	0,56	0,56	0,86 ± 0,16
R5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20 ± 0,30
R6	0,23	0,33	0,33	0,33	0,00 ± 0,05
R7	1,00	0,94	0,92	0,86	0,94 ± 0,01
R8	0,00	0,01	0,07	0,09	0,10 ± 0,04

Tablo E6-33 Oksijenli Kesikli Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılan reaksiyona %15 ve maksimum biyokütleyle % 10 esneklik payı verilen iFF708-genom *S.cerevisiae* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Oksijenli Kesikli Ortam
R1	0,50	0,92	0,88	0,89	0,85 ± 0,03
R2	0,01	0,99	0,99	0,99	0,99 ± 0,00
R3	0,03	0,03	0,03	0,03	0,01 ± 0,02
R4	0,53	0,56	0,56	0,56	0,86 ± 0,16
R5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20 ± 0,30
R6	0,23	0,33	0,33	0,33	0,00 ± 0,05
R7	1,00	0,95	0,93	0,91	0,94 ± 0,01
R8	0,00	0,00	0,06	0,06	0,10 ± 0,04

Tablo E6-34 Oksijenli Kesikli Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılan hem bu reaksiyona hem de maksimum biyokütleyle % 15 esneklik payı verilen iFF708-genom *S.cerevisiae* modeli hesaplamaları,

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Oksijenli Kesikli Ortam
R1	0,50	0,94	0,88	0,90	0,85 ± 0,03
R2	0,01	0,99	0,99	0,99	0,99 ± 0,00
R3	0,03	0,03	0,03	0,03	0,01 ± 0,02
R4	0,53	0,56	0,56	0,56	0,86 ± 0,16
R5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20 ± 0,30
R6	0,23	0,33	0,33	0,33	0,00 ± 0,05
R7	1,00	0,94	0,92	0,86	0,94 ± 0,01
R8	0,00	0,01	0,07	0,09	0,10 ± 0,04

Tablo E6-35 Oksijenli Kesikli Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılan hem bu reaksiyona hem de maksimum biyokütleyle esneklik payı verilmeden iFF708-genom *S.cerevisiae* modeli hesaplamaları,

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Oksijenli Kesikli Ortam
R1	0,50	0,88	0,88	0,88	0,85 ± 0,03
R2	0,01	0,99	0,99	0,99	0,99 ± 0,00
R3	0,03	0,03	0,03	0,03	0,01 ± 0,02
R4	0,54	0,54	0,54	0,54	0,86 ± 0,16
R5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20 ± 0,30
R6	0,24	0,25	0,25	0,25	0,00 ± 0,05
R7	1,00	0,00	1,00	1,00	0,94 ± 0,01
R8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10 ± 0,04

Tablo E6-36 Oksijensiz Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılmayan sadece maksimum biyokütleye % 10 esneklik payı verilen iFF708-genom *S.cerevisiae* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Oksijensiz Sürekli Ortam
R1	0,50	0,92	0,91	0,96	0,88 ± 0,13
R2	0,00	0,99	0,99	0,99	0,99 ± 0,18
R3	0,00	0,00	0,01	0,00	0,02 ± 0,07
R4	0,38	0,41	0,52	0,40	0,37 ± 0,62
R5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,08
R6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R7	1,00	0,98	0,98	0,98	0,99 ± 0,01
R8	0,00	0,09	0,11	0,05	0,19 ± 0,00

Tablo E6-37 Oksijensiz Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılmayan sadece maksimum biyokütleye % 15 esneklik payı verilen iFF708-genom *S.cerevisiae* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Oksijensiz Sürekli Ortam
R1	0,50	0,93	0,90	0,96	0,88 ± 0,13
R2	0,00	0,99	0,99	0,99	0,99 ± 0,18
R3	0,00	0,00	0,02	0,00	0,02 ± 0,07
R4	0,38	0,42	0,52	0,40	0,37 ± 0,62
R5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,08
R6	0,00	0,06	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R7	1,00	0,97	0,99	0,98	0,99 ± 0,01
R8	0,00	0,09	0,11	0,05	0,19 ± 0,00

Tablo E6-38 Oksijensiz Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılan hem bu reaksiyona hem de maksimum biyokütleyle % 10 esneklik payı verilen iFF708-genom *S.cerevisiae* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Oksijensiz Sürekli Ortam
R1	0,50	0,93	0,91	0,96	0,88 ± 0,13
R2	0,00	0,99	0,99	0,99	0,99 ± 0,18
R3	0,00	0,00	0,01	0,00	0,02 ± 0,07
R4	0,38	0,41	0,52	0,40	0,37 ± 0,62
R5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,08
R6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R7	1,00	0,98	0,99	0,98	0,99 ± 0,01
R8	0,00	0,08	0,11	0,05	0,19 ± 0,00

Tablo E6-39 Oksijensiz Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılan reaksiyona % 10 ve maksimum biyokütleyle % 15 esneklik payı verilen iFF708-genom *S.cerevisiae* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Oksijensiz Sürekli Ortam
R1	0,50	0,94	0,91	0,96	0,88 ± 0,13
R2	0,00	1,00	1,00	0,99	0,99 ± 0,18
R3	0,00	0,00	0,02	0,00	0,02 ± 0,07
R4	0,38	0,42	0,52	0,40	0,37 ± 0,62
R5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,08
R6	0,00	0,06	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R7	1,00	0,97	0,99	0,98	0,99 ± 0,01
R8	0,00	0,08	0,10	0,05	0,19 ± 0,00

Tablo E6-40 Oksijensiz Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılan reaksiyona %15 ve maksimum biyokütleyle % 10 esneklik payı verilen iFF708-genom *S.cerevisiae* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Oksijensiz Sürekli Ortam
R1	0,50	0,93	0,91	0,96	0,88 ± 0,13
R2	0,00	0,99	0,99	0,99	0,99 ± 0,18
R3	0,00	0,00	0,01	0,00	0,02 ± 0,07
R4	0,38	0,41	0,52	0,40	0,37 ± 0,62
R5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,08
R6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R7	1,00	0,98	0,99	0,98	0,99 ± 0,01
R8	0,00	0,08	0,11	0,05	0,19 ± 0,00

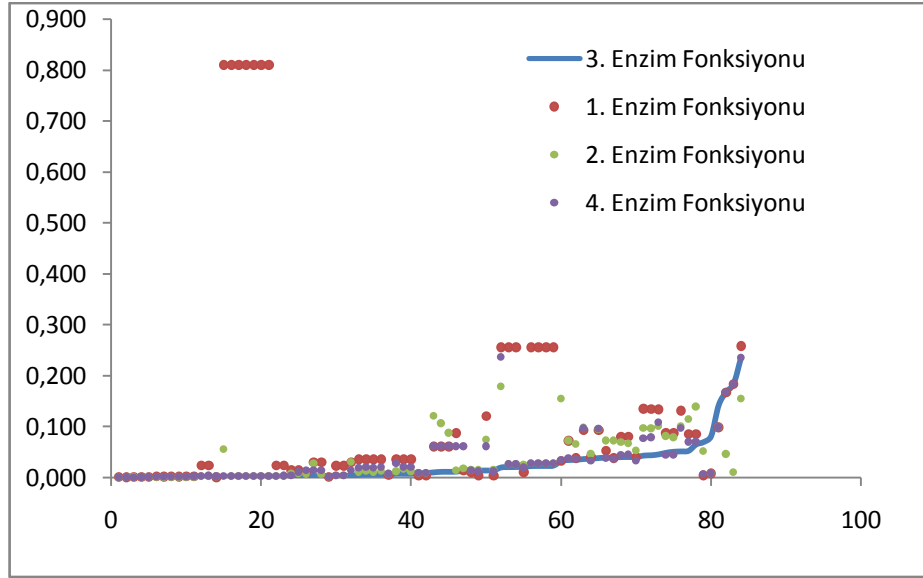
Tablo E6-41 Oksijensiz Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılan hem bu reaksiyona hem de maksimum biyokütleyle % 15 esneklik payı verilen iFF708-genom *S.cerevisiae* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Oksijensiz Sürekli Ortam
R1	0,50	0,94	0,91	0,96	0,88 ± 0,13
R2	0,00	1,00	0,99	0,99	0,99 ± 0,18
R3	0,00	0,00	0,02	0,00	0,02 ± 0,07
R4	0,38	0,42	0,52	0,40	0,37 ± 0,62
R5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,08
R6	0,00	0,06	0,00	0,00	0,00 ± 0,05
R7	1,00	0,97	0,99	0,98	0,99 ± 0,01
R8	0,00	0,08	0,10	0,05	0,19 ± 0,00

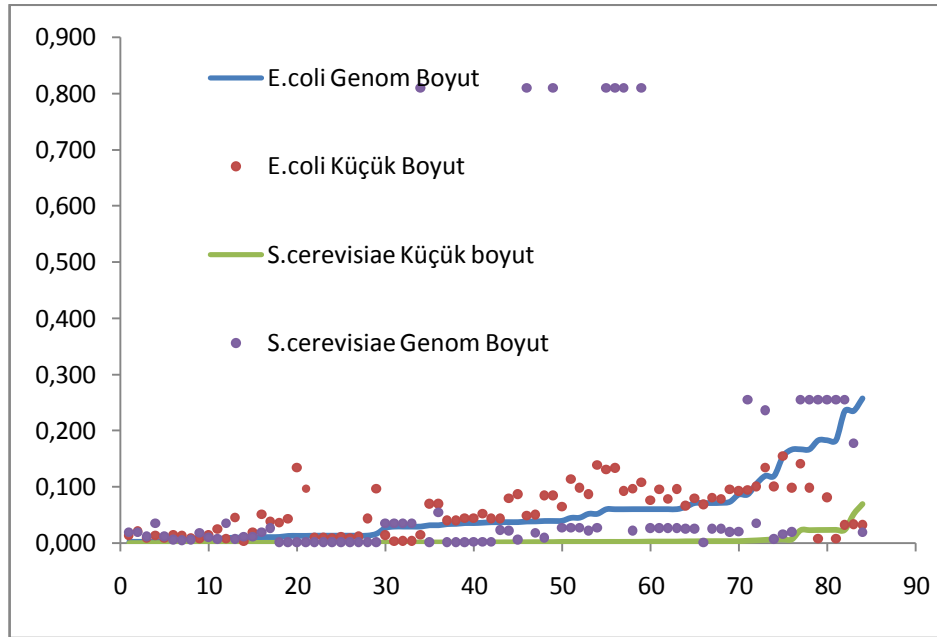
Tablo E6-42 Oksijensiz Ortam için, bakım-onarım reaksiyonu kullanılan hem bu reaksiyona hem de maksimum biyokütleyle esneklik payı verilmeden iFF708-genom *S.cerevisiae* modeli hesaplamaları

Ayrılma Oranı	1.Enzim Fonksiyonu	2.Enzim Fonksiyonu	3.Enzim Fonksiyonu	4.Enzim Fonksiyonu	Oksijensiz Sürekli Ortam
R1	0,50	0,95	0,88	0,96	0,88 ± 0,13
R2	0,00	0,99	1,00	0,99	0,99 ± 0,18
R3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02 ± 0,07
R4	0,38	0,41	0,23	0,38	0,37 ± 0,62
R5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,08
R6	0,00	0,00	0,95	0,00	0,00 ± 0,05
R7	1,00	0,98	0,88	0,98	0,99 ± 0,01
R8	0,00	0,06	0,27	0,05	0,19 ± 0,00

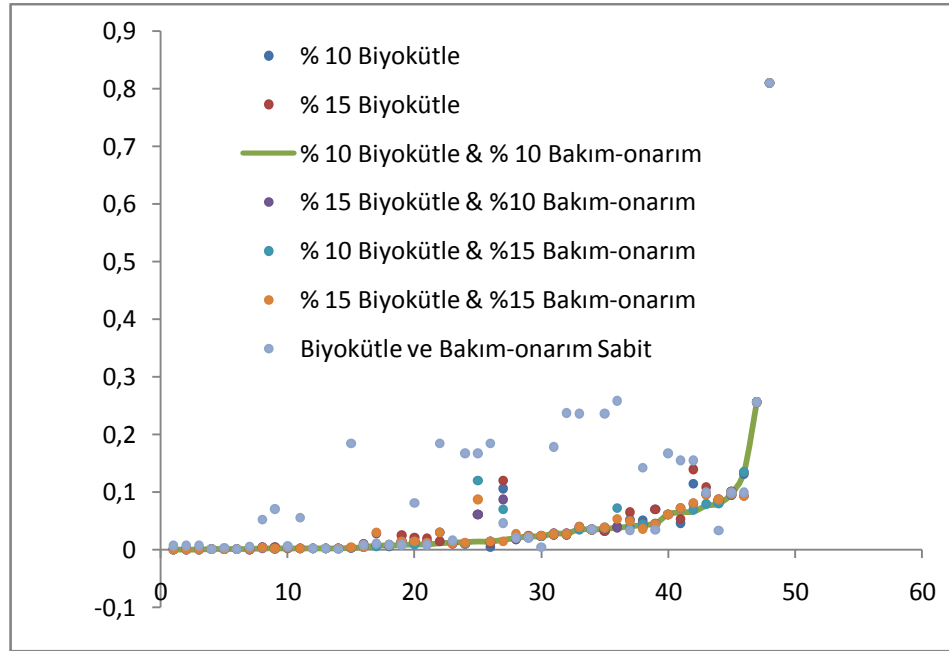
EK 7: TÜM HESAPLAMALARDAN ELDE EDİLEN PF DEĞERLERİNİN AYNIKOŞULLARDAKİ SONUÇLARLA KARŞILAŞTIRMALARI



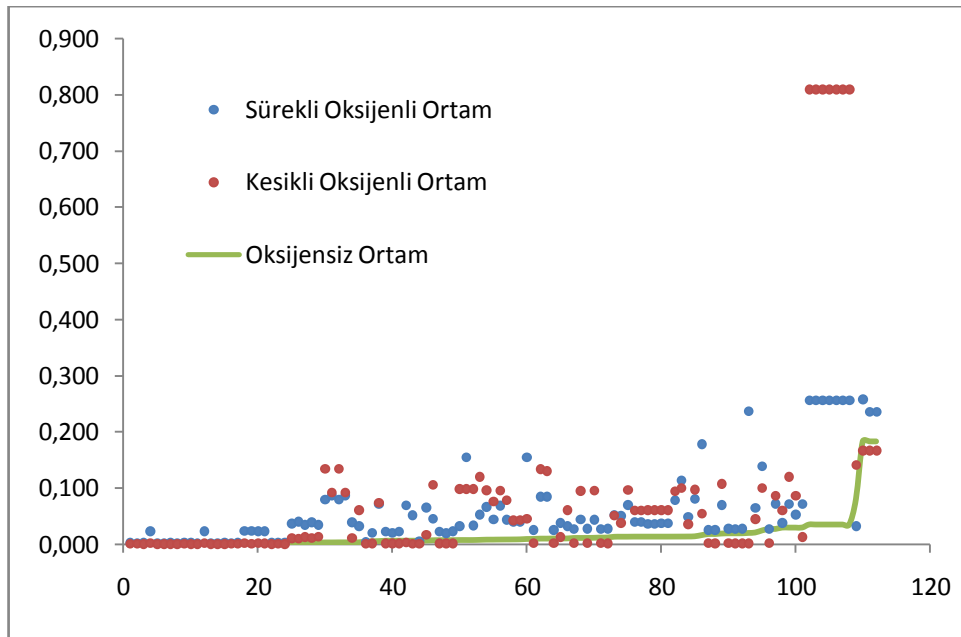
Şekil E7-1 3. Enzim fonksiyonu ile elde edilen PF değerlerinin küçükten büyüğe sıralanması ve diğer enzim fonksiyonları ile elde edilen PF değerlerinin aynı şartlardaki noktasal gösterimi



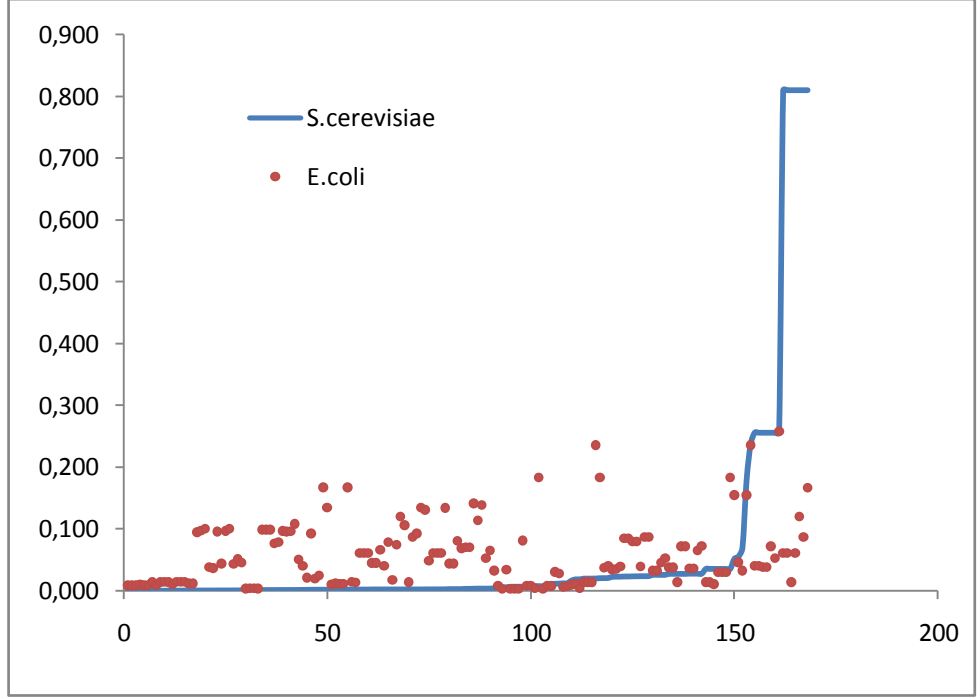
Şekil E7-2 *E.coli* Genom boyut ve *S.cerevisiae* küçük boyut metabolik modelleri ile elde edilen PF değerlerinin küçükten büyüğe sıralanması ve diğer metabolik modellerle elde edilen PF değerlerinin aynı şartlardaki noktasal gösterimi



Şekil E7-3 % 10 Biyokütle ve Bakım-onarım reaksiyonuna verilen esneklik hesaplamalarından elde edilen PF değerlerinin küçükten büyüğe sıralanması ve diğer hesaplamalardan elde edilen PF değerlerinin aynı şartlardaki noktasal gösterimi



Şekil E7-4 Oksijensiz ortam hesaplamalarından elde edilen PF değerlerinin küçükten büyüğe sıralanması ve diğer hesaplamalardan elde edilen PF değerlerinin aynı şartlardaki noktasal gösterimi



Şekil E7-5 *S.cerevisiae* mikroorganizması için yapılan hesaplamalardan elde edilen PF değerlerinin küçükten büyüğe sıralanması ve *E.coli* mikroorganizması için yapılan hesaplamalardan elde edilen PF değerlerinin aynı şartlardaki noktasal gösterimi