

Melas Ortamında Mikrobiyel Kaynaklı Metiyonin Gama Liyaz Sentezi

Şebnem Erenler*, Emel Aytan, Aslı Giray Kurt

ÖZET

Moleküler Biyoloji ve bakteriyolojideki gelişmeler, kanser tedavisinde kullanılan bakteriyel uygulama alan ve olanakları genişletmiştir. Metiyonin Gama Liyaz enzimi (MGL), akciğer kanseri, böbrek kanseri, beyin kanseri, prostat kanseri, melonoma ve fibrosarkoma'yı da kapsayan L-metiyonin bağımlı çeşitli kanser hücre hatlarında anti tümör etkinliği kanıtlanmış bir enzimdir. L- metiyonin kültür ortamından uzaklaştırıldığı zaman tümör hücreleri *in vitro* olarak büyüyememektedirler. L-metiyonin eksikliğinde, L-metiyonine bağımlı olan kanser hücreleri, hücre döngüsünün geç- S/G₂ fazında bloke olup tutulmakta ve bölünememektedirler. Çalışmamızda çeşitli bakteri türlerinden elde edildiği rapor edilen bu enzimi *Citrobacter freundii* ve onun MK57 ve *vgb* geni taşıyan rekombinantları kullanılarak biyoteknolojik bir yaklaşımla atık kullanarak üretimini hedeflenmiştir. Literatürde bakteriyel kaynaklı MGL çalışmalarında çeşitli besiyeri ortamları kullanıldığı rapor edilmiş fakat, çalışmamızda planladığımız atık sulardan kemoterapi enzimlerinin üretimi temeline dayanan çalışmaların oldukça sınırlı olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızda bu fonksiyonel enzimin mikrobiyel eldesi için ülkemizde yaygın olarak bulunabilen bir atık olan melas %1'lik ve %2'lik oranda sulandırılarak kullanılmış ve sonuçta melas ortamında verimli MGL sentezi belirlenmiş ve *vgb* geninin bu üretim yöntemine katkı sağladığı tespit edilmiştir. Sonuçlarımız değerlendirildiğinde endüstriyel üretim ve biyomedikal uygulamalar için ümit verici bulunmuş ve optimizasyon koşulları üzerine dikkatli bir çalışma ile bu atığın bir kemoterapi enzimi üretiminde kullanılabilirliğini kanıtlanmıştır.

Anahtar kelimeler: Kemoterapi enzimi, katı atık giderimi, mikrobiyel biyoteknoloji, *vgb*

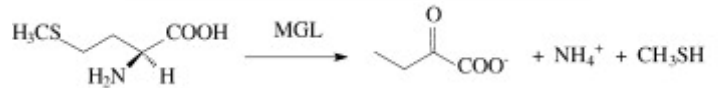
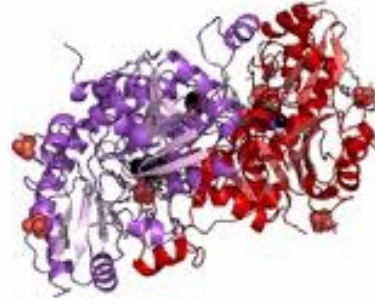
GİRİŞ

Son yıllarda, enzimlerin bir kısmının kemoterapide kullanım potansiyellerinin keşfedilmesi ile bu konudaki çalışmalar hız kazanmıştır. Enzimler özgün olmaları, fizyolojik pH ve sıcaklıklarda reaksiyonları katalizlemeleri ve yüksek turnover dereceleri ile kimyasal katalizörlere göre tercih edilen yapılardır. Kanser tedavisinde genellikle cerrahi, radyoterapi, kemoterapi ve diğer alternatif tedavi yöntemleri (gen tedavisi, lazer tedavisi, immünoterapi, vb.) uygulanmaktadır [1-5]. Metiyonin Gama Liyaz enzimi (MGL), kanser tedavisinde etkili kanıtlanmış önemli bir kemoterapötik bir ajandır. Enzimleri diğer ilaçlardan ayıran en önemli özellik, yüksek affinite ve spesifiteyle substratlarını bağlayarak onları oldukça yüksek bir hızda işlemeleridir. MGL, sınıflandırmada EC4.4.1.1.1. şeklinde numaralandırılan ve L-metiyoninin

* İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Malatya. Yazışmalardan sorumlu yazar: sebnem.erenler@inonu.edu.tr

bakteriyel metabolizmasında anahtar rol oynayan hücre içi bir enzimdir [6-8]. Ayrıca bu enzim sülfürlü aminoasitlerin metabolizmasında da önemli bir role sahiptir [9]. MGL kodlayan gen birçok bakteri, *Archaea* ve ilkel protozoalarda bulunmaktadır [10,11]. MGL, *Pseudomonas putida*, *Clostridium sporogenes*, *Aeromonas* sp., *Citrobacter intermedius*, *Citrobacter freundii*, *Brevibacterium linens*, *Trichomonas vaginalis*, *Entamoeba histolytica*, *Treponema denticola* ve *Porphyromonas gingivalis* gibi bir çok mikroorganizmadan saflaştırılıp tanımlanmıştır [12-16]. Ancak maya, bitki ve memeli hücrelerinde bulunamamıştır [17].

MGL, pridoksal-5'-fosfat bağımlı multifonksiyonel bir enzimdir. Enzim, γ -eliminasyon ile L-metiyonin α -ketobütirat, metanetiyoyle ve amonyak'a dönüştürülmektedir (Şekil 1.) [17,18]. Birçok insan kanser ve başlıca tümör hücreleri için esansiyel aminoasit olduğundan L-metiyonine ihtiyaç duymaktadır [20,21]. L- metiyonin kültür ortamından uzaklaştırıldığı zaman tümör hücreleri *in vitro* olarak büyüyememektedirler [22, 23]. Metiyonin bağımlılığı sadece kanser hücrelerinde görülen metabolik bir bozukluktur [24].



Şekil 1: L- Metiyonin Gama Liyaz ve etki ettiği reaksiyon [11,19].

L-metiyonin eksikliğinde, L-metiyonine bağımlı olan kanser hücreleri, hücre döngüsünün geç- S/G₂ fazında bloke olup tutulmakta ve bölünememektedirler [25,26]. MGL, akciğer kanseri, böbrek kanseri, beyin kanseri, prostat kanseri, melonoma ve fibrosarkoma'yı da kapsayan L-metiyonin bağımlı birkaç kanser hücre hattında anti tümör etkinliği gösterilmiştir [15]. Yine yapılan bir çalışmada, *in vivo* olarak insan kolon tümörlerine karşı cisplatin ile MGL kombinasyonunun etkili olarak kullanıldığı gösterilmiştir [22]. *Vitreoscilla* hemoglobini (VHb), prokaryotik hemoglobinler arasında ilk keşfedilen ve muhtemelen karakterizasyonu en iyi yapılmış olan hemoglobindir.

Bu proteinin esas fonksiyonunun düşük konsantrasyonlarda bulunan ekstraselüler oksijeni bağlayıp onu terminal solumum oksidazlarına vererek hücresel solunuma katkıda bulunduğu sanılmaktadır [27]. Genel olarak, belli seviyede oksijene gereksinim duyan tüm biyoproseslerde bu proteinin potansiyel kullanımının olabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmanın hedefi, endojen kaynaklı rekombinant bir oksijen alım sistemi olan *Vitreoscilla* hemoglobinin amaca uygun olarak seçilmiş bakterilerde metiyonin γ -liyaz üretimi üzerine etkisini araştırmaktır. Bu çalışmada, *Citrobacter freundii* ve onun MK 57 ve *Vitreoscilla* hemoglobin geni (*vgb*) taşıyan rekombinantlarında, atık ortamında regülasyon ve enzim sentezi çalışılmıştır. VHb sentezleyen rekombinant bakterilerin oldukça farklı oksijen alım yeteneklerinin ve metabolik akış yollarının endüstriyel değeri oldukça yüksek olan böyle bir enzimin üretiminde ciddi avantaj sağlayacağını gösteren bulgular elde edilmiştir.

Çalışmamızda önemli bir endüstriyel atık olan melas, enzim üretiminde besiyeri olarak kullanılmıştır. Melas şeker elde etmek için şeker pancarının işlenmesi sırasında ortaya çıkan koyu kahve renkli koloidal bir atık maddedir. Şeker fabrikasında işlenen her 100 kg şeker pancarında 4 kg kadar melas oluşmaktadır. İçeriğinde kompleks polisakkaritler, invert şekerler, karbonhidrat olmayan bileşikler, koyu kahve renkli azot içeren polimerik bileşikler, inorganik iyonlar, malik asit, laktik asit, formik asit, asetik asit, propiyonik asit gibi organik asitler bulunmaktadır [28]. Melas şeker fabrikalarının atık maddelerinden olup, bu atık maddelerin üretimini yapan fabrikalarda tekrar değerlendirilmesi ve çevre kirlilik yükünün azaltılması oldukça önemlidir.

Çalışmanın amacı; Metiyonin gama liyazın, bakteriyel üretimi için, üretim şartlarında avantaj sağlayacak rekombinant sistem ve besi ortamı olarak da endüstriyel atık kullanılması yolu ile daha ucuz ve daha kaliteli enzim üretimini sağlamaya çalışmaktır. Bakterilerin MGL üretiminde kullanılacak temel değişkenler melasın değişik konsantrasyonları, farklı ortam pH'sı ve farklı sıcaklık dereceleri. İdeal hücre kültürlerinin yapılması [23], ekstraktların hazırlanması, enzim aktivitesinin ölçülmesi [29] standart metotlar kullanılarak yapılmıştır.

MATERYAL METOT

Kullanılan Kimyasallar, Bakteri Suşları ve Kültür Koşulları

Kullanılan kimyasallardan Metiyonin (Aldrich); PLP, merkaptolanol (Sigma), EDTA (Applichem), TCA (Across), 3-MBTH (Merk); sodyum asetat (Riedel-de Haen), potasyum fosfat ve dipotasyum fosfat (Sigma) kaynaklıdır. Bütün kimyasallar analitik ölçektir. Çalışmamızda *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ve onun *vgb+* (MK79) ve MK57 rekombinant suşları kullanılmıştır. Bu suşlar 4°C de saklanan petri içindeki stok kültürden koloni alınarak hazırlanan ve LB (Laura Broth)'den oluşan besiyerinde gece boyu büyütülmüş ve daha sonra, sabah %1'lik ve %2'lik melas içeren besiyeri ortamlarında çoğaltılmış ve enzim aktivitesine çeşitli değişkenlerin etkisi ölçülmüştür.

Metiyonin Gama Liyaz Aktivitesinin Ölçümü

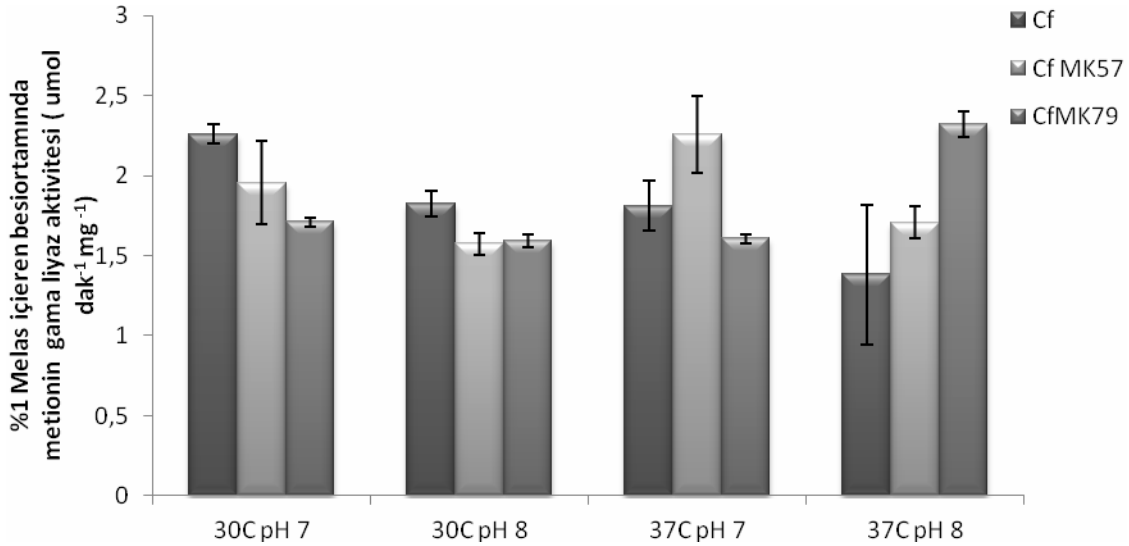
MGL üretimi için, bakteri ve suşlarının %1 ve %2 melas içeren kültürlerde çeşitli değişkenler kullanılarak 72 saat boyunca bir orbital çalkalayıcı üzerinde 200 rpm'de büyüme ve çoğalmaları sağlanmıştır. Rekombinant MGL aktivitesi standart metot [30,31] ile tespit edilmiştir. Enzim absorbansı 320 nm de ölçülmüştür. Bir enzim ünitesi 37 °C'de pH 8.0 'de dakikada L-metiyonin başına serbest kalan alfa-ketobütiratın 1.0 mikro molü olarak kabul edilmiştir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Yapılan ölçümlerde tüm bakterilerin, 37 °C ve pH 7'de en yüksek üreme değerlerine sahip olduğu gözlenmiştir (Tablo 1.). Bu koşullarda orijinal bakteri ile rekombinantlarının OD değerleri kıyaslandığında *vgb* içeren suşun en yüksek üreme değerlerine sahip olduğu gözlemlenmiştir. Bu durumu *vgb* nin organizmaya ileri kültür koşullarında sağladığı yaşamsal avantajların bir sonucu olarak yorumlanabilir. Bu koşullarda %1 oranında Melas içeren ortamda ölçülen enzim aktivitesi, OD değerleri ile paralellik göstermiş ve en düşük aktivite Cf de, daha sonra ise MK79 ve en yüksek aktivite ise MK 57 suşunda tespit edilmiştir (Şekil 2.).

Tablo 1. % 1'lik melas ortamı OD₆₀₀ değerleri

	30°C pH 7	30°C pH 8	37°C pH 7	37°C pH 8
Cf	0,7	0,7	1,1	0,7
Cf MK57	0,8	0,8	1,4	0,6
CfMK79	0,8	0,7	1,6	0,06



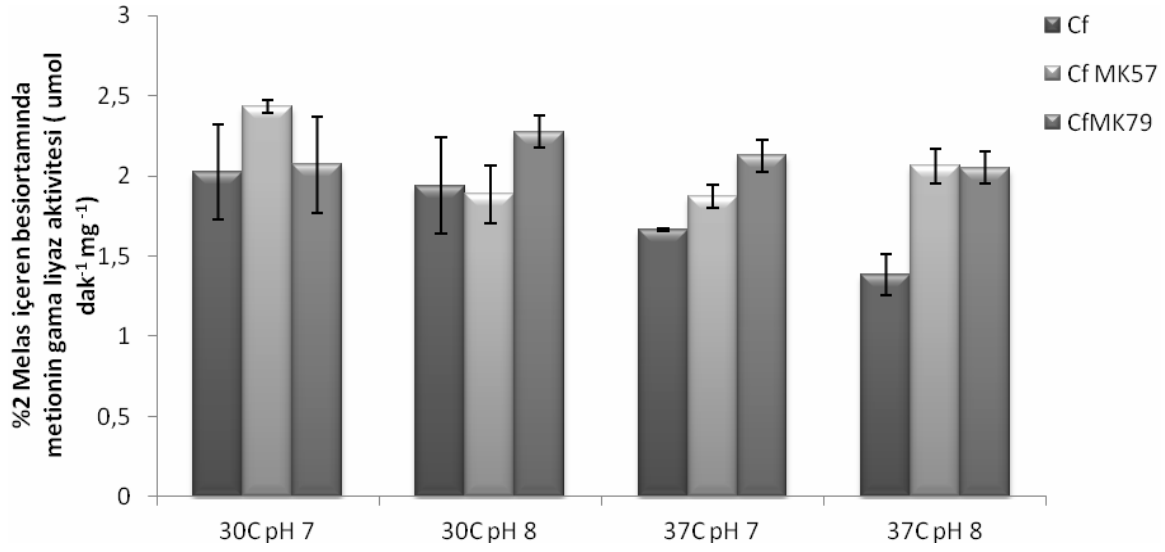
Şekil 2. % 1'lik Melas ortamında MGL aktivitesi.

Melas yapısında kuru madde formunda % 48-52 oranında sükröz şekerini içermektedir. Sükröz çay şekeri olarak bilinen ve glukoz ve fruktozun birleşmesi ile oluşan bir disakkarittir. *vgb* promotörü glukoz varlığında baskılandığı için *vgb* içeren suşun diğer rekombinantı göre daha düşük enzim aktivitesi göstermesi bu durumla ilişkilendirilebilir. Aynı koşullarda %2 Melas içeren ortamda OD değerlerinde (Tablo 2.) belirgin bir düşüş yaşanmış olmasına karşın enzim aktivitesinde belirgin bir fark tespit edilememiştir (Şekil 3.).

Tablo 2. %2'lik melas ortamı OD₆₀₀ değerleri

	30°C pH 7	30°C pH 8	37°C pH 7	37°C pH 8
Cf	0,9	0,8	0,8	0,9
Cf MK57	1,0	0,9	0,7	0,6
CfMK79	0,9	0,8	0,7	0,7

Melasın içerdiği uçucu asitlerin ortam pH sı üzerindeki etkisi (Tablo 3. ve Tablo 4.), artan melas konsantrasyonunda OD değerlerini sınırlamıştır. Ancak enzim aktivitesi açısından bu sınırlama gözlenmemiştir. 30 °C de ise pH 7 de %2 Melas içeren ortamda yüksek enzim değerleri ölçülmüştür. Tüm çalışma boyunca ölçülen en yüksek enzim değeri bu kültür koşullarında yaklaşık 2.4 ile Cf MK 57 suşunda tespit edilmiştir. Bu koşullarda doğal bakteri ile *vgb* rekombinantı yaklaşık bir enzim aktivitesi göstermiştir.



Şekil 3. % 2'lik Melas ortamında MGL aktivitesi.

Tablo 3. % 1'lik melas ortamı pH değerleri

	30°C pH 7	30°C pH 8	37°C pH 7	37°C pH 8
Cf	5,3	4,9	5,1	4,37
Cf MK57	8,4	8,4	8,3	8,5
CfMK79	8,4	8,4	8,3	8,3

Tablo 4. %2'lik melas ortamı pH değerleri

	30°C pH 7	30°C pH 8	37°C pH 7	37°C pH 8
Cf	6,6	6,4	5,9	5,7
Cf MK57	8,4	8,7	8,5	8,5
CfMK79	8,6	8,5	8,6	8,7

Aynı kültür koşullarında %1 lik melas içeren ortamda kültive edilen bakteriler arasında en yüksek enzim aktivitesi doğal suş Cf de tespit edilmiştir. MK 57 ve MK 79 suşlarında ise enzim aktivitesinde belirgin bir düşüş yaşanmıştır. Bu durum pH artışının bakteri yaşamını etkilemesi ile açıklanabilir çünkü bu şartlardaki kültür koşullarında rekombinant suşların kültür OD değerlerinde belirgin bir düşüş tespit edilmiştir. Bu besiyerinde 30°C de pH 8 lik koşullarda ise en düşük enzim değerleri ölçülmüştür. Bu durum melasın içeriğinde bulunan asitlerin etkisi oluşan ani düşüş ile izah edilebilir. % 2'lik Melas içeren ortamda 30 °C de pH 7 de ise, % 1 lik ortama göre enzim değerleri oldukça yüksek ölçülmüştür. Bu sonuç bakterilerin sukroz kaynaklı olarak enerji metabolitlerinin daha fazla olması ve buna bağlı yüksek OD değerlerine sahip olmaları ve yüksek enzim üretimleri ile açıklanabilir.

Ortam sıcaklığının 37 °C ve ortam pH'sinin 8 olduğu kültür koşullarında ise, % 1 melas içeren besi ortamında *vgb⁺* suş yüksek bir enzim aktivitesi gösterirken Cf ise tüm çalışmalardaki en düşük enzim değerini vermiştir. Bu şartlarda bu ölçüme *vgb⁺* suşun taşıdığı rekombinant sistemin katkısı olduğu düşünülmektedir. % 2 Melas içeren ortamda ise Cf bakterisi düşük bir enzim aktivitesi gösterirken MK 57 ve MK 79 suşları neredeyse aynı enzim aktivitesini göstermişlerdir. Üreme periyodu sonunda yani 72. saat sonunda ölçülen kültür ortamı değerlerinin tüm ölçümlerde paralellik gösteren bir düşüş içerisinde olduğu tespit edilmiştir. pH değerleri açısından doğal bakteri ve rekombinant suşlarının kendi içlerinde bir istikrar içinde oldukları belirlenmiştir. Cf de başlangıç pH değerleri tüm ölçümlerde pH 4-6 arasında olacak şekilde bir düşüş yaşarken, MK 57 ve MK 79 suşlarında bu aralık pH 8.3-8.7 aralığına yükselmiştir.

SONUÇLAR

Çalışmamızın amacı; Metiyonin gama liyazın, bakteriyel üretimi için, yeni bir ortamın ilk kez denenmesi yani besi ortamı olarak endüstriyel atık kullanılması yolu ile daha ucuz ve daha kaliteli enzim üretimini sağlamaya çalışmaktır. Kullandığımız rekombinant suşda bulunan Vhb'nin (MK79), etkin bir oksijen alım sistemi olarak enzim üretiminde önemli avantaj sağlayabilirliği bilinmektedir. Çalışmamızda da uygun besiyeri, sıcaklık, pH ve üreme zamanı tespiti ile belirli gruplarda Vhb'nin metiyonin gama liyaz üretiminde kayda değer bir artış sağladığı belirlenmiştir. Mikroorganizmaların sahip olduğu benzersiz metabolik kapasiteleri sayesinde gelişen biyoteknolojik proseslerde melas gibi bir endüstriyel atığın kullanımı ile değerli bir kemoterapi enziminin üretilebilirliğinin ispatlandığı bu çalışmamızda bu konudaki geliştirilebilir çalışmalarımız için ümit verici olmuştur. Çalışmamız özellikle, oksijenin bu enzim üretiminde sınırlayıcı rol oynaması nedeni ile, burada kullanılacak ve etkin bir oksijen alım sistemi olan Vhb MGL üretiminde önemli avantaj sağlayabilirliği temeli üzerine planlanmış ve tespit edilen sonuçlarda bu hedefin gerçekçi ve geliştirilebilir olduğunu göstermiştir.

REFERANSLAR

- [1] American Cancer Society. <http://www.cancer.org/cancer/cancerbasics/what-is-cancer/11.12.2016>
- [2] Kufe, DW., Pollock, Raphael E., Weichselbaum, RR., Bast, RC., Jr., Gansler, TS., Holland, JF., Frei, E. 2003. Cancer Medicine. 6th ed. BC Decker Inc.;
- [3] Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C., Krieger, M., Scott, M., Zipursky, L., Darnell, J. 2003. Molecular Cell Biology. Fifth Edition. W. H. Freeman & Co.; New York. 1112 pages.
- [4] Migliore, L., and Coppede F. 2002. Genetic and environmental factors in cancer and neuro- degenerative. Mutation Research. 512: 135-153.
- [5] Lewin, B., 1998. Genes VI. Oxford University Pres, Oxford, 1278 pages.
- [6] Vellard, M. 2003. The enzyme as drug: application of enzymes as pharmaceuticals. Curr. Opin. Biotechnol. 14: 444-450.

- [7] Sato D., Nozaki T. 2009. Methionine gamma-lyase: The unique reaction mechanism, Physiological roles, and therapeutic applications against infectious diseases and cancers. *IUBMB Life* 61(11) 1019–1028.
- [8] Dias, B., Weimer, B. 1998. Purification and Characterization of L-Methionine γ -Lyase from *Brevibacterium linens* BL2. *App. Environ. Microbiol.* 64(9) 3327- 3331.
- [9] Inoue, H., Inagaki, K., Eriguchi, S., Tamura, T., Esaki, N., Soda, K., Tanaka, H. 1997. Molecular Characterization of the *mde* Operon Involved in L-methionine Catabolism of *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* 179 (12) 3956-3962.
- [10] Lishko, V., Lishko, O and Hoffman, R. 1993. Depletion of serum Methionine by methioninase in mice. *Anticancer Research.* 13: 1465-1468.
- [11] Inoue, H., Inagaki, K., Adachi, N., Tamura, T., Esaki, N. 2000. Role of tyrosine 114 of L-methionine γ -lyase from *Pseudomonas putida*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64 (11): 2336-2343.
- [12] Takakura, T., Mitsushima, K., Yagi, S., Inagaki, K., Tanaka, H., Esaki, N., Soda, K., Takimoto, A. 2004. Assay method for antitumor L-methionine c-lyase: comprehensive kinetic analysis of the complex reaction with L-methionine. *Anal. Biochem.*, 327:233-240.
- [13] Geckil, H., Stark, BC., Webster, DA. 2001. Cell growth and oxygen uptake of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* are differently effected by the genetically engineered *Vitreoscilla* hemoglobin gene. *J. Biotechnol.*, 85: 57-66.
- [14] Erenler, SO., Gencer, S., Geckil, H., Stark, BC., and Webster, DA. 2004. Cloning and Expression of the *Vitreoscilla* Hemoglobin Gene in *Enterobacter aerogenes*: Effect on Cell Growth and Oxygen Uptake. *Applied Biochemistry and Microbiology*, Vol. 40, No.3pp.241-248.
- [15] Yamamoto, N., Gupta, A., Xu, M., Miki, K., Tsujimoto, Y., TsuchiyA, H., Tomita, K., Moossa, AR., Hoffman, RM 2003. Methioninase gene therapy with selenomethionine induces apoptosis in bcl-2-overproducing lung cancer cells. *Cancer Gene Therapy* 10: 445-450.
- [16] Kudou, D., Misaki, S., Yamashita, M., Tamura, T., Takakura, T., Yoshioka, T., Yagi, S., Hoffman, R., Takimoto, A., Esaki, N., Inagaki, K. 2007. Structure of the Antitumour Enzyme L-Methionine γ -Lyase from *Pseudomonas putida* at 1.8Å \circ . Resolution. *J. Biochem.*, 141:535-544.
- [17] Lockwood, BC., Coombs, GH. 1991. Purification and characterization of methionine γ -lyase from *Trichomonas vaginalis*. *Biochem. J.*, 279:675-682.
- [18] Takakura, T., Ito, T., Yagi, S., Notsu, Y., Itakura, T., Nakamura, T. 2006. High-level expression and bulk crystallization of recombinant L-methionine γ -lyase, an anticancer agent. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 70:183-192.
- [19] Kokkinakis, DM., Schold, S., Hori, H., Nobori, T. 1997. Effect of long-term depletion of plasma methionine on the growth and survival of human brain tumor xenografts in athmic mice. *Nutr. Cancer*, 29 (3):195-204.
- [20] Aydın, S., Geçkil, H., Çaylak, E., Kılıç, N. 2004. Mikroorganizmaların Kansere Tedavisinde Kullanımı. *Fırat Tıp Dergisi*, 9(2):30-34.
- [21] Takakura, T., Takimoto, A., Notsu, Y., Yoshida, H., Ito T., Nagatome, H., Ohno, M., Kobayashi, Y., Yoshioka, T., Inagaki, K., Yagi, S., Hoffman, R., Esaki, N. 2006.

Physicochemical and Pharmacokinetic Characterization of γ -Lyase Conjugated with Polyethylene Glycol as an Antitumor Agent. *Cancer Res.*, 66: (5)-2807-2814.

[22] Hoffman, R. 1997. Methioninase: A therapeutic for diseases related to altered methionine metabolism and transmethylation: Cancer, heart disease, obesity, aging, and Parkinson's disease. *The Japan Human Cell*, 10 (1)-69-80.

[23] Yang, Z., Wang, J., Yoshioka, T., Li, B., Lu, Q., Li, S., Sun, X., Tan, Y., Yagi, S., Frenkel, E., Hoffman, R. 2004. Pharmacokinetics, Methionine Depletion, and Antigenicity of Recombinant Methioninase in Primates. *Clin. Cancer Res.*, 10:2131-2138.

[24] Alferov, KV., Faleev, NG., Demidkina, TV., Khurs, EN., Morozova, EA., Khomutov, RM. 2006. Biologically active organophosphorous analogues of methionine in reactions catalyzed by L-methionine γ -lyase. *Doklady Biochem. Biophys.*, 407:102-105.

[25] Tabakov, V., Emel'ianova, LK., Antonova, SV., Voelkova, TA. 2001. Effect of the gene for bacterial hemoglobin *vhb* on the effectiveness of the process of *Escherichia coli*-*Streptomyces* interspecies conjugation and production of antibiotics in streptomycetes. *Genetika* 37:422-425.

[26] Wei, ML., Webster, DA., Stark, BC. 1998. Genetic engineering of *Serratia marcescens* with bacterial hemoglobin gene: effects on growth, oxygen utilization, and cell size, *Biotechnol Bioeng.*, 57:477-483.

[27] Erenler, SO, Geckil, H. 2014. Effect of vitreoscilla hemoglobin and culture conditions on production of bacterial L-asparaginase, an oncolytic enzyme. *Appl Biochem Biotechnol.* 173(8):2140-51.

[28] Kahyaoğlu, M., Konar, V. 2006. *Şeker Fabrikası Atık Maddeleri Kullanılarak Pseudomonas aeruginosa'dan Ramnolipit Biyosüfektanı Elde Edilmesi*, *Fırat Ün. Fen ve Müh. Bilim. Dergisi* 18:493-498.

[29] Coombs GH., Mottram J. 2001. Trifluoromethionine, a Prodrug Designed against Methionine γ -Lyase-Containing Pathogens, Has Efficacy in vitro and in vivo against *Trichomonas vaginalis*. *Antimicrob. Agents. Ch.*, 45 (6):1743-1745.

[30] Tanaka, H., Imahara, H., Esaki, N. and Soda, K. 1980. Selective determination of L-methionine and L-cysteine with bacterial L-methionine γ -lyase and anti-tumor activity of the enzyme. *J. Appl. Biochem.* 2, 439-444.

[31] Soda, K. 1968. Microdetermination of D-amino acids and D-amino acid oxidase activity with 3-methyl-2-benzothiazolone hydrazone hydrochloride. *Anal. Biochem.* 25, 228-235.