

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**REAKSİYON MÜHENDİSLİĞİ PRENSİPLERİYLE
REKOMBİNANT L-FENİLALANIN ÜRETİMİ İÇİN
BİYOPROSES GELİŞTİRİLMESİ**

YASEMİN DEMİRCİ

KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2006**

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

REAKSİYON MÜHENDİSLİĞİ PRENSİPLERİYLE REKOMBİNANT L-FENİLALANIN ÜRETİMİ İÇİN BİYOPROSES GELİŞTİRİLMESİ

Yasemin Demirci

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. H. Tunçer ÖZDAMAR

Aromatik amino asit yolizinde DAHP sentetaz (gen: *aroA*) enziminin katalizlediği ilk tepkime ile korizmat mutaz (gen: *aroH*) enziminin katalizlediği korizmat'tan pefenat oluşum tepkimeleri rekombinant L-fenilalanin üretiminde iki kısıtlayıcı tepkime olarak belirlendiğinden, bu iki konuma yönelik olarak rekombinant-*Bacillus subtilis* ve biyoproses geliştirilmesi araştırma programının temel amacıdır. Beş alt-programdan oluşan araştırma programının ilk alt-programında biyokimyasal reaksiyon mühendisliği teknikleri kullanılarak DAHP sentetaz enziminden sorumlu *aroA* geni, *aroH* geni içeren ve içermeyen pUC19 *E.coli* plasmidlerine paralel olarak yapışkan-uç ligasyon tepkimesi ile klonlanmış, ardından pMK4 ve pMK4::*aroH* *E.coli*-*Bacillus* shuttle plasmidlerine sub-klonlama yapılmış ve geliştirilen pMK4::*aroA*::*aroH* ve pMK4::*aroA* plasmidleri ayrı ayrı *Bacillus subtilis* A-263'e aktararak iki r-*B.subtilis* geliştirilmiştir. İkinci alt-programda, geliştirilen r-*Bacillus subtilis* A-263 ve doğal *Bacillus subtilis* A-263 ile $V_R=0.11 \text{ dm}^3$ çalışma hacimli biyoreaktörlerde, $T=37^\circ\text{C}$, $N=200 \text{ dk}^{-1}$ ve $\text{pH}_0=6.8$ işletme koşullarında glukozun karbon kaynağı olarak kullanıldığı tanımlanmış üretim ortamında L-fenilalanin üretim performansları karşılaştırılmıştır. Bu koşullarda en yüksek L-fenilalanin derişimine ($C_{\text{phe}}=1.38 \text{ kgm}^{-3}$) pMK4::*aroA*::*aroH* taşıyan r-*Bacillus subtilis* A-263 ile ulaşılmıştır. Üçüncü alt-programda, laboratuvar ölçekte geliştirilen koşullarda, $V_R=0.55 \text{ dm}^3$ hacimli, mekanik karıştırmalı, pH, sıcaklık, çözünmüş oksijen ve karıştırma hızı kontrollü pilot-ölçek kesikli biyoreaktörlerde L-fenilalanin üretimine oksijen aktarımının etkisi sistematik bir programla; $Q_0/V_R=0.2, 0.35, \text{ ve } 0.5 \text{ vvm}$ hava giriş hızlarında, $N=500 \text{ ve } 750 \text{ dk}^{-1}$ karıştırma hızlarında oluşturulan oksijen-aktarım koşullarında araştırılmıştır. Glukoz, hücre, L-fenilalanin, amino asit ve organik asit derişimleri ölçülmüştür. En yüksek L-fenilalanin üretimi ($C_{\text{phe}}=1.5 \text{ kgm}^{-3}$) $Q_0/V_R=0.5 \text{ vvm}$, $N=500 \text{ dk}^{-1}$ oksijen aktarım koşullunda elde edilmiştir. Dördüncü alt-programda belirlenen periyotlarda oksijen aktarım koşullarında elde edilen veriler kullanılarak, 150 tepkime ve 110 metabolit içeren hücreiçi biyokimyasal-tepkime sistemi için kurulan matematik model çözülmüş ve, tepkime akıları ve dağılımı bulunarak sonuçlar yorumlanarak değerdendirilmiştir.

2006, 273 sayfa

Anahtar Kelimeler: L-fenilalanin, reaksiyon mühendisliği, metabolik mühendislik, *aroA*, *aroH*, rekombinant *Bacillus subtilis*, biyoreaktör, oksijen aktarımı, hücreiçi tepkimeler

ABSTRACT

Master Thesis

BIOPROCESS DEVELOPMENT FOR RECOMBINANT L-PHENYLALANINE PRODUCTION BY REACTION ENGINEERING PRINCIPLES

Yasemin DEMİRCİ

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemical Engineering

Supervisor: Prof. Dr. H. Tunçer ÖZDAMAR

The reactions catalysed by DAHP sentetase (EC 2.5.1.54) and chorismate mutase (EC 5.4.99.5) in the L-phenylalanine pathway of *Bacillus subtilis* were predicted as the rate-limiting steps. To overcome the limitation of the reactions and to increase the yield and selectivity in L-phenylalanine production, by metabolic engineering design and research program, *aroA* and *aroH* genes encoding, respectively, DAHP sentetase and chorismate mutase were cloned one by one first onto an *E.coli* plasmid. *aroA* gene was cloned first onto the pUC19 and pUC19::*aroH* with the sticky-end reactions, and then sub-cloned onto a multicopy *Bacillus-E.coli* shuttle vectors pMK4 and pMK4::*aroH* for developing two r-*Bacillus subtilis* A-263 carrying pMK4::*aroA*::*aroH* and pMK4::*aroA* strains, were transferred into *Bacillus subtilis* A-263. L-phenylalanine production performance of r-*Bacillus subtilis* A-263 and wild type *Bacillus subtilis* A-263 were compared on a defined medium with sole carbon source glucose at T=37 °C, N=200 dk⁻¹ ve pH₀=6.8 operation conditions in V_R=0.11 dm³ laboratory scale bioreactors. The highest L-phenylalanine concentration was obtained (C_{phe}=1.38 kgm⁻³) by r-*Bacillus subtilis* A-263 carryng pMK4::*aroA*::*aroH*. Thereafter, the effects of oxygen transfer on L-phenylalanine production were investigated at pH₀=6.8 and T=37°C at five different oxygen transfer conditions in V_R=0.55 dm³ pilot-scale batch-bioreactors consisted of systems having temperature, pH, foam, dissolved oxygen, air inlet, stirring controls. L-phenylalanine, cell, amino acids and organic acids were measured. The oxygen transfer contion Q_o/V_R=0.5 vvm, N=500 min⁻¹ (MOT1 condition) produced maximum L-phenylalanine as C_{phe}=1.5 kgm⁻³. Lastly in order to generate a deep understanding, metabolic flux analysis for the five oxygen transfer condition, moreover, the fluxes at MOT1 conditions for the three r-*B.subtilis*, i.e., r-*B. subtilis* carrying pMK4::*aroH*, r-*B. subtilis* carrying pMK4::*aroA*, and r-*B. subtilis* carrying pMK4::*aroA*::*aroH*, were calculated using the data obtained in pilot-scale bioreactor experiments. The results shows the successful pathway flux amplification achieved by the metabolic engineering design in the aromatic amino acid pathway toward L-phenylalanine.

2006, 273 pages

Key Words: L-phenylalanine, reaction engineering, metabolic engineering, *aroA*, *aroH*, recombinant *Bacillus subtilis*, bioreactor, oxygen transfer intracellular reactions,

ÖNSÖZ

“Reaksiyon mühendisliği prensipleriyle rekombinant L-fenilalanin üretimi için biyoproses geliştirilmesi” konulu bu çalışma Ankara Üniversitesi Biyokimyasal Reaksiyon Mühendisliği Araştırma Grubu’nda yürütülmüş, TÜBİTAK Mühendislik araştırma Grubu Misag-210 ve Misag-275 projeleri ile desteklenmiştir.

2003 yılında Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü’nden mezun olduktan sonra Eylül 2003’te A.Ü Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı’nda yüksek lisans çalışmalarına başladım. Yüksek lisans ders dönemi süresince araştırma grubumuzda yürüten diğer lisans-üstü araştırmalara programlı bir şekilde katıldım. Böylece genetik mühendisliği araştırma teknikleri, biyoreaktör sistemlerinin hazırlanması ve işletilmesi, laboratuvar sorumluluklarım ve diğer cihazların kullanımı ile ilgili uyum ve gelişme sürecini kısa sürede tamamladım.

Yüksek lisans çalışmalarına literatür araştırması yaparak başladım; tez projemi hazırladım. Kısa bir süre sonra da tez projem kapsamında deneysel çalışmalarımın ön hazırlıklarını gerçekleştirdim. Büyük bir istek ve heyecanla çalışmamın birinci aşaması olan metabolik mühendislik tasarımı ile rekombinant mikroorganizma geliştirilmesi çalışmamın en heyecanlı bölümüydü. Çok sayıda tekrarlar ve paralel olarak gerçekleştirdiğim klonlama tepkimeleri aşamasında genimin büyük olmasından kaynaklanan sorunları aşmak için yeni bir metabolik mühendislik tasarımı düşündüm; zaman zaman sıkıntılı günler geçirdim, sonuçta dört metabolik tasarım gerçekleştirdim ve sonuncusunda başardım. Bu başarıdan sonra, araştırma programımın sonraki aşamalarına daha da istek ve merakla devam ettim. Pilot-ölçek üretim deneylerimde merakla beklediğim sonuçları ve proses süresince uykusuz kaldığım günleri ve geçirdiğim yorucu fakat bir o kadar da eğlenceli anıları hiç unutmayacağım.

Yüksek lisans öğrenimim TÜBİTAK Bilim Adamı Yetiştirme Grubu “yüksek lisans” bursu ile desteklendi; maddi desteği yanında benim için manevi ve bilim dünyasındaki değeri büyük olan bu bursu kazandığım için çok mutluyum

Yüksek lisans çalışmamı Kimya Mühendisliği Bölümü Proses ve Reaktör Tasarımı Anabilim Dalında, Endüstriyel Biyoteknoloji alanındaki mükemmel araştırma altyapısını kullanarak Prof. Dr. H.Tunçer Özdamar danışmanlığında sürdürdüm. Lisans ve yüksek lisansa başladığım andan itibaren her aşamada çalışmalarımı ilgi ile takip eden, yüksek lisans araştırmalarımnda özellikle

metabolik mühendislik tasarımlarım ile ilgili klonlama çalışmalarında geçirdiğim sıkıntılı günlerimde bana her zaman destek veren, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, araştırmalarım sırasında sonuçların yorumlanması, değerlendirilmesi, gerektiğinde alternatif çözüm yöntemlerin bulunması ve istediğim her zaman benimle tartışma ortamı ve iyi bir bilim adamı olarak yetişmem için bana her türlü imkanı sağlayan danışman hocam Sayın Prof. Dr. H. Tunçer Özdamar'a içtenlikle teşekkür ederim.

Yüksek lisans araştırmalarımdaya fiilen ikinci danışman olarak genetik mühendisliğı bilgi birikiminde çok yararlandığım, araştırma sonuçlarımın değerlendirilmesinde ve her aşamada karşılaştığım problemlerde hiç çekinmeden danıştığım, gerektiğinde laboratuvarlarında çalışma imkanı sağlayan, tezimin yazımında görüş ve eleştirilerinden yararlandığım ODTÜ Kimya Mühendisliğı öğretim üyesi hocam Sayın Prof. Dr. Pınar Çalık'a çok teşekkür ederim.

Araştırma grubumuzun haftalık pazartesi toplantılarında ve her zaman bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, hoşgörü ve yardımları ile manevi desteğini esirgemeyen, tezimin yazımında eleştirilerinden çok yararlandığım hocam Sayın Prof. Dr. Güzide Çalık'a çok teşekkür ederim.

Araştırma grubumuza yeni geldiğimde deneyimlerini benimle paylaşan ve özellikle laboratuvarlara uyum sürecinde bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım Sayın Dr. İlknur Şenver Özçelik'e teşekkür ederim.

Araştırmalarım sırasında karşılaştığım problemlerde manevi olarak desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, gerektiğinde deneyimi ve sistemimi gönül rahatlığı ile emanet edebildiğim, biyoreaktör deneylerim sırasında gece yanımda kalan çok yakın arkadaşım KM Birgül Şentürk'e teşekkür ederim. Çalışmalarım süresince bana her zaman destek veren arkadaşlarım KM Nurhan Güngör, KM Hande Kaya ve Biyolog Arda Büyüksungur'a çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans çalışmalarım sırasında ve öncesinde maddi ve manevi desteklerini başarılı bir bilim insanı olabilmem için hiçbir zaman esirgemeyen, bana her zaman güvenen ve her konuda benim büyük moral kaynağım olan sevgili babam Bahattin Demirci, sevgili annem Sevim Demirci ve sevgili kardeşim Çiğdem Demirci'ye teşekkür ederim.

Yasemin DEMİRCİ

Ankara, Eylül 2006

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ.....	iii
SİMGELER DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xviii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xxii
GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	9
2.1 Mikroorganizma.....	10
2.1.1 Mikrobiyolojik yapı.....	11
2.2.1.1 Prokaryotik hücreler.....	11
2.2.1.2 Ökaryotik hücreler.....	12
2.1.2 Bakteriler.....	13
2.1.2.1 <i>Bacillus</i> türü mikroorganizmalar.....	15
2.1.2.1.1 <i>Bacillus subtilis</i> ve özellikleri.....	16
2.2 Genetik Mühendisliği Teknikleri.....	17
2.2.1 Nükleik asitler.....	17
2.2.2 DNA yapısı ve fonksiyonu.....	19
2.2.3 RNA ve fonksiyonları.....	22
2.2.4 Mikro-reaksiyon mühendisliği ve mikro-ayırma işlemleri.....	23
2.2.4.1 DNA'nın kimyasal sentezi.....	23
2.2.4.2 Gen dizininin belirlenmesi.....	24
2.2.4.3 Polimeraz zincir tepkimesiyle (PCR) gen derişiminin artırılması.....	25
2.2.4.4 Gen derişiminin ölçümü.....	27
2.2.4.5 Restriksiyon enzimleri ve seçimi.....	28
2.2.4.6 Plasmidler ve özellikleri.....	29
2.2.4.7 Klonlama : Ligasyon tepkimesi.....	31
2.2.4.8 Genin hücreye transferi.....	32
2.2.4.9 Geni taşıyan plasmidlerin bulunması.....	35
2.3 Biyoproses Karakteristikleri.....	37

2.4 Biyoreaktör İşletim Parametreleri.....	40
2.4.1 Sıcaklık	40
2.4.2 pH	40
2.4.3 Oksijen aktarımı	41
2.5 Metabolik Mühendislik.....	49
2.51 Hücre-içi tepkimeler.....	50
2.5.1.1 Katabolik tepkimeler.....	52
2.5.1.2 Anabolik tepkimeler.....	53
2.5.2 Hücre-içi tepkime hızlarının reaksiyon mühendisliği prensipleriyle belirlenmesi ve analizi: Metabolik akı analizi (MAA).....	54
2.6 Amino Asitler.....	64
2.6.1 L-Fenilalanin ve özellikleri.....	66
2.6.2 L-Fenilalanin önemi ve kullanım alanları.....	66
2.6.3 L-Fenilalanin üretim yöntemleri.....	67
2.7 L-Fenilalanin üretimi ile ilgili kaynak araştırması.....	67
2.7.1 Mikroorganizma.....	68
2.7.1.1 L-Fenilalanin üretimi için kullanılan rekombinant mikroorganizmalar.....	68
2.7.2 Üretim ortamı bileşenlerinin etkisi.....	72
2.7.3 Biyoreaktör işletim türü ve hidrodinamiği.....	73
2.7.3.1 Oksijen aktarımı	74
2.7.3.2 Hidrojen iyonu derişimi (pH).....	75
2.7.3.4 Sıcaklık	75
2.7.4 Metabolik mühendislik temelli araştırmalar.....	75
3. MATERYAL VE METOD.....	85
3.1 Kimyasal Maddeler.....	85
3.2 Mikroorganizma.....	85
3.2.1 Mikrobank (mikroorganizma saklama sistemi).....	86
3.3 Katı Çoğalma Ortamı	86
3.4 Ön-sıvı Çoğalma Ortamı.....	87
3.5 Üretim Ortamı.....	87
3.6 Ölçek Büyütme Adımları ve Biyoreaktör Sistemi.....	88

3.6.1 Pilot ölçek biyoreaktörde üretim.....	89
3.7 Analitik Yöntemler.....	91
3.7.1 Mikroorganizma derişimi.....	91
3.7.2 Amino asit derişimleri.....	91
3.7.3 Protein derişimleri.....	92
3.7.4 Organik asit derişimleri.....	93
3.7.5 Glukoz derişimi (DNS Yöntemi).....	94
3.8 Sıvı faz kütle aktarım katsayısının ve oksijen tüketim hızının belirlenmesi.....	94
3.9 Metabolik Akı Analizi için Hücre-içi Tepkime Sistemi.....	96
3.10 Rekombinant <i>Bacillus</i> Türü Geliştirilmesinde Kullanılan Genetik Mühendisliği Teknikleri.....	103
3.10.1 Enzimler, Markerlar , Kitler.....	105
3.10.2 Kromozomal DNA izolasyonu.....	105
3.10.3 Gen derişiminin belirlenmesi	106
3.10.4 PCR cihazıyla gen derişiminin artırılması.....	106
3.10.5 Ligasyon tepkimesiyle klonlama.....	107
3.10.6 Restriksiyon enzimleri ile kesme tepkimesi.....	108
3.10.6 DNA dizin analizi.....	109
3.10.7 Plasmid DNA'nın <i>E.coli</i> 'ye CaCl ₂ yöntemiyle transferi.....	109
3.10.7.1 CaCl ₂ Yöntemi.....	109
3.10.8 <i>E.coli</i> 'den plasmid DNA izolasyonu.....	110
3.10.9 DNA'nın agaroz jelden ekstraksiyonu.....	111
3.10.10 Elektroporasyonla plasmid DNA'nın <i>Bacillus</i> türlerine transferi.....	111
3.10.11 <i>Bacillus</i> 'tan miniprep plasmid DNA izolasyonu: alkali liziz yöntemi.....	112
4. DENEY VE BULGULAR.....	115
4.1 Metabolik Mühendislik Araştırma Programı.....	115
4.1.1 İki-gen sistemi oluşturarak tasarım (Tasarım-I).....	116
4.1.1.1 Primer tasarımı ve PCR ile gen derişiminin artırılması.....	116
4.1.2 İki-gen sistemi oluşturarak tasarım (Tasarım-II).....	119

4.1.2.1 Primer tasarımı ve PCR ile gen derişiminin artırılması.....	120
4.1.3 <i>aroA</i> ve <i>aroH</i> genlerinin birer-birer klonlanması (Tasarım-III).....	123
4.1.3.1 Primer tasarımı ve PCR ile gen derişiminin artırılması.....	124
4.1.3.1.1 PCR ile gen derişimi artırılması için kalıp seçimi.....	124
4.1.3.1.2 PCR ile gen derişiminin artırılması	125
4.1.3.2 <i>aroA</i> geninin <i>E.coli</i> plasmidine klonlanması, <i>E.coli</i> 'ye transformasyonu ve <i>E.coli</i> ' de derişiminin artırılması.....	128
4.1.3.3 <i>aroA</i> geninin <i>Bacillus-E.coli</i> shuttle plasmidine sub-klonlanması ve <i>E.coli</i> 'ye transformasyonu	135
4.1.3.4 Tek-gen <i>aroA</i> ve iki-gen sistemi taşıyan plasmidlerinin <i>B. subtilis</i> 'e aktarılması.....	139
4.2 Rekombinant Hücrelerin L-Fenilalanin Üretim Performanslarının Kıyaslanması.....	140
4.3 Oksijen Aktarımı Etkileri	145
4.3.1 Oksijen aktarım karakteristikleri.....	165
4.4 Metabolik Mühendislik Tasarımlarının L-Fenilalanin Üretimine Etkisi.....	172
4.4.1 Oksijen aktarım karakteristikleri	191
4.5 Hücre-İçi Tepkime Hızları.....	197
4.5.1 Oksijen aktarımının hücre-İçi tepkime hızlarına etkisi.....	197
4.5.2 Metabolik tasarımların hücre-İçi tepkime hızlarına etkisi.....	205
5. TARTIŞMA VE YORUM	214
5.1 L-Fenilalanin Üretimi için Rekombinant Mikroorganizma Geliştirilmesi.....	215
5.2 pMK4:: <i>aroA</i> :: <i>aroH</i> Taşıyan r- <i>B.subtilis</i> ile L-Fenilalanin Üretimine Oksijen Aktarımının Etkisi.....	217
5.3 Üç rekombinant <i>B.subtilis</i> 'in Biyoproses Karakteristikleri	224
6 SONUÇLAR.....	234
6.1 Rekombinant Mükroorganizma Geliştirilmesi.....	234
6.2 Laboratuvar ölçekli üretim.....	234
6.3 Pilot ölçekli üretim.....	234
6.4 Hedeflenen Çalışmalar.....	236

KAYNAKLAR.....	237
EKLER.....	243
EK 1 Genetik mühendisliği araştırma programında kullanılan çözeltilerin bileşimi.....	243
EK 2 <i>Bacillus</i>'tan miniprep plasmid DNA izolasyonunda kullanılan çözeltiler.....	245
EK 3 DNS Yöntemi ile toplam indirgenmiş şeker analizi için reaktif hazırlanması.....	246
EK 4 Mikroorganizma derişimi için kalibrasyon eğrisi.....	247
EK 5 Glukoz derişimi için kalibrasyon eğrisi.....	248
EK 6 <i>aroA</i> geninin nükleik asit dizini.....	249
EK 7 <i>aroA</i> geni ileri primer dizini ve termodinamik özellikleri.....	250
EK 8 <i>aroA</i> geni geri primer dizini ve termodinamik özellikleri.....	251
EK 9 Genetik Mühendisliği araştırma programında kullanılan markerlar ve büyüklükleri	252
EK 10 GAMS paket programı ile metabolik akı analizi için matematik modelin çözümünde kullanılan program.....	253
EK 11 Deney verileri.....	261
ÖZGEÇMİŞ.....	273

SİMGELER DİZİNİ

$c(t)$	Metabolit birikim vektörü
$c_1(t)$	Hücre dışı metabolit birikim vektörü
$c_2(t)$	Hücre içi metabolit birikim vektörü
C_{AA}	Toplam amino asit derişimi, kgm^{-3}
C_G	Glukoz derişimi, kgm^{-3}
C_{G0}	Başlangıç glukoz derişimi, kgm^{-3}
C_O	Çözünmüş oksijen derişimi, molm^{-3}
C_O^*	Oksijen doygunluk derişimi, mol m^{-3}
C_{OA}	Toplam organik asit derişimi, kgm^{-3}
C_{phe}	L-fenilalanin derişimi, kgm^{-3}
C_x	Hücre derişimi, kgm^{-3}
Da	Damköhler sayısı (OD/OTR_{maks} ; maksimum oksijen tüketim hızının maksimum kütle aktarım hızına oranı)
E	Artma faktörü ($=K_L a/K_L a_0$)
G/V	Gen/vektör oranı
$K_L a$	Sıvı faz hacimsel kütle aktarım katsayısı, s^{-1}
N	Karıştırma hızı, dk^{-1}
N_A	Oksijen aktarım hızı (OTR): $N_A = K_L a(C_O^* - C_O)$, $\text{mol/m}^3 \text{ s}$
OD	Maksimum oksijen tüketim hızı ($= \mu_{\text{max}} * C_X/Y_{X/O}$), $\text{mol/m}^3 \text{ s}$
pH_0	Başlangıç pH değeri
PCR	Polimeraz zincir tepkimesi
q_p	Birim zamanda birim hücre başına L-fenilalanin miktarı, kg/ kg st
$-r_O$	Oksijen tüketim hızı: (OUR), $-r_O$, $\text{mol/m}^3 \text{ s}$
r_p	L-fenilalanin üretim hızı, $\text{kg/m}^3 \text{ st}$
r_x	Hücre çoğalma hızı, $\text{kg/m}^3 \text{ st}$
S_p	L-fenilalaninin toplam amino asit derişimine oranı
t	Kalma süresi, s veya st
T	Sıcaklık, $^{\circ}\text{C}$
Q_0/V_R	Birim hacime gönderilen gaz hızı, hacim/hacim dk (vvm)
V_R	Biyodönüşüm ortamı hacmi, dm^3

$Y_{X/S}$	Substrat başına hücre verimi
$Y_{X/O}$	Tüketilen oksijen başına hücre verimi
$Y_{P/S}$	Tüketilen substrat başına ürün verimi
$Y_{P/X}$	Hücre başına ürün verimi
Z	Amaç fonksiyon

Yunan Harfleri

λ	Dalga boyu, nm
μ	Spesifik çoğalma hızı, s^{-1}
μ_{max}	Maksimum spesifik çoğalma hızı, s^{-1}
α_i	Stokiyometrik katsayılar
η	Etkinlik katsayısı (= OUR/OD; oksijen tüketim hızının maksimum oksijen tüketim hızına oranı)

Kısaltmalar

AccCoA	Asetil koenzim A
ADP	Adenozin 5'-difosfat
ATP	Adenozin 5'-trifosfat
DAHP	3-deoksi-D-arabino-heptulozonat 7-fosfat
E4P	Eritroz 4-fosfat
F6P	Fruktoz 6-fosfat
G6P	Glukoz 6-fosfat
α -KG	Alfa ketoglutarik asit
OA	Okzaloasetik asit
PEP	Fosfoenolpiruvat
L-Phe	L-fenilalanin
PFY	Pentoz fosfat yolizi
R#	Reaksiyon numarası
R5P	Ribuloz 5-fosfat
TCA	Trikarboksilik asit

T3P Trioz 3-fosfat

Metabolik tepkime sistemi ile ilgili kısaltmalar

AacAc	L-amino-Aseto-Asetate
AcAc	Asetoasetat
Ac	Asetat
Ac-AK	N-asetil-L-2-amino-6-ketopimelat
Aclac	Asetolaktat
AcCoA	Asetil koenzim A
Ac-DAP	N-asetil-L,L-diaminopimelat
AcGlu	N-asetil glutamate
AcGluP	N-asetil glutamil-P
AcGluSa	N-asetil-glutamat-semialdehid
AcHbut	2-aseto-2 hidroksi bitürat
AcHser	O-asetil-L-homoserin
AcrCoA	Akrilil koenzim A
AcOrn	Asetil ornitin
Adip	Adipat
AdipCoA	3-okzo Adipil koenzim A
ADP	Adenozin 5'-difosfat
ADPHep	ADP-D-gliserol-D-mannoheptoz
AEL	3-okzo Adipat-enol-lakton
L-Ala	L-Alanin
AMP	Adenozin 5'-monofosfat
Anth	Antranilat
L-Arg	L-Arginin
L-Asn	L-Asparajin
L-Asp	L-Aspartik asit
AspgP	4-asperjil-P
AspSa	Aspartat semialdehid

ATP	Adenozin 5'-trifosfat
C14:0	Miristik asit
C14:1	Hidroksimiristik asit
CaP	Karbamoil-fosfat
Cat	Katekol
CDP	Sitidin 5'-difosfat
CDPEtN	CDP-etanolamin
Chor	Korizmat
Cit	Sitrate
Citr	Sitrulin
ChisoCap	3-karboksi, 3-hidroksi izocaproat
CMP	Sitidin 5'-monofosfat
CMPKDO	CMP-3-deoksi-D-manno-oktulozonik asit
CO ₂	Karbondioksid
CPADRib	1-(2-karboksifenilamino)-1'-dehidroksiribuloz-5'-P
CrotCoA	Krotonil koenzim A
CTP	Sitidin 5'-trifosfat
L-Cys	L-Sistein
L-Cysn	L-Sistationin
CV3Pshik	O-(1-karboksivinil)-3-P-şikimat
DAP	diaminopimelat
DATP	2'-Deoksi-ATP
DCTP	2'-Deoksi-CTP
DGTP	2'-Deoksi-GTP
DTTP	2'-Deoksi-TTP
DShik	3-dehidroşikimat
DQui	3-dehidrokinat
L-DC	L-2,3 dihidrodipikolinat
DDDH7P	7P-2 dehidro-3-deoksi-D-arabinoheptonat
DHF	7,8-Dihidrofolat
Gloc	Glukonik asit
Disoval	2,3- Dihidroksiizovalerat

DMV	2,3-dihidroksi-3-metilvalerat
E4P	Erithroz 4-fosfat
FacAc	Fumarilasetoasetat
F10THF	N ¹⁰ -Formil-THF
F6P	Fruktoz 6-fosfat
FA	Yağ asitleri
FADH	Flavin adenindinükleotid (indirgenmiş)
Fglu	N-forminiol-glutamat
FKV	N-Formil-kinurenin
For	Format
Fum	Fumarat
G1P	Glukoz 1-fosfat
G6P	Glukoz 6- fosfat
GDP	Guanozin 5'-difosfat
GL3P	Gliserol 5- fosfat
Glc	Glukoz
L-Gln	L-Glutamin
L-Glu	L-Glutamat
Gluc	Glukonat
Gluc6P	Glukonat 6-fosfat
GluCoA	Glutaril koenzim A
GlucCoA	Glutakonil koenzim A
L-GluP	L-Glutamil-P
GluSa	Glu-5-semialdehid
Glx	Gliokzalat
L-Gly	L-Glisin
GMP	Guanozin 5'-monofosfat
GTP	Guanozin 5'-trifosfat
HBCoA	3-hidroksibutiril koenzim A
L-Hcys	L-homosistein
Hgen	Homojentisat
H ₂ S	Hidrojen sülfid

HIBCoA	β -hidroksiisobutiril koenzim A
Hibut	Hidroksiisobutirat
L-His	L-Histidin
HMGCoA	Hidroksimetil glutakonil koenzim A
HPP	4-hidroksifenil pirüvat
Hprop	3-hidroksipropiyonat
HpropCoA	3-hidroksipropiyonil koenzim A
Hpyr3P	3-P-Hidroksiprüvat
HPPyr	4-hidroksifenilpirüvat
HSer	Homoserin
HserP	O-fosfo-L-homoserin
IbutCoA	Izobutiril koenzim A
Icit	Izositrat
IGP	Indolegliserolfosfat
L-Ile	L-Izolözin
IMP	Inozinmonofosfat
Iprop	4-imidazolon-5-propiyonat
IpropMal	3-izopropilmalat
IvalCoA	İzovalerat koenzim A
α KG	α -ketoglutarat
KisoAsp	Ketoizo Aspartat
Kval	Ketovalin
L-KV	L-Kinurenin
Lac	Laktat
L-Leu	L-Lözin
L-Lys	L-Lizin
MACoA	metil Akril koenzim A
MAcAc	4-maleil AsetoAsetat
MacCoA	2-metil-aseto-asetil koenzim A
Mal	Malat
MalSa	Malonat semialdehid
MCCoA	β -metilcrotonil koenzim A

mDAP	mezo-Diaminopimelat
L-Met	L-Metionin
MetBCoA	2-metil-butiril koenzim A
MeTHF	N ⁵ - N ¹⁰ -metenil-THF
MetTHF	N ⁵ - N ¹⁰ -methilen-THF
MGCCoA	Metil glutakonil koenzim A
MhbCoA	2-metil-3-hidroksibutiril koenzim A
mMalSa	metilmalonat semialdehid
MTHF	N ⁵ - metil-THF
Muc	sis Mukonat
NADH	Nikotinamid-adenindinükleotid (indirgenmiş)
NADPH	Nikotinamid-adenindinükleotid fosfat (indirgenmiş)
NH ₃	Amonyak
OA	Okzaloasetat
OacSer	o-asetilserin
Obut	2-okzobitürat
Orn	Ornitin
Oval	2-okzo-3-metilvalerat
OisoCap	2-okzoizocaproat
Ox	Oksalat
PEP	Fosfoenolpirüvat
PG3	Gliserat 3-fosfat
Phe	L-fenilalanin
PhePyr	Fenilpiruvat
Pi	Inorganik ortofosfat
PPi	Inorganik pirofosfat
PRAIC	5'-fosforibozil-4-karboksamid-5-aminoimidazol
PRAnth	N-5'-fosforibozilantranilat
Prep	Prefenat
L-Pro	L-Prolin
PropCoA	Propiyonil koenzim A
PRPP	5-fosfo-D-ribozil pirofosfat

3Pser	3-fosfo serin
Pyr	Pirüvat
R5P	Ribuloz 5-fosfat
Rib5P	Riboz 5- fosfat
S7P	Sedoheptuloz-7- fosfat
L-Ser	L-Serin
Shik	Şikimat
Shik5P	Shikimat-5-P
Suc	Suksinat
SucCoA	Suksinat koenzim A
Xyl5P	Ksiloz 5- fosfat
Tet	L-2,3,4,5 Tetrahidrodipikolinat
T3P	Trioz 3- fosfat
THF	Tetrahidrofolat
L-Thr	L-Treonin
L-Trp	L-Triptofan
L-Tyr	L-Tirozin
Ucar	Urokarat
UDP	Uridin 5'-difosfat
UDPGlc	UDP-glucoz
UDPNAG	UDP-N-Asetil-glukozamin
UDPNAM	UDP-N-Asetil-murami asit
UMP	Uridin 5'-monofosfat
UTP	Uridin 5'-tri fosfat
L-Val	L-Valin

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Bakteri hücresi.....	14
Şekil 2.2 Bakterilerin üç farklı formu.....	14
Şekil 2.3 Nükleotit biriminin yapısı	18
Şekil 2.4 Pürin ve pirimidin bazları	18
Şekil 2.5 DNA'nın birincil yapısı.....	21
Şekil 2.6 DNA'nın ikincil yapısı.....	21
Şekil 2.7 DNA'nın üç boyutlu yapısı.....	21
Şekil 2.8 PCR ile gen derişiminin artırılması.....	26
Şekil 2.9 <i>SalI</i> restriksiyon enzimi ile DNA molekülünü kesme tepkimesi.....	29
Şekil 2.10 Plasmidlerin genel yapıları.....	30
Şekil 2.11 Hücrede bulunan plasmid şekilleri	30
Şekil 2.12 Ligasyon tepkimesi	32
Şekil 2.13 İndüklenmiş transformasyon sırasında hücre ve plasmidin durumu.....	34
Şekil 2.14 pUC19 plasmid vektörü.....	37
Şekil 2.15 İki film teorisine göre bir gaz kabarcığından mikroorganizmaya oksijenin aktarım mekanizması	42
Şekil 2.16 Dinamik Yöntem uygulamasında çözünmüş oksijen derişiminin kalma süresi ile derişimi	47
Şekil 2.17 Dinamik Yöntem ile sıvı faz hacımsal kütle aktarım katsayısının belirlenmesi	48
Şekil 2.18. <i>Bacillus licheniformis</i> ve <i>Bacillus subtilis</i> için hücreiçi tepkimelerin metabolik yolizi haritası şeklinde gösterimi.....	63
Şekil.2.19 Bir amino asitin bulunduğu çözeltinin pH'ına göre iyonlaşma özellği.....	64
Şekil 3.1a pUC19 plasmidi.....	86
Şekil 3.1b pMK4 plasmidi	86
Şekil 3.2 Pilot ölçek biyoreaktör sistemi: B.Braun Biostat Q4.....	90
Şekil 3.3 Dinamik yöntem ile sıvı faz hacımsal kütle aktarım katsayısının belirlenmesi.....	96

Şekil 3.4 Rekombinant mikroorganizma geliştirilmesi için kullanılan genetik mühendisliği algoritması.....	104
Şekil 4.1 Aromatik amino asit yolizi.....	115
Şekil 4.2 <i>aroA</i> geni için tasarlanan primerler ve nükleotit dizinleri.....	117
Şekil 4.3 <i>aroH</i> geni için tasarlanan primerler ve nükleotit dizinleri.....	118
Şekil 4.4 <i>aroA</i> geni için tasarlanan primerler ve nükleotit dizinleri.....	121
Şekil 4.5 <i>aroH</i> geni için tasarlanan primerler ve nükleotit dizinleri.....	122
Şekil 4.6 <i>aroA</i> geni için tasarlanan primerler ve nükleotit dizinleri.....	126
Şekil 4.7 PCR ile <i>aroA</i> geninin sentezlenmesi.....	128
Şekil 4.8 pUC19 plasmidine <i>aroA</i> geninin yapışan-uç ligasyonu.....	131
Şekil 4.9 pUC19:: <i>aroH</i> plasmidine <i>aroA</i> geninin yapışkan-uç ligasyonu	132
Şekil 4.10a Plasmid DNA izolasyonu sonuçları	133
Şekil 4.10b Plasmid DNA izolasyonu sonuçları	133
Şekil 4.11 İzolasyondan elde edilen muhtemel r-pMK4'lerin PCR tepkimesi ile kontrol edilmesi.....	134
Şekil 4.12 İzolasyondan elde edilen muhtemel r-pMK4'lerin kesilerek kontrol edilmesi	135
Şekil 4.13a <i>SalI</i> ile kesilmiş pMK4.....	136
Şekil 4.13b <i>SalI</i> ile kesilmiş pMK4:: <i>aroH</i>	136
Şekil 4.14a Plasmid DNA izolasyon sonuçları.....	137
Şekil 4.14b Plasmid DNA izolasyon sonuçları	137
Şekil 4.15 İzolasyondan elde edilen muhtemel r-pMK4'lerin PCR tepkimesi ile kontrol edilmesi.....	138
Şekil 4.16a İzolasyondan elde edilen muhtemel r-pMK4'lerin kesilerek kontrol edilmesi.....	139
Şekil 4.16b İzolasyondan elde edilen muhtemel r-pMK4'lerin kesilerek kontrol edilmesi	139
Şekil 4.17 <i>r-B.subtilis</i> 'lerden plasmid izolasyonu sonuçları.....	140
Şekil 4.18 <i>r-B.subtilis</i> 'lerin PCR tepkimesi ürünü	141
Şekil 4.19 Doğal <i>B. subtilis</i> ve <i>r-B. subtilis</i> A263 hücreleri ile L-fenilalanin üretiminde hücre derişiminin kalma süresi ile değişimi:	

$C_G=10 \text{ kg m}^{-3}$, $pH_0=7.0$, $N=200 \text{ dk}^{-1}$ ve $T=37 \text{ }^\circ\text{C}$	142
Şekil 4.20 Doğal ve r- <i>B. subtilis</i> A263 hücreleri ile L-fenilalanin üretiminde L-fenilalanin derişiminin kalma süresi ile değişimi: $C_G=10 \text{ kg m}^{-3}$, $pH_0=7.0$, $N=200 \text{ dk}^{-1}$ ve $T=37 \text{ }^\circ\text{C}$	143
Şekil 4.21 Doğal ve r- <i>B. subtilis</i> A263 hücreleri ile L-fenilalanin üretiminde glukoz derişiminin kalma süresi ile değişimi.....	144
Şekil 4.22 pMK4:: <i>aroA</i> :: <i>aroH</i> taşıyan r- <i>B. subtilis</i> A263 ile L-fenilalanin üretiminde pH'ın oksijen aktarımı ve kalma süresi ile değişimi.....	147
Şekil 4.23 pMK4:: <i>aroA</i> :: <i>aroH</i> taşıyan r- <i>B. subtilis</i> A263 ile çözünen oksijen derişiminin oksijen aktarım koşulu ve kalma süresiyle değişimi.....	148
Şekil 4.24 pMK4:: <i>aroA</i> :: <i>aroH</i> taşıyan r- <i>B. subtilis</i> A263 ile hücre derişiminin oksijen aktarım koşulu ve kalma süresiyle değişimi.....	149
Şekil 4.25 pMK4:: <i>aroA</i> :: <i>aroH</i> taşıyan r- <i>B. subtilis</i> A263 ile glukoz derişiminin oksijen aktarım koşulu ve kalma süresiyle değişimi.....	150
Şekil 4.26 pMK4:: <i>aroA</i> :: <i>aroH</i> taşıyan r- <i>B. subtilis</i> A263 ile L-fenilalanin derişiminin oksijen aktarım koşulu ve kalma süresiyle değişimi.....	151
Şekil 4.27 L-fenilalanin üretim hızının oksijen aktarımı ve kalma süresi ile değişimi.....	152
Şekil 4.28 Birim zamanda birim hücre başına üretilen L-fenilalanin miktarının değerlerinin oksijen aktarımı ve kalma süresi ile değişimi.....	153
Şekil 4.29 pMK4:: <i>aroA</i> :: <i>aroH</i> taşıyan r- <i>B. subtilis</i> A263 ile L-fenilalanin üretiminde amino asit ve toplam amino asit derişimlerinin oksijen aktarım koşulu ve kalma süresi ile değişimi	157
Şekil 4.30 pMK4:: <i>aroA</i> :: <i>aroH</i> taşıyan r- <i>B. subtilis</i> A263 ile L-fenilalanin üretiminde toplam organik asit derişimlerinin oksijen aktarım koşulu ve kalma süresi ile değişimi.....	164
Şekil 4.31 Doğal ve r- <i>B. subtilis</i> A263 hücreleri ile MOT1 oksijen aktarım koşulunda ($Q_0/V_R=0.5 \text{ vvm}$, 500 dk^{-1}) pH'ın kalma süresi ile değişimi.....	174

Şekil 4.32 Doğal ve <i>r-B.subtilis</i> A263 hücreleri ile MOT1 oksijen aktarım koşulunda ($Q_0/V_R=0.5$ vvm, 500 dk^{-1}) çözünmüş oksijen derişiminin kalma süresi ile değişimi.....	175
Şekil 4.33 Doğal ve <i>r-B.subtilis</i> A263 hücreleri ile MOT1 oksijen aktarım koşulunda ($Q_0/V_R=0.5$ vvm, 500 dk^{-1}) hücre derişiminin kalma süresi ile değişimi:	176
Şekil 4.34 Doğal ve <i>r-B.subtilis</i> A263 hücreleri ile MOT1 oksijen aktarım koşulunda ($Q_0/V_R=0.5$ vvm, 500 dk^{-1}) glukoz derişiminin kalma süresi ile değişimi	177
Şekil 4.35 Doğal ve <i>r-B.subtilis</i> A263 hücreleri ile MOT1 oksijen aktarım koşulunda ($Q_0/V_R=0.5$ vvm, 500 dk^{-1}) L-fenilalanin derişiminin kalma süresi ile değişimi.....	178
Şekil 4.36 Doğal ve <i>r-B.subtilis</i> A263 hücreleri ile MOT1 oksijen aktarım koşulunda ($Q_0/V_R=0.5$ vvm, 500 dk^{-1}) L-fenilalanin üretim hızının kalma süresi ile değişimi	179
Şekil 4.37 Doğal ve <i>r-B.subtilis</i> A263 hücreleri ile MOT1 oksijen aktarım koşulunda ($Q_0/V_R=0.5$ vvm, 500 dk^{-1}) birim zamanda birim hücre başına üretilen L-fenilalanin miktarının kalma süresi ile değişimi.....	180
Şekil 4.38 Doğal ve <i>r-B.subtilis</i> A263 hücreleri ile MOT1 oksijen aktarım koşulunda ($Q_0/V_R=0.5$ vvm, 500 dk^{-1}) amino asit ve toplam amino asit derişimlerinin kalma süresi ile değişimi....	184
Şekil 4.39 Doğal ve <i>r-B. subtilis</i> A263 hücreleri ile MOT1 oksijen aktarım koşulunda ($Q_0/V_R=0.5$ vvm, 500 dk^{-1}) L-fenilalanin üretiminde toplam organik asit derişiminin kalma süresi ile değişimi.....	190
Şekil 5.1 Metabolik mühendislik tasarımı ile geliştirilen <i>r-B.subtilis</i> A263'lerin periyot III'te hücre içi tepkime akılarının karşılaştırılması.....	230

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 Amino asitlerin üretimi ve birim fiyatları.....	4
Çizelge 1.2 Türkiye'nin L-fenilalaninin ithalatı	5
Çizelge 2.1 DNA molekül büyüklükleri.....	20
Çizelge 2.2 <i>E.coli</i> 'deki RNA molekülleri.....	23
Çizelge 2.3 Bazı restriksiyon enzimleri ve kesme biçimleri.....	28
Çizelge 2.4 Farklı verim katsayılarının tanımları	39
Çizelge 2.5 <i>Bacillus licheniformis</i> ve <i>Bacillus subtilis</i> için metabolik yolizi tepkimleri.....	56
Çizelge. 2.6 Amino asitler ve özellikleri	65
Çizelge 2.7 L-fenilalaninin özellikleri.....	67
Çizelge 2.8 L –fenilalanin üretimiyle ilgili kaynaklar: Üretim ortamı bileşenleri ve ölçülen parametreler.....	78
Çizelge 2.9 L –fenilalanin üretimiyle ilgili kaynaklar: L-fenilalanin üretimi için geliştirilen rekombinant mikroorganizmalar.....	79
Çizelge 2.10 L –fenilalanin üretimiyle ilgili kaynaklar: Biyoreaktör ve işletim koşulları.....	80
Çizelge 2.11 L-fenilalanin üretiminde kullanılan katı, sıvı, üretim ortam bileşimleri.....	81
Çizelge 3.1 Rekombinant mikroorganizma geliştirmek için kullanılan mikroorganizma ve plasmidler.....	86
Çizelge 3.2 Doğal ve rekombinant <i>Bacillus subtilis</i> için katı çoğalma ortamı.....	87
Çizelge 3.3 Doğal ve rekombinant <i>Bacillus subtilis</i> için ön-sıvı çoğalma ortamı.....	87
Çizelge 3.4 Doğal ve rekombinant <i>Bacillus subtilis</i> için sıvı çoğalma ortamı.....	88
Çizelge 3.5 New-Pico yöntemi gradyen tablosu.....	92
Çizelge 3.6 <i>aroA</i> geni sentezi için tasarlanan primerlerin nükleik asit dizini.....	106
Çizelge 3.7 Polimeraz zincir tepkimesi (PCR) için tepkime bileşimi.....	107
Çizelge 3.8 PCR sistemi işletim programı.....	107
Çizelge 3.9 Ligasyon tepkimesi için tepkime bileşimi.....	108

Çizelge 3.10 <i>SalI</i> restriksiyon enzimi ile kesme tepkimesi bileşimi.....	108
Çizelge 3.11 Plasmidin fosfat uçlarının giderilmesi için tepkime bileşimi.....	109
Çizelge 4.1 <i>aroA::aroH</i> geninin pUC19 ve pMK4 plasmidlerine ligasyon tepkimesi.....	119
Çizelge 4.2 <i>aroA::aroH</i> geninin pUC19 ve pMK4 plasmidlerine ligasyon tepkimesi.....	123
Çizelge 4.3 Primer tasarımlarının termodinamik özellikleri.....	127
Çizelge 4.4 Polimeraz zincir tepkimesi işletim koşulları.....	127
Çizelge 4.5 Polimeraz zincir tepkime bileşen ve bileşimleri	127
Çizelge 4.6 <i>aroA</i> geninin, pUC19:: <i>aroH</i> ve pUC19'un <i>SalI</i> enzimiyle yapışkan-uç kesimi için tepkime koşulları.....	129
Çizelge 4.7 Lineer pUC19:: <i>aroH</i> ve pUC19 plasmidlerinin uç fosfat gruplarının plasmidden uzaklaştırılması için tepkime koşulları....	129
Çizelge 4.8 <i>aroA</i> geninin pUC19:: <i>aroH</i> ve pUC19 plasmidine yapışkan-uç klonlanması için ligasyon tepkime koşulları.....	131
Çizelge 4.9 <i>aroA</i> geninin pMK4 ve pMK4:: <i>aroH</i> plasmidlerine yapışkan-uç klonlanması için ligasyon tepkime koşulları.....	132
Çizelge 4.10 Oksijen aktarımı koşulları ve kısaltmaları	145
Çizelge 4.11 Amino asit derişimlerinin oksijen aktarım koşulu ve proses süresince değişimi: $C_{Go}=10 \text{ kg m}^{-3}$, $pH_o=6.8$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=0.5 \text{ dm}^3$	155
Çizelge 4.12 Organik asit derişimlerinin oksijen aktarım koşulu ve proses süresince değişimi: $C_{Go}=10 \text{ kg m}^{-3}$, $pH_o=6.8$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=0.5 \text{ dm}^3$	159
Çizelge 4.13 Farklı oksijen aktarım koşullarında pMK4:: <i>aroA::aroH</i> taşıyan <i>r-Bacillus subtilis</i> A263 ile L-fenilalanin üretiminde üretim ortamına salgılanan amino ve organik asitler ile bunların ortamdaki maksimum toplam derişimleri: $C_{Go}=10 \text{ kg m}^{-3}$, $pH_o=6.8$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=0.5 \text{ dm}^3$	156

Çizelge 4.14	pMK4:: <i>aroA</i> :: <i>aroH</i> taşıyan <i>r-B.subtilis</i> A263 ile L-fenilalanin üretiminde oksijen aktarım parametrelerinin oksijen aktarım koşulu ve proses süresince değişimi, $C_{G0}=10 \text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH}_0=6.8$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=0.5 \text{ dm}^3$	168
Çizelge 4.15	Verim katsayılarının oksijen aktarım koşulu ve kalma süresiyle değişimi: $C_{G0}=10 \text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH}_0=6.8$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=0.5 \text{ dm}^3$	171
Çizelge 4.16	Doğal ve üç <i>r-B.subtilis</i> A263 ile MOT1 oksijen aktarım koşulunda toplam amino asit derişimlerinin proses süresince değişimi: $C_{G0}=10 \text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH}_0=6.8$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=0.5 \text{ dm}^3$	182
Çizelge 4.17	Doğal ve üç <i>r-B.subtilis</i> A263 ile MOT1 oksijen aktarım koşulunda toplam amino asit derişimlerinin proses süresince değişimi: $C_{G0}=10 \text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH}_0=6.8$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=0.5 \text{ dm}^3$	186
Çizelge 4.18	Doğal ve üç <i>r-Bacillus subtilis</i> A263 ile MOT1 oksijen aktarım koşulunda üretim ortamına salgılanan amino ve organik asitler ile bunların ortamdaki maksimum toplam derişimleri: $C_{G0}=10 \text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH}_0=6.8$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=0.5 \text{ dm}^3$	188
Çizelge 4.19	<i>B. subtilis</i> A-263, pMK4:: <i>aroA</i> taşıyan <i>r-B. subtilis</i> A-263 ve pMK4:: <i>aroH</i> taşıyan <i>r-B. subtilis</i> A-263'ün MOT1 oksijen aktarım koşulunda oksijen aktarım parametrelerinin proses süresince değişimi, $C_{G0}=10 \text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH}_0=6.8$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=0.5 \text{ dm}^3$	193
Çizelge 4.20	Doğal ve üç <i>r-B.subtilis</i> A263 için MOT1 oksijen aktarım koşulunda verim katsayılarının proses süresince değişimi	196
Çizelge 4.21	pMK4:: <i>aroA</i> :: <i>aroH</i> ile hücreiçi tepkime hızlarının oksijen aktarım koşulu ve proses süresince değişimi: $C_{G0}=10 \text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH}_0=6.8$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=0.5 \text{ dm}^3$	200

Çizelge 4.22 Doğal ve üç r- <i>B.subtilis</i> A263 için L-fenilalanin üretiminde hücreiçi tepkime hızlarının oksijen aktarım koşulu ve proses süresince dağılımı: $C_{Go}=10 \text{ kg m}^{-3}$, $pH_o=6.8$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=0.5 \text{ dm}^3$	208
Çizelge 5.1 Üç rekombinant plasmidi taşıyan <i>B.subtilis</i> A263 ile biyoreaktöre aktarılan toplam amino asit derişimi, L-fenilalanin derişim ve seçimliliği, ve hücreiçi tepkime akılarının değışimi.....	232

1. GİRİŞ

Mikrobiyal, bitki doku veya hayvan doku hücreleri ile, biyokimyasal tepkime-ağı içinde enzim-katalitik tepkimelerle metabolik-yolizleri üzerinden üretilen ürünlere *biyoteknolojik ürünler*; biyomoleküllerin üretildiği biyoreaktör ve biyoproses ayırma işlemlerinden oluşan proseslere *biyoteknolojik prosesler* denir. Biyoteknolojik proseslerle üretim 20.Yüzyılın ikinci yarısında kimya endüstrisi içinde gelişen bir sektörler grubu olmuş; 1980'li yılların başından itibaren moleküler genetik yöntemlerdeki hızlı gelişmeler ile başta farmasötik temel maddeler olmak üzere birim fiyatı yüksek endüstriyel biyoteknolojik ürünleri üretecek rekombinant mikroorganizmaların geliştirilmesine olanak sağlamıştır.

Biyoteknolojik proseslerle ürün üreten sektörler :

1. Farmasötik Hammaddeler Sektörü
2. Biyokimyasal Temel Maddeler Sektörler Grubu
3. Enzim Üretim Sektörü
4. Klasik Fermentasyon Ürünleri Sektörler Grubu
5. Hayvancılık, Ormancılık, Tarım Sektörleri için Biyoteknolojik Ürünler Üreten Sektörler

şeklinde gruplanmaktadır (Çalık 1998). Biyoteknolojik ürünlerin üretiminde verim ve seçimliliğin artırılması için biyoreaktör işletim koşulları temel parametrelerdir. Ancak, mikroorganizmanın mikro-biyoreaktör işlevi yaparak hücre-içi tepkime ağı üzerinden hedef biyomolekülü sentez potansiyeli ilk kritik noktadır. Mikroorganizmanın üretim kapasitesi moleküler düzeyde, uygun bir metabolik mühendislik tasarımı ile geliştirilebilir. Bu çerçevede ilk aşamada, mikro-reaktör olarak işlev gören mikroorganizmanın yapısının ve fonksiyonlarının araştırılıp istenen ürün üretimindeki hız kısıtlayıcı basamakların reaksiyon mühendisliği prensipleriyle belirlenmesi gerekmektedir. Hız kısıtlayıcı basamak(lar) belirlendikten sonra istenen ürün verim ve seçimliliğinin artırılması için darboğaz oluşturduğu belirlenen gen(ler) genetik mühendisliği teknikleri kullanılarak uygun bir algoritma ile klonlanarak verim ve seçimliliği yüksek rekombinant mikroorganizma geliştirilir. Genetik çalışma

programında istenen ürün üretiminden sorumlu gen(ler) izole edilir, sonra bu gen(ler) taşıyıcı DNA moleküllerine (plasmidlere) klonlanır. Uygun bir konak hücreye transfer edilerek rekombinant mikroorganizma elde edilir. Metabolik mühendislik teknikleriyle rekombinant mikroorganizma geliştirilmesi:

- a) kimyasal/biyokimyasal (mikro-reaktörlerde yapılan enzim katalitik tepkimeler)
 - b) fizikokimyasal (mikro-ayırma işlemleri)
 - c) fiziksel (mikro ve ultra santrifüjle ayırma)
- işlemleri kapsamaktadır.

Amino asitler insan vücudunun ve metabolizmasının yapı taşlarıdır; hastalıklardan korunmada ve yaşamın sürmesinde önemli görevler yaparlar. İnsan vücudunda hücrelerin yapımında, dokuların oluşumunda ve onarımında, bakteri ve virüslere karşı savaşan antikorların oluşumunda görev alırlar; ayrıca kemik ve kan hücreleri ve organ ve dokuların sağlıklı kalmasını sağlarlar. Amino asitler hücre içinde sentezlenir ve hücre içindeki protein ve enzim sentezlerinde monomer olarak kullanılırlar. Ancak 10 adet amino asit insan hücrelerinde sentezlenemediğinden, dışarıdan yiyeceklerle -yani amino asit ve protein kaynaklarından- sağlanmaları gerekir.

Önemli endüstriyel biyoteknolojik ürünlerden olan amino asitler;

- Gıda Sektöründe (katkı maddesi olarak),
- Farmasötik Hammaddeler Sektörleri Grubunda,
- Kozmetik Sektöründe,
- Biyokimyasal araştırmalarda, ve
- Kimya Sektöründe (hammadde olarak)

kullanılırlar (Atkinson B., Mavituna F. 1991).

Amino asitlerin üretimi önce kimyasal proses ile rasemik D- ve L- izomerlerin karışımı olarak, sonra ucuz-doğal proteinlerin hidrolizi ile L-izomer karışımından herbirinin ayrılmasıyla, yapılmıştır. 1960'lı yılların başında Japonya'da L-glutamik asit ile başlayan biyoteknolojik prosesle (fermentasyon) üretim L-lizin, L-alanin, L-arjinin, L-histidin, L-treonin ile sürmüştür. Aromatik grup amino asitler L-fenilalanin, L-triptofan,

L-tirozin gibi diğ er temel amino asitlerin  oğ u için 1970-1990 arasında enzim-katalitik “biyod n   m prosesleri” geliştirilmesi önemli araştırma alanı olmuştur. Gen dizininin hücre dışında derişiminin artırılması için uygulanan “polimeraz zincir tepkimesi (PCR)” için robot özellikli “termal döngü” cihazının tasarımı ve üretimi (1989), genetik mühendisliğı teknikleri kullanarak rekombinant mikroorganizma geliştirilmesini ve sonuçta rekombinant biyomolekül üretimi için biyoproses geliştirilmesini, son 15 yılda önemli araştırma alanı haline getirmiştir. Bu gelişme enzim-katalitik biyod n   m tepkimeleri ile üretilen amino asitlerin biyoteknolojik proseslerle üretimini tekrar araştırmalar için çekici yapmış bulunmaktadır.

Endüstriyel amino asit üretiminin büyük bir kısmı Japonya'da yapılmaktadır; üretim kapasitesi açısından önemli kuruluşlar, üretilen amino asitler, üretim yöntemleri, üretim miktarları ve birim fiyatları  izelge 1.1'de verilmiştir (Kırk and Othmer 1994). Üretim kapasitesi açısından önemli kuruluşlar, Ajinomoto Co.(Japonya), Kyowa Hakko Kogyo Co.Ltd. (Japonya) ve Tanabe Seiyaku Co. (Japonya)'dır.

Çizelge 1.1 Amino asitlerin üretimi ve birim fiyatları (Kirk and Othmer 1994)

Amino Asit	Üretim Yöntemi	Miktar, ton / yıl		Birim Fiyatı \$/kg
		Japonya	Dünya	
DL-alanin	K	1.500		6-7
L-alanin	E	150		12-29
L-arjinin	B, Ekst	700	1.000	44-51
L-aspartik asit	E	2.000	4.000	10-12
L-asparajin	Ekst	30		
L-sistein ve sistin	Ekst, E	300	1.000	59-88
Glisin	K	3.500	6.000	7-13
L-glutamik asit	B	80.000	340.000	3
L-glutamin	B	850		44-52
L-histidin	B	250		110-147
L-izolözin	B	200		294-331
L-lözin	B, Ekst	200		74-147
L-lizin	B	30.000	70.000	5-6
DL-metiyonin	K	30.000	250.000	5-6
L-metiyonin	E	150		74-88
L-ornitin	B	70		74-147
L-fenilalanin	B, K, E	1.500	3.000	59-88
L-prolin	B	150		147-294
L-serin	B, E	60		74-132
DL-serin	K			
L-treonin	B, K	200		125-147
L-triptofan	B, K, E	250		74-147
L-tirozin	B, Ekst F	60		74-110
L-valin	B, K	200		110-147

B: biyoteknolojik proses (fermentasyon); E: enzim-katalitik biyodönüşüm prosesi,

Ekst: protein hidrolizatlarının ekstraksiyonu; K: kimyasal proses

Aromatik grup amino asitlerden olan L-fenilalaninin endüstriyel üretimi biyodönüşüm prosesleri ile yapılırken, son 15 yılda rekombinant ürün olarak üretimi üzerinde araştırmalar başlamıştır. Endüstriyel amino asit L-fenilalaninin Türkiye'de üretimi henüz yapılmamaktadır. Türkiye için yıllara göre ithalat durumu ise Çizelge 1.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 1.2 Türkiye'nin L-fenilalaninin ithalatı (İGEME 2005)

Yıl		İthalat
2000	Miktar; kg	937
	Fiyat; \$	31.905
2001	Miktar; kg	1017
	Fiyat; \$	34.542
2002	Miktar; kg	700
	Fiyat; \$	22.751
2003	Miktar; kg	653
	Fiyat; \$	26.180
2004	Miktar; kg	840
	Fiyat; \$	33.587
2005	Miktar; kg	506
	Fiyat; \$	20.975

L-fenilalanin dipeptit tatlandırıcı α -aspartam üretiminde ve farmasötik sanayinde ilaç etken maddelerinin üretiminde girdi olarak; gıda sanayinde gıda-katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. L-fenilalanine olan talebin sürekli artışı üretimine yönelik orijinal araştırmaları çekici yapmaktadır. L-fenilalanin enzim-katalitik biyodönüşüm prosesleriyle, örneğin trans-sinamik asitin girdi olarak kullanımıyla, üretilirken moleküler genetikteki gelişmelerin etkisinde, L-fenilalanin üretimi için rekombinant mikroorganizma geliştirilmesi ve fermentasyon türü biyoteknolojik proseslerle üretimi için proses geliştirme çalışmaları önemli olmuştur.

Biyoteknolojik prosesle rekombinant L-fenilalanin üretiminin araştırma ile geliştirilen bilgi-yoğun teknolojiyle ancak ucuz ve kolay elde edilebilir girdilerle ekonomik olarak yapılabilmesi ve sadece L-izomerinin üretilmesi önemli üstünlüklerdir. Mikrobiyal L-fenilalanin üretiminde mikroorganizma seçimi önemlidir. Seçilecek mikroorganizmanın özellikleri arasında patojen olmaması ve toksik ürünler üretmemesi, hedef ürün olan L-fenilalanini üretebilme kabiliyetinin yüksek olması, genetik mühendisliği tekniklerinin uygulanabilir olması yer almaktadır. L-fenilalanin üretimi için mikrobiyal prosesler yaklaşık son 15 yılda geliştirilmeye başlanmıştır. L-fenilalanin üretimi ile ilgili yayınlarda *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium lactofermentum*, *Escherichia coli*, *Arthrobacter globiformis*, *Bacillus polymyxa* ve *Bacillus subtilis* mikroorganizma olarak seçilmiş ve kullanılmıştır.

Science Citation Index'çe (SCI) taranan hakemli dergilerde yayınlanan araştırma makalelerinde L-fenilalanin üretimi için:

1. kullanılan mikroorganizmalar ve yapılan mutasyonlar ile, rekombinant mikroorganizma geliştirmek için uygulanan stratejiler ve sonuçları
2. biyoreaktör işletim koşulları, üretim ortamı bileşenleri ve incelenen parametreler, temelinde incelenmiş ve değerlendirilmiştir. Bu çerçevede yapılan kaynak araştırması sonuçları, L-fenilalanin üretimi için üretim ortamı bileşenleri ve ölçülen parametreler Çizelge 2.8, geliştirilen rekombinant mikroorganizmalar Çizelge 2.9, biyoreaktör ve işletim koşulları Çizelge 2.10 ve katı, sıvı, üretim ortam bileşimleri Çizelge 2.11'de özetlenmiştir.

L-fenilalanin üretimi ile ilgili çalışmalarla ilgili Çizelge 2.8, incelendiğinde 1990 yılından sonra üretici kuruluşların ve araştırma gruplarının genetik mühendisliği teknikleri kullanarak L-fenilalanin yolizinde darboğaz oluşturduğu düşünülen enzimleri kodlayan genlerin belirlenerek rekombinant mikroorganizma geliştirilmesine yönelik çalışmalara yoğunluk verdikleri görülmektedir.

Bu çerçevede, "Reaksiyon mühendisliği prensipleriyle rekombinant L-fenilalanin üretimi için biyoproses geliştirilmesi" konulu yüksek lisans tezi beş araştırma programından oluşmaktadır.

1. Araştırma Programı: Metabolik mühendislik araştırma programı

Bu araştırma programının amacı, araştırma grubumuzun daha önce yaptığı çalışmalarda (Özçelik 2003, Özçelik vd 2004) belirtilen aromatik grup amino asit yolizinde R70 numaralı tepkimeyi katalizleyen DAHP sentetaz (EC 2.5.1.54) enzimini kodlayan *aroA* geni ile R72 numaralı tepkimeyi katalizleyen korizmat mutaz enziminin (EC 5.4.99.5) sentezinden sorumlu *aroH* genlerini taşıyan rekombinant plasmidin metabolik tasarımı yapılarak rekombinant *Bacillus subtilis* geliştirilmesidir.

2. Araştırma Programı: Rekombinant hücrelerin L-fenilalanin üretim performanslarının kıyaslanması

Bu amaçla,

- a. Doğal *B. subtilis* A263,
- b. pMK4::*aroH* taşıyan r-*B. subtilis* A263,
- c. pMK4::*aroA* taşıyan r-*B. subtilis* A263 ve
- d. pMK4::*aroA*::*aroH* taşıyan r-*B. subtilis* A263,

hücreler kullanılarak $V_R=0.11 \text{ dm}^3$ çalışma hacimli laboratuvar ölçek biyoreaktörlerde tanımlanmış üretim ortamında L-fenilalanin üretim performansları karşılaştırılmasıdır.

3. Araştırma Programı: L-fenilalanin üretimine oksijen aktarımı etkilerinin incelenmesi

Üretim performansı en yüksek rekombinant r-*Bacillus subtilis* ile L-fenilalanin üretimine oksijen aktarım etkileri $V=1.0 \text{ dm}^3$ pilot-ölçek biyoreaktörlerde $V_R=0.5 \text{ dm}^3$ tepkime hacmi oluşturarak, $Q_0/V_R=0.2, 0.35, 0.5 \text{ vvm}$ hava giriş hızlarında ve $N=500-750 \text{ dk}^{-1}$ karıştırma hızlarında organize edilen 5 işletim koşulunda –laboratuvar ölçekteki optimum koşullarda- toplam $t=30 \text{ st}$ kalma süreli yarı-kesikli sistemde

araştırılması, L-fenilalanin ve yan-ürün üretimine oksijen aktarım etkileri incelenerek biyoproses ve oksijen aktarım karakteristiklerinin belirlenmesidir.

4. Araştırma Programı: *Metabolik tasarımların L-fenilalanin üretimine etkisinin incelenmesi*

Bu amaçla ikinci araştırma programında yer alan doğal ve rekombinant hücreler ile metabolik tasarımının L-fenilalanin üretimine etkisi $V=1.0 \text{ dm}^3$ pilot-ölçek biyoreaktörlerde $V_R=0.5 \text{ dm}^3$ tepkime hacmi oluşturarak, üçüncü araştırma programı sonucu elde edilen optimum aktarım koşulunda –laboratuvar ölçekteki optimum koşullarda- toplam $t=30$ st kalma süreli yarı-kesikli sistemde karşılaştırılmasıdır.

5. Araştırma Programı: *Hücre-içi tepkime hızlarının belirlenmesi*

Pilot ölçekte elde edilen deneysel verileri kullanılarak metabolik yolizi analizi yapılmış ve hücre-içi tepkime hızlarına:

- a. Oksijen aktarımının, ve sonra
- b. Metabolik tasarımların, etkisinin incelenmesidir.

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

Biyoteknolojik prosesleri iki gruba ayırılır:

1. Biyodönüşüm Prosesleri

1. Enzim Katalitik tepkimeler
2. Dinlenen (resting) hücrelerle biyodönüşüm tepkimeleri

2. Biyoprosesler (Fermentasyon Prosesleri)

Biyoproses ile üretim karbon kaynağının (örneğin; glukoz, melas, soya vd) girdi olarak kullanılmasıyla uygun bir mikroorganizma ile hücre-içinde gerçekleşen çok sayıda tepkime ile gerçekleşir. Endüstriyel biyoteknolojik ürünlerin yüksek verimlilikte biyoproses ile üretiminde genellikle mutant ve/veya genetik olarak modifiye edilerek üretim kapasitesi artırılmış mikroorganizma kullanılır. Biyoproseslerde, tasarlanan biyoreaktör işletim koşullarının steril koşullarda ancak fiziksel olarak kolay gerçekleştirilebilir olması ve, farklı biyomoleküllerin üretimi için aynı biyoreaktör sistemlerinin kullanılabilmesi önemli avantajlarıdır. Ancak, istenen ürünün yanısıra biyoreaktör ürün karışımından ayrılması gereken çok sayıda yan ürünler, öncelikle amino asitler ve organik asitler, ve hücre-dışı enzimlerin oluşumu biyoprosesle üretimde ayırma işlemlerinin de başarılması gerektiğini düşündürmelidir. Bu nedenle fermentasyon türü proseslerle yüksek verim ve seçicilikte istenen ürün üretimi için en uygun biyoreaktör işletim koşullarında, metabolik mühendislik teknikleriyle mikroorganizma fonksiyon ve üretimdeki darboğazların bulunarak; darboğaz oluşturan tepkime(ler)den sorumlu hedef gen(ler) tasarlanan metabolik mühendislik teknikleriyle belirlenen plasmide klonlanarak rekombinant mikroorganizma geliştirilmesi gerekmektedir. Sonuç olarak metabolik mühendislik teknikleriyle geliştirilen rekombinant mikroorganizma ile üretimde yan ürün oluşumu en aza indirilerek yüksek verim ve seçicilikte istenen ürün üretimi gerçekleştirilebilir.

Biyodönüşüm ile üretimde ise tek veya bir-kaç basamaktan oluşan enzim katalitik tepkime ile mikroorganizmanın ürettiği spesifik bir enzimin ya da dinlenen (resting) hücrenin enzim deposu olarak kullanılmasıyla üretim gerçekleştirilir. Bu proseslerde tepkime stokiyometrik denklemi ile tanımlanmayan yan ürün oluşmamakta, verim

denge tepkimesi değilse yüksek olmakta ve üretim kolay tasarlanabilir tepkime koşullarında gerçekleştirilebilmektedir. Bu proseslerde enzimlerin tek bir substratlarının olması; substratların pahalı ve az bulunması bu proseslerin dezavantajları arasında yer almaktadır.

Biyoteknolojik proseslerde üretimi etkileyen biyoproses ve biyoreaktör parametreleri:

1. Mikroorganizma
2. Ortam tasarımı
3. Biyoreaktör işletim türü ve hidrodinamiği
4. Biyoreaktör işletim parametreleri
 - a) Oksijen aktarımı ve stratejisi
 - * Hava giriş hızı (Q_o/V_R)
 - * Karıştırma hızı, (N)
 - b) Hidrojen iyonu derişimi (pH) ve sıcaklıktır.

Bu nedenle bundan sonraki bölümlerde biyoproseslerle üretimde verim ve seçimliliğin artırılması üzerinde durulacaktır.

2.1 Mikroorganizma

Biyoteknolojik proseslerde üretim mikrobiyoreaktör olarak davranan mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirilir. İstenen nitelikte ve nicelikte ürün üretmek için ilk aşamada istenen biyomolekülü üretebilen uygun mikroorganizmanın seçilmesi gerekmektedir. Mikroorganizmalar farklı ürün üretebildikleri gibi, aynı ürünü üretebilen farklı mikroorganizmalar da bulunmaktadır. Endüstriyel biyoteknolojik ürünlerin biyoproses ile üretiminde:

1. Doğal ve/veya mutant olarak modifiye edilerek üretim kapasitesi artırılmış mikroorganizmalar,
2. Genetik mühendisliği tasarımı ile geliştirilen rekombinant mikroorganizmalar,

3. Genetik mühendislik ve metabolik tasarım ile geliştirilen rekombinant mikroorganizmalar kullanılmaktadır.

L-fenilalanin üretimine ilişkin literatürde yukarıda belirtilen 2. tür mikroorganizma kullanılmaktadır. Bu yüksek lisans çalışmasında L-fenilalanin üretimi metabolik ve genetik mühendislik tasarımı ile geliştirilen rekombinant mikroorganizma kullanılmıştır.

2.1.1 Mikrobiyolojik yapı

Hücre biyolojik aktivite gösteren en küçük birimdir. Hücreler fiziksel şekil ve yapıları, enerji ve besin ihtiyaçları, çoğalma ve üreme-salgılama hızları, çoğalma yöntemleri ve hareket etme araç ve yetenekleri arasındaki farklara göre *prokaryotlar* ve *ökaryotlar* olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Hücreler hücre zarı, sitoplazma ve çekirdek olmak üzere üç fonksiyonel temel birimden oluşur (Bailey and Ollis 1986).

Ökaryotik hücreler organelleriyle basit olmayan yapısal özellikler gösteren, çekirdeği bir zarla sitoplazmadan ayrılmış hücreler oldukları halde; prokaryotik hücreler çekirdeği belirgin bir zarla çevrili olmayan daha basit yapıli hücrelerdir. Canlılığı belirleyen metabolik olaylar hücre zarı ve ondan oluşun yapılarla yürütölür.

2.2.1.1 Prokaryotik hücreler

Prokaryotik hücreler küçük ve basit hücrelerdir ve genellikle yalnız bulunurlar ve diğler hücrelerle birleşmezler. Bu gruptaki hücreler küresel ve çubuk şeklinde olabilir. Boyutları 0.5-3 µm mertebesindedir; hacimleri ise yaklaşık $1 \cdot 10^{-12}$ g'dır (Bailey and Ollis 1986).

Prokaryotik hücreler yaklaşık 20 dakikada bir bölünerek iki yavru hücre oluştururlar; biyokimyasal olarak zengindirler ve birçok karbon kaynağını kullanabilirler. Bu ve diğler özellikleri prokaryotik hücrelerin geniş bir çevreye adapte olmalarını sağlar. Prokaryotik bir hücre yaklaşık 200 Å kalınlıkta gözenekli hücre duvarı tarafından

sarılmıştır. Bu duvar hücrenin bütünlüğünü korur ve ona yapısal dayanıklılık verir. Hücre duvarının altında yaklaşık 70 Å kalınlıkta hücre zarı vardır. Plazma zarı olarak da adlandırılan bu zar tüm hücrelerde bulunur. Hücre zarı karbon ve enerji kaynaklarının hücreye taşınımını, sitoplazmaya geçmesini ve hücre-içinde oluşan metabolik ürünlerin de hücre-dışına aktarımını sağlar. Hücrelerin temel kontrol birimi çekirdektir ve tüm genetik bilgi bu birimde saklıdır. Prokaryotik hücrelerin sitoplazmalarında protein ve RNA'lerden oluşan ribozomlar bulunur. Bu birimde proteinlerin/enzimlerin sentezi gerçekleşir. Sitoplazma çekirdek ile zar arasını dolduran ve hücre organellerini tutan sıvı maddedir. Bazı prokaryotlarda plazma zarı belli yerlerden hücre-içine doğru uzayıp katlanarak zar yüzeyini artırır. Bu katlanmalara *mezosom* denir. Mezosomun solunum ve hücre bölünmesi gibi hücresel etkinliklere katıldığı düşünülmektedir (Bailey and Ollis 1986).

2.2.1.2 Ökaryotik hücreler

Ökaryotik hücreler prokaryotik hücrelere kıyasla daha komplekstir. Tüm yüksek organizmaların hücreleri bu sınıfa girer. Bunun yanında tek hücreli mikroorganizmaların da önemli bir grubu ökaryotik hücrelerdir. Ökaryotik hücre sitoplazması, hücrenin aktivitelerini yürütmek için özel yapılara ve fonksiyonlara sahip olan çok sayıda organelle sahiptir. Ökaryotik hücreler, prokaryotik hücrelerde de bulunabilene benzer bir zar ile çevrilmiştir. Bu zarın dış yüzeyinde hücre duvarı olabilir. Bu dış örtünün yapısı hücre türüne bağlıdır. Örneğin yüksek organizmalar olan hayvan hücreleri ince bir hücre duvarına sahiptir. Bu duvarın özel yapışkan özellikleri, karaciğer gibi özel amaç için kullanılan dokuları ve organları oluşturmak için benzer hücreleri tutucu olması önemlidir. Diğer taraftan bitki hücreleri çok dayanıklı, kalın bir hücre duvarı ile kaplanmıştır. Ökaryotik hücrelerin organellerinin işlevleri açısından hücre-içi membranların varlığı önemlidir. Hücre zarından başlayıp hücre-içinde çekirdek zarına kadar uzanan kompleks ince membran kanallar sistemi olan endoplazmik retikulum besin maddelerinin hücre-içine alınmasında işlev yapar. Golgi kompleksinin görevi ise oluşan metabolik ürünleri hücre-dışına transfer etmektir. Bu hücrelerde çekirdek gözenekli bir membran ile sarılmıştır. Proteinlerin/enzimlerin sentezinin gerçekleştiği biyokimyasal tepkime konumları olan ribozomlar, çoğunlukla

endoplazmik retikulum yüzeyine gömülmüş olarak bulunurlar. Ökaryotlarık hücrelerde bulunan ribozamlar prokaryotik hücrelerdekilere göre daha büyüktür (Bailey and Ollis 1986).

Çekirdeğin temel işlevlerinden biri ribozomlardaki katalitik aktivitelerin denetimidir. Hücrenin temel aktivitesini ve kalıtımını sağlayan “kromatin”(chromatin) maddesidir. Bunun içerisinde çeşitli proteinler, DNA ve kalıtsal moleküller yani genler bulunur. Her hücre-için özgün karakterler DNA molekülünde şifrelenmiştir. Çekirdeğin içerisinde ayrıca küre şeklinde bir çekirdekçik kısmı bulunmaktadır. Bunun içerisinde vakuoller (vacuole) ve birçok granül biçiminde parçacık vardır. Bunlar, RNA içerdikleri halde genellikle DNA içermezler.

Çekirdek membranlar tarafından sınırlanmış birkaç iç bölgeden biridir. Bu membran kaplı bölgeler organeller olarak bilinir. Mitokondri hücrenin aktiviteleri için gerekli enerjiyi üretir. Bunlar, enerji üretme prosesinde oksijen kullanan bütün ökaryotik hücrelerde bulunurlar. Lizozomlar ve vakuoller ise kimyasal reaksiyonları ya da belirli kimyasal bileşenleri sitoplazmadan izole etmede görev yaparlar (Bailey and Ollis 1986).

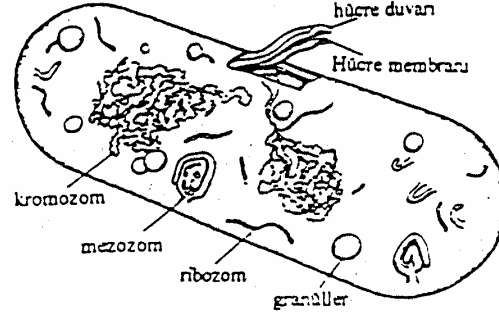
2.1.2 Bakteriler

Bakterilerin tam olarak tanımlanması güçtür; prokaryotlar grubunda, tek hücreli ve bölünen mikroorganizmalar şeklinde tanımlanabilirler. Bakteriler dış taraftan sert bir hücre duvarı ile çevrilidirler; türlerinin çoğunun hücre duvarının dış yüzeyi *kapsül* veya *slime-layer* olarak adlandırılan yapışkan, jelatinimsi bir tabaka ile kaplanmıştır. Tipik bir bakteri hücresi Şekil 2.1’de gösterilmiştir. Basit bakteriler spor, kamçı ve kapsül içermezler. 0.5-2.0 mikron çapındadırlar. İnce ipliksi bir ağ şeklinde görünen çekirdeği doğrudan doğruya sitoplazma ile sınırlanmış olan bakteriler Şekil 2.2’de görünen üç temel morfolojik şekilden bulunabilirler (Bailey and Ollis 1986).

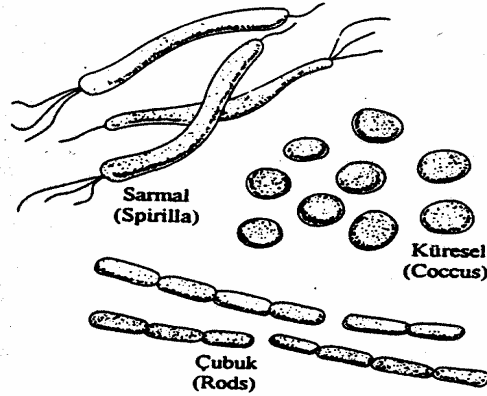
a) Çubuk (rod): Genel olarak 0.5-4.0µm uzunluk ve 0.5-4.0µm genişlikte dirler. *Bacillus* bu gruba girmektedir.

b) Küresel (coccus): Çapları 0.5-4.0 µm arasında değişmektedir.

c) Sarmal (spirilla): Yaklaşık 1 μm uzunluk ve 0.5 μm genişliktedir.



Şekil 2.1 Bakteri hücresi



Şekil 2.2 Bakterilerin üç farklı formu

Bakteriler tür ve çevresel koşullara göre tek, ikili, kümeli ya da uzun zincirli gruplar halinde bulunabilirler. Hücre zarı besinlere karşı yarı geçirgen özellikte olup, kuru hücre ağırlığının yaklaşık %5-10'unu oluşturur. Bu zar başlıca %50 protein, %28 yağ ve %15-20 karbonhidrat içeren çift katmanlı bir yapı gösterir. Gram pozitif bakterilerin hücre zarında aromatik ve kükürt içeren amino asitler, arginin ve prolin bulunmaz. Gram negatif hücrelerin zarları ise lipitçe daha zengindir. Hücre zarında elektron aktaran ve oksidatif fosfatlanmayı sağlayan enzimler bulunmaktadır.

Bakteri hücrelerinde; endoplazmik retikulum, mitokondri, golgi kompleksi bulunmaz. Bakterilerdeki temel genetik bilgiler kromozomda bulunur. Bakterilerin çoğu kromozomal DNA'larına ek olarak, bazı özelliklerini genetik kontrol altında tutan, sitoplazmada serbest olarak bulunan, kendi kendilerini replike edebilen 1-100 kb büyüklüğünde *plasmid* adı verilen dairesel DNA moleküllerini içerir.

Bazı bakteriler sitoplazmalarında spor oluşturma ve bulundurma potansiyeline sahiptirler. Bu tip bakteriler yüksek ve düşük sıcaklık, kuraklık, osmoz ve kimyasal etkilere karşı dirençlidirler. Çevre koşullarının uygun olmadığı durumlarda spor yapabilen bakteriler güç dış etkenlere karşı türünü koruyabilmek için “spor” oluştururlar. Spor uygun besi yerinde ve çevre koşullarında bulunduğu zaman kendini koruyan korteksinden kurtularak yaşamsal faaliyetlerine geri döner. *Bacillus* spor yapan bakterilerdendir. Bu bakterilerin sporları havada ve toprakta bulunmaktadır (Lehninger 1979).

2.1.2.1 *Bacillus* türü mikroorganizmalar

Bacillus prokaryot sınıfında, gram pozitif, aerobik ve ısıya dayanıklı spor oluşturan bakteri grubudur. Çubuk şeklinde olan bu bakteri grubu hücreleri 0.3-2.2 µm çapında ve 1.2-7.0 µm uzunluğundadır. *Bacillus*'ların guanin+sitozin (G+C) bileşimi %32-62 arasında değişir (Çalık 1998, Buchanan and Gibbons 1974).

Bacillus sp. hücre zarı besinlere karşı yarı geçirgen özelliğe sahiptir. Bu zarın başlıca %50 protein, %28 yağ, %15-20 karbonhidrat içeren bileşimi ve çift katmanlı yapısı vardır. *Bacillus sp.* hücre duvarları stoplazmik membranları koruyan ve çevreleyen, dinamik olarak değişken ve esnek yapılardır. Hücre duvarları hücrelerin çoğalmasında, morfogenezde, hücre bölünmesinde, genom segregasyonunda, hücre ve çevre etkileşiminde ve materyallerin hücre-içi ve dışına taşınımında önemlidir. *Bacillus* hücre duvarları, diğer gram pozitif hücreler gibi temel olarak peptidoglikan ve bir veya birden fazla anyonik polimerden oluşur. Bunun yanında peptidoglikan-anyonik polimer kompleksine kovalent bağlarla veya kovalent olmayan etkileşimlerle bağlı değişik oranlarda protein; nötral polisakkarit, lipoteikoik asit ve hücre duvarı kompleksinin

polielektrolit jel yapısının parçası olan katyonlar hücre duvarında bulunurlar. Duvarın fiziksel ve kimyasal özellikleri, özellikle sınırlı gözenekliliği ve yüklü grupların yüksek derişiminden dolayı duvar, stoplazmik membran ile mikroçevre arasındaki materyallerin sınırsız taşınımını engelleyebilecek özelliktedir. Duvarın katyon bağlama (iyon değişimi) ve membran bağlı enzim sistemlerinin etkinliği için uygun iyonik ortam oluşturma işlevi vardır (Çalık 1998).

Rekombinant mikroorganizma kullanan fermentasyon endüstrisinde konak hücre olarak kullanılan *Bacillus* endüstriyel önemi olan bir mikroorganizmadır. *Bacillus*'lar değişik karbon kaynaklarını kullanarak, çok yüksek pH ve sıcaklıklarda ekstrem koşullarda kararlılığı yüksek ürünleri üretebilmektedirler. Diğer mikroorganizmalara kıyasla moleküler genetik tekniklerle daha kolay manipüle edilebilirler; metabolitleri ve proteinleri hücre-dışına transfer etme kapasiteleri yüksektir ve endüstriyel üretim için seğimli olmalarının bir diğer nedeni de kolaylıkla çoğalabilmeleridir. Bu grubun ürettiği ana ürünler; (i) hidrolitik enzimler, (ii) antibiyotikler, (iii) haşarat ilaçları, (iv) nükleositler, (v) vitaminler ve (vi) diğer biyomoleküllerdir (Arbige 1993).

2.1.2.1.1 *Bacillus subtilis* ve özellikleri

Bacillus türleri endüstriyel olarak önemli olan çeşitli enzimleri, haşarat öldürücü endotoksinler ve rekombinant proteinleri salgılayan organizmalardır. *Bacillus* araştırmaları için *Bacillus subtilis* kullanılır; genetik, biyokimyasal ve fizyolojik seviyede en iyi tanımlanmış prokaryotik organizmadır.

B. subtilis üzerinde en fazla çalışma yapılmış gram-pozitif prokaryottur ve *B. subtilis* için birçok plasmid geliştirilmiş ve uygun plasmid-vektör sistemleri geliştirmenin farklı evrelerinde farklı problemlerle karşılaşılmıştır. Doğal olarak transformasyonla plasmidleri alma potansiyeli olan *B. subtilis* endogenous plasmidler içermezler. Diğer bazı *Bacillus* suşları da konakçıları üzerinde kolaylıkla seğilebilir fenotipler vermeyen gizli plasmidler içerirler. *B. subtilis* plasmid vektörleri ilk olarak *Staphylococcus aureus* kökenli plasmidler kullanılarak elde edilmiştir. Bunların birkaçı *B. subtilis*'de replike olur ve antibiyotik dirençi sağlayan proteinleri üretir. *B. subtilis* için bugünkü plasmid

vektörlerinin çoğu yine *S. aureus* plasmidlerine dayanır. Başarılı klonlama kaydedilmesine rağmen, düşük klonlama verimleri ve plasmid kararsızlığı nedeniyle bu plasmidlerin *B. subtilis* için uygun olmadığı bulunmuştur. Gram-pozitif bakterilerden küçük plasmidlerin tek zincir bir DNA araürünü yoluyla, muhtemelen çevrim halkası (rolling-cycle) replikasyon ile replike olmaları önemli bir bulgudur (Bron 1990).

2.2 Genetik Mühendisliği Teknikleri

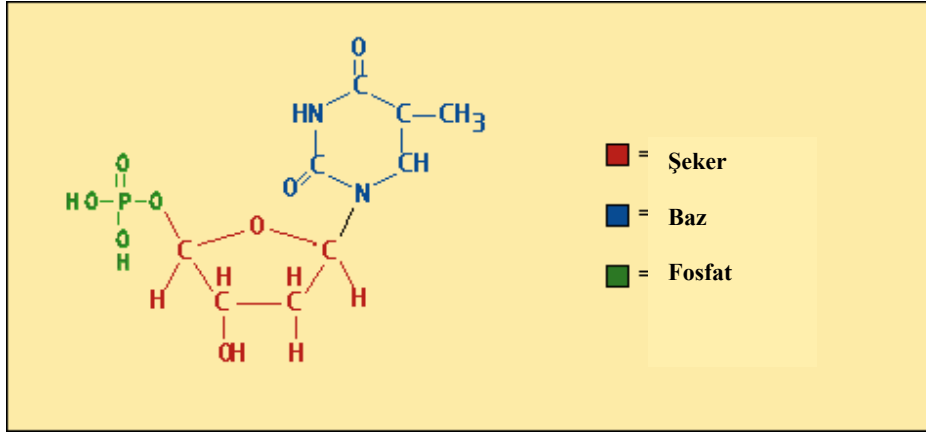
Endüstriyel biyoteknolojik ürünlerin üretiminde darboğaz oluşturan ve kritik bir basamak olan mikroorganizma geliştirilmesinde genetik mühendisliği ve rekombinant DNA teknolojisi uygulanması ve gelişimi için;

1° DNA yapısının ve fonksiyonlarının bilinmesi,

2° Biyokimyasal reaksiyon mühendisliği temellerinin bilinmesi, gerekmektedir (Çalık 1998).

2.2.1 Nükleik asitler

Nükleik asitler (DNA, RNA), yaşam bilgilerini içeren, bunları saklayan ve proteine dönüştürülmesini gerçekleştiren biyopolimerlerdir. İki tür nükleik asit vardır. Bunlar; deoksiribonükleik asit (DNA) ve ribonükleik asit (RNA)'dır. Nükleik asitler diğer polimerlerde olduğu gibi, dehidrasyon sentezi ile birleşen monomerlerden oluşmuştur. Nükleik asit monomerleri-nükleotitler-üç birimden oluşmuştur. Bunlar bir azotlu baz, bir şeker ve bir fosforik asittir. Şekil 2.3'de bir nükleotit biriminin yapısı gösterilmiştir (Lehninger 1979).

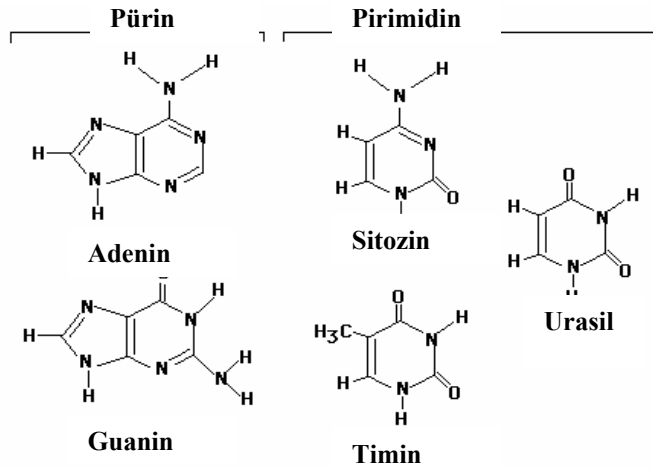


Şekil 2.3 Nükleotit biriminin yapısı

1. Azotlu bazlar, N içeren halka şeklindeki bazlardır. Nükleotidlerde bulunan azotlu bazlar pürin ve pirimidin bazları olarak iki gruba ayrılırlar.

a. Pirimidin bazları: Pirimidin, 1,3-diazindir yani benzen (6'lı karbon) halkasının 1- ve 3- yerlerinde iki azot molekülü bulunur. Bunun türevleri timin (T), sitozin (C) ve urasil (U) dır. Şekil 2.4'de pirimidin bazlarının formülleri gösterilmiştir.

b. Pürin bazları: Pürin halkası, imidazol ve pirimidin halkalarının kaynaşmasıyla oluşmuştur. Bunun türevleri adenin (A) ve guanin (G) dir. Şekil 2.4'de pürin bazlarının formülleri gösterilmiştir.



Şekil 2.4 Pürin ve pirimidin bazları

Bu azotlu bazlar kısaca ilk harfleri ile gösterilirler. Her nükleik asit sadece dört tür nükleotit

molekülünden oluşur. DNA'da urasil içeren nükleotit, RNA'da ise timin bazını içeren nükleotit bulunmaz (Lewin 1994).

2) Beş karbonlu monosakkarit: Nükleik asitlerin yapısına giren şeker beş karbonlu bir pentozdur. Fakat pentozun molekül yapısı iki tip nükleik asitte farklı olur. D-riboz şeklinde olduğu zaman, nükleik asit, ribonükleik asit (RNA), 2 deoksi-D-riboz olduğu zaman da deoksiribonükleik asit (DNA) adını alır.

Çekirdek baz D-riboz halkasının 1-β konumuna bağlanmış ise nükleosit, 2 deoksi-D-riboz halkasının 1-β konumuna bağlanmış ise buna deoksinükleosit denir. Bu iki pentozun moleküler yapısı incelenirse, aralarındaki fark riboz'da iki numaralı karbona bağlı hidroksil grubu olduğu halde deoksiriboz şekerinde bu konumda hidrojenin bulunmamasıdır; bu nedenle ikincisi “oksijensiz” anlamında “deoksi” ön-eki kullanılarak adlandırılmıştır (Stryer 1995, Lewin 1994).

3) Fosfat iyonu: Nükleik asitlerin fosfat kısmı, fosforik asidin diesteri şeklindedir. Bu nükleik asitlerin, uzun zincirlerini 3'-5' yerlerinden birbirine bağlar. Fosfodiester kısmında fosfora bağlı serbest bir -OH grubu bulunduğunda pH ~2 olan güçlü bir asittir (Lewin 1994).

2.2.2 DNA yapısı ve fonksiyonu

DNA, çift-iplik sarmal (helis) yapıda polimerik makromoleküldür. DNA ipliksi molekülün monomeri olan nükleotit bir organik baz, adenin(A), sitozin (C), guanin (G) veya timin (T) içerir. Bazın, deoksiriboz şekerinin 1'-karbon atomuna , fosfat grubunun da deoksiriboz şekerinin 5'-karbon atomuna bağlanmasıyla DNA molekülünün monomerik birimi olan nükleotit oluşur. Bir nükleotit deoksiriboz şekerinin 3'-hidroksil gruplarının ve komşu nükleotitin 5'-fosfat gruplarının *fosfodiester bağları* oluşturması ile binlerce nükleotitten oluşan birincil yapıdaki ipliksi DNA makromolekülü oluşur (Şekil 2.5). DNA ikincil yapısı primidin ve pürin bazları arasında gerçekleşen düzlemsel

hidrojen bağlarıyla oluşur. A ile T iki hidrojen bağı ile, G ile C üç hidrojen bağıyla birbirlerine bağlanırlar (A=T, G=C). İki zincirin birbirlerine hidrojen bağıyla bağlanmaları sonucunda ortaya çıkan yapıya ise DNA'nın sekonder (ikincil) yapısı denir (Şekil 2.6). DNA'nın tersiyer yapısı sarmal yapının ortaya çıkmasıdır. Bu yapıda DNA molekülü sağa ve sola kıvrılarak üç boyutlu yapısını oluşturur (Şekil 2.7) (Stryer 1995).

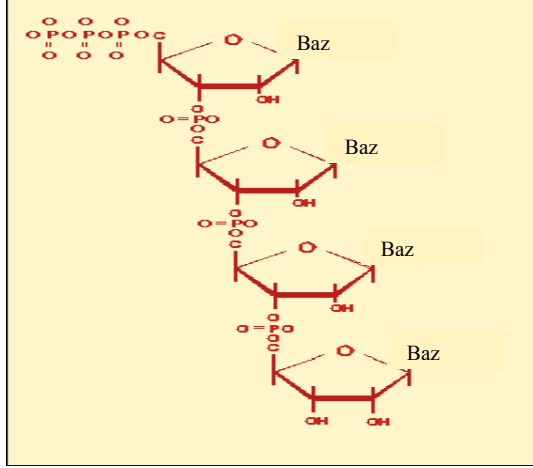
Çift sarmal yapıdaki DNA molekülünün uzunluğu eşleşmiş nükleotitlerin sayısı ile tanımlanır; kısaca baz çiftleri sayısıdır. Bir baz-çifti mertebesi için 'bp', binler mertebesi için 'kbp', milyon mertebesi için 'Mbp' megabaz çiftleri sayısı uzunluk birimi olarak kullanılır. Bir organizmanın yapısının oluşması ve biyokimyasal fonksiyonları, DNA'da kodlanmış bulunan bilgiye dayanır. Genetik bilginin özgün birimlerine 'GEN' denir. DNA'daki bilgi içeriği nükleotitlerin özgün dizinine bağlıdır. Herhangi bir gen otomatik olarak fonksiyon gösteremez, fonksiyonunu göstermesi veya pertürbe edilmesi için hücre bileşenleri tarafından bilgilendirilmelidir. Her gen kararlı bir yapıya sahiptir ve dışarıdan bir etki geldiği takdirde etkilerden dolayı değişimler olabilir. Gen dizininde meydana gelen değişikliklere mutasyon denir. Mutasyon genetik bilgi yapısındaki bilgi değişimine neden olur (Lewin 1994).

Mikroorganizmaların ve ökaryotik hücrelerin DNA büyüklükleri Çizelge 2.1'de verilmiştir. Bakterilerde ve yüksek organizmalarda genetik bilgiyi bir jenerasyondan diğer bir jenerasyona çift-sarmal yapıdaki DNA taşır (dsDNA). Bazı bakteriyel virüslerde ise genetik bilgi tek DNA (ssDNA) dizini ile taşınır (Lewin 1994).

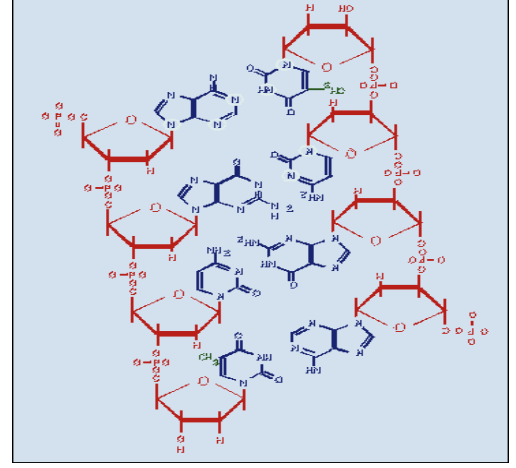
Çizelge 2.1 DNA molekül büyüklükleri

Polimer	Molekül Çapı
DNA(Mikroorganizma)	20Å
DNA(Yüksek mikroorganizma)*	110 Å
DNA polimeraz	200 Å
RNA polimeraz	100 Å
Protein (50.000 dalton)	50 Å

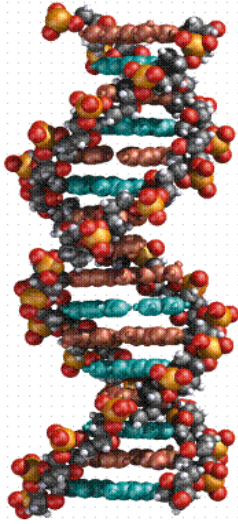
* Hayvan hücrelerinin kromozomu bakteri kromozomundan yaklaşık 50 kat büyüktür.
Bir insan kromozomu bir bakteriden daha büyüktür.



Şekil 2.5 DNA'nın birincil yapısı



Şekil 2.6 DNA'nın ikincil yapısı



Şekil 2.7 DNA'nın üç boyutlu yapısı

2.2.3 RNA ve fonksiyonları

RNA'nın primer yapısı temelde DNA'ya çok benzer olup aralarındaki fark RNA'da timin (T) yerine urasil (U) bulunması ve şeker grubunda riboz olmasıdır. Tek zincir halinde bulunan RNA molekülleri, yer-yer kendi üzerlerinde kıvrılarak çift helis bölgeler meydana getirebilirler. Bu bölgeler de DNA'da olduğu gibi A=U ve G=C baz çiftleri arasında yer alan hidrojen bağları tarafından oluşturulmuştur (Lehninger 1979).

Protein sentezinde görev yapan nükleik asitler RNA'lar hücrede, DNA'dan aldıkları genetik bilgi ile protein sentezinde görev yaparlar. RNA molekülleri genellikle tek zincir halindedir. Hücrede protein sentezinde görev yapan üç farklı RNA vardır. Bunlar ribozomal RNA (rRNA), mesajcı RNA (mRNA) ve transfer RNA (tRNA) 'dır. *E.coli*'den izole edilen RNA moleküllerinin büyüklükleri Çizelge 2.2'de verilmiştir (Lehninger 1979).

rRNA'lar üç farklı boyutta olurlar. 5S, 16S ve 23S. Bunlar çok sayıda protein ile kendiliğinden birleşerek ve kompleksleşerek proteinlerin sentezlendiği ribozomları oluştururlar.

mRNA'lar sentezlenecek proteinin büyüklüğüne bağlı olarak değişik büyüklüklerde olurlar. mRNA'lar DNA'dan genin dizini ile ilgili bilgiyi üzerlerine aldıklarından genin nükleik asit dizinine analog büyüklükte olurlar. Moleküllerinde baz etkileşimleri yoktur. Bunların fonksiyonları DNA'daki genetik bilgiyi alarak protein sentez merkezleri olan ribozomlara taşımaktır (Lehninger 1979).

tRNA'lar amino asitleri protein dizininde yerlerini almaları için taşırlar. Her bir amino asite ait spesifik bir tRNA hücrede mevcuttur. tRNA'lar 73-93 nükleik asitten meydana gelmişlerdir. Molekül ağırlıkları 25.000 Da'dur (Lehninger 1979).

Çizelge 2.2 *E.coli*'deki RNA molekülleri

RNA çeşidi	Yüzde	Molekül ağırlığı
Ribozomal RNA (rRNA)	80	1.2*10 ⁶ Da 5.5*10 ⁵ Da 3.6*10 ⁴ Da
Transfer RNA (tRNA)	15	2.5*10 ⁴ Da
Haberci RNA (mRNA)	5	**

** Büyüklükleri protein molekülünün büyüklüğüne göre değişir.

2.2.4 Mikro-reaksiyon mühendisliği ve mikro-ayırma işlemleri

Genetik mühendisliği ile ilgili tekniklerde, tepkimeler ng mertebesinde DNA ve girdiler kullanılarak mikro-reaksiyon mühendisliği prensipleriyle mikroreaktörlerde gerçekleştirilir; tepkime sonrası DNA parçaları tepkime karışımından mikro-ayırma işlemleri ile (spesifik adsorpsiyon, iyon değişimi, ekstraksiyon, çöktürme vd) ayrılır. DNA'nın kimyasal yapısının aydınlatılması ve hücre-içindeki biyokimyasal tepkime koşullarının bulunmasıyla, birçok tepkimeyi hücre-dışında reaksiyon mühendisliği teknikleri kullanılarak mikro-reaktörlerde gerçekleştirmek için geliştirilen yöntemler moleküler biyoteknolojide hızlı gelişmenin temelini oluşturmuştur (Çalık 1998).

Bir DNA molekülünü kimyasal olarak "DNA Sentezleyici" veya "Gen Makinası" adı verilen cihazlarla standart olarak sentezlemek, DNA Dizin Analiz Cihazıyla gen/DNA dizinini analizlemek, Polimeraz Zincir Tepkimesiyle (PCR) gen sentezleyerek derişimini artırmak mikro-reaksiyon mühendisliği prensiplerine uygun olarak geliştirilen mikro-reaktör sistemlerinde gerçekleştirilir (Çalık 1998).

2.2.4.1 DNA'nın kimyasal sentezi

DNA sentezleyicide sentez biyokimyasal tepkimeler ile değil kimyasal bir proses ile, DNA'nın 5'-hidroksil ucundan başlayarak nükleotitlerin sırayla bağlanması prensibiyle, tüm tepkimeler kontrollu gözenekli cam (KGC/CPG) ile dolgulu bir tek kolonda, kalma

süresi farklı tepkimelerin ardışık olarak yapılmasıyla gerçekleştirilir. Geliştirilen dolgu kolon mikro-reaktör sisteminde ardışık tepkimeler ve tepkimeyi izleyen yıkama işlemleri bilgisayar kontrollu olarak yapılır. Kolondaki tepkime öncesinde adenin, guanin ve sitozin amino grupları sırasıyla benzoil, izobütiril ve tekrar benzoil grupları eklenerek türevleri yapılır ve DNA zincirinin oluşması için yapılan tepkime sırasında yan-ürün vermeleri önlenir (timinin amino grubu olmadığından türevi yapılamaz). DNA molekülü hangi uzunlukta sentezlenecekse herbir ardışık tepkime için girdiler kolona pompalanır; tepkimeden sonra yıkama ile tepkimeye girmeyenler uzaklaştırılır ve ikinci basamak tepkimeye geçilir. Nükleositler, KGC-silisyum gruplarına bağlı hidroksil gruplarına bağlanan, spacer (ara molekül) adı verilen ucunda birinci nükleositin 3'-ucundan bağ yapabileceği fonksiyonel grup bulunan taşıyıcı pellet üzerinde, ardışık tepkimelerle istenen dizinde DNA zincirinin oluşması için sırasıyla tepkimeye sokulur (Çalık 1998).

2.2.4.2 Gen dizininin belirlenmesi

DNA dizini iki yöntemle belirlenebilir;

1. DNA dizini DNA dizin analiz cihazında doğrudan belirlenebilir,
2. Protein yapısından yola çıkarak bulunabilir. Bu yöntemde protein molekülü küçük parçalara bölünür ve protein dizini protein analiz cihazında analiz edildikten sonra protein yapısından nükleik asit (DNA) dizinine genetik kodlardan yararlanılarak geçilebilir.

DNA dizin analizinin temeli Sanger veya dideoksi yöntemine dayanır. Bu yöntemde ssDNA kalıp (template) olarak kullanılır ve primerler yardımıyla ssDNA'ların kopyaları üretilir. Burada kullanılan primerler klonlamanın yapıldığı vektörün polilinker bölgesinden seçilir. Genellikle mavi/beyaz koloni yöntemi ile seçimi yapıldığı için kullanılan primerler β -galaktosidaz enziminin gen dizininden seçilir. Kullanılan primerler gen sentezi 3'-ucundan 5'-ucuna doğru ilerlemelidir. Primerler yardımıyla genin sentezlenmesi için DNA polimeraz ve dNTP'lere gerek duyulur. Dizin analizi yapabilmek için ortama hem dNTP'ler hem de ddNTP'ler eklenir. Kalıbın kopyası

üretilirken DNA polimeraz enzimi her ddNTP eklediğinde sentez orada duracaktır. Çünkü ddNTP'lerin 3'-ucu sonra gelecek dNTP'nin 5'-ucu ile fosfodiester bağı yapacak konuma sahip değildir. Pratikte her bir tepkime kabına dört tür dNTP' de konur, ancak ddNTP'lerden ise sadece bir tanesi tepkime ortamına eklenir. Örneğin; dört dNTP ve ddATP'nin bulunduğu bir tepkime kabında, DNA dizininin sentezi, polimer her ddATP ile karşılaştığında duracaktır. Ortamda hem ddATP hem de dATP bulunduğu için iki nükleotit aynı yer için yarışacaklar ve tepkimeler sonunda değişik uzunlukta olan -hepsinin sonu ddATP ile biten- polimer zincirleri sentezlenebilecektir. Bu tepkime ddATP ile yapıldığı gibi diğer ddNTP-ddCTP, ddGTP, ddTTP- ile farklı tepkime kaplarında yapıp agaroz jelde elektroforetik ayırma ile ayırıldıktan sonra polimerin büyüklüğüne ve son nükleotit bazına bakılarak dizin tayin edilebilmektedir. Günümüzde ise her bir ddNTP farklı bir floresans madde ile işaretlenmekte ve veriler de lazer tarayıcısı ve bilgisayarlar tarafından güvenle işlenebilmektedir (Çalık 1998).

2.2.4.3 Polimeraz zincir tepkimesiyle (PCR) gen derişiminin artırılması

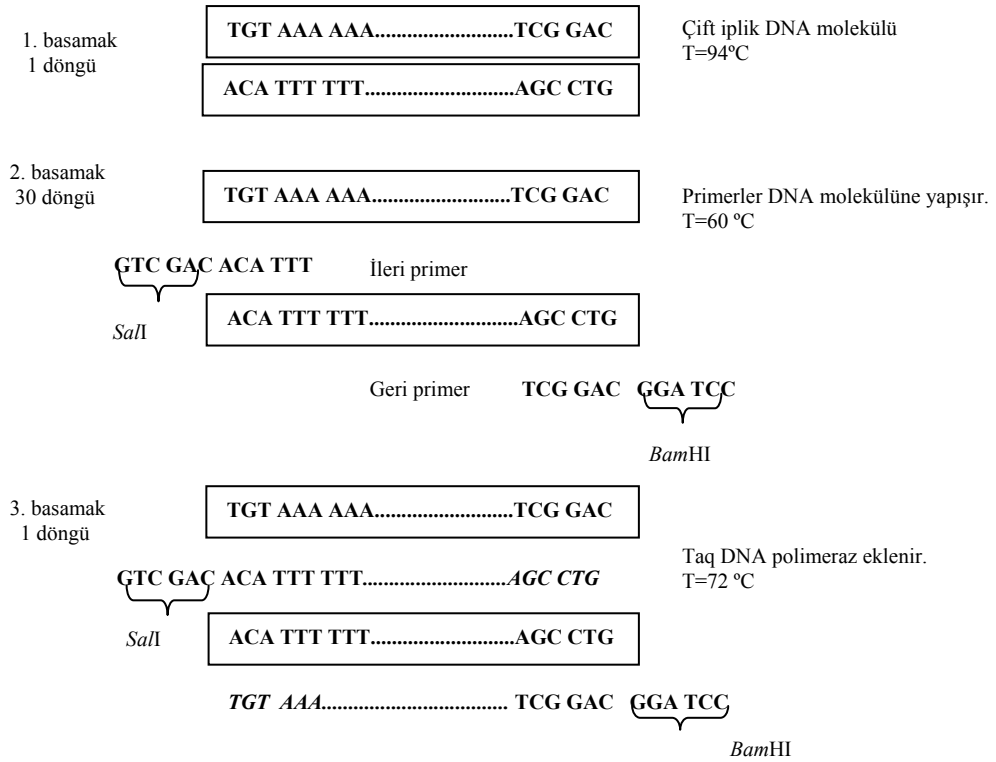
Polimeraz zincir tepkimesi (PCR: Polymerase Chain Reaction) spesifik bir DNA'nın belirli uzunluktaki bir hedef bölgesinin dizinini (kalıp) hücre-dışında yüksek derişimde çoğaltmak için etkili bir yöntemdir. Hedef DNA dizininin derişimi, PCR tepkimesi ile her döngüsü üç basamaktan oluşan çok sayıda (30-60 döngü) ardışık döngü ile artırılır. PCR tepkimesi ile gen derişiminin artırılmasının temeli DNA polimeraz enzimi ile ssDNA'nın kalıp olarak kullanılmasıyla DNA parçasının derişiminin artırılmasıdır. PCR ile hedef genin derişiminin artırılabilmesi için hedef genin her iki ucundaki DNA dizininin tamamlayıcısı olan, uygun koşullarda hedef ssDNA'nın uçlarına bağlanabilen, 3'-hidroksil uçlarından sentezin başlamasını ve devam etmesini sağlayan ve klonlama için uygun restriksiyon enzim konumlarını içeren yaklaşık 20-30 nükleotitten oluşan iki sentetik oligonükleotit primer (ileri primer ve geri primer) tasarlanır (Şekil 2.8). Birbirinden sıcaklık etkisiyle ayrılmış iki DNA zinciri de -primerler yardımıyla çoğaltılması sırasında kalıp olarak kullanılabilir.

Bir PCR prosesindeki her döngü üç önemli basamaktan oluşmaktadır. Bunlar:

1. dsDNA'dan ssDNA oluşması: PCR sisteminde ilk basamak, tepkime karışımının sıcaklığının 94°C'ye çıkarılmasıyla dsDNA'dan ssDNA oluştuğu basamaktır. Hedef DNA'ya ek olarak tepkime kabında primerler, dört dNTP ve Taq DNA polimeraz enzimi de bulunmaktadır. Sıcaklık 94°C'ye çıkarıldıktan sonra tepkime kabı 1dk bu sıcaklıkta bekletilir.

2. Primerlerin bağlanması: İkinci basamakta, sıcaklık 94°C'den primerlerin yapışma sıcaklığına (~50-60°C) düşürülür. Böylece primerler hedef DNA üzerindeki spesifik bölgelerine bağlanırlar.

3. DNA sentezi (dsDNA'nın oluşması): Son basamak olan üçüncü basamakta, sıcaklık Taq DNA polimerazın katalitik fonksiyonu için optimum olan 72°C'ye çıkartılır ve böylece her bir primerin 3'-hidroksil grubundan DNA sentezi başlar. DNA sentezinin tamamlanması için gerekli süre hedef DNA'nın büyüklüğüne (1dk/kb) bağlı olarak değişir (Sambrook ve Russell 2001).



Şekil 2.8 PCR ile gen derişiminin artırılması

2.2.4.4 Gen derişiminin ölçümü

Gen derişimi;

1. Jel elektroforetik, ve
2. UV spektrofotometrik yöntemlerle belirlenebilir.

DNA molekülünün net yükü -yapısındaki fosfat iyonları nedeniyle- negatiftir. DNA molekülleri -molekül ağırlıklarındaki farklar nedeni ile- jel elektroforez cihazıyla, bir elektrik alan uygulanarak ayrılırlar. Uygulanan elektrik alan içinde molekül ağırlığı en küçük olan DNA en hızlı, en büyük olan da en yavaş hareket eder. DNA moleküllerinin ayrılmasında jel olarak agaroz-çok küçük DNA parçalarının ayrılması için de poliakrilamit kullanılır. Agaroz derişimi %0.7-1.2 (a/h) arasında amaca göre değişir. Jel elektroforezin işletilmesi sırasında voltaj 125V'ü aşmamalıdır. Bu değerin üzerinde jelin yapısı bozulur ve elektroforez çözeltisinde buharlaşma meydana gelir. Jel elektroforez cihazında jelin örnek haznelerinden birine işaretleyici (marker) yüklenir. İşaretleyicide bulunan bantlar ve büyüklükleri bellidir. Bu sayede koşturulan jel için uzaklığa karşı molekül ağırlığı grafiğe geçirilerek kalibrasyon yapılır ve istenen genin molekül ağırlığı yapılan bu kalibrasyon ile bulunur. Örnekleri jele yüklerken, yükleme boyasının kullanılması gerekmektedir. Çünkü yükleme boyasındaki bromofenol mavisi 300bp DNA ile aynı hızla hareket eder ve böylece DNA bantlarının yaklaşık yerleri ve cihazın işletme süresi belirlenir. Jelde DNA parçalarının elektroforetik koşturulması tamamlandıktan sonra jel etidyum bromür (EtBr) çözeltisinde bekletilir ve DNA parçaları EtBr ile boyanır; böylece UV ışığı altında bantlar gözlenebilir. Genin veya DNA parçalarının derişimi ve molekül ağırlıkları, bilinen işaretleyici DNA parçalarının bant üzerindeki konumları ve yansıttıkları ışık şiddeti ile kıyaslanarak hesaplanır (Çalık 1998). Hem DNA hem de RNA derişimi spektrofotometre ile tayin edilebilir. Nükleik asitler, UV-spektrofotometrede 260 nm dalga boyunda en yüksek oranda ışık absorpsiyonu yaparlar. Derişim tayin edilirken DNA'nın veya RNA'nın saflaştırılmış olmasına dikkat edilmelidir; çünkü bulunan derişim ortamda bulunan tüm DNA ve RNA'nın derişimi olacaktır (Smith and Wood 1991).

2.2.4.5 Restriksiyon enzimleri ve seçimi

Belli bir gen dizininden hedef DNA parçasının ayrılmasını sağlamak üzere kullanılan yöntem DNA moleküllerinin uygun restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesikli mikro-reaktörlerde enzimatik tepkimelerle kesilmesidir. Bakteriler tarafından yabancı DNA'ları yok etmek için sentezlenen bu enzimlerin diğer endonükleazlardan en önemli farkları DNA'da daima belli hedef dizinleri seçebilmeleri ve hep aynı dizinde özgül ve özgün kesme yapabilmeleridir. .etkilerine göre üç farklı restriksiyon enzim sınıfı bulunmaktadır. Tüm endonükleaz enzimleri, nükleik asitler arasındaki fosfodiester bağlarını keserler. Bunlardan endonükleaz enzimi II grubunda olanlar gen klonlamasında kullanılmaktadır. Bu enzimler DNA'nın genellikle dört ile sekiz adet baz içeren kısmını seçerler ve hedef dizini tanıyarak kesme yaparlar. Spesifik DNA'ları kesen 150'den fazla endonükleaz enzimi izole edilmiş durumdadır. Yaptıkları kesme biçimine göre küt (blunt) ya da yapışkan (sticky) uç DNA parçaları oluşur. Bazı restriksiyon enzimleri ve kesme biçimleri Çizelge 2.3'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.3 Bazı restriksiyon enzimleri ve kesme biçimleri

Enzim	Mikroorganizma	Hedef dizin	Yapışkan/Küt Uç Kesim
<i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli</i>	GAATTC	Yapışkan
<i>BamHI</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	GGATCC	Yapışkan
<i>BglIII</i>	<i>Bacillus globigii</i>	AGATCT	Yapışkan
<i>PvuI</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	CGATCG	Yapışkan
<i>PvuII</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	CAGCTG	Küt
<i>HindIII</i>	<i>Haemophilus influenzae R_d</i>	AAGCTT	Yapışkan
<i>HinfI</i>	<i>Haemophilus influenzae R_f</i>	GANTC	Yapışkan
<i>Sau3A</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	GATC	Yapışkan
<i>AluI</i>	<i>Arthrobacter luteus</i>	AGCT	Küt
<i>TaqI</i>	<i>Thermus aquaticus</i>	TCGA	Yapışkan
<i>HaeIII</i>	<i>Haemophilus aegyptius</i>	GGCC	Küt
<i>NotI</i>	<i>Nocardia otitidis-caviarum</i>	GCGGCCGC	Yapışkan

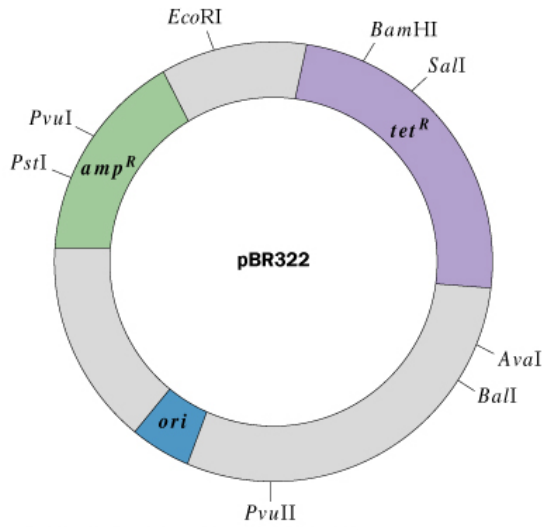
Restriksiyon enzimleri spesifik olarak bir nükleotit şekerinin 3'-karbonunun oksijeni ile, komşu nükleotit şekerinin 5'-karbonuna bağlı fosfat grubu arasındaki internükleotit bağı koparır. *EcoRI* ve *SalI* restriksiyon enzimlerinin DNA molekülünü kesme işlemi Şekil 2.9'da gösterilmiştir. DNA'nın kesiminde kullanılan restriksiyon enzimlerinin seçimi klonlama prosesinin tasarımında önemli bir basamaktır.



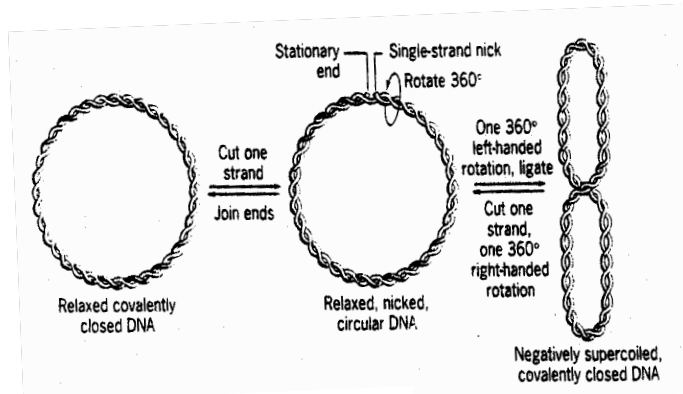
Şekil 2.9 *SalI* restriksiyon enzimi ile DNA molekülünü kesme tepkimesi

2.2.4.6 Plasmidler ve özellikleri

Bakterilerdeki temel genetik bilgiler kromozomda bulunur. Bakterilerin çoğu büyük DNA kromozomuna ek olarak, bazı özelliklerini genetik kontrol altında tutan, sitoplazma içinde serbest olarak bulunan, kendi kendilerini replike edebilen 1-100kb büyüklüğünde plasmid adı verilen dairesel DNA molekülleri içerir (Şekil 2.10). Plasmidler, içinde bulundukları konakçı hücre ile uyum içinde yaşarlar. Plasmidlerin en önemli özelliği, bakteri kromozomundan bağımsız olarak replike olabilmeleri ve kendi replikasyonlarını kontrol edebilmeleridir (Kalender 2000). Plasmidlerin büyüklüğü idealde 10 kb'ı geçmemelidir. Çünkü büyük DNA moleküllerinin saflaştırma sırasında kırılma olasılığı vardır, ayrıca büyük plasmid molekülleri çok zor manipüle olurlar. Plasmidler genellikle bir veya bir kaç gen taşırlar, ve bu genler konakçı bakterinin belirli karakteristik özellikleri göstermesine neden olurlar. Örneğin; kloramfenikol veya ampisilin gibi antibiyotiklerin toksik derişimlerinde bakterilerin yaşamlarını sürdürebilme kabiliyetleri genellikle bakterilerde bulunan plasmidlerin taşıdığı antibiyotik direnç genleri ile sağlanmaktadır. Plasmidler hücrede sabit ve karakteristik bir kopyalama sayısında muhafaza edilirler. Yani bu sayı nesilden nesile sabit olarak kalır. Kopyalama sayısı plasmidlerde bulunan genler tarafından belirlenir fakat konakçı hücre ve çoğalma koşullarından etkilenir (Kalender 2000).



Şekil 2.10 Plasmidlerin genel yapıları



Şekil 2.11 Hücrede bulunan plasmid şekilleri

Genellikle bakteriyel plasmidler hücre-içinde dairesel DNA molekülleri olarak bulunurlar. Plasmidler kopyalama sayısına göre düşük (low) ve yüksek (high) kopyalama sayılı olarak iki gruba ayrılır. Bu sınıflandırma oldukça geniştir. Plasmidlerin transfer şekli, sıklığı, antibiyotik dirençliliği gibi bazı özelliklerine göre daha detaylı bir sınıflandırma yapmak mümkündür.

Aşağıda verilen 4 grup plasmid diğerlerine oranla daha iyi incelenmiştir:

F plasmidi: F plasmid ilk keşfedilen plasmiddir ve çok geniş olarak çalışılmıştır. Bu plasmidler konjugasyon ile bir mikroorganizmadan diğer bir mikroorganizmaya kendilerini transfer edebilmeleri nedeniyle önemlidir.

R plasmidleri: Antibiyotiklere karşı direnç özelliğini yöneten genleri içeren plasmidlerdir. Bunu taşıyan bir bakteri hangi antibiyotiğe karşı dirençli ise o ortamda rahatlıkla yaşayabilir. Bir plasmid birden fazla antibiyotiğe karşı dirençli olabilir.

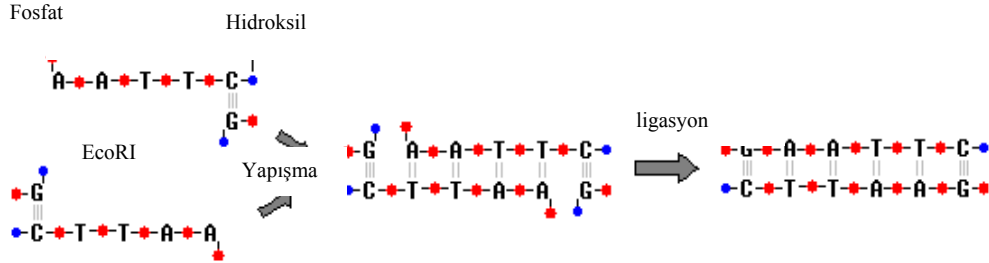
Col plasmidleri: Col plasmidleri bakterilerde "colicin" yapımını yöneten genetik bilgiyi taşıyan plasmidlerdir. Colicinler, değişik bakteri türleri tarafından salgılanan ve genellikle aynı türün diğer elemanlarına öldürücü etkisi olan antibiyotik benzeri maddelerdir. Değişik bakteri türleri tarafından oluşturulan ve birbirine benzeyen bu maddelere genel olarak "Bacteriocine" de denilmektedir.

Rekombinant plasmidler: Bu plasmidler, doğal olarak iki veya daha fazla plasmidden türetilen parçaların yeniden birleştirilmesi ile yapılan hibrit plasmidlerdir. Bunlar yaygın olarak klonlama vektörleri olarak kullanılır (Kalender 2000).

2.2.4.7 Klonlama : Ligasyon tepkimesi

Klonlama işlemi, mikro-reaktörlerde sıvı ortamda Taq DNA polimeraz enzimi ile DNA molekülleri arasında fosfodiester bağı oluşturularak gerçekleştirilir (Şekil 2.12). Bu tepkimenin oluşması için ortamda aynı restriksiyon enzimleri ile kesilmiş -aynı uçlara sahip- plasmid DNA ve klonlanmak istenen genin bulunması gerekmektedir. Ligasyon tepkimesi, genetik mühendisliği teknikleri içinde kısıtlayıcı basamağı oluşturmakta, reaksiyon mühendisliği prensipleri ile tepkime koşullarının geliştirilmesi klonlama prosesinin düşük olan başarı olasılığını yükseltebilmektedir. Ligasyon tepkimesi sonunda oluşan ürünler lineer ve gevşemiş (relaxed) plasmid oldukları için bunların transformasyonu süperhelis (supercoiled) plasmide kıyasla daha zor olur. Ligasyon

tepkimesi sonunda elde edilen ürünler gen transfer teknikleri ile uygun konak hücrelere transfer edilirler (Çalık 1998, Bloom *et al.* 1996).



Şekil 2.12 Ligasyon tepkimesi

Optimum tepkime koşullarının bulunması: Ligasyon tepkimesinin gerçekleşmesi için ortamda ng mertebesinde makromolekül DNA bulunur. Makromoleküllerin klonlanması için klonlanması gereken iki makromolekülün klonlanması gereken uçlarının karşı karşıya gelmesi gerekmektedir. Bu olasılığın düşük olması klonlama tepkimelerinin gerçekleşme olasılığını da azaltmaktadır. Ligasyon tepkimesinde ortamda bulunan vektörün ve genin derişimi çok önemlidir. Vektör ve gen derişimleri DNA parçalarının büyüklüğüne göre değiştiğinden bunların uygun derişimleri optimize edilmelidir (Bloom *et al.* 1996).

2.2.4.8 Genin hücreye transferi

Bakteriler sadece laboratuvar koşullarında değil, doğada da genetik yapılarını değiştirirler. Bakterilere gen transferi aşağıdaki üç mekanizma ile gerçekleşmektedir. Bunlar;

1. Transformasyon,
2. Konjugasyon, ve
3. Transdüksiyondur.

Bakteriye göre yukarıdaki gen transfer yöntemlerinden biri kullanılmaktadır.

Örneğin, konjugasyon, sadece gram negatif hücrelerde gerçekleştirilirken, gram pozitif bakterilerde gerçekleşmez. Bazı bakterilerde de transformasyon doğal olarak gerçekleşirken, bazılarında gen transferi için önışlemlerin uygulanması gerekir. Doğada meydana gelen transformasyonlar ise, bakterilerin yabancı DNA'lara karşı kendilerini korumak için ürettikleri endonükleazlar sayesinde sınırlıdır.

Transformasyon

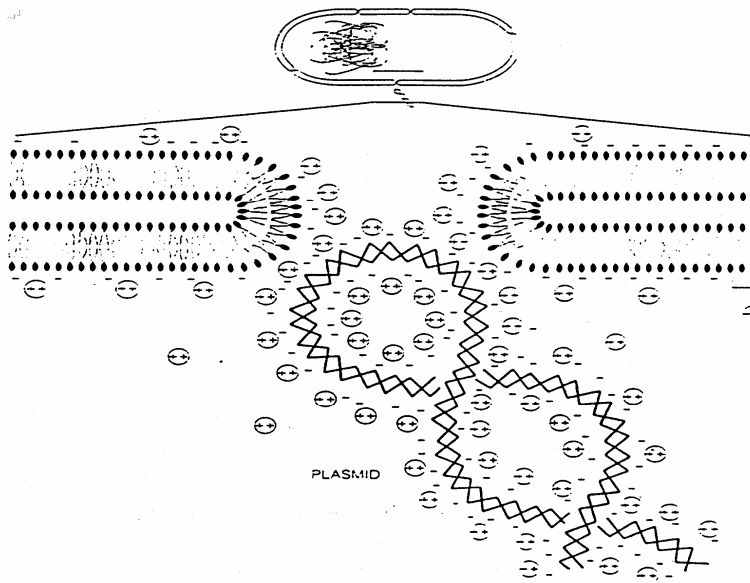
Bu yöntem genetik çalışmalarda en çok kullanılan yöntemler grubudur. Bu yöntemde bakteri hücreleri DNA molekülünü içine alırlar. Dört farklı yöntem vardır. Bunlar;

1. Doğal aktarım,
2. İndüklenmiş aktarım,
3. Protoplast transformasyonu, ve
4. Elektroporasyon

Doğal aktarım yönteminde bakteri kendiliğinden yabancı DNA'yı üstel çoğalma fazının başında alır. Bakterinin içine aldığı DNA parçası, kromozomal DNA'nın bir bölümüyle aynı dizine sahipse, kromozoma entegre olur ve kromozom ile birlikte çoğalarak varlığını sürdürür. *Bacillus* türü bakterilere gen bu yöntemle transfer edilebilmektedir.

İndüklenmiş aktarım yönteminde bakteri hücreleri önışlemlerden geçirildikten sonra DNA transferi yapılır (Şekil 2.13). Bu yöntem ile ilgili birçok yöntem (protokol) bulunmaktadır. Bunlardan en uygunu ve en çok kullanılanı, *E.coli* hücrelerinin CaCl_2 ile yıkanması ve $+4^\circ\text{C}$ 'de bekletildikten sonra plasmid DNA ile aynı ortama konulup, 42°C 'de 1-2 dakika bekletilerek ısı şokuyla plasmid DNA'nın hücreye transferidir. Transfer yapıldıktan sonra hücreler katı ortamda uygun bir işaretleyici antibiyotik kullanılarak çoğaltılırlar. Bu yöntemde hücrenin, istenen DNA molekülünü hangi mekanizma ile içine aldığı halen bilinmemektedir.

Protoplast transformasyon yönteminde bakterilerin hücre duvarı kısmen - lizozim enzimi ile- enzimatik olarak hidroliz edilir. Ortamda osmotik stabilizatörlerin -sakkaroz gibi- bulunması durumunda, hücrelerin parçalanmaları önlenir. Transformasyon sırasında ortamda hücre ve DNA ile birlikte uygun oranda PEG kullanılması durumunda, yüksek verimde transformasyon gerçekleşir ve istenen DNA parçası istenen mikroorganizmanın kromozomal DNA'sına girmiş (fused edilmiş) olur. Transformasyon basamağından sonra hücreler santrifüjlenerek PEG uzaklaştırılır fakat hücre çoğalması stabilizatör varlığında gerçekleştirilir. Transformasyon için diğer bir teknik de elektroporasyondur. Bu yöntemde pulse etkiyle yüksek voltaj uygulanarak DNA istenen hücreye transfer edilir. Bu yöntemde de hücrenin hangi mekanizma ile DNA'yı aldığı henüz bilinmemektedir (Glazer 1995).



Şekil 2.13 İndüklenmiş transformasyon sırasında hücre ve plasmidin durumu

2.2.4.9 Geni taşıyan plasmidlerin bulunması

Transformasyon işleminden sonra, istenen geni taşıyan hücrelerin uygun yöntemlerle seçimi gerekir. Transformasyon sonunda ortamda çok fazla koloni bulunacağı için seçici işaretleyici (selective marker) gereklidir. En yaygın yöntem antibiyotiklere karşı direnç sağlayabilecek gen taşıyan plasmidlerin klonlamada kullanılmasıdır. *E.coli* ile

yapılan çalışmalarda genellikle ampisilini etkisiz hale getirecek geni -amp^R- taşıyan plasmidler tercih edilmektedir. Transformasyon işleminden sonra koloniler seçici işaretleyici görevini yapacak antibiyotiği içeren ortamda çoğaltılırlar. Plasmidi taşıyan hücrelerin hepsi bu ortamda yaşama kapasitesine sahiptir. Antibiyotik içeren ortamda yaşayabilen hücrelerin hepsi klonlamada kullanılan plasmidi taşımalarına rağmen klonlanması amaçlanan geni taşıma olasılıkları çok düşüktür. Kontrol amacı ile her bir hücre tekrar çoğaltılır ve hücrelerden plasmid izolasyonu yapıldıktan sonra plasmidler uygun restriksiyon enzimleri ile kesilerek istenen geni taşıyıp taşımadıkları kontrol edilir.

Plasmidin özelliklerine bağlı olarak geni taşıyacak olan plasmidi seçme yöntemleri de değişir.

- a. İki antibiyotiğe karşı direnç sağlayan plasmid kullanımıdır. Bu yöntemde klonlanmak istenen gen, antibiyotiğe karşı direnç sağlayan genlerden birini pertürbe edecek şekilde klonlanır.

İstenen geni taşıyan mikroorganizma ise aşağıdaki yöntemle seçilir.

- b. Transformasyondan sonra hücreler, klonlamadan etkilenmemiş antibiyotiği içeren ortamda çoğaltılırlar.

İkinci aşamada, bu hücreler iki ayrı ortamda çoğaltılırlar.

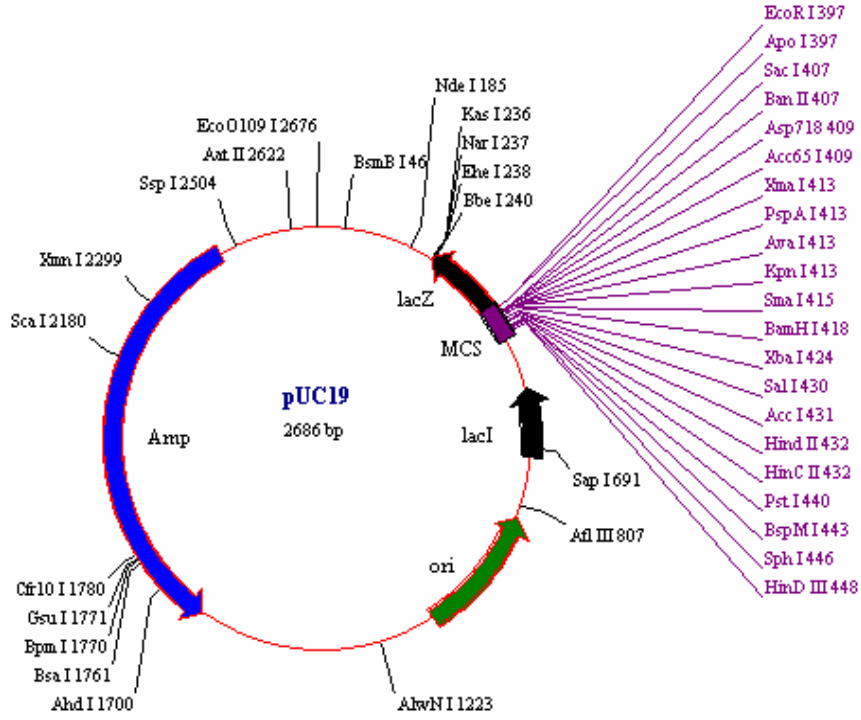
1. Birinci ortam geni pertürbe edilen antibiyotiği içerir, ikinci ortam ise klonlamadan etkilenmemiş genin antibiyotiğini içerir.
2. Birinci ortamda çoğalmayan, ikinci ortamda çoğalabilen hücrelere klonlama gerçekleşmiştir.

Çünkü birinci antibiyotikli ortamda hücrenin çoğalmaması antibiyotiği etkisiz hale getirecek genin fonksiyon göstermemesi demektir.

Klonlanmış plasmidi taşıyan koloninin seçiminde en çok kullanılan yöntemlerden biri, *lacZ* genini taşıyan plasmidlerin kullanımıdır. Genin ürettiği β -galaktosidaz enziminin galaktozu parçalama fonksiyonundan yararlanılmaktadır. Bu yöntemde galaktozun analogu X-gal (5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktosid) substrat olarak kullanılmaktadır. Plasmid tarafından β -galaktosidaz üretilip ve substrat hidroliz edildiğinde hücrelerin rengi bu substrat analogunun kromatografik özelliklerinden dolayı mavi olmaktadır. *lacZ* geni, gen yapısına herhangi bir nükleik asit dizininin sokulmasıyla pertürbe edildiğinde β -galaktosidaz enzimi sentezlenemeyeceği ve substrat analogunu parçalayamayacağı için kolonilerin rengi beyaz olacaktır. Bu işaretleyici içeren plasmidlerde *lacZ* geni içinde bir poliklonlama konumu bulunur ve klonlama işlemleri bu bölgeye yapılır. Koloniler bu yöntemle renklerine göre seçilir ve tüm yöntemlerdeki gibi restriksiyon analizleriyle genin varlığı kontrol edilir. Şekil 2.14’de pUC19 plasmid vektörü gösterilmiştir. Bu vektör, hem ampisilin direnç genini taşımakta hem de *lacZ* genini taşımaktadır. Bu vektöre benzer çok sayıda vektör temin edilebilir.

Verimi en yüksek olan yöntem ise koloni hibridizasyon (hybridisation) yöntemidir. Bu yöntemde radyoaktif izotop içeren dNTP’ler kullanılarak, klonlanması istenen gen radyoaktif olarak işaretlenerek probe hazırlanır. Probe hazırlamak için ssDNA kalıp olarak kullanılır. ssDNA’nın karşılık gelen zinciri klenow enzimi ile oluşturulur.

Ortamdaki nükleik asitlerden birisi radyoaktif izotop taşır. Geni taşıyan plasmidi içeren mikroorganizmalar nitroselüloz filtreler üzerine adsorplanır ve bu filtre radyoaktif prob ile hibridize edilir ve bir sonraki aşamada ya X-ray filmine radyoaktif maddenin ışınları aktarılır veya özel bir görüntü analiz (Molecular Imager) cihazında radyoaktif ışınla oluşan sinyalden yararlanarak klonlanmış geni içeren plasmidin aktarıldığı mikroorganizma seçilir (Sambrook 2001).



Şekil 2.14 pUC19 plasmid vektörü

2.3 Biyoproses Karakteristikleri

Biyoteknolojik üretimlerde kullanılan ve biyoreaktör içindeki mikro-biyoreaktörler olan hücreler hedeflenen üretim için koşulları geliştirilmesi ve optimize edilmesi gereken ortamlarda, genetik kontrol mekanizmalarının etkisi altında binlerce enzim tarafından katalizlenen çok sayıdaki metabolik reaksiyonu hücre-içinde gerçekleştirerek ve hücre-içi/dışı arasında farklı mekanizmalarla yürüyen transferler yaparak substratları tüketirler; kendilerini ve metabolik ürünleri üretirler. Hücre kinetiği yani substrat tüketim, hücre ürün ve yan-ürün üretim kinetikleri hücreleri sırasıyla çok bileşenden ve tek bileşenden oluşmuş "yapısal" (structured) ve "yapısal olmayan" (unstructured) yaklaşımlarla tanımlanabilir. Farklı özelliklerde heterojen hücre toplulukları "ayrık" (segregated), ortalama ortak özelliklere sahip hücre toplulukları "birleşik" (unsegregated) olarak nitelendirildiğinde; ayrık hücreleri dikkate alan yapısal model yaklaşımı, gerçek durumu yansıtırken ortak özelliklere sahip hücrelerin tek bileşen gibi düşünüldüğü modeller ideal bir durumu tanımlarlar. Genel olarak hücre kinetiği

proseste ulaşılmak istenen temel amaca uygun gerekli anahtar değişkenlere bağlı olarak kullanışlı matematiksel modellerle tanımlanmalıdır (Bailey and Ollis1986).

Kesikli biyoreaktörlerde hücre derişiminin zamanla değişimi "çoğalma eğrisi" genel olarak S-eğrisi (sigmoid) şeklindedir ve "gecikme", "üstel çoğalma" ve "duraklama" fazlarını içerir. Hücre üretim hızı, r_x aşağıda verilen Monod denklemiyle hücre derişimi C_x 'e bağlanabilir:

$$r_x = \frac{dC_x}{dt} = \mu C_x \quad (2.1)$$

Burada μ , spesifik çoğalma hızıdır. μ değerini substrat derişimine bağlayan Monod, substrat, ürün inhibisyonu gibi modeller mevcuttur. Karbon kaynağının tüketim hızı, $-r_s$ ürün üretim hızı, r_p ise sırasıyla:

$$-r_s = -\frac{dC_s}{dt} \quad (2.2)$$

$$r_p = \frac{dC_p}{dt} \quad (2.3)$$

tüketilen substrat başına üretilen hücre veya ürün ise aşağıdaki verim katsayıları ile tanımlanabilir:

$$Y_{x/s} = \frac{r_x}{-r_s} = \frac{dC_x}{-dC_s} \quad (2.4)$$

$$Y_{p/s} = \frac{r_p}{-r_s} = \frac{dC_p}{-dC_s} \quad (2.5)$$

Benzer şekilde tüketilen oksijen başına üretilen hücre verimi ise,

$$Y_{x/o} = \frac{r_x}{-r_o} \quad (2.6)$$

şeklinde tanımlanmıştır.

Farklı verim katsayılarının tanımları ve birimleri ile birlikte Çizelge 2.4'de verilmiştir.

Çizelge 2.4 Farklı verim katsayılarının tanımları (Blanch and Clark 1997)

Sembol	Tanım	Birim
$Y_{x/s}'$	Oluşan hücrenin mol C miktarının tüketilen substratın mol C miktarına oranı	mol hücre (mol substrat) ⁻¹
$Y_{x/s}$	oluşan hücrenin ağırlığının tüketilen substratın ağırlığına oranı	g hücre (g substrat) ⁻¹
$Y_{x/o}'$	oluşan hücrenin mol C miktarının tüketilen oksijenin mol C miktarına oranı	mol hücre (mol oksijen) ⁻¹
$Y_{x/o}$	oluşan hücrenin ağırlığının tüketilen oksijenin ağırlığına oranı	g hücre (g oksijen) ⁻¹
$Y_{p/s}'$	oluşan ürünün mol C miktarının tüketilen substrat mol C miktarına oranı	mol ürün (mol substrat) ⁻¹
$Y_{p/s}$	oluşan ürünün ağırlığının tüketilen substrat ağırlığına oranı	g ürün (g substrat) ⁻¹

Eğer verim faktörü tanımlanan proses için yaklaşık olarak sabitse, proses süresince hücre ve substrat derişimindeki değışiklikler sadece stokiyometri temel alınarak belirlenebilir. Bu durumda biyoreaktör tasarımından gelen etkiler ihmal edilerek değışkenlerden biri diğeri cinsinden ifade edilebilir. Ancak biyoteknolojik proseslerde verim katsayısının sabit olduğunu kabul etmek, mikroorganizmanın yaşamsal faaliyetleri de göz önüne alındığından mümkün değildir. Bu nedenle proses veriminde mikroorganizmanın çoğalma hızına ve yaşamsal işlevlerine bağılı olarak biyoproses süresince değışim gözlenir. Bu durumda mikroorganizmanın substrat tüketimini belirlemek için ürün oluşumu ve hücre çoğalması yanında hücrenin yaşam fonksiyonlarının da dikkate alınması gerekir (Bailey and Ollis 1986). Toplam seçimlilik prosesin başlangıç ve bitiş zamanı arasındaki dC_i/dt (i =hücre, ürün, substrat veya çözünmüş oksijen derişimi) olarak tanımlanabilir.

2.4 Biyoreaktör İşletim Parametreleri

2.4.1 Sıcaklık

Biyoproses ortamının sıcaklığı çoğalma hızında etkili olduğu gibi karbon ve enerji kaynaklarının kullanımında da etkilidir; substratlardan hücre ve ürün oluşum verimlerini değiştirebilir. Sıcaklık düşüncü daha fazla enerjiye gereksinme olacağı için karbon ve enerji kaynağının verimi de düşer. Ayrıca sıcaklık azaldıkça çoğalma sırasındaki magnezyum, potasyum ve fosfat verimleri üzerinde de düşmeler gözlenmiştir. Bazı hallerde biyoproses ortamının sıcaklığı ile birlikte mikroorganizmalardaki yolizlerinde de değişiklikler olduğu gözlenebilmiştir (Pekin 1980). Her mikroorganizmanın çoğalmasının/ürün üretiminin maksimum olduğu bir optimum sıcaklık/sıcaklık aralığı vardır. İstenilen ürünün verimini ve seçimliliğini artırmak için mikroorganizmanın aktif olduğu optimum sıcaklık değerinde veya aralığında çalışılmalıdır. L-fenilalanin üretimi ile ilgili çalışmalar incelendiğinde sıcaklık etkisi parametre olarak incelenmeden *Corynebacterium glutamicum* ile ilgili çalışmalarda 30°C, *Brevibacterium lactofermentum*'da 31.5 °C, *Escherichia coli*'de 33-38.5 °C, *Bacillus polymyxa* ve *Bacillus subtilis*'te 37 °C sıcaklık değerlerinde çalışılmıştır (Çizelge 2.10).

2.4.2 pH

Ortamdaki hidrojen iyonu derişimi hücrenin metabolik faaliyetlerine bağılı olarak değişir ve hücre-dışındaki değişimlere rağmen hücre, iç pH değerini sabit tutar. Hücre-içi ve dışı arasındaki proton gradyeni ise kütle aktarımından enerji üretimine, pek çok metabolik fonksiyon için gereklidir (Neilsen and Vallidsen 1994). Bu nedenle hücre-dışı pH'ın değeri/aralığı hücre fazla ya da az enerji harcayarak proton gradyenini korumaya çalışacağı için metabolik faaliyetleri, dolayısıyla da üretim verimini değiştirecektir. Sonuç olarak biyoüretim sırasında verim ve seçimlilik açısından dış ortamın pH'ını belli değerde ya da aralıkta tutmak gerekebilir (Pekin 1980, İleri ve Çalık 2006).

Biyoproses süresince pH değişimi metabolik yolizindeki değişimlerin ve sapmaların önemli bir göstergesidir. Karbonhidratlar, örneğin glukoz kullanıldığında, hücre-içi

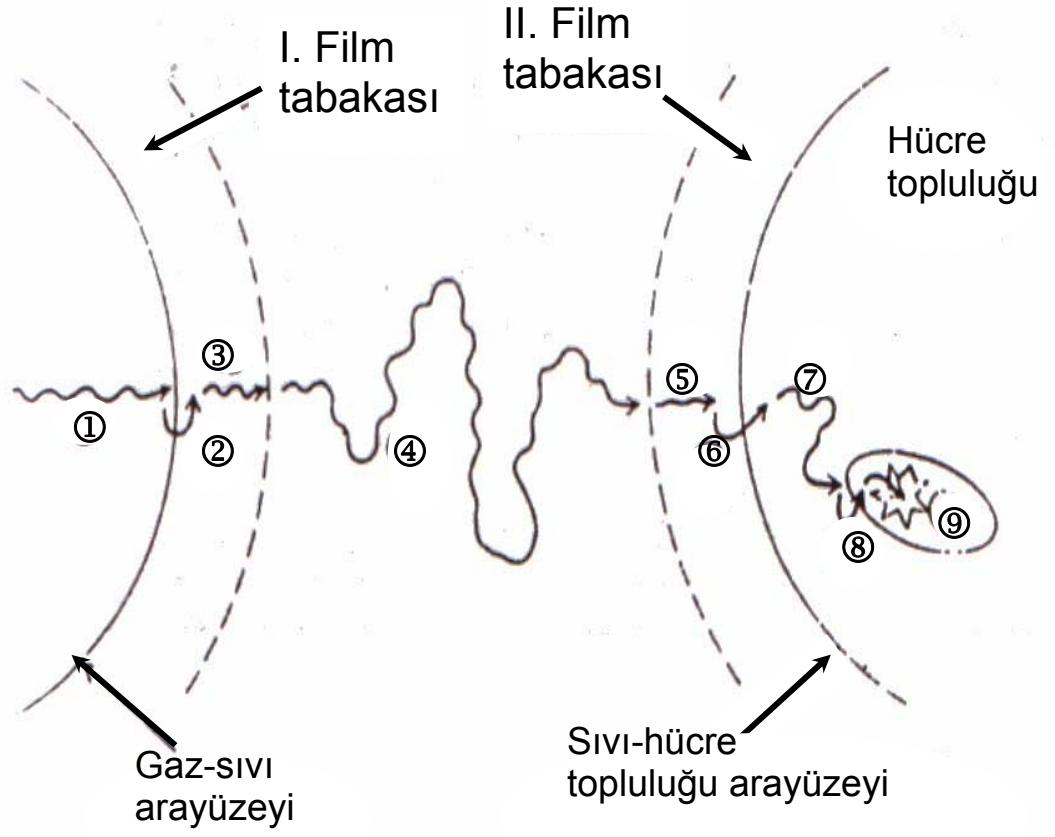
tepkimelerle oluşan organik asitlerin, amino asitlerin ortama salgılanmasıyla birlikte ortam pH'ında düşme, ortama salgılanan metabolitlerin tekrar hücreye transferi ve kullanımıyla da artış gözlenir. Ortam pH'ına bağlı olarak hücre-içi tepkimeler ve hızları değiştiğinden, biyoteknolojik ürünlerin üretiminde kullanılan mikroorganizmalar, çoğalma ve istenen ürünün üretimi için farklı optimum pH değeri ya da aralığına sahip olabilirler.

2.4.3 Oksijen aktarımı

Oksijenin girdi olarak kullanıldığı aerobik proseslerde mikrobiyal hücreler solunum, çoğalma, ürün sentezi gibi metabolik faaliyetlerini sürdürebilmek için temel girdilerden biri olan oksijene ihtiyaç duyarlar. Bu nedenle çoğalma ve üretim ortamındaki çözünmüş oksijen derişimi ve oksijenin aktarım hızı önemlidir. Oksijenin aktarımının eksikliği ya da fazlalığı ürün verimi ve seçimliliğini etkiler. Bir biyoteknolojik proseste oksijen gereksinimi ve aktarımı, mikroorganizma türüyle, üretim ortamının fiziksel özellikleri ile, biyoreaktör ve karıştırıcı konfigürasyonu ile ilgilidir. Karıştırmalı biyoreaktörlerde oksijen aktarımı için oksijen/hava giriş hızı ve karıştırma hızı ile birlikte önemli biyoreaktör işletim parametreleridir (Çalık vd 2000a, b).

Aerobik üretim proseslerinde mikrobiyal hücrelere oksijenin aktarım hızı, biyolojik dönüşüm hızının belirlenmesinde önemli bir kısıtlayıcı etkidir. Çünkü biyokimyasal reaksiyonların hızları üretim ortamına aktarılan oksijenin aktarım hızına oranla genel olarak daha yüksektir.

İki film teorisine göre biyoproses ortamındaki bir gaz kabarcığından mikrobiyal hücreye oksijenin aktarımı şekil 2.15'de görüldüğü gibi sekiz basamakta gerçekleşir (Bailey and Ollis 1986).



Şekil 2.15 İki film teorisine göre bir gaz kabarcığından mikroorganizmaya oksijenin aktarım mekanizması

1. Oksijenin gaz yığınının gaz-sıvı ara yüzeyine aktarımı
2. Gaz-sıvı ara yüzeyde çözünme (gaz fazdan sıvı faza geçiş)
3. Çözünmüş gazın durgun sıvı filminde aktarımı
4. Çözünmüş gazın iyi karışan sıvı yığında aktarımı
5. Çözünmüş gazın mikrobiyal hücre yığınının bitişik durgun sıvı filminde aktarımı
6. Çözünmüş gazın durgun sıvı film tabakasına bitişik hücre kümesine aktarımı
7. Hücre yığınının hücreye aktarım
8. Hücre duvarından geçiş ve reaksiyon konumuna aktarım

Oksijenin su içerisindeki çözünürlüğü düşüktür. Bu nedenle oksijen aktarımında gaz filminin direnci sıvı film direncine kıyasla ihmal edilebilir düzeydedir. Biyoproses

ortamında karıştırma hızının veya havalandırma hızının artırılmasıyla hava kabarcıkları çevresindeki film dirençleri kırılarak oksijenin biyodönüşüm ortamındaki aktarım hızı artırılabilir. Hücre kümeler oluşturmuyorsa altıncı adım ortadan kalkacaktır. Hücreler ara yüzeylere adsorplanma eğiliminde olduklarından çözünmüş oksijen tek bir sıvı film direncini aşmak durumunda kalabilir.

Oksijenin biyoproses ortamındaki çözünme hızı hava kabarcıkları çevresinde yeni filmin oluşma hızı ile kontrol edilir. Eğer biyoproses ortamı iyi bir şekilde karıştırılamıyor ve sıvı faz içinde derişim profilleri önemli ise sıvı yığındaki oksijen aktarım dirençleri de hızı kısıtlar. Bu nedenle sıvı fazdaki tüm oksijen aktarım dirençlerini azaltmak için biyoproses ortamı mekanik ve/veya gaz girişı ile karıştırılmalıdır. Bu durumda, oksijen moleküllerinin biyoproses ortamında mikrobiyal hücrelere taşınımı hem moleküler aktarım hem de konvektif aktarım ile gerçekleşir.

Hücre kümesi içinde difüzyon ve arayüzeylerden (gaz-sıvı, sıvı-hücre kümesi ve hücre zarı) geçiş direnç oluşturmuyorsa birim hacım başına gazdan sıvıya oksijen aktarım hızı, sıvı faz hacımsal kütle aktarım katsayısı cinsinden aşağıdaki gibi tanımlanabilir:

$$N_A = K_L a (C_0^* - C_0) \quad (2.7)$$

Oksijenin sudaki çözünürlüğü düşük olduğundan toplam kütle aktarım katsayısı $K_L a$ sıvı tarafı kütle aktarım katsayısı $k_L a$ 'ya eşit olacaktır.

b Oksijen aktarım karakteristikleri

Aerobik fermentasyon proseslerinde mikrobiyal hücreye oksijen aktarımı, metabolik akıların değışmesi ve metabolik yolizinin etkilenmesi nedeniyle ürün oluşumunu etkiler. Bu nedenle mikroorganizmanın fizyolojisiyle ilgili biyoreaktör performansının belirlenmesi için mikroorganizmanın oksijen ihtiyacının aydınlatılması gerekmektedir. Denklem (2.1) ile tanımlanan gazdan sıvıya oksijen aktarım hızı ise hem gaz hızı ve karıştırma hızıyla belirli fizikokimyasal özelliklere sahip sıvı fazda yaratılan karıştırma etkilerine hem de sıvı fazda oksijenin mikroorganizma tarafından tüketim hızına

bağlıdır. Bu nedenle oksijen tüketim hızı ve kütle aktarım katsayısı “oksijen aktarım karakteristikleri” olarak adlandırılırlar.

b.1 Oksijen tüketim hızı

Aerobik biyoreaktörlerin tasarımı çoğunlukla prosesi kontrol eden basamak belirlenerek yapılır. Bu basamak oksijen aktarım hızı, oksijen tüketim hızı ya da başka bir substratın tüketim hızı olabilir. Mümkün olan en yüksek oksijen aktarım ve tüketim hızları belirlenip kıyaslanarak ilgili parametrelerden hangisinin hız kısıtlayıcı olduğu bulunabilir. Maksimum oksijen aktarım hızı $C_o=0$ koşulundaki N_{Amax} değeridir ($N_{Amax}=k_L a C_o^*$). Oksijenin maksimum tüketim hızı ise Denklem (2.1) ve (2.6)’dan $-r_{0max}=C_x \mu_{max}/Y_{x/o}$ olarak bulunur. Burada C_x hücre derişimini, $Y_{x/o}$ tüketilen 1 g oksijene karşılık oluşan hücreyi gösterir.

Eğer maksimum oksijen aktarım hızı maksimum oksijen tüketim hızından daha büyükse, artan oksijen tüketimi için esas direnç mikrobiyal metabolizmadır ve biyoproses biyokimyasal tepkime ağı kısıtlamalı olur. Bu durumun tersi geçerli ise C_o yaklaşık sıfır ve biyoproses kütle aktarım kısıtlamalı olur. Ara durumlarda prosesi her iki adım da kontrol edebilir. Gerçekte durum yukarıdaki yaklaşımdan çok daha karmaşıktır. Sıva fazda oksijen derişimi kritik değerinin üzerinde ise hücre metabolizması oksijene doymuş durumdadır ve solunum zincirinden geçen tüm elektron çiftleri oksijen tarafından alınır. Bu durumda metabolizma içinde başka bir adım prosenin hızını kısıtlayacaktır (Bailey and Ollis 1986).

Pek çok faktör mikroorganizmanın oksijen ihtiyacını etkileyebilir. Biyoprosesdeki oksijen tüketim hızı mikroorganizmanın fizyolojik özelliklerine ve ortamdaki karbon kaynağına bağlıdır. Karbon kaynakları içinde glukoz genelde diğer karbonhidratlardan daha hızlı metabolizmaya girer. Örneğin *Penicillium* için gözlenen oksijen ihtiyacı laktoz, sukroz ve glukoz için sırasıyla 4.9, 6.7, 13.4 mol $dm^{-3} st^{-1}$ ’dir. Oksijen tüketiminin önemli bir kısmını hücre kendini çoğaltmak için kullanırken yaşamsal işlevleri, biyosentez ve ürün oluşumu içindeki oksidasyon tepkimeleri için de oksijen gerekmektedir. Dolayısıyla metabolik stokiyometri yardımıyla çoğalma için oksijen

tüketim hızı, substrat tüketim hızıyla doğrudan ilişkilendirilebilir (Bailey and Ollis 1986).

Aerobik proseslerde mikroorganizmanın üstel çoğalma fazı sırasında oksijen tüketim hızı artar ve oksijen aktarım hızı yeterli değil ise ortamdaki çözünmüş oksijen seviyesi, mikroorganizmanın oksijene olan ihtiyacından dolayı azalır. Biyoproseste kalma süresiyle birlikte ortamda hücre birikimi ve ürün oluşumunun artması sonucu viskozitenin artmasıyla ise oksijen aktarım hızı ve buna paralel olarak da oksijen tüketim hızı azalmaya başlar. Durgunluk fazı sırasında ise hücrenin oksijen ihtiyacı azalır ve bu gereksinimin büyük bir kısmını yaşamsal fonksiyonlar oluşturur. Oksijen tüketim hızının azalmasıyla da ortamdaki çözünmüş oksijen derişimi artar (Atkinson ve Mavituna 1991).

b.2 Sıvı faz kütle aktarım katsayısı

Oksijenin sıvı faz hacımsal kütle aktarım katsayısı (K_{La}), biyoreaktörlerde gaz-sıvı kütle aktarım hızını gösteren önemli bir parametredir. K_{La} , mikroorganizma türüne, fermentasyon ortamının fizikokimyasal özelliklerine, biyoreaktörün ve karıştırma sisteminin tasarımına, karıştırma ve havalandırma hızlarına bağlıdır (Aiba *et al.* 1973). Çözünmüş oksijenin metabolizmaya yeterli hızda aktarılıp aktarılamadığının bilinmesi, oksijen aktarım katsayılarının belirlenmesi ile mümkündür. Rainer (1990) biyolojik ve biyolojik olmayan sistemlerde sıvı faz hacımsal kütle aktarım katsayısının (K_{La}) deneysel olarak belirlenmesi için ölçüm yöntemlerini “doğrudan” ve “dolaylı” yöntemler olmak üzere iki grupta sınıflandırmıştır:

1) Doğrudan Ölçüm Yöntemleri

- i.* Dinamik Yöntem
- ii.* Gaz Dengesi Yöntemi
- iii.* Sürekli Kültür Yöntemi

2) Dolaylı Ölçüm Yöntemleri

- i. Gaz Çıkış Yöntemi
- ii. Elektrot-Momentum Yöntemi
- iii. Sülfite Oksidasyon Yöntemi
- iv. Glukoz-Oksidaz Yöntemi
- v. CO₂ Yöntemi

1) i. Dinamik yöntem

Dinamik Yöntem biyoreaktörlerde sıvı faz kütle/oksijen aktarım katsayısının (K_{La}) deneysel belirlenmesi amacıyla yaygın olarak kullanılan yöntemdir. Kolay uygulanabilir olması ve gaz içerisindeki bileşenlerin analizlerine ihtiyaç duyulmaması yöntemin avantajları arasındadır. Yatışkın olmayan koşulda, kesikli biyoreaktörde sıvı faz için kütle korunum denklemi kurulursa Denklem (2.8) elde edilir:

$$K_L a(C_o^* - C_o) + r_o C_x = \frac{dC_o}{dt} \quad (2.8)$$

Yöntem biyoreaktöre gönderilen havanın kısa süreli olarak kesilmesi ve bir oksijen elektrodu ile çözünmüş oksijen derişiminde önce azalmanın; havanın tekrar sisteme verilmesi ile de artışın incelenmesi prensibine dayanmaktadır (Rainer 1990) (Şekil 2.16). Havanın kesildiği t₀ anına kadar biyoreaktörde çözünmüş oksijen derişimi yatışkın koşulda C gibi bir değerdedir ve t₁ anında hava yeniden verilmektedir. T₀ anından t₁ anına kadar zamanla çözünmüş oksijen derişimindeki azalma gözlenir. Burada oksijen aktarımı gerçekleşmediğinden K_{La}(C_o*- C_o) terimi sıfıra eşittir ve Denklem (2.8) denklem (2.9)'a indirgenir:

$$r_o = \frac{dC_o}{dt} \quad (2.9)$$

Denklem (2.9)'dan oksijen tüketim hızı -r_o; denklem (2.10)'dan ise birim hücre kütlesi başına oksijen tüketim hızı -r_o bulunabilir.

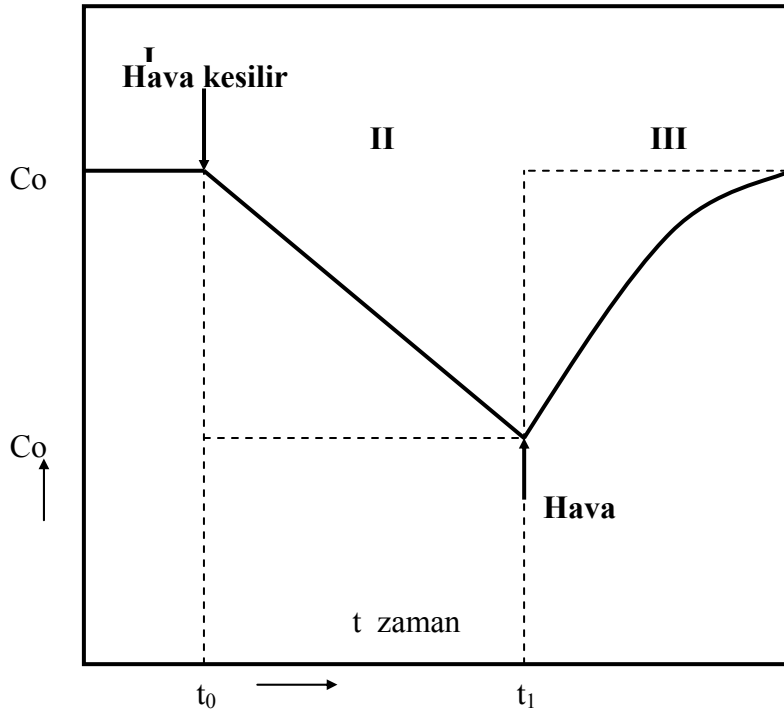
$$r_o = r_o''' C_x \quad (2.10)$$

t_1 Anında hava gönderilmesi ile çözünmüş oksijen derişiminin zamanla artışı gözlenir. Bu durumda Denklem (2.8) geçerlidir. Denklem (2.8) ve (2.9)'dan yararlanılarak,

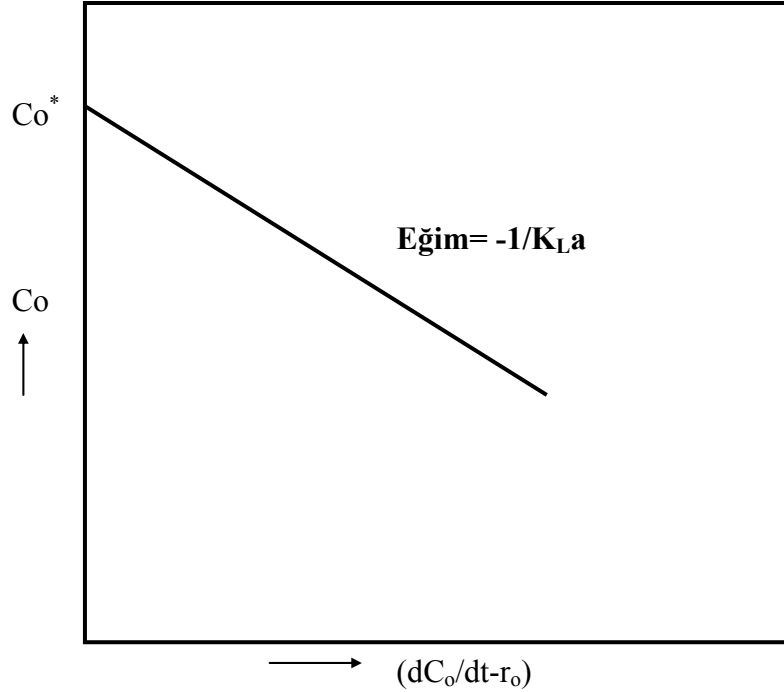
$$\{(dC_o / dt - r_o); C_o\}$$

grafiğı elde edilir (Şekil 2.17); grafiğın eğiminden $K_L a$ hesaplanır.

Biyoreaktörde havanın kesilmesi ile çözünmüş oksijen derişiminde hemen azalma olmaz. Biyoreaktörden çıkan hava kabarcıklarının uzaklaşması gaz tutma (hold-up) nedeniyle zaman alır. Yüksek karıştırma hızlarında, sıvı üzerindeki ara yüzeyden ölçülebilen büyüklükte oksijen aktarımı da meydana gelmektedir. Bu etkiyi azaltmak için hava kesildiğı zaman karıştırma hızı düşürülmelidir.



Şekil 2.16 Dinamik Yöntem uygulamasında çözünmüş oksijen derişiminin kalma süresi ile derişimi



Şekil 2.17 Dinamik Yöntem ile sıvı faz hacımsal kütle aktarım katsayısının belirlenmesi

K_La , kalma süresi, gaz hızı ve karıştırma hızıyla değişir ve karıştırma hızı arttıkça artar. Biyoprosesin gecikme ve üstel çoğalma evrelerinde sıvı-faz hacımsal kütle aktarım katsayısı, biyoproses periyodlarına bağlı olarak değişim göstermektedir. Biyoproses ortamının reolojik özelliklerinin proses süresince fazla değişmediği koşullarda, K_La 'nın momentum yayınlığının kütle yayınlığına oranı olan Schmidt sayısındaki değişimden etkilenmediği düşünülebilir. Tepkimeli bir sistemde, tepkime ve gaz-sıvı kütle aktarımının birlikte yer aldığı proseslerde kütle aktarımı çok sayıda parametreye bağlı olarak değişebilir. Bunlardan biri tepkime hızının proses süresince değişimi; diğeri ise kütle aktarım alanında bulunan küçük parçacıklardır (mikroorganizma). Bu nedenle mikroorganizmanın bulunduğu ortamda sıvı faz kütle aktarım katsayısının mikroorganizmanın oksijen tüketim hızına, boyutlarına ve derişimine bağlı olarak değişmesi beklenebilir (Çalık 2000a,b).

Biyoteknik ortamının karıştırılması ve havalandırılması köpük oluşumuna neden olur. Biyoproses ortamına kimyasal köpük gidericilerin katılması gaz-sıvı ara yüzeyinde kütle aktarım dirençlerini olumsuz yönde etkiler. Yüzey geriliminin artması ile gaz kabarcığı ara yüzey alanı azalır. Bu nedenlerle köpük kontrolü için kimyasal köpük gidericilerin kullanılması kütle aktarım katsayısında azalmaya neden olur (Aiba 1973). Ayrıca ürün ve mikroorganizma derişiminin artması nedeniyle viskozitenin artması da kütle aktarım dirençlerini artıracığı için $K_L a$ 'yı azaltır.

2.5 Metabolik Mühendislik

Moleküler biyolojik teknikler, analitik yöntemler ve matematiksel araçlarda son on yılda meydana gelen gelişmeler, endüstriyel- ve medikal- biyoteknolojik amaçlar için metabolik mühendislik yaklaşımının gelişmesine ve bu alan ilgi oluşmasına neden olmuştur (Stephanopoulos 1998). Metabolik mühendislik, istenen ürünün yüksek verimlilik ve seçicilikte üretimi için genetik mühendisliği teknikleriyle hücre-içinde meydana gelen spesifik biyokimyasal tepkimelerin uygun bir şekilde modifikasyonu veya bunlara yeni tepkimelerin eklenmesiyle hücrenin özelliklerinin doğrudan geliştirilmesi olarak tanımlanmaktadır (Stephanopoulos 1998). Kısaca; metabolik mühendislik, hedeflenen özel amaca ulaşmak için mühendislik prensipleriyle metabolik tepkime yollarının analizlenmesi ve tasarlanmasıdır (Yang 1998). Metabolik tepkime yollarının tasarlanması için önerilen genetik modifikasyonların yapılmasında kullanılan moleküler biyolojik teknikler ile akıların ve akı kontrol mekanizmalarının kantitatif olarak belirlenmesi için kullanılan analitik yöntemlerin kombinasyonu metabolik mühendisliğin temelini oluşturmaktadır (Stephanopoulos 1998). Metabolik mühendislik yaklaşımı ile rekombinant protein, amino asit ve antibiyotik üretim proseslerinde ürün verimliliği artırılmaktadır (Yang 1998).

Metabolik mühendisliğin bir çok uygulama alanları vardır. Bunlar:

1. Proteinler, amino asitler, organik asitler, vitaminler ve antibiyotikler vb. biyokimyasal ürünlerin üretiminde verim ve seçiciliğin artırılmasında,

2. Yeni ürünlerin üretiminde (örnek mikroorganizmalarda ve bitkilerde poliketid ve biyopolimer sentezi),

3. Farmasotik ürünlerin üretiminde ara-ürünler olan kiral bileşiklerin üretiminde, Medikal alanda , gen-terapi ve beslenme stratejileriyle hastalıkların kontrolü için hedeflerin belirlenmesi ve tüm organ ve dokuların metabolizmalarının analizidir (Stephanopoulos 1998).

Biyoteknolojik ürünlerin verim ve seçimliliğinin artırılabilmesi için istenen ürünü üretecek hücrenin yapısının ve fonksiyonlarının bilinmesi gerekir. Biyoproseslerle herhangi bir biyoteknolojik ürünün üretildiği mikro-biyoreaktör olarak görev yapan hücrelerde çok sayıda kimyasal tepkime gerçekleşmektedir. Hücre çoğalması da hücre-içinde gerçekleşen bu tepkimeler sonucu meydana gelir. Bu tepkimeler genel olarak substratların küçük moleküllere parçalanarak pek çok hücre-içi metabolitin sentezi için girdilerin olduğu tepkimeler, küçük moleküllerin polimerleşerek daha büyük molekülleri oluşturduğu tepkimeler, makromoleküllerin birleşerek hücre organellerini oluşturduğu tepkimeler ve substratların ve oluşan metabolitlerin hücre-içinden hücre-dışına veya hücre-dışından hücre-içine aktarımını içermektedir. Hücre-içinde gerçekleşen bu tepkimeler için gerekli Gibbs serbest enerjisi yine bu tepkimelerle oluşur (Nielsen ve Villadsen 1994).

2.5.1 Hücre-içi tepkimeler

Hücreler, içerisinde çok sayıda farklı enzim tarafından katalizlenen 1000'den fazla kimyasal tepkimenin gerçekleştiği kompleks kimyasal reaktörler olduğu için mikro-biyoreaktörler olarak düşünülmelidirler. Hücre-içinde meydana gelen tepkimelerin tümüne metabolizma denir (Bailey and Ollis 1986). Hücre metabolizmasının dört spesifik fonksiyonu vardır:

- 1) Yüksek kimyasal enerjili girdiler kullanarak veya fotosentezle hücre-içi enerji oluşumunu sağlamak ve farklı enerji türlerini gerekli forma dönüştürmek,
- 2) Girdi moleküllerini hücre sel makromoleküllerin öncülü (girdileri) olan moleküllere dönüştürmek,

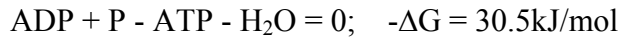
- 3) Öncülleri birleştirerek protein, nükleik asit gibi diğer makromolekülleri sentezlemek,
- 4) Hücre fonksiyonları için önemli olan biyomolekülleri sentezlemek veya parçalamaktır (Lehninger 1979).

Bu tepkimelerin hız, yön ve oranları birbiri ile bağlantılı olarak, hücrenin gereksinimine göre düzenlenir. Hücre metabolizması birbirine bağlı ardışık tepkimelerden oluşur ve bir tepkime yolizinde yer alan bir ürün diğer bir zincirin başında yer alan substrat olabilir. Örneğin, glukozun parçalanma tepkimeleri sırasında oluşan AcCoA, yağ asitlerinin sentezini başlatan moleküldür.

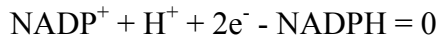
Metabolizma, "katabolizma" ve "anabolizma" olmak üzere iki faza ayrılır. Hücrenin çevresinde veya besin deposunda bulunan karbonhidratlar, lipidler ve proteinler gibi büyük ve kompleks girdi moleküllerini parçalayarak, amino asitler, organik asitler, CO₂, amonyak veya üre gibi daha küçük ve basit moleküllere dönüştürdüğü ve bunlara paralel olarak hücrenin diğer fonksiyonları (anabolizma) için gerekli olan serbest enerjiyi (ATP) ürettiği faza metabolizmanın indirgen fazı olan "katabolizma" denir. "Anabolizma" ise katabolizma sonucu oluşan küçük moleküllerden nükleik asitler, proteinler, polisakkaritler ve lipidler gibi hücre bileşenlerinin katabolizma sırasında üretilen enerji kullanılarak sentezlendiği faz olan metabolizmanın biyosentetik fazına denir. Hücre-içinde meydana gelen katabolizma ve anabolizma tepkimelerinin tümüne metabolizma ve bu tepkimelerde yer alan bileşiklere metabolit denir. Hücre-içinde meydana gelen tepkimelerin oluşturdukları tepkime yolizlerine ise metabolik yolizi denir. Katabolizma ve anabolizma birbirlerini tamamlayan olaylardır. Bunlar hücrede aynı zamanda meydana gelebilir, ve hem ayrı ayrı hem de birlikte kontrol edilebilirler. Temel metabolik yolizleri; glikoliz yolizi, glikoneogenesis yolizi, TCA (trikarboksilik asit) döngüsü ve pentoz fosfat yolizidir.

Substratlar, sitoplazmaya transfer edildikten sonra, çok sayıda biyokimyasal tepkimeyle hücre-içi bileşiklere ve metabolik ürünlere dönüştürülür. Oluşan hücre-içi bileşenler molekül ağırlıkları ve fonksiyonları açısından birbirinden çok farklıdır. Genellikle hücrenin %90'ı protein, RNA, lipid ve karbonhidratlar gibi makromoleküllerden oluşmaktadır. Substratlardan makromoleküllerin oluşumu anabolik tepkimelerle

gerçekleşir. Substratlar önce amino asit ve nükleotitler gibi ana yapı taşlarına dönüşür; polimerizasyon tepkimeleriyle amino asitlerden proteinler ve nükleotitlerden DNA ve RNA sentezlenir. Anabolik tepkimeler dışardan enerji gereksinimi duyan tepkimelerdir. Bu enerji ATP'deki yüksek enerjili fosfat bağının kopmasıyla veya NADPH koenziminin indirgenmesiyle sağlanır. ATP'deki yüksek enerjili fosfat bağının indirgenmesiyle büyük miktarda enerji açığa çıkar (Nielsen and Villadsen 1994).



NADPH, NADP^+ 'ya oksitlendiğinde iki elektron açığa çıkar; bu elektronlar hücre içinde diğer bileşiklere transfer edilerek bu bileşikler indirgenir.



ATP ve NADPH substratın daha düşük enerjili diğer maddelere dönüştüğü katabolik tepkimelerle oluşur (Nielsen ve Villadsen 1994).

2.5.1.1 Katabolik tepkimeler

Hücre çoğalmasında en çok kullanılan enerji kaynağı şekerlerdir. Şekerler CO_2 , laktik asit, asetik asit ve etanol gibi metabolik ürünlere dönüşür ve bu dönüşüm sırasında ATP, NADPH ve NADH oluşumu gerçekleşir. NADH da NADPH gibi bir kofaktördür; ancak NADH oksidatif fosforilasyon gibi katabolik tepkimelerde kullanılırken, NADPH anabolik tepkimelerde kullanılır. Şekerlerin çoğunun hücreye transferiyle G6P veya F6P'ta oluşur ve sırasıyla glikoliz yolizine, pentoz fosfat yolizine (PFY) ve TCA döngüsüne girerek katabolize olurlar.

Glikoliz yolizi glukozun bir seri tepkime ile pirüvata dönüştüğü ve paralel olarak bir miktar ATP'nin de üretildiği karbon katabolizmasının ilk temel tepkime sistemidir. Bunların yanısıra glikoliz yolizinde TCA döngüsünün, pentoz fosfat yolizinin ve bazı amino asitlerin ilk girdisi olan metabolitler üretilir.

Aerobik proseslerde, glikoliz yolizinden sonraki basamak; pirüvatın oksidatif dekarboksilasyonu ile asetilkoenzimA (AcCoA) oluşum tepkimesidir ve AcCoA sonraki basamakta karbon katabolizmasının temel tepkimlerinden biri olan TCA döngüsüne girer ve tamamen CO₂ ve H₂O'ya dönüşebilir. Her bir mol pirüvat oksidasyonuna karşılık TCA döngüsünde bir mol ATP, dört mol NADH ve bir mol de FADH₂ oluşur. Pirüvatın oksidasyonu sırasında kullanılan NAD⁺ ve FAD⁺, NADH ve FADH₂'den rejenere edilir. NADH ve FADH₂ –elektron taşıyıcıları- solunum zincirinde oluşur ve serbest oksijen içeren bu oksidasyon prosesi bu nedenle sadece aerobik mikroorganizmalarda gerçekleşir (Nielsen ve Villadsen 1994). TCA döngüsünde enerjinin yanısıra aspartik asit grubu ve glutamik asit grubu amino asitlerin sentezi için gerekli başlatıcı metabolitler de üretilir.

Karbon katabolizmasının temel tepkimelerinden bir diğeri olan pentoz fosfat yolizinin en önemli fonksiyonu biyokimyasal tepkimelerde elektron taşıyıcısı olan NADPH'ın üretimini gerçekleştirmektir. Bununla birlikte pentoz fosfat yolizinde purin ve primidin nükleotidlerinin biyosentezi için temel başlangıç girdileri olan riboz 5-fosfat ve eritroz 4-fosfat üretilir (Nielsen ve Villadsen 1994).

2.5.1.2 Anabolik tepkimeler

Hücrenin büyük bir bölümünü oluşturan makromoleküllerin oluşumu için amino asitlerin ve nükleik asitlerin sentezi ile ardışık polimerizasyon tepkimelerinin gerçekleşmesi gerekir. Biyosentez ve polimerizasyon tepkimeleri anabolik tepkimeler olarak bilinir. Hücrede üretilen toplam enerjinin yaklaşık %70'i protein sentezi için kullanılmaktadır. Protein sentezi yüksek miktarda serbest enerjiye gereksinim duyar (Nielsen ve Villadsen 1994). Mikroorganizmalar bu enerjiyi, ortamda bulunan bileşiklerin kimyasal bağlarında depolanmış enerjiyi kullanarak sağlar. Karbon kaynağı olarak seçilen bileşiğin -örneğin glukoz, sakkaroz, organik asit et al- metabolizmaya özgün bir biyokimyasal yolizinden girerek katabolik tepkimelerle küçük moleküllü ara ürünlere veya yan ürünlere dönüştürülmesiyle eşanlı olarak enerji, ATP, NADH, NADPH üretilir. Kullanılan karbon kaynağının özelliklerine ve biyoreaktör işletim

koşullarına bağlı olarak hücre-içi merkezi döngü ve metabolik yolizindeki katabolizma tepkimeleri, enerji üretim tepkimeleri ve hızları belirlenir.

2.5.2 Hücre-içi tepkime hızlarının reaksiyon mühendisliği prensipleriyle belirlenmesi ve analizi: Metabolik akı analizi (MAA)

Biyoproses süresince hücre, ürün, yan-ürün dağılımının araştırılması, biyoprosesin geliştirilebilmesi için hücre-içinde oluşan tepkimelerin bilinmesi ve bu tepkimelerin hızlarının reaksiyon mühendisliği prensipleriyle bulunmasında gerekmektedir. Ürün verim ve seçiciliği etkileyen biyoreaktör işletim parametreleri araştırılırken, metabolik yolizi teknikleriyle metabolik yolizi üzerinde bulunan hız kısıtlayıcı basamaklar belirlenmelidir. Hücre-içi tepkime hızlarının bulunması hücrenin fizyolojisi hakkında bilgi sağlamaktadır (Çalık ve Özdamar 2002).

Hücre-içi tepkime hızlarının hesaplanması

Hücre-içinde meydana gelen tepkimeler belirlendikten sonra, izotermal koşulda hücre yarı-kesikli mikro-biyoreaktör varsayılarak, her bir bileşen için kütle-korunum temelli stokiyometrik denklemler kurulur. Tepkime sistemindeki i-bileşiği için birikim hızı, bileşiği oluşturan tepkimeler ile bileşiği tüketen tepkimelerin cebirsel toplamı ile bileşiğin aktarım hızının cebirsel toplamına eşitlenir:

$$r_{Ri}V + r_{Ti}V = d(C_iV)/dt \quad (2.11)$$

burada, r_{Ri} i-bileşiğine göre net tepkime hızı ve r_{Ti} i-bileşiğinin net aktarım hızıdır. Bu şekilde kurulan diferansiyel denklem sistemi:

$$A \cdot \mathbf{r}(t) = \mathbf{c}_1(t) + \mathbf{c}_2(t) \quad (2.12)$$

vektör diferansiyel denkleminle tanımlanır. Burada A , metabolik tepkime sisteminin $m \times n$ stokiyometrik katsayılar matrisi, $\mathbf{r}(t)$, $n \times 1$ tepkime hız (akı) vektörü, $\mathbf{c}_1(t)$ ve $\mathbf{c}_2(t)$

ise sırasıyla, hücre-dışı ve hücre-içi metabolit birikim vektörüdür. Hücre-dışı metabolitlerin birikim ve tüketim Metabolik akı analizinin yapıldığı evrede, hücre-içinde yaklaşık yatışkın koşul varsayımı yapıldığında; $c_2(t)=0$ olduğundan denklem (2.12) denklem 2.13'den yararlanılarak denklem'e (2.14) indirgenir.

$$\mathbf{c}(t)=\mathbf{c}_1(t) \quad (2.13)$$

$$\mathbf{A}^* \mathbf{r}(t)= \mathbf{c}(t) \quad (2.14)$$

Matematik modelin çözümü

Tepkime sisteminin $\mathbf{m} \times \mathbf{n}$ stokiyometrik katsayılar matrisinde,

- $\mathbf{m}=\mathbf{n}$ ise matematik modelin tek bir çözümü vardır.
- $\mathbf{m}>\mathbf{n}$ ise matematik modelin yine tek bir çözümü vardır ve yaklaşık kesin çözüm elde edilir. (2.12) denkleminin çözümü sınırlandırılmış (constrained) en küçük kareler yaklaşımıyla kütle korunum denklemlerinde kalanların (residual) karelerinin minimize edilmesi amaç fonksiyonu olarak kullanılarak yapılabilir.
- $\mathbf{m}<\mathbf{n}$ ise matematik model optimizasyon yaklaşımıyla çözülebilir. Bunun için amaç fonksiyonu Z:

$$Z = \sum \alpha_i r_i \quad (2.15)$$

denklemleriyle tanımlanır. Burada, i-bileşiği için α_i stokiyometrik katsayıları ile r_i hızlarının çarpımının lineer toplamı olarak tanımlanan denklem (2.15)'in amaca göre minimize edilmesiyle ya da maksimize edilmesiyle denklem sistemi çözülmektedir. Matematik modelin değişkenleri olan tepkime akıları $mmol/g.st$ olarak tanımlanmıştır. Hücre oluşum hızı, $r_x (g/g..st)$; birim reaktör hacmi başına hücre oluşum hızının C_x değerine bölünmesiyle $r_x (g/g.kh. st)$ olarak elde edilir (Çalık 1998).

Çizelge 2.5. *Bacillus licheniformis* ve *Bacillus subtilis*'te serin alkali proteaz için metabolik yolizi tepkimeleri (Çalık 1998, Çalık ve Özdamar 2002)

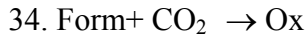
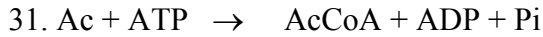
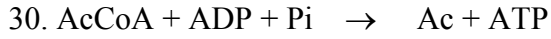
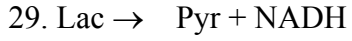
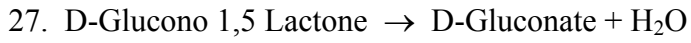
A. Glukoliz ve Glukoneogenesisiz Yolizi

1. Glc + PEP $\rightarrow$ G6P + Pyr
2. Fruktoz + PEP $\rightarrow$ F6P + Pyr
3. G6P $\rightarrow$ F6P
4. F6P $\rightarrow$ G6P
5. F6P + ATP $\rightarrow$ 2T3P + ADP
6. 2T3P $\rightarrow$ F6P + Pi
7. T3P + ADP + Pi $\rightarrow$ PG3 + ATP + NADH
8. PG3 + ATP + NADH $\rightarrow$ T3P + ADP + Pi
9. PG3 $\rightarrow$ PEP
10. PEP $\rightarrow$ PG3
11. PEP + ADP $\rightarrow$ Pyr + ATP
12. Pyr + 2 ATP $\rightarrow$ PEP + 2 ADP
13. Pyr $\rightarrow$ AcCoA + NADH + CO₂

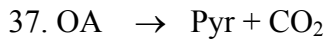
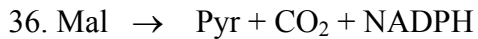
B. Pentoz Fosfat Yolizi

14. G6P $\rightarrow$ Gluc6P + NADPH
15. Gluc6P $\rightarrow$ R5P + NADPH + CO₂
16. R5P $\rightarrow$ Xyl5P
17. Xyl5P $\rightarrow$ R5P
18. R5P $\rightarrow$ Rib5P
19. Rib5P $\rightarrow$ R5P
20. Xyl5P + Rib5P $\rightarrow$ S7P + T3P
21. S7P + T3P $\rightarrow$ Xyl5P + Rib5P
22. Xyl5P + E4P $\rightarrow$ F6P + T3P
23. F6P + T3P $\rightarrow$ Xyl5P + E4P
24. T3P + S7P $\rightarrow$ F6P + E4P
25. F6P + E4P $\rightarrow$ T3P + S7P

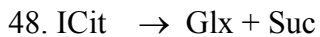
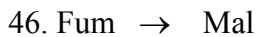
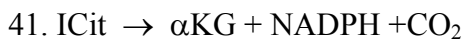
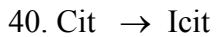
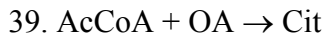
C. Glikoliz yolizinden ayrılan tepkimeler



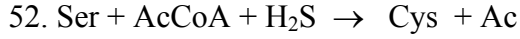
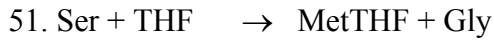
D. Anapleoritik Tepkimeler



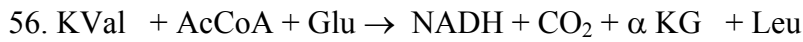
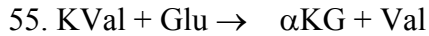
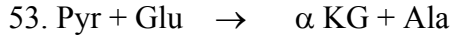
E. TCA Döngüsü



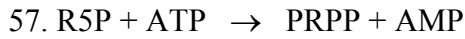
F. Serin Grubu Amino Asitlerin Biyosentezi



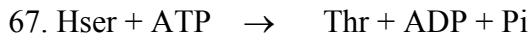
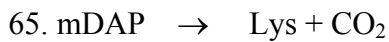
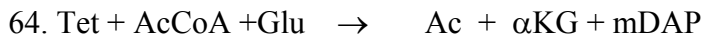
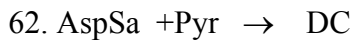
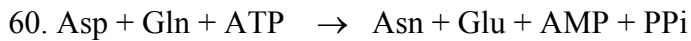
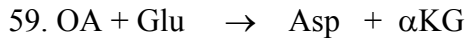
G. Alanin Grubu Amino Asitlerin Biyosentezi



H. Histidin Biyosentezi



I. Aspartik Asit Grubu Amino Asitlerin Biyosentezi



J. Aromatik Amino Asitlerin Biyosentezi



72. Chor + Glu $\rightarrow$ Tyr + α KG + NADH + CO₂
 73. Chor + NH₃ + PRPP $\rightarrow$ Pyr + IGP + CO₂ + PPi
 74. IGP + Ser $\rightarrow$ Trp + T3P

K. Glutamik Asit Grubu Amino Asitlerin Biyosentezi

75. α KG + NH₃ + NADPH $\rightarrow$ Glu
 76. Glu + ATP + NH₃ $\rightarrow$ Gln + ADP + Pi
 77. Glu + ATP + 2 NADPH $\rightarrow$ Pro + ADP + Pi
 78. 2Glu + AcCoA + ATP + NADPH $\rightarrow$ Orn + Ac + ADP + Pi + α KG
 79. Orn + CaP $\rightarrow$ Citr + Pi
 80. Citr + Asp + ATP $\rightarrow$ Arg + Fum + AMP + PPi

L. Amino Asitlerin Katabolizması

81. α KG + Ala $\rightarrow$ Pyr + Glu
 82. Arg + α KG $\rightarrow$ 2Glu + NH₃ + NADPH + CO₂
 83. Asn $\rightarrow$ Asp + NH₃
 84. Asp $\rightarrow$ Fum + NH₃
 85. Cys $\rightarrow$ Pyr + NH₃ + H₂S
 86. Gln + α KG + NADPH $\rightarrow$ 2Glu
 87. Gly + MetTHF $\rightarrow$ Ser + THF
 88. His + THF $\rightarrow$ Glu + MeTHF
 89. Ile + α KG $\rightarrow$ Glu + FADH₂ + 2NADH + CO₂ + SucCoA + AcCoA
 90. Leu + α KG + ATP $\rightarrow$ Glu + FADH₂ + NADH + 2AcCoA + ADP + Pi
 91. Phe $\rightarrow$ Tyr + NADPH
 92. Pro $\rightarrow$ Glu + NADPH
 93. Ser $\rightarrow$ Pyr + NH₃
 94. Thr $\rightarrow$ Gly + NADH + AcCoA
 95. Trp + NADPH $\rightarrow$ AcCoA + Ala
 96. Tyr + α KG + SucCoA $\rightarrow$ Glu + Fum + AcCoA + Succ + CO₂
 97. Val + α KG $\rightarrow$ Glu + FADH₂ + 3NADH + 2CO₂ + SucCoA

M. Nükleotitlerin Biyosentezi

98. $\text{PRPP} + 2\text{Gln} + \text{Asp} + 2\text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2 + \text{Gly} + 4\text{ATP} + \text{F10THF} \rightarrow$
 $2\text{Glu} + \text{PPi} + 4\text{ADP} + 4\text{Pi} + \text{THF} + \text{PRAIC} + \text{Fum}$
99. $\text{PRAIC} + \text{F10THF} \rightarrow \text{IMP} + \text{THF}$
100. $\text{IMP} + \text{Gln} + \text{ATP} \rightarrow \text{NADH} + \text{GMP} + \text{Glu} + \text{AMP} + \text{PPi}$
101. $\text{GMP} + \text{ATP} \rightarrow \text{GDP} + \text{ADP}$
102. $\text{ATP} + \text{GDP} \rightarrow \text{ADP} + \text{GTP}$
103. $\text{GTP} + \text{ADP} \rightarrow \text{ATP} + \text{GDP}$
104. $\text{NADPH} + \text{ATP} \rightarrow \text{dATP}$
105. $\text{NADPH} + \text{GTP} + \text{ATP} \rightarrow \text{ADP} + \text{dGTP}$
106. $\text{IMP} + \text{GTP} + \text{Asp} \rightarrow \text{GDP} + \text{Pi} + \text{Fum} + \text{AMP}$
107. $\text{AMP} + \text{ATP} \rightarrow 2\text{ADP}$
108. $\text{PRPP} + \text{Asp} + \text{CaP} \rightarrow \text{UMP} + \text{NADH} + \text{PPi} + \text{Pi} + \text{CO}_2$
109. $\text{UMP} + \text{ATP} \rightarrow \text{UDP} + \text{ADP}$
110. $\text{UDP} + \text{ATP} \rightarrow \text{ADP} + \text{UTP}$
111. $\text{UTP} + \text{NH}_3 + \text{ATP} \rightarrow \text{CTP} + \text{ADP} + \text{Pi}$
112. $\text{ATP} + \text{NADPH} + \text{CDP} \rightarrow \text{dCTP} + \text{ADP}$
113. $\text{CDP} + \text{ATP} \rightarrow \text{CTP} + \text{ADP}$
114. $\text{CTP} + \text{ADP} \rightarrow \text{CDP} + \text{ATP}$
115. $\text{UDP} + \text{MetTHF} + 2\text{ATP} + \text{NADPH} \rightarrow \text{dTTP} + \text{DHF} + 2\text{ADP} + \text{Ppi}$

N. Kofaktörlerin Biyosentezi

116. $\text{DHF} + \text{NADPH} \rightarrow \text{THF}$
117. $\text{MetTHF} + \text{CO}_2 + \text{NH}_3 + \text{NADH} \rightarrow \text{Gly} + \text{THF}$
118. $\text{MetTHF} + \text{NADPH} \rightarrow \text{MTHF}$
119. $\text{MetTHF} \rightarrow \text{MeTHF} + \text{NADPH}$
120. $\text{MeTHF} \rightarrow \text{F10THF}$
121. $\text{Gly} + \text{THF} \rightarrow \text{MetTHF} + \text{NH}_3 + \text{NADH} + \text{CO}_2$

O. Hidrojen Transfer Reaksiyonları

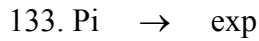
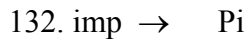
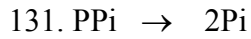
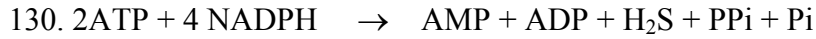
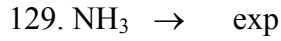
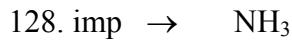
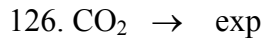
122. $\text{NADH} \rightarrow \text{NADPH}$



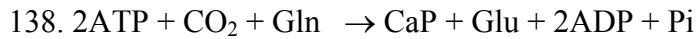
P. Elektron Taşıma Sistemi



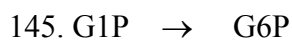
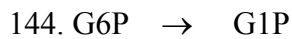
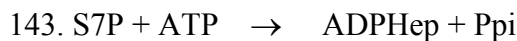
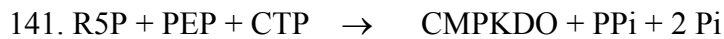
R. Taşıma Tepkimeleri

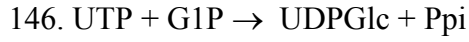


S. Yağ Asitlerinin ve Fosfolipidlerin Biyosentezi

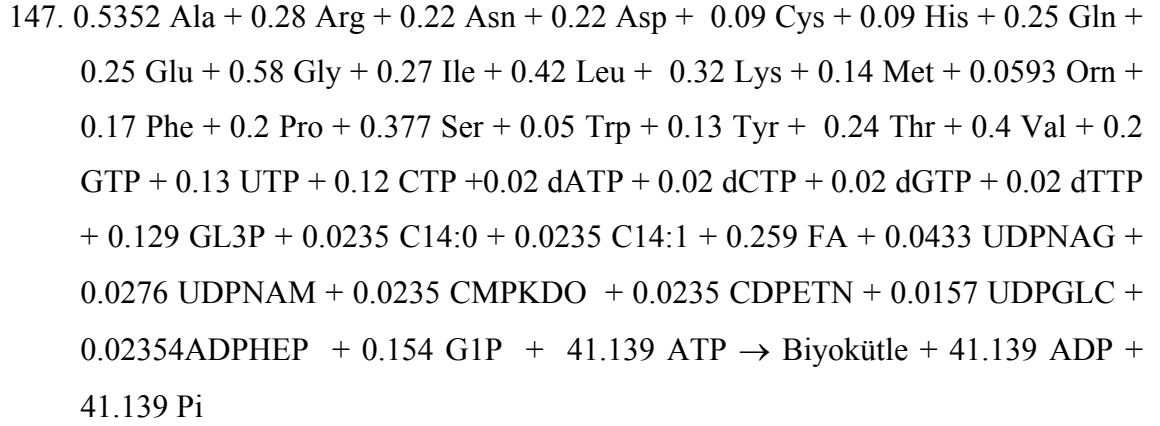


T. Biyokütle Bileşenleri

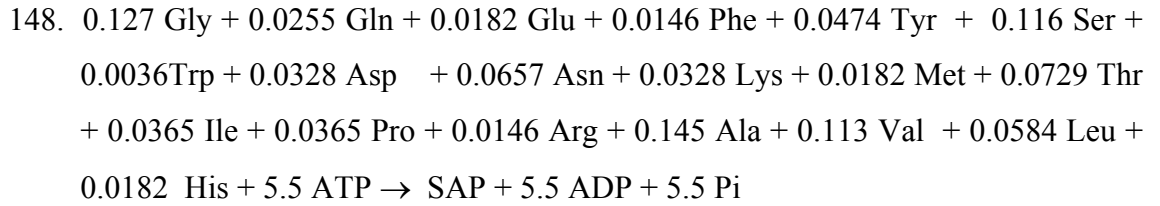




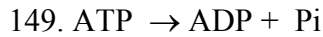
U. Biyokütle sentezi



V. Serin Alkali Proteaz sentezi



Y. Yaşam



Şekil 2.18. *Bacillus licheniformis* ve *Bacillus subtilis* için hücreiçi tepkimelerin metabolik yolizi haritası şeklinde gösterimi (Çalık 1998, Çalık ve Özdamar 2002)

Şekil 2.18. *Bacillus licheniformis* ve *Bacillus subtilis* için hücreiçi tepkimelerin metabolik yolizi haritası şeklinde gösterimi (Çalık 1998, Çalık ve Özdamar 2002)

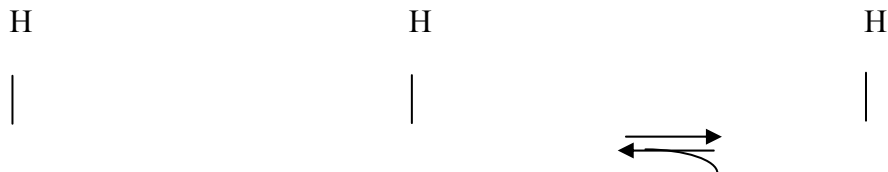
2.6 Amino Asitler

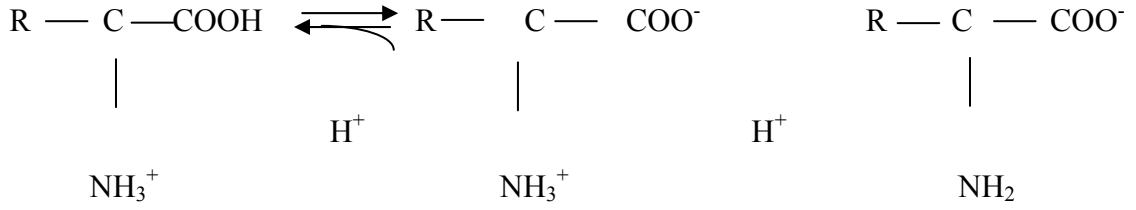
Amino asitler proteinlerin yapı taşlarıdır. Bir α -amino asitin yapısında α -C atomuna bağlı bir amino grubu, bir karboksil grubu ve bir de amino asiti simgeleyen hidrofilik veya hidrofobik R grubu bulunmaktadır. R grubu asidik, nötral veya bazik; alifatik veya aromatik olabilmektedir.

R grupları etkisiyle farklılaşan amino asitler değişik gruplamalarla sınıflandırılmaktadır. Enzimlerin ve proteinlerin yapısı ve fonksiyonları açısından R gruplarının proteinlerine dayanan sınıflandırma en önemlisidir. Buna göre amino asitler dört ana gruba ayrılırlar (Çizelge 2.6) (Lehninger 1979, Çalık 1998):

- Polar olmayan (nonpolar) veya hidrofobik R grubuna sahip amino asitler,
- Nötral (yüksüz) polar R grubuna sahip amino asitler,
- Pozitif yüklü (bazik) R grubuna sahip amino asitler,
- Negatif yüklü (asidik) R grubuna sahip amino asitler.

Amino asitler yapılarındaki asimetric α -C atomu nedeniyle L- ve D- şeklinde iki stereoisomere sahiptir. 20 çeşit amino asit DNA tarafından kodlanarak protein yapısına girer. Bunların hepsi L- amino asittir. Bununla birlikte yapılarında bazik özellik gösteren amino grubu ($-\text{NH}_2$) ve asidik özellik gösteren karboksil grubu ($-\text{COOH}$) bulunduğundan pH'ı nötral olan bir sulu çözeltide dipolar iyon yapısındadırlar. Bulundukları çözeltinin pH'ına göre iyonlaşma durumları ve dolayısıyla da yükleri değişir (Şekil 2.19)





Şekil.2.19 Bir amino asitin bulunduğu çözeltinin pH'ına göre iyonlaşma özelliği

Çizelge 2.6 Amino asitler ve özellikleri

Amino asit	Simgesi	Molekül ağırlığı	Fizikokimyasal Özellikleri	
			Hidrofil/Hidrofob	Asidik /Bazık/Nötral
Alanin	Ala (A)	71.09	Hidrofobik	
Arginin	Arg (R)	156.19	Hidrofilik	Bazık
Asparajin	Asn (N)	114.11	Hidrofilik	Nötral
Aspartik asit	Asp (D)	115.09	Hidrofilik	Asidik
Sistein	Cys (C)	103.15	Hidrofilik	Nötral
Glutamin	Gln (Q)	128.14	Hidrofilik	Nötral
Glutamik asit	Glu (E)	129.12	Hidrofilik	Asidik
Glisin	Gly (G)	57.05	Hidrofilik	Nötral
Histidin	His (H)	137.14	Hidrofilik	Bazık
İzolözin	Ile (L)	113.16	Hidrofobik	
Lözin	Leu (L)	113.16	Hidrofobik	
Lizin	Lys (K)	128.17	Hidrofilik	Bazık
Metiyonin	Met (M)	131.19	Hidrofobik	
<i>Fenilalanin</i>	<i>Phe (F)</i>	<i>147.18</i>	<i>Hidrofobik</i>	
Prolin	Pro (P)	97.12	Hidrofobik	
Serin	Ser (S)	87.08	Hidrofilik	Nötral
Treonin	Thr (T)	101.11	Hidrofilik	Nötral
Triptofan	Trp (W)	186.21	Hidrofobik	
Tirozin	Tyr (Y)	163.18	Hidrofilik	Nötral
Valin	Val (V)	99.14	Hidrofobik	

Amino asitler hücreler tarafından sentezlenir ve hücre-içindeki protein ve enzim sentezlerinde monomer olarak kullanılırlar. Ancak insan hücrelerinde 10 adet amino asit

sentezlenemediğinden, dışarıdan yiyeceklerle yani amino asit ve protein kaynaklarından alınması gerekir. L-fenilalanin'in de arasında bulunduğu bu amino asitler gıda maddeleri ile dışardan alınması gerektiğinden, “gerekli amino asitler” olarak adlandırılmaktadır (Kırk and Othmer 1994).

2.6.1 L-Fenilalanin ve özellikleri

L-fenilalanin aromatik amino asitlerden biri olup metabolizmada üretilen birincil metabolitlerdendir. Moleküler yapısında bulunan aromatik grup nedeniyle hidrofobik özellik gösterir ve polar olmayan amino asitler sınıfına girer. L-fenilalanin bazı özellikleri Çizelge 2.7 'de verilmiştir

Çizelge 2.7 L-fenilalaninin özellikleri

Molekül Ağırlığı	165
Bağıl yoğunluğu	1.340
Erime noktası, °C	283
Bozunma noktası, °C	283
İyonlaşma sabitleri:	
pK1	1.83
pK2	9.13
İzoelektrik noktası	
pI	5.48
Kırılma indisi	
$[\alpha_D]$	-35.1
Sudaki çözünürlüğü, g/L	
0 °C	19.8
25 °C	29.6
50 °C	44.3
75 °C	66.2
100 °C	99.0

2.6.2 L-Fenilalanin önemi ve kullanım alanları

Endüstriyel aromatik amino asitlerden biri olan L-fenilalanin dipeptit tatlandırıcı olan α -aspartam yapımında girdi olarak kullanılmaktadır. L-fenilalanin ayrıca farmasötik sanayinde-ilaç etken maddelerinin üretiminde girdi olarak- ve gıda sanayinde de katkı maddesi olarak da kullanılmaktadır.

2.6.3 L-Fenilalanin üretim yöntemleri

L-fenilalanin benzaldehit, glisin ve asetik anhidrit gibi girdiler kullanılarak kimyasal sentezle, protein hidrolizatların ayrılması sırasında veya mikrobiyal (fermentasyon) ya da enzimatik proseslerle üretilebilir (Maiti ve Chatterjee 1990). Genel olarak enzimatik prosesle L-fenilalanin üretiminin; saf ürün elde etme avantajı olmasına rağmen tepkimeleri katalizleyen enzimlerin spesifik aktivitelerinin ve kararlılıklarının düşük olması, substrat inhibisyonuna karşı hassas olmaları, kofaktör rejenerasyonuna ihtiyaç duymaları ve reaksiyon denge sabitlerinin düşük olması gibi dezavantajları da vardır.

Mikrobiyal olarak L-fenilalanin üretiminin ucuz ve kolay elde edilebilir girdilerin olması ve sadece L-izomerinin elde edilmesi üstünlükleridir. Mikrobiyal L-fenilalanin üretiminde mikroorganizma seçimi oldukça önemlidir. Bu nedenle pahalı vitamin veya diğer katkı maddelerine ihtiyacı olmaksızın mineral ortamda hızlı çoğalma kabiliyetinin olması, patojen olmaması ve toksik ürünler üretmemesi, L-fenilalanin'i ve girdileri indirgeme kabiliyetinin yüksek olması, genetik mühendisliği tekniklerinin uygulanabilir olmasıdır. L-fenilalanin üretimi için mikrobiyal prosesler 1980'li yılların sonlarında geliştirilmeye başlanmıştır. Mikroorganizma seçimi diğer amino asitlerin (glutamik asit, triptofan, vb) üretimi için endüstriyel proseslerin geliştirilmesi sırasında edinilen endüstriyel mikrobiyolojik bilgilerden yararlanılarak yapılmaktadır. L-fenilalanin üretimi ile ilgili yayınlarda *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium lactofermentum*, *Escherichia coli*, *Arthrobacter globiformis*, *Bacillus polymyxa* ve *Bacillus subtilis* mikroorganizma olarak seçilmiş ve kullanılmıştır.

2.7 L-Fenilalanin üretimi ile ilgili kaynak araştırması

Sürelî yayın literatüründe L-fenilalanin üretimiyle ilgili çalışmalar:

3. Kullanılan mikroorganizmalar ve yapılan mutasyonlar ile, rekombinant mikroorganizma geliştirmek için uygulanan stratejiler ve sonuçları;
4. Biyoreaktör işletim koşulları, üretim ortamı bileşenleri ve incelenen parametreler temelinde incelenmiş ve değerlendirilmiştir. Bu çerçevede L-fenilalanin üretimi için üretim ortamı bileşenleri ve ölçülen parametreler Çizelge 2.8, geliştirilen rekombinant mikroorganizmalar Çizelge 2.9, biyoreaktör ve işletim koşulları Çizelge 2.10 ve katı, sıvı ve üretim ortam bileşimleri Çizelge 2.11’de özetlenmiştir.

2.7.1 Mikroorganizma

Biyoteknolojik proseslerde üretim kompleks bir tepkime sistemi üzerinden hücre-içinde gerçekleştiğinden, yüksek verim ve seçicilikte istenen ürün üretimi için mikroorganizma seçimi önemli basamaktır. İstenen biyomolekülü doğal olarak üretebilen mikroorganizmalar da bulunabilir. Mikroorganizma istenen ürün yanında, amino asit, organik asit ve proteinler olmak üzere yan-ürün üretebilir. L-fenilalanin üretimi için seleksiyon ve mutasyon amaçlı endüstriyel mikrobiyolojik teknikler yanında, genetik mühendisliği teknikleri kullanılarak rekombinant mikroorganizmalar geliştirilmiştir. *Corynebacterium glutamicum* ile ilgili çalışmalarda genetik tekniklerle geliştirilen rekombinant mutantlar (Ozaki *et al.* 1985, Ikeda *et al.* 1992, Ikeda *et al.* 1993) ile L-fenilalanin analoglarına dirençli geliştirilen mutant (Shu and Liao, 2002); *Brevibacterium lactofermentum* ile ilgili çalışmalarda rekombinant mikroorganizma (Ito *et al.* 1990a, b); *Escherichia coli* ile ilgili ise rekombinant mikroorganizmalar (Förberg and Haggström, 1987, Konstatinov *et al.* 1990, Takagi *et al.* 1996, Flores *et al.* 1996, Weikert *et al.* 1998, Gerigk *et al.* 2002) ve L-fenilalanin analoglarına dirençli mutantlar (Hwang *et al.* 1985, Gil *et al.* 1985); L-fenilalanin analoglarına dirençli *Arthrobacter globiformis* (Maiti ve Chatterjee, 1991a, 1991b, 1993) ve; *Bacillus* ile ilgili çalışmalarda L-fenilalanin analoglarına dirençli (Sheety *et al.* 1986) ve rekombinant *Bacillus subtilis* (Özçelik vd. 2004) kullanılmıştır (Çizelge 2.8, 2.9, 2.10).

2.7.1.1 L-Fenilalanin üretimi için kullanılan rekombinant mikroorganizmalar

L-fenilalanin üretimine ilişkin genetik mühendisliği teknikleri kullanılarak rekombinant mikroorganizma geliştirilmesi ile ilgili *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium lactofermentum*, *Escherichia coli* ve *Bacillus subtilis* kullanılmıştır. Özellikle glutamik asit üretiminde kullanılan gram pozitif *Corynebacterium glutamicum* ve *Brevibacterium lactofermentum* türü bakterilerin mutantları ile, sırasıyla, Kyowa Hakko Co (Japonya) ile Ajinomoto Co. (Japonya)'da rekombinant DNA tekniklerinin kullanılması ile yapılan ilk önemli çalışmalardan sonra, genomu belirlenen ilk bakteri olması nedeniyle *Escherichia coli* ile L-fenilalanin üretimine ilişkin çalışmalar yoğunluk kazanmıştır. Çizelge 2.9'da özetlenen kaynaklarda, L-fenilalanin biyokimyasal yolizinde kritik tepkimeler olarak düşünülen tepkimelerin katalizörleri DAHP sentetaz, korizmat mutaz ve prephenat dehidrataz enzimlerini kodlayan genler hedef seçilmiştir; tek- veya çok-gen klonlama yaklaşımıyla geliştirilen rekombinant mikroorganizmalarla L-fenilalanin üretim veriminin artırılması amacı ile araştırmalar yapılmıştır.

Kyowa Hakko Co (Tokyo)'da L-fenilalanin üretimi ile ilgili çalışmalarda Ozaki *et al.* (1985) metabolik mühendislik yaklaşımı ile p-florofenilalanin ve m-florofenilalanine dirençli L-fenilalanin üretebilen *C.glutamicum* K38 korizmat mutaz ve prephenat dehidrataz enzimlerinden sorumlu gen kaynağı olarak kullanılmıştır. Bu genler pCE53 plasmidine klonlanarak geliştirilmiş olan rekombinant pCmB4 plasmidi ilk aşamada *C.glutamicum* RRL5'e transforme edilerek doğal ve rekombinant *C.glutamicum* RRL5'lerin korizmat mutaz ve prephenat dehidrataz enzim aktiviteleri karşılaştırılmıştır. Sonuçta korizmat mutaz aktivitesinde 10 kat artış gözlenirken, prephenat dehidrataz aktivitesinde artış gözlenmemiştir. Bu nedenle klonlamanın başarılı olduğunu belirlemek amacıyla r-pCmB4'ü *C.glutamicum* KY10621 ve *C.glutamicum* KY10425'e transforme ederek L-fenilalanin üretimi incelenmiştir. *C.glutamicum* KY10621 ile başlangıçta L-fenilalanin üretilmezken r-*C.glutamicum* KY10621 ile 1.4 g/L L-fenilalanin üretilmekte, *C.glutamicum* KY10425 ile başlangıçta 3.7 g/L L-fenilalanin üretilirken r-*C.glutamicum* KY10425 ile 4.6 g/L L-fenilalanin üretilmektedir. Bu deneyler sonucunda klonlamanın başarılı olduğunu belirlemişlerdir. Bundan sonraki aşamada r-pCmB4 plasmidini taşıyan *C.glutamicum* K38 ile doğal *C.glutamicum* K38'in L-fenilalanin üretim performansları karşılaştırıldığında L-

fenilalanin üretiminin r- *C.glutamicum* K38’de %50 (19 mg/ml) arttığı belirlenmiştir. Kyowa Hakko Co (Tokyo)’da Ikeda ve Katsumata (1992) metabolik mühendislik yaklaşımı ile triptofan üreten *C. glutamicum*’u genetik mühendisliği teknikleriyle tirozin ve L-fenilalanin üretebilen mikroorganizmaya dönüştürmek amacıyla yaptıkları çalışmada aromatik amino asit yolizinde DAHP sentetaz (DS) ve dallanma noktalarındaki korizmat mutaz (CM) ve prephenat dehidrataz (PD) enzimlerini kodlayan genler son ürün inhibisyonundan bağımsız hale getirilmiş bu enzimlere sahip *C.glutamicum* 10694 ‘ten izole edilerek plasmid üzerinde arka arkaya birleştirilmiştir. Geliştirilen üç r-plasmid; pCA2 (sadece CM genini içeren), pKY1 (DS veya CM genlerinden birini içeren) diğeri pKF1 (Her üç genide içeren) olarak adlandırılmıştır. pKY1 ve pKF1 plasmidlerinin triptofan üreten *C.glutamicum* KY10865 ‘e transforme edilmesiyle metabolik yolizindeki karbon akışı tirozin ve L-fenilalanine doğru yönlendirildiğinden tirozin (26 g/L) ve L-fenilalanin (28 g/L) üretiminde artış gözlenmiştir. Ozaki *et al.* (1985) ve Ikeda *et al.* (1992) çalışmaları karşılaştırıldığında DAHP sentetaz geninin klonlanmasıyla, L-fenilalanin üretiminde %68 artış sağlanmıştır. Kyowa Hakko Co (Tokyo)’da Ikeda *et al.* (1993) diğ bir çalışmada Ozaki *et al.* (1985) ve Ikeda *et al.* (1992) çalışmalarına benzer olarak metabolik mühendislik yaklaşımı *E.coli pheA* geni ile kodlanan iki-işlevli korizmat mutaz-prefenat dehidrataz enzimi L-fenilalanin biyokimyasal yolizindeki iki önemli tepkimeyi katalizlemektedir. *C.glutamicum* KY10694 ‘ü potansiyel L-fenilalanin üreticisi haline getirmek için *E.coli* MM294 *pheA* geni pBR322’ye klonlanmış ve *pheA* genini içeren 3.2 kb’lik DNA parçasını bir *E.coli-C.glutamicum* shuttle vektörü olan pCE51’e klonlayarak rekombinant pEA11 plasmidini elde etmişlerdir. pEA11 rekombinant plasmidi protoplast transformasyon ile *C.glutamicum* KLS4’e transforme edilerek rekombinant mikroorganizma ile doğal mikroorganizmaların CM ve PD aktiviteleri karşılaştırılmıştır. Sonuçta her iki enzimin aktivitelerinin 10 kat arttığı belirlenmiştir. pEA11 plasmidini hücre-içi mutasyonu ile son ürün inhibisyonuna karşı direnç gösteren pEA22 elde etmişlerdir. pEA11 ve pEA22 *C.glutamicum* KY10694’e aktarıldığında ise L-fenilalanin üretiminin sırasıyla %8 ve %37 oranında arttığı bulunmuştur. Biyoreaktör deneylerinde pEA22 plasmidini içeren *C.glutamicum* KY10694 ile L-fenilalanin üretiminde %35 artışla 23 g/L L-fenilalanin üretilmiştir.

Ajinomoto Co'da (Japonya) yapılan araştırmada Ito *et al.* (1990a) mFP ve pFP'ye karşı dirençli ve geri beslemeli inhibisyondan bağımsız DAHP sentetaz genine sahip *B.lactofermentum* AJ1957'nin DAHP sentetaz genini pAJ1844 plasmidine klonlayarak pAR1: 15.3 kb ve pAR2: 6.8 kb rekombinat plasmidlerini geliştirmişlerdir. Her iki plasmid de doğal *B.lactofermentum* AJ12036'a aktarılmış ve bu mikroorganizmanın mFP ve pFP'ye direnç kazandığı ve pAR1 ve pAR2 plasmidini içeren *B.lactofermentum* AJ12036'da DAHP sentetaz aktivitesinin sırasıyla 15- ve 3- kat artığı belirlenmiştir. L-fenilalanin etimi açısından *B.lactofermentum* AJ12036:pAR1 ve *B.lactofermentum* AJ12036: pAR2 karşılaştırıldığında sırasıyla 4.4 g/L ve 0.5 g/L L-fenilalanin etilmektedir. Ito *et al.* (1990b) diğer bir çalışmasında *B.lactofermentum* AJ11957 ile geri beslemeli inhibisyondan bağımsız prephenat dehidrataz enzimini kodlayan genini klonlanarak pPH11-pPH17 arasında mFP'ye karşı dirençli yedi rekombinant plasmid elde etmişlerdir. Rekombinant pPH11 ve pPH14 numaralı plasmidler prephenat dehidrataz geni içermeyen *B.lactofermentum* A-15 'e protoplast transformasyon yöntemi ile transforme edilerek PD aktivitesi rekombinant *B.lactofermentum* A-15, doğal *B.lactofermentum* AJ12036 ve *B.lactofermentum* AJ1957 ile karşılaştırılmıştır. Sonuçta pPH11 ve pPH14 plasmidlerini içeren rekombinant mikroorganizmaların spesifik aktiviteleri doğal *B.lactofermentum* AJ12036 ve *B.lactofermentum* AJ1957'a göre daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca Ito *et al.* (1990b) alışmalarının diğer bir aşamasında L-tirozin ve L-fenilalanin üretebilen mFP'ye dirençli doğal *B.lactofermentum* MF358 mikroorganizmasını kullanmışlardır. Doğal *B.lactofermentum* MF358'de 5.5 g/L L-phe, 6.8 g/L L-tyr ve 0.3 g/L L-antranilat üretirken; *B.lactofermentum* MF358: pPH14'n 15.3 g/L L-phe, 1 g/L L-tyr ürettiği bulunmuştur. Bir nceki çalışmalarında (Ito *et al.* 1990a) geliştirdikleri DAHP sentetaz genini içeren pAR1 plasmidi ile bu çalışmada geliştirilen PD genini içeren pTAR16 plasmidi ile *B.lactofermentum* MF358'e transforme edildiğinde 18.2 g/L L-fenilalanin ve 1 g/L L-tirozin etilmektedir. Bu çalışmada da Ozaki *et al.* (1985) ve Ikeda *et al.* (1992) alışmalarıyla karşılaştırıldığında aromatik amino asit yolizinde DAHP oluşum tepkimesinden sorumlu DAHP sentetaz geninin klonlanmasıyla karbon akısı artmakta ve dolayısıyla daha fazla L-fenilalanin etiminin sağlandığı görülmektedir.

Flores *et al.* (1996) *E.coli* ile, aromatik amino asit yolizinin ilk tepkimesinin girdileri olan PEP ve E4P miktarını artırmak amacıyla yaptıkları çalışmada DAHP sentetaz enziminden sorumlu *aroG* genini içeren pRW5 ile *aroG* ve transketolaz enziminden *tktA* genlerini pRW5'e klonlayarak pRW5::*aroG* ve pRW5::*aroG::tktA* rekombinant plasmidini geliştirmişlerdir. pRW5::*aroG* ve pRW5::*aroG::tktA* plasmidlerini karbon kaynağı olarak glukozu kullanan ve fosfotransferaz sistemini kullanmayan *E.coli* NF9 ve triptofan üreten *E.coli* PB103'ye transforme edilmesi sonucu elde edilen rekombinant *E.coli* ile DAHP üretimi incelenmiştir. Sonuçta *E.coli* PB103/ pRW5::*tktA* ile maksimum. 18 mM DAHP elde edilmiştir. L-fenilalanin üretiminde DAHP oluşum tepkimesinin girdilerinden PEP'in yanı sıra E4P bileşeninin de kısıtlayıcı bileşen olduğunu belirtmişlerdir. Polen *et al.* (2005) *E.coli* mikroorganizması ile hücre çoğalma ortamında farklı derişimlerde fenilalanin veya şikimat bulunduğu zaman global gen ekspresyonundaki değişim araştırılmıştır. Ortama 0.5 gl⁻¹ fenilalanin eklendiğinde Tyr⁻ ortamlı regulasyona göre aromatik amino asit metabolizmasının birincil olarak etkilendiği, 5 gl⁻¹ fenilalanin eklendiğinde hücre çoğalma hızı yaklaşık %50 azalmaktadır. Sonuçta, ortama eklenen fenilalanin miktarının hücre çoğalma hızına olan inhibisyon etkisinin azalması ile *tyrR*⁻ türlerde daha fazla fenilalanin üretimi gerçekleşmektedir.

Özçelik vd. (2004) *Bacillus subtilis* ile aromatik amino asit yolizinde L-fenilalanin üretiminde verim ve seçimliliğini artırmak amacıyla biyokimyasal reaksiyon mühendisliği prensipleriyle aromatik amino asit yolizinde darboğaz oluşturan tepkimeleri belirlemiştir. Yolizinde belirledikleri iki darboğaz tepkime R89 ve R96 arasında yaptıkları analizle birincil darboğaz olarak belirledikleri korizmattan prephenat oluşum tepkimesini katalizleyen enzimden sorumlu *aroH* genini önce bir *E.coli* plasmidi olan pUC19'a klonlanmıştır. Elde edilen rekombinant plasmidi *E.coli* XLI-Blue'ya transforme ederek doğal ve r-*E.coli*'de L-fenilalanin üretim performansları karşılaştırılmıştır. Sonuçta *aroH* genini içeren r-*E.coli* ile L-fenilalanin üretiminin 2-kat arttığı bulunmuştur. Genetik çalışmalarının ikinci aşamasında *aroH* geni *E.coli*-*Bacillus* shuttle plasmidi olan pMK4'e klonlanarak dört rekombinant *Bacillus* (A1, A206, A263 ve BS 1315) türleri geliştirilmiştir. Doğal *Bacillus* (A1, A206, A263 ve BS 1315) türleri ile r-*Bacillus* türlerinin L-fenilalanin üretim performansları

karşılaştırıldığında en yüksek L-fenilalanin üretimi (0.4 g/L) r-*Bacillus* A263 ile elde edilmiş ve L-fenilalanin üretimi 2.7-kat artmıştır. Doğal *Bacillus* türü ile rekombinant *Bacillus* A263 karşılaştırıldığında R96 numaralı tepkimenin akısı r-*Bacillus* A263 ile 7.2-kat artmıştır (Çizelge 2.9).

2.7.2 Üretim ortamı bileşenlerinin etkisi

İstenen ürün üretimi için, üretim potansiyeli olan mikroorganizma seçimi yapıldıktan sonra verim ve seçimliliğinin artırılması için ortam tasarımı yapılması gerekmektedir. Mikroorganizmanın çoğalması, istenen ürünü sentezlemesi için ortamda gerekli bileşikler bulunmalıdır. Ortamı oluşturan bileşikler ve bileşimleri her ürün için farklı olabileceği gibi hücre çoğalması için de farklı olabilir. Biyoteknolojik proseslerde üretim ortamı için planlanan araştırma programı ile belirlenen karbon, azot, fosfor, inorganik tuzların bulunması gerekmektedir. L-fenilalanin üretimi ile ilgili yapılan çalışmalar ortam tasarımı açısından incelendiğinde, her çalışmada kullanılan mikroorganizmaya göre katı, ön-sıvı ve üretim ortam bileşimleri farklılık göstermektedir (Çizelge 2.11). *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium lactofermentum*, *Escherichia coli*, *Bacillus* türleri ile yapılan çalışmalarda üretim ortamındaki bileşenlerinin etkisi ile bir çalışma olmadığı halde, *Arthrobacter globiformis* (Maiti *et al.* (1991) ile ilgili çalışmada uygun karbon ve azot kaynağı belirlenmiştir. *Corynebacterium glutamicum* ile ilgili çalışmalarda tanımlanmış veya kompleks ortam; *Escherichia coli*'de genellikle tanımlanmış ortam kullanıldığı gibi Gil *et al.* (1985) çalışmasında kompleks ortam; *Bacillus* türlerinde ise Shetty *et al.* (1986) kompleks ortam, Özçelik vd. (2004) tanımlanmış ortam kullanmışlardır. *Corynebacterium glutamicum* ile ilgili çalışmalarda genelde karbon ve azot kaynağı olarak şeker kamışı, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; *Escherichia coli*'de glukoz, yeast ekstrakt; *Bacillus* türleri için ise karbon kaynağı olarak nişasta ve glukoz, azot kaynağı olarak ise $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ve $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ kullanılmıştır.

2.7.3 Biyoreaktör işletim türü ve hidrodinamiği

Biyoreaktör işletim türleri kesikli veya yarı-kesikli işletim, sürekli işletim ve periyodik-pulse beslemeli işletim olmak üzere sınıflandırılabilirler. Sıvı faza göre kesikli, oksijene göre yarı-kesikli olan işletimler küçük ve orta kapasiteli üretim proseslerinde kullanılırlar. L-fenilalanin üretimiyle ilgili çalışmalarda *Corynebacterium glutamicum* ve *Escherichia coli* ile ilgili araştırmalarda oksijene göre yarı-kesikli işletimde çalışılmıştır (Çizelge 2.10). *Corynebacterium glutamicum* türü mikroorganizmaların kullanıldığı çalışmalarda Ozaki *et al.* (1985), Ikeda *et al.* (1992), Ikeda *et al.* (1993) oksijene göre yarı-kesikli çalışmışlar ve karbon kaynağının tüketildiği anda ortama belirli zaman aralıklarında karbon kaynağı sürekli olarak beslenmiştir. Konstantinov *et al.* (1990) ve Takagi *et al.* (1996) ile Gerigk *et al.* (2002) oksijene göre yarı-kesikli olarak işletilen sistemlerde karbon kaynağı olarak kullandıkları glukozu prosesin belirli bir kalma süresinde sürekli olarak beslemeye başlamışlar ve ortamdaki glukoz derişimini bir set noktasında kontrol etmişlerdir.

Substrat inhibisyonunun olduğu durumlarda substrat sisteme periyodik-pulse işletim türü ile beslenmektedir. *E.coli* ile ilgili çalışmalarda Shu and Liao (2002), Hwang *et al.* (1985), Gil *et al.* (1985), Förberg and Haggström (1987) glukozu sisteme periyodik-pulse ile beslemişlerdir.

2.7.3.1 Oksijen aktarımı

Aerobik proseslerde oksijen aktarımı ürün verim ve seçimliliğini etkileyen önemli bir parametredir. Biyoteknolojik proseste oksijen aktarımı, mikroorganizma türü, üretim ortamının fiziksel özelliği, biyoreaktör ve karıştırıcı konfigürasyonu ile ilgilidir. Karıştırmalı biyoreaktörlerde oksijen aktarımı karıştırma hızı ve oksijen/hava giriş hızının bir fonksiyonu olup önemli biyoreaktör işletim parametrelerindendir (Çalık 1998).

L-fenilalanin üretimi ile ilgili çalışmalarda incelenen biyoreaktör işletim parametreleri Çizelge 2.10'da verilmiştir. Shu and Liao'nun (2002) *Corynebacterium glutamicum* ile L-fenilalanin üretiminde oksijen aktarım hızının artırılarak ürün inhibisyonunun azaltılmasını amaçlanmıştır. Bu amaçla ortama farklı başlangıç L-fenilalanin

derişimlerinin eklenmesi (0-20 g/L) ve farklı karıştırma hızlarında (400, 600 ve 900 rpm) kesikli işletimde L-fenilalanin üretim kinetiği incelenmiştir. Ortama eklenen başlangıç L-fenilalanin derişimi ve oksijen aktarım hızının artırılması ile ürün inhibisyonunun azaldığı ve L-fenilalanin üretiminin de arttığı belirlenmiştir. Çizelge 2.10'da belirtilen çalışmalarda hava giriş hızı ve karıştırma hızı etkisi incelenmeden çalışmışlardır.

2.7.3.2 Hidrojen iyonu derişimi (pH)

Mikroorganizmaların özgün bir iç pH değerleri vardır; yaşamları için bu pH değerini sabit tutmaya çalışırlar. Mikroorganizmalar, hücre-içi ve hücre-dışı pH değerine, kullanılan karbon kaynaklarına ve bulundukları metabolik evreye göre üretim ortamına H^+ iyonu salgılar ya da ortamdan H^+ iyonu transfer ederek ortam pH değerinin değişmesine, buna bağlı olarak da hücre-içi tepkime ve hızlarının değişmesine sebep olurlar. Aynı zamanda biyoproses süresince karbon kaynaklarının farklı ürünlere dönüşmesi ortam pH'ını etkilemektedir. Karbon kaynağı olarak glukoz kullanıldığında, hücre-içi tepkimeler sonucu oluşan organik asitlerin ve amino asitlerin ortama salgılanmasıyla birlikte, ortam pH'ında azalma, ortama salgılanan metabolitlerin tekrar kullanımıyla da artış gözlenir (Çalık 1998).

2.7.3.4 Sıcaklık

Her mikroorganizmanın çoğalma ve gelişiminin maksimum olduğu bir sıcaklık değeri olmalıdır; istenilen ürünün verim ve seçimliliğini artırmak için genellikle bu sıcaklıkta izoterm koşullarda çalışmak gereklidir. L-fenilalanin üretimi ile ilgili çalışmalar incelendiğinde sıcaklık etkisi parametre olarak incelenmeden *Corynebacterium glutamicum* ile ilgili çalışmalarda 30°C, *Brevibacterium lactofermentum*'da 31.5 °C, *Escherichia coli*'de 33-38.5 °C, *Bacillus polymyxa* ve *Bacillus subtilis*'te 37 °C sıcaklık değerlerinde çalışılmıştır (Çizelge 2.10).

2.7.4 Metabolik mühendislik temelli araştırmalar

Metabolik yolizinde yer alan tepkime hızlarının ürün, yan ürün oluşumu sırasındaki dağılımının belirlenmesi biyoproses geliştirilmesinde kritik basamaktır. L-fenilalanin üretiminde verim ve seçimliliğinin artırılması için metabolik mühendislik temeliyle hücre-içi tepkime hız dağılımlarının belirlenerek hız kısıtlayıcı basamaklar ortaya çıkarılmalıdır. Bundan sonraki basamakta ise bu bilgiden yararlanılarak genetik strateji ortaya konulmalıdır. Aromatik amino asit yolizinde L-fenilalanine üretimine giden tepkimelerin hızları hesaplanıp, hız kısıtlayıcı basamakların belirlenmesi ve bu sonuçlara bağlı olarak metabolik mühendislik teknikleri kullanılarak L-fenilalanin verim ve seçimliliğinin artırılmasına yönelik, araştırma grubumuzda yapılan bir çalışma literatürde bulunmaktadır (Özçelik vd. 2004).

Flores *et al.* (1996) metabolik mühendislik tekniklerini kullanarak aromatik amino asit metabolik yolizinin ilk tepkime girdilerinden biri olan PEP miktarını artırmak amacıyla *E.coli* kullanmışlardır. Glukozun karbon kaynağı olarak kullanıldığı fermentasyon proseslerinde glikoliz yolizinde 1 mol glukozdan stokiyometrik olarak 2 mol PEP oluşmaktadır. Fakat 1 mol PEP glukozun taşınımı sırasında fosfotransferaz sistemi (PTS) tarafından kullanıldığından net 1 mol PEP aromatik amino asit üretimi için bir mol E4P ile tepkimeye girerek DAHP oluşturmaktadır. Bu çalışmada Flores *et al.* PTS sistemini kullanmayan (PTS⁻) *E.coli* ile aromatik amino asit yolizine doğru giden PEP miktarını artırmayı amaçlamışlardır. PEP miktarını artırmaya yönelik iki öneri ortaya koymuşlardır. İlk olarak karbon kaynağı olarak glukozu kullanabilen fakat fosfotransferaz sistemini kullanmayan mikroorganizma geliştirerek glukozun galaktoz permeaz (*GalP*) enzimi kullanılarak kolaylaştırılmış difüzyonla hücreye taşınımı sağlamayı veya piruvat gibi fosfotransferaz sistemini kullanmayan karbon kaynağı ile piruvattan PEP sentetaz üretimini artırarak PEP oluşumunu gerçekleştirmeyi düşünmüşlerdir. Önerilerinden ilk olanını kullanarak fosfotransferaz sistemini kullanmayan, karbon kaynağı olarak glukozu kullanan (PTS⁻, glukoz⁺) *E.coli* PB12 ve PB13 türlerini geliştirmişlerdir. Araştırmalarının genetik aşamasında DAHP sentetaz enziminden sorumlu *aroG* genini içeren pRW5: *aroG* ile *aroG* ve transketolaz enziminden *tktA* gelerini içeren pRW5: *aroG*, *tktA* rekombinant plasmidlerini *E.coli* NF9 ve triptofan üreten *E.coli* PB103 ile DAHP üretimini incelemişlerdir. Sonuçta *E.coli* PB103/pRW5: *aroG*, *tktA* ile maksimum 18 mM DAHP elde edilmiştir.

Aromatik amino asit yolizinde DAHP oluşum tepkimesi girdilerinden PEP'in yanı sıra E4P bileşeninin de kısıtlayıcı bileşen olduğunu belirtmişlerdir.

Özçelik vd. (2004) yaptıkları çalışmada bir önceki çalışmadaki gibi PTS⁻, glukoz⁺ *Bacillus subtilis* kullanmışlardır. Metabolik mühendislik temelinde hücre-içi tepkime hızlarının belirlenebilmesi için aromatik amino asit yolizindeki ilk tepkimenin (R#89) girdileri olan PEP ve E4P'nin biyoreaktör üretim ortamına ayrı-ayrı ve aynı miktarda eklenerek sistem pertürbe edildiğinde glukoz, hücre, yan-ürünlerin ve L-fenilalanin derişimlerinin zamanla derişimini belirlemişlerdir. Ortamda PEP (0.083 g/L) veya E4P+PEP (ayrı ayrı 0.083 g/L) bulunduğunda düşük derişim değerlerinden dolayı hücre derişimi önemli ölçüde etkilenmezken, sadece PEP bulunduğunda 12 st'ten sonra L-fenilalanin üretimi azalmış, PEP+E4P bulunduğunda ise 16 ve 20 st'lerde L-fenilalanin üretimi 2.2- ve 3.9- kat artmıştır. Ortamda sadece E4P bulunduğunda ise referans koşullara göre 16 ve 20 st'lerde L-fenilalanin üretimi 3.8- ve 2.7- kat artmaktadır. E4P'nin (0.083 g/L) bulunduğu ortamda 12 st'den sonra hücre-içi tepkime akıları hesaplanarak R#96 ile simgelenen korizmattan prephenat oluşum tepkimesinin birincil hız kısıtlayıcı basamak olduğunu belirlemişlerdir. Bu verilere dayalı olarak çalışmalarının ikinci aşamasında genetik mühendisliği teknikleri ile R#96 tepkimesinden sorumlu *aroH* genini iki aşamalı olarak klonladıkları *E.coli* ve *E.coli-Bacillus* shuttle vektörlerini *E.coli* ve *Bacillus*' a transforme ederek r-*E.coli* ve r-*B.subtilis* elde etmişlerdir. Geliştirdikleri rekombinant mikroorganizma ile doğal mikroorganizmayı karşılaştırdıklarında R#96 numaralı tepkimenin akısının 7.2-kat arttığını belirlemişlerdir (Çizelge 2.10).

Çizelge 2.8. L –fenilalanin üretimiyle ilgili kaynaklar: Üretim ortamı bileşenleri ve ölçülen parametreler.

Mikroorganizma	Araştırılan etki				Ortam	Ölçümler										Kaynaklar
	C	N	P	YE		C _x	A _{CM}	A _{PD}	A _{DAHP}	C _{AA}	C _{OA}	C _{Phe}	C _{Tyr}	C _{Trp}	C _{Ac}	
<i>r-C.glutamicum</i>	-	-	-	-	Kompleks	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	Ozaki <i>et al.</i> (1985)
<i>r-C.glutamicum</i>	-	-	-	-	Kompleks	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	Ikeda <i>et al.</i> (1992)
<i>r-C.glutamicum</i>	-	-	-	-	Kompleks	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	Ikeda <i>et al.</i> (1993)
<i>C.glutamicum</i>	-	-	-	-	Kompleks	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	Shu ve Liao (2002)
<i>r-B.lactofermentum</i>	-	-	-	-	Tanımlı	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	Ito <i>et al.</i> (1990a)
<i>r-B.lactofermentum</i>	-	-	-	-	Tanımlı	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	Ito <i>et al.</i> (1990b)
<i>E.coli</i>	-	-	-	-	Kompleks	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	Hwang <i>et al.</i> (1985)
<i>E.coli</i>	-	-	-	-	Kompleks	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	Gil <i>et al.</i> (1985)
<i>r-E.coli</i>	-	-	-	-	Tanımlı	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	Förberg ve Haggström (1987)
<i>r-E.coli</i>	-	-	-	-	Tanımlı	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	Konstantinov <i>et al.</i> (1990)
<i>r-E.coli</i>	-	-	-	-	Kompleks	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	K Flores <i>et al.</i> (1996)
<i>r-E.coli</i>	-	-	-	-	Tanımlı	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	Takagi <i>et al.</i> (1996)
<i>r-E.coli</i>	-	-	-	-	Tanımlı	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	Weikert <i>et al.</i> (1998)
<i>E.coli</i>	-	-	-	-	Tanımlı	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	Gerigk <i>et al.</i> (2002)
<i>Arthrobacter globiformis</i>	+	+	-	-	Tanımlı	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	Maiti <i>et al.</i> (1991)
<i>Arthrobacter globiformis</i>	-	-	-	-	Tanımlı	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	Maiti <i>et al.</i> (1991)
<i>Arthrobacter globiformis</i>	-	-	-	-	Tanımlı	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	Maiti <i>et al.</i> (1993)
<i>Bacillus polymyxa</i>	-	-	-	-	Kompleks	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	Shetty <i>et al.</i> (1986)
<i>r-Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-	Tanımlı	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	Özçelik <i>et al.</i> (2004)

Karbon kaynağı, C; Azot kaynağı, N; Fosfat kaynağı, P; Yeast ekstrakt, YE; Hücre derişi, C_x; Korizmat mutaz aktivitesi, A_{CM}; Pprephenat dehidrataz aktivitesi, A_{PD}; DAHP sentetaz aktivitesi A_{DAHP}; Amino asit derişimleri, C_{AA}; Organik asit derişimleri, C_{OA}; L-fenilalanin derişimi, C_{Phe}; L-tirozin derişimi, C_{Tyr}; L-triptofan derişimi, C_{Trp}; Asetik asit derişimi, C_{Ac}

Çizelge 2.9. L –fenilalanin üretimiyle ilgili kaynaklar: L-fenilalanin üretimi için geliştirilen rekombinant mikroorganizmalar

Mikroorganizma	Plasmid(<i>ler</i>)	Hedef enzim(<i>ler</i>)	Gen/genler	Restriksiyon Enzimleri	Rekombinant Mikroorganizma: Mikro-biyoreaktör	Kaynak
r- <i>C.glutamicum</i> K38 (pFP ^R ve mFP ^R dirençli)	pCE53 , (Cm ^R ,Km ^R ,Tc ^R) pCMB4, (Cm ^R ,Km ^R ,Tc ^S)	Korizmat mutaz- prephenat dehidrataz	Korizmat mutaz (CM), prephenat dehidrataz (PD) genleri	pCE53 : <i>Bam</i> HI <i>C.glutamicum</i> K38 : <i>Bam</i> HI	Kyowa Hakko Co'da L-fenilalanin üretebilen <i>C.glutamicum</i> 'un pFP ^R ,mFP ^R 'e karşı korizmat mutaz ve prephenat genlerini plasmid pCE53' e T4 DNA ligaz enzimi ile klonlanarak rekombinat plasmid pCmB4 elde edilmiştir. pCmB4 protoplast transformasyonla <i>C.glutamicum</i> KY9456'ya transforme etmişlerdir	Ozaki vd. (1985)
r- <i>C.glutamicum</i> KY10693 ve KY10694 (triptofan üreten)	pCG115, (Sp ^R) pCE53 (Cm ^R ,Km ^R ,Te ^R) pKY1, (Sp ^R) pKF1, (Sp ^R)	DAHP sentetaz (DS), korizmat mutaz (CM), prephenat dehidrataz (PD)	DAHP sentetaz (DS), korizmatmutaz (CM), prephenat dehidrataz (PD) genleri	pCG115 : <i>Sal</i> I (DS) pCE53: <i>Sal</i> I (CM) pCE53: <i>Bam</i> HI (PD) <i>C.glutamicum</i> KY10693 : <i>Bam</i> HI <i>C.glutamicum</i> KY10694 : <i>Sal</i> I	Kyowa Hakko Co'da DAHP sentetaz , korizmat mutaz ve prephenat dehidrataz genleri çok-aşamalı klonlama stratejisiyle, kopyalama sayısı çok olan pKF1 vektörlerine arka arkaya ekleyerek rekombinant plasmid elde edilmiştir.	Ikeda vd. (1992)
r- <i>C.glutamicum</i> KY10694	PBR322 (<i>E.coli</i>), (Amp ^R ,Tc ^R) pCE51 (<i>E.coli</i> - <i>C.glutamicum</i>), (Km ^R)	<i>Bifonksiyonel enzim</i> : Korizmat mutaz- prephenat dehidrataz	<i>pheA</i>	pBR322 : <i>Eco</i> RI ve <i>Bam</i> HI pCE51 : <i>Eco</i> RV <i>E.coli</i> MM294 : <i>Eco</i> RI ve <i>Bam</i> HI	Kyowa Hakko Co'da <i>pheA</i> genini pBR322 'ye önce klonlamışlar; ve <i>pheA</i> genini içeren 3.2 kb'lık DNA parçası <i>E.coli</i> - <i>C.glutamicum</i> shuttle vektörü pCE51'e klonlanarak pEA11: <i>pheA</i> elde etmişlerdir.	Ikeda vd. (1993)
r- <i>B.lactofermentum</i> (pFP ^R ,mFP ^R)	pAJ1844, (Cm ^R) pAR1, (Cm ^R) pAR2, (Cm ^R)	DAHP sentetaz	DAHP sentetaz geni	<i>B.lactofermentum</i> AJ11957 : <i>Pst</i> I pAJ1844 : <i>Pst</i> I	Ajinomoto Co'da geri-beslemeli inhibisyon etkisinde olmayan DAHP sentetaz geni plasmid pAJ1844 'e klonlanmış ve iki (pAR1: 15.3 kb, pAR2: 6.8 kb) L-fenilalanin ve L-tirozin verimliliğinin arttığı bulunmuştur.	Ito vd. (1990a)
r- <i>B.lactofermentum</i> (TA ^R ,mFP ^R ,tyr ⁻ ,met ⁻)	pAJ1844 (<i>E.coli</i> - <i>B.lactofermentum</i>), (Cm ^R) pAJ224 (<i>B.lactofermentum</i>), (Tp ^R) pTAR16, (Tp ^R)	prephenat dehidrataz	Prephenat dehidrataz geni	<i>B.lactofermentum</i> AJ11957 : <i>Pst</i> I pAJ1844: <i>Pst</i> I pAJ224 : <i>Sal</i> I ve <i>Bam</i> HI	Ajinomoto Co'da geri-beslemeli inhibisyon etkisinde olmayan prephenat dehidrataz geni plasmid pAJ1844 'e klonlanmış ve 7 plasmid (pPH11-17) elde etmişlerdir.	Ito vd.(1990b)
r- <i>E.coli</i> (<i>pts</i> ⁻ , <i>glukoz</i> ⁺)	pRW5 (Cm ^R) pRW5tki (Cm ^R)	DAHP sentetaz , Transketolaz	<i>aroG</i> , <i>tkiA</i>	pRW5 : <i>Bam</i> HI pRW5tki : <i>Bam</i> HI <i>E.coli</i> JM101: <i>Bam</i> HI	<i>tkiA</i> ve <i>aroG</i> genlerini içeren pRW5 'e klonlanmış ve fosfotransferaz sistemini kullanmayan <i>E.coli</i> PB103 ve NF9'a transforme edilerek DAHP üretimindeki artış araştırılmıştır.	K Flores vd. (1996)
r-Bacillus subtilis (<i>aroH</i>)	pUC19 (<i>E.coli</i>), (Amp ^R) pMK4 (<i>E.coli</i> - <i>Bacillus</i>), (Amp ^R)	Korizmat mutaz	<i>aroH</i> geni	pUC19 : <i>Bam</i> HI ve <i>Sal</i> I pMK4 : <i>Bam</i> HI ve <i>Sal</i> I	<i>B.subtilis</i> 'de L-fenilalanin yolizinde korizmat mutazdan prephenat oluşum tepkimesinin darboğaz oluşturduğu metabolik mühendislik teknikleriyle belirlenmiş ve genetik mühendisliği teknikleri ile bu tepkimeden sorumlu <i>aroH</i> geni önce plasmid pUC19 ve sonra pMK4 'e iki aşamalı klonlanmıştır.	Özçelik vd. (2004)

Çizelge 2.10. L –fenilalanin üretimiyle ilgili kaynaklar- Biyoreaktör ve işletim koşulları

Mikroorganizma	Biyoreaktör İşletme Koşulları							Hesaplanan verim değerleri		Sonuçlar	Kaynak
	Biyoreaktör / İşletim Türü	T °C	V _R dm ³	N dk ⁻¹	Q ₀ /V dk ⁻¹	DO %	pH	Y _{P/S}	Y _{X/S}		
r- <i>C.glutamicum</i> (pFP ^R ,mFP ^R ,fenilalanin üreten)	Yarı kesikli	30	0.55	800	1.8	-	7.2c	0.14	-	Korizmat mutaz ve prephenat dehidrataz genleri plasmid pCE53 'e klonlanmış; rekombinant <i>C.glutamicum</i> ile %50 artışla 19 g/L L-fenilalanin üretilmiştir	Ozaki <i>et al.</i> (1985)
r- <i>C.glutamicum</i> (phe ⁻ , tyr ⁻)	Yarı kesikli	30	0.55	800	1.8	-	6.1c	0.20	-	Triptofan üreten <i>C.glutamicum</i> 'a aromatik amino asit yolizinde yer alan üç tepkimeyi katalizleyen DAHP sentetaz, korizmat mutaz ve prephenat dehidrataz enzimlerinin genleri klonlanmış ve 28 g/l fenilalanin, 26 g/l tirozin ve 18 g/L triptofan üretilmiştir.	Ikeda <i>et al.</i> (1992)
r- <i>C.glutamicum</i> (fenilalanin üreten)	Yarı-kesikli	30	0.55	800	1.8	-	6.3c	0.17	-	Korizmat mutaz ve prephenat dehidrataz genleri pEA22 'ye klonlanmış;rekombinant <i>C.glutamicum</i> ile %35 artışla 23 g/L L-fenilalanin üretilmiştir.	Ikeda <i>et al.</i> (1993)
<i>C.glutamicum</i> (pFP ^R ,mFP ^R)	Yarı-kesikli	30	1.4	600 (t=21.5 st)	0.71	-	7.0c	0.18*	0.09*	L-fenilalanin üretiminde oksijen aktarımının etkisi incelenmiş; yarı kesikli biyoreaktörde ürün derişimi artarken ,oksijen aktarımı artırılarak ürün inhibisyonu azaltmış ve max. %42 verimlilikle 23.2 g/L L-fenilalanin üretilmiştir.	Shu ve Liao (2002)
	Yarı-kesikli	30	1.4	600-900 (t=44 st)	0.71-1.48	-	7.0c				
r- <i>B.lactofermentum</i> (pFP ^R ,mFP ^R)	Kesikli	31.5	-	-	-	-	-	0.2	-	Geri beslemeli inhibisyonla bağımsız DAHP sentetaz geni plasmid pAJ1844'e klonlanmış; doğal B.lactofermentum ile 0.4 g/L antranilat üretilirken, r- <i>B.lactofermentum</i> ile 4.4 g/L L-fenilalanin ve 4.9 g/L L-tirozin üretilmiştir	Ito <i>et al.</i> (1990a)
r- <i>B.lactofermentum</i> (TA ^R ,mFP ^R ,tyr ⁻ ,met ⁻)	Kesikli	31.5	-	-	-	-	-	0.11*	-	Prephenat dehidrataz geni plasmid pAJ1844'e klonlanmış; r- <i>B.lactofermentum</i> ile doğal <i>B.lactofermentum</i> ' a göre 3.3 kat (18.2 g/L) daha fazla L-fenilalanin üretilmiştir	Ito <i>et al.</i> (1990b)
<i>E.coli</i> (pFP ^R ,mFP ^R ,tyr ⁻)	Yarı-kesikli	33	20.5	400	1	>30	7.0c	0.08	0.12	Fenilalanin analogu olan mFP ve pFP'ye dirençli tirozin oksotrof <i>E.coli</i> ile üretim ortamında L-fenilalaninin üstel çoğalma fazının sonlarına inhibisyon etkisi yaptığını belirlemiştir	Hwang <i>et al.</i> (1985)
<i>E.coli</i> (pFP ^R ,TA ^R ,tyr ⁻)	Yarı-kesikli	33	200	360	0.76	-	7.0c	0.11	0.23	Fenilalanin analogu olan TA ve pFP'ye dirençli <i>E.coli</i> ile optimum glukoz içeriği (%14) ve aşılama oran (%) ile 0.35-0.40 verimlilikle 14-15 g/L L-fenilalanin üretilmiştir.	Gil <i>et al.</i> (1985)
<i>r-E.coli</i> (Amp ^R ,Tc ^R ,pheA ^{FBR-} ,aroF ⁻)	Yarı-kesikli	37	2	600	0.7-0.85	>70	7.0c	0.11*	-	r- <i>E.coli</i> ile yarı kesikli işletimde fosfat kısıtlaması ile L-fenilalanin üretimi azalırken , sülfat kısıtlaması altında değişmemiş; sürekli işletimde ise fosfat kısıtlamalı ortamda L-fenilalanin üretimi en iyi ve yan ürün asetat oluşumunun en az olduğu koşul olarak belirlenmiştir.	Förberg ve Haggström (1987)
	Kemostat	37	1.3-1.4	600	1.08-1.21	>70	7.0c				
r- <i>E.coli</i> (tyr ⁻ ,tiamin ⁻ ,pheA ^{FR-} ,aroF ^{FR})	Yarı-kesikli	38.5	3	-	1	20	7.0c	0.14	0.83	r- <i>E.coli</i> ile L-fenilalanin üretiminde asetik asit oluşumunu azaltmak için optimum glukoz besleme stratejisi araştırılmış ; optimum glukoz besleme hızında %18 verimle 46 g/L L-fenilalanin üretilmiştir.	Konstantinov <i>et al.</i> (1990)
r- <i>E.coli</i> (pts ⁻ ,glukoz ⁺ , aroG, tktA)	Kesikli	35	-	-	-	-	6.5c	-	-	Aromatik amino asit yolizinde DAHP oluşum tepkimesinin girdilerinden biri olan PEP miktarını artırmak amacıyla yapılan çalışmada DAHP sentetaz ve transketolaz enzimlerinden sorumlu aroG ve tktA genleri pRW5 plasmidine klonlanmış; r- <i>E.coli</i> ile 18 mm DAHP üretilmiştir.	K.Flores <i>et al.</i> (1996)
<i>E.coli</i> (tyr ⁻ ,tiamin ⁻ ,pheA ^{FR-} ,aroF ^{FR})	Yarı-kesikli	38.5	5	1000' e kadar değişken	1	20	7.0c	0.20	-	r- <i>E.coli</i> glukoz ve tirozinin eşanlı olarak beslenmesinin L-fenilalanin üretimine etkisi araştırılmıştır.	Takagi <i>et al.</i> (1996)
r- <i>E.coli</i> (tyr ⁻ ,tiamin ⁻ ,pheA ^{FR-} ,aroF ^{FR})	Kesikli	37	0.35	500	1.5	-	7.0c	0.03*	0.23*	Korizmat mutaz-prephenat sentetaz ve DAHP sentetaz enzimlerinden sorumlu genleri içeren rekombinant <i>E.coli</i> CWML2 kullanılarak çoğalma-olmayan koşullarda kesikli işletimde L-fenilalanin üretimi incelenmiş ve 0.9 g/L L-fenilalanin üretilmiştir.	Weikert <i>et al.</i> (1998)
r- <i>E.coli</i> (aroF ^{FR})	Yarı-kesikli	37	7.5	-	-	-	6.5c	0.23*	-	Oksijene göre yarı-kesikli olarak işletilen sistemlerde karbon kaynağı olarak glukozun kullanıldığı proseste belirli bir kalma süresinde sürekli olarak beslemeye başlayarak glukoz derişimini bir set noktasında kontrol etmişlerdir.	Gerigk <i>et al.</i> (2002)

<i>Arthrobacter globiformis</i> (trp ⁻ , tyr ⁻ , pFP ^R , TA ^R)	Kesikli	30	-	-	-	-	7.0	0.02	-	Analog dirençli <i>Arthrobacter globiformis</i> mutanı ile L-fenilalanin üretimi için optimum karbon ve azot kaynağı sırasıyla glukoz (350 mM) ve NH ₄ Cl (60 mM) olarak belirlenmiştir.	Maiti <i>et al.</i> (1991)
<i>Arthrobacter globiformis</i> (trp ⁻ , tyr ⁻ , pFP ^R , TA ^R)	Kesikli	30	-	-	-	-	7.0c	0.04	-	Analog dirençli <i>Arthrobacter globiformis</i> mutanı ile 2.6 g/L L-fenilalanin üreilmiştir	Maiti <i>et al.</i> (1991)
<i>Arthrobacter globiformis</i> (trp ⁻ , tyr ⁻ , pFP ^R , TA ^R)	Kesikli	30	-	-	-	-	7.0c	0.14	-	Analog dirençli <i>Arthrobacter globiformis</i> mutanı ile optimum tirozin (0.1 mM) ,triptofan (0.5 mM) ve biotin (5 µg/l) derişimlerinde 8.7 g/L L-fenilalanin üretilmiştir	Maiti <i>et al.</i> (1993)
<i>Bacillus polymyxa</i> (pFP ^R TA ^R)	Kesikli	37	-	100	-	-	7.1	0.05	-	Analog dirençli <i>Bacillus polymyxa</i> mutantları ile 0.5g/L L-fenilalanin , 0.15 g/L L-tirozin glukoz besleme hızında %18 verimle 46 g/L L-fenilalanin üreilmiştir.	Shetty <i>et al.</i> (1986)
r- <i>Bacillus subtilis</i> (aroH)	Kesikli	37	0.5	500	0.25	-	7.0	0.06	0.29	Metabolik yolizi analizi ile L-fenilalanin üretiminde darboğaz oluşturduğu belirlenen R96 numaralı tepkimeyi katalizleyen korizmat mutaz enziminden sorumlu aroH geninin <i>B.subtilis</i> 'e klonlanarak kesikli biyoreaktörde L-fenilalanin üretimi araştırılmıştır. r- <i>B.subtilis</i> ileR96 tepkimenin hücre akısında 7.2-kat artış gözlenmiştir.	Özçelik <i>et al.</i> (2004)

Çizelge 2.11. L-fenilalanin üretiminde kullanılan katı, sıvı, üretim ortam bileşimleri

Mikroorganizma	Ortam bileşen ve bileşimleri			Kaynak
	Katı Ortam	Ön sıvı Ortamı	Üretim Ortamı	
<i>r-C.glutamicum</i>	-	% 2 et suyu % 0.5 yeast ekstrakt	(g/L) : şeker kamışı melası (glukoza eşdeğer), 50 KH ₂ PO ₄ , 0.5 K ₂ HPO ₄ , 0.5 MgSO ₄ .7H ₂ O, 0.25 (NH ₄) ₂ SO ₄ , 20 CaCO ₃ , 20	Ozaki et al. (1985)
<i>r-C.glutamicum</i>	RCGA agar: %1.6 bacto-agar Spektinomisin, 400 µg/mL Fenilalanin ve tirozin , 200 µg/mL BY agar: %1.6 bacto-agar Kanamisin, 100µg/mL Fenilalanin ve tirozin, 10 µg/mL MM agar: %1.6 bacto-agar Kanamisin, 100µg/mL Fenilalanin, tirozin, 100µg/mL	-	TS1 ortamı (g/L): Sukroz, 50 KH ₂ PO ₄ , 2 MgSO ₄ .7H ₂ O, 0.5 (NH ₄) ₂ SO ₄ , 5 Üre, 0.6 Corn steep likör, 40 FeSO ₄ .7H ₂ O, 10 mg MnSO ₄ .4~6H ₂ O, 10 mg CuSO ₄ .5H ₂ O, 4 mg Tirozin, 266 mg L-fenilalanin, 362 mg D-Biotin, 100 µg Tiamin-HCl, 5 mg CaCO ₃ , 20 TP2 ortamı (g/L): Sukroz, 60 KH ₂ PO ₄ , 2 K ₂ HPO ₄ , 1.2 MgSO ₄ .7H ₂ O, 1.7 (NH ₄) ₂ SO ₄ , 17 Corn steep likörü , 66 FeSO ₄ .7H ₂ O, 13 mg MnSO ₄ .4~6H ₂ O, 13 mg CuSO ₄ .5H ₂ O, 6 mg Tirozin, 310 mg L-fenilalanin, 650 mg D-Biotin, 230 µg Tiamin-HCl, 450 µg	Ikeda et al. (1992)

Çizelge 2.11. L-fenilalanin üretiminde kullanılan katı, sıvı, üretim ortam bileşimleri (devam)

<i>r-C.glutamicum</i>	RCGA agar: %1.6 bacto-agar Kanamisin, 200 ug/ml LB ve M9 agar: %1.6 bacto-agar Ampisilin, 100 ug/ml Tetrasiklin, 20 ug/ml Kanamisin, 20 ug/ml BY agar: %1.6 bacto-agar Kanamisin, 10 ug/ml MM agar: %1.6 bacto-agar Kanamisin, 10 ug/ml	-	(g/L): şeker kamışı melası, 50 KH ₂ PO ₄ , 0.5 K ₂ HPO ₄ , 0.5 MgSO ₄ .7H ₂ O, 0.25 (NH ₄) ₂ SO ₄ , 20 Corn steep likörü , 2.5 FeSO ₄ .7H ₂ O, 0.005 MnSO ₄ .4~6H ₂ O, 0.2 Tirozin, D-Biotin, 5*10 ⁻⁵ Tiamin-HCl, 0.005	Ikeda et al. (1993)
<i>C.glutamicum</i>	Complete medium (w/v%): Bacto yeast ekstrakt, 1 Bacto pepton, 1 Sukroz, 0.5 KCl, 0.5	(g/L): Melas , 7 (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0.3 Soy protein, 5 KH ₂ PO ₄ , 0.1 K ₂ HPO ₄ , 0.1 MgSO ₄ .7H ₂ O, 0.03 CaCO ₃ , 2	(g/L): Melas, 7 (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0.3 KH ₂ PO ₄ , 0.1 K ₂ HPO ₄ , 0.1 MgSO ₄ .7H ₂ O, 0.03	Shu ve Liao (2002)
<i>r-Brevibacterium lactofermentum</i>	CM-RG SM-3 RB (3 ug /ml klorampenikol)	-	(g/L): Glukoz, 50 Tiamin, 0.005 L-histidin, L-prolin, L-arjinin, L-izolözin , L-lözin , L-valin, 0.005	Ito et al. (1990a)
<i>r-Brevibacterium lactofermentum</i>	CM-RG SM-3 RB (3 ug /ml kloramfenikol)	-	(g/L): Glukoz, 50 Tiamin, 0.005 L-histidin, l-prolin, L-arjinin, L-izolözin , L-lözin , L-Valin, 0.005	Ito et al. (1990b)
<i>E.coli</i>	Nutrient agar L-tirozin, 50 mg/L TA, 6 g/L PFP, 6 g/L	(g/L): Glukoz, 50 Sodyum sitrat, 1.2 K ₂ HPO ₄ , 1 Yeast ekstrakt, 1 K ₂ SO ₄ , 0.4 MgCl ₂ .6H ₂ O, 0.8 NH ₄ Cl, 5.8 FeCl ₂ .6 H ₂ O, 0.015 CaCO ₃ , 25 Eser element çözeltisi, 1 ml/L	(g/L): Glukoz, 50 Sodyum sitrat, 1.48 K ₂ HPO ₄ , 2 Yeast ekstrakt, 3.69 K ₂ SO ₄ , 0.91 MgCl ₂ .6H ₂ O, 1.97 FeCl ₂ .6 H ₂ O, 0.037 Eser element çözeltisi, 2.46 ml/L	Hwang et al. (1985)
<i>E.coli</i>	Nutrient agar	(g/L): Glukoz, 20 Yeast ekstrakt, 3 NH ₄ Cl, 4 K ₂ SO ₄ , 0.36 Sodyum sitrat, 1.2 MgCl ₂ .6H ₂ O, 0.8 FeCl ₂ .6 H ₂ O, 0.02 K ₂ HPO ₄ , 2 Tiamin-HCl, 0.001 1 ml/L eser element çözeltisi	(g/L): Glukoz, 50 Yeast ekstrakt, 2.77 K ₂ SO ₄ , 0.91 Sodyum sitrat, 1.48 MgCl ₂ .6H ₂ O, 1.97 FeCl ₂ .6 H ₂ O, 0.037 K ₂ HPO ₄ , 1.5 Tiamin-HCl, 0.00148 Eser element çözeltisi, 2.46 ml/L	Gil et al. (1985)

Çizelge 2.11. L-fenilalanin üretiminde kullanılan katı, sıvı, üretim ortam bileşimleri (devam)

r- <i>E.coli</i>	LB agar (g/L): Trypton, 10 Yeast ekstrakt, 5 NaCl, 5 Agar, 15 Tetrasiklin, 10 mg/L	-	(g/L): Glukoz, 20 NH ₄ Cl, 5 K ₂ SO ₄ , 0.8 CaCl ₂ .2H ₂ O, 0.02 MgCl ₂ .6H ₂ O, 0.8 KH ₂ PO ₄ , 0.5 Na ₂ HPO ₄ , 1 Sodyum sitrat, 2.5 FeCl ₃ .6 H ₂ O, 0.01 Eser element çözeltisi, 1 ml/ L	Förberg et al. (1987)
r- <i>E.coli</i>	-	LB ortam (g/L): Glukoz, 20 Kanamisin, 0.04 Antifoam	(g/L): Glukoz, 20 Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O, 7 KH ₂ PO ₄ , 4 K ₂ HPO ₄ , 4 NaCl, 1 K ₂ SO ₄ , 2 MgSO ₄ .7H ₂ O, 3 Sodyum sitrat, 10 Sodyum glutamat, 0.55 CaCl ₂ .2H ₂ O, 0.06 Tirozin, 0.6 Tiamin, 0.05 Kanamisin, 0.04	Konstantinov et al. (1990)
r- <i>E.coli</i>	Mac-Cankey agar	-	(g/L): Glukoz, 15 Yeast ekstrakt, 15 MgSO ₄ , 3 KH ₂ PO ₄ , 16 K ₂ HPO ₄ , 14 (NH ₄) ₂ SO ₄ , 5 Antifoam	K.Flores et al. (1996)
r- <i>E.coli</i>	-	LB ortam (g/L): Glukoz, 20 Kanamisin, 0.04 Antifoam	(g/L): Glukoz, 20 Na ₂ HPO ₄ .12 H ₂ O, 7 KH ₂ PO ₄ , 4 K ₂ HPO ₄ , 4 NaCl, 1 K ₂ SO ₄ , 2 MgSO ₄ .7H ₂ O, 3 Sodyum sitrat, 10 Sodyum glutamat, 0.55 CaCl ₂ .2H ₂ O, 0.06 Tirozin, 0.6 Tiamin, 0.05 Kanamisin, 0.04	Takagi et al (1996)
r- <i>E.coli</i>	-	(mM): Glukoz, 50 (NH ₄) ₂ SO ₄ , 30 KH ₂ PO ₄ , 3.7 K ₂ HPO ₄ , 6.6 MgSO ₄ , 1 CaCl ₂ , 0.05 FeCl ₂ , 0.2 B ₁ vitamin 0.3 µM 100 µL/L polipropilen glikol	(mM): Glukoz, %50 (w/v) (NH ₄) ₂ SO ₄ , 30 KH ₂ PO ₄ , 3.7 K ₂ HPO ₄ , 6.6 MgSO ₄ , 1 CaCl ₂ , 0.05 FeCl ₂ , 0.2 vitamin B ₁ 0.3 µM 100 µL/L polipropilen glikol	Weikert et al. (1998)

Çizelge 2.11. L-fenilalanin üretiminde kullanılan katı, sıvı, üretim ortam bileşimleri (devam)

<i>E.coli</i>	-	(g/L): Glukoz, 5 MgSO ₄ .7H ₂ O, 0.3 CaCl ₂ .H ₂ O, 0.015 KH ₂ PO ₄ , 3 K ₂ HPO ₄ , 12 NaCl, 0.1 (NH ₄) ₂ SO ₄ , 5 FeSO ₄ . 7H ₂ O/Na-sitrat, 0.075/0.1 Tiamin*HCl, 0.0075 L-tirozin, 0.08 Ampisilin, 0.1 Eser element çözeltisi 1.5 ml/L	(g/L): Glukoz, 15 MgSO ₄ .7H ₂ O, 3 CaCl ₂ .H ₂ O, 0.015 KH ₂ PO ₄ , 3 NaCl, 1 (NH ₄) ₂ SO ₄ , 5 FeSO ₄ . 7H ₂ O/Na-sitrat,0.075/0.1 Tiamin, 0.075 L-tirozin, 0.3 Ampisilin, 0.1 Eser element çözeltisi 1.5 ml/L	Gerigk et al. (2002)
<i>Arthrobacter globiformis</i>	Alföldi agar	-	Glukoz; 350 mM NH ₄ Cl: 60 mM Tirozin Tryptofan	Maiti et al. (1991a)
<i>Arthrobacter globiformis</i>	Alföldi agar	-	Glukoz; 350 mM NH ₄ Cl: 60 mM Tirozin Tryptofan	Maiti et al. (1991b)
<i>Arthrobacter globiformis</i>	Alföldi agar	-	Glukoz; 350 mM NH ₄ Cl: 60 mM Tirozin Tryptofan	Maiti et al. (1993)
<i>Bacillus polymyxa</i>	Starch minimal agar	Starch minimal medium : (g/L) Nişasta, 10 (NH ₄) ₂ SO ₄ , 2 Na ₂ HPO ₄ , 5 KH ₂ PO ₄ , 3 MgSO ₄ .7H ₂ O, 0.2 NaCl, 0.2 CaCl ₂ .2H ₂ O, 0.5 Eser element çözeltisi, 1 ml	(g/L): Nişasta, 10 (NH ₄) ₂ SO ₄ , 2 Na ₂ HPO ₄ , 5 KH ₂ PO ₄ , 3 MgSO ₄ .7H ₂ O, 0.2 NaCl, 0.2 CaCl ₂ .2H ₂ O, 0.5 Eser element çözeltisi, 1 ml	Shetty et al. (1986)
<i>r-Bacillus subtilis</i>	LB agar (g/L): Trypton, 10 NaCl, 5 Yeast ekstrakt, 5 Agar, 15	LB broth (g/L): Trypton, 10 NaCl, 5 Yeast ekstrakt, 5	(g/L): Glukoz, 10 (NH ₄) ₂ HPO ₄ , 5 KH ₂ PO ₄ , 0.5 K ₂ HPO ₄ , 0.5 MgSO ₄ .7H ₂ O, 0.1 MnSO ₄ .H ₂ O, 0.1 ZnSO ₄ .7H ₂ O, 2 mg	Özçelik et al. (2004)

3. MATERYAL VE METOD

3.1 Kimyasal Maddeler

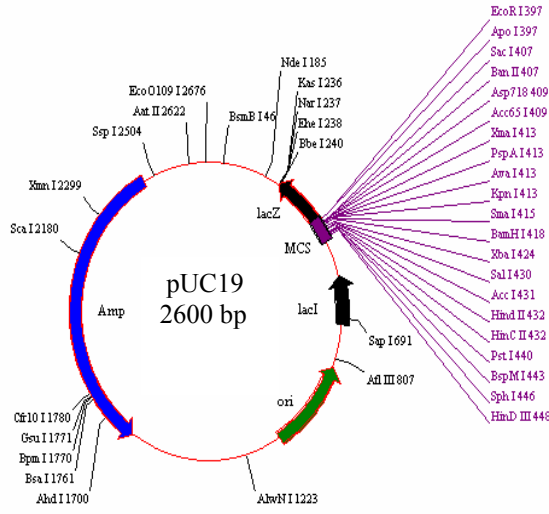
Bu yüksek lisans araştırma programında genetik mühendislik ve metabolik mühendislik çalışmalarında kullanılan primer ve enzimler MBI Fermentas, kimyasal maddeler ise Sigma, Difco, Fluka ve Merck firmalarından satın alınmıştır.

3.2 Mikroorganizma

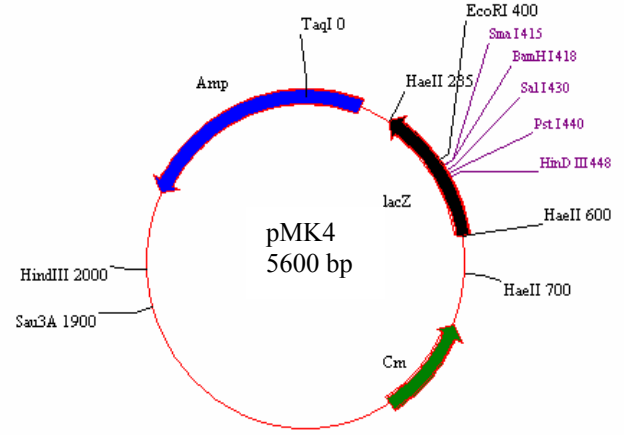
Yüksek lisans araştırma programında Northern Regional Research Laboratory (NRRL) 'den dondurularak kurutulmuş olarak getirilmiş olan; *aroA* genini taşıyan *Bacillus subtilis* NRRL-NRS 1315 ve rekombinant mikroorganizma geliştirmek için *Bacillus* Genetic Stock Center'dan getirilen *Bacillus subtilis* 1A263 (*metC pfk pstII*) seçilerek kullanılmıştır.

Çizelge 3.1 Rekombinant mikroorganizma geliştirmek için kullanılan mikroorganizma ve plasmidler

Mikroorganizma	Kaynak
<i>E. coli</i>	
XLI-Blue	ATCC 31538, Bullock vd. (1987)
<i>B. subtilis</i>	
BS1315 (<i>aroA</i> geni kaynağı)	NRRL
1A263	BGSC
Plasmidler	Kaynak
pUC19	Yanisch-Peron vd. (1985)
pMK4	Brücknet vd. (1992)
pUC19:: <i>aroH</i>	Özçelik (2003), Özçelik vd (2004)
pMK4:: <i>aroH</i>	Özçelik (2003), Özçelik vd. (2004)
pUC19:: <i>aroA</i>	<i>Bu çalışma</i>
pMK4:: <i>aroA</i>	<i>Bu çalışma</i>
pUC19:: <i>aroA</i> :: <i>aroH</i>	<i>Bu çalışma</i>
pMK4:: <i>aroA</i> :: <i>aroH</i>	<i>Bu çalışma</i>



Şekil 3.1a pUC19 plasmidi



Şekil 3.1b pMK4 plasmidi

3.2.1 Mikrobank (mikroorganizma saklama sistemi)

1.8 cm³ hacımlı 25 adet gözenekli boncuk ve gliserol içeren şişelere (*PRO-LAB*, *Microbank^{TS}*), katı ortamda çoğaltılmış aktif mikroorganizma aktarılmış, bir süre çalkalanarak mikroorganizmanın boncuklara adsorpsiyonu sağlanmış ve şişedeki gliserol atılmıştır. Şişeler derin dondurucuda, T= -20 °C 'da saklanmıştır.

3.3 Katı Çoğalma Ortamı

Doğal ve rekombinant *Bacillus* türleri için kullanılan katı çoğalma ortamı bileşimi Çizelge 3.2' de verilmiştir. Rekombinant mikroorganizmaların aktarılacağı katı çoğalma ortamlarına sterilizasyon işleminden sonra plasmidin korunması için ortamdaki derişimi 7 µg/cm³ olacak şekilde kloramfenikol (Cm^R) eklemiştir. Mikroorganizmalar katı ortama steril koşullarda öze ile aktarıldıktan sonra 37 °C'de 24 st inkübatörde (Fischer) çoğaltılmıştır.

Çizelge 3.2 Doğal ve rekombinant *Bacillus subtilis* için katı çoğalma ortamı

Bileşen	Derişim, kg/m ³
Et özütü	3
Pepton	5
Agar	15

3.4 Ön-sıvı Çoğalma Ortamı

Mikroorganizma çoğalmasında ve L-fenilalanin üretiminde kullanılan ön-sıvı çoğalma ortam bileşimi Çizelge 3.3’de verilmiştir. Katı ortamda çoğalmalarını tamamlayan hücreler $V_R=150$ ml hacimli mikrobiyolojik hava filtreli biyoreaktörde bulunan 30 ml hacimli ön-sıvı çoğalma ortamına steril koşullarda aktarılmış ve sıcaklığı 37 °C, karıştırma hızı $N=200 \text{ dk}^{-1}$ olan orbital karıştırmalı inkübatörde (*B.Braun, Certomat BS-1*) 12 st çoğaltılmışlardır. Rekombinant mikroorganizma kullanıldığında plasmidin korunması için sterilizasyon işleminden sonra ortama derişimi $7 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ olacak şekilde kloramfenikol (Cm^R) eklemiştir.

Çizelge 3.3 Doğal ve rekombinant *Bacillus subtilis* için ön-sıvı çoğalma ortamı

Bileşen	Derişim,kg/m ³
Et özütü	3
Pepton	5

3.5 Üretim Ortamı

Ön-sıvı ortamda çoğalan mikroorganizmalar pipet yardımıyla steril koşullarda -aksi belirtilmedikçe- bileşimi Çizelge 3.4’de verilen $V_R= 500$ ml hacimli mikrobiyolojik hava filtreli biyoreaktörde bulunan 100 cm^3 hacimli üretim ortamlarına 1:10 ölçek büyütme oranında aktarılmıştır. Aktarma yapıldıktan sonra hücreler karıştırma hızı $N=200 \text{ dk}^{-1}$ olan orbital karışmalı inkübatörde (*B.Braun, Certomat BS-1*) 37°C sıcaklıkta çoğaltılmıştır.

Çizelge 3.4 Doğal ve rekombinant *Bacillus subtilis* için sıvı çoğalma ortamı

Bileşen	Derişim, kg/m ³
Glukoz	10
KH ₂ PO ₄	0.5
K ₂ HPO ₄	0.5
(NH ₄) ₂ HPO ₄	5.657
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.1
MnSO ₄ .H ₂ O	0.1
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.002
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.002
LiCl ₂	0.002
pH	7.0

3.6 Ölçek Büyütme Adımları ve Biyoreaktör Sistemi

L-fenilalanin üretiminde kullanılan pilot ölçek biyoreaktör sistemi Şekil 3.2’de verilmiştir. Birinci basamakta mikroorganizma mikrobanktan katı ortama aktarılmış, ikinci basamakta katı ortamda ön-sıvı çoğalma ortamına, üçüncü basamakta ise 1/10 aşılama oranı ile üretim ortamının yer aldığı pilot ölçek biyoreaktöre aktarılmıştır.

L-fenilalanin üretim deneyleri, laboratuvar ve pilot ölçek olmak üzere iki farklı ölçekte yapılmıştır. Laboratuvar ölçekte bileşimi Çizelge 3.4’de verilen üretim ortamı kullanılarak $V_R=100 \text{ cm}^3$ çalışma hacimli mikrobiyolojik hava filtreli tam karıştırmalı kesikli biyoreaktörlerde $N=200 \text{ dk}^{-1}$ karıştırma hızı, $T=37^\circ\text{C}$ sıcaklıkta yaklaşık $t=27 \text{ st}$ süreyle L-fenilalanin üretimi gerçekleştirilmiştir.

Pilot ölçekte yapılan L-fenilalanin üretim deneylerinde üretim ortam bileşimi Çizelge 3.4’de verilen başlangıç pH değeri $\text{pH}_0=6.8$ olan $V_R=500 \text{ cm}^3$ hacimli biyoreaktör üretim ortamına ön-sıvıdan 1/10 aşılama oranında aktarılmıştır. Bu adımda kullanılan biyoreaktör sistemindeki (BBraun Biostat Q4) biyoreaktörlerin herbiri $V_R=1 \text{ dm}^3$

toplam hacimli, mekanik karıştırılmalı, pH, sıcaklık, çözülmüş oksijen ve karıştırma hızı kontrollü pilot ölçekli kesikli biyoreaktörlerdir. Sterillenen biyoreaktörlerin herbirinde iki çift engel, iki adet düz bıçaklı türbin tipi karıştırıcı ve halkalı, nokta- delikli gaz dağıtıcısı olan bir gaz giriş borusu bulunmaktadır. Sıcaklık kontrolü ceketten su sirkülasyonu ile yapılmaktadır. Soğutma suyu, sıcaklığı $T=5-20^{\circ}\text{C}$ 'e ayarlanabilen CA 111 model Eyela (Japonya) soğutmalı su sirkülatörü ile; reaktöre beslenen hava ise Larfon (İtalya) yapımı yağsız-hava kompresörü ile sağlanmıştır.

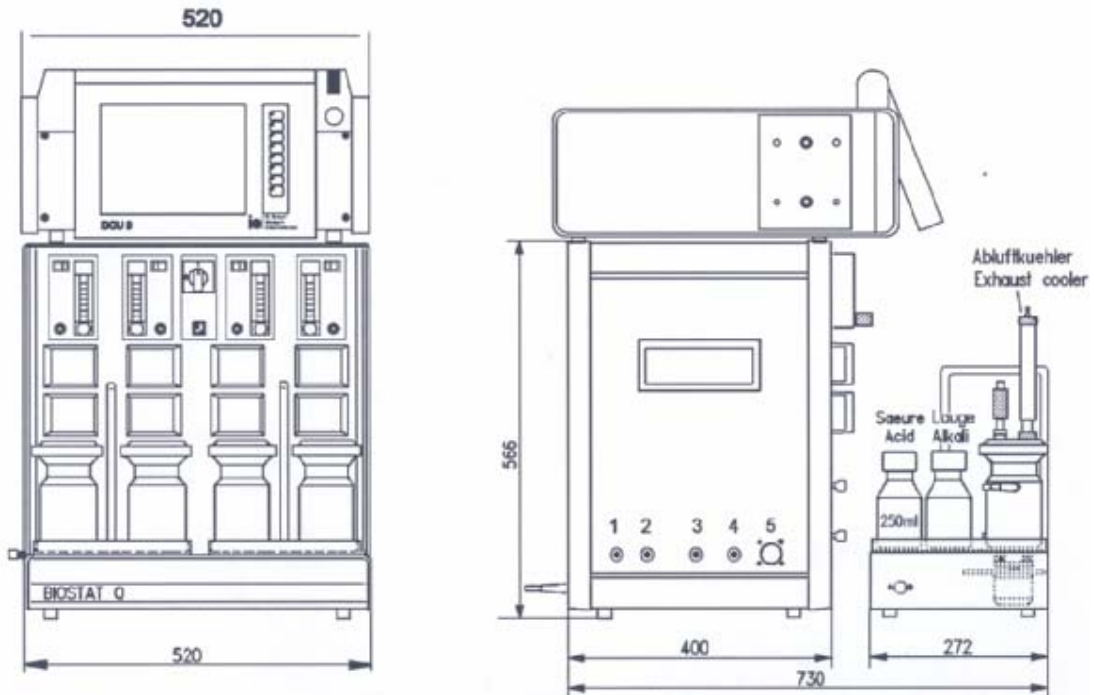
3.6.1 Pilot ölçek biyoreaktörde üretim

L-fenilalanin üretimi için kullanılan biyoreaktör sisteminin (B.Braun Biostat Q4) hazırlanmasında izlenecek adımlar aşağıda sırasıyla anlatılmıştır:

1. Temiz ve saf su ile dolu olarak bırakılmış olan biyoreaktör boşaltılır.
2. Her reaktörün pH elektrotları reaktör bağlantılarından sökülerek ayrı bir beher içinde $\text{pH}=7.0$ ve $\text{pH}=4.0$ olan Mettler Toledo'nun standart tamponları ile sırasıyla kalibrasyon yapılır ve elektrotlar yerine takılır.
3. Sterilizasyon işleminden önce biyoreaktörler 450 cm^3 glukoz ve eser elementleri içermeyen üretim ortamları (Çizelge 3.4) ile, ceketleri ise saf su ile doldurulur. pH elektrodu ve oksijen elektrodunun kabloları elektrodlardan çıkarılır ve bağlantı yerleri uygun bir şekilde sterilizasyon sırasında zarar görmemeleri için kapatılır. Reaktörlerin hava çıkışları açık olmalı, gaz-çıkış soğutucu ucuna filtre bağlanmış olmalıdır. Asit ve baz şişeleri asit ve baz çözeltileriyle doldurulduktan sonra reaktörlere bağlantıları yapılır ve hortumlar kısaçlanır. Açık olan hortum uçları ve sıcaklık probu bağlantı kablosunun ucu uygun şekilde kapatıldıktan sonra reaktörler ikişerli gruplar halinde $T=121^{\circ}\text{C}$ sıcaklı ve $P=1.2\text{ atm}$ koşullarında $t=20\text{ dk}$ süre ile buhar sterilizatöründe (Hirayama HA 240 MII) sterillendir.
4. Sterillenen reaktörler dikkatle soğutulduktan sonra ana üniteye ve kontrol ünitesine bağlantıları yapılır.
5. Aynı gün hazırlanmış ve buhar sterilizatöründe (Hirayama HA 240 MII) 121°C ve 20 dk süreyle sterillenmiş olan üretim ortamının diğer bileşenleri (glukoz çözeltisi

ve eser element çözeltisi) $V_R = 500 \text{ cm}^3$ olacak şekilde steril enjektörler yardımıyla silikon hortumlarla steril koşullarda biyoreaktörlere aktarılır.

6. Biyoreaktörler belirlenen işletme koşullarında (sıcaklık, karıştırma hızı ve hava giriş hızı) çalıştırılmak üzere kontrol sistemine istenen değerler girilir ve sıcaklık ve karıştırma hızlarının kontrolleri aktif hale getirilir.
7. Oksijen elektrodlarının kalibrasyonu için biyoreaktör ortamına, önce N_2 gazı gönderilerek oksijen uzaklaştırılır ve çözünmüş oksijen doygunluk değeri %0'a ayarlanır.
8. Daha sonra hava gönderilerek sabit kalan değer %100 doygunluk değerine ayarlanır. Çoğunlukla tek noktada yani %100 doygunluk değerinde kalibrasyon yapmak yeterlidir.
9. Oksijen elektrodları kalibre edildikten sonra ön-sıvı ortamda çoğaltılan mikroorganizma biyoreaktöre aşılır.
10. İşletim sırasında –gerektiğinde- köpük giderici olarak steril lenmiş %0.5 (h/h) Antifoam A çözeltisi gereken miktarda steril koşullarda sisteme enjekte edilir.



Şekil 3.2 Pilot ölçek biyoreaktör sistemi: B.Braun Biostat Q4

3.7 Analitik Yöntemler

Laboratuvar ve pilot ölçekli biyoreaktörlerde gerçekleştirilen biyotepkimeler süresince farklı kalma sürelerinde alınan örneklerin önce mikroorganizma derişimi ölçülmüş, daha sonra üretim ortamı 10 dk süreyle 12000g'de 4°C sıcaklıkta santrifüj cihazı ile santrifüjlenerek hücreler ayrılmıştır. Sıvı faz 0.45 µm gözenekli filtrelerden süzöldükten sonra sıvı ortamdaki amino asit, organik asit, protein ve glukoz derişimleri aşğıdaki analitik yöntemlerle belirlenmiştir.

3.7.1 Mikroorganizma derişimi

Mikroorganizma derişimi türbidimetrik olarak UV-spektrofotometrede (Shimadzu UV 160A) absorbans ölçümüyle belirlenmiştir. Kalibrasyon doğrusu, referans çözelti olarak mikroorganizma içermeyen üretim ortamları kullanılarak belli derişimde hücre içeren ortam için $\lambda=600$ nm'de 1/6 seyreltme oranında belirlenmiştir (Ek 4), (Özçelik 2003).

3.7.2 Amino asit derişimleri

L-fenilalanin ve üretim ortamında bulunan diğer amino asitlerin derişimlerinin belirlenmesi için ters faz kromatografik yöntem ile ayırma yapan yüksek basınç sıvı kromatografı temelli Amino Asit Analiz Sistemi (AAAS, Waters) kullanılmıştır. Amino asit analizi için kolon öncesi türevlendirme gerektiren PICO-TAG yöntemi kullanılmıştır (Cohen 1983). Waters tarafından geliştirilmiş ve 32 amino asit ve amino asit türevinden oluşan karışımın analizine yönelik olan "Picofree Gradient Yöntemi" nin modifiye edilmesi ile geliştirilen "New-Pico Gradient Yöntemi" ile amino asit analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemde serbest amino asitler birinci basamakta Fenilizotiyosiyanat (PITC) ile tepkimeye sokularak feniltiyokarbomil amino asit (PTC-AA) türevleri elde edilmiştir. İkinci basamakta elde edilen amino asit türevleri AAAS'ne enjekte edilmiştir. Analizde iki farklı çözücü bir gradyen oluşturarak (Çizelge 3.5) kolondan geçmektedir. Elde edilen kromatogramlardan amino asit derişimleri,

amino asit standartları temel alınarak tek nokta kalibrasyonu ile hesaplanmıştır. Amino asitlerin analizi için aşağıda verilen koşullar kullanılmıştır:

Amino asit analiz sistemi işletim koşulları:

Kolon	: Amino asit analiz kolonu (Nova-Pak C18, Millipore)
Kolon boyutları	: 3.9 mm* 30 cm
Sistem	: Ters faz kromatografi
Hareketli faz akış hızı	: 1 ml dk ⁻¹
Kolon sıcaklığı	: 38 °C
Dedektör, dalga boyu ve duyarlılık:	UV/VIS, 254 nm, 0.05 AUFS
Enjeksiyon hacmi	: 4 µl
Analiz süresi	: 18 dk
Hareketli faz A bileşimi (h/h)	: % 6 Asetonitril, %94 Deiyonize su, %1.79 (a/h)
Sodyum asetat trihidrat, % 0.05 Trietil amin	
Hareketli faz B bileşimi (h/h)	: % 66,6 Asetonitril, %33,3 Deiyonize su

Çizelge 3.5 New-Pico yöntemi gradyen tablosu

t, dk	Akış hızı, ml dk ⁻¹	%A	%B
0.0	1.0	100.0	0.0
10.0	1.0	54.0	46.0
10.5	1.0	0.0	100.0
11.5	1.0	0.0	100.0
12.0	1.0	0.0	100.0
12.5	1.0	100.0	0.0
18.0	1.0	100.0	0.0

3.7.3 Protein derişimleri

L-fenilalanin üretiminde biyodönüşüm ortamına mikroorganizma tarafından salgılanan protein derişimleri kapiler elektroforez cihazı HPCE (Waters Quanta, 4000E) ile belirlenmiştir (Çalık et al.1998). Kapiler elektroforez cihazı ile analizin temeli elektrik

alan içerisindeki iyon ve yüklenmiş kolloidlerin farklı göç hızlarına sahip olmasından yararlanılmaktadır. Taşıyıcı faz, çift tuz Z1-Metil (Waters) içeren 100 mM'lık borat tamponudur; çift tuz kapiler yüzeyine protein adsorpsiyonunu azaltmak için kullanılmıştır. Proteinlerin analizi için belirlenen koşullar aşağıda verilmiştir:

Kapiler elektroforez işletim koşulları:

Kolon	: Silika (SiO ₂) kaplı kapiler kolon
Kolon boyutları	: 60 cm*75 µm
Güç Kaynağı	: Pozitif
İşletme Voltajı	: 12 kV
Enjeksiyon türü	: Hidrostatik basınç
Enjeksiyon hacmi	: 10 µl
Enjeksiyon süresi	: 30 s
Analiz sıcaklığı	: 15 °C
Kullanılan Tampon:	Modifiye Borat tamponu pH=10
Dedektör, dalga boyu:	UV, 214 nm
Analiz süresi	30 dk

3.7.4 Organik asit derişimleri

Sıvı ortamda bulunan organik asitlerin derişimlerinin belirlenmesi için yüksek basınç sıvı kromatografi (Waters, Alliance 2695, Organik Asit Analiz Sistemi) kullanılmıştır. Organik asit derişimleri, derişimleri bilinen örneklerin analiz edilmesi sonucu elde edilen kromatogramlar yardımı ile hesaplanmıştır. Organik asitlerin analizi için aşağıda verilen koşullar kullanılmıştır (İleri 2004):

Organik asit analiz sistemi işletim koşulları:

Kolon	: Capital Optimal ODS, 5 µm
Kolon boyutları	: 4.6 mm*250 mm
Sistem	: Ters faz kromatografi
Hareketli faz akış hızı:	0.8 cm ³ /dk

Kolon sıcaklığı : 30 °C

Dedektör, dalga boyu ve duyarlılık: Waters 2487 Dual absorbans dedektör, 254 nm

Enjeksiyon hacmi : 5 µl

Analiz süresi : 15 dk

Hareketli faz bileşimi: %3.6 (NH₄)₂HPO₄

3.7.5 Glukoz derişimi (DNS Yöntemi)

İndirgenmiş şeker olan glukoz derişim DNS (dinitrosalisilik asit) yöntemi ile ölçülmüştür (Miller 1959). Bunun için önce derişimi bilinen miktarlarda glukoz içeren ortamlar kullanılarak kalibrasyon eğrisi hazırlanmıştır. Oluşturulan kalibrasyon eğrisi Ek 5, DNS çözeltisi hazırlama yöntemi ise Ek 3’de verilmiştir. Kalibrasyon eğrisinin ve örneklerin analizinde kullanılan yöntem aşağıda verilmiştir:

1. Farklı derişimlerdeki glukoz içeren ortamlardan 1 cm³ alınarak üzerine 3 cm³ DNS çözeltisi eklenir.
2. Karışım 5 dk kaynayan su banyosunda tutulduktan sonra 5 dk buz banyosunda bekletilir.
3. İndirgenmiş şeker içermeyen ve aynı basamaklardan geçen çözelti ile UV-spektrofotometre (Shimadzu UV-160A) sıfır ayarı yapılır; çözeltilerin absorbansları en uygun dalga boyu olarak seçilen 550 nm’de ölçülür.

3.8 Sıvı faz kütle aktarım katsayısının ve oksijen tüketim hızının belirlenmesi

Pilot ölçekte L-fenilalanin üretim prosesi boyunca sıvı faz hacimsel kütle aktarım katsayısı ve oksijen tüketim hızı ‘Dinamik Yöntem’ ile belirlenmiştir. Yöntem, dinamik koşullarda oksijen için kurulan kütle korunum denklemi yorumlanarak, reaktöre gönderilen havanın kesilmesi ve bir oksijen elektrodu yardımıyla biyoteknik ortamındaki çözünmüş oksijen derişimindeki azalmanın, daha sonra havanın sisteme tekrar verilmesi ile oksijen derişimindeki artışın zamanla ölçülmesi prensibine dayanmaktadır (Bandyopadhyay and Humprey 1967, Çalık vd 2000a).

Biyoreaktör ortamına ön-sıvı ortamından aşı yapılamadan önce fiziksel oksijen aktarım katsayısı; aşılama yapıldıktan sonra ise kimyasal tepkimeli oksijen aktarım katsayısı belirlenmiştir. Yatışkın olmayan koşulda, kesikli biyoreaktörlerde sıvı faz için kütle korunum denklemi kurulur (Denklem 3.1). Yöntemde şekilde çok kısa süreli olarak biyoreaktöre beslenen hava mikroorganizmanın biyolojik faaliyetlerini etkilemeyecek şekilde kesilmiş; yüzey havalandırma etkisini azaltmak amacıyla karıştırma hızı $N=150 \text{ dk}^{-1}$ olarak ayarlanmıştır. Zamanla biyoproses ortamında çözünmüş oksijen derişiminde azalma gözlenir. Burada oksijen katraımı gerçekleşmediğinden $K_L a(C_0^* - C_0)$ terimi sıfıra eşittir ve denklem 3.1 denklem 3.2'ye indirgenir. Denklem 3.2 'in düzenlenmesi ile Şekil 3.3'de gösterildiği şekilde $((dC_0/dt - r_0), C_0)$ grafiğinin eğiminden $K_L a$ değeri hesaplanmıştır.

$$K_L a(C_0^* - C_0) + r_0''' C_x = \frac{dC_0}{dt} \quad (3.1)$$

$$\frac{dC_0}{dt} = r_0 \quad (3.2)$$

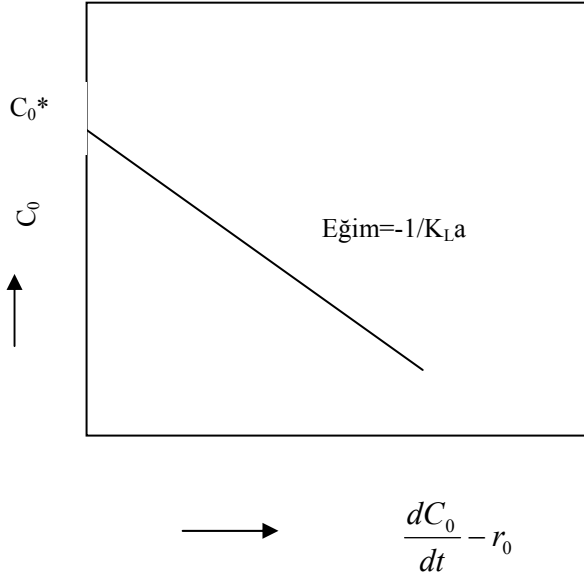
Denklem 3.2'den oksijen tüketim hızı $-r_0$; denklem 3.3'den ise birim hücre kütlesi başına oksijen tüketim hızı $-r_0'''$ bulunabilir.

$$r_0 = r_0''' C_x \quad (3.3)$$

Sisteme tekrar hava gönderilmesi ile çözünmüş oksijen derişiminin zamanla artışı gözlenir. Bu durumda denklem 3.1 geçerlidir. Denklem 3.1 ve 3.2 'den yararlanılarak,

$$\{ (dC_0 / dt - r_0), C_0 \}$$

grafiği elde edilir (Şekil 3.3); grafiğin eğiminden $K_L a$ hesaplanır. Çözünmüş oksijen derişim değerleri yüzde olarak belirlendiğinden doygunluk çözünmüş oksijen derişim değeri 0,2 olarak belirlenmiş ve bu katsayı ile çarpılarak çözünmüş oksijen değerine ($\text{mmol/m}^3\text{st}$) geçilmiştir.



Şekil 3.3 Dinamik yöntem ile sıvı faz hacımsal kütle aktarım katsayısının belirlenmesi

3.9 Metabolik Akı Analizi için Hücre-İçi Tepkime Sistemi

Çalık (1998)'ın *Bacillus licheniformis*, daha sonra Çalık ve Özdamar (2002)'ın *Bacillus subtilis* için geliştirdiği, hücreiçi tepkime sistemini tanımlayan (Çizelge 2.7) 149 tepkimeden oluşan 109 metabolit içeren model bu araştırmada kullanılmıştır. Ancak, ardışık aromatik amino asit yolizi tepkimelerden toplam şeklinde yazılan ilk iki ardışık tepkime bölünerek model amaç doğrultusunda geliştirilmiş ve aşağıda verilmiştir:

Glikoliz ve Glikoneogenesisiz Yoliz

1. $\text{Glc} + \text{PEP} \rightarrow \text{G6P} + \text{Pyr}$
2. $\text{Fructose} + \text{PEP} \rightarrow \text{F6P} + \text{Pyr}$
3. $\text{G6P} \rightarrow \text{F6P}$
4. $\text{F6P} \rightarrow \text{G6P}$
5. $\text{F6P} + \text{ATP} \rightarrow 2 \text{T3P} + \text{ADP}$

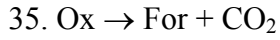
6. $2 \text{ T3P} \rightarrow \text{F6P} + \text{Pi}$
7. $\text{T3P} + \text{ADP} + \text{Pi} \rightarrow \text{PG3} + \text{ATP} + \text{NADH}$
8. $\text{PG3} + \text{ATP} + \text{NADH} \rightarrow \text{T3P} + \text{ADP} + \text{Pi}$
9. $\text{PG3} \rightarrow \text{PEP}$
10. $\text{PEP} \rightarrow \text{PG3}$
11. $\text{PEP} + \text{ADP} \rightarrow \text{Pyr} + \text{ATP}$
12. $\text{Pyr} + 2 \text{ ATP} \rightarrow \text{PEP} + 2 \text{ ADP}$
13. $\text{Pyr} \rightarrow \text{AcCoA} + \text{CO}_2 + \text{NADH}$

Pentoz Fosfat Yolizi

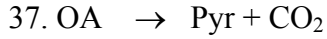
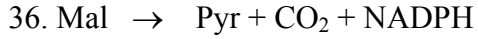
14. $\text{G6P} \rightarrow \text{Gluc6P} + \text{NADPH}$
15. $\text{Gluc6P} \rightarrow \text{R5P} + \text{NADPH} + \text{CO}_2$
16. $\text{R5P} \rightarrow \text{Xyl5P}$
17. $\text{Xyl5P} \rightarrow \text{R5P}$
18. $\text{R5P} \rightarrow \text{Rib5P}$
19. $\text{Rib5P} \rightarrow \text{R5P}$
20. $\text{Xyl5P} + \text{Rib5P} \rightarrow \text{S7P} + \text{T3P}$
21. $\text{S7P} + \text{T3P} \rightarrow \text{Xyl5P} + \text{Rib5P}$
22. $\text{Xyl5P} + \text{E4P} \rightarrow \text{F6P} + \text{T3P}$
23. $\text{F6P} + \text{T3P} \rightarrow \text{Xyl5P} + \text{E4P}$
24. $\text{T3P} + \text{S7P} \rightarrow \text{F6P} + \text{E4P}$
25. $\text{F6P} + \text{E4P} \rightarrow \text{T3P} + \text{S7P}$

Glikoliz yolizinden ayrılan tepkimeler

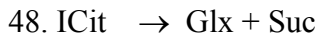
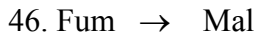
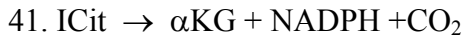
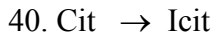
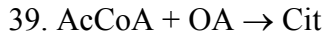
26. $\text{Glc} + \text{NADH} \rightarrow \text{D-Glc 1,5 Lactone}$
27. $\text{D-Glc 1,5 Lactone} \rightarrow \text{Glc}$
28. $\text{Pyr} + \text{NADH} \rightarrow \text{Lac}$
29. $\text{Lac} \rightarrow \text{Pyr} + \text{NADH}$
30. $\text{AcCoA} + \text{ADP} + \text{Pi} \rightarrow \text{Ac} + \text{ATP}$
31. $\text{Ac} + \text{ATP} \rightarrow \text{AcCoA} + \text{ADP} + \text{Pi}$
32. $\text{Pyr} \rightarrow \text{For} + \text{CO}_2$



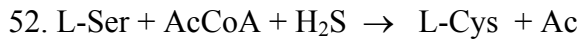
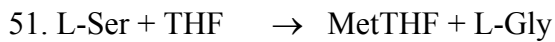
Anapleoritik Tepkimeler



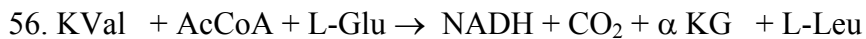
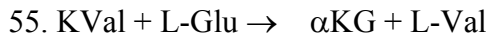
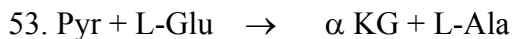
TCA Döngüsü



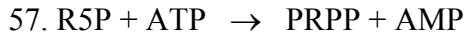
Serin Grubu Amino Asitlerin Biyosentezi



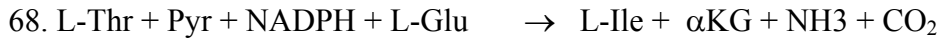
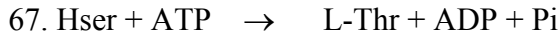
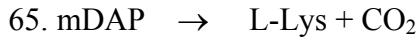
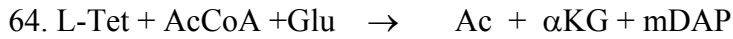
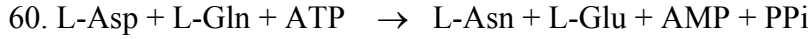
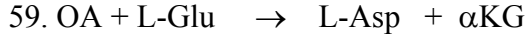
Alanin Grubu Amino Asitlerin Biyosentezi



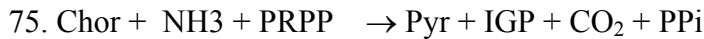
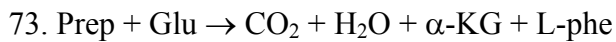
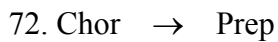
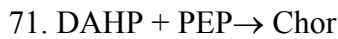
Histidin Biyosentezi



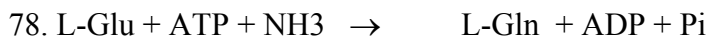
Aspartik Asit Grubu Amino Asitlerin Biyosentezi



Aromatik Amino Asitlerin Biyosentezi

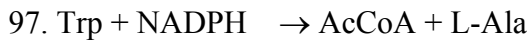
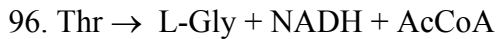
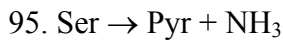
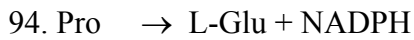
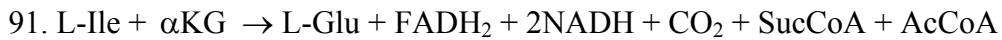
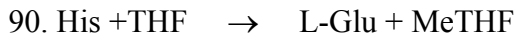
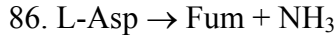
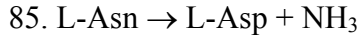
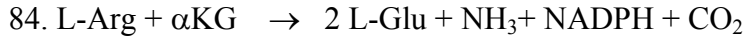
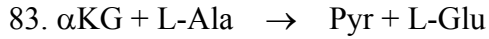


Glutamik Asit Grubu Amino Asitlerin Biyosentezi

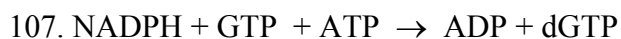
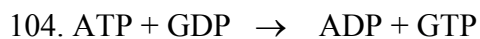
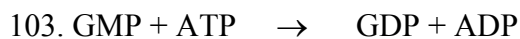
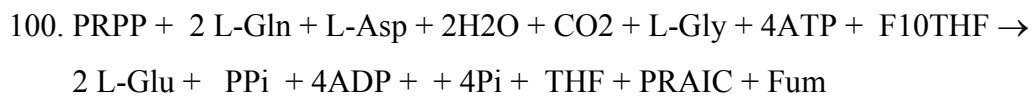




Amino Asitlerin Katabolizması



Nükleotitlerin Biyosentezi



108. $\text{IMP} + \text{GTP} + \text{L-Asp} \rightarrow \text{GDP} + \text{Pi} + \text{Fum} + \text{AMP}$
109. $\text{AMP} + \text{ATP} \rightarrow 2\text{ADP}$
110. $\text{PRPP} + \text{L-Asp} + \text{CaP} \rightarrow \text{UMP} + \text{NADH} + \text{PPi} + \text{Pi} + \text{CO}_2$
111. $\text{UMP} + \text{ATP} \rightarrow \text{UDP} + \text{ADP}$
112. $\text{UDP} + \text{ATP} \rightarrow \text{ADP} + \text{UTP}$
113. $\text{UTP} + \text{NH}_3 + \text{ATP} \rightarrow \text{CTP} + \text{ADP} + \text{Pi}$
114. $\text{ATP} + \text{NADPH} + \text{CDP} \rightarrow \text{dCTP} + \text{ADP}$
115. $\text{CDP} + \text{ATP} \rightarrow \text{CTP} + \text{ADP}$
116. $\text{CTP} + \text{ADP} \rightarrow \text{CDP} + \text{ATP}$
117. $\text{UDP} + \text{MetTHF} + 2\text{ATP} + \text{NADPH} \rightarrow \text{dTTP} + \text{DHF} + 2\text{ADP} + \text{Ppi}$

Kofaktörlerin Biyosentezi

118. $\text{DHF} + \text{NADPH} \rightarrow \text{THF}$
119. $\text{MetTHF} + \text{CO}_2 + \text{NH}_3 + \text{NADH} \rightarrow \text{L-Gly} + \text{THF}$
120. $\text{MetTHF} + \text{NADPH} \rightarrow \text{MTHF}$
121. $\text{MetTHF} \rightarrow \text{MeTHF} + \text{NADPH}$
122. $\text{MeTHF} \rightarrow \text{F10THF}$
123. $\text{Gly} + \text{THF} \rightarrow \text{MetTHF} + \text{NH}_3 + \text{NADH} + \text{CO}_2$

Hidrojen Transfer Reaksiyonları

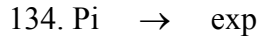
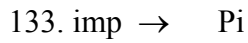
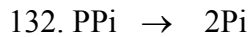
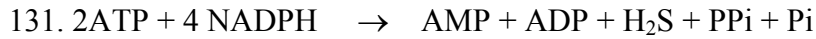
124. $\text{NADH} \rightarrow \text{NADPH}$
125. $\text{NADPH} \rightarrow \text{NADH}$

Elektron Taşıma Sistemi

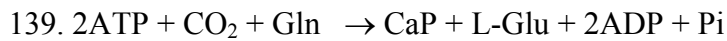
126. $\text{NADH} + 2\text{ADP} + 2\text{Pi} \rightarrow 2\text{ATP}$
127. $\text{FADH}_2 + \text{ADP} + \text{Pi} \rightarrow \text{ATP}$

Taşıma Tepkimeleri

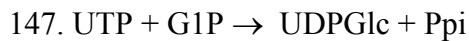
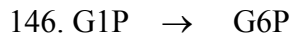
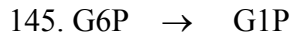
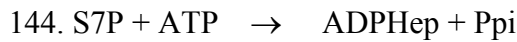
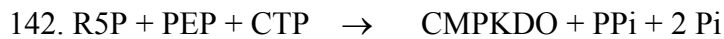
128. $\text{CO}_2 \rightarrow \text{exp}$
129. $\text{imp} \rightarrow \text{CO}_2$
130. $\text{imp} \rightarrow \text{NH}_3$



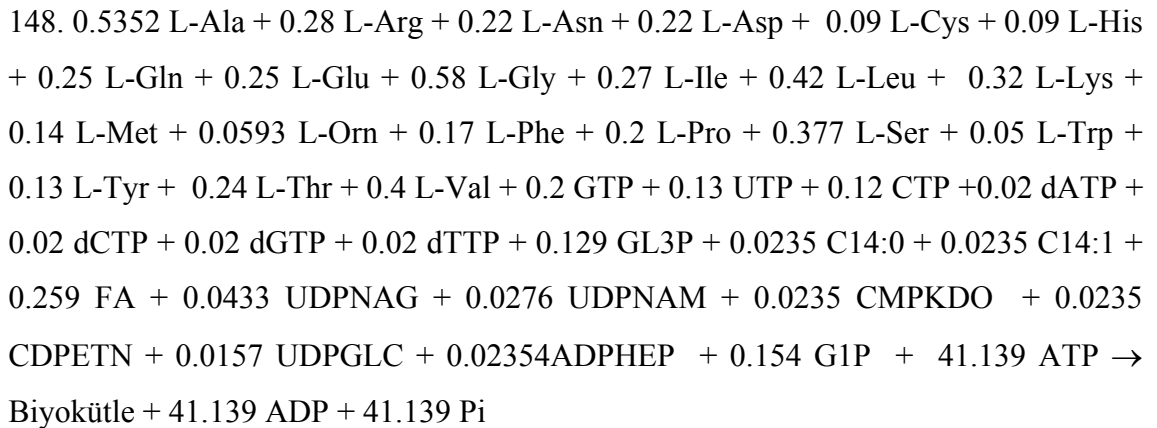
Yağ Asitlerinin ve Fosfolipidlerin Biyosentezi



Biyokütle Bileşenleri



Biyokütle sentezi



SAP sentezi

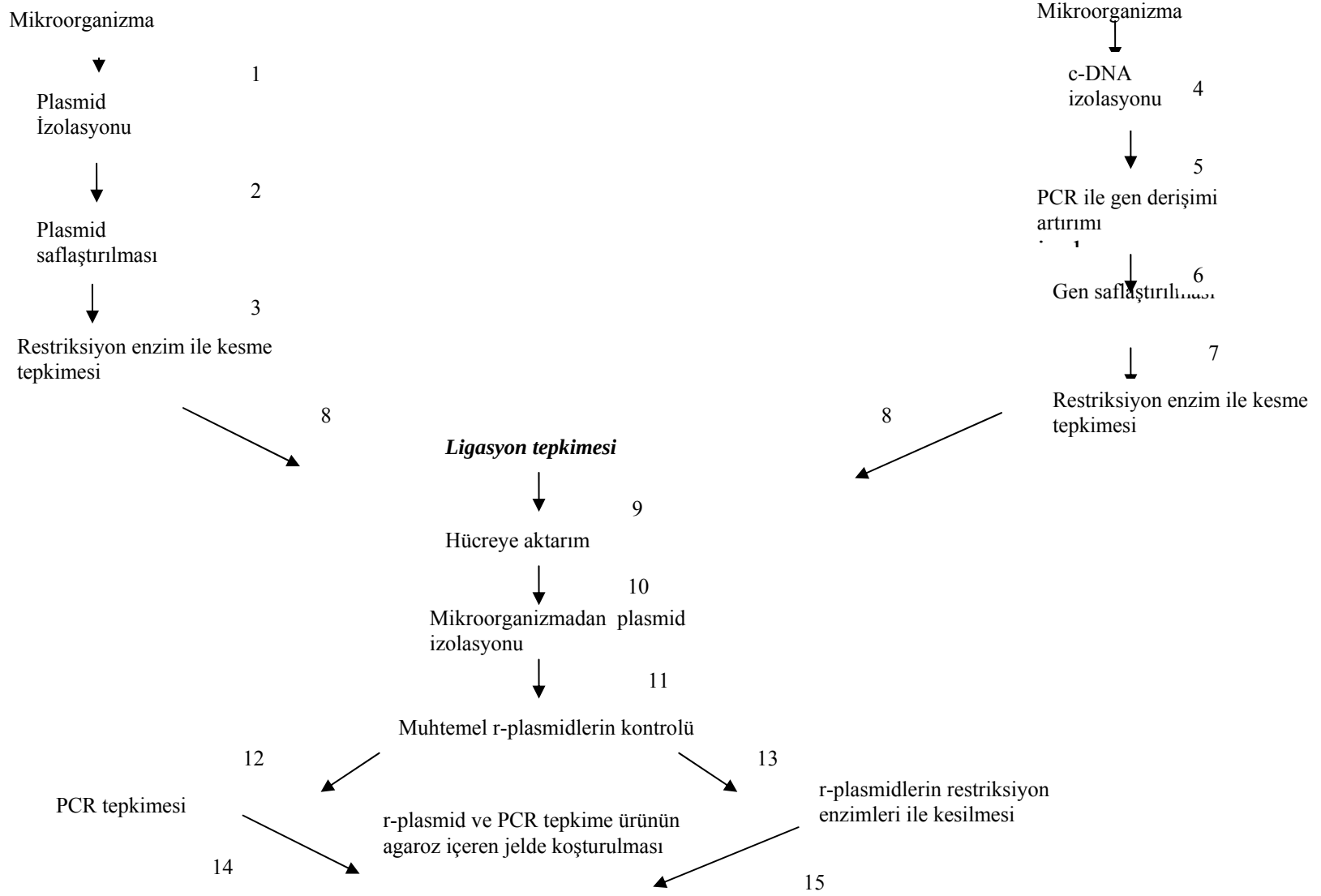
149. $0.127 \text{ L-Gly} + 0.0255 \text{ L-Gln} + 0.0182 \text{ Glu} + 0.0146 \text{ L-Phe} + 0.0474 \text{ L-Tyr} + 0.116 \text{ L-Ser} + 0.0036 \text{ L-Trp} + 0.0328 \text{ L-Asp} + 0.0657 \text{ L-Asn} + 0.0328 \text{ L-Lys} + 0.0182 \text{ L-Met} + 0.0729 \text{ L-Thr} + 0.0365 \text{ L-Ile} + 0.0365 \text{ L-Pro} + 0.0146 \text{ L-Arg} + 0.145 \text{ L-Ala} + 0.113 \text{ L-Val} + 0.0584 \text{ L-Leu} + 0.0182 \text{ L-His} + 5.5 \text{ ATP} \rightarrow \text{SAP} + 5.5 \text{ ADP} + 5.5 \text{ Pi}$

Yaşam

150. $\text{ATP} \rightarrow \text{ADP} + \text{Pi}$

3.10 Rekombinant *Bacillus* Türü Geliştirilmesinde Kullanılan Genetik Mühendisliği Teknikleri

Rekombinant *Bacillus* türü mikroorganizma geliştirilmesinde izlenen adımlar algoritma olarak Şekil 3.4’de verilmiştir. Hedef genlerin ilk aşama da pUC19 plasmidine klonlanabilmesi için 15 basamak kullanılır. Bu aşamadan sonra pMK4 plasmidine ligasyon tepkimesi algoritma modifiye edilerek gerçekleştirilir. Dört numaralı basamakta hedef genin c-DNA’dan izolasyonu yerine 15. basamakta restriksiyon enzimleri ile kesilen r-pUC19’dan ekstrakte edilerek 8. basamak olan ligasyon tepkimesi gerçekleştirilir. 8. basamaktan sonra algoritma aynı şekilde devam etmektedir



3.10.1 Enzimler, Markerlar , Kitler

L-fenilalanin üretimi için rekombinant *Bacillus* türü geliştirmede polimeraz zincir tepkimelerinin ve ligasyon tepkimelerinin katalizörü olan Taq DNA polimeraz ve T4 DNA ligaz, RNAaz, dNTP, ATP, hedef genin plasmide klonlanabilmesi için kullanılan *SaII*, CIAP restriksiyon enzimleri ve tamponları ile jel elektroforez görüntülerinde kullanılan λ DNA *HindIII*, 100 bp DNA Ladder plus markerları MBI Fermentas (Litvanya) firmasından satın alınmıştır.

3.10.2 Kromozomal DNA izolasyonu

Kromozomal DNA 'nın *Bacillus subtilis* NRRL-NRS 1315 'den izolasyonu için aşağıdaki yöntem uygulanmıştır:

1. *B.subtilis* NRRL-NRS 1315 katı ortamdan 30 ml hacımlı LB ortamına (Ek 1) aktarılmış ve 30°C 'da 12 st (bir gece) çoğaltılmıştır.
2. Hücrelerin çoğaldıkları ortam 3000g 'de 10 dk santrifüjlenmiş, sıvı atıldıktan sonra hücreler 5 ml SET tamponu (Ek 1) içinde tekrar süspansiyon haline getirilmiştir.
3. Son derişimi 1 mg/ml olacak şekilde ortama lizozim enzimi eklenmiş ve 37°C 'da 60 dk süreyle tepkime gerçekleştirilerek hücre duvarı parçalanmıştır.
4. 1/10 hacim oranında ortama %10 'luk SDS eklenmiş ve hemen ardından derişimi 0.5 mg/ml olacak şekilde proteinaz-K eklenmiş ve iki saat süreyle -arasıra çalkalayarak- 4°C 'da tepkime gerçekleştirilmiştir.
5. Çözelti hacminin 1/3'ü kadar 5M NaCl; sonra çözelti hacmi kadar kloroform eklenmiş ve tepkime oda sıcaklığında 30 dk süreyle karıştırılarak gerçekleştirilmiştir.
6. İki fazlı karışım 4500g'de 15dk santrifüjlenmiş ve sulu faz Pasteur pipetiyle tüpe alınmıştır.
7. Sulu fazdaki kromozomal DNA üzerine hacmi kadar izopropanol eklenmiş; süspansiyon 4500g 'de 15dk santrifüjlenmiştir. DNA %70 'lik EtOH ile yıkanmış ve

vakum altında kurutulmuştur. DNA uygun miktarda TE tamponu (Ek 1) içinde çözülmüş ve -20°C 'da saklanmıştır (Posprech ve Neumann 1995) .

3.10.3 Gen derişiminin belirlenmesi

DNA moleküllerinin ayrılmasında jel elektroforez, jel oluşturma maddesi olarak agaroz; jel çözeltisi olarak TBE tamponu (EK 1) kullanılmıştır. Agaroz derişimi 1.0-1.7 (a/h) arasında amaca göre değişmiştir. Jel elektroforezin işletim voltajı 100V'tur. Bu işlemde sonra jel 20-50µl EtBr (10mg/ml) ile boyanarak UV ışığı altında fotoğrafı çekilmiş ve işaretleyiciden yararlanılarak her bandın derişimi UVP (UVP Bioluminescence System) sisteminden yararlanılarak hesaplanmıştır.

3.10.4 PCR cihazıyla gen derişiminin artırılması

PCR cihazıyla gen derişiminin artırılabilmesi için ilk olarak gerekli primer tasarımları yapılmıştır ve bir bilgisayar programı (NAR) yardımıyla primerlerin yapıları kontrol edilmiş ve bazı fizikokimyasal özellikleri belirlenmiştir. *aroA* gen derişiminin artırılabilmesi için bir adet ileri bir adet geri olmak üzere iki adet primer tasarlanmıştır. Primer dizinleri Çizelge 3.6'da verilmiştir. Primer tasarımı yapılırken; plasmide klonlanabilmesi için ileri ve geri primerlere *SalI* restriksiyon enzim konumu eklenmiştir. PCR tepkimeleri için kullanılan girdilerin derişimleri ve PCR sistemi işletme koşulları Çizelge 3.7-3.8'de verilmiştir.

Çizelge 3.6 *aroA* geni sentezi için tasarlanan primerlerin nükleik asit dizinleri

Primerin Adı	Gen Nükleotit Dizini	Gen
<i>SalI</i> İleri Primer	5'_ GCGTCGACGTAAAAACCCTTGAACATTGC_3'	<i>aroA</i>
<i>SalI</i> Geri Primer	5'_ CGCGTCGACAAAGCATAAAAAAGGCCG_3'	<i>aroA</i>

Çizelge 3.7 Polimeraz zincir tepkimesi (PCR) için tepkime bileşimi

10X PCR Tamponu with MgSO ₄	5µl
--	-----

dNTPler (1mM)	10µl
İleri Primer (FP) (10µM)	1µl
Geri Primer (RP) (10µM)	1µl
Template DNA	2µl
dH ₂ O	30.5µl
Taq DNA polimeraz (5U/µL)	0.5µl

Çizelge 3.8 PCR sistemi işletim programı

1.	1 DÖNGÜ:	$T=94^{\circ}\text{C}, t=2 \text{ dk}$
2.	30 DÖNGÜ:	$T_1=94^{\circ}\text{C}, t_1=1 \text{ dk}$ $T_2=60^{\circ}\text{C}, t_2=1 \text{ dk}$ $T_3=72^{\circ}\text{C}, t_3=90 \text{ s}$
3.	1 DÖNGÜ:	$T_1=72^{\circ}\text{C}, t_1=5 \text{ dk}$ $T_2=4^{\circ}\text{C}, t_2=5 \text{ dk}$

3.10.5 Ligasyon tepkimesiyle klonlama

Ligasyon tepkimelerinde **yapışkan uçlu (sticky end) DNA** parçası -gen (insert)- ve vektör kullanıldığında **gen (insert)/vektör molar oranının 3-5** olması uygundur. Ligasyon tepkimeleri aşağıda verilen koşullarda gerçekleştirilmiştir:

Çizelge 3.9 Ligasyon tepkimesi için tepkime bileşimi

Gen (Insert) DNA	~60-200 ng
-------------------	------------

Vektör DNA	~10-60 ng
Ligasyon tamponu (ATP içeren)	2µl
T4 DNA ligaz	0.5-4U
dH ₂ O	<i>Gen + vektör sulu çözeltisi V_R= 20 µl 'ye tamamlanır.</i>
Mikroreaktör hacmi	V _R = 20 µl
Mikroreaktör sıcaklığı	T=22°C
Kalma süresi	t= 16 st

3.10.6 Restriksiyon enzimleri ile kesme tepkimesi

Ligasyon tepkimesi için gen ve plasmid, gen için tasarlanan primer yapısındaki restriksiyon enzim(ler) ile T=37°C’de 2 st tepkime süresinde V_{rxn}=20 µl olacak şekilde restriksiyon enzim katalizörlüğünde kesilmektedir. Restriksiyon enzimi ile kesme tepkimesi aşağıda verilen koşullarda gerçekleştirilmiştir. Tepkime sonrası tepkime karışımı T=65°C’de 20 dk bekletilerek restriksiyon enzimi deaktive edilir.

Çizelge 3.10 *SaII* restriksiyon enzimi ile kesme tepkimesi bileşimi

Bileşen	Miktar
Gen/Plasmid	~ 45-200 ng
<i>SaII</i> (10U/ µl)	2.5 µl
1X Buffer <i>SaII</i>	2 µl
dH ₂ O	<i>Gen + vektör sulu çözeltisi V_R= 20 µl 'ye tamamlanır.</i>

Vektörün (plasmid) aynı restriksiyon enzimi veya küt-uç kesme gerçekleştiren bir restriksiyon enzimi ile kesildiğinde kesilen uçlarının klonlama tepkimesi sırasında birbirine tekrar bağlanmaması için, vektör alkali fosfataz enzimiyle T=37°C’de 2 st tepkime süresinde aşağıdaki koşullarda tepkimeye sokulmuş ve vektör ucunda klonlama için gerekli fosfat grupları vektörden uzaklaştırılmış; tepkime tamamlandıktan sonra alkali fosfataz enziminin yapısının bozunması için T=85 °C ’da 15 dk bekletilmiştir.

Çizelge 3.11 Plasmidin fosfat uçlarının giderilmesi için tepkime bileşimi

Bileşen	Miktar
<i>SalI</i> + pUC19 tepkime karışımı	20 µl
Alkali fosfataz tamponu	5 µl
Alkali fosfataz (0.1U/µl)	1 µl
dH ₂ O	<i>Gen + vektör sulu çözeltisi V_R = 50 µl 'ye tamamlanır.</i>

3.10.6 DNA dizin analizi

aroA geninin nükleotit dizini DNA dizin analiz cihazında (Microsynth GmBH, İsviçre) analizlenmiştir. *aroA* taşıyan rekombinant plasmidin dizin analizi için tasarlanan ileri ve geri primerler kullanılmıştır.

3.10.7 Plasmid DNA'nın *E.coli*'ye CaCl₂ yöntemiyle transferi

Klonlama işleminden sonra geni taşıyan plasmid DNA *E.coli* 'ye aşağıda verilen CaCl₂ yöntemi ile aktarılmıştır.

3.10.7.1 CaCl₂ Yöntemi

1. *E.coli* LBA katı ortamında, 37°C de bir gece (~ 12 saat) çoğaltılmıştır.
2. Katı ortamdan 5 ml hacimli LB ortamına aktarılmış ve 37°C'da bir gece daha inkübe edilmiştir.
3. LB ortamında çoğaltılan hücrelerden 1 ml alınarak 100 ml'lik yeni LB ortamına aktarılmış ve 37°C sıcaklıkta 4 st 250 dk⁻¹'da üstel çoğalma fazı başına kadar tekrar çoğaltılmıştır.
4. Çoğalan hücreler steril, soğuk 100 ml'lik santrifüj tüplerine konulmuş ve tüpler buz üzerinde 10 dk tutularak 0°C 'a soğutulması sağlanmıştır.
5. Hücreler 4000g'de, 4°C'da 10 dk santrifüjlenerek çöktürülmüştür.

6. Sıvı kısım atılmış; çöken hücreler santrifüj tüpünün kağıt havlu üzerinde ters çevrilerek 1 dk kurutulmuştur.
7. Hücreler 10 ml, 0,1 M CaCl_2 ile süspansiyon haline getirilmiş ve buzda bekletilmiştir.
8. Süspansiyon 4000g'de, 4°C'da 10 dk santrifüjlenerek hücreler tekrar çöktürülmüştür.
9. Sıvı kısım dökülmüş ve hücreler santrifüj tüpünün kağıt havlu üzerinde ters çevrilerek 1 dk kurutulmuştur.
10. Çöken hücreler 4 ml, 0,1 M CaCl_2 içinde tekrar süspansiyon haline getirilmiş ve buzda bekletilmiştir.
11. Mikropipetle 200 μl süspansiyon Eppendorf tüpüne alınmış ve tüpe DNA (10 ml hacminde 50 ng'dan fazla olmayacak şekilde) eklenmiş, yavaş yavaş aşağı yukarı çevrilerek karıştırılmış ve 30 dk buzda bekletilmiştir.
12. Daha sonra tüpler 42°C'daki su banyosuna alınarak 90 saniye bekletilmiş ve ısı şokuyla plasmid DNA'nın hücreye transferi sağlanmıştır. Bundan sonra tüpler hızlı bir şekilde buz banyosuna alınmış ve 1-2 dk hücrelerin çökmesi için beklenmiştir.
13. Her tüpe 800 μl LB çözeltisi eklenmiş ve 37°C'da, 45 dk su banyosunda inkübe edildikten sonra LBA ve seçici antibiyotiği içeren petri kaplarının her birine uygun hacimde (~250 μl) aktarılmıştır (Sambrook 1995).

3.10.8 *E.coli*'den plasmid DNA izolasyonu

1. 12 st (bir gece) LB ortamında çoğaltılmış hücreler, 12.000 g 'de 30 s santrifüjlenmiştir.
2. Berrak kısım atıldıktan sonra hücrelerin üzerine çoğaltılmış hücrelerden 1ml tekrar eklenmiş ve önceki basamaktaki gibi tekrar santrifüjlenmiştir.
3. Berrak kısım tekrar atılmış ve hücreler üzerinde kalan az miktardaki sıvı da mikropipetler yardımıyla alınmış; hücreler buz üzerine yerleştirilmiştir.
4. Hücreler 4°C sıcaklığındaki, 100 μl Çözelti I (EK 1) ile tekrar süspansiyon haline getirilmiştir.
5. Üzerine 200 μl yeni hazırlanmış Çözelti II (EK 1) eklenmiş; eppendorf tüpü ara sıra aşağı-yukarı çevrilerek 5 dk karıştırılmıştır.

6. Üzerine 150 µl 4°C sıcaklığında Çözelti III (EK 1) eklenmiş ve 5dk buz içerisinde bekletilmiştir.
7. 12.000g 'de, 4°C 'da 5 dk santrifüjlenmiş; berrak kısım temiz bir tüpe alınmıştır.
8. Berrak çözelti hacminin 0.1 hacmi kadar 3M NaAc ve 2 katı kadar saf EtOH eklenmiş ve -20°C 'da 10 dk bekletilmiştir.
9. Plasmid DNA 12000g 'de, 4°C 'da 5 dk santrifüjlenerek çöktürülmüştür.
10. Berrak kısım dökülmüş ve çöken plasmid DNA vakum altında kurutulmuştur.
11. Kuruyan pellet amaca göre ya 100 µl TE tamponu (EK 1) (pH=8) veya dH₂O ile çözülmüş ve -20°C 'da saklanmıştır (Sambrook 1995).

3.10.9 DNA'nın agaroz jelden ekstraksiyonu

Jelde ayrılan gen parçalarından klonlama tepkimesinde kullanılacak olan jelden kesilerek alınmış ve sonra da Fermentas DNA Ekstraksiyon Kit ile ekstrakte edilmiştir. Bu yöntemle göre; öncelikle istenen DNA molekülünü içeren jel parçası uygun çözeltilerle karıştırılarak 55°C'de çözülür. Daha sonra çözeltiye geçen DNA molekülü ortama eklenen toz halindeki silika partiküllerine adsorplanır. DNA moleküllerini taşıyan silika tozları yıkanır ve sonra da 55°C desorpsiyon işlemi gerçekleştirildiğinde klonlama tepkimesinde kullanılacak DNA molekülleri saf olarak elde edilir.

3.10.10 Elektroporasyonla plasmid DNA'nın *Bacillus* türlerine transferi

Hedef geni taşıyan *E.coli-Bacillus* shuttle vektörü *Bacillus subtilis* NRRL-1315'e aşağıda açıklanan elektroporasyon ve doğal transformasyon yöntemleriyle aktarılmıştır. Doğal transformasyon yönteminin elektroporasyondan tek farkı elektrik şoku uygulanmamasıdır.

Eppendorf Elektroporasyon Yöntemi (*B.subtilis* 'in transformasyonu)

Elektrokompetent hücrelerin hazırlanması :

1. Hücreler 5ml'lik LB sıvıda 37°C ve 180 rpm koşullarında 1 gece çoğaltılırlar.
2. 5 ml'lik LB sıvıda çoğaltılan mikroorganizmanın 250 µl 'si 50 ml'lik LB sıvı içeren yeni ortamlara aktarılır ve 1. basamaktaki ile aynı koşullarda 3 st çoğaltılır.

3. 4000 rpm ve +4°C'de 15 dk santrifüjlenerek ayrılan hücreler 1 mM HEPES (pH=7.0) tamponu ile iki kez yıkandıktan sonra soğuk elektroporasyon tamponu (%25 PEG ve 0.1M mannitol) ile de iki kez yıkanır. Yöntemin uygulandığı süreçte hücrelerin soğuk olması gerekir.
4. Hücreler başlangıç çoğalma ortamı hacminin 1/200'ü kadar hacımlı soğuk elektroporasyon tamponu ile süspansiyon haline getirilir ve +4°C'de 10 dk bekletilir.

Elektroporasyonla DNA'nın hücrelere aktarılması :

1. Elektroporasyon cihazı belirlenen voltaj değerine ayarlanır. Başlangıç voltaj değeri 16kV/cm olabilir (1mm'lik küvetler için 1600 V kullanılmıştır).
2. 40 µl elektrokompotent hücre içeren tüpe 2 µl plasmid DNA eklenir ve karıştırılır.
3. Hücre/DNA karışımı önceden soğutulmuş küvet içerisine konur ve küvetin dışı kurulandıktan sonra elektroporasyon cihazının küvet tutucusuna (holder) yerleştirilir.
4. Elektrik-pulse uygulanır ve hücrelerin 2-3 dk dinlenmesi için beklendikten sonra üzerine 0.5 ml LB sıvı eklenir ve 37°C'de 3 st bekletilir.
5. Uygun seçici antibiyotiği içeren LB agar üzerine yayılır ve 37°C'de inkübe edilir.

3.10.11 *Bacillus* 'tan miniprep plasmid DNA izolasyonu: alkali liziz yöntemi

Bacillus 'tan plasmid DNA izolasyonu aşağıda verilen yöntem kullanılarak yapılmıştır. Yöntem uygulanırken kullanılan çözeltilerin bileşimleri EK 2'de verilmiştir (Harwood and Cutting 1990).

1. Deney tüpü veya 25ml'lik erlenlerde bulunan, seçici antibiyotik içeren 2.5ml'lik LB sıvı-ortama plasmid DNA'nın izole edileceği mikroorganizmadan tek koloni aktarılır.
2. Mikroorganizma 37°C ve 200 rpm koşullarında bir gece çoğaltılır.
3. Çoğalan hücrelerin 1.2ml'si 10000 rpm ve oda sıcaklığında 1dk santrifüjlenir. Sıvı kısım dökülür ve kalan sıvının tamamı bir mikropipet yardımıyla uzaklaştırılır.
4. Hücreler 1.2ml TSE tamponu ile tekrar süspansiyon haline getirilerek yıkanır.

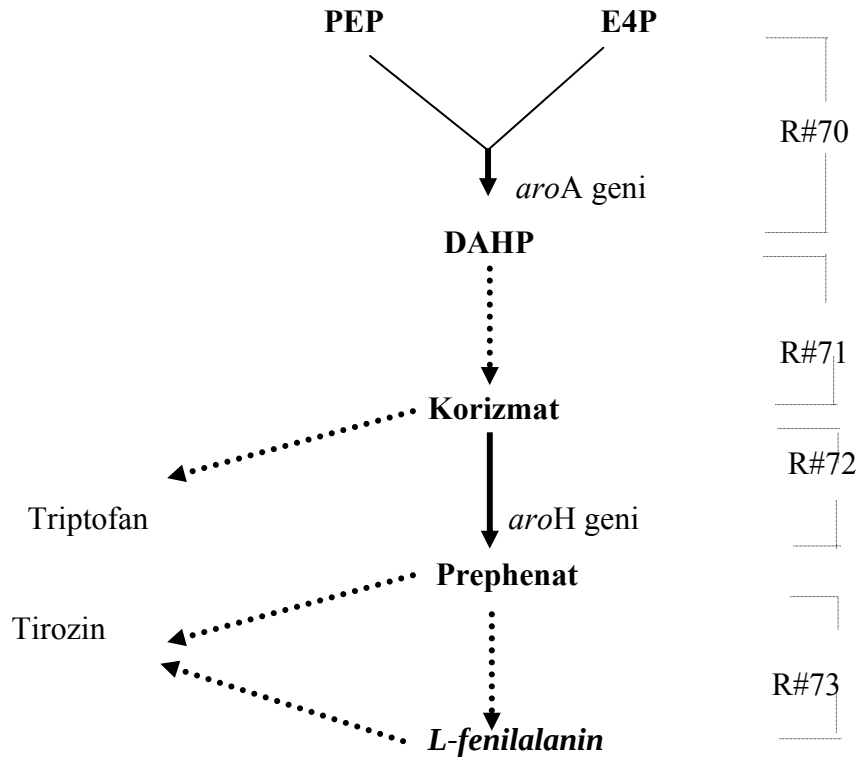
5. 3.basamak tekrarlanır.
6. Hücre pelleti 2mg/ml egg white lizozim içeren (kullanmadan hemen önce toz olarak eklenmiş) 500 µl Çözelti A ile süspansiyon haline getirilir.
7. 10 s vorteks işlemi ile homojenizasyondan sonra $T=37^{\circ}\text{C}$ 'de hücreler parçalanıncaya kadar (10-20 dk) inkübe edilir. Bu basamak kritiktir ve süspansiyon viskoz olmalıdır.
8. Karışım buz üzerine konur ve oda sıcaklığında bekletilen Çözelti-B'den 400 µl eklenir, 10s vorteks işlemi ile homojenizasyondan sonra 4 dk buz üzerinde bekletilir. Süspansiyon gerçekte berrak olmalıdır (Eğer berrak değilse vorteks işlem basamağı tekrarlanır) .
9. 300 µl Çözelti-C eklenir ve 10s vorteks işleminden sonra buz üzerinde 5 dk bekletilir.
10. 16000 rpm ve $+4^{\circ}\text{C}$ koşullarında 6 dk santrifüjlenir. Çökeltinin büyük kısmı dibe çöker, bir kısmı çözeltide kalır.
11. Sıvı kısmın ~ 600 µl'si 1ml'lik mikropipetle yeni ependorf tüpüne alınır.
12. 600 µl fenol/kloroform/izoamilalkol (25/24/1) karışımı eklenir, 10s vorteks uygulanır ve 1 dk sonra işlem tekrarlanır.
13. Fazları ayırmak için 16000 rpm ve $+4^{\circ}\text{C}$ koşullarında 6 dk santrifüjlenir.
14. ~ 500 µl sulu (üst) faz 1 ml'lik mikropipetle yeni tüpe alınır. Ara-faz ve alt-fazdan çekilmemesine dikkat edilir.
15. 500 µl Kloroform/izoamilalkol (24/1) eklenir, 5 s vorteks işleminden sonra 16000 rpm ve $+4^{\circ}\text{C}$ koşullarında 2 dk santrifüjlenerek fazlar ayrılır.
16. 14. basamaktaki gibi yaklaşık 450 µl'lik üst-faz yeni tüpe alınır.
17. 1 ml %96'lık etanol (oda sıcaklığında) eklenir, karıştırılır ve buz üzerinde 10 dk bekletilir.
18. 16000 rpm ve $+4^{\circ}\text{C}$ koşullarında 10 dk santrifüjlenerek DNA pellet haline getirilir.
19. Sıvı kısım 4. basamaktaki gibi uzaklaştırılır; pellete dokunulmamalıdır.
20. 1 ml %80'lık etanol eklenir. Genellikle DNA pelleti tüpün bir tarafında sabit kalır. Eğer kalmazsa ya da herhangi bir şüphe olursa, 1dk tekrar santrifüjlenir. Sıvı kısım 19. basamaktaki gibi uzaklaştırılır.
21. 20.basamak tekrarlanır.
22. Pellet vakumda kurutulur ve 25µl TE tamponunda çözülür.

23. 1 μ l Rnase eklenir ve 37°C’de 20 dk inkübe edilir. DNA –20°’de saklanır.

4. DENEY VE BULGULAR

4.1 Metabolik Mühendislik Araştırma Programı

Metabolik mühendislik araştırma programının amacı, araştırma grubumuzun daha önce yaptığı çalışmalarda (Özçelik 2003, Özçelik vd. 2004) belirlenen hız kısıtlayıcı tepkimelerin, aromatik grup amino asit yolizinin birinci tepkimesinin katalizörü DAHP sentetaz (EC 2.5.1.54) enzimini kodlayan *aroA* ile yolizindeki ardışık yedinci tepkimenin katalizörü korizmat mutaz (EC 5.4.99.5) enzimini kodlayan *aroH* geninin (Şekil 4.1), **iki-gen sistemi** klonlama stratejisiyle *B.subtilis*'te üretim için seçilecek plasmide klonlanmasıdır. İki-gen sistemini taşıyan rekombinant plasmid oluşturulması için alternatif metabolik mühendislik tasarımları yapılmıştır ve aşağıda sunulmuştur.



Şekil 4.1 Aromatik amino asit yolizi

4.1.1 İki-gen sistemi oluşturarak tasarım: Tasarım-I

aroA::aroH (=2452bp) iki-gen sisteminin oluşturulması; sonra *E.coli* plasmidi pUC19'a klonlanması, üçüncü basamakta da *E.coli- B.subtilis* shuttle plasmidi pMK4'e klonlanmasıdır. *aroA::aroH* (=2452bp) büyüklüğündeki iki-gen sistemi oluşturulmuş, ancak pUC19'a klonlama başarılı olmamıştır.

Tasarım-I'e göre yürütülen araştırma programının primer tasarımları ve *aroA::aroH* iki-gen sisteminin oluşturulması, gen değişiminin artırılması, *E.coli* ve *E.coli-Bacillus* plasmidlerine klonlama tepkimeleri, transformasyon deney ve bulguları aşağıda verilmiştir.

4.1.1.1 Primer tasarımı ve PCR ile gen değişiminin artırılması

DAHP sentetaz enzimini kodlayan *aroA* ve korizmat mutaz enzimini kodlayan *aroH* genlerinin nükleik asit dizinleri, *B. subtilis* için Institut Pasteur (Fransa) koordinasyonunda oluşturulan SubtiList'den (Fransa): <http://genolist.pasteur.fr/SubtiList/> adresinden alınmıştır (Şekil 4.2, 4.3).

tgtaa

aaaacccttgaacattgccctcacatcatgtaggtagc
ttcatagattactttatcacttaaaagcgtttgggtaat
aaagtagagtttttataaaaatttttgtatttcagtatt
tccatttgggaattactttatagtaagatgcatgataacta
caaaataaaaaatgaatgtgcagggaaaggatgaaaaaa
1 - atg agc aac aca gag tta gag ctt tta agg
31 - cag aaa gca gac gaa tta aac cta caa att
61 - tta aaa tta atc aac gaa cgc ggc aat gtt
91 - gta aaa gag atc ggt aaa gcg aag gaa gca
121 - cag ggt gtc aac cga ttt gac cct gtc aga
151 - gaa cgc aca atg tta aac aat atc att gaa
181 - aac aat gac ggg ccg ttc gaa aat tca acc
211 - atc cag cac att ttt aaa gag ata ttc aaa
241 - gcc ggt tta gag ctt cag gaa gaa gat cac
271 - agc aaa gcg ctg ctt gtc tcc cgc aag aaa
301 - aaa cct gaa gat aca att gtt gat atc aaa
331 - ggc gaa aaa atc gga gac ggc cag caa aga
361 - ttc att gtc ggc cca tgt gcg gta gag agc
391 - tat gag cag gta gct gaa gtc gct gca gct
421 - gcg aaa aaa caa ggg att aaa att ttg cgc
451 - ggt gga gcc ttt aag cct cgt acg agc cca
481 - tac gat ttc caa ggg ctt ggt gtt gaa ggc
511 - ctt caa att tta aaa cgt gta gcg gat gaa
541 - ttt gat ctg gcg gtt atc agt gaa atc gta
571 - act ccg gct cat atc gaa gaa gcg ctg gac
601 - tac att gat gtc att caa atc gga gcg cgc
631 - aac atg caa aac ttc gaa ttg ctg aaa gcg
661 - gcc ggc gcc gtg aaa aag cca gtg ctt ctg
691 - aag cgc ggt ctt gct gca acg atc tct gaa
721 - ttc atc aat gct gct gaa tac atc atg tca
751 - caa gga aat gac caa att atc ctt tgt gag
781 - cgc gga atc aga aca tat gaa aca gca acg
811 - aga aac acg ctg gat att tca gct gtg ccg
841 - att ttg aaa caa gaa acg cat ttg cca gtc
871 - ttt gtt gat gtt acg cat tca aca ggc cgc
901 - cgt gac ctc ttg ctt ccg aca gct aaa gcc
931 - gct tta gcg atc ggt gct gat ggc gta atg
961 - gct gag gtt cac cct gat ccg tca gtc gca
991 - ctt tct gac tct gct cag caa atg gcg att
1021 - cct gaa ttc gaa aaa tgg ctg aat gaa ctg
1051 - aag cca atg gtg aaa gtc aac gct
taattgaacaatccaaaaggccgctgcggccctttttt
tatgctttctcgtttatttagttataaaaaccaagtata
cgttttcatcatctataaaaacgtgtataatttcacgag
aagtaattaaatttgatgaataatgaaaaataatgtaca
ctactgacttacgcttacaa**atcataaacgacataaatt**
cggac

aroA FP + *SalI*: 5' _ **gcgtcgacgtaaaaaacccttgaacattgc** _ 3'

aroA RP + *aroH*: 5' **aaccaggttttgcgaatttatgtcgttatgat** 3'

Şekil 4.2 *aroA* geni için tasarlanan primerler ve nükleotit dizinleri

aaaag

cctgggttatccaagtcaaatacagaaaagagacggaac
ttcgggttctcttgaaccgtatgatgaatgataagaaaac
ccgtggcgggaagattcagtttattgtgctcaacgaatt
agggaaagtgtgctgatacatattttccagaaatgaact
tgagagctggctgaacaaatggcgattggaggagacatc
1 - atg atg att cgc gga att cgc gga gca act
31 - aca gtt gaa cgg gat act gaa gaa gaa att
61 - tta caa aaa act aaa cag ctg tta gag aaa
91 - atc ata gaa gaa aat cat aca aaa ccg gaa
121 - gat gtt gtt caa atg ctt ctg tcg gct aca
151 - cct gat ttg cac gct gtt ttc ccg gca aaa
181 - gct gtt cgc gag ctt tca gga tgg cag tat
211 - gta ccg gta aca tgt atg cag gaa atg gac
241 - gta aca ggc ggt ctg aaa aag tgc ata aga
271 - gtc atg atg acg gtc cag aca gat gtc cct
301 - cag gat cag atc aga cat gta tat tta gaa
331 - aaa gtt gtc gta ttg agg ccc gat tta tca
361 - ttg aca aaa aat act gaa ttg
taatacgataagaacagcttagaaatacacaagagtgtg
tataaagcaattagaatgagttgagttagagaataggg
agcagagaatgagtttagttgagctgagacattatgttt
attctacccaaaagaagtctttcttttgggtttatttgt
tatatagtattttatcctctcat**gccatcttctcattct**
ccttg

aroH FP+ *aroA*: 5' **ataaattcggacaaaagcctgggttatccaagt** 3'

aroH RP+*Bam*HI : 5' **ggggatccccaaggagaatgagaagatggc** 3'

Şekil 4.3 *aroH* geni için tasarlanan primerler ve nükleotit dizinleri

aroA ve *aroH* genleri 1. ve 2. PCR tepkimeleriyle $T_{\text{yapışma}}=60\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t_{\text{yapışma, }aroA}=180\text{ s}$
ve $t_{\text{yapışma, }aroH}=90\text{ s}$ 'de gen derişimleri artırılmıştır

1 ve 2. PCR tepkimeleri ile çoğaltılan *aroA* ve *aroH* genleri 3. PCR tepkimesi ile
 $T_{\text{yapışma}}=60\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t_{\text{yapışma, }aroA::aroH}=180\text{ s}$ PCR tepkimesi işletim koşullarında SOE
yöntemine göre birleştirilmiş ve 2452bp uzunluğunda *aroA::aroH* elde edilmiştir
(Çizelge 4.5).

aroA::aroH geni birinci aşamada *E.coli* plasmidi olan pUC19 ve *E.coli* –*Bacillus*
shuttle plasmid olan pMK4 ve pHV1431'lere farklı gen/plasmid ve gen, plasmid
derişimlerinde ligasyon tepkimeleri gerçekleştirilmiştir. Ligasyon tepkime ürünleri

E.coli XLI-Blue mikroorganizmasına CaCl₂ yöntemi ile transforme edilmiştir. Transformasyon sonucu oluşan kolonilerden plasmid izolasyonları sonucunda gen içeren plasmid elde edilememiştir. Bunun sonucu farklı parametreler değiştirilerek ligasyon tepkimeleri tekrar gerçekleştirilmiştir. İncelenen parametreler Çizelge 4.1’de özetlenmiştir.

Çizelge 4.1 *aroA::aroH* geninin pUC19 ve pMK4 plasmidlerine ligasyon tepkimesi

Plasmid	Ligasyon türü	Gen derişimi (G) (ng/μl)	Plasmid derişimi (V) (ng/μl)	G/V
pUC19	Yapışkan-uç	10.3	7.07	3 (60/20)
pUC19	Yapışkan-uç	10.3	7.07	3 (90/30)
pUC19	Yapışkan-uç	15.78	10.71	3 (72/24)
pUC19	Yapışkan-uç	15.78	10.71	3 (90/30)
pUC19	Küt-uç	15.78	10.71	3 (90/30)
pUC19	Yapışkan-uç	20.43	53.6	3 (120/40)
pUC19	Yapışkan-uç	20.43	7.07	5 (100/20)
pUC19	Yapışkan-uç	20.43	53.6	2 (80/40)
pUC19	Yapışkan-uç	20.43	53.6	3 (50/50)
pUC19	Yapışkan-uç	33.3	22.2	5 (100/20)
pUC19	Yapışkan-uç	33.3	22.2	3 (60/20)
pUC19	Yapışkan-uç	33.3	24	3 (144/48)
pUC19	Yapışkan-uç	33.3	24	5 (240/48)
pMK4	Yapışkan-uç	15.78	23.1	3 (72/24)
pMK4	Yapışkan-uç	15.78	23.1	3 (90/30)
pMK4	Küt-uç	15.78	23.1	3 (90/30)
pMK4	Yapışkan-uç	20.43	34.64	3 (60/20)
pMK4	Yapışkan-uç	20.43	34.64	3 (50/16.67)
pMK4	Yapışkan-uç	20.43	34.64	5 (100/20)
pMK4	Yapışkan-uç	20.43	34.64	5 (50/10)
pMK4	Yapışkan-uç	26.24	11.53	3 (90/30)
pMK4	Yapışkan-uç	26.24	11.53	3 (120/40)
pHV1431	Yapışkan-uç	20.43	12.1	5 (120/24)
pHV1431	Yapışkan-uç	20.43	12.1	5 (120/17.14)

4.1.2 İki-gen sistemi oluşturarak tasarım: Tasarım-II

aroA::aroH (=2252bp) iki-gen sisteminin oluşturulması; sonra *E.coli* plasmidi pUC19’a klonlanması, üçüncü basamakta da *E.coli*- *B.subtilis* shuttle plasmidi pMK4’e klonlanmasıdır. 2252bp büyüklüğündeki *aroA::aroH* iki-gen sistemi Tasarım-I’e kıyasla küçültüldüğü halde, pUC19’a klonlama başarılı olmamıştır.

Tasarım-II'ye göre yürütülen araştırma programının primer tasarımları ve *aroA::aroH* iki-gen sisteminin oluşturulması, gen derişiminin artırılması, *E.coli* ve *E.coli-Bacillus* plasmidlerine klonlama tepkimeleri, transformasyon deney ve bulguları aşağıda verilmiştir

4.1.2.1 Primer tasarımı ve PCR ile gen derişiminin artırılması

aroA ve *aroH* genlerinin nükleik asit dizinleri ve tasarlanan ileri ve geri primer dizinleri Şekil 4.4 ve 4.5'te verilmiştir.

tgtaa

aaaacccttgaacattgccctcacatcatgtaggatagc
ttcatagattactttatcacttaaaagcgtttgggtaat
aaagtagagtttttataaaaattttttgtatttcagtatt
tccatttgggaattacttatagtaagatgcatgataacta
caaaataaaaaatgaatgtgcagggaaaggatgaaaaaa
1 - atg agc aac aca gag tta gag ctt tta agg
31 - cag aaa gca gac gaa tta aac cta caa att
61 - tta aaa tta atc aac gaa cgc ggc aat gtt
91 - gta aaa gag atc ggt aaa gcg aag gaa gca
121 - cag ggt gtc aac cga ttt gac cct gtc aga
151 - gaa cgc aca atg tta aac aat atc att gaa
181 - aac aat gac ggg ccg ttc gaa aat tca acc
211 - atc cag cac att ttt aaa gag ata ttc aaa
241 - gcc ggt tta gag ctt cag gaa gaa gat cac
271 - agc aaa gcg ctg ctt gtc tcc cgc aag aaa
301 - aaa cct gaa gat aca att gtt gat atc aaa
331 - ggc gaa aaa atc gga gac ggc cag caa aga
361 - ttc att gtc ggc cca tgt gcg gta gag agc
391 - tat gag cag gta gct gaa gtc gct gca gct
421 - gcg aaa aaa caa ggg att aaa att ttg cgc
451 - ggt gga gcc ttt aag cct cgt acg agc cca
481 - tac gat ttc caa ggg ctt ggt gtt gaa ggc
511 - ctt caa att tta aaa cgt gta gcg gat gaa
541 - ttt gat ctg gcg gtt atc agt gaa atc gta
571 - act ccg gct cat atc gaa gaa gcg ctg gac
601 - tac att gat gtc att caa atc gga gcg cgc
631 - aac atg caa aac ttc gaa ttg ctg aaa gcg
661 - gcc ggc gcc gtg aaa aag cca gtg ctt ctg
691 - aag cgc ggt ctt gct gca acg atc tct gaa
721 - ttc atc aat gct gct gaa tac atc atg tca
751 - caa gga aat gac caa att atc ctt tgt gag
781 - cgc gga atc aga aca tat gaa aca gca acg
811 - aga aac acg ctg gat att tca gct gtg ccg
841 - att ttg aaa caa gaa acg cat ttg cca gtc
871 - ttt gtt gat gtt acg cat tca aca ggc cgc
901 - cgt gac ctc ttg ctt ccg aca gct aaa gcc
931 - gct tta gcg atc ggt gct gat ggc gta atg
961 - gct gag gtt cac cct gat ccg tca gtc gca
991 - ctt tct gac tct gct cag caa atg gcg att
1021 - cct gaa ttc gaa aaa tgg ctg aat gaa ctg
1051 - aag cca atg gtg aaa gtc aac gct
taattgaacaatccaaaag**gccgccgtgccc**ttttt
tatgctttctcgttttatttagttataaaaaccaagtata
cgttttcatcatctataaaaacgtgtataatttcagag
aagtaattaaatttgatgaataatgaaaaataatgtaca
ctactgacttacgcttacaaatcataaacgacataaatt
cggac

aroA FP + *SalI* : 5' **gcgtcgacgtaaaaaacccttgaacattgc** 3'

aroA RP + *aroH* : 5' **aaccaggtttgtccgaatttatgtcgttatgat** 3'

Şekil 4.4 *aroA* geni için tasarlanan primerler ve nükleotit dizinleri

aaaag

cctgggttatccaagtcaaatacagaaaagagacggaaaac
ttcggttctcttgaaccgtatgatgaatgataagaaaaac
ccgtggcgggaagattcagtttattgtgctcaacgaatt
agggaaagtgtgctgatacatattttccagaaatgaact
tgagagctggctgaacaaatggcgattggaggagacatc
1 - atg atg att cgc gga att cgc gga gca act
31 - aca gtt gaa cgg gat act gaa gaa gaa att
61 - tta caa aaa act aaa cag ctg tta gag aaa
91 - atc ata gaa gaa aat cat aca aaa ccg gaa
121 - gat gtt gtt caa atg ctt ctg tcg gct aca
151 - cct gat ttg cac gct gtt ttc ccg gca aaa
181 - gct gtt cgc gag ctt tca gga tgg cag tat
211 - gta ccg gta aca tgt atg cag gaa atg gac
241 - gta aca ggc ggt ctg aaa aag tgc ata aga
271 - gtc atg atg acg gtc cag aca gat gtc cct
301 - cag gat cag atc aga cat gta tat tta gaa
331 - aaa gtt gtc gta ttg agg ccc gat tta tca
361 - ttg aca aaa aat act gaa ttg
taatacgataagaacagcttagaaatacacaagagtgtg
tataaagcaattagaatgagttgagtttagagaatagggt
agcagagaatgagtttagttgagctgagacattatgttt
attctacccaaaagaagtctttcttttgggtttattttgt
tatatagtattttatcctctcatgccatcttctcattct
ccttg

aroH FP+ *aroA*: 5' **ataaattcggacaaaagcctgggttatccaagt** 3'

aroH RP+*Bam*HI : 5' **ggggatccccagctgttcttatcgtattac** 3'

Şekil 4.5 *aroH* geni için tasarlanan primerler ve nükleotit dizinleri

aroA ve *aroH* genleri 1. ve 2. PCR tepkimeleriyle $T_{\text{yapışma}}=60\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t_{\text{yapışma, }aroA}=180\text{ s}$ ve $t_{\text{yapışma, }aroH}=90\text{ s}$ 'de gen derişimleri artırılmıştır.

1. ve 2. PCR tepkimeleri ile çoğaltılan *aroA* ve *aroH* genleri 3. PCR tepkimesi ile $T_{\text{yapışma}}=60\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t_{\text{yapışma, }aroA::aroH}=180\text{ s}$ koşullarında gen derişimi artırılmıştır ve 2252bp uzunluğunda *aroA::aroH* elde edilmiştir (Çizelge 4.5).

aroA::aroH geni *E.coli* plasmidi olan pUC19 ve *E.coli* –*Bacillus* shuttle plasmid olan pMK4'e farklı gen/plasmid ve gen, plasmid derişimlerinde küt-uç ve yapışkan-uç ligasyon tepkimeleri gerçekleştirilmiştir. Ligasyon tepkime ürünleri *E.coli* XLI-Blue mikroorganizmasına CaCl_2 yöntemi ile transforme edilmiştir. Transformasyon sonucu

oluşan kolonilerden plasmid izolasyonları sonucunda gen içeren plasmid elde edilememiştir. Bunun sonucu farklı parametreler değiştirilerek ligasyon tepkimeleri tekrar gerçekleştirilmiştir. İncelenen parametreler Çizelge 4.2’de özetlenmiştir.

Çizelge 4.2 *aroA::aroH* geninin pUC19 ve pMK4 plasmidlerine ligasyon tepkimesi

Plasmid	Ligasyon türü	Gen derişimi (G) (ng/μl)	Plasmid derişimi (V) (ng/μl)	G/V=3
pUC19	Yapışkan -uç	13.43	32.14	90/30
pUC19	Yapışkan -uç	13.43	32.14	72/24
pMK4	Yapışkan -uç	13.43	69.23	90/30
PMK4	Yapışkan- uç	13.43	69.23	72/24
PUC19	Küt -uç	31.55	12.85	90/30
PMK4	Küt -uç	31.55	15	90/30
pMK4	Yapışkan -uç	6.3	23.09	72/24
pMK4	Yapışkan -uç	6.3	23.09	60/20
pUC19	Yapışkan -uç	6.3	5.36	60/20

Tasarım I ve Tasarım II ‘de iki-gen sistemi büyüklükleri pUC19 büyüklüğüne yakın olması nedeni ile iki tasarımda klonlamaların başarılı olmadığı sonucuna varılmıştır.

4.1.3 *aroA* ve *aroH* genlerinin birer-birer klonlanması: Tasarım-III

aroA ve *aroH* genlerinin birer-birer klonlanması ile iki-gen klonlama stratejisidir. Tasarımın adımları:

1. *aroH* ’nin önce *E.coli* plasmidi pUC19 ‘a klonlanarak *aroH::pUC19* rekombinant plasmidi oluşturulması (Şekil 4.4, 4.5);
2. Tek-gen taşıyan rekombinant-plasmid *aroH::pUC19* ‘ya *aroA* ’nın klonlanarak *aroH::aroA::pUC19* iki-gen sistemini taşıyan rekombinant plasmid oluşturulmasıdır.

Başarılı olan Tasarım-III’e göre yürütülen araştırma programının primer tasarımları ve gen derişiminin artırılması, *aroA* geninin *E.coli* ve *E.coli-Bacillus* plasmidlerine klonlanarak, transformasyon deney ve bulguları aşağıda verilmiştir.

4.1.3.1 Primer tasarımı ve PCR ile gen derişiminin artırılması

DAHP sentetaz enzimini kodlayan *aroA* geninin nükleik asit dizini (EK 6), *B. subtilis* için Institut Pasteur (Fransa) koordinasyonunda oluşturulan SubtiList'den (Fransa): <http://genolist.pasteur.fr/SubtiList/> adresinden alınmıştır.

aroA gen derişiminin artırılması için iki oligonükleotit tasarımı (EK 7, 8) yapılmıştır. Primerler tasarlanırken aşağıdaki kurallara dikkat edilmiştir:

- Primerlerin nükleotid dizinleri kalıp DNA'nın hedef bölgelerindeki nükleotid dizinleri ile uyum içerisinde olmalı ve hedef DNA'nın diğer bölgeleri ile baz çifti oluşturmamalıdır,
- Kendi kendinin tamamlayıcısı olmamalı ve dimer oluşturmamalıdır,
- Primerler 25-45 baz çifti uzunluğunda olmalıdır,
- İki primerin 3' uçlarında komplementer'lik olmamalıdır,
- Primerlerde GC nükleotidleri toplam nükleotidlerin en az %43'ünü içermeli ve primerler bir ya da daha fazla G ya da C nükleotidleri ile sonlanmalıdır. (Özçelik 2003)

Tasarlanan primerlerin sentezi Thermo Hybaid GmbH (Almanya) laboratuvarlarında yapılmıştır.

Bu nedenle ilk aşamada *aroA* gen dizini elde edildikten sonra, bu genler üzerinde bulunan ve bulunmayan restriksiyon enzim konumları U.S. National Institutes of Health (U.S.A): <http://www.restrictionmapper.org> adresinden yararlanılarak belirlenmiştir. Tasarlanan primerlerin nükleotit dizinleri (Şekil 4.2) ve termodinamik özellikleri Çizelge 4.1'de verilmiştir.

4.1.3.1.1 PCR ile gen derişimi artırılması için kalıp seçimi

Genomik DNA molekülünde *aroA* genini taşıyan *B. subtilis* NRRL NRS1315 kalıp olarak kullanılmaya karar verilerek genomik DNA izolasyonu yapılmış ve saflaştırılmış, ve elde edilen genomik DNA derişiminin spektrofotometrik olarak 4.06 mg/ml olduğu bulunmuştur.

4.1.3.1.2 PCR ile gen derişiminin artırılması

Genomik DNA'nın kalıp olarak kullanılması sonucunda, *aroA* gen sentezi PCR cihazında tasarlanan primerler (ileri primer+geri primer) kullanılarak belirlenen PCR bileşimi ve koşullarında (Bölüm 3.10.4.) çoğaltılmıştır. Genin nükleotitlerden polimerizasyon tepkimeleriyle doğru sentezlenebilmesi için primerlerin DNA'ya yapışma sıcaklığı (annealing temperature), Td erime sıcaklığından 5°C daha düşük veya 12°C daha yüksek olan bir sıcaklık aralığında olabileceğinden [(Td-5)<Tideal<(Td+12)], yapışma sıcaklığı 60°C olarak; DNA'nın polimerizasyonla uzama (alongation) süresi ise *aroA* geni 1471 baz çifti içerdiğinden 90s olarak belirlenmiştir. DNA'nın uzama sıcaklığı (alongation temperature) Taq DNA polimeraz enziminin optimum sıcaklığı olan 72°C olarak seçilmiştir (Sambrook 1995).

tgtaa
aaaacccttgaacattgccctcacatcatgtaggatagc
ttcatagattactttatcacttaaaagcgtttgggtaat
aaagtagagtttttataaaaattttttgtatttcagtatt
tccatttgggaattacttatagtaagatgcatgataacta
caaaataaaaaatgaatgtgaggggaaaggatgaaaaaa
1 - atg agc aac aca gag tta gag ctt tta agg
31 - cag aaa gca gac gaa tta aac cta caa att
61 - tta aaa tta atc aac gaa cgc ggc aat gtt
91 - gta aaa gag atc ggt aaa gcg aag gaa gca
121 - cag ggt gtc aac cga ttt gac cct gtc aga
151 - gaa cgc aca atg tta aac aat atc att gaa
181 - aac aat gac ggg ccg ttc gaa aat tca acc
211 - atc cag cac att ttt aaa gag ata ttc aaa
241 - gcc ggt tta gag ctt cag gaa gaa gat cac
271 - agc aaa gcg ctg ctt gtc tcc cgc aag aaa
301 - aaa cct gaa gat aca att gtt gat atc aaa
331 - ggc gaa aaa atc gga gac ggc cag caa aga
361 - ttc att gtc ggc cca tgt gcg gta gag agc
391 - tat gag cag gta gct gaa gtc gct gca gct
421 - gcg aaa aaa caa ggg att aaa att ttg cgc
451 - ggt gga gcc ttt aag cct cgt acg agc cca
481 - tac gat ttc caa ggg ctt ggt gtt gaa ggc
511 - ctt caa att tta aaa cgt gta gcg gat gaa
541 - ttt gat ctg gcg gtt atc agt gaa atc gta
571 - act ccg gct cat atc gaa gaa gcg ctg gac
601 - tac att gat gtc att caa atc gga gcg cgc
631 - aac atg caa aac ttc gaa ttg ctg aaa gcg
661 - gcc ggc gcc gtg aaa aag cca gtg ctt ctg
691 - aag cgc ggt ctt gct gca acg atc tct gaa
721 - ttc atc aat gct gct gaa tac atc atg tca
751 - caa gga aat gac caa att atc ctt tgt gag
781 - cgc gga atc aga aca tat gaa aca gca acg
811 - aga aac acg ctg gat att tca gct gtg ccg
841 - att ttg aaa caa gaa acg cat ttg cca gtc
871 - ttt gtt gat gtt acg cat tca aca ggc cgc
901 - cgt gac ctc ttg ctt ccg aca gct aaa gcc
931 - gct tta gcg atc ggt gct gat ggc gta atg
961 - gct gag gtt cac cct gat ccg tca gtc gca
991 - ctt tct gac tct gct cag caa atg gcg att
1021 - cct gaa ttc gaa aaa tgg ctg aat gaa ctg
1051 - aag cca atg gtg aaa gtc aac gct
taattgaacaatccaaaaggcccgccgtgcggcctttttt
tatgctttctcgtttatttagttataaaaaccaagtata
cgttttcatcatctataaaaacgtgtataatttcagatgag
aagtaattaaatttgatgaataatgaaaaataatgtaca
ctactgacttacgcttacaaatcataaacgacataaatt
cggac

aroA FP + *SalI* : 5' _ **gcgtcgacgtaaaaaacccttgaacattgc** _3'

aroA RP + *SalI* : 5' _ **cgctcgacaaagcataaaaaaggccg** _3'

Şekil 4.6 *aroA* geni için tasarlanan primerler ve nükleotit dizinleri

Çizelge 4.3 Primer tasarımlarının termodinamik özellikleri

Gen	Primerin Adı	Td, °C	ΔG, kcal/mol	ΔH, kcal/mol	ΔS(eu)
aroA	İleri primer	63.3	-34.7	-170.8	-446.4
	İleri primer + <i>SalI</i>	81.62	-54.4	-241	-620.1
	Geri primer	62.4	-33.7	-164.9	-432.5
	Geri primer+ <i>SalI</i>	82.7	-55.3	-241.7	-617.1

PCR tepkimeleri ile gen derişiminin artırılmasında Çizelge 4.4’de verilen sıra, program ve koşullar kullanılmıştır:.

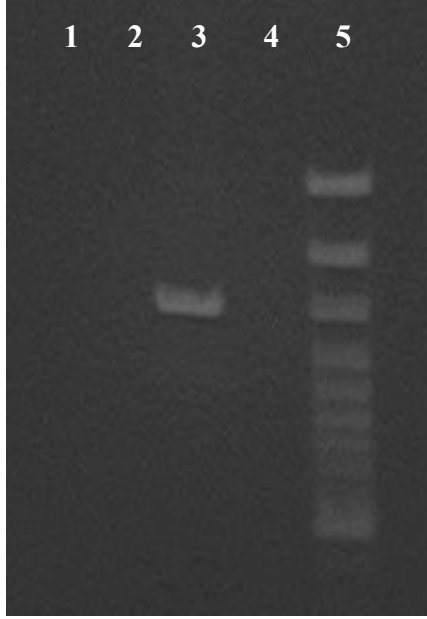
Çizelge 4.4 Polimeraz zincir tepkimesi işletim koşulları

1 DÖNGÜ	T=94°C, t=2dk
30 DÖNGÜ	T ₁ =94°C, t ₁ =1dk T ₂ =60°C, t ₂ =1dk T ₃ =72°C, t ₃ =90s
1 DÖNGÜ	T ₁ =72°C, t ₁ =5dk T ₂ =4°C, t ₂ =5dk

PCR cihazında *aroA* gen sentez tepkimesi için belirlenen uygun tepkime bileşimi Çizelge 4.5’de verilmiştir.

Çizelge 4.5 Polimeraz zincir tepkime bileşen ve bileşimleri

Bileşen	Miktar
10X PCR Tamponu+ MgSO ₄	5μl
dNTPler (1mM)	10μl
İleri Primer (FP) (10μM)	1μl
Geri Primer (RP) (10μM)	1μl
Template DNA (1.5 mg/ml)	2μl
Taq DNA polimeraz (5U/μL)	0.5μl
dH ₂ O	30.5μl



Şekil 4.7 PCR ile *aroA* geninin sentezlenmesi

5. Marker (100 bp DNA Ladder Plus) , 3. *aroA* geni

4.1.3.2 *aroA* geninin *E.coli* plasmidine klonlanması, *E.coli* 'ye transformasyonu ve *E.coli* ' de derişiminin artırılması

Moleküler genetik çalışmalarda genetik yapısı ve fonksiyonları çok iyi incelenen *E.coli* klonlama plasmidleri için konak hücre olarak öncelikle seçilmektedir. *E.coli*'ye plasmid DNA transferinin kolay olması ve bunun da ötesinde *E.coli*'den plasmid DNA izolasyonunun kolaylığı nedeniyle, bu araştırmanın birinci araştırma programında ön klonlama işlemlerinin *E.coli* plasmidlerine yapılmasına ve *E.coli*'ye transformasyonuna karar verilmiştir. Böylece *aroA* geninin paralel olarak pUC19::*aroH* (Özçelik vd. 2004) ve pUC19'a klonlama tepkimeleri için araştırmalar başlatılmıştır. PCR tepkimesi ile sentezlenen ve klonlama tepkimesinin girdisi olan *aroA* geni adsorpsiyon temelli bir ayırma işlemi (QIAquick PCR Purification Kit, QiaGen, Almanya); klonlama tepkimesinin diğer bir girdisi olan pUC19::*aroH* ve pUC19 plasmidlerini yüksek derişimde ve yüksek saflıkta elde etmek amacıyla, plasmid izolasyonu ve arkasından adsorpsiyon temelli başka ikinci bir ayırma işlemi ile QiaGen Midi Kit kullanılarak saflaştırılmıştır. Saf ve derişik olan gen ve plasmid, paralel olarak gerçekleştirilen yapışkan-uç klonlama deneylerinde kullanılmak üzere *SalI* restriksiyon enzimi ile kesilerek uçları uygun şekilde modifiye edilmiştir (Çizelge 4.6). Kesilen uçların

klonlama tepkimesi sırasında birbirine tekrar bağlanmaması için, plasmid alkali fosfataz enzimiyle aşağıdaki koşullarda tepkimeye sokulmuş ve plasmid ucunda fosfat grupları plasmidden uzaklaştırılmış; tepkime tamamlandıktan sonra alkali fosfataz enziminin yapısının bozunması için T=85 °C’da 15 dk bekletilmiştir (Çizelge 4.7). Uçları modifiye edilen gen ve plasmid saflaştırıldıktan sonra klonlama tepkimelerinde kullanılmıştır (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.6 *aroA* geninin, pUC19::*aroH* ve pUC19’un *SalI* enzimiyle yapışkan-uç kesimi için tepkime koşulları

	Miktar
<i>aroA</i> geni,	
pUC19:: <i>aroH</i> veya	~100ng
pUC19	~100ng
TamponQ	2 µl
<i>SalI</i> (10U/µl)	2.5 µl
dH ₂ O	10.5 µl
T=37 °C	t=2st

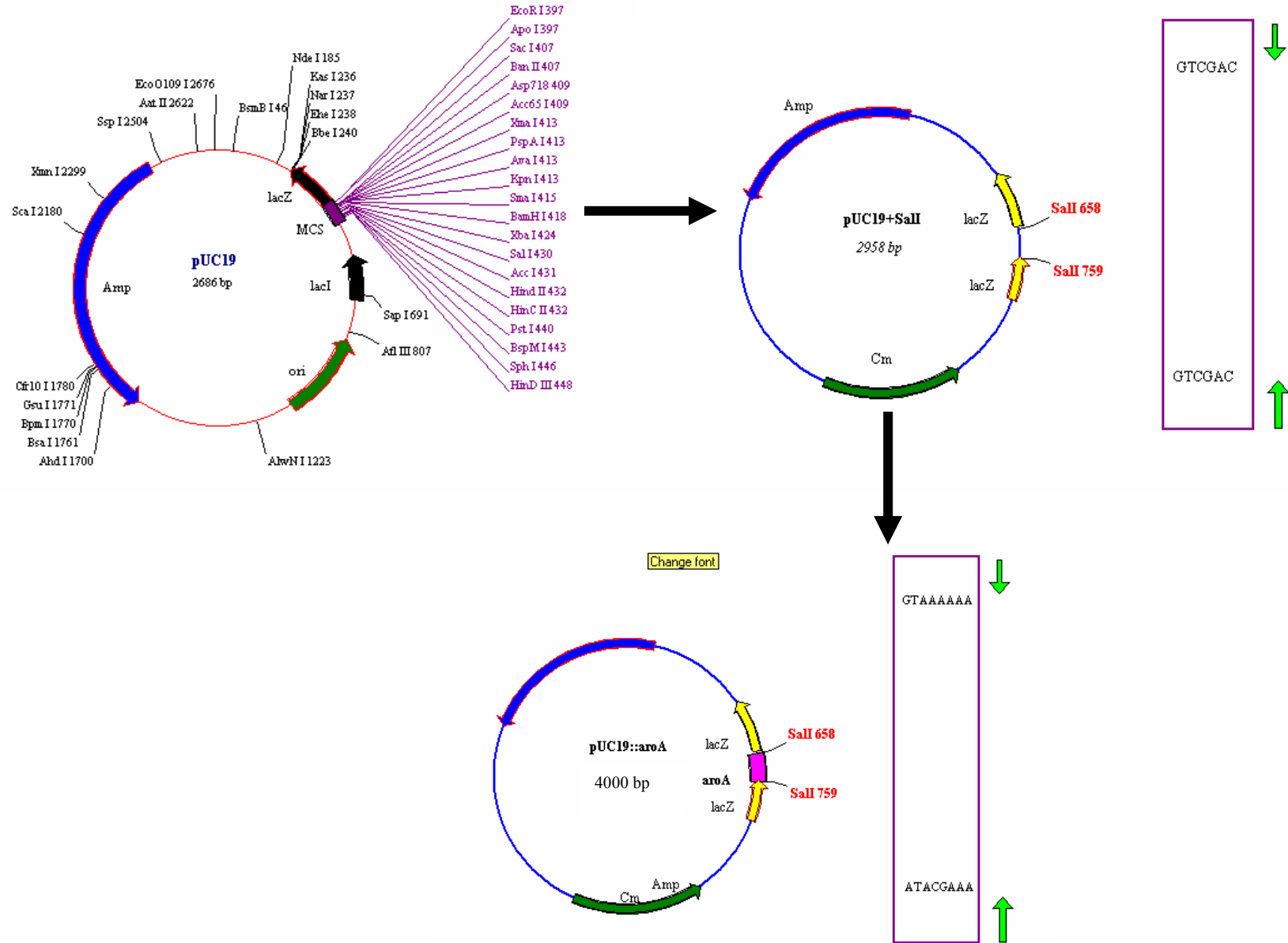
Çizelge 4.7 Lineer pUC19::*aroH* ve pUC19 plasmidlerinin uç fosfat gruplarının plasmidden uzaklaştırılması için tepkime koşulları

<i>SalI</i> + pUC19:: <i>aroH</i> veya	20 µl
<i>SalI</i> + pUC19 tepkime karışımı	~100ng
Alkali fosfataz tamponu	5µl
Alkali fosfataz (0.1U/µl)	1 µl
dH ₂ O	24 µl
T=37 °C	t=60 dk

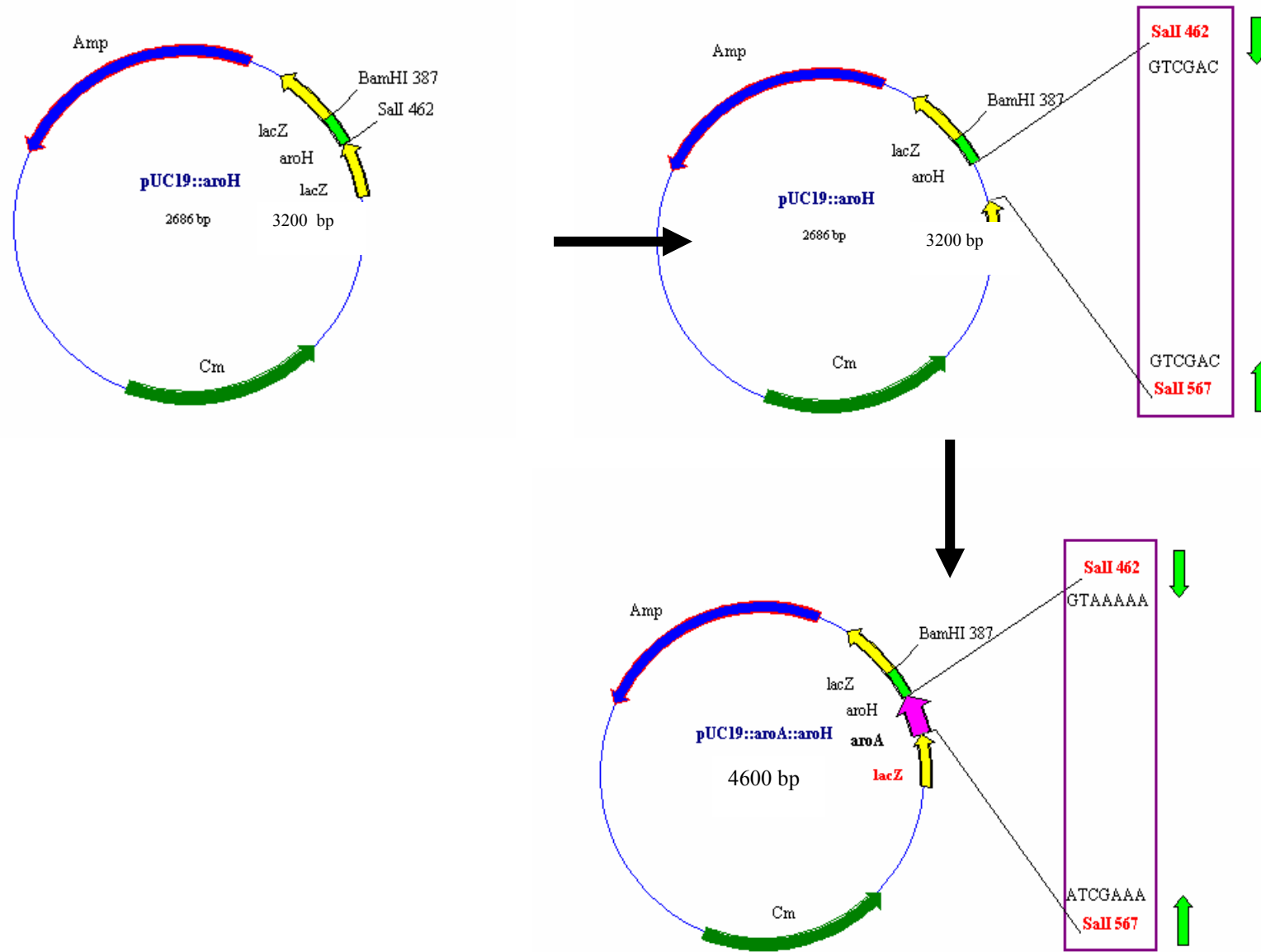
Klonlama tepkimesi öncesi uçları uygun şekilde modifiye edilmiş olan gen kit (QiaGen) ile plasmid ise Fenol:Kloroform:Izoamilalkol ile saflaştırılmıştır.

Çizelge 4.8 *aroA* geninin pUC19::*aroH* ve pUC19 plasmidine yapışkan-uç klonlanması için ligasyon tepkime koşulları

Bileşen	G/V=5
<i>aroA</i> geni	~100 ng
pUC19:: <i>aroH</i> veya pUC19 plasmidi	~20 ng
ATP(10mM)	1.5 µl
T4 DNA ligaz tamponu	2 µl
T4 DNA ligaz (5U/µl)	1 µl
dH ₂ O	$V_R=20$ µl <i>olacak şekilde belirlenmiştir.</i>
T=22 °C	t=16 st

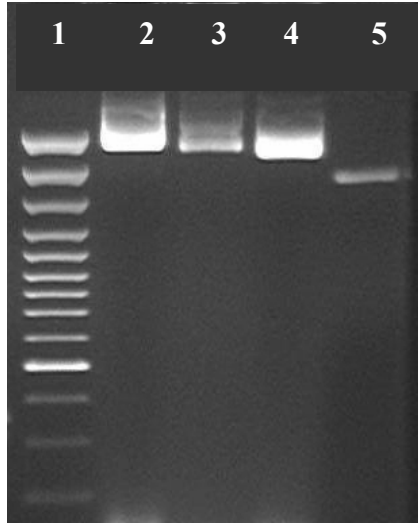


Şekil 4.8 pUC19 plasmidine *aroA* geninin yapışan-uç ligasyonu



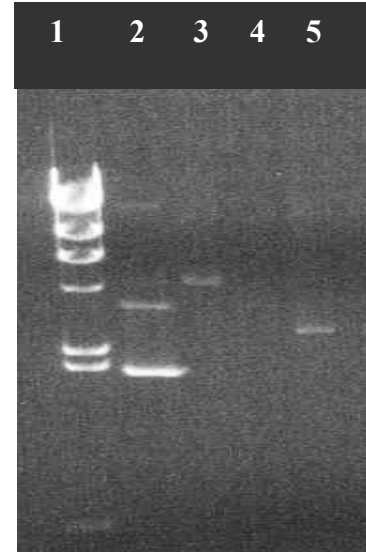
Şekil 4.9 *pUC19::aroH* plasmidine *aroA* geninin yapışkan-uç ligasyonu

Klonlama işleminden sonra ligasyon tepkime karışımları *E.coli* XLI-Blue'ya CaCl_2 yöntemi ile transfer edilmiştir. Transformasyon sonucu oluşan kolonilerden plasmid izolasyonu yapılmıştır. İzolasyon ürünlerinin jel elektroforez görüntülerine bakıldığında (Şekil 4.10.a) kolonilerden sadece üç tanesinin pUC19'dan; (Şekil 4.10.b) için ise iki tanesinin pUC19::*aroH*'den daha büyük olan DNA molekülleri taşıdığı görülmüştür. DNA moleküllerinin *aroA* genini taşıyıp-taşımadığı PCR tepkimeleri ile kontrol edilmiş daha sonra da Çizelge 4.4'de verilen koşullarda *SalI* restriksiyon enzimiyle kesilerek ikinci kontrol gerçekleştirilmiştir. PCR tepkimesi sonucu *aroA* geni sentezlenmiş (Şekil 4.11); rekombinant plasmidler *SalI* restriksiyon enzimi ile kesildiğinde ise pUC19 büyüklüğünde ve *aroA* geni büyüklüğünde (Şekil 4.12); ve pUC19::*aroH* ve *aroA* (Şekil 4.12) iki ayrı DNA molekülü gözlenmiştir Böylece *aroA* geninin pUC19 ve pUC19::*aroH*'ye klonlandığı kanıtlanmış ve genetik mühendisliği araştırmalarının birinci araştırma programı başarılmıştır .



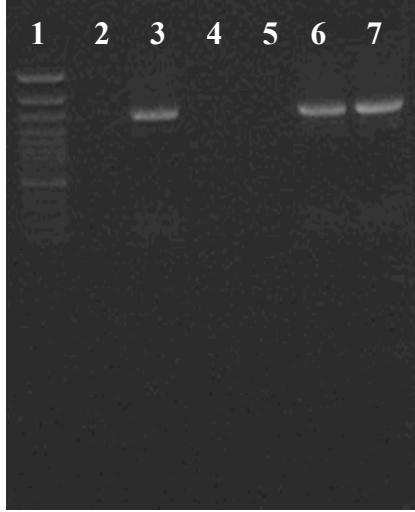
Şekil 4.10a Plasmid DNA izolasyonu sonuçları

1. Marker (100 bp DNA Ladder Plus),
- 2-4. İzolasyon ürünleri,
5. pUC19 plasmidi



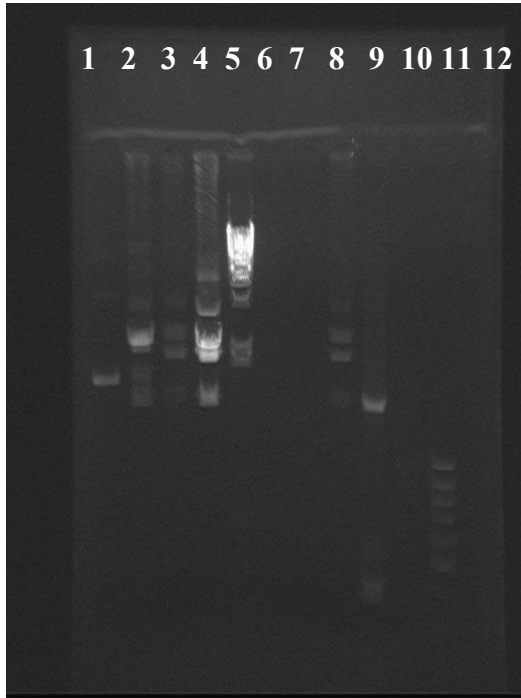
Şekil 4.10b Plasmid DNA izolasyonu sonuçları

1. Marker (λ DNA *HindIII*),
2. pUC19::*aroH*
- 3,5. İzolasyon ürünleri



Şekil 4.11 İzolasyondan elde edilen muhtemel r-pUC19'ların PCR tepkimesi ile kontrol edilmesi

1. Marker (100 bp DNA Ladder Plus),
3. *aroA* geni,
6. Muhtemel r-pUC19::*aroA*::*aroH* plasmidinin PCR tepkimesi ürünü
7. Muhtemel r-pUC19::*aroA* plasmidinin PCR tepkimesi ürünü



Şekil 4.12 İzolasyondan elde edilen muhtemel r-pUC19'ların kesilerek kontrol edilmesi

1. pUC19 plasmidi, 2. Muhtemel r-pUC19::*aroA*+*SalI*, 3. Muhtemel r-pUC19::*aroA*::*aroH*+*SalI*, 5. Marker (λ DNA/*HindIII*), 9. *aroA* geni

Araştırmanın ikinci aşamasında *aroA* geni, *Bacillus-E.coli* shuttle plasmidi olan pMK4::*aroH* ve pMK4 plasmidlerine paralel olarak klonlanmıştır (Şekil 4.13a-b). Genetik araştırma programında *aroA* geninin ilk olarak pMK4 yerine pUC19'a klonlanmasının temel sebepleri;

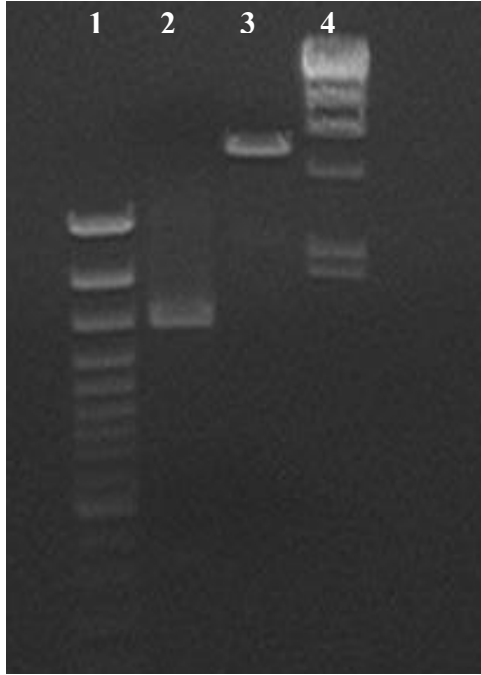
- a. pMK4 plasmidinin daha dar poliklonlama restriksiyon enzim kesim bölgesine sahip olması,
- b. klonlanması olasılığı düşük olan -PCR cihazında sentezlenmiş- genin pMK4 gibi daha büyük bir plasmide klonlanmasının daha düşük olasılığa sahip olmasıdır.

Bacillus-E.coli shuttle plasmidleri arasından pMK4'ün seçilmesinin nedenleri,

- a. pMK4'ün yapısal kararlılığının ve kopyalama sayısının yüksek (50) olması, molekül ağırlığının düşük olması ve,
- b. yapısında bulunan *lacZ* geni ile klonlama sonrası rekombinant plasmidlerin daha kısa sürede belirleme imkanının olmasıdır.

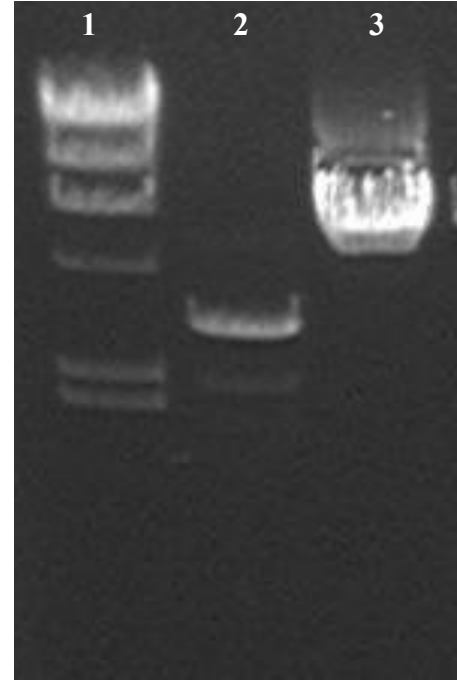
4.1.3.3 *aroA* geninin *Bacillus-E.coli* shuttle plasmidine sub-klonlanması ve *E.coli*'ye transformasyonu

aroA geninin pMK4::*aroH* ve pMK4 plasmidlerine paralel olarak klonlanabilmesi için *aroA* gen derişimi PCR tepkimesi ile artırılmış, pMK4 ve pMK4::*aroH* plasmidleri ise *E.coli*'den izole edilmiştir. Plasmidler ve *aroA* geni *SalI* restriksiyon enzimiyle Çizelge 4.6'da verilen koşullarda paralel olarak kesilmiştir. Kesme işleminden sonra T=65°C'de 15dk bekletilerek *SalI* restriksiyon enzimi inaktif hale getirilmiş ve plasmid alkali fosfataz enzimiyle tepkimeye sokulmuş (Çizelge 4.7) plasmid ucunda klonlama için gerekli fosfat grupları plasmidden uzaklaştırılmıştır.



Şekil 4.13a *SalI* ile kesilmiş pMK4

1. Marker (100 bp DNA Ladder Plus),
2. *aroA*+*SalI*,
3. *SalI* ile kesilmiş pMK4



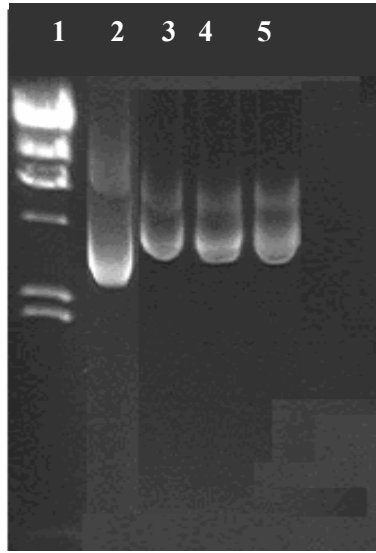
Şekil 4.13b *SalI* ile kesilmiş pMK4::*aroH*

1. Marker (λ DNA/*HindIII*),
2. pMK4::*aroH*
3. *SalI* ile kesilmiş pMK4::*aroH*

Çizelge 4.9 *aroA* geninin pMK4 ve pMK4::*aroH* plasmidlerine yapışkan-uç klonlanması için ligasyon tepkime koşulları

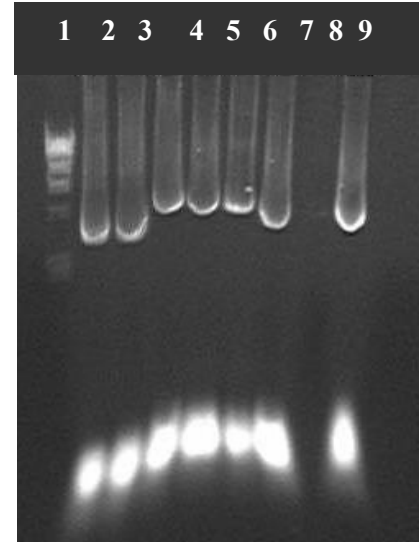
Bileşen	G/V=3	G/V=5
<i>aroA</i> geni	~90 ng	~120 ng
pMK4 veya pMK4:: <i>aroH</i>	~30 ng	~24 ng
Ligasyon tamponu (10X)	2 μ l	2 μ l
ATP (10mM)	1.5 μ l	1.5 μ l
T4 DNA ligaz (5U/ μ l)	1 μ l	1 μ l
dH ₂ O	$V_R=20 \mu$ l olacak şekilde belirlenmiştir.	
T=22 °C	t=20 st	

pMK4 ve pMK4::*aroH* plasmidlerine yapışkan-uç klonlama sonucu elde edilen ligasyon tepkime karışımları *E.coli* XLI-Blue'ya aktarılmış ve klonlamanın gerçekleşip gerçekleşmediğinin kontrolü mavi/beyaz koloni oluşumu yöntemi ile yapılmıştır. Klonlama işleminden sonra pMK4::*aroA* ligasyonu için üç tane, pMK4::*aroA*::*aroH* ligasyonu için beş beyaz koloniden plasmid izolasyonu yapılmış ve bunların jel elektroforez görüntülerine (Şekil 4.14a-b) göre pMK4::*aroA* ve pMK4::*aroA*::*aroH* ligasyonu için elde edilen kolonilerin muhtemel r-pMK4 taşıdıklarına karar verilmiş ve bunlar PCR tepkimeleri (Şekil 4.15) ve *SalI* restriksiyon enzimleri ile kesilerek kontrol edildiğinde muhtemel pMK4::*aroA* için iki tanesinin, muhtemel pMK4::*aroA*::*aroH* için ise iki tanesinin *aroA* genini taşıdıkları bulunmuştur (Şekil 4.16a-b).



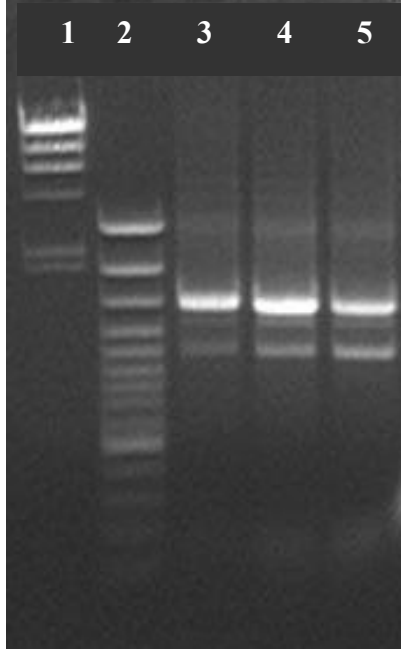
Şekil 4.14a Plasmid DNA izolasyonu sonuçları

1. Marker ((λDNA *HindIII*))
- 2 . pMK4 plasmidi
- 3-5. pMK4::*aroA* plasmid izolasyonları



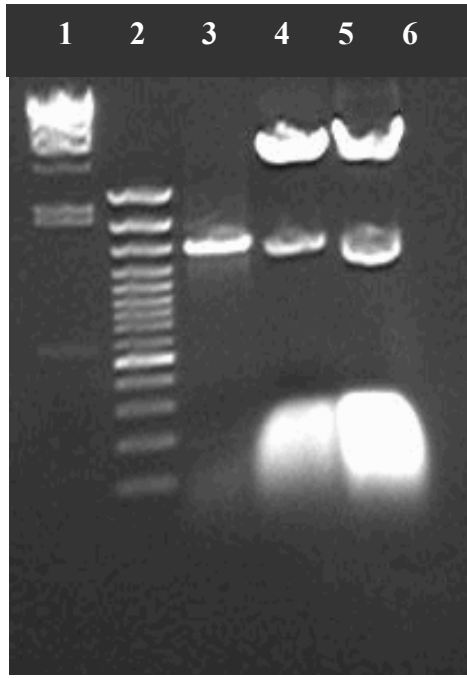
Şekil 4.14b Plasmid DNA izolasyonu sonuçları

1. Marker ((λDNA *HindIII*))
- 2 . pMK4::*aroH* plasmidi
- 3-9. pMK4::*aroA*::*aroH* plasmid izolasyonları



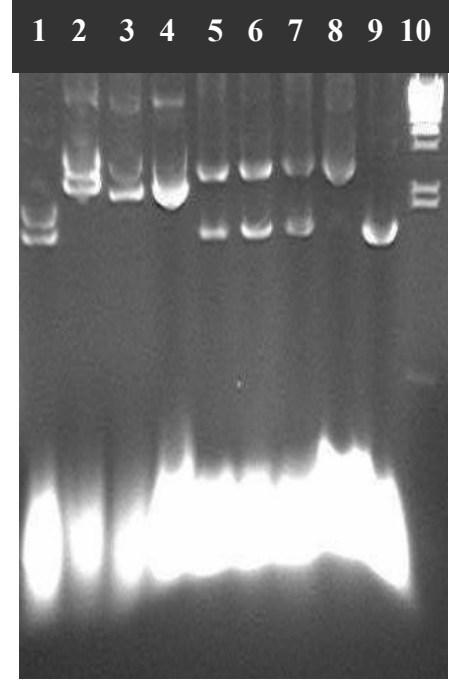
Şekil 4.15 İzolasyondan elde edilen muhtemel r-pMK4'lerin PCR tepkimesi ile kontrol edilmesi

1. Marker (λ DNA/*Hind*III), 2. Marker (100 bp DNA Ladder Plus), 3-4.Muhtemel pMK4::*aroA* ve pMK4::*aroA*::*aroH* PCR tepkimesi ürünü, 5. *aroA* geni,



Şekil 4.16a İzolasyondan elde edilen muhtemel r-pMK4'lerin kesilerek kontrol edilmesi

1. Marker (100 bp DNA Ladder plus),
3. *aroA* geni, 4-5. pMK4::*aroA*::*aroH*+*SalI*



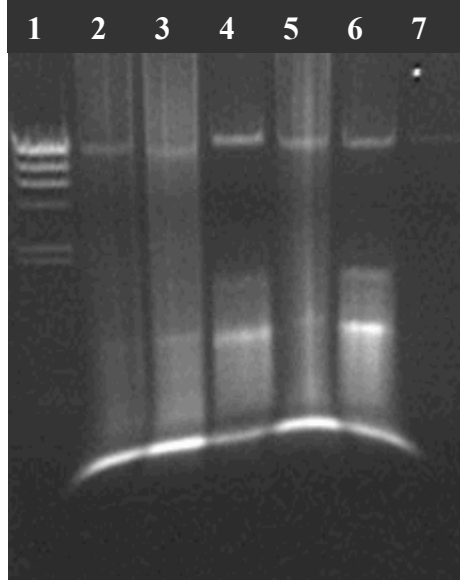
Şekil 4.16b İzolasyondan elde edilen muhtemel r-pMK4'lerin kesilerek kontrol edilmesi

10. Marker (λ DNA/*HindIII*)
9. *aroA* geni, 5-6 pMK4::*aroA*+*SalI*

4.1.3.4 Tek-gen *aroA* ve iki-gen sistemi taşıyan plasmidlerinin *B. subtilis*'e aktarılması

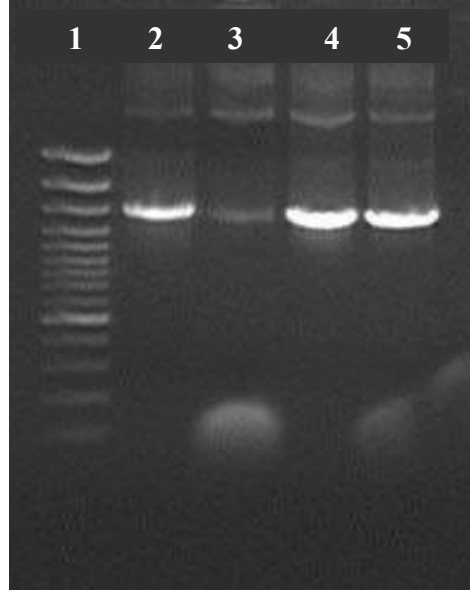
aroA genini taşıyan pMK4::*aroA* ve pMK4::*aroA*::*aroH* rekombinant plasmidler paralel olarak *E.coli*'den izole edilmiş; farklı genotip özelliklere sahip *aroH* geni taşıyan *B. subtilis* türleri arasında L-fenilalanin üretim potansiyeli yüksek olan *B. subtilis* A263 türüne transforme edilmesine karar verilmiştir. *B. subtilis* A263 konak hücrelere (Bölüm 3.10.10) elektroporasyon ile $C=25\mu F$, $R=200\Omega$ ve $V/L=10-12.5kV/cm$ koşullarında ve doğal transformasyon yöntemleriyle aktarılmıştır. Elde edilen kolonilerin rekombinant plasmidi taşıyıp taşımadıklarını kontrol etmek amacıyla plasmid izolasyonu yapılmış (Şekil 4.17) ve izolasyon ürünleri kullanılarak PCR'da *aroA* geni sentezlenmiştir (Şekil 4.18). Plasmid izolasyonu ve PCR ürünlerinin jel görüntülerinden r-*B. subtilis*

A263'lerin ayrı ayrı pMK4::*aroA*::*aroH* ve pMK4::*aroA* rekombinant plasmidi taşıdıkları belirlenmiştir.



Şekil 4.17 *r-B.subtilis* 'lerden plasmid izolasyonu sonuçları:

1.Marker (λ DNA/*Hind*III), 2-3. pMK4::*aroA* izolasyon ürünleri,
4-6. pMK4::*aroA*::*aroH* izolasyon ürünleri



Şekil 4.18 *r-B. subtilis* 'lerin PCR tepkimesi ürünü

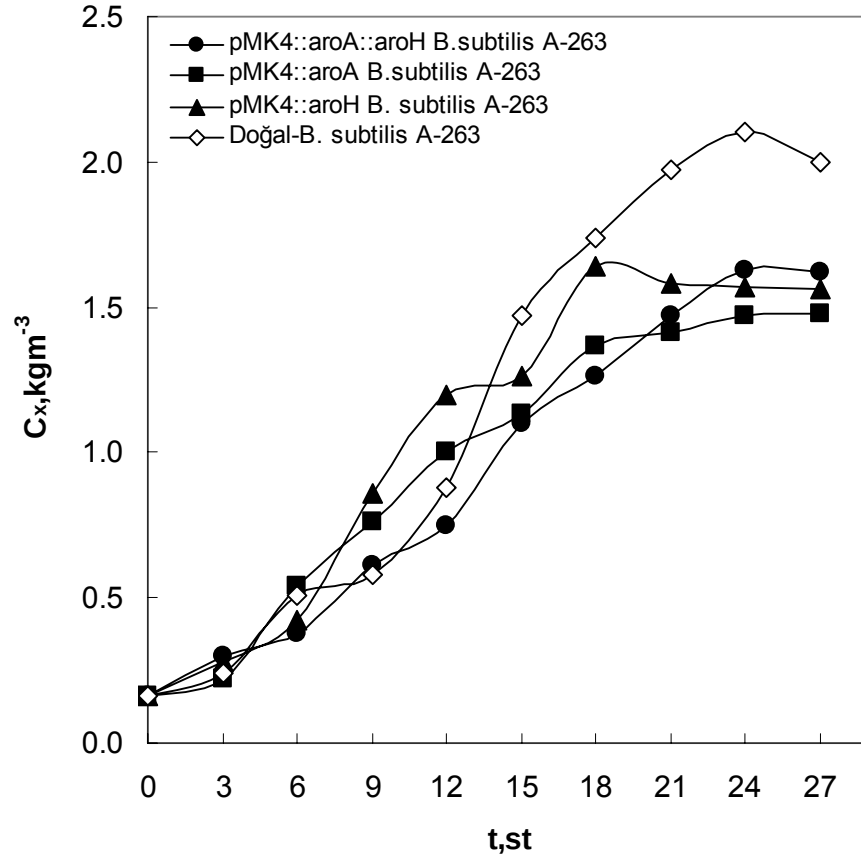
1. Marker (100 bp DNA Ladder plus), 2. *aroA* geni,
- 3-4. pMK4::*aroA* taşıyan *r-B. subtilis* A263 PCR tepkimesi ürünü, 5. pMK4::*aroA* taşıyan *r-B. subtilis* A263 PCR tepkimesi ürünü

4.2 Rekombinant Hücrelerin L-Fenilalanin Üretim Performanslarının Kıyaslanması

Doğal *B. subtilis* A263 ile metabolik mühendislik araştırma programı sonucunda geliştirilmiş olan pMK4::*aroA* taşıyan *r-B. subtilis* A263, pMK4::*aroA*::*aroH* taşıyan *r-B. subtilis* A263, ve pMK4::*aroH* taşıyan *r-B. subtilis* A263 (Özçelik 2003) mikroorganizmalarının L-fenilalanin üretim performansları laboratuvar ölçekli kesikli biyoreaktörlerde $T=37^{\circ}\text{C}$, $N=200\text{ rpm}$ ve $\text{pH}_0=7.0$ işletim koşullarında bileşimi Çizelge 3.4'de verilen ve karbon kaynağı olarak glukoz içeren ortamda $t=27\text{ st}$ kalma süreli paralel L-fenilalanin üretim deneyleri ile karşılaştırılmıştır. Deneyler sırasında kalma süresine (t) karşı alınan örneklerin hücre ve L-fenilalanin derişimleri belirlenmiştir (Şekil 4.19-4.20).

Doğal ve *r-B. subtilis* A263'ler ile hücre derişiminin kalma süresi ile derişimi incelendiğinde (Şekil 4.19) *r-B. subtilis* A263 'lerin hücre çoğalma hızlarının ve dolayısıyla da hücre derişimlerinin doğal *B. subtilis* A263'e göre daha düşük olduğu

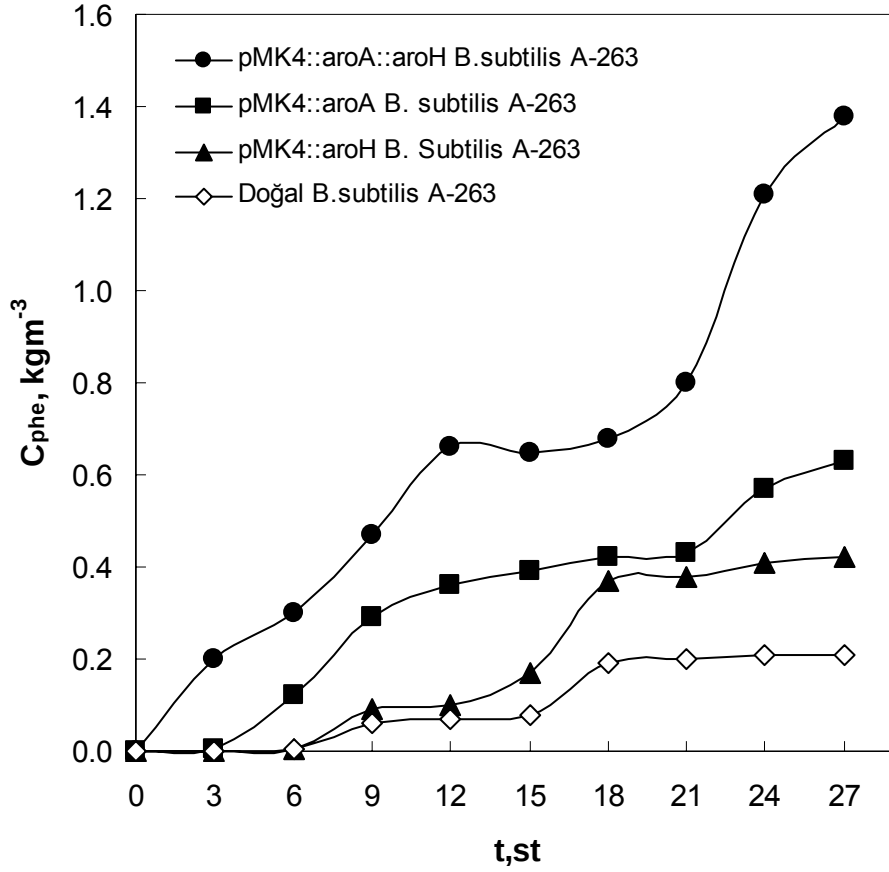
görülmektedir. Proseste, $t=27$ st'te en yüksek hücre derişimine doğal *B. subtilis* A263 (2.0 kg m^{-3}) ile ulaşılırken, hücre derişim profillerine incelendiğinde $t=27$ st'te r-*B.subtilis* A263'ler arasında en yüksek hücre derişimine pMK4::aroA::aroH taşıyan r-*B.subtilis* A263 (1.26 kg m^{-3}) ile ulaşılmıştır.



Şekil 4.19 Doğal *B. subtilis* ve r-*B. subtilis* A263 hücreleri ile L-fenilalanin üretiminde hücre derişiminin kalma süresi ile değişimi, $C_G=10 \text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH}_0=7.0$, $N=200 \text{ dk}^{-1}$ ve $T=37^\circ\text{C}$

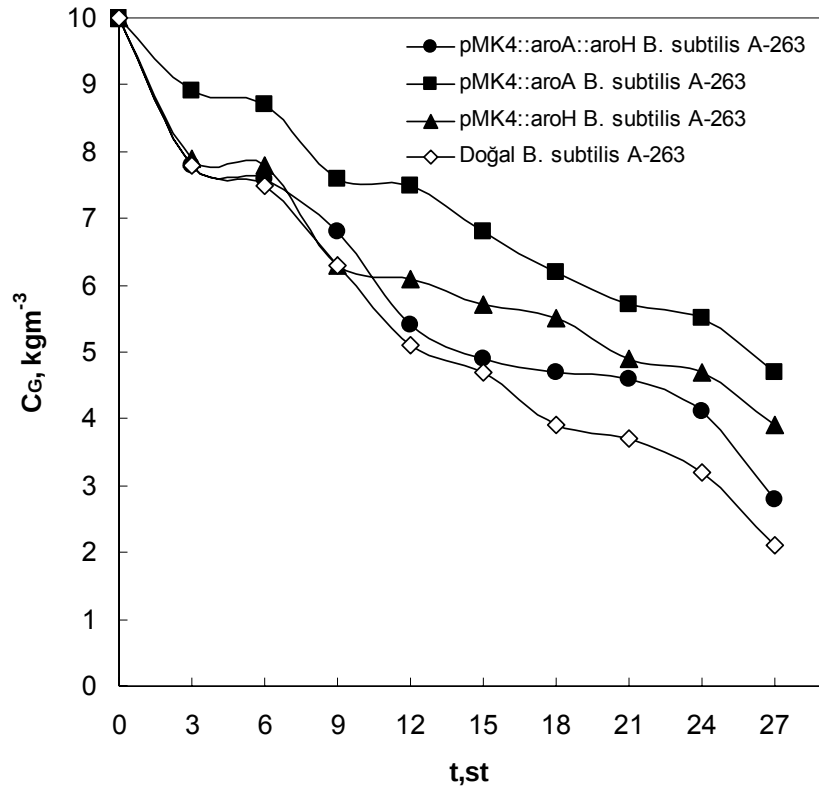
Doğal ve r-*B. subtilis* A263 hücreleri ile L-fenilalanin derişiminin kalma süresi ile değişimi incelendiğinde (Şekil 4.20) ile r-*B. subtilis*'lerin L-fenilalanin üretim performansları doğal *B. subtilis* A263'e göre daha iyi olduğu bulunmuş ve sırasıyla 2-, 3- ve 6.5- kat artış bulunmuştır. Rekombinant mikroorganizmaları kendi içerisinde karşılaştırıldığında pMK4::aroA::aroH taşıyan r-*B. subtilis* A263'in L-fenilalanin

üretim hızının pMK4::aroH plasmidi taşıyan *r-B. subtilis* A263 ve pMK4::aroA plasmidi taşıyan *r-B. subtilis* A263'e göre sırasıyla 3- ve 2- kat yüksek olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.20 Doğal ve *r-B. subtilis* A263 hücreleri ile L-fenilalanin üretiminde L-fenilalanin derişiminin kalma süresi ile değışimi, $C_G=10 \text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH}_0=7.0$, $N=200 \text{ dk}^{-1}$ ve $T=37^\circ\text{C}$

Doğal ve *r-B. subtilis* A263 hücreleri ile glukoz derişiminin kalma süresi ile değışimi incelendiğinde (Şekil 4.21) hücre derişim profilleri ile paralellik göstermektedir. Doğal *B. subtilis* A263, pMK4::aroA taşıyan *r-B. subtilis* A263, pMK4::aroH taşıyan *r-B. subtilis* A263 ve pMK4::aroA::aroH taşıyan *r-B. subtilis* A263'ler ile sırasıyla başlangıç glukozunun %79, %53, %61 ve %72'si tüketilmiştir.



Şekil 4.21 Doğal ve r-*B. subtilis* A263 hücreleri ile L-fenilalanin üretiminde glukoz derişiminin kalma süresi ile değişimi, $C_G=10 \text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH}_0=7.0$, $N=200 \text{ dk}^{-1}$ ve $T=37^\circ\text{C}$

Doğal *B. subtilis* A263 ve r-*B. subtilis* A263'lerin L-fenilalanin performanslarını karşılaştırmak amacıyla kesikli biyoreaktörlerde zamana karşı alınan örnekler kapiler elektroforezde (Waters Quanta, 4000E) analizlenmiştir. Analiz sonucunda serin, nötral ve alkali proteazlar ile α -amilaz enzimine ait pik elde edilmemiştir.

4.3 Oksijen Aktarımı Etkileri

pMK4::*aroA*::*aroH* taşıyan *r-B. subtilis* A263 ile L-fenilalanin üretimine oksijen aktarımı etkilerinin incelenebilmesi amacıyla Bölüm 3.6’da anlatılan $V=1 \text{ dm}^3$ pilot-ölçek yarı-kesikli biyoreaktörlerde $V_R=0.5 \text{ dm}^3$ tepkime hacmi kullanılarak, $Q_0/V_R=0.2, 0.35, 0.5$ vvm hava giriş hızlarında ve $N=250, 500$ ve 750 dk^{-1} karıştırma hızlarında, laboratuvar ölçekte pMK4::*aroH* taşıyan *r-B. subtilis* A263 mikroorganizması için geliştirilen (Özçelik 2003) optimum üretim koşullarında, $t=30$ st kalma süreli L-fenilalanin üretim deneyleri tasarlanmıştır. Uygulanan 5 farklı oksijen aktarım koşulu anlatıma kolaylık getirmesi amacı ile uygun kısaltmalar ile Çizelge 4.10’da verildiği gibi kodlanmıştır. Pilot-ölçekli biyoreaktörlerde biyoproses süresince kalma

Çizelge 4.10 Oksijen aktarımı koşulları ve kısaltmaları

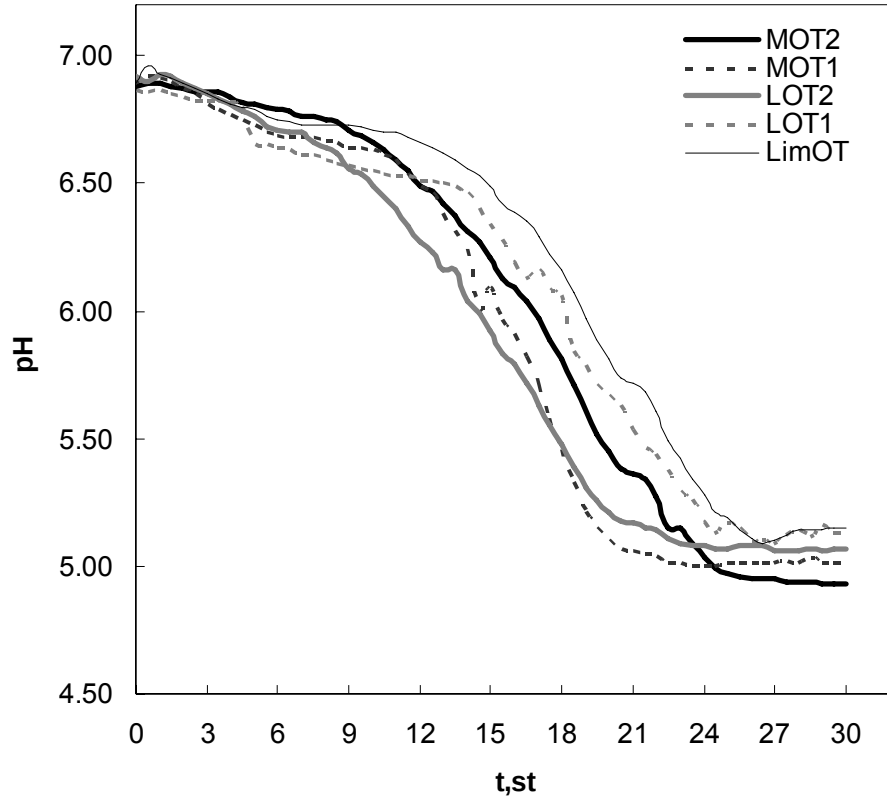
Ölçek	$V_R, \text{ dm}^3$	$N, \text{ dk}^{-1}$	$Q_0/V_R, \text{ vvm}$	Kısaltma
Pilot	0.5	750	0.2	LimOT
Pilot	0.5	500	0.35	LOT1
Pilot	0.5	750	0.35	LOT2
Pilot	0.5	500	0.5	MOT1
Pilot	0.5	750	0.5	MOT2

süresine karşı belirlenen aralıklarla (3 st) alınan örnekler kullanılarak glukoz, hücre, L-fenilalanin ve yan-ürün derişimleri ölçülmüştür (Şekil 4.22-4.26). Dinamik-yöntem ile prosesin sıvı faz hacimsel kütle aktarım katsayısı K_{La} ve mikroorganizma oksijen tüketim hızı $-r_0$ belirlenmiştir.

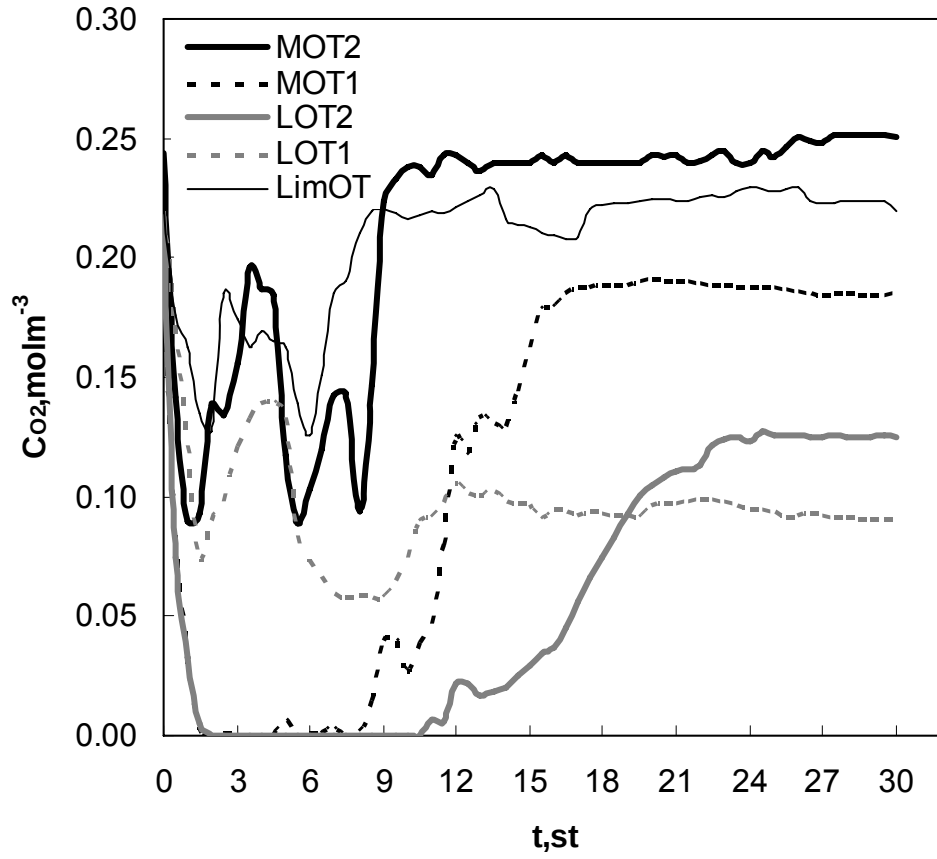
Kalma süresi t ’ye karşı ölçülen pH, çözünmüş oksijen, mikroorganizma, glukoz ve L-fenilalanin derişimlerinin kalma süresi ile derişimleri incelenen tüm oksijen aktarım koşulları için sırasıyla Şekil 4.22-4.26 ’da gösterilmiştir.

Şekil 4.22’de pH’ın kalma süresi t ile derişimi incelendiğinde tüm oksijen aktarım koşullarında karakteristik bir derişim gözlenmiştir. $0 < t < 24$ st kalma sürelerindeki pH

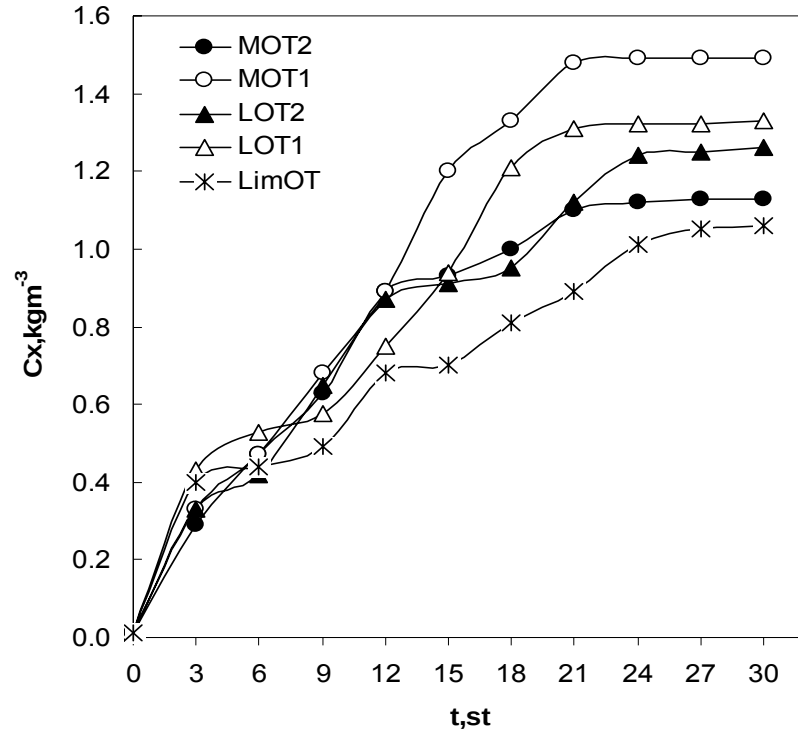
değerlerinde farklı hızlarda azalmakta, $t=24$ st'den sonra ise t ile değişim gözlenmemektedir. Proses süresince pH profilindeki düşüş üretim ortamına salgılanan H^+ iyonlarından kaynaklanmaktadır. pH düşüşünün en fazla olduğu oksijen aktarım koşulu MOT2 'dir; çizelge 4.12'de en yüksek toplam organik asit derişiminin MOT2 oksijen aktarımında ölçüldüğünü belirtmektedir. Çözünmüş oksijen derişimi LOT2 ve MOT1 oksijen aktarım koşullarında $t=1.5$ st'de sıfıra ulaşmış ve LimOT, LOT1 ve MOT2 oksijen aktarım koşulları gibi yaklaşık olarak $t=9$ st'den sonra çözünmüş oksijen derişimlerinde artış gözlenmiş; $t=18$ st'den sonra hücreler durgunluk fazına girdikten sonra sabitlenmiştir. Belirtilen iki oksijen aktarım koşulunda çözünmüş oksijen derişimlerinin sıfıra ulaşması, hücre çoğalması ve L-fenilalanin üretimi için oksijen ihtiyacının yüksek olduğunu göstermektedir. Oksijen aktarım koşuluna göre substrat tüketim hızı ve hücre çoğalma hızı farklılıklar göstermektedir. LOT1, LOT2, MOT1 ve MOT2 oksijen aktarım koşullarında $t=21$ st'e kadar glukoz hızla tüketilmiştir, $t=21$ st'den sonra hücre çoğalmasının durgunluk fazına girmesi nedeniyle substrat tüketim hızı azalmaktadır. Belirtilen koşullarda başlangıç glukoz derişiminin sırasıyla %82, %71, %78 ve %84'ü tüketilmiştir. LimOT koşulunda ise prosesin $t=15$ st'ine kadar LOT1 ile benzer glukoz derişim profili gözlenirken, $t>15$ st'den sonra glukoz tüketim hızı diğer oksijen aktarım koşullarına göre daha yüksektir. L-fenilalanin derişiminin kalma süresi ve oksijen aktarım koşulu ile değişimi incelendiğinde, düşük oksijen aktarım koşullarında L-fenilalanin üretiminin de düşük olduğu ve oksijen aktarım hızının artmasıyla L-fenilalanin üretim hızının arttığı görülmektedir. Maksimum L-fenilalanin derişimine ($C_{phe}=1.5 \text{ kg m}^{-3}$) MOT1 koşulunda ulaşılmıştır. Maksimum L-fenilalanin üretimine ulaşıldığında çözünmüş oksijen derişiminin ve pH'ın sabit kaldığı, hücrenin ise durgunluk fazında olduğu görülmektedir.



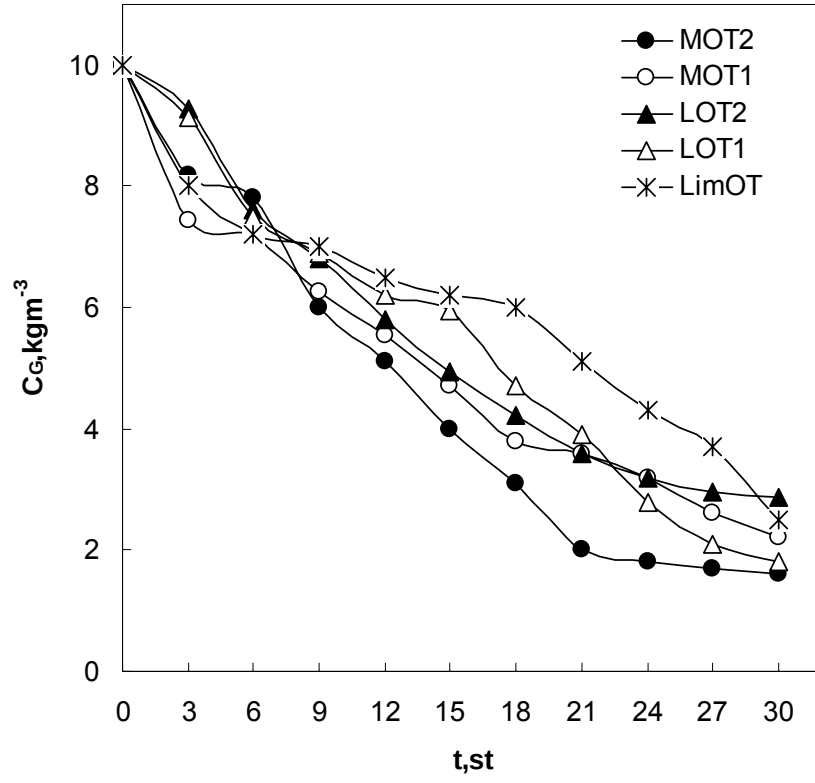
Şekil 4.22 pMK4::*aroA*::*aroH* taşıyan *r-B. subtilis* A263 ile L-fenilalanin üretiminde pH'nın oksijen aktarımı ve kalma süresi ile değişimi: $C_{G0}=10 \text{ kg m}^{-3}$, $pH_0=6.8$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=0.5 \text{ dm}^3$



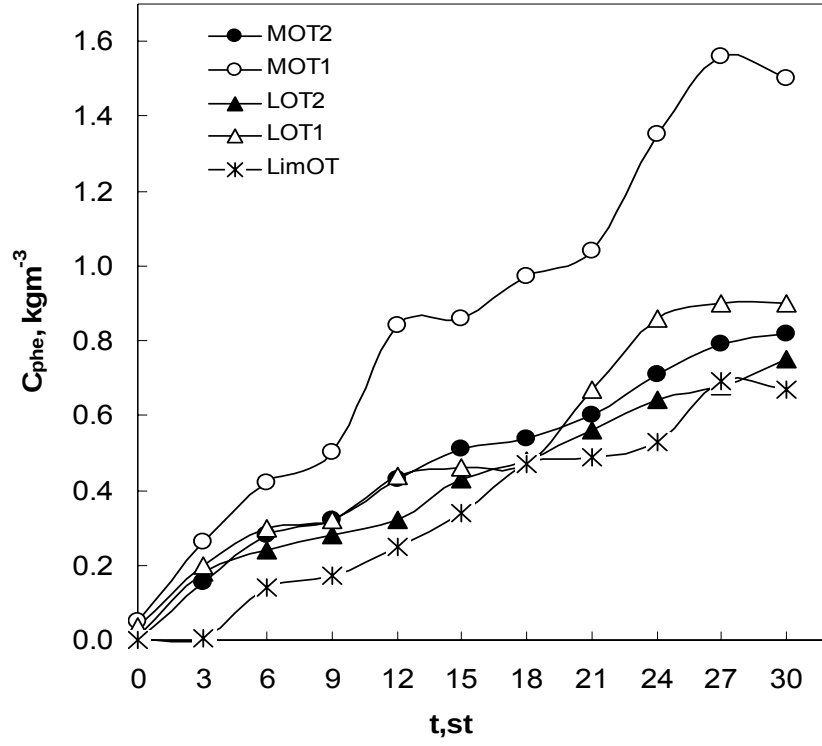
Şekil 4.23 pMK4::*aroA*::*aroH* taşıyan *r-B. subtilis* A263 ile çözünen oksijen derişiminin oksijen aktarım koşulu ve kalma süresiyle değişimi: $C_{G0}=10 \text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH}_0=6.8$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=0.5 \text{ dm}^3$



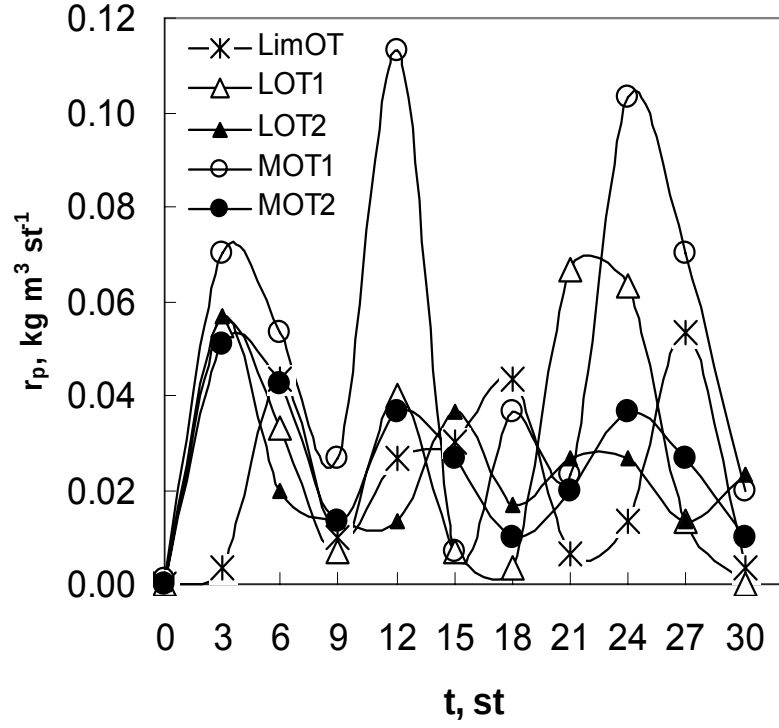
Şekil 4.24 pMK4::*aroA*::*aroH* taşıyan *r-B. subtilis* A263 ile hücre derişiminin oksijen aktarım koşulu ve kalma süresiyle değişimi: $C_{G0}=10 \text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH}_0=6.8$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=0.5 \text{ dm}^3$



Şekil 4.25 pMK4::aroA::aroH taşıyan *r-B. subtilis* A263 ile glukoz derişiminin oksijen aktarım koşulu ve kalma süresiyle değişimi: $C_{G0}=10 \text{ kg m}^{-3}$, $pH_0=6.8$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=0.5 \text{ dm}^3$

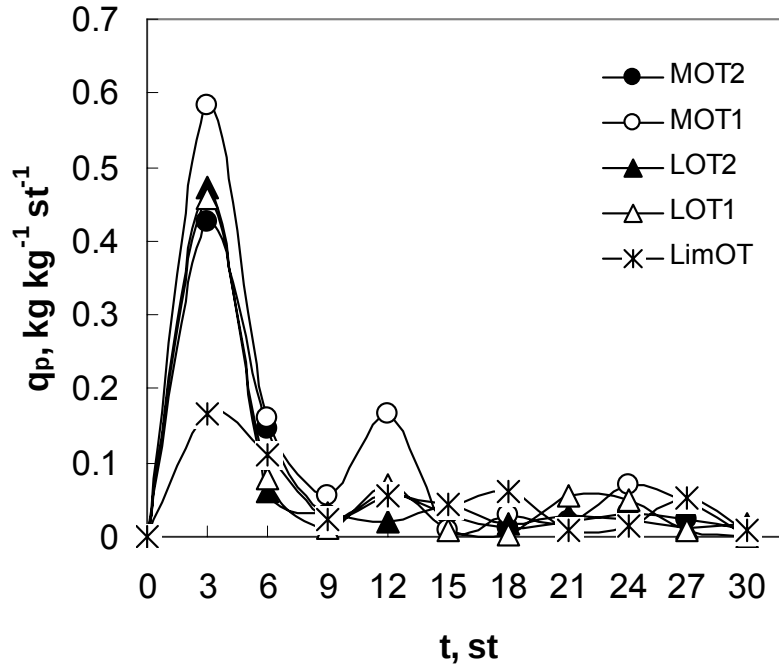


Şekil 4.26 pMK4::aroA::aroH taşıyan *r-B. subtilis* A263 ile L-fenilalanin derişiminin oksijen aktarım koşulu ve kalma süresiyle değişimi: $C_{G0}=10 \text{ kg m}^{-3}$, $pH_0=6.8$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=0.5 \text{ dm}^3$



Şekil 4.27 L-fenilalanin üretim hızının oksijen aktarımı ve kalma süresi ile değişimi:

$$C_{Go}=10 \text{ kg m}^{-3}, \text{ pH}_0=6.8, T=37^\circ\text{C}, V_R=0.5 \text{ dm}^3$$



Şekil 4.28 Birim zamanda birim hücre başına üretilen L-fenilalanin miktarının oksijen aktarımı ve kalma süresi ile değişimi: $C_{Go}=10 \text{ kg m}^{-3}$, $pH_0=6.8$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=0.5 \text{ dm}^3$

pMK4::*aroA*::*aroH* taşıyan *r-B. subtilis* A263 ile r_p ve q_p değerlerinin oksijen aktarım koşulu ve kalma süresi ile değişimi Şekil 4.27 ve 4.28'de verilmektedir. r_p değerlerinin kalma süresi ile değişimi oksijen aktarım koşullarına göre salınım göstermektedir. MOT1 oksijen aktarım koşulunda $t=12$ ve 14 st 'ta –yaklaşık- en yüksek $r_p = 0.11 \text{ kg m}^{-3} \text{ st}^{-1}$ L-fenilalanin üretim hızı değerine ulaşılmıştır. q_p değerlerinin en yüksek değerlerine ise tüm oksijen aktarım koşullarında $t=3 \text{ st}$ 'te gözlenmiştir; en yüksek değerden başlayarak sırasıyla MOT1'de $0.58 \text{ kg m}^{-3} \text{ st}^{-1}$, LOT2'de $0.47 \text{ kg m}^{-3} \text{ st}^{-1}$, LOT1'de $0.46 \text{ kg m}^{-3} \text{ st}^{-1}$, MOT2 'de $0.43 \text{ kg m}^{-3} \text{ st}^{-1}$, LimOT 'ta $0.17 \text{ kg m}^{-3} \text{ st}^{-1}$ elde edilmiştir.

Amino asit ve organik asit derişimlerinin proses süresince değişimi üç periyotta incelenmiştir. Bu periyotlar hücre ve L-fenilalanin derişim profilleri göz önünde bulundurularak hücre çoğalmasının log faz süreci ve L-fenilalanin üretiminin başladığı periyot I ($0 < t < 6 \text{ st}$), periyot II ($6 < t < 21 \text{ st}$), periyot III ($t > 21 \text{ st}$) olarak belirlenmiştir. İncelenen oksijen aktarım koşullarında ürün L-fenilalanin yanında diğer amino

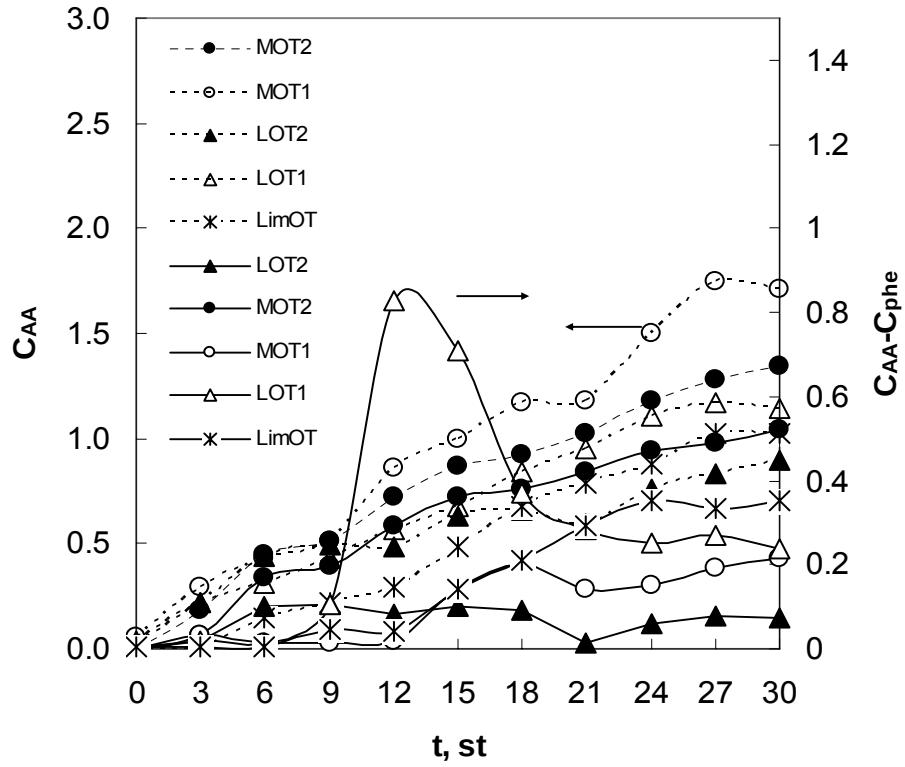
asitlerden aspartik asit, glutamik asit, glisin biyoreaktörde bulunmaktadır. Çizelge 4.11’de farklı oksijen aktarım koşullarında amino asit derişimlerinin proses süresince değişimi verilmiştir. Çizelge 4.11 incelendiğinde aspartik asit genelde proses süresince gözlenirken, glisin derişimi oksijen aktarım koşullarına göre I<periyot<II’de 0.004-0.013 kg m⁻³ arasında değişmektedir. Buna göre sabit hava giriş hızında, karıştırma hızının arttırılması ile ortamda gözlenen amino asitlerden glisin derişimi artarken; aspartik asit, glutamik asit ve asparajin derişimleri değişiklik göstermiştir. Sabit karıştırma hızında hava giriş hızının artmasıyla amino asit derişimleri salınım göstermiştir. Toplam amino asit ve ürün olan L-fenilalanin dışındaki diğer amino asit derişimlerinin (C_{AA}) kalma süresi ve oksijen aktarım koşullarıyla değişimi şekil 4.29’da verilmiştir.

Çizelge 4.11 Amino asit derişimlerinin oksijen aktarım koşulu ve proses süresince değişimi: $C_{G0}=10 \text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH}_0=6.8$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=0.5 \text{ dm}^3$

LimOT, C_{AA}, kg m^{-3}							
Periyot	t,st	Asp	Glu	Asn	Gly	Phe	C_{AA}
I	0	-	-	0.003	-	0.000	0.003
	3	0.0001	-	0.004	-	0.010	0.014
	6	0.005	-	-	-	0.140	0.145
II	9	0.006	0.012	0.020	0.010	0.170	0.218
	12	0.008	0.034	-	-	0.250	0.292
	15	0.110	0.032	-	-	0.340	0.482
III	18	0.172	0.037	-	-	0.470	0.679
	21	0.270	0.023	-	-	0.490	0.783
	24	0.280	0.026	0.045	-	0.530	0.881
	27	0.260	0.028	0.046	-	0.690	1.024
	30	0.290	0.028	0.046	-	0.670	1.024
LOT1, C_{AA}, kg m^{-3}							
Periyot	t, st	Asp	Glu	Asn	Gly	Phe	C_{AA}
I	0	-	-	-	-	0.035	0.035
	3	-	0.020	-	-	0.200	0.220
	6	-	0.015	-	-	0.300	0.315
II	9	0.097	0.010	-	-	0.320	0.427
	12	0.060	0.070	-	-	0.440	0.570
	15	0.090	0.190	0.016	0,012	0.460	0.768
III	18	0.210	0.150	-	0,010	0.470	0.840
	21	0.090	0.190	0.002	-	0.670	0.952
	24	0.060	0.190	-	-	0.860	1.110
	27	0.080	0.190	-	-	0.900	1.170
	30	0.050	0.190	-	-	0.900	1.140
LOT2, C_{AA}, kg m^{-3}							
Periyot	t,st	Asp	Glu	Asn	Gly	Phe	C_{AA}
I	0	0.010	-	-	-	0.010	0.020
	3	0.018	0.020	-	-	0.180	0.218
	6	0.200	-	-	-	0.240	0.440
II	9	0.190	0.012	-	0.011	0.280	0.493
	12	0.150	0.014	-	-	0.320	0.484
	15	0.170	0.020	-	0.012	0.430	0.632
III	18	0.160	0.021	-	-	0.480	0.661
	21	-	0.030	-	-	0.560	0.590
	24	0.090	0.030	-	-	0.640	0.760
	27	0.120	0.024	0.008	-	0.680	0.832
	30	0.110	0.024	0.008	-	0.750	0.892

Çizelge 4.11 Amino asit derişimlerinin oksijen aktarım koşulu ve proses süresince değişimi: $C_{G0}=10 \text{ kg m}^{-3}$, $pH_0=6.8$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=0.5 \text{ dm}^3$ (*devam*)

MOT1, C_{AA}, kg m^{-3}						
t,st	Asp	Glu	Asn	Gly	Phe	C_{AA}
0	0.0004	-	-	-	0.050	0.0504
3	0.003	0.030	-	-	0.260	0.293
6	0.008	-	-	0.004	0.420	0.532
9	0.006	-	-	0.006	0.500	0.512
12	0.008	0.012	-	-	0.840	0.860
15	0.100	0.018	0.023	-	0.860	1.001
18	0.150	0.030	0.021	-	0.970	1.171
21	0.110	0.024	0.008	-	1.040	1.182
24	0.130	0.021	-	-	1.350	1.501
27	0.170	0.021	-	-	1.560	1.751
30	0.190	0.023	-	-	1.500	1.713
MOT2, C_{AA}, kg m^{-3}						
t, st	Asp	Glu	Asn	Gly	Phe	C_{AA}
0	0.0002	-	-	-	0	0.0002
3	0.013	0.020	-	-	0.153	0.183
6	0.160	0.007	-	-	0.280	0.447
9	0.170	0.013	-	0.013	0.320	0.516
12	0.280	0.014	-	-	0.430	0.724
15	0.340	0.021	-	-	0.510	0.871
18	0.350	0.031	-	-	0.540	0.921
21	0.390	0.032	-	-	0.600	1.022
24	0.430	0.042	-	-	0.710	1.182
27	0.440	0.042	0.007	-	0.790	1.279
30	0.470	0.043	0.007	-	0.820	1.340



Şekil 4.29 pMK4::aroA::aroH taşıyan *r-B. subtilis* A263 ile L-fenilalanin üretiminde amino asit ve toplam amino asit derişimlerinin oksijen aktarım koşulu ve kalma süresi ile değişimi, $C_{G0}=10 \text{ kg m}^{-3}$, $pH_0=6.8$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=0.5 \text{ dm}^3$.

Toplam amino asit derişiminin kalma süresiyle genel olarak arttığı gözlenmiş ve maksimum toplam amino asit derişimine L-fenilalanin üretimi açısından optimum koşul olan MOT1 oksijen aktarım koşulunda ($C_{AA}=1.024 \text{ kg m}^{-3}$) ulaşılmıştır. $t=18 \text{ st}$ 'de LOT2 koşulu için aspartik asit derişimi önce azalmakta $t>21 \text{ st}$ 'den sonra tekrar artmaktadır. LOT2 koşullu için toplam amino asit derişimi $t=9 \text{ st}$ 'e kadar LOT1 ve LimOT koşullarına göre daha yüksek iken $9<t<15 \text{ st}$ 'ler arası LOT1'e, $21<t<30 \text{ st}$ 'ler arasında LimOT, LOT1, MOT1 ve MOT2 koşuluna göre daha düşük toplam amino asit derişimine sahiptir.

Oksijen aktarım hızına bağlı olarak biyoreaktörde hücre dışına aktarılan yan-ürünler organik asitler de araştırılmış ve derişimlerinin değişimi ölçülmüştür. Sitrik, glukonik,

fumarik, α -ketoglutarik, maleik, malik, okzalik ve pirüvik asit biyodönüşüm ortamına aktarılan organik asitlerdir. Çizelge 4.12’de farklı oksijen aktarım koşullarında organik asit derişimlerinin kalma süresiyle değişimi gösterilmiştir. LimOT işletim koşulunda üretim ortamında en yüksek derişimli organik asit, glukonik asit (0.67 kg m^{-3}) olmuş; bunu pirüvik asit (0.095 kg m^{-3}), okzalik asit (0.052 kg m^{-3}), malik asit (0.03 kg m^{-3}), sitrik asit (0.019 kg m^{-3}) ve sıfıra çok yakın derişimlerde olan fumarik (0.0006 kg m^{-3}), α -ketoglutarik (0.0006 kg m^{-3}) ve maleik asit (0.0003 kg m^{-3}) takip etmiştir. LOT1 işletim koşulunda üretim ortamında en yüksek derişimli organik asit, glukonik asit (1.21 kg m^{-3}) olmuş; bunu okzalik asit (0.088 kg m^{-3}), formik asit (0.009 kg m^{-3}), malik asit (0.006 kg m^{-3}), pirüvik asit (0.004 kg m^{-3}), laktik asit (0.002 kg m^{-3}) ve sıfıra çok yakın derişimde olan α -ketoglutarik (0.0007 kg m^{-3}), maleik asit (0.0003 kg m^{-3}) takip etmiştir. LOT2 koşulunda üretim ortamında en yüksek derişimli organik asit, glukonik asit (0.474 kg m^{-3}) olmuş; bunu okzalik asit (0.072 kg m^{-3}), α -ketoglutarik (0.0099 kg m^{-3}), okzalik (0.0045 kg m^{-3}), laktik asit (0.004 kg m^{-3}) ve sıfıra çok yakın derişimde olan pirüvik asit (0.0005 kg m^{-3}) takip etmiştir. MOT1 işletim koşulunda üretim ortamında en yüksek derişimli organik asit, glukonik asit (1.30 kg m^{-3}) olmuş; bunu okzalik asit (0.073 kg m^{-3}), laktik asit (0.003 kg m^{-3}), malik asit (0.0021 kg m^{-3}), α -ketoglutarik (0.0017 kg m^{-3}) takip etmiştir. MOT2 işletim koşulunda üretim ortamında en yüksek derişimli organik asit, glukonik asit (1.42 kg m^{-3}) olmuş; bunu okzalik asit (0.076 kg m^{-3}), pirüvik asit (0.015 kg m^{-3}), malik asit (0.008 kg m^{-3}), laktik asit (0.0053 kg m^{-3}) ve α -ketoglutarik (0.0023 kg m^{-3}) takip etmiştir. İncelenen tüm oksijen aktarım koşullarında glukonik asit en yüksek derişime sahip organik asittir. Buna göre sabit hava giriş hızında, karıştırma hızının artırılması ile ortamda gözlenen organik asitlerden laktik, α -ketoglutarik ve okzalik derişimleri artarken, glukonik, sitrik, fumarik, maleik, malik, pirüvik asit derişimleri azalmaktadır. Sabit karıştırma hızında hava giriş hızının artmasıyla glukonik, α -ketoglutarik ve okzalik asit derişimleri artmaktadır.

Çizelge 4.12 Organik asit derişimlerinin oksijen aktarım koşulu ve proses süresince değişimi: $C_{G0}=10 \text{ kg m}^{-3}$, $pH_0=6.8$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=0.5 \text{ dm}^3$

LimOT, C_{OA} , kg m^{-3}															
Periyot	t,st	Ac	Citr	Fum	For	Glu	α KG	Lac	Mle	Mal	Ox	OxA	Pyr	Suc	C_{OA}
I	0	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0005	-	-	-	-	0.0005
	3	-	0.010	0.0001	-	0.001	-	-	-	0.002	0.005	-	0.0001	-	0.009
	6	-	-	-	-	0.046	0.0001	-	0.0001	0.006	0.006	-	0.0002	-	0.060
	9	-	0.001	0.0001	-	0.320	-	-	-	0.009	0.007	-	0.001	-	0.339
II	12	-	-	-	-	0.280	0.0001	-	-	0.020	0.010	-	0.008	-	0.318
	15	-	-	-	-	0.370	-	-	-	0.030	0.030	-	0.020	-	0.450
	18	-	0.011	0.0002	-	0.630	0.0006	-	0.0003	0.001	0.052	-	0.077	-	0.772
	21	-	0.000	0.0003	-	0.620	-	-	0.0003	0.002	0.050	-	0.087	-	0.760
III	24	-	0.013	0.0004	-	0.650	-	-	0.0002	0.004	0.049	-	0.088	-	0.805
	27	-	0.018	0.0005	-	0.670	0.0001	-	0.0001	0.006	0.048	-	0.091	-	0.834
	30	-	0.019	0.0006	-	0.660	-	-	0.0001	0.005	0.039	-	0.095	-	0.819
LOT1, C_{OA} , kg m^{-3}															
Periyot	t,st	Ac	Citr	Fum	For	Glu	α KG	Lac	Mle	Mal	Ox	OxA	Pyr	Suc	C_{OA}
I	0	-	-	-	0.002	0.003	0.0001	0.0006	-	0.0008	0.0001	-	0.0001	-	0.007
	3	-	-	-	0.004	0.146	0.0003	0.002	0.0001	0.001	0.001	-	0.0009	-	0.156
	6	-	-	-	0.006	0.560	0.0007	0.003	0.0002	0.003	0.002	-	0.002	-	0.577
	9	-	-	-	0.007	0.790	0.0005	0.002	0.0003	0.003	0.021	-	0.001	-	0.825
II	12	-	-	-	0.008	0.890	0.0007	0.0006	0.0001	0.003	0.046	-	0.003	-	0.950
	15	-	-	-	0.009	1.120	0.0006	-	-	0.003	0.082	-	0.003	-	1.216
	18	-	-	-	0.007	1.210	0.0005	-	0.0002	0.003	0.088	-	0.003	-	1.311
	21	-	-	-	-	0.700	-	-	-	0.005	0.051	-	0.003	-	0.759
III	24	-	-	-	0.0004	0.600	0.0001	0.0001	0.0001	0.005	0.055	-	0.003	-	0.664
	27	-	-	-	0.001	0.530	0.0002	-	-	0.006	0.049	-	0.004	-	0.589
	30	-	-	-	0.003	0.580	0.0003	-	-	0.006	0.050	-	0.004	-	0.643

Çizelge 4.12 Organik asit derişimlerinin oksijen aktarım koşulu ve proses süresince değişimi: $C_{G0}=10 \text{ kg m}^{-3}$, $pH_0=6.8$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=0.5 \text{ dm}^3$ (devam)

LOT2, C _{OA} , kg m ⁻³															
Periyot	t,st	Ac	Citr	Fum	For	Glu	αKG	Lac	Mle	Mal	Ox	OxA	Pyr	Suc	C _{OA}
I	0	-	-	-	-	0.032	-	-	-	0.0004	0.0003	-	0.0002	-	0.033
	3	-	-	-	-	0.046	-	-	-	0.0007	0.008	-	0.0005	-	0.055
	6	-	-	-	-	0.260	-	-	-	0.0006	0.002	-	0.0004	-	0.263
II	9	-	-	-	-	0.083	-	-	-	0.0014	0.008	-	-	-	0.092
	12	-	-	-	-	0.350	-	-	-	0.0022	0.001	-	-	-	0.354
	15	-	-	-	-	0.160	0.0008	0.004	-	0.0043	0.014	-	-	-	0.183
III	18	-	-	-	-	0.096	0.0099	0.002	-	0.0045	0.055	-	-	-	0.167
	21	-	-	-	-	0.084	0.0010	0.000	-	0.0028	0.067	-	-	-	0.155
	24	-	-	-	-	0.285	0.0015	0.000	-	0.0027	0.069	-	-	-	0.359
	27	-	-	-	-	0.378	0.0016	0.000	-	0.0026	0.073	-	-	-	0.455
	30	-	-	-	-	0.474	0.0017	0.000	-	0.0024	0.072	-	-	-	0.550
MOT1, C _{OA} , kg m ⁻³															
Periyot	t,st	Ac	Citr	Fum	For	Glu	αKG	Lac	Mle	Mal	Ox	OxA	Pyr	Suc	C _{OA}
I	0	-	-	-	-	0.045	-	-	-	-	0.0002	-	-	-	0.045
	3	-	-	-	-	0.180	0.0001	-	-	-	0.025	-	-	-	0.205
	6	-	-	-	-	0.130	0.0003	0.001	-	0.0001	0.028	-	-	-	0.159
II	9	-	-	-	-	0.250	0.0002	-	-	0.0003	0.038	-	-	-	0.287
	12	-	-	-	-	0.370	-	-	-	0.001	0.047	-	-	-	0.418
	15	-	-	-	-	0.480	-	-	-	-	0.037	-	-	-	0.517
III	18	-	-	-	-	0.300	-	-	-	-	0.027	-	-	-	0.327
	21	-	-	-	-	0.970	0.0005	0.003	-	0.0016	0.067	-	-	-	1.042
	24	-	-	-	-	1.200	0.0014	0.002	-	0.0019	0.069	-	-	-	1.274
	27	-	-	-	-	1.100	0.0017	0.001	-	0.0021	0.070	-	-	-	1.175
	30	-	-	-	-	1.300	0.002	-	-	0.0017	0.073	-	-	-	1.379

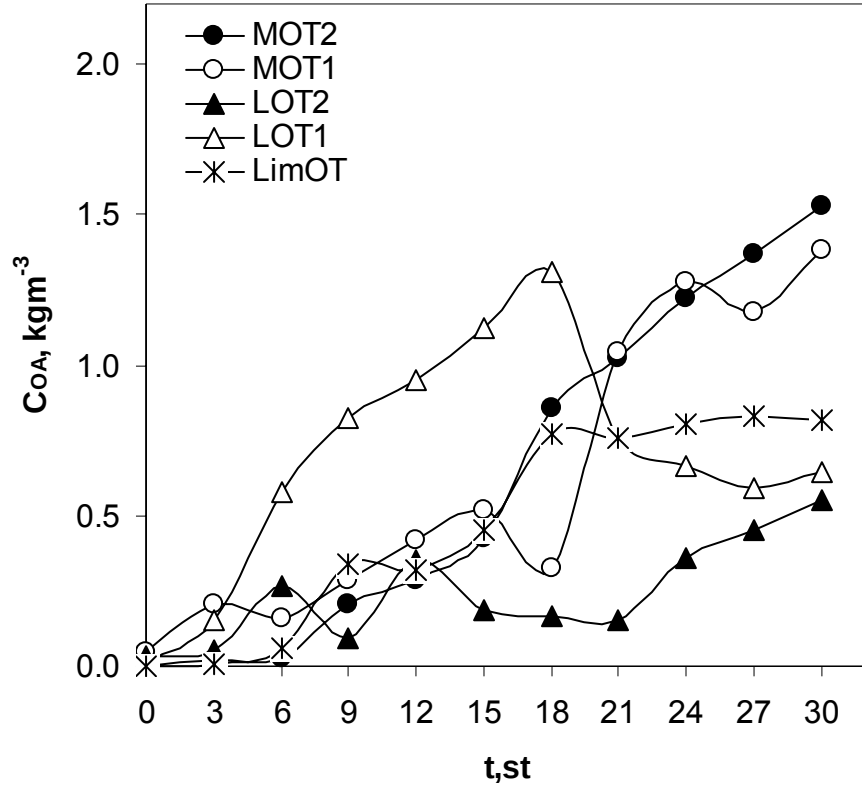
Çizelge 4.12 Organik asit derişimlerinin oksijen aktarım koşulu ve proses süresince değışimi: $C_{G0}=10 \text{ kg m}^{-3}$, $pH_0=6.8$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=0.5 \text{ dm}^3$ (devam)

MOT2, C_{OA} , kg m^{-3}															
Periyot	t,st	Ac	Citr	Fum	For	Glu	α KG	Lac	Mle	Mal	Ox	OxA	Pyr	Suc	C_{OA}
I	0	-	-	-	-	0.0004	-	-	-	0.0006	-	-	0.0006	-	0.002
	3	-	-	-	-	0.009	0.0001	0.0004	-	0.001	0.005	-	0.002	-	0.018
	6	-	-	-	-	0.016	0.0002	0.0006	-	0.002	0.007	-	0.004	-	0.030
	9	-	-	-	-	0.180	0.0004	0.0009	-	0.004	0.017	-	0.003	-	0.205
II	12	-	-	-	-	0.250	0.0006	0.0016	-	0.001	0.026	-	0.005	-	0.284
	15	-	-	-	-	0.390	0.0005	0.003	-	-	0.030	-	0.001	-	0.425
	18	-	-	-	-	0.790	0.0006	-	-	0.005	0.055	-	0.004	-	0.855
	21	-	-	-	-	0.940	0.0007	0.004	-	0.006	0.067	-	0.008	-	1.025
III	24	-	-	-	-	1.130	0.0012	0.0042	-	0.006	0.071	-	0.009	-	1.221
	27	-	-	-	-	1.270	0.0018	0.0051	-	0.006	0.075	-	0.013	-	1.371
	30	-	-	-	-	1.420	0.0023	0.0053	-	0.008	0.076	-	0.015	-	1.527

Çizelge 4.13 Farklı oksijen aktarım koşullarında pMK4::aroA::aroH taşıyan *r-Bacillus subtilis* A263 ile L-fenilalanin üretiminde üretim ortamına salgılanan amino ve organik asitler ile bunların ortamdaki maksimum toplam derişimleri: $C_{G0}=10 \text{ kg m}^{-3}$, $pH_0=6.8$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=0.5 \text{ dm}^3$

Koşul	$C_{AA, \text{maks}}$ (kg m^{-3})	S_P (kg/kg)	Salgılanan amino asitler	$C_{OA, \text{maks}}$ (kg m^{-3})	Salgılanan organik asitler
LimOT	1.024	0.67	Asp, Glu, Asn, Gly, Phe	0.834	Sitrik, Fumarik, Glukonik, α -Ketoglutarik, Maleik, Malik, Okzalik, Pirüvik
LOT1	1.170	0.77	Asp, Glu, Asn, Gly, Phe	1.231	Glukonik, α -Ketoglutarik, Laktik, Malik, Okzalik, Pirüvik
LOT2	0.892	0.84	Asp, Glu, Asn, Gly, Phe	0.550	Formik, Glukonik, α -Ketoglutarik, Laktik, Maleik, Malik, Okzalik, Pirüvik
MOT1	1.751	0.89	Asp, Glu, Asn, Gly, Phe	1.379	Glukonik, α -Ketoglutarik, Laktik, Malik, Okzalik,
MOT2	1.340	0.61	Asp, Glu, Asn, Gly, Phe	1.527	Glukonik, α -Ketoglutarik, Laktik, Malik, Okzalik, Pirüvik

Çizelge 4.13’de pMK4::*aroA*::*aroH* taşıyan *r-Bacillus subtilis* A263 için farklı oksijen aktarım koşullarında üretim ortamına salgılanan amino ve organik asitler ile bunların ortamdaki maksimum toplam derişimleri ve L-fenilalanin’in toplam amino asit derişimine oranı olarak tanımlanan ürün seçimliliği S_p verilmiştir. Buna göre toplam amino asit derişimi oksijen aktarımının artmasıyla salınım göstermektedir. LimOT koşulu için ortamdaki toplam amino asit derişimi 1.024 kg m^{-3} , LOT1 için 1.17 kg m^{-3} , LOT2 koşulu için 0.892 ’dir. L-fenilalanin üretimi açısından optimum oksijen aktarım koşulu olan MOT1 için 1.751 kg m^{-3} ve MOT2 için ise 1.340 kg m^{-3} olarak belirlenmiştir. Maksimum S_p değerine (0.89 kg/kg) pMK4::*aroA*::*aroH* taşıyan *B. subtilis* A263 ile ulaşılmıştır. Üretim ortamına salgılanan toplam organik asit derişimi de oksijen aktarım koşuluna göre salınım göstermektedir. LimOT koşulu için ortamdaki toplam organik asit derişimi 0.834 kg m^{-3} , LOT1 için 1.231 kg m^{-3} , LOT2 koşulu için bu değer 0.55 kg m^{-3} ’tür. L-fenilalanin üretimi açısından optimum oksijen aktarım koşulu olan MOT1 için 1.379 kg m^{-3} ve MOT2 için ise 1.527 kg m^{-3} olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.30 pMK4::*aroA*::*aroH* taşıyan *r-B. subtilis* A263 ile L-fenilalanin üretiminde toplam organik asit derişimlerinin oksijen aktarım koşulu ve kalma süresi ile değişimi: $C_{G0}=10 \text{ kg m}^{-3}$, $pH_0=6.8$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=0.5 \text{ dm}^3$

Düşük oksijen aktarım koşulu olan LimOT koşulunda toplam organik asit derişiminin kalma süresiyle genel olarak değişimi gözlenmiş ve maksimum toplam organik asit derişimine en yüksek oksijen aktarım koşulu olan MOT2 koşulunda ($C_{OA}=1.527 \text{ kg m}^{-3}$) ulaşılmıştır. LimOT koşulu oksijen aktarımının arttırılmasıyla toplam organik asit derişiminin kalma süresiyle artış gösterdiği bulunmuştur. LimOT koşulunda ulaşılan toplam organik asit derişimi ($C_{OA}=0.8187 \text{ kg m}^{-3}$) LOT1 ve LOT2 koşuluna göre daha yüksektir. MOT1 koşulu için maksimum toplam organik asit derişimi $t=30$. saatte ($C_{OA}=1.379 \text{ kg m}^{-3}$) belirlenmiştir (Şekil 4.30).

4.3.1 Oksijen aktarım karakteristikleri

Pilot-ölçek biyoreaktör sistemlerde L-fenilalanin üretim prosesi süresince dinamik yöntem uygulanarak Çizelge 4.14'deki, örneğin, K_{La} , OTR, $-r_O$, vd oksijen aktarım parametreleri hesaplanmıştır. Biyoreaktör sistemlerine ön-sıvı ortamdan mikroorganizma aşılması yapılmadan önce ($t<0$) fiziksel kütle aktarım katsayısı olan K_{La0} değerleri ölçülmüştür. LimOT, LOT1, LOT2, MOT1 ve MOT2 koşulları için hesaplanan K_{La0} değerleri sırasıyla 0.008, 0.009, 0.010, 0.012, 0.013 s^{-1} olup oksijen aktarımının artmasıyla K_{La0} değerleri artmaktadır. K_{La} , E (K_{La}/K_{La0}), OTR, OTR_{maks} , $-r_O$, OD, Da ve η değerlerinin proses süresince değişimi Çizelge 4.14'de verilmiştir. Çizelge 4.14'de periyot I ($0<t<6$), periyot II ($6<t<21$), periyot III ($21<t<30$) olarak tanımlanmıştır. MOT1 işletim koşullunda periyot II'de çözünmüş oksijen derişimi sıfır olduğu için K_{La} değerleri prosesin başında ($t=0.5 \text{ st}$) ve $t>12 \text{ st}$ 'ten sonra belirlenebilmiştir. LimOT, LOT1 LOT2 koşullarında sıvı faz kütle aktarım katsayısı K_{La} kalma süresiyle artmaktadır, MOT1 ve MOT2 koşulları için ise önce artmakta sonra da azalmaktadır. Kimyasal tepkimeli sistemde, tepkime ve gaz-sıvı kütle aktarımının birlikte yer aldığı proseslerde kütle aktarımı çok sayıda parametreye bağlı olarak artabilir. Bunlardan birisi tepkime hızının proses süresince değişimi; diğeri ise kütle aktarım alanında bulunan küçük-ince taneciklerdir. Beenackers (1993) sıvı faz tepkime ortamında bulunan taneciklerin çapının 1.0-0.5 μm olması durumunda, kütle aktarımının önce arttığı ve bu taneciklerin derişiminin artmasıyla da azaldığı belirtmişlerdir. Taneciklerin çapının, kütle aktarım tabakasının kalınlığından fazla olması durumunda gaz absorpsiyonu artmakta, fakat artan tanecik çapıyla da

küçülmektedir. Bu nedenle, 0.6-0.8 µm çapında ve 1.5-3.0 µm uzunluğunda; çubuk şekilli *B.subtilis*'in bulunduğu biyoreaktör ortamın sıvı faz kütle aktarım katsayısı mikroorganizmanın oksijen tüketim hızına, boyutlarına ve derişimine bağı olarak değışmiştir.

Kimyasal tepkimeli kütle aktarım hızının maksimum fiziksel kütle aktarım hızına oranı olarak tanımlanan artma faktörü $E (=K_La/K_{La0})$ incelenen tüm oksijen aktarım koşulunda 1'den büyüktür. Bu durum, biyoreaktörde gerçekleşen oksijen tüketim hızının fiziksel kütle aktarım hızında artmaya neden olduğunu göstermektedir. Boyutları film tabakası mertebesinde olan mikroorganizma da kimyasal tepkimeli kütle aktarım hızının fiziksel kütle aktarım hızından büyük olmasına neden olabilmektedir (Beenackers 1993).

İncelenen oksijen aktarım koşullarında kütle aktarım prensiplerine göre hız kısıtlayıcı basamağın belirlenebilmesi için maksimum oksijen tüketim hızının maksimum kütle aktarımına oranı olarak tanımlanan Damköhler sayısı (Da) ile, oksijen tüketim hızının maksimum oksijen tüketim hızına oranı olarak tanımlanan etkinlik katsayısı (η) bazı kalma sürelerinde oksijen tüketim hızının veya tüketilen oksijen başına hücre veriminin bulunamamasından dolayı hesaplanamamıştır. Da sayısı LimOT, LOT1, LOT2 ve MOT2 (periyot III) ve MOT1 (periyot II) işletim koşulunda $Y_{X/O}$ verim katsayısının sıfır olması nedeniyle hesaplanamamıştır. Da işletim koşulluna göre farklılık göstermektedir. LimOT, LOT1, MOT1 ve MOT2 oksijen aktarım koşulları için periyot I'de 1'den küçük değerlere sahiptir. Oksijen aktarım kısıtlamasının etkin olduğu bu periyot I'de çözünmüş oksijen derişimi hızlı bir şekilde azalmaktadır. Periyot II'de ise LimOT, LOT1 ve LOT2 koşulları için Da sayısı mertebe olarak uyumludur. L-fenilalanin üretimi açısından optimum olan MOT1 koşulu için periyot I'de oksijen aktarım kısıtlamalı iken periyot III'te kütle aktarım kısıtlamalıdır. LimOT, LOT1, LOT2, MOT1 ve MOT2 koşullarında pMK4::aroH taşıyan *r-B.subtilis* A263 ile gerçekleştirilen deney seti verileri kullanılarak hesaplanan Da sayısal değerleri ile aynı koşullarda pMK4::aroA::aroH taşıyan *r-B.subtilis* A263 ile elde edilen Da sayısal değerleri mertebe olarak uyumludur. Etkinlik katsayıları ise 0.004-0.99 değerleri arasındadır. Şekil 4.23 incelendiğinde çözünmüş oksijen derişimi prosesin ilk 3 saati

içerisinde hızla azaldığından oksijen tüketim hızı maksimum oksijen tüketim hızına yakın olduğu için etkinlik katsayısı ilk periyotlarda 1'e yakın değerlerdedir. İlerleyen periyotlarda oksijen tüketim hızının azalması ve maksimum oksijen tüketim hızının artmasıyla etkinlik katsayısı sıfıra yakın değerlerdedir. MOT1 koşulu için periyot I'de etkinlik katsayısı 0.99 iken periyot III'te bu değer 0.004'tür.

Oksijen aktarım hızı (OTR), çözünmüş denge derişimi (C_0^*) ve dinamik çözünmüş oksijen derişimi (C_0) arasındaki fark ile orantılıdır (Denklem 2.7). Oksijen aktarım parametrelerinden bir diğeri olan oksijen tüketim hızının ($-r_O$), incelenen oksijen aktarım koşullarında, biyoprosesin ilk periyotunda OTR'den büyük değerlere sahip iken biyoprosesin diğeri periyotlarında farklılık göstermektedir. $-r_O$ ve OTR değerleri mertebe olarak uyumludur. LimOT, LOT1, LOT2, MOT1 ve MOT2 koşullarında pMK4::*aroH* taşıyan *r-B.subtilis* A263 ile gerçekleştirilen deney seti verileri kullanılarak hesaplanan $-r_O$ değerleri ile aynı koşullarda pMK4::*aroA*::*aroH* taşıyan *r-B.subtilis* A263 ile elde edilen $-r_O$ değerleri ile mertebe olarak uyumludur.

Çizelge 4.14 pMK4::aroA::aroH taşıyan r-*B.subtilis* A263 ile L-fenilalanin üretiminde oksijen aktarım parametrelerinin oksijen aktarım koşulu ve proses süresince değişimi, $C_{G0}=10 \text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH}_0=6.8$, $T=37 \text{ }^\circ\text{C}$, $V_R=0.5 \text{ dm}^3$

Koşul	Periyot	$K_L a \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$E=K_L a/K_L a_0$	$\text{OTR} \times 10^3 \text{ (molm}^{-3}\text{s}^{-1}\text{)}$	$\text{OTR}_{\text{maks}} \times 10^3 \text{ (molm}^{-3}\text{s}^{-1}\text{)}$	$-r_O \times 10^3 \text{ (molm}^{-3}\text{s}^{-1}\text{)}$	$\text{OD} \times 10^3 \text{ (molm}^{-3}\text{s}^{-1}\text{)}$	$\text{Da OD/OTR}_{\text{mx}}$	$\eta -r_O/\text{OD}$
	(t<0)	$K_L a_0=0.008$							
0.2 vvm, 750 rpm (LimOT)	I	0.014	1.75	0.42	2.80	0.54	0.66	0.23	0.810
	II	0.025	3.13	1.14	5.00	1.19	108.30	21.6	0.015
	III	0.026	3.25	0.36	5.20	0.41	-	-	-
	(t<0)	$K_L a_0=0.009$							
0.35 vvm, 500 rpm (LOT1)	I	0.019	2.11	0.83	3.80	0.91	0.96	0.25	0.950
	II	0.024	2.66	3.27	4.80	2.42	64.78	13.49	0.037
	III	-	-	-	-	-	-	-	-
	(t<0)	$K_L a_0=0.010$							
0.35 vvm, 750 rpm (LOT2)	I	0.011	1.10	1.54	2.20	2.04	2.87	1.30	0.710
	II	0.022	2.20	4.15	4.40	0.36	102.90	23.38	0.004
	III	0.022	2.20	1.76	4.40	1.32	-	-	-

Çizelge 4.14 pMK4::aroA::aroH taşıyan *r-B.subtilis* A263 ile L-fenilalanin üretiminde oksijen aktarım parametrelerinin oksijen aktarım koşulu ve proses süresince değişimi, $C_{G0}=10 \text{ kg m}^{-3}$, $pH_0=6.8$, $T=37 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $V_R=0.5 \text{ dm}^3$ (devam)

Koşul	Periyot	$K_L a \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$E=K_L a/K_L a_0$	$OTR \times 10^3 \text{ (molm}^{-3}\text{s}^{-1}\text{)}$	$OTR_{maks} \times 10^3 \text{ (molm}^{-3}\text{s}^{-1}\text{)}$	$-r_O \times 10^3 \text{ (molm}^{-3}\text{s}^{-1}\text{)}$	$OD \times 10^3 \text{ (molm}^{-3}\text{s}^{-1}\text{)}$	$\frac{Da}{OD/OTR_{mx}}$	$\frac{\eta}{-r_O/OD}$
0.5 vvm, 500 rpm (MOT1)	(t<0)	$K_L a_0=0.012$							
	I	0.019	1.58	1.90	3.80	2.10	2.11	0.55	0.990
	II*	0.026	2.17	$K_L a C_o^* = OTR_{maks} = OTR = -r_O = 5.2$			-	-	-
	III	0.025	2.04	5.73	5.00	0.33	51.40	10.28	0.006
0.5 vvm, 750 rpm (MOT2)	(t<0)	$K_L a_0=0.013$							
	I	0.023	1.76	1.38	4.60	1.43	1.70	0.37	0.840
	II	0.037	2.84	0.36	7.40	0.74	49.00	6.62	0.015
	III	0.036	2.76	1.60	7.20	0.42	-	-	-

pMK4::*aroA*::*aroH* taşıyan *r-B.subtilis* A263 ile L-fenilalanin üretiminde farklı oksijen aktarım koşullarında gerçekleştirilen deney verileri kullanılarak sırasıyla tüketilen substrat ve oksijen başına üretilen hücre verimi ($Y_{X/S}$, $Y_{X/O}$) ile tüketilen substrat ve oluşan hücre başına L-fenilalanin verimi ($Y_{P/S}$, $Y_{P/X}$) hesaplanmış ve sonuçlar Çizelge 4.15’de verilmiştir. Çizelge 4.15’de yer alan $Y_{P/S}$ oluşan ürünün tüketilen glukoza oranını ifade etmektedir; verim katsayısı $Y_{P/S}$ tepkime girdisine göre ürün seçimliliğidir. $Y_{X/S}$ değerinin incelenen oksijen aktarım koşullarında kalma süresiyle değişimi hücrenin durgunluk fazına girmesinden ve substrat tüketim hızının azalmasından dolayı genel olarak azalmakta ve en yüksek $Y_{X/S}=1.24$ değerine L-fenilalanin üretimi için optimum olan MOT1 koşulunda ulaşılmıştır. Tüketilen oksijen başına hücre verimi ise Çizelge 4.14’deki $-r_O$ değerlerinden yararlanılarak hesaplanmıştır. Düşük çözünmüş oksijen derişimlerinde $-r_O$ hesaplanamaması ve hücrenin durgunluk fazına girmesi ile r_X değerlerinin sıfıra eşit olması nedeniyle $Y_{X/O}$ verim katsayısı değeri genelde sıfıra eşittir. LimOT koşulu için periyot II’de $Y_{X/O}$ değeri 0.02, LOT2 koşulu için 0.03, MOT2 için 0.37 olarak belirlenmiştir. Hücre başına L-fenilalanin üretimi $Y_{P/X}$ incelendiğinde periyot I ve II’de arttığı gözlenmiştir. Periyot III’te ise, LimOT ve LOT2’de kalma süresiyle önce artmaktadır, LOT1 ve MOT2’de ise hücrelerin durgunluk fazına girmesi nedeniyle biyoprosesin sonlarına doğru sıfır olduğu görülmektedir. En yüksek $Y_{P/X}$ değerine 31.00 MOT1 koşulunda ulaşılmıştır.

Çizelge 4.15 Verim katsayılarının oksijen aktarım koşulu ve kalma süresiyle değişimi:

$$C_{G0}=10 \text{ kg m}^{-3}, \text{ pH}_0=6.8, T=37^\circ\text{C}, V_R=0.5 \text{ dm}^3.$$

LimOT					
Periyot	t,st	$Y_{X/S}, (\text{kg kg}^{-1})$	$Y_{X/O}, (\text{kg kg}^{-1})$	$Y_{P/S}, (\text{kg kg}^{-1})$	$Y_{P/X}, (\text{kg kg}^{-1})$
I	3	0.194	-	0.003	0.015
	6	0.050	-	0.168	3.350
	9	0.250	-	0.150	0.600
	12	0.380	-	0.160	0.421
II	15	0.073	0.02	0.300	4.091
	18	0.540	-	0.650	1.204
	21	0.089	-	0.022	0.250
	24	0.150	-	0.050	0.333
III	27	0.067	-	0.267	4.000
	30	0.008	-	0.008	1.000
Toplam Seçimlilik		0.140	0.00	0.090	0.710

LOT1					
Periyot	t,st	$Y_{X/S}, (\text{kg kg}^{-1})$	$Y_{X/O}, (\text{kg kg}^{-1})$	$Y_{P/S}, (\text{kg kg}^{-1})$	$Y_{P/X}, (\text{kg kg}^{-1})$
I	3	0.573	-	0.226	0.395
	6	0.059	-	0.060	1.020
	9	0.060	-	0.025	0.417
II	12	0.174	-	0.120	0.690
	15	0.218	-	0.023	0.105
	18	0.386	-	0.014	0.037
	21	0.159	-	0.317	2.000
III	24	0.025	-	0.475	19.00
	27	-	-	0.160	-
	30	0.111	-	-	-
Toplam Seçimlilik		0.180	0.00	0.120	0.710

LOT2					
Periyot	t,st	$Y_{X/S}, (\text{kg kg}^{-1})$	$Y_{X/O}, (\text{kg kg}^{-1})$	$Y_{P/S}, (\text{kg kg}^{-1})$	$Y_{P/X}, (\text{kg kg}^{-1})$
I	3	0.370	-	0.198	0.535
	6	0.055	-	0.037	0.667
	9	0.383	-	0.067	0.174
II	12	0.314	-	0.057	0.182
	15	0.160	0.03	0.440	2.750
	18	0.032	-	0.040	1.250
	21	0.213	-	0.100	0.471
III	24	0.109	-	0.073	0.667
	27	0.014	-	0.057	4.000
	30	0.033	-	0.233	7.000
Toplam Seçimlilik		0.150	0.00	0.090	0.590

Çizelge 4.15 Verim katsayılarının oksijen aktarım koşulu ve kalma süresiyle değişimi:

$$C_{G0}=10 \text{ kg m}^{-3}, \text{pH}_0=6.8, T=37^\circ\text{C}, V_R=0.5 \text{ dm}^3(\text{devam})$$

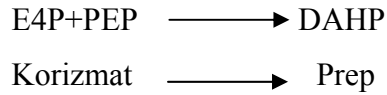
MOT1					
Periyot	t,st	$Y_{X/S}, (\text{kg kg}^{-1})$	$Y_{X/O}, (\text{kg kg}^{-1})$	$Y_{P/S}, (\text{kg kg}^{-1})$	$Y_{P/X}, (\text{kg kg}^{-1})$
I	3	0.370	-	0.244	0.660
	6	0.085	-	0.098	1.143
	9	0.350	-	0.133	0.381
	12	0.300	-	0.486	1.619
II	15	1.240	-	0.080	0.065
	18	0.104	-	0.088	0.846
	21	0.188	-	0.088	0.467
	24	0.009	-	0.282	31.000
III	27	-	-	0.300	-
	30	-	-	0.200	-
Toplam		0.180	0.00	0.120	1.060
Seçimlilik					
MOT2					
Periyot	t,st	$Y_{X/S}, (\text{kg kg}^{-1})$	$Y_{X/O}, (\text{kg kg}^{-1})$	$Y_{P/S}, (\text{kg kg}^{-1})$	$Y_{P/X}, (\text{kg kg}^{-1})$
I	3	0.175	-	0.084	0.481
	6	0.368	-	0.334	0.907
	9	0.117	-	0.022	0.190
	12	0.233	-	0.122	0.524
II	15	0.282	0.37	0.073	0.258
	18	0.144	-	0.033	0.231
	21	0.136	-	0.055	0.400
	24	0.050	-	0.550	11.000
III	27	-	-	0.800	-
	30	-	-	0.200	-
Toplam		0.180	0.00	0.090	0.660
Seçimlilik					

4.4 Metabolik Mühendislik Tasarımlarının L-Fenilalanin Üretimine Etkisi

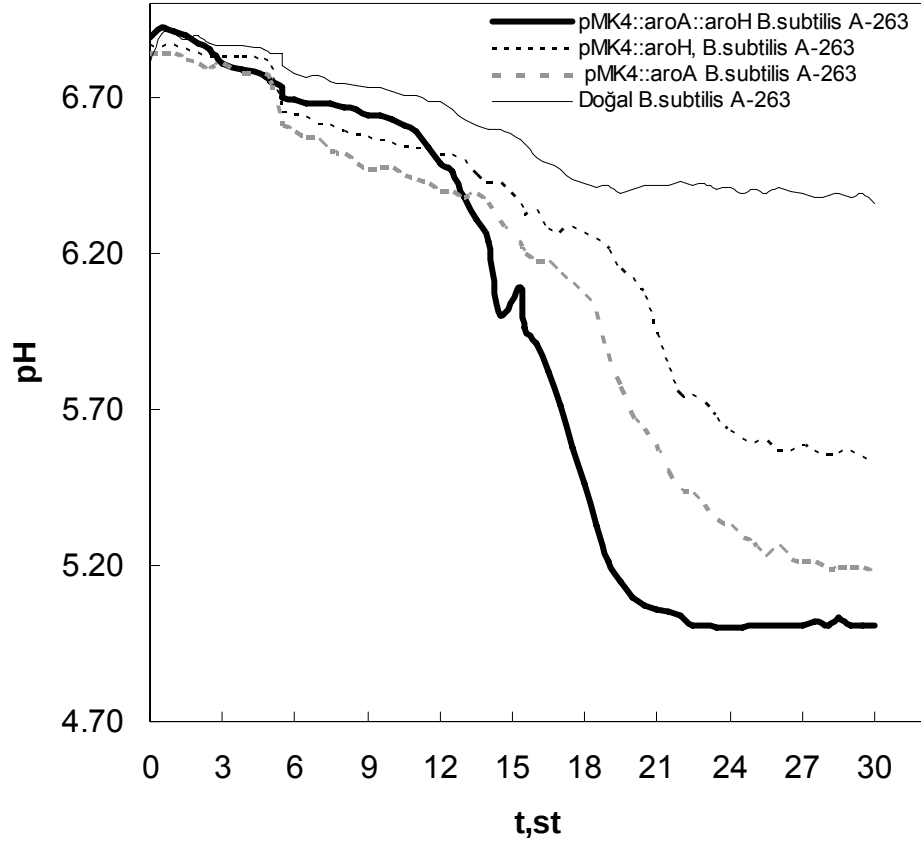
Aromatik amino asit yolizinde metabolik mühendislik araştırma programı kapsamında geliştirilen 3 farklı sistem olan pMK4::*aroH* taşıyan *r-B. subtilis* A263, pMK4::*aroA* taşıyan *r-B. subtilis* A263 ve pMK4::*aroA*::*aroH* taşıyan *r-B. subtilis* A263'lerin pilot-ölçek biyoreaktörlerde L-fenilalanin üretimi açısından optimum koşul olan MOT1 oksijen aktarım koşulunda L-fenilalanin üretim performansları karşılaştırılmıştır.

Şekil 4.31-4.35'de görüldüğü gibi pH ve çözünmüş oksijen derişiminin değişimleri genel olarak paralellik göstermekte; oksijen aktarım koşuluna da bağlı olarak pH önce belli bir kalma süresine kadar farklı hızlarda azalmakta ve sonra da değişmemektedir.

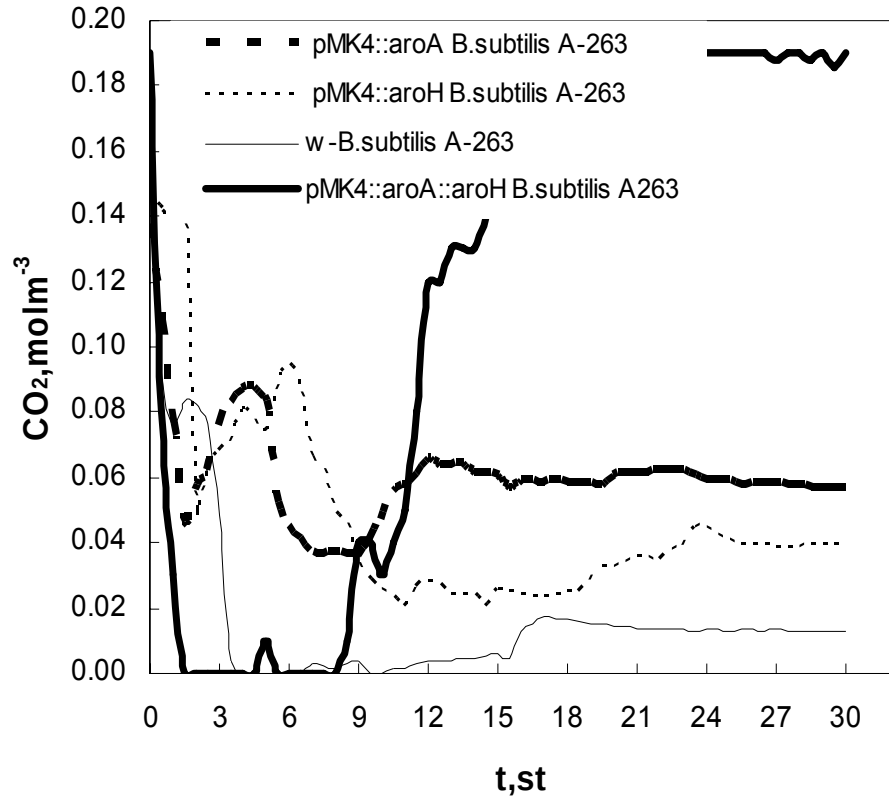
Çözünmüş oksijen derişimi MOT1 koşulunda doğal ve üç *r-B.subtilis* A263 için periyot I’de azalmakta, periyot II’de önce azalmakta sonra da artmakta, periyot III’te ise değişmemektedir. pH profilleri incelendiğinde en fazla pH düşüşü pMK4::*aroA*::*aroH* taşıyan *r-B.subtilis* A263’te gözlenmiştir. pH değişimi ortama salgılanan H⁺ iyonlarından kaynaklanmaktadır. Çizelge 4.16 ve Çizelge 4.17 incelendiğinde, biyoreaktör üretim ortamında en yüksek amino- ve organik- asit derişimlerine pMK4::*aroA*::*aroH* taşıyan *r-B.subtilis* A263’e ulaşıldığından, pH düşüşüne de hidrojen iyonu kaynağı olarak başta organik ve amino asitlerin neden olduğu düşünülürse, bu sonuç beklenmelidir. Hücre ve substrat derişimlerinin kalma süresi ile değişim profilleri incelendiğinde, biyoprosesin periyot III’te hücreler durgunluk fazına ulaşmakta ve substrat tüketim hızı da azalmaktadır. Doğal *B.subtilis* A263, pMK4::*aroH* taşıyan *r-B. subtilis* A263, pMK4::*aroA* taşıyan *r-B. subtilis* A263, pMK4::*aroA*::*aroH* taşıyan *r-B. subtilis* A263 ile sırasıyla başlangıç glukozunun %75, %71, %69 ve %68’i tüketilmiştir. L-fenilalanin derişiminin kalma süresi ve mikroorganizma türü ile değişimi incelendiğinde doğal *B. subtilis* A263 ile 0.12 kg m⁻³, pMK4::*aroH* taşıyan *r-B. subtilis* A263 ile 0.83 kg m⁻³, pMK4::*aroA* taşıyan *r-B. subtilis* A263 ile 0.85 kg m⁻³, pMK4::*aroA*::*aroH* taşıyan *r-B. subtilis* A263 ile 1.5 kg m⁻³ L-fenilalanin üretimi görülmektedir. Buna göre aromatik amino asit yolizindeki dallanma noktaları olan:



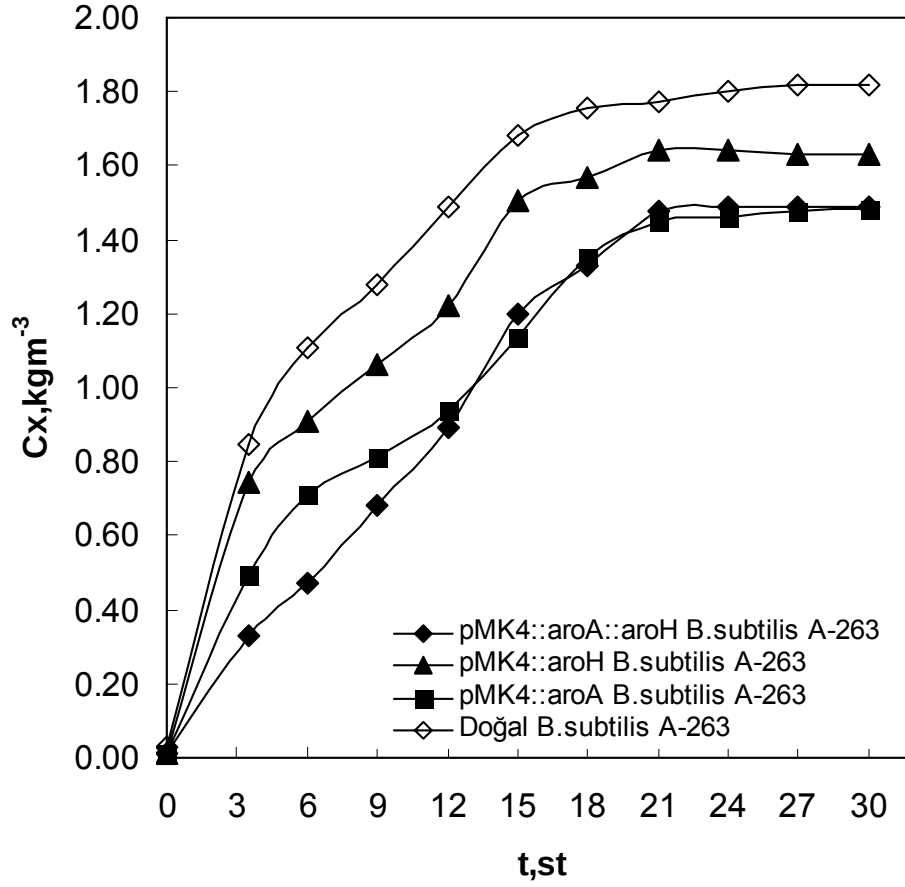
tepkimelerinin darboğaz oluşturduğu ve bu tepkimelerden sorumlu genlerin klonlanmasıyla bu yolizindeki tepkime akıların (hızlarının) ve böylece L-fenilalanin de üretiminin arttığı bulunmuştur.



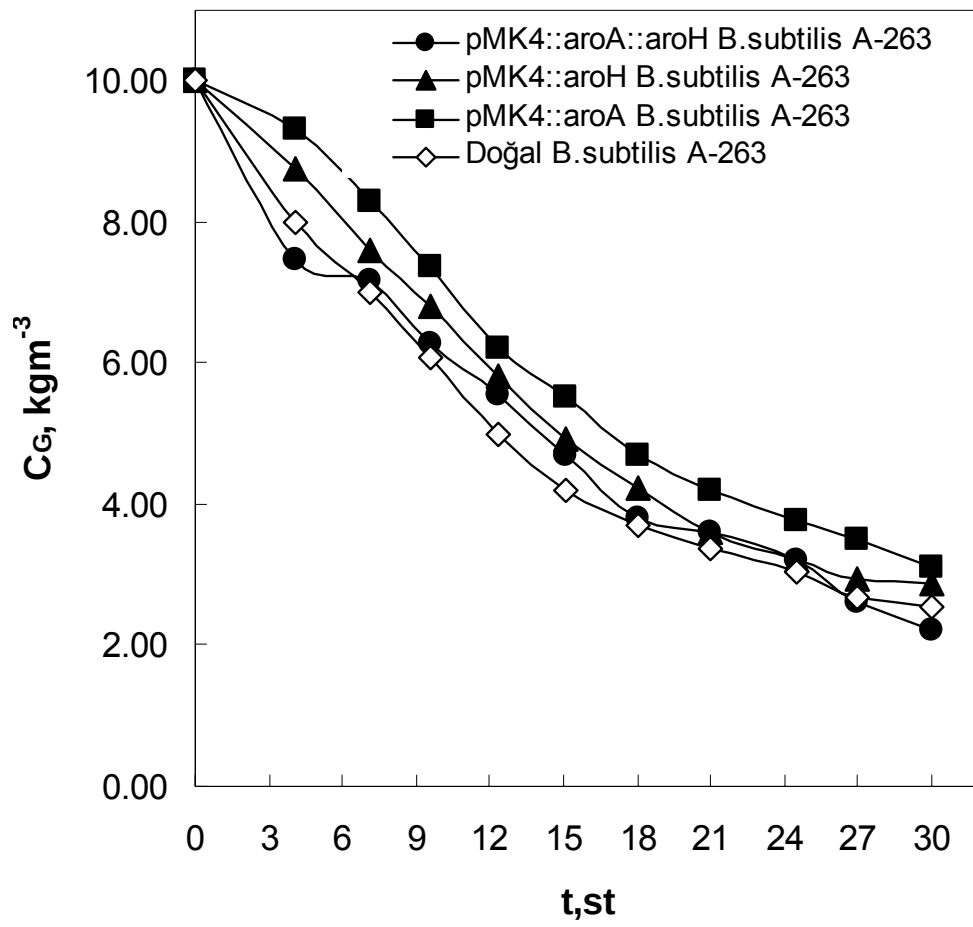
Şekil 4.31 Doğal ve üç *r-B. subtilis* A263 ile MOT1 oksijen aktarım koşulunda kalma süresi ile değişimi: $C_{G0}=10 \text{ kg m}^{-3}$, $pH_0=6.8$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=0.5 \text{ dm}^3$



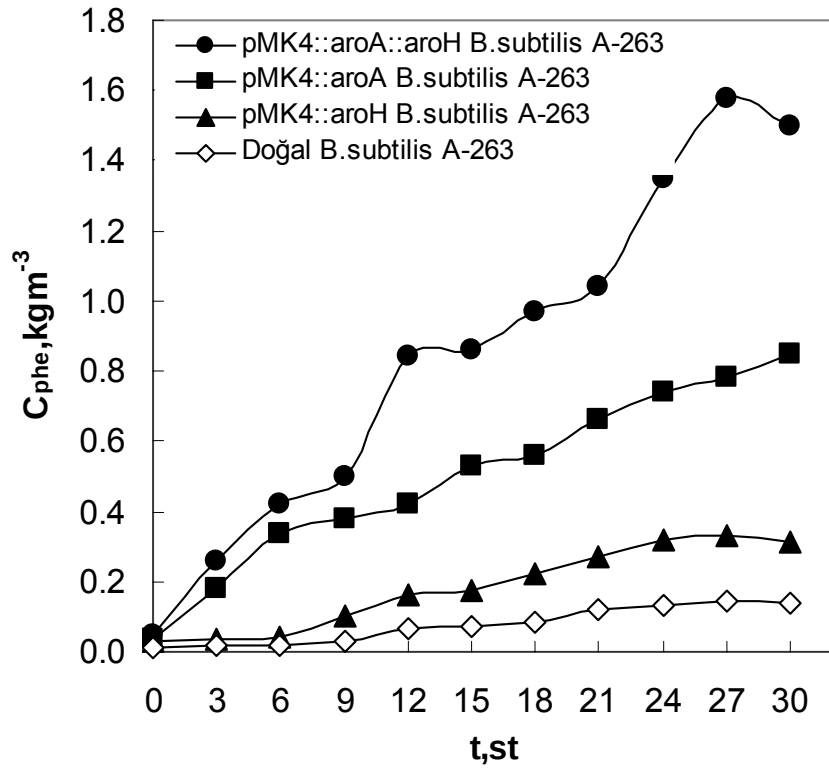
Şekil 4.32 Doğal ve üç *r-B.subtilis* A263 ile MOT1 oksijen aktarım koşulunda çözülmüş oksijen derişiminin kalma süresi ile değişimi: $C_{G0}=10 \text{ kg m}^{-3}$, $pH_0=6.8$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=0.5 \text{ dm}^3$



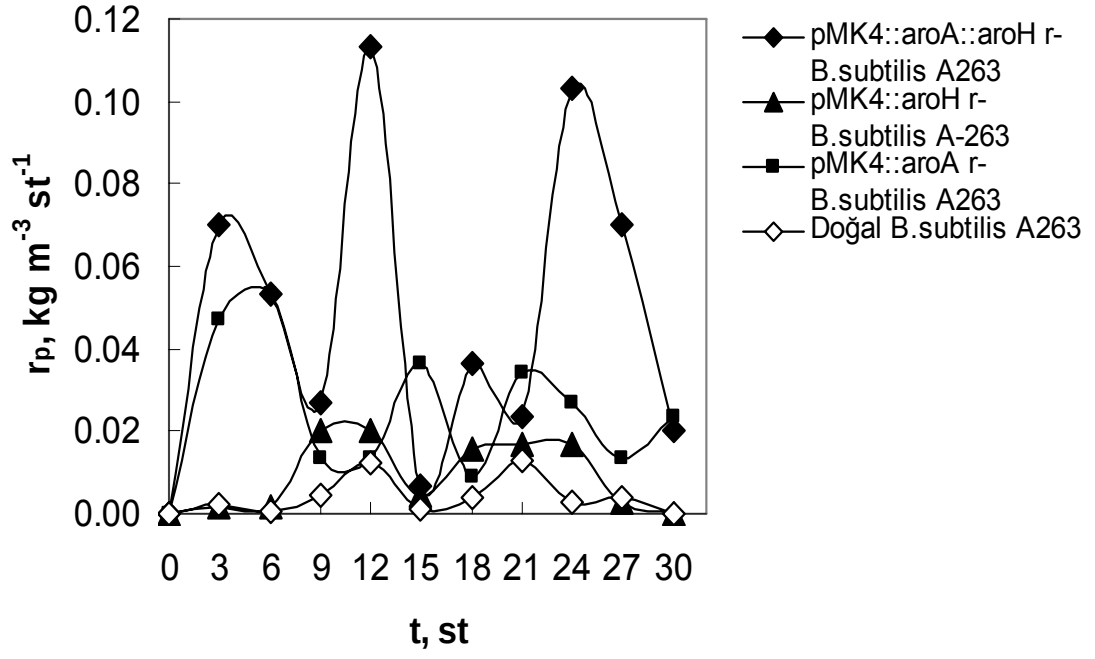
Şekil 4.33 Doğal ve üç r-*B. subtilis* A263 ile MOT1 oksijen aktarım koşulunda hücre derişiminin kalma süresi ile değişimi: $C_{G0}=10 \text{ kg m}^{-3}$, $pH_0=6.8$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=0.5 \text{ dm}^3$



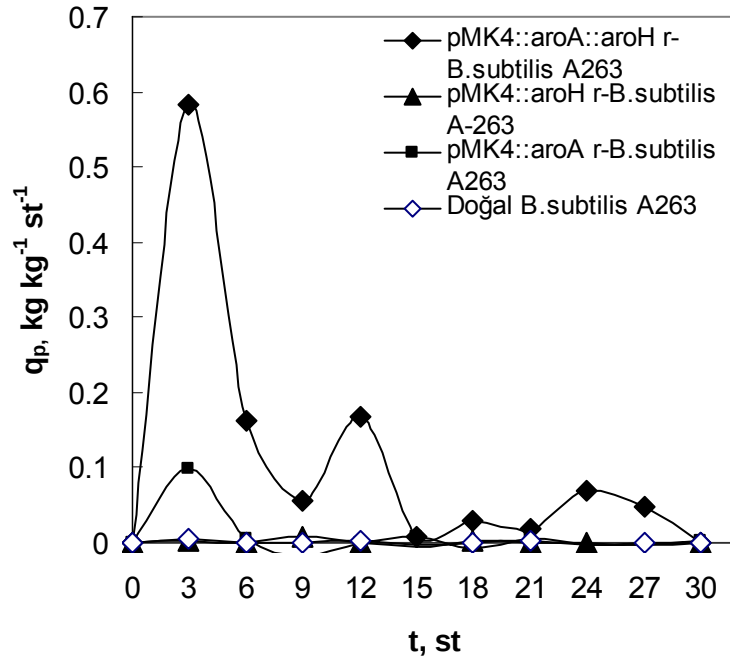
Şekil 4.34 Doğal ve üç r-*B. subtilis* A263 ile MOT1 oksijen aktarım koşulunda glukoz derişiminin kalma süresi ile değişimi: $C_{G0}=10 \text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH}_0=6.8$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=0.5 \text{ dm}^3$



Şekil 4.35 Doğal ve üç *r-B. subtilis* A263 ile MOT1 oksijen aktarım koşulunda L-fenilalanin derişiminin kalma süresi ile değışimi: $C_{Go}=10 \text{ kg m}^{-3}$, $pH_0=6.8$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=0.5 \text{ dm}^3$



Şekil 4.36 Doğal ve üç r-*B. subtilis* A263 ile MOT1 oksijen aktarım koşulunda L-fenilalanin üretim hızının kalma süresi ile değişimi: $C_{G0}=10 \text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH}_0=6.8$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=0.5 \text{ dm}^3$



Şekil 4.37 Doğal ve üç *r-B. subtilis* A263 ile MOT1 oksijen aktarım koşulunda birim zamanda birim hücre başına üretilen L-fenilalanin miktarının kalma süresi ile değişimi: $C_{G0}=10 \text{ kg m}^{-3}$, $pH_0=6.8$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=0.5 \text{ dm}^3$

Şekil 4.36 ve 4.37’de doğal ve rekombinant hücreler ile r_p ve q_p değerlerinin oksijen aktarım koşulu ve kalma süresi ile değişimi verilmektedir. r_p değerlerinin kalma süresi ile değişimi oksijen aktarım koşullarına göre salınım göstermektedir. En yüksek L-fenilalanin üretim hızına $t=12$ ve 24 st ’de ($r_p = 0.11 \text{ kg m}^{-3} \text{ st}^{-1}$) pMK4::aroA::aroH taşıyan *r-B. subtilis* A263 ile ulaşılmıştır. q_p değerlerinin değişimi incelendiğinde, en yüksek değerden başlayarak sırasıyla pMK4::aroA::aroH taşıyan *r-B. subtilis* A-263 ile $t=3 \text{ st}$ ’te $0.58 \text{ kg m}^{-3} \text{ st}^{-1}$, pMK4::aroA taşıyan *r-B. subtilis* A-263 ile $t=3 \text{ st}$ ’te $0.099 \text{ kg m}^{-3} \text{ st}^{-1}$, pMK4::aroH taşıyan *r-B. subtilis* A-263 ile $0.003 \text{ kg m}^{-3} \text{ st}^{-1}$ değerleri elde edilmiştir.

Doğal ve üç *r-B. subtilis* A263 ile MOT1 oksijen aktarım koşulunda ürün L-fenilalanin yanında biyoreaktör üretim ortamına salgılanan diğer amino asitler aspartik asit, glutamik asit, asparajin ve az miktarda glisin bulunmaktadır. Çizelge 4.16’da MOT1 oksijen aktarım koşulu için doğal *B. subtilis* A263 ve üç *r-B. subtilis* A263 ile üretim

ortamına salgılanan amino asit derişimlerinin kalma süresiyle değişimi gösterilmiştir. Çizelge 4.16 incelendiğinde aspartik asit proses süresince bulunurken, doğal *B. subtilis* A263 ile gerçekteştirilen deneyde glisin biyoreaktörde bulunmamaktadır. Yan ürün olarak biyoreaktörde en yüksek derişimde bulunan amino asit aspartik asit ($C_{asp}=0.241 \text{ kg m}^{-3}$) olup, bu değer doğal *B. subtilis* A-263'e aittir. şekil 4.35'de MOT1 koşulunda toplam amino asit derişimin kalma süresinin artışıyla artmaktadır. Maksimum toplam amino asit derişimine ($C_{AA,maks}=1.713 \text{ kg m}^{-3}$) pMK4::*aroA*::*aroH* taşıyan r-*B.subtilis* A263 ile ulaşılmıştır. pMK4::*aroA*::*aroH* taşıyan r-*B.subtilis* A263 ile elde edilen toplam amino asit derişimi, doğal- ve pMK4::*aroH* taşıyan r-*B.subtilis* A263 ve pMK4::*aroA* taşıyan r-*B.subtilis* A263 ile karşılaştırıldığında, sırasıyla 6.2-, 4.0- ve 1.6-kat yüksek L-fenilalanin derişimi elde edilmiştir (şekil 4.38).

Çizelge 4.16 Doğal ve üç r-*B.subtilis* A263 ile MOT1 oksijen aktarım koşulunda toplam amino asit derişimlerinin proses süresince değışimi:

$$C_{G0}=10 \text{ kg m}^{-3}, \text{pH}_0=6.8, T=37^\circ\text{C}, V_R=0.5 \text{ dm}^3$$

Doğal <i>Bacillus subtilis</i> A-263							
Periyot	t, st	Asp	Glu	Asn	Gly	Phe	C _{AA}
I	0	-	-	0.013	-	0.010	0.023
	3	-	-	0.011	-	0.016	0.027
	6	0.020	0.006	-	-	0.018	0.044
	9	0.132	0.006	0.007	-	0.031	0.169
II	12	0.125	0.006	-	-	0.068	0.199
	15	0.241	0.006	-	-	0.071	0.318
	18	0.214	0.007	-	-	0.083	0.304
	21	0.221	0.007	-	-	0.122	0.350
III	24	0.229	0.007	-	-	0.131	0.367
	27	0.123	0.007	-	-	0.143	0.273
	30	0.128	0.007	-	-	0.140	0.275

pMK4::aroH taşıyan r-*Bacillus subtilis* A-263

Periyot	t, st	Asp	Glu	Asn	Gly	Phe	C _{AA}
I	0	-	0.003	-	-	0.030	0.033
	3	-	0.015	-	-	0.035	0.050
	6	0.091	-	-	-	0.040	0.131
	9	0.098	-	-	0.004	0.100	0.202
II	12	0.051	-	-	0.005	0.160	0.216
	15	0.113	0.009	-	-	0.173	0.295
	18	0.116	0.012	0.012	-	0.220	0.360
	21	0.116	0.010	0.008	-	0.270	0.404
III	24	0.112	0.009	-	-	0.320	0.441
	27	0.112	0.009	-	-	0.329	0.450
	30	0.110	0.010	-	-	0.312	0.432

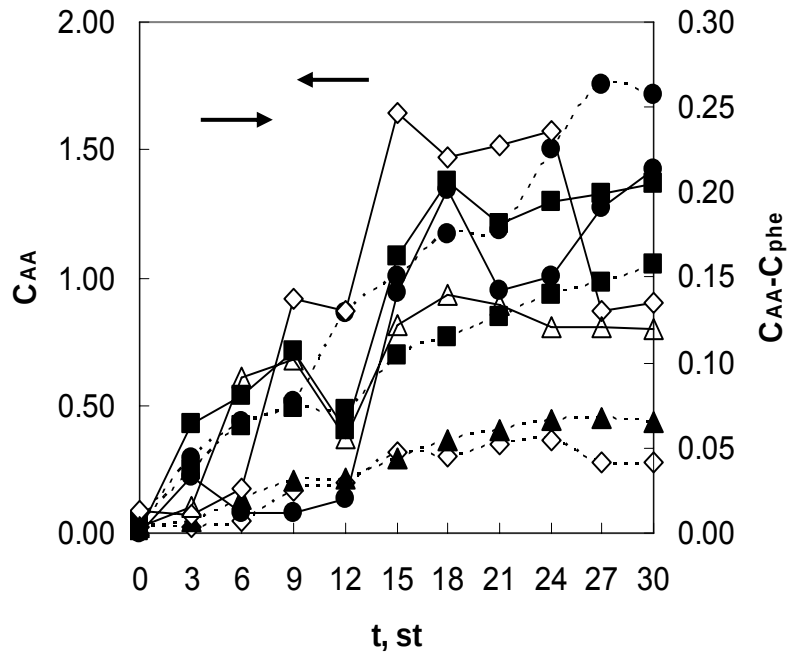
pMK4::aroA taşıyan r-*Bacillus subtilis* A-263

Periyot	t, st	Asp	Glu	Asn	Gly	Phe	C _{AA}
I	0	0.0007	-	0.0001	-	0.038	0.039
	3	0.056	-	0.008	-	0.180	0.244
	6	0.066	0.0006	0.013	0.0006	0.340	0.420
	9	0.073	0.010	0.02	0.004	0.380	0.487
II	12	0.047	0.014	-	-	0.420	0.581
	15	0.140	0.022	-	-	0.530	0.692
	18	0.156	0.036	0.014	-	0.557	0.763
	21	0.151	0.031	-	-	0.660	0.842
III	24	0.151	0.015	0.028	-	0.740	0.934
	27	0.153	0.015	0.031	-	0.780	0.979
	30	0.155	0.018	0.032	-	0.850	1.055

Çizelge 4.16 Doğal ve üç r-*B.subtilis* A263 ile MOT1 oksijen aktarım koşulunda toplam amino asit derişimlerinin proses süresince değışimi:

$C_{G0}=10 \text{ kg m}^{-3}$, $pH_0=6.8$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=0.5 \text{ dm}^3$ (devam)

pMK4::aroA::aroH taşıyan r-<i>Bacillus subtilis</i> A-263							
Periyot	t, st	Asp	Glu	Asn	Gly	Phe	C_{AA}
I	0	0.0004	-	-	-	0.050	0.054
	3	0.003	0.030	-	-	0.260	0.293
	6	0.008	-	-	0.004	0.420	0.432
	9	0.006	-	-	0.006	0.500	0.512
II	12	0.008	0.012	-	-	0.840	0.860
	15	0.100	0.018	0.023	-	0.860	1.001
	18	0.150	0.030	0.021	-	0.970	1.171
	21	0.110	0.024	0.008	-	1.040	1.182
III	24	0.130	0.021	-	-	1.350	1.501
	27	0.170	0.021	-	-	1.560	1.751
	30	0.190	0.023	-	-	1.500	1.713



Şekil 4.38 Doğal ve üç *r-B.subtilis* A263 ile MOT1 oksijen aktarım koşulunda toplam amino asit ve L-fenilalanin dışındaki amino asit derişimlerinin t ile değışimi: $C_{G0}=10 \text{ kg m}^{-3}$, $pH_0=6.8$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=0.5 \text{ dm}^3$

Doğal *B. subtilis* A263 ve *r-B. subtilis* A263 ile MOT1 oksijen aktarım koşulunda yan-ürün olarak hücre dışına aktarılan organik asit derişimlerinin kalma süresiyle değışimi araştırılmıştır. Sitrik, glukonik, fumarik, α -ketoglutarik, maleik, malik, okzalik ve pirüvik asit üretim ortamına aktarılan organik asitlerdir. Çizelge 4.17’de organik asit derişimlerinin kalma süresiyle değışimi gösterilmiştir. Doğal *B.subtilis* A263 ile üretim ortamında en yüksek derişimli organik asitler, glukonik asit (0.741 kg m^{-3}) ve sitrik asit (0.208 kg m^{-3}) olmuş; bunu asetik asit (0.073 kg m^{-3}), laktik asit (0.034 kg m^{-3}), malik asit (0.005 kg m^{-3}), okzalik asit (0.004 kg m^{-3}) ve sıfıra çok yakın derişimde olan fumarik (0.0005 kg m^{-3}) takip etmiştir. *pMK4::aroH* taşıyan *B. subtilis* A263 ile üretim ortamında en yüksek derişimli organik asitler laktik asit (0.63 kg m^{-3}), fumarik asit (0.555 kg m^{-3}), pirüvik asit (0.412 kg m^{-3}), asetik asit (0.041 kg m^{-3}) olmuş; bunu sitrik asit (0.026 kg m^{-3}), formik asit (0.014 kg m^{-3}) takip etmiştir. *pMK4::aroA* taşıyan *r-B. subtilis* A263 ile en yüksek derişimli organik asit, glukonik asit (0.747 kg m^{-3}) olmuş; bunu laktik asit (0.009 kg m^{-3}), okzalik asit (0.008 kg m^{-3}), malik asit (0.001 kg m^{-3}), ve sıfıra çok yakın derişimlerde olan pirüvik asit (0.0005 kg m^{-3}) ve fumarik (0.0002 kg m^{-3}) takip etmiştir.

³⁾ takip etmiştir. pMK4::*aroA*::*aroH* taşıyan *B. subtilis* A263 ile en yüksek derişimli organik asit, glukonik asit (1.30 kg m⁻³) olmuş; bunu okzalik asit (0.073 kg m⁻³), laktik asit (0.003 kg m⁻³), malik asit (0.0021 kg m⁻³) ve α -ketoglutarik (0.002 kg m⁻³) takip etmiştir. MOT1 koşulnda doğal ve r-*B.subtilis* A263'ler ile ulaşıl原因 en yüksek derişime sahip organik asit glukonik asittir (1.30 kg m⁻³).

Çizelge 4.17 Doğal ve üç r-*B.subtilis* A263 ile MOT1 oksijen aktarım koşulunda toplam amino asit derişimlerinin proses süresince değışimi: C_{G0}=10 kg m⁻³, pH₀=6.8, T=37°C, V_R=0.5 dm³

Doğal <i>Bacillus subtilis</i> A-263															
Periyot	t,st	Ac	Citr	Fum	For	Glu	α-KG	Lac	Mle	Mal	Ox	OxA	Pyr	Suc	C _{OA}
I	0	0.001	0.000	-	-	0.007	-	-	-	-	-	-	-	-	0.008
	3	0.026	0.000	0.0001	-	0.125	-	0.012	-	-	-	-	-	-	0.163
	6	0.014	0.000	-	-	0.255	-	0.026	-	-	-	-	-	-	0.295
	9	-	0.000	-	-	0.124	-	0.011	-	-	0.001	-	-	-	0.136
II	12	0.017	0.031	-	-	0.114	-	0.028	-	-	0.004	-	-	-	0.194
	15	0.019	0.042	-	-	0.106	-	0.027	-	-	0.003	-	-	-	0.197
	18	0.019	-	-	-	0.15	-	-	-	-	-	-	-	-	0.169
	21	0.044	0.151	0.0002	-	0.21	-	0.029	-	0.004	0.004	-	-	-	0.442
II	24	0.073	0.208	0.0005	-	0.37	-	0.034	-	0.005	0.004	-	-	-	0.694
	27	0.051	-	-	-	0.582	-	-	-	-	-	-	-	-	0.633
	30	-	0.121	-	-	0.741	-	-	-	-	-	-	-	-	0.862
pMK4::aroH r- <i>Bacillus subtilis</i> A-263															
Periyot	t,st	Ac	Citr	Fum	For	Glu	α-KG	Lac	Mle	Mal	Ox	OxA	Pyr	Suc	C _{OA}
I	0	-	-	-	-	-	-	0.0001	-	-	-	-	0.000	-	0.0001
	3	-	-	-	0.014	-	-	0.010	-	-	-	-	0.011	-	0.035
	6	-	-	-	0.007	-	-	0.002	-	-	-	-	0.022	-	0.031
	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.351	-	0.351
II	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.412	-	0.412
	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.241	-	0.241
	18	-	-	0.155	-	-	-	0.412	-	-	-	-	0.318	-	0.885
	21	0.037	0.021	0.325	-	-	-	0.630	-	-	-	-	0.052	-	1.065
II	24	0.025	0.023	0.415	-	-	-	0.502	-	-	-	-	0.071	-	1.036
	27	0.030	0.026	0.265	-	-	-	0.425	-	-	-	-	0.018	-	0.764
	30	0.041	0.024	0.555	-	-	-	0.322	-	-	-	-	0.102	-	1.044

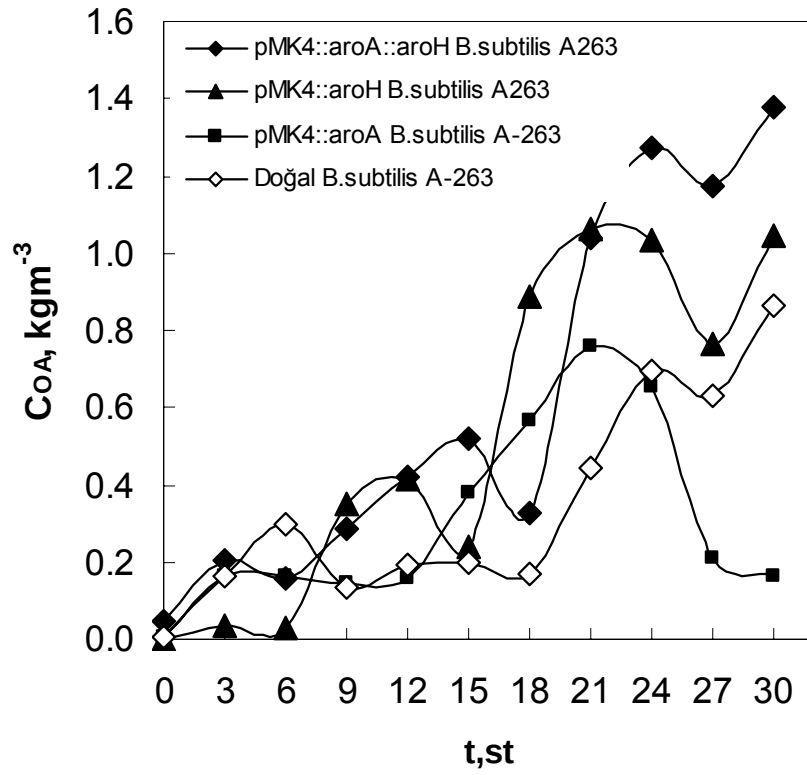
Çizelge 4.17 Doğal ve üç r-*B.subtilis* A263 ile MOT1 oksijen aktarım koşulunda toplam amino asit derişimlerinin proses süresince değışimi: C_{G0}=10 kg m⁻³, pH₀=6.8, T=37°C, V_R=0.5 dm³ (devam)

pMK4::aroA r- <i>Bacillus subtilis</i> A-263															
Periyot	t,st	Ac	Citr	Fum	For	Glu	α-KG	Lac	Mle	Mal	Ox	OxA	Pyr	Suc	C _{OA}
I	0	-	-	-	-	0.003	-	-	-	0.0002	-	-	0.0001	-	0.003
	3	-	-	-	-	0.159	-	-	-	0.0007	0.002	-	0.0005	-	0.162
	6	-	-	-	-	0.164	-	-	-	0.0006	0.001	-	0.0004	-	0.166
	9	-	-	-	-	0.139	-	-	-	-	0.005	-	-	-	0.144
II	12	-	-	-	-	0.154	-	-	-	0.0007	0.004	-	-	-	0.159
	15	-	-	-	0.007	0.360	-	-	-	0.0009	0.012	-	-	-	0.380
	18	-	-	-	-	0.565	-	-	-	0.0006	0.002	-	-	-	0.568
	21	-	-	0.0002	-	0.747	-	0.009	-	0.001	0.001	-	-	-	0.758
II	24	-	-	-	-	0.643	-	0.006	-	0.0009	0.006	-	-	-	0.656
	27	-	-	-	-	0.201	-	-	-	-	0.007	-	-	-	0.208
	30	-	-	-	-	0.154	-	-	-	0.0008	0.008	-	-	-	0.163
pMK4::aroA::aroH r- <i>Bacillus subtilis</i> A-263															
Periyot	t,st	Ac	Citr	Fum	For	Glu	α-KG	Lac	Mle	Mal	Ox	OxA	Pyr	Suc	C _{OA}
I	0	-	-	-	-	0.045	-	-	-	-	0.0002	-	-	-	0.045
	3	-	-	-	-	0.180	0.0001	-	-	-	0.025	-	-	-	0.205
	6	-	-	-	-	0.130	0.0003	0.001	-	0.0001	0.028	-	-	-	0.159
	9	-	-	-	-	0.250	0.0002	-	-	0.0003	0.038	-	-	-	0.287
II	12	-	-	-	-	0.370	-	-	-	0.001	0.047	-	-	-	0.418
	15	-	-	-	-	0.480	-	-	-	-	0.037	-	-	-	0.517
	18	-	-	-	-	0.300	-	-	-	-	0.027	-	-	-	0.327
	21	-	-	-	-	0.970	0.0005	0.003	-	0.0016	0.067	-	-	-	1.042
III	24	-	-	-	-	1.200	0.0014	0.002	-	0.0019	0.069	-	-	-	1.274
	27	-	-	-	-	1.100	0.0017	0.001	-	0.0021	0.070	-	-	-	1.175
	30	-	-	-	-	1.300	0.002	-	-	0.0017	0.073	-	-	-	1.379

Çizelge 4.18 Doğal ve üç r-*Bacillus subtilis* A263 ile MOT1 oksijen aktarım koşulunda üretim ortamına salgılanan amino ve organik asitler ile bunların ortamdaki maksimum toplam derişimleri: $C_{Go}=10 \text{ kg m}^{-3}$, $pH_0=6.8$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=0.5 \text{ dm}^3$

r-plasmid	$C_{AA, \text{maks}}$ (kg m^{-3})	S_P (kg/kg)	Salgılanan amino asitler	$C_{OA, \text{maks}}$ (kg m^{-3})	Salgılanan organik asitler
-	0.367	0.52	Asp, Glu, Asn, Phe	0.862	Asetik, Sitrik, Fumarik, Glukonik, Laktik, Malik, Okzalik
pMK4::aroH (R72)	0.450	0.73	Asp, Glu, Asn, Gly, Phe	1.065	Asetik, Sitrik, Formik, Laktik
pMK4::aroA (R70)	1.055	0.81	Asp, Glu, Asn, Gly, Phe	0.758	Fumarik, Formik, Glukonik,, Laktik, Malik, Okzalik, Pirüvik
pMK4::aroA::aroH (R70+R72)	1.751	0.89	Asp, Glu, Asn, Gly, Phe	1.379	Glukonik, α -Ketoglutarik, Laktik, Malik, Okzalik

Çizelge 4.18’de doğal ve üç r-*Bacillus subtilis* A263 hücreleri için üretim ortamına salgılanan amino ve organik asitler ile bunların ortamdaki maksimum toplam derişimleri, L-fenilalaninin toplam amino asit derişimine oranı olarak tanımlanan ürün seçimliliği S_p verilmiştir. Toplam amino asit derişimi aromatik amino asit yolizindeki iki konum R70 ve R72’ ye yönelik moleküler tasarım doğrultusunda artmıştır. Doğal *B.subtilis* A263 için ortamdaki toplam amino asit derişimi 0.367 kg m^{-3} , pMK4::*aroH* taşıyan *B. subtilis* A263 için 0.450 kg m^{-3} , pMK4::*aroA* taşıyan r-*B. subtilis* A263 için 1.055 kg m^{-3} ve pMK4::*aroA*::*aroH* taşıyan *B. subtilis* A263 için ise 1.751 kg m^{-3} olarak belirlenmiştir. S_p ‘de toplam amino asit derişimine paralel olarak artmıştır. Maksimum S_p değeri 0.89, pMK4::*aroA*::*aroH* taşıyan *B. subtilis* A263 ile elde edilmiştir. Üretim ortamına salgılanan toplam organik asit derişimleri doğal *B.subtilis* A263, pMK4::*aroH* taşıyan *B. subtilis* A263, pMK4::*aroA* taşıyan r-*B. subtilis* A263 ve pMK4::*aroA*::*aroH* taşıyan *B. subtilis* A263 için sırasıyla 0.865 kg m^{-3} , 1.065 kg m^{-3} , 0.758 kg m^{-3} ve 1.379 kg m^{-3} olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.39 Doğal ve üç *r-B. subtilis* A263 ile MOT1 oksijen aktarım koşulunda toplam organik asit derişiminin kalma süresi ile değişimi: $C_{Go}=10 \text{ kg m}^{-3}$, $pH_o=6.8$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=0.5 \text{ dm}^3$

Şekil 4.39’da MOT1 koşulunda toplam organik asit derişimleri prosesin $18 < t < 24$ st’leri arasında artmakta, $t > 24$ st’ten sonra azalmaktadır. Maksimum toplam organik asit derişimine ($C_{OA, \text{maks}}=1.379 \text{ kg m}^{-3}$) pMK4::aroA::aroH taşıyan *r-B.subtilis* A263 ile ulaşılmıştır.

4.4.1 Oksijen aktarım karakteristikleri

Doğal *B. subtilis* A263, pMK4::*aroH* taşıyan *B. subtilis* A263, pMK4::*aroA* taşıyan r-*B. subtilis* A263 ve pMK4::*aroA*::*aroH* taşıyan *B. subtilis* A263 'ün L-fenilalanin üretim performansları MOT1 oksijen aktarım koşulunda incelenmiş; her biyoproses süresince K_{La} , OTR, $-r_O$, vd oksijen aktarım parametreleri hesaplanmış ve Çizelge 4.19'da sunulmuştur. Biyoreaktör sistemlerine ön-sıvı ortamdan mikroorganizma aşılması yapılmadan önce ($t < 0$) fiziksel kütle aktarım katsayısı K_{La0} değerleri ölçülmüştür. MOT1 koşulu için mikroorganizma aşılması yapılmadan önce ($t < 0$) K_{La0} değeri 0.012 s^{-1} olarak ölçülmüştür. K_{La} , $E (=K_{La}/K_{La0})$, OTR, OTR_{maks} , $-r_O$, OD, Da ve η değerlerinin biyoproses süresince değişimi Çizelge 4.19'da periyotlar halinde verilmiştir. Periyot I ($0 < t < 6$), periyot II ($6 < t < 21$), periyot III ($21 < t < 30$) olarak tanımlanmıştır. Doğal *B. subtilis* A263 ile MOT1 işletim koşullunda periyot II'de çözünmüş oksijen derişimi sıfır olduğu için, K_{La} değerleri periyot I ve III'de belirlenebilmiştir. MOT1 koşullunda pMK4::*aroH* taşıyan *B. subtilis* A263, pMK4::*aroA* taşıyan r-*B. subtilis* A263 için sıvı faz kütle aktarım katsayısı K_{La} değeri periyottan-periyota proses süresince azalmakta; pMK4::*aroA*::*aroH* taşıyan *B. subtilis* A263 için ise önce artmakta sonra da azalmaktadır. Hücre içi tepkimelerle kullanılan oksijenin tüketim hızı, biyoreaktörde kütle aktarım hızında artışa neden olmakta; böylece, kimyasal tepkimeli kütle aktarım hızının maksimum fiziksel kütle aktarım hızına oranı olarak tanımlanan artma faktörü $E (=K_{La}/K_{La0})$ 1'den büyük olmaktadır. Damköhler sayısı (Da) doğal *B. subtilis* A263, pMK4::*aroH* taşıyan *B. subtilis* A263 ve pMK4::*aroA*::*aroH* taşıyan *B. subtilis* A263 için periyot I'de, pMK4::*aroA* taşıyan r-*B. subtilis* A263 için ise periyot I ve II'de 1'den küçüktür. Bu durum ($Da < 1$), proseslerin belirtilen periyotlarda biyokimyasal tepkime kısıtlayıcı olduğunu göstermektedir. Doğal *B. subtilis* A263 ve pMK4::*aroA* taşıyan *B. subtilis* A263 için periyot II ve III'te, pMK4::*aroH* taşıyan *B. subtilis* A263 için ise periyot III'te, $Y_{X/O}$ verim katsayısının sıfır olması nedeniyle Da hesaplanamamıştır. Şekil 4.32 incelendiğinde çözünmüş oksijen derişimi prosesin ilk 3 saati içerisinde hızla azaldığından oksijen tüketim hızı maksimum oksijen tüketim hızına yakın olduğu için etkinlik katsayısı ilk periyotlarda 1'e yakın değerlerdedir. İlerleyen periyotlarda oksijen

tüketim hızının azalması ve maksimum oksijen tüketim hızının artmasıyla etkinlik katsayısı sıfıra yakın değerlerdedir.

Oksijen tüketim hız değerleri ($-r_O$) doğal ve üç *r-B.subtilis* A263 hücreleri için -MOT1 koşulunda- biyoprosesin ilk periyotunda OTR değerlerinden daha büyüktür.

Çizelge 4.19 *B. subtilis* A-263, pMK4::*aroA* taşıyan r-*B. subtilis* A-263 ve pMK4::*aroH* taşıyan r-*B. subtilis* A-263'ün MOT1 oksijen aktarım koşulunda oksijen aktarım parametrelerinin proses süresince değişimi, $C_{G0}=10 \text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH}_0=6.8$, $T=37 \text{ }^\circ\text{C}$, $V_R=0.5 \text{ dm}^3$

r-plasmid	Koşul	Periyot	$K_{La} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$E=K_{La}/K_{La0}$	$OTR \times 10^3 \text{ (molm}^{-3}\text{s}^{-1}\text{)}$	$OTR_{maks} \times 10^3 \text{ (molm}^{-3}\text{s}^{-1}\text{)}$	$-r_O \times 10^3 \text{ (molm}^{-3}\text{s}^{-1}\text{)}$	$OD \times 10^3 \text{ (molm}^{-3}\text{s}^{-1}\text{)}$	$\frac{Da}{OD/OTR_{mx}}$	$\frac{\eta}{-r_0/OD}$
-	0.5 vvm, 500 rpm (MOT1)	(t<0)	$K_{La0}=0.012$							
		I	0.013	1.08	1.43	2.6	1.51	1.86	0.71	0.810
		II	-	-	-	-	-	-	-	-
		III	-	-	-	-	-	-	-	-
pMK4:: <i>aroH</i> (R72)	0.5 vvm, 500 rpm (MOT1)	(t<0)	$K_{La0}=0.012$							
		I	0.019	1.58	0.82	3.8	1.17	1.26	0.33	0.920
		II	0.015	1.25	0.67	3.0	0.69	1.35	0.45	0.511
		III	-	-	-	-	-	-	-	-
pMK4:: <i>aroA</i> (R70)	0.5 vvm, 500 rpm (MOT1)	(t<0)	$K_{La0}=0.012$							
		I	0.021	1.75	1.21	4.2	1.23	1.25	0.29	0.980
		II	0.015	1.25	1.57	3.0	1.60	1.76	0.58	0.910
		III	-	-	-	-	-	-	-	-

Çizelge 4.19 *B. subtilis* A-263, pMK4::*aroA* taşıyan r-*B. subtilis* A-263 ve pMK4::*aroH* taşıyan r-*B. subtilis* A-263'ün MOT1 oksijen aktarım koşulunda oksijen aktarım parametrelerinin proses süresince değişimi, $C_{G0}=10 \text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH}_0=6.8$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=0.5 \text{ dm}^3$ (devam)

r-plasmid	Koşul	Periyot	$K_L a \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$E=K_L a/K_L a_0$	$OTR \times 10^3 \text{ (mol m}^{-3} \text{ s}^{-1}\text{)}$	$OTR_{\text{maks}} \times 10^3 \text{ (mol m}^{-3} \text{ s}^{-1}\text{)}$	$-r_O \times 10^3 \text{ (mol m}^{-3} \text{ s}^{-1}\text{)}$	$OD \times 10^3 \text{ (mol m}^{-3} \text{ s}^{-1}\text{)}$	$\frac{Da}{OD/OTR_{\text{mx}}}$	$\frac{\eta}{-r_0/OD}$
pMK4:: <i>aroA</i> :: <i>aroH</i> (R70+R72)	0.5 vvm, 500 rpm (MOT1)	(t<0)	$K_{La0}=0.012$							
		I	0.019	1.58	1.90	3.8	2.10	2.11	0.55	0.990
		II*	0.026	2.17	$K_L a C_o^* =$ $OTR_{\text{max}} =$ $OTR = -r_0 = 5.2$	-	-	-		
		III	0.025	2.04	5.73	5.0	0.33	51.40	10.28	0.006

Doğal *B. subtilis* A263, pMK4::*aroH* taşıyan *B. subtilis* A263, pMK4::*aroA* taşıyan r-*B. subtilis* A263 ve pMK4::*aroA*::*aroH* taşıyan *B. subtilis* A263 ile MOT1 oksijen aktarım koşulunda gerçekleştirilen L-fenilalanin üretim prosesleri deney verileri kullanılarak, sırasıyla, tüketilen substrat ve oksijen başına üretilen hücre verimi ($Y_{X/S}$, $Y_{X/O}$) ile tüketilen substrat ve oluşan hücre başına L-fenilalanin verimi ($Y_{P/S}$, $Y_{P/X}$) hesaplanmış ve sonuçlar Çizelge 4.20'de verilmiştir. Tüketilen substrat başına üretilen hücre verimi kalma süresiyle değişimi doğal ve üç r-*B. subtilis* A263 için periyot I'de azalmakta; periyot II'de ise önce artmakta sonra da azalmaktadır. Periyot III'te hücrelerin durgunluk fazında olması ve substrat tüketim hızının azalmasından dolayı genel olarak azalmaktadır. En yüksek $Y_{X/S}=1.24$ değerine maksimum L-fenilalanin derişimi elde edilen pMK4::*aroA*::*aroH* taşıyan *B. subtilis* A263 ile ulaşılmıştır. Tüketilen oksijen başına hücre verimi ise Çizelge 4.19'daki $-r_0$ değerlerinden yararlanılarak hesaplanmıştır. Düşük çözünmüş oksijen derişimlerinde $-r_0$ hesaplanamaması ve hücrenin durgunluk fazına girmesi ile r_x değerlerinin sıfıra eşit olması nedeniyle $Y_{X/O}$ verim katsayısı değeri genelde sıfıra eşittir. pMK4::*aroH* taşıyan r-*B. subtilis* A263 için periyot I ve II'de sırasıyla 0.42, 0.71, 0.27, 0.67, pMK4::*aroA* taşıyan r-*B. subtilis* A263 için periyot II'de 0.98 olarak hesaplanmıştır. Bunun yanısıra $Y_{P/S}$ değerleri karşılaştırıldığında periyot I'de azalmakta, periyot II için önce artmakta sonra da azalmakta, periyot III için ise doğal *B. subtilis* A263 ve pMK4::*aroA*::*aroH* taşıyan *B. subtilis* A263 için önce artmakta sonra da azalmakta, pMK4::*aroH* taşıyan *B. subtilis* A263, pMK4::*aroA* taşıyan r-*B. subtilis* A263 için ise önce azalmakta sonra da artmaktadır. $Y_{P/X}$ değerleri karşılaştırıldığında periyotlara ve mikroorganizmaya göre farklılık göstermektedir. En yüksek $Y_{P/X}$ değerine (31.00) pMK4::*aroA*::*aroH* taşıyan *B. subtilis* A263 ile ulaşılmıştır.

Çizelge 4.20 Doğal ve üç r-*B.subtilis* A263 için MOT1 oksijen aktarım koşulunda verim katsayılarının proses süresince değişimi

Doğal <i>Bacillus subtilis</i> A-263					
Periyot	t,st	$Y_{X/S}$ (kg kg ⁻¹)	$Y_{X/O}$ (kg kg ⁻¹)	$Y_{P/S}$ (kg kg ⁻¹)	$Y_{P/X}$ (kg kg ⁻¹)
I	3	0.409	-	0.003	0.007
	6	0.262	-	0.002	0.008
	9	0.183	-	0.014	0.076
II	12	0.194	-	0.035	0.178
	15	0.240	-	0.004	0.016
	18	0.155	-	0.024	0.158
	21	0.042	-	0.118	2.786
III	24	0.086	-	0.026	0.300
	27	0.047	-	0.035	0.750
	30	0.008	-	-	3.000
Toplam Seçimlilik		0.240	0.00	0.020	0.070

pMK4::aroH r- <i>Bacillus subtilis</i> A-263					
Periyot	t,st	$Y_{X/S}$ (kg kg ⁻¹)	$Y_{X/O}$ (kg kg ⁻¹)	$Y_{P/S}$ (kg kg ⁻¹)	$Y_{P/X}$ (kg kg ⁻¹)
I	3	0.590	-	0.004	0.007
	6	0.143	0.420	0.004	0.030
	9	0.193	0.710	0.075	0.390
II	12	0.160	0.270	0.060	0.375
	15	0.322	0.670	0.015	0.046
	18	0.094	-	0.067	0.712
	21	0.111	-	0.079	0.714
III	24	-	-	0.125	-
	27	-	-	0.036	0.900
	30	-	-	0.189	-
Toplam Seçimlilik		0.230	0.000	0.040	0.170

pMK4::aroA r- <i>Bacillus subtilis</i> A-263					
Periyot	t,st	$Y_{X/S}$ (kg kg ⁻¹)	$Y_{X/O}$ (kg kg ⁻¹)	$Y_{P/S}$ (kg kg ⁻¹)	$Y_{P/X}$ (kg kg ⁻¹)
I	3	0.715	-	0.209	0.292
	6	0.210	-	0.155	0.741
	9	0.107	-	0.043	0.408
II	12	0.108	-	0.034	0.317
	15	0.290	0.980	0.159	0.550
	18	0.261	-	0.033	0.126
	21	0.204	-	0.210	1.030
III	24	0.023	-	0.182	8.000
	27	0.077	-	0.154	2.000
	30	0.011	-	0.184	17.500
Toplam Seçimlilik		0.210	0.000	0.120	0.613

Çizelge 4.20 Doğal ve üç *r-B.subtilis* A263 için MOT1 oksijen aktarım koşulunda verim katsayılarının proses süresince değişimi (*devam*)

Periyot	pMK4::aroA::aroH <i>r-Bacillus subtilis</i> A-263				
	t,st	$Y_{X/S}$ (kg kg ⁻¹)	$Y_{X/O}$ (kg kg ⁻¹)	$Y_{P/S}$ (kg kg ⁻¹)	$Y_{P/X}$ (kg kg ⁻¹)
I	3	0.370	-	0.244	0.660
	6	0.085	-	0.098	1.143
	9	0.350	-	0.133	0.381
II	12	0.300	-	0.486	1.619
	15	1.240	-	0.080	0.065
	18	0.104	-	0.088	0.846
	21	0.188	-	0.088	0.467
	24	0.009	-	0.282	31.000
III	27	-	-	0.300	-
	30	-	-	0.200	-
Toplam Seçimlilik		0.180	0.00	0.120	1.060

4.5 Hücre-İçi Tepkime Hızları

4.5.1 Oksijen aktarımının hücre-içi tepkime hızlarına etkisi

pMK4::aroA::aroH taşıyan *B. subtilis* A263 ile L-fenilalanin üretiminde farklı oksijen aktarım koşullarının metabolik yolizindeki darboğaz oluşturan tepkimelerin hızlarına (akıları) etkisini belirleyebilmek amacıyla metabolik akı analizi beş farklı oksijen aktarım koşulunda yapılmıştır. Oksijen aktarımının hücreiçi tepkime hızlarına etkilerinin incelenebilmesi amacıyla, biyoproses süresince ölçülen glukoz, hücre, L-fenilalanin, diğer amino asitler ile organik asitlerin derişimlerinin kalma süresi ile değişimleri kullanılarak LimOT, LOT1, LOT2, MOT1 ve MOT2 işletim koşulları için her periyotta metabolik akı analizi yapılmıştır. Hücre çoğalma ve L-fenilalanin üretim profilleri dikkate alındığında, hücre çoğalmasının log faz süreci ve L-fenilalanin üretiminin başladığı periyot I ($0 < t \leq 6$ st), üstel çoğalma fazı süreci periyot II ($6 < t \leq 21$ st) ve üstel çoğalma fazının sonu aynı zamanda da L-fenilalanin üretiminin maksimum değere ulaştığı periyot III ($21 < t \leq 30$ st) olmak üzere ($t = 3$ st, $t = 6$ st ve $t = 21$ st) metabolik akı analizi yapılmış ve sonuçlar Çizelge 4.21’de verilmiştir. Metabolik akı analiziyle aşağıdaki metabolik özellikler bulunmuştur.

Çizelge 4.21’de görüldüğü gibi tüm oksijen aktarım koşullarında tepkime akıları kalma süresi ile azalmıştır. L-fenilalanin üretim prosesinde glikoliz yolizi tepkime akılarının kalma süresi ile değişimi incelendiğinde; glukozun substrat olarak kullanılması nedeniyle glikoliz yolizindeki 1-13 numaralı tepkimelerin genel olarak tüm oksijen aktarım koşullarında aktif olduğu ve kalma süresiyle tepkime akılarının azaldığı özellikle periyot III’te glukoz tüketim hızlarının azalması nedeniyle glikoliz yolizi tepkime akılarının paralel olarak azaldığı belirlenmiştir. Nükleik asitlerin ve hücre oluşumunda önemli girdi olan R5P pentoz fosfat yolizi için dallanma noktasıdır; F6P veya G6P’den Gluc6P oluşumunu takiben üretilmektedir. Glikoliz yolizinden pentoz fosfat yolizine bağlantı periyot I’de LimOT oksijen aktarım koşulunda periyot I ve II’de G6P, periyot III’te G6P, F6P ve T3P; LOT1 koşulunda periyot I ve II’de G6P, periyot II ve III’te F6P ile T3P; LOT2 ve MOT2 koşullarında periyot II’de G6P, periyot I ve III’te F6P ile T3P; MOT1 koşulunda ise periyot II’de G6P, periyot I, II ve III’te F6P ile T3P ile olmuştur.

Glikoliz yolizinden TCA döngüsüne dallanma noktaları olan anaplerotik reaksiyonlardan OA’dan Pyr’ın sentezlendiği R37 tepkimesi LOT1 koşulu için periyot II, LOT2 koşulu için periyot III süresinde aktif, Mal’dan Pyr’ın sentezlendiği R36 tepkimesi LOT1 koşulu için periyot III, MOT1 için periyot II ve III’te aktif olup LimOT, LOT2 ve MOT2 koşullarında aktif değildir. Pyr’dan OA’nın sentezlendiği R38 tepkimesi, LimOT koşulunda periyot I ve II’de; LOT1 koşulunda periyot I ve III’te, LOT2 koşulunda periyot II’de, MOT2’de ise periyot I ve II’de aktiftir, ancak MOT1 koşulunda aktif değildir.

Glikoliz yolizinde AcCoA’nın sentezlendiği R13 tepkimesinin akısı LOT1 için periyot III’te ve LimOT koşulu için her üç periyotta sıfır olduğu için TCA döngüsü aktif değildir ve döngüdeki dallanma noktası metabolitleri α KG ve OA döngü dışında üretilmiştir. α KG incelenen oksijen aktarım koşullarında R50, R55, R56, R58, R59, R64, R68, R72, R73 ve R79 tepkimeleriyle sentezlenmiştir.

Toplam ATP üretim akıları periyot I'de LimOT, LOT1, LOT2, MOT1 ve MOT2 koşulları için sırasıyla, 6.655, 11.705, 22.828, 28.429, 36.850 mmol g⁻¹ st⁻¹; periyot II 'de 7.758, 12.847, 28.558, 30.129, 38.387, periyot III'te ise 3.262, 3.716, 6.285, 9.455, 16.187, mmol g⁻¹ st⁻¹ olarak hesaplanmıştır.

Aromatik grup amino asitlerin yolizi tepkimeleri karşılaştırıldığında R70-74 tepkimelerinin akısı kalma süresiyle oksijen aktarım koşulundan etkilenmekte ve farklılık göstermektedir. Aromatik amino asit yolizinin ilk tepkimesi olan PEP+E4P'den DAHP oluşum R70 tepkime akısı kalma süresiyle önce artmış sonra da azalmıştır. MOT1 koşulu için R70 tepkimesinin akısı periyot II'de periyot I değerinden yaklaşık 5 kat daha yüksektir. Kalma süresiyle L-fenilalanin sentez tepkimesi akısı R73 önce artmış sonra da azalmıştır. L-fenilalanin üretimi açısından optimum koşul olan MOT1 koşulu için tirozin üretim tepkimesi akısı R74 ve triptofan üretim tepkimesi akısı R75 ise kalma süresiyle azalmıştır ve, periyot III'te tirozin ve triptofan üretimi yoktur. Böylece kalma süresiyle sadece L-fenilalanin üretimi değil, L-fenilalaninin aromatik grup amino asitlere göre seçimliliği de artmıştır.

Çizelge 4.21 pMK4::aroA::aroH ile hücre içi tepkime hızlarının oksijen aktarım koşulu ve proses süresince değişimi: $C_{G0}=10 \text{ kg m}^{-3}$, $pH_0=6.8$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=0.5 \text{ dm}^3$

	LimOT			LOT1			LOT2			MOT1			MOT2		
R#	(mmol g ⁻¹ st ⁻¹)			(mmol g ⁻¹ st ⁻¹)			(mmol g ⁻¹ st ⁻¹)			(mmol g ⁻¹ st ⁻¹)			(mmol g ⁻¹ st ⁻¹)		
	Periyot I	Periyot II	Periyot III	Periyot I	Periyot II	Periyot III	Periyot I	Periyot II	Periyot III	Periyot I	Periyot II	Periyot III	Periyot I	Periyot II	Periyot III
1	6.720	6.022	1.455	5.185	1.085	1.060	1.210	1.155	0.760	1.730	0.760	0.598	7.381	1.921	1.893
3	1.700	1.441	1.437	1.048	0.990	0.000	1.202	0.000	0.750	1.711	0.890	0.556	7.348	1.609	1.588
4	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
5	4.430	4.275	3.877	3.232	0.940	0.836	4.737	1.127	0.621	1.190	0.776	0.551	7.033	1.329	1.242
6	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
7	9.922	9.664	2.494	7.129	1.772	1.659	1.907	2.686	1.114	2.068	1.409	1.055	13.833	2.813	2.290
8	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
9	9.274	9.016	2.326	6.646	1.695	1.375	1.844	2.643	1.026	1.931	1.322	0.959	13.442	2.469	2.229
10	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
11	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.267	0.014	0.000	0.000	0.000	5.349	0.000	0.783
12	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
13	0.000	0.000	0.000	1.149	1.140	0.000	0.000	0.075	0.273	0.000	0.741	2.331	0.977	0.160	0.000
14	5.227	5.066	0.000	5.146	0.078	0.000	0.000	1.850	0.000	0.000	0.194	0.000	0.000	0.829	0.000
15	5.227	5.066	0.000	5.146	0.078	0.000	0.000	1.850	0.000	0.000	0.194	0.000	0.000	0.829	0.000
16	2.868	2.761	0.000	2.964	0.000	0.000	0.000	1.130	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.274	0.000
17	0.000	0.000	0.132	0.000	0.145	0.102	0.131	0.000	0.123	0.511	0.000	0.110	0.297	0.000	0.143
18	1.909	1.855	0.107	1.847	0.000	0.002	0.093	0.695	0.001	0.000	0.050	0.051	0.029	0.274	0.067
19	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.206	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
20	1.909	1.855	0.017	1.847	0.000	0.002	0.093	0.695	0.001	0.000	0.050	0.051	0.029	0.274	0.067
21	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.206	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
22	0.959	0.905	0.000	1.117	0.000	0.000	0.000	0.435	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
23	0.000	0.000	0.149	0.000	0.145	0.103	0.224	0.000	0.125	0.306	0.050	0.161	0.326	0.000	0.209
24	1.901	1.848	0.015	1.842	0.000	0.000	0.092	0.694	0.000	0.000	0.048	0.050	0.025	0.270	0.066
25	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.208	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
26	0.050	0.152	0.025	0.015	0.025	0.00022	0.460	0.025	0.000	0.150	0.000	0.148	0.111	0.091	0.063
27	0.050	0.152	0.025	0.015	0.025	0.00022	0.460	0.025	0.000	0.150	0.000	0.148	0.111	0.091	0.063
28	0.000	0.000	0.000	0.000	0.022	0.000	0.000	0.018	0.000	0.000	0.000	0.014	0.002	0.005	0.018
29	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.009	0.004	0.000	0.0004	0.008	0.0004	0.000	0.000	0.000	0.000
30	0.000	0.000	0.000	0.591	0.000	0.000	0.074	0.000	0.000	0.000	0.057	0.000	0.000	0.672	0.767
31	3.128	3.257	0.490	0.000	3.804	0.208	0.000	0.777	0.000	1.671	0.000	1.446	4.524	0.000	0.000
32	0.007	0.007	0.000	0.000	0.036	0.039	0.006	0.039	0.000	0.049	0.000	0.198	0.011	0.048	0.039
33	0.000	0.000	0.003	0.040	0.000	0.000	0.000	0.000	0.015	0.000	0.015	0.000	0.000	0.000	0.000
34	0.007	0.007	0.000	0.000	0.036	0.039	0.006	0.039	0.000	0.049	0.000	0.198	0.011	0.048	0.039

Çizelge 4.21 pMK4::aroA::aroH ile hücre içi tepkime hızlarının oksijen aktarım koşulu ve proses süresince değişimi: $C_{G0}=10 \text{ kg m}^{-3}$, $pH_0=6.8$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=0.5 \text{ dm}^3$ (devam)

R#	LimOT			LOT1			LOT2			MOT1			MOT2		
	(mmol g ⁻¹ st ⁻¹)			(mmol g ⁻¹ st ⁻¹)			(mmol g ⁻¹ st ⁻¹)			(mmol g ⁻¹ st ⁻¹)			(mmol g ⁻¹ st ⁻¹)		
	Periyot I	Periyot II	Periyot III	Periyot I	Periyot II	Periyot III	Periyot I	Periyot II	Periyot III	Periyot I	Periyot II	Periyot III	Periyot I	Periyot II	Periyot III
35	0	0.000	0	0.000	0.003	0.040	0	0.000	0.000	0.000	0.015	0.000	0.015	0.000	0.000
36	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.433	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.125	1.965	0.000	0.000
37	0.000	0.000	0.000	0.000	1.093	0.000	0.000	0.000	0.000	0.233	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
38	3.766	3.895	0.000	0.680	0.000	0.603	0.000	0.217	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
39	2.039	2.168	0.148	0.702	2.479	0.117	0.417	0.034	0.000	1.024	0.219	2.040	4.031	0.201	0.215
40	2.039	2.168	0.148	0.702	2.479	0.117	0.417	0.034	0.000	1.024	0.219	2.040	4.031	0.201	0.215
41	2.039	2.168	0.094	0.702	0.134	0.117	0.417	0.034	0.000	0.766	0.000	0.032	4.031	0.201	0.000
42	1.701	1.830	0.000	0.491	0.000	0.000	0.370	0.000	0.008	1.221	0.000	0.000	3.669	0.000	0.000
43	1.701	1.830	0.730	0.491	0.000	0.339	0.251	0.000	0.263	1.484	0.000	0.228	3.669	0.000	0.000
44	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
45	1.701	1.830	0.784	0.491	2.367	0.339	0.370	0.000	0.296	1.742	0.219	2.236	3.669	0.000	0.215
46	1.922	2.050	0.840	0.646	2.456	0.427	0.519	1.598	0.498	2.440	0.345	2.267	3.800	0.095	0.269
47	1.897	2.025	0.888	0.647	4.794	0.000	0.518	1.596	0.497	2.694	0.437	2.304	3.794	0.110	0.483
48	0.000	0.000	0.054	0.000	2.346	0.000	0.000	0.000	0.000	0.258	0.219	2.008	0.000	0.000	0.215
49	0.000	0.000	0.054	0.000	2.346	0.000	0.000	0.000	0.000	0.258	0.219	2.008	0.000	0.000	0.215
50	0.648	0.648	0.168	0.483	0.283	0.077	0.063	0.044	0.087	0.137	0.096	0.087	0.391	0.344	0.061
51	0.253	0.253	0.067	0.186	0.078	0.029	0.033	0.023	0.047	0.062	0.049	0.035	0.156	0.086	0.024
52	0.075	0.075	0.019	0.053	0.023	0.016	0.010	0.007	0.014	0.025	0.014	0.010	0.044	0.032	0.007
53	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.037	0.024	0.016	0.032	0.059	0.025	0.003	0.000	0.000	0.000
54	0.266	0.266	0.198	0.295	0.103	0.197	0.274	0.263	0.137	0.153	0.049	0.037	0.158	0.157	0.285
55	0.130	0.130	0.163	0.092	0.061	0.167	0.018	0.012	0.112	0.107	0.024	0.018	0.077	0.056	0.012
56	0.136	0.136	0.035	0.203	0.042	0.029	0.256	0.251	0.025	0.046	0.025	0.019	0.081	0.101	0.273
57	0.443	0.443	0.113	0.330	0.220	0.099	0.037	0.025	0.120	0.714	0.142	0.058	0.263	0.278	0.075
58	0.029	0.029	0.007	0.021	0.009	0.047	0.004	0.003	0.076	0.633	0.091	0.004	0.017	0.013	0.037
59	0.424	0.353	0.340	0.525	0.222	0.486	0.101	0.779	0.264	0.670	0.219	0.264	0.403	0.259	0.268
60	0.049	0.049	0.146	0.178	0.022	0.022	0.010	0.007	0.013	0.024	0.013	0.000	0.042	0.031	0.007
61	0.170	0.299	0.474	0.223	0.119	0.326	0.052	0.031	0.062	0.069	0.058	0.275	0.095	0.036	0.063
62	0.033	0.066	0.042	0.074	0.269	0.080	0.014	0.010	0.019	0.098	0.019	0.014	0.067	0.045	0.044
63	0.033	0.066	0.042	0.074	0.269	0.080	0.014	0.010	0.019	0.098	0.019	0.014	0.067	0.045	0.044
64	0.033	0.066	0.042	0.074	0.269	0.080	0.014	0.010	0.019	0.098	0.019	0.014	0.067	0.045	0.044
65	0.033	0.066	0.042	0.074	0.269	0.080	0.014	0.010	0.019	0.098	0.019	0.014	0.067	0.045	0.044
66	0.233	0.233	0.054	0.149	0.150	0.045	0.037	0.021	0.043	0.071	0.039	0.260	0.125	0.091	0.019
67	0.187	0.187	0.042	0.117	0.136	0.036	0.031	0.017	0.035	0.056	0.031	0.254	0.098	0.071	0.015
68	0.088	0.088	0.022	0.062	0.027	0.019	0.012	0.008	0.016	0.030	0.016	0.240	0.052	0.038	0.008
69	0.045	0.045	0.012	0.032	0.014	0.010	0.006	0.004	0.008	0.015	0.008	0.006	0.027	0.020	0.004

Çizelge 4.21 pMK4::aroA::aroH ile hücre içi tepkime hızlarının oksijen aktarım koşulu ve proses süresince değişimi: $C_{G0}=10 \text{ kg m}^{-3}$, $pH_0=6.8$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=0.5 \text{ dm}^3$ (devam)

	LimOT			LOT1			LOT2			MOT1			MOT2		
	(mmol g ⁻¹ st ⁻¹)			(mmol g ⁻¹ st ⁻¹)			(mmol g ⁻¹ st ⁻¹)			(mmol g ⁻¹ st ⁻¹)			(mmol g ⁻¹ st ⁻¹)		
R#	Periyot I	Periyot II	Periyot III	Periyot I	Periyot II	Periyot III	Periyot I	Periyot II	Periyot III	Periyot I	Periyot II	Periyot III	Periyot I	Periyot II	Periyot III
70	0.043	0.063	0.163	0.059	0.324	0.103	0.170	0.316	0.125	0.097	0.511	0.606	0.143	0.351	0.276
71	0.043	0.063	0.0163	0.059	0.324	0.103	0.170	0.316	0.125	0.097	0.511	0.606	0.143	0.351	0.276
72	0.012	0.014	0.010	0.189	0.254	0.043	0.000	0.091	0.080	0.078	0.587	0.380	0.213	0.251	0.083
73	0.012	0.014	0.010	0.189	0.254	0.043	0.000	0.091	0.080	0.078	0.587	0.380	0.213	0.251	0.083
74	0.042	0.042	0.000	0.030	0.000	0.000	0.125	0.004	0.001	0.014	0.008	0.000	0.025	0.018	0.000
75	0.190	0.190	0.049	0.151	0.143	0.003	0.002	0.001	0.003	0.005	0.010	0.023	0.113	0.169	0.018
76	0.190	0.190	0.000	0.151	0.143	0.003	0.002	0.001	0.003	0.005	0.005	0.000	0.169	0.113	0.000
77	0.000	0.000	0.663	0.298	0.652	0.270	0.000	0.000	0.670	0.192	0.626	0.655	0.000	0.075	0.710
78	0.447	0.705	0.308	0.578	0.235	0.303	0.606	0.829	0.278	0.907	0.236	0.068	0.888	0.346	0.100
79	0.065	0.065	0.017	0.046	0.020	0.014	0.009	0.006	0.012	0.022	0.012	0.009	0.039	0.028	0.006
80	0.110	0.110	0.028	0.078	0.034	0.024	0.015	0.088	0.077	0.037	0.020	0.015	0.065	0.048	0.010
81	0.091	0.091	0.023	0.064	0.028	0.020	0.013	0.086	0.074	0.031	0.017	0.013	0.054	0.039	0.008
82	0.091	0.091	0.023	0.064	0.028	0.020	0.013	0.086	0.074	0.031	0.017	0.013	0.054	0.039	0.008
83	0.000	0.000	0.000	0.017	0.084	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.087	0.000
84	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.578	0.057	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
85	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.030	0.000	0.000	0.000
86	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
87	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
88	8.793	9.050	0.000	0.000	0.000	0.000	0.512	2.186	0.000	0.000	0.000	0.000	13.356	0.000	0.000
89	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
90	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.041	0.000	0.000	0.071	0.623	0.086	0.000	6.640	0.351	0.000
91	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.228	0.000	0.000	0.034
92	0.000	0.000	0.000	2.107	0.000	0.000	0.537	0.839	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.242	1.261
93	0.000	0.000	0.000	0.000	0.034	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.006	0.000	0.000	0.004
94	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
95	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
96	0.022	0.022	0.000	0.000	0.085	0.000	0.008	0.002	0.004	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000	0.000
97	0.174	0.174	0.044	0.140	0.138	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.007	0.021	0.103	0.162	0.061
98	0.000	0.000	0.000	0.000	0.021	0.000	0.119	0.000	0.034	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
99	0.000	0.000	0.730	0.000	0.021	0.339	0.000	0.000	0.288	0.263	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
100	0.086	0.086	0.022	0.061	0.026	0.018	0.012	0.008	0.016	0.029	0.016	0.012	0.051	0.037	0.008
101	0.115	0.115	0.029	0.081	0.035	0.065	0.016	0.011	0.092	0.662	0.107	0.016	0.068	0.049	0.045
102	0.071	0.071	0.018	0.051	0.022	0.015	0.010	0.007	0.013	0.024	0.013	0.010	0.042	0.031	0.007
103	0.071	0.071	0.018	0.051	0.022	0.015	0.010	0.007	0.013	0.024	0.013	0.010	0.042	0.031	0.007
104	0.108	0.108	0.028	0.077	0.033	0.064	0.015	0.010	0.091	0.660	0.106	0.015	0.064	0.047	0.044

Çizelge 4.21 pMK4::aroA::aroH ile hücre içi tepkime hızlarının oksijen aktarım koşulu ve proses süresince değişimi: $C_{G0}=10 \text{ kg m}^{-3}$, $pH_0=6.8$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=0.5 \text{ dm}^3$ (devam)

	LimOT			LOT1			LOT2			MOT1			MOT2		
	(mmol g ⁻¹ st ⁻¹)			(mmol g ⁻¹ st ⁻¹)			(mmol g ⁻¹ st ⁻¹)			(mmol g ⁻¹ st ⁻¹)			(mmol g ⁻¹ st ⁻¹)		
R#	Periyot I	Periyot II	Periyot III	Periyot I	Periyot II	Periyot III	Periyot I	Periyot II	Periyot III	Periyot I	Periyot II	Periyot III	Periyot I	Periyot II	Periyot III
105	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
106	0.006	0.006	0.002	0.005	0.002	0.001	0.0009	0.0006	0.001	0.002	0.001	0.0009	0.004	0.003	0.0006
107	0.006	0.006	0.002	0.005	0.002	0.001	0.0009	0.0006	0.001	0.002	0.001	0.0009	0.004	0.003	0.0006
108	0.043	0.043	0.011	0.031	0.013	0.050	0.006	0.004	0.079	0.638	0.094	0.006	0.026	0.019	0.038
109	0.818	0.818	0.342	0.739	0.343	0.231	0.092	1.639	0.321	1.472	0.302	0.104	0.499	0.449	0.146
110	0.138	0.138	0.035	0.097	0.042	0.030	0.019	0.013	0.025	0.047	0.025	0.019	0.082	0.059	0.013
111	0.138	0.138	0.035	0.097	0.042	0.030	0.019	0.013	0.025	0.047	0.025	0.019	0.082	0.059	0.013
112	0.131	0.131	0.033	0.093	0.040	0.028	0.018	0.012	0.024	0.044	0.024	0.018	0.078	0.057	0.012
113	0.061	0.061	0.016	0.043	0.019	0.013	0.008	0.006	0.011	0.021	0.011	0.008	0.036	0.026	0.006
114	0.006	0.006	0.002	0.005	0.002	0.001	0.0009	0.0006	0.001	0.002	0.001	0.0009	0.004	0.003	0.0006
115	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
116	0.006	0.006	0.002	0.005	0.002	0.001	0.0009	0.0006	0.001	0.002	0.001	0.0009	0.004	0.003	0.0006
117	0.006	0.006	0.002	0.005	0.002	0.001	0.0009	0.0006	0.001	0.002	0.001	0.0009	0.004	0.003	0.0006
118	0.006	0.006	0.002	0.005	0.002	0.001	0.0009	0.0006	0.001	0.002	0.001	0.0009	0.004	0.003	0.0006
119	0.000	0.000	0.003	0.008	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.006	0.000	0.0009
120	0.045	0.045	0.012	0.032	0.014	0.010	0.006	0.004	0.008	0.015	0.008	0.006	0.027	0.020	0.004
121	0.201	0.201	0.051	0.142	0.062	0.043	0.028	0.019	0.037	0.068	0.037	0.028	0.119	0.086	0.019
122	0.201	0.201	0.051	0.142	0.062	0.084	0.028	0.019	0.108	0.691	0.123	0.028	0.119	0.086	0.053
123	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.025	0.002	0.000	0.000	0.023	0.000	0.000	0.000	0.022	0.000
124	6.114	6.822	4.056	0.000	5.661	2.322	1.378	0.000	1.642	5.522	0.770	0.000	22.771	1.178	2.610
125	0.000	0.000	0.000	3.611	0.000	0.000	0.000	0.170	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
126	2.210	2.797	0.813	4.761	3.402	1.221	10.961	13.859	2.718	12.039	14.955	3.267	11.952	19.272	7.488
127	0.534	0.534	0.907	2.597	3.325	0.936	0.906	0.839	0.585	2.867	0.219	2.693	9.277	0.242	1.510
128	9.130	9.130	2.152	8.635	3.600	1.155	1.777	2.816	1.292	3.501	1.200	4.820	7.256	2.211	1.545
129	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
130	9.565	9.565	2.004	2.984	3.007	1.535	0.596	2.246	0.880	4.057	0.860	0.478	13.965	1.537	0.821
131	0.120	0.120	0.031	0.085	0.037	0.026	0.017	0.011	0.022	0.041	0.022	0.017	0.071	0.052	0.011
132	0.862	0.862	0.353	0.770	0.356	0.240	0.098	1.643	0.329	1.487	0.310	0.110	0.525	0.468	0.150
133	0.697	0.697	0.178	0.493	0.214	0.150	0.096	0.064	0.129	0.236	0.129	0.096	0.414	0.300	0.064
134	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
135	0.042	0.042	0.011	0.030	0.013	0.009	0.006	0.004	0.008	0.014	0.008	0.006	0.025	0.018	0.004
136	0.008	0.008	0.002	0.005	0.002	0.002	0.001	0.0007	0.001	0.003	0.001	0.001	0.005	0.003	0.0007
137	0.008	0.008	0.002	0.005	0.002	0.002	0.001	0.0007	0.001	0.003	0.001	0.001	0.005	0.003	0.0007
138	0.084	0.084	0.021	0.060	0.026	0.018	0.012	0.008	0.016	0.028	0.016	0.012	0.050	0.036	0.008
139	0.229	0.229	0.058	0.162	0.070	0.049	0.032	1.599	0.099	0.077	0.042	0.032	0.136	0.099	0.021

Çizelge 4.21 pMK4::aroA::aroH ile hücre içi tepkime hızlarının oksijen aktarım koşulu ve proses süresince değişimi: $C_{G0}=10 \text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH}_0=6.8$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=0.5 \text{ dm}^3$ (devam)

	LimOT			LOT1			LOT2			MOT1			MOT2		
	(mmol g ⁻¹ st ⁻¹)			(mmol g ⁻¹ st ⁻¹)			(mmol g ⁻¹ st ⁻¹)			(mmol g ⁻¹ st ⁻¹)			(mmol g ⁻¹ st ⁻¹)		
R#	Periyot I	Periyot II	Periyot III	Periyot I	Periyot II	Periyot III	Periyot I	Periyot II	Periyot III	Periyot I	Periyot II	Periyot III	Periyot I	Periyot II	Periyot III
140	0.023	0.023	0.006	0.016	0.007	0.005	0.003	0.002	0.004	0.008	0.004	0.003	0.014	0.010	0.002
141	0.009	0.009	0.002	0.006	0.003	0.002	0.001	0.0008	0.002	0.003	0.002	0.001	0.005	0.004	0.0008
142	0.008	0.008	0.002	0.005	0.002	0.002	0.001	0.0007	0.001	0.003	0.001	0.001	0.005	0.003	0.0007
143	0.008	0.008	0.002	0.005	0.002	0.002	0.001	0.0007	0.001	0.003	0.001	0.001	0.005	0.003	0.0007
144	0.008	0.008	0.002	0.005	0.002	0.002	0.001	0.0007	0.001	0.003	0.001	0.001	0.005	0.003	0.0007
145	0.055	0.055	0.014	0.039	0.017	0.012	0.008	0.005	0.010	0.019	0.010	0.008	0.033	0.024	0.005
146	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
147	0.005	0.005	0.001	0.004	0.002	0.001	0.0007	0.0005	0.0009	0.002	0.0009	0.0007	0.003	0.002	0.0004
148	0.325	0.325	0.083	0.230	0.100	0.070	0.045	0.030	0.060	0.110	0.060	0.045	0.193	0.140	0.030
149	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
150	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.187	8.847

4.5.2 Metabolik tasarımların hücre-içi tepkime hızlarına etkisi

Pilot-ölçek biyoreaktör sisteminde, doğal *B. subtilis* A263, pMK4::*aroH* taşıyan r-*B. subtilis* A263, pMK4::*aroA* taşıyan r-*B. subtilis* A263 ve, pMK4::*aroA*::*aroH* taşıyan r-*B. subtilis* A263 için, L-fenilalanin üretimi açısından optimum koşul olan MOT1 oksijen aktarım koşulunda biyoproses süresince ölçülen glukoz, hücre, L-fenilalanin, diğer amino asitler ile organik asitlerin derişimlerinin kalma süresi ile değişimleri kullanılarak metabolik akı analizi yapılmıştır. Hücre çoğalma ve L-fenilalanin üretim profilleri dikkate alındığında, hücre çoğalmasının log faz süreci ve L-fenilalanin üretiminin başladığı periyot I ($0 < t \leq 6$ st), üstel çoğalma fazı süreci periyot II ($6 < t \leq 21$ st) ve üstel çoğalma fazının sonu aynı zamanda da L-fenilalanin üretiminin maksimum değere ulaştığı periyot III ($21 < t \leq 30$ st) olmak üzere üç nokta ($t = 3$ st, $t = 12$ st ve $t = 24$ st) için metabolik akı analizi yapılmış ve sonuçlar Çizelge 4.22’de verilmiştir. Metabolik akı analiziyle aşağıdaki metabolik özellikler bulunmuştur.

Glikoliz yolizinden pentoz fosfat yolizine bağlantı L-fenilalanin’in üretim prosesinde glikoliz yolizi tepkime akılarının kalma süresi ile değişimi incelendiğinde; glukozun substrat olarak kullanılması nedeniyle glikoliz yolizindeki R1-13 numaralı tepkimelerin genel olarak aktif olduğu ve kalma süresiyle tepkime akılarının azaldığı özellikle periyot III’te glukoz tüketim hızlarının azalması nedeniyle glikoliz yolizi tepkime akılarının paralel olarak azaldığı belirlenmiştir. Nükleik asitlerin ve hücre oluşumunda önemli girdi olan R5P pentoz fosfat yolizi için dallanma noktasıdır; F6P veya G6P’den Gluc6P oluşumunu takiben üretilmektedir. Glikoliz yolizinden pentoz fosfat yolizine bağlantı doğal *B. subtilis* A263 ile periyot I’de G6P, periyot II için G6P ve F6P ile T3P’den, periyot III’te ise F6P ile T3P’den, pMK4::*aroH* taşıyan r-*B. subtilis* A263 ile periyot I için F6P ile T3P, periyot II’de G6P ve F6P ile T3P’den, periyot III’te ise sadece F6P ile T3P’den, pMK4::*aroA* taşıyan r-*B. subtilis* A263 ile periyot I, II ve III’te F6P ile T3P’den, pMK4::*aroA*::*aroH* taşıyan r-*B. subtilis* A263 ile periyot II’de G6P, periyot I,II, III için F6P ile T3P’den üretilmiştir.

Glikoliz yolizinden TCA döngüsüne dallanma noktaları olan anaplerotik reaksiyonlardan OA’dan Pyr’ın sentezlendiği R37 tepkimesi pMK4::*aroA* taşıyan r-*B.*

subtilis A263 ile MOT1 koşulu için periyot I ve II’de aktif, Mal’dan Pyr’ın sentezlendiği R36 tepkimesi pMK4::*aroH* taşıyan r-*B. subtilis* A263 ile periyot II ve III’te, pMK4::*aroA* taşıyan r-*B. subtilis* A263 için periyot I ve II’de, pMK4::*aroA*::*aroH* taşıyan r-*B. subtilis* A263 için ise periyot II ve III’te aktif olup doğal *B.subtilis* A263 için aktif değildir. Pyr’dan OA’nın sentezlendiği R38 tepkimesi doğal *B.subtilis* A263 için periyot I, II ve III’te, pMK4::*aroH* taşıyan r-*B. subtilis* A263 için periyot II ve III’te, pMK4::*aroA* taşıyan r-*B. subtilis* A263 için periyot II’de aktif olup pMK4::*aroA*::*aroH* taşıyan r-*B. subtilis* A263 için aktif değildir.

Glikoliz yolizinde AcCoA’nın sentezlendiği R13 tepkimesinin akısı doğal *B.subtilis* A263 için periyot II, pMK4::*aroH* taşıyan r-*B. subtilis* A263 ve pMK4::*aroA* taşıyan r-*B. subtilis* A263 için periyot I ve III’te, pMK4::*aroA*::*aroH* taşıyan r-*B. subtilis* A263 için periyot I’de sıfır olduğu için TCA döngüsü aktif değildir ve döngüdeki dallanma noktası metabolitleri α KG ve OA döngü dışında üretilmiştir. α -KG incelenen oksijen aktarım koşullarında R50, R55, R56, R58, R59, R64, R68, R72, R73 ve R79 tepkimeleriyle sentezlenmiştir.

Toplam ATP üretim akıları periyot I’de doğal *B. subtilis* A263, pMK4::*aroH* taşıyan r-*B. subtilis* A263, pMK4::*aroA* taşıyan r-*B. subtilis* A263 ve pMK4::*aroA*::*aroH* taşıyan r-*B. subtilis* A263 için sırasıyla 17.503, 20.122, 20.47, 28.429 mmol g⁻¹ st⁻¹; periyot II’de 5.281, 16.058, 29.673, 30.129; periyot III’te ise 3.206, 0.887, 6.371, 9.455 mmol g⁻¹ st⁻¹’tir.

Aromatik grup amino asitlerin yolizi tepkimeleri karşılaştırıldığında R70-74 tepkimelerinin akısı kalma süresiyle önce artmakta sonra da azalmaktadır. Aromatik amino asit yolizinin ilk tepkimesi olan PEP+E4P’dan DAHP oluşum R70 tepkime akısı kalma süresiyle önce artmış sonra da azalmıştır. Doğal *B.subtilis* A263 için R70 tepkimesinin akısı periyot II’de periyot I değerinden yaklaşık 1.8 kat, pMK4::*aroH* taşıyan r-*B. subtilis* A263 için 2.8 kat, pMK4::*aroA* taşıyan r-*B. subtilis* A263 için 4.2 kat ve pMK4::*aroA*::*aroH* taşıyan r-*B. subtilis* A263 için ise 5 kat daha yüksektir. Aromatik amino asit yolizindeki kısıtlayıcı basamaklardan sorumlu olan *aroA* ve *aroH* genlerinin klonlanmasıyla bu yolizine giden tepkime akılarının arttığı ve darboğazların

ortadan kalktığı söylenebilir. Kalma süresiyle L-fenilalanin sentez tepkimesi R73'in akısı önce artmış sonra da azalmıştır. Doğal *B.subtilis* A263 için R73 tepkimesinin akısı periyot II'de periyot I değerinden yaklaşık 1.1 kat, pMK4::*aroH* taşıyan r-*B. subtilis* A263 için 1.8 kat, pMK4::*aroA* taşıyan r-*B. subtilis* A263 için 4 kat ve pMK4::*aroA*::*aroH* taşıyan r-*B. subtilis* A263 için ise 7.5 kat daha yüksektir. Aromatik amino asit yolizinde üretimi gerçekleşen tirozin üretim tepkimesinin R74 akısı ve triptofan üretim tepkimesinin R75 akısı doğal *B. subtilis* A263, pMK4::*aroH* taşıyan r-*B. subtilis* A263, pMK4::*aroA* taşıyan r-*B. subtilis* A263 için kalma süresiyle azalmıştır ve periyot III'te tirozin ve triptofan üretimi çok azdır. pMK4::*aroA*::*aroH* taşıyan r-*B. subtilis* A263 için ise periyot III'te tirozin ve triptofan üretimi yoktur. Böylece kalma süresiyle sadece L-fenilalanin üretimi değil, L-fenilalanin'in diğer aromatik grup amino asitler arasındaki seçimliliği de artmıştır.

Çizelge 4.22 Doğal ve üç *r-B.subtilis* A263 için L-fenilalanin üretiminde hücre içi tepkime hızlarının oksijen aktarım koşulu ve proses süresince dağılımı: $C_{G0}=10 \text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH}_0=6.8$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=0.5 \text{ dm}^3$

	Doğal <i>B.subtilis</i> A263			pMK4::aroH taşıyan <i>r-B.subtilis</i> A263			pMK4::aroA taşıyan <i>r-B.subtilis</i> A263			pMK4::aroA::aroH taşıyan <i>r-B.subtilis</i> A263		
	(mmol g ⁻¹ st ⁻¹)			(mmol g ⁻¹ st ⁻¹)			(mmol g ⁻¹ st ⁻¹)			(mmol g ⁻¹ st ⁻¹)		
R	Periyot I	Periyot II	Periyot III	Periyot I	Periyot II	Periyot III	Periyot I	Periyot II	Periyot III	Periyot I	Periyot II	Periyot III
1	3.183	1.40	0.366	4.890	2.890	0.450	5.846	2.675	0.562	1.730	0.760	0.598
3	2.606	1.423	0.366	4.834	2.737	0.448	5.791	1.997	0.558	1.711	0.890	0.556
4	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
5	2.701	1.418	3.315	4.006	2.732	0.409	5.008	1.994	0.470	1.190	0.776	0.551
6	0.000	0.000	3.019	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
7	5.383	2.809	0.584	7.699	5.409	0.768	9.271	4.121	0.836	2.068	1.409	1.055
8	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	8.712	3.676	0.801	0.000	0.000	0.000
9	4.916	2.721	0.516	6.966	5.311	0.740	0.000	0.000	0.000	1.931	1.322	0.959
10	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.178	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
11	1.482	0.985	0.000	0.499	2.107	0.141	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
12	0.000	0.000	0.357	0.000	0.000	0.000	0.000	0.671	0.000	0.000	0.000	0.000
13	0.704	0.000	0.000	0.000	4.766	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.741	2.331
14	0.522	0.110	0.000	0.000	0.145	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.194	0.000
15	0.522	0.110	0.000	0.000	0.145	0.000	0.000	0.671	0.000	0.000	0.194	0.000
16	0.125	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
17	0.000	0.000	0.069	0.797	0.000	0.038	0.752	0.000	0.086	0.511	0.000	0.110
18	0.125	0.049	0.003	0.008	0.079	0.018	0.046	0.250	0.017	0.000	0.050	0.051
19	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.206	0.000	0.000
20	0.125	0.049	0.003	0.008	0.079	0.018	0.046	0.250	0.017	0.000	0.050	0.051
21	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.206	0.000	0.000
22	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
23	0.000	0.049	0.072	0.805	0.079	0.056	0.798	0.250	0.103	0.306	0.050	0.161
24	0.117	0.048	0.003	0.000	0.078	0.018	0.038	0.249	0.016	0.000	0.048	0.050
25	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.208	0.000	0.000
26	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.150	0.000	0.148

Çizelge 4.22 Doğal ve üç *r-B.subtilis* A263 için L-fenilalanin üretiminde hücre içi tepkime hızlarının oksijen aktarım koşulu ve proses süresince dağılımı: $C_{G0}=10 \text{ kg m}^{-3}$, $pH_0=6.8$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=0.5 \text{ dm}^3$ (devam)

	Doğal <i>B.subtilis</i> A263			pMK4::aroH taşıyan <i>r-B.subtilis</i> A263			pMK4::aroA taşıyan <i>r-B.subtilis</i> A263			pMK4::aroA::aroH taşıyan <i>r-B.subtilis</i> A263		
	(mmol g ⁻¹ st ⁻¹)			(mmol g ⁻¹ st ⁻¹)			(mmol g ⁻¹ st ⁻¹)			(mmol g ⁻¹ st ⁻¹)		
R	Periyot I	Periyot II	Periyot III	Periyot I	Periyot II	Periyot III	Periyot I	Periyot II	Periyot III	Periyot I	Periyot II	Periyot III
27	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.150	0.000	0.148
28	0.061	0.050	0.010	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.014
29	0.000	0.000	0.000	0.038	0.000	0.014	0.000	0.000	0.010	0.008	0.0004	0.000
30	0.000	0.000	0.046	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.057	0.000
31	0.457	1.162	0.000	1.701	8.326	0.233	2.444	0.129	0.118	1.671	0.000	1.446
32	0.001	0.000	0.012	0.000	0.000	0.005	0.027	0.000	0.221	0.049	0.000	0.198
33	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.012	0.000	0.000	0.015	0.000
34	0.001	0.000	0.012	0.000	0.000	0.005	0.000	0.000	0.185	0.049	0.000	0.198
35	0.114	0.006	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.018	0.000	0.000	0.015	0.000
36	0.000	0.000	0.000	0.000	12.788	0.166	0.001	0.012	0.000	0.000	0.125	1.965
37	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000
38	0.000	0.404	0.118	0.000	12.942	0.354	0.000	0.049	0.000	0.000	0.000	0.000
39	0.501	0.554	0.323	0.947	4.661	0.156	0.610	2.033	0.530	1.024	0.219	2.040
40	0.501	0.512	0.267	0.947	4.661	0.154	0.610	2.033	0.530	1.024	0.219	2.040
41	0.501	0.088	0.267	0.341	4.661	0.013	0.000	2.033	0.530	0.766	0.000	0.032
42	0.167	0.000	0.222	0.000	4.611	0.000	0.000	1.980	0.581	1.221	0.000	0.000
43	1.110	0.462	0.222	1.977	4.611	0.000	2.170	2.018	1.085	1.484	0.000	0.228
44	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
45	1.110	0.86	0.222	2.750	4.611	0.141	2.780	2.018	1.085	1.742	0.219	2.236
46	1.328	0.915	0.223	3.139	12.914	0.151	3.358	2.045	1.150	2.440	0.345	2.267
47	1.328	1.339	0.223	3.620	0.000	0.000	3.842	2.045	1.151	2.694	0.437	2.304
48	0.000	0.423	0.000	0.607	0.000	0.141	0.610	0.000	0.000	0.258	0.219	2.008
49	0.000	0.423	0.000	0.607	0.000	0.141	0.610	0.000	0.000	0.258	0.219	2.008
50	0.468	0.088	0.068	0.734	0.097	0.028	0.559	0.445	0.034	0.137	0.096	0.087
51	0.249	0.034	0.002	0.000	0.039	0.011	0.265	0.031	0.019	0.062	0.049	0.035

Çizelge 4.22 Doğal ve üç *r-B.subtilis* A263 için L-fenilalanin üretiminde hücre içi tepkime hızlarının oksijen aktarım koşulu ve proses süresince dağılımı: $C_{G0}=10 \text{ kg m}^{-3}$, $pH_0=6.8$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=0.5 \text{ dm}^3$ (devam)

	Doğal <i>B.subtilis</i> A263			pMK4::aroH taşıyan <i>r-B.subtilis</i> A263			pMK4::aroA taşıyan <i>r-B.subtilis</i> A263			pMK4::aroA::aroH taşıyan <i>r-B.subtilis</i> A263		
	(mmol g ⁻¹ st ⁻¹)			(mmol g ⁻¹ st ⁻¹)			(mmol g ⁻¹ st ⁻¹)			(mmol g ⁻¹ st ⁻¹)		
R	Periyot I	Periyot II	Periyot III	Periyot I	Periyot II	Periyot III	Periyot I	Periyot II	Periyot III	Periyot I	Periyot II	Periyot III
52	0.074	0.010	0.00059	0.075	0.011	0.003	0.075	0.009	0.005	0.025	0.014	0.010
53	0.172	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.104	0.000	0.012	0.059	0.025	0.003
54	1.800	0.498	0.002	2.413	0.039	0.121	2.438	1.655	0.019	0.153	0.049	0.037
55	1.072	0.480	0.001	2.275	0.019	0.006	2.301	0.016	0.009	0.107	0.024	0.018
56	0.728	0.018	0.001	0.138	0.020	0.115	0.137	1.639	0.010	0.046	0.025	0.019
57	0.265	0.060	0.0066	0.782	0.065	0.019	0.699	0.420	0.069	0.714	0.142	0.058
58	0.029	0.004	0.00023	0.030	0.0004	0.001	0.386	0.004	0.052	0.633	0.091	0.004
59	0.827	1.189	0.018	2.672	8.281	0.198	3.232	0.061	0.621	0.670	0.219	0.264
60	0.071	0.010	0.00057	0.072	0.011	0.003	0.097	0.009	0.005	0.024	0.013	0.000
61	0.333	1.121	0.003	2.167	0.047	0.186	2.296	0.080	0.536	0.069	0.058	0.275
62	0.103	1.089	0.0008	1.422	0.015	0.177	2.084	0.013	0.017	0.098	0.019	0.014
63	0.103	1.089	0.0008	1.422	0.015	0.177	2.084	0.013	0.017	0.098	0.019	0.014
64	0.103	1.089	0.0008	1.422	0.015	0.177	2.084	0.013	0.017	0.098	0.019	0.014
65	0.103	1.089	0.0008	1.422	0.015	0.177	2.084	0.013	0.017	0.098	0.019	0.014
66	0.230	0.032	0.002	0.745	0.031	0.009	0.213	0.067	0.519	0.071	0.039	0.260
67	0.185	0.025	0.001	0.699	0.024	0.007	0.167	0.061	0.516	0.056	0.031	0.254
68	0.087	0.012	0.0007	0.089	0.013	0.004	0.088	0.049	0.510	0.030	0.016	0.240
69	0.045	0.006	0.0003	0.046	0.007	0.002	0.046	0.006	0.003	0.015	0.008	0.006
70	0.037	0.044	0.035	0.055	0.156	0.074	0.074	0.310	0.119	0.097	0.511	0.606
71	0.037	0.044	0.035	0.055	0.156	0.074	0.074	0.310	0.119	0.097	0.511	0.606
72	0.059	0.065	0.011	0.069	0.122	0.064	0.074	0.306	0.115	0.078	0.587	0.380
73	0.059	0.065	0.011	0.069	0.122	0.064	0.074	0.306	0.115	0.078	0.587	0.380
74	0.042	0.006	0.0003	0.209	0.006	0.002	0.043	0.005	0.003	0.014	0.008	0.000
75	0.016	0.026	0.064	0.527	0.028	0.008	0.088	0.389	0.001	0.005	0.010	0.023
76	0.064	0.026	0.016	0.527	0.028	0.008	0.389	0.088	0.001	0.005	0.005	0.000

Çizelge 4.22 Doğal ve üç *r-B.subtilis* A263 için L-fenilalanin üretiminde hücre içi tepkime hızlarının oksijen aktarım koşulu ve proses süresince dağılımı: $C_{G0}=10 \text{ kg m}^{-3}$, $pH_0=6.8$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=0.5 \text{ dm}^3$ (devam)

	Doğal <i>B.subtilis</i> A263			pMK4::aroH taşıyan <i>r-B.subtilis</i> A263			pMK4::aroA taşıyan <i>r-B.subtilis</i> A263			pMK4::aroA::aroH taşıyan <i>r-B.subtilis</i> A263		
	(mmol g ⁻¹ st ⁻¹)			(mmol g ⁻¹ st ⁻¹)			(mmol g ⁻¹ st ⁻¹)			(mmol g ⁻¹ st ⁻¹)		
R	Periyot I	Periyot II	Periyot III	Periyot I	Periyot II	Periyot III	Periyot I	Periyot II	Periyot III	Periyot I	Periyot II	Periyot III
77	0.000	0.000	0.127	5.444	8.644	0.503	7.581	0.000	0.836	0.192	0.626	0.655
78	3.160	2.769	0.048	0.683	8.370	0.029	1.063	0.461	0.098	0.907	0.236	0.068
79	0.064	0.009	0.0005	0.066	0.010	0.003	0.065	0.008	0.005	0.022	0.012	0.009
80	0.109	0.058	0.044	0.111	8.286	0.005	0.111	0.014	0.008	0.037	0.020	0.015
81	0.090	0.055	0.043	0.092	8.284	0.004	0.092	0.011	0.006	0.031	0.017	0.013
82	0.090	0.012	0.0007	0.092	8.284	0.004	0.092	0.011	0.006	0.031	0.017	0.013
83	0.000	0.000	0.063	0.335	0.000	0.000	0.000	0.365	0.000	0.000	0.000	0.000
84	0.000	0.000	0.000	0.000	8.270	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
85	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.030
86	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
87	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
88	2.492	2.635	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.378	0.000	0.000	0.000	0.000
89	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
90	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.357	0.000	0.050	0.623	0.086	0.000
91	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.038	0.504	0.000	0.000	0.228
92	0.593	0.000	0.000	0.000	0.000	0.109	0.000	1.623	0.000	0.000	0.000	0.000
93	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.006
94	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
95	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
96	0.021	0.003	0.0002	0.532	0.000	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000	0.000	0.003
97	0.000	0.024	0.064	0.511	0.026	0.007	0.071	0.387	0.000	0.000	0.007	0.021
98	0.000	0.000	0.000	0.167	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
99	0.944	0.462	0.000	2.144	0.000	0.000	2.170	0.000	0.000	0.263	0.000	0.000
100	0.085	0.012	0.0006	0.086	0.013	0.004	0.086	0.011	0.006	0.029	0.016	0.012
101	0.113	0.016	0.0009	0.116	0.017	0.005	0.473	0.014	0.058	0.662	0.107	0.016
102	0.071	0.010	0.0005	0.072	0.011	0.003	0.072	0.009	0.005	0.024	0.013	0.010
103	0.071	0.010	0.0005	0.072	0.011	0.003	0.072	0.009	0.005	0.024	0.013	0.010

Çizelge 4.22 Doğal ve üç *r-B.subtilis* A263 için L-fenilalanin üretiminde hücre içi tepkime hızlarının oksijen aktarım koşulu ve proses süresince dağılımı: $C_{G0}=10 \text{ kg m}^{-3}$, $pH_0=6.8$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=0.5 \text{ dm}^3$ (devam)

	Doğal <i>B.subtilis</i> A263			pMK4::aroH taşıyan <i>r-B.subtilis</i> A263			pMK4::aroA taşıyan <i>r-B.subtilis</i> A263			pMK4::aroA::aroH taşıyan <i>r-B.subtilis</i> A263		
	(mmol g ⁻¹ st ⁻¹)			(mmol g ⁻¹ st ⁻¹)			(mmol g ⁻¹ st ⁻¹)			(mmol g ⁻¹ st ⁻¹)		
R	Periyot I	Periyot II	Periyot III	Periyot I	Periyot II	Periyot III	Periyot I	Periyot II	Periyot III	Periyot I	Periyot II	Periyot III
104	0.107	0.015	0.0008	0.109	0.016	0.005	0.466	0.013	0.057	0.660	0.106	0.015
105	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
106	0.006	0.00088	0.0005	0.007	0.001	0.0003	0.007	0.0008	0.0005	0.002	0.001	0.0009
107	0.006	0.00088	0.0005	0.007	0.001	0.0003	0.007	0.0008	0.0005	0.002	0.001	0.0009
108	0.043	0.006	0.0003	0.044	0.006	0.002	0.401	0.005	0.053	0.638	0.094	0.006
109	0.658	0.114	0.069	1.183	8.394	0.036	1.481	0.469	0.147	1.472	0.302	0.104
110	0.136	0.019	0.001	0.139	0.020	0.006	0.139	0.017	0.010	0.047	0.025	0.019
111	0.136	0.019	0.001	0.139	0.020	0.006	0.139	0.017	0.010	0.047	0.025	0.019
112	0.130	0.018	0.001	0.132	0.019	0.006	0.132	0.016	0.009	0.044	0.024	0.018
113	0.060	0.008	0.0004	0.061	0.009	0.003	0.061	0.007	0.004	0.021	0.011	0.008
114	0.006	0.00088	0.0005	0.007	0.001	0.00028	0.007	0.0008	0.0005	0.002	0.001	0.0009
115	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
116	0.006	0.00088	0.0005	0.007	0.001	0.00028	0.007	0.0008	0.0005	0.002	0.001	0.0009
117	0.006	0.00088	0.0005	0.007	0.001	0.00028	0.007	0.0008	0.0005	0.002	0.001	0.0009
118	0.006	0.00088	0.00005	0.007	0.001	0.00028	0.007	0.0008	0.0005	0.002	0.001	0.0009
119	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.00046	0.011	0.000	0.0007	0.000	0.002	0.000
120	0.045	0.006	0.0003	0.046	0.007	0.002	0.046	0.006	0.003	0.015	0.008	0.006
121	0.198	0.027	0.002	0.202	0.030	0.009	0.202	0.025	0.014	0.068	0.037	0.028
122	0.198	0.027	0.002	0.202	0.030	0.009	0.559	0.025	0.064	0.691	0.123	0.028
123	0.000	0.000	0.000	0.255	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.023	0.000	0.000
124	5.595	5.513	0.066	15.276	0.000	0.989	17.623	0.000	2.167	5.522	0.770	0.000
125	0.000	0.000	0.000	0.000	8.471	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
126	6.873	1.198	1.381	5.967	3.418	0.232	5.690	11.969	1.592	12.039	14.955	3.267
127	2.647	2.423	0.222	6.211	4.611	0.423	6.929	3.717	2.102	2.867	0.219	2.693
128	4.648	1.865	0.761	7.329	14.203	0.183	7.301	6.839	2.258	3.501	1.200	4.820
129	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
130	3.105	2.785	0.239	6.326	8.763	0.538	8.669	0.803	0.427	4.057	0.860	0.478
131	0.119	0.016	0.0009	0.121	0.018	0.005	0.121	0.015	0.009	0.041	0.022	0.017
132	0.701	0.120	0.070	1.227	8.401	0.038	1.525	0.474	0.150	1.487	0.310	0.110
133	0.688	0.094	0.006	0.703	0.103	0.030	0.701	0.086	0.049	0.236	0.129	0.096

Çizelge 4.22 Doğal ve üç *r-B.subtilis* A263 için L-fenilalanin üretiminde hücre içi tepkime hızlarının oksijen aktarım koşulu ve proses süresince dağılımı: $C_{G0}=10 \text{ kg m}^{-3}$, $pH_0=6.8$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=0.5 \text{ dm}^3$ (devam)

	Doğal <i>B.subtilis</i> A263			pMK4::aroH taşıyan <i>r-B.subtilis</i> A263			pMK4::aroA taşıyan <i>r-B.subtilis</i> A263			pMK4::aroA::aroH taşıyan <i>r-B.subtilis</i> A263		
	(mmol g ⁻¹ st ⁻¹)			(mmol g ⁻¹ st ⁻¹)			(mmol g ⁻¹ st ⁻¹)			(mmol g ⁻¹ st ⁻¹)		
R	Periyot I	Periyot II	Periyot III	Periyot I	Periyot II	Periyot III	Periyot I	Periyot II	Periyot III	Periyot I	Periyot II	Periyot III
134	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
135	0.041	0.006	0.0003	0.042	0.006	0.002	0.042	0.005	0.003	0.014	0.008	0.006
136	0.008	0.001	0.000006	0.008	0.001	0.00032	0.008	0.0009	0.0005	0.003	0.001	0.001
137	0.008	0.001	0.000006	0.008	0.001	0.00032	0.008	0.0009	0.0005	0.003	0.001	0.001
138	0.083	0.011	0.0006	0.085	0.012	0.004	0.085	0.010	0.006	0.028	0.016	0.012
139	0.226	0.074	0.045	0.231	8.304	0.010	0.230	0.028	0.016	0.077	0.042	0.032
140	0.023	0.003	0.0001	0.023	0.003	0.0009	0.023	0.003	0.002	0.008	0.004	0.003
141	0.009	0.001	0.00007	0.009	0.001	0.0004	0.009	0.001	0.0006	0.003	0.002	0.001
142	0.008	0.001	0.00006	0.008	0.001	0.0003	0.008	0.0009	0.0005	0.003	0.001	0.001
143	0.008	0.001	0.00006	0.008	0.001	0.0003	0.008	0.0009	0.0005	0.003	0.001	0.001
144	0.008	0.001	0.00006	0.008	0.001	0.0003	0.008	0.0009	0.0005	0.003	0.001	0.001
145	0.054	0.007	0.0004	0.056	0.008	0.002	0.055	0.007	0.004	0.019	0.010	0.008
146	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
147	0.005	0.00069	0.00004	0.005	0.0007	0.0002	0.005	0.0006	0.0004	0.002	0.0009	0.0007
148	0.321	0.044	0.003	0.328	0.048	0.014	0.327	0.040	0.023	0.110	0.060	0.045
149	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
150	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	26.079	3.895	0.000	0.000	0.000

5. TARTIŞMA VE YORUM

“Reaksiyon mühendisliği prensipleriyle rekombinant L-fenilalanin üretimi için biyoproses geliştirilmesi” konulu yüksek lisans araştırma programı kapsamında, birinci araştırma programında aromatik amino asit yolizinin birinci tepkimesini katalizleyen DAHP sentetaz enzimini kodlayan *aroA* geni ile, korizmat mutaz enzimini katalizleyen *aroH* genini birlikte taşıyan rekombinant plasmid tasarımı için alternatif metabolik mühendislik tasarımları yapılmıştır. *aroA* gen dizininin *aroH* gen dizininin önüne entegre edilmesi için oluşturulan Tasarım-1 ve 2 “iki-gen sistemi” klonlanma stratejisinde pUC19’a klonlama, iki-gen sistemi büyük olduğundan (Tasarım-1) ve küçültüldüğü halde (Tasarım-2), iki-gen sisteminin büyüklüğü plasmid büyüklüğüne kıyasla yeterli küçültülemediğinden pozitif sonuç vermemiştir. Bu sonuç ve değerlendirme üzerine Tasarım-3 yapılarak, “*aroA* ve *aroH* genlerinin birer-birer klonlaması” ile pUC19’da iki-gen sistemi oluşturulmuş; ikinci aşamada da *E.coli*-*B.subtilis* shuttle-plasmide klonlanarak pMK4::*aroA*::*aroH* taşıyan *r-B.subtilis* geliştirilmiştir. Paralel bir programla ise tek-gen pMK4::*aroA* taşıyan *r-B.subtilis* geliştirilmiş; daha önce araştırma grubumuzda geliştirilen tek-gen pMK4::*aroH* (Özçelik vd. 2004) taşıyan *B.subtilis* ile birlikte kıyaslama amacıyla kullanılmıştır. İkinci araştırma programında, geliştirilen iki-gen taşıyan *r-Bacillus subtilis* A263 ile tanımlanmış üretim ortamı kullanılarak mikrobiyolojik hava filtreli, kesikli, $V_R=110 \text{ cm}^3$ çalışma hacimli laboratuvar ölçekli biyoreaktörlerde, $T=37 \text{ }^\circ\text{C}$, $N=200 \text{ dk}^{-1}$ ve $\text{pH}_0=7.0$ işletme koşullarında L-fenilalanin üretim performansı incelenmiştir. Araştırmanın üçüncü programında oluşturulan beş farklı oksijen aktarım koşulunda pilot ölçek biyoreaktörlerde oksijen aktarımının L-fenilalanin üretimine etkisi sistematik bir programla incelenmiştir. Araştırmanın dördüncü programında, bulunan en iyi oksijen aktarım koşulunda, pMK4::*aroA*::*aroH* taşıyan *r-B.subtilis*, pMK4::*aroA* taşıyan *r-B.subtilis* ile pMK4::*aroH* taşıyan *B.subtilis* ile deneyler yapılarak aromatik amino asit yolizine ve L-fenilalanin üretimine etkileri araştırılmıştır. Yukarıdaki iki programın verileri kullanılarak, sırasıyla, oksijen aktarımının iki-gen taşıyan *r-B.subtilis* hücreiçi tepkime hızlarına ve, aromatik amino asit yolizi tepkimelerinin hızlarının artışına etkileri doğal ve üç *r-B.subtilis* A263 ile biyokimyasal reaksiyon mühendisliği prensipleriyle metabolik akı analizi yapılarak incelenmiştir.

5.1 L-Fenilalanin Üretimi için Rekombinant Mikroorganizma Geliştirilmesi

Aromatik amino asit yolizinde DAHP sentetaz (gen: *aroA*) ve korizmat mutaz (gen: *aroH*) enzimlerinin katalizlediği rekombinant L-fenilalanin üretiminde kısıtlayıcı tepkimeler olarak belirlendiğinden (Özçelik vd. 2004), bu konumlara yönelik rekombinant-*Bacillus subtilis* ve biyoproses geliştirilmesi araştırma programının temel amacını oluşturmaktadır. Metabolik mühendislik araştırma programının hedefi doğrultusunda geliştirilen pMK4::*aroA*::*aroH* taşıyan rekombinant *Bacillus subtilis* ile L-fenilalanin yolizi tepkimelerinin akılarının dolayısıyla L-fenilalanin verim ve seçimliliğinin artışı amaçlanmıştır. Rekombinant mikroorganizma geliştirilmesi amacıyla ilk olarak DAHP sentetaz enzimini kodlayan *aroA* ve korizmat mutaz enzimini kodlayan *aroH* gen dizinleri kullanılarak iki-gen sistemi oluşturmak amacıyla alternatif ileri ve geri primerler tasarlanmıştır. İki-gen sistemi iki aşamada plasmide klonlanarak r-*B.subtilis* geliştirilmesi amaçlanmış; ancak, büyüklüğünün plasmid büyüklüğüne yakın olması nedeniyle klonlama gerçekleşmemiştir. Bu aşamada *aroA* ve *aroH* genlerinin birer-birer klonlaması ile r-*B.subtilis* geliştirilmiştir. *Bacillus subtilis* NRRL-NRS1315'in kromozomal DNA'sı PCR tepkimesinde kalıp olarak kullanılarak tasarlanan ileri ve geri primerler yardımıyla *aroA* geni optimum işletim koşulları bulunan PCR tepkimeleri ile sentezlenmiştir. *E.coli* plasmidi olan pUC19'un molekül ağırlığının küçük ve klonlama sonrası belirlenmesinin kolay ve kısa sürede yapılabilmesi nedeniyle klonlamanın önce bu plasmide yapılmasına karar verilmiştir. PCR tepkimesi ile sentezlenen *aroA* geninin pUC19 ve pUC19::*aroH* (Özçelik vd. 2004) plasmidlerine klonlanabilmesi için, gen ve plasmid tasarlanan primerlerin uç konumlarında olan *SalI* restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. Klonlama tepkimesinin (ligasyon) gerçekleşme olasılığını arttırmak için bu tepkimenin girdileri olan gen ve plasmidin derişimleri gen/plasmid oranı arttırılarak (G/V=3-5) tepkimeler gerçekleştirilmiştir. T4 DNA ligaz enzimi katalizörlüğünde T=22°C, t=16 st süren tepkime ile G/V=3 oranında başarılı bir şekilde klonlanmış ve plasmid DNA izolasyonunun kolay olması nedeniyle *E.coli* XLI-Blue'ya aktarılmıştır. *aroA* geni pUC19 ve pUC19::*aroH* plasmidlerinden kesilip ayrılarak kopyalama sayısı yüksek olan pMK4 ve pMK4::*aroH* *Bacillus-E.coli* shuttle plasmidlerine sub-klonlama yapılmış ve *E.coli* XLI-Blue'ya transforme edilmiştir. *aroA* geninin doğru klonlandığı

saptandıktan sonra *Bacillus subtilis* A263'e elektroporasyon yöntemi ile transforme edilerek, pMK4::aroA::aroH taşıyan r-*B.subtilis* ve pMK4::aroA taşıyan r-*Bacillus subtilis* geliştirilmiştir.

SCI'ce taranan hakemli dergilerde L-fenilalanin üretimine ilişkin çalışmalarda rekombinant mikroorganizma geliştirilmesi ile ilgili *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium lactofermentum*, *Escherichia coli* ve *Bacillus subtilis* kullanılmıştır (Ozaki vd. (1985), Förberg and Haggström (1987), Konstantinov vd. (1990), Ito vd. (1990a); (1990b), Ikeda vd. (1992); (1993), Flores vd. (1996), Takagi vd. (1996), Weikert vd. (1998), Özçelik vd. (2004)) (Çizelge 2.8). Özellikle L-glutamik asit üretiminde kullanılan gram-pozitif *Corynebacterium glutamicum* ve *Brevibacterium lactofermentum* türü bakterilerin mutantları ile, sırasıyla, Kyowa Hakko Co (Japonya) ile Ajinomoto Co. (Japonya)'da rekombinant DNA tekniklerinin kullanılması ile yapılan ilk önemli çalışmalardan sonra, genomu belirlenen ilk bakteri olması nedeniyle *Escherichia coli* ile L-fenilalanin üretimine ilişkin çalışmalar yoğunluk kazanmıştır. Bununla birlikte *Bacillus subtilis* ile L-fenilalanin üretimi rekombinant mikroorganizma geliştirilmesine yönelik iki çalışma yer almaktadır; bunlardan biri patenttir (Kurahashi vd. 1896) ve patentte hedef gen ve hangi genin klonlanacağı belirtilmemiştir. Diğer çalışma araştırma grubumuzda yapılmıştır (Özçelik vd. 2004); aromatik amino asit yolizinde L-fenilalanin üretiminde verim ve seçimliliğini artırmak amacıyla biyokimyasal reaksiyon mühendisliği prensipleriyle aromatik amino asit yolizinde darboğaz oluşturan tepkimeler belirlenmiş ve birincil darboğaz olarak belirledikleri korizmattan prefenat oluşum tepkimesini katalizleyen enzimden sorumlu *aroH* geni klonlanarak pMK4::aroH taşıyan r-*Bacillus subtilis* geliştirilmiştir.

Aromatik amino asit yolizindeki hedef tepkimelerden sorumlu genlerin klonlanmasıyla geliştirilen pMK4::aroA taşıyan r-*Bacillus subtilis* A263 ve iki-gen sistemini içeren pMK4::aroA::aroH taşıyan r-*Bacillus subtilis* A263 ile pMK4::aroH taşıyan r-*Bacillus subtilis* A263'ün L-fenilalanin üretim performansları pilot-ölçek biyoreaktör sisteminde karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Üç rekombinant *Bacillus subtilis* ile L-fenilalanin üretim performanslarının doğal *Bacillus subtilis* A263 ile kıyaslandığında arttığı bulunmuştur. Ancak üç rekombinant B.*subtilis* birbiriyle kıyaslandığında, yolizindeki

hedef iki genden biri olan *aroH* geninin klonlanmasıyla geliştirilen pMK4::*aroH* taşıyan *r-Bacillus subtilis* A263 ile en yüksek L-fenilalanin derişimi $C_{phe}=0.34 \text{ kgm}^{-3}$ olurken (Özçelik 2004); aromatik amino asit yolizindeki ikinci hedef gen olan *aroA* geninin klonlanmasıyla geliştirilen pMK4::*aroA* taşıyan *r-Bacillus subtilis* A263 ile, ve pMK4::*aroA*::*aroH* taşıyan *r-Bacillus subtilis* A263 ile L-fenilalanin üretimi, sırasıyla, 0.85 kgm^{-3} ve 1.56 kgm^{-3} 'e çıkmıştır. Böylece *aroA* geninin klonlanması ile aromatik amino asit yolizine giren moleküller E4P ve PEP akıları artmakta, *aroH* geninin klonlanması ile de L-fenilalanin yolizindeki hız kısıtlayıcı tepkimenin katalizörü olan enzimin derişimi artırılarak yolizi tepkime hızları arttırılmaktadır. Sonuç olarak, metabolik mühendislik tasarımı iki-gen içeren rekombinant plasmid pMK4::*aroA*::*aroH* ile araştırma programının temel amacı gerçekleştirilmiştir.

5.2 pMK4::*aroA*::*aroH* Taşıyan *r-B.subtilis* ile L-Fenilalanin Üretimine Oksijen Aktarımının Etkisi

Üçüncü araştırma programında, $V_R=0.550 \text{ dm}^3$ hacımlı, mekanik karıştırılmalı, pH, sıcaklık, çözünmüş oksijen ve karıştırma hızı kontrollu pilot-ölçekli kesikli biyoreaktörlerde pMK4::*aroA*::*aroH* taşıyan *r-B.subtilis* A263 ile L-fenilalanin üretiminde oksijen aktarım etkileri $Q_O/V_R=0.2, 0.35$ ve 0.5 vvm hava giriş hızlarında, $N=500$ ve 750 dk^{-1} karıştırma hızlarında oluşturulan beş oksijen aktarım koşulunda incelenmiş ve oksijen aktarımının glukoz tüketimini, mikroorganizma derişimini, ürün verimini ve yan-ürün oluşumunu, hücreiçi metabolik yolizlerini ve akıların dağılımını etkilediği bulunmuştur. Oksijen aktarımının etkisinin incelendiği deneylerde ortama mikroorganizma aşılardan önce ($t<0 \text{ st'e}$) K_{La0} , mikroorganizma aşılandıktan sonra oksijen aktarım katsayısı K_{La} , artma faktörü $E (=K_{La}/K_{La0})$, oksijen tüketim hızı $-r_O$ (OUR), oksijen aktarım hızı (OTR), Damköhler sayısı (Da), ve etkinlik katsayısı (η) değerleri belirlenmiştir (Çizelge 4.14).

Pilot ölçek biyoreaktör sistemlerinde uygulanan beş oksijen aktarım koşulunda kalma süresine karşı pH, C_0 , C_X , C_G , C_{phe} değişimleri incelendiğinde, her parametre için özgün bir geometrik yeri olan karakteristik eğri ailesi olduğu, her eğri ailesi içinde farklı

oksijen aktarım koşullarının eğri ailesi içinde incelenen değişkenin t ile değişimini veren farklı eğriler oluşturduğu, sonuç olarak tasarlanan:

- 1) $Q_O/V_R=0.2$ vvm, $N= 750 \text{ dk}^{-1}$: LimOT
- 2) $Q_O/V_R=0.35$ vvm, $N= 500 \text{ dk}^{-1}$: LOT1
- 3) $Q_O/V_R=0.35$ vvm, $N= 750 \text{ dk}^{-1}$: LOT2)
- 4) $Q_O/V_R=0.5$ vvm, $N= 500 \text{ dk}^{-1}$: MOT1
- 5) $Q_O/V_R=0.5$ vvm, $N= 750 \text{ dk}^{-1}$: MOT2

oksijen aktarım koşullarının biyoreaktörde L-fenilalanin üretimine pertürbasyon etkisi yaptığı bulunmuştur. Oksijen aktarım koşuluna bağlı olarak pH önce belli bir kalma süresine kadar farklı hızlarda azalmış; prosesin $t=24$ st'inden sonra t ile değişim gözlenmemiştir. Çözünmüş oksijen derişimi LOT2 ve MOT1 oksijen aktarım koşullarında $t=1.5$ st'de sifıra ulaşmış ve diğer oksijen aktarım koşulları gibi $t=12$ st'den sonra oksijen derişimlerinde artış gözlenmiş; biyoprosesin $t=21$ st' inden sonra hücreler durgunluk fazına girdikten sonra derişim değişmemiştir. Bu iki koşulda çözünmüş oksijen derişimlerinin sifıra ulaşması, hücre çoğalması ve L-fenilalanin üretimi için oksijen ihtiyacının yüksek olduğunu göstermektedir. Oksijen aktarım koşuluna göre substrat tüketim hızı ve hücre çoğalma hızı farklılıklar göstermektedir. Düşük oksijen aktarım koşullarında L-fenilalanin üretiminin de düşük olduğu ve oksijen aktarım hızının artmasıyla L-fenilalanin üretim hızının arttığı bulunmuştur. L-fenilalanin üretiminin maksimum olduğu oksijen aktarım koşulu MOT1'dir. MOT1 koşulunda maksimum L-fenilalanin üretimine ulaşıldığında, oksijen derişimi değişmemekte, pH yaklaşık sabit olmakta ve mikroorganizma durgunluk fazında bulunmaktadır. En iyi oksijen aktarım koşulu MOT1 için deney sonuçların tekrar edilebilirliği araştırılmıştır. L-fenilalanin, hücre, glukoz, çözünmüş oksijen ve pH değerleri hata payı en çok $\pm \%1$ olarak belirlenmiştir. LimOT oksijen aktarım koşulunda hücre derişimi ve paralel olarak L-fenilalanin derişimi artmış; ancak laboratuvar ölçekteki L-fenilalanin üretiminden daha düşük olduğu bulunmuştur. LOT1 ve LOT2 oksijen aktarım koşullarında ise hücre derişimi ve L-fenilalanin üretiminin LimOT oksijen aktarım koşuluna göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. MOT2 oksijen aktarım koşullunda hücre ve L-fenilalanin derişimi L-fenilalanin üretimi açısından optimum koşul olan MOT2 oksijen aktarım koşulluna göre daha düşüktür. Biyoreaktörde $N=500$ ve $N=750$

dk^{-1} karıştırma hızları için, hava giriş hızının artışıyla L-fenilalanin üretimi artarken, $Q_0/V_R=0.35$ ve 0.5 vvm hava giriş hızlarında karıştırma hızlarının artırılmasıyla L-fenilalanin üretimi azalmıştır.

Araştırma grubuzda yapılan önceki çalışmada (Özçelik vd. 2004, Özçelik 2003) pMK4::aroH taşıyan r-*B. subtilis* A263 ile L-fenilalanin üretimine oksijen aktarımının etkisi araştırılmış, oksijen aktarım hızının artışıyla L-fenilalanin üretim hızının arttığı bildirilmiştir. Özçelik vd. (2004) $Q_0/V_R=0.35$ vvm, $N=750 \text{ dk}^{-1}$ oksijen aktarım koşulundan maksimum L-fenilalanin derişimi olan $C_{\text{phe}}=0.34 \text{ kgm}^{-3}$ değerine ulaşmışlardır. Özçelik (2003), K_{La} değerinin genel olarak hava giriş hızının artıyla fazla değişmediğini, ancak karıştırma hızının artışıyla belirgin bir şekilde arttığını bildirmiştir. Oksijen tüketim hızı (OUR) incelenen oksijen aktarım koşullarında kalma süresiyle önce artmakta sonra da azalmaktadır. Artma faktörü E genelde 1'den büyük değerlere sahiptir. Damköhler sayısı (Da) genelde 1'den küçük olarak hesaplanmış ve prosesin biyokimyasal tepkime kısıtlayıcı olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Araştırma grubumuzda *Bacillus* türü mikroorganizmalarla yapılan önceki çalışmada (Özçelik vd. 2004, Özçelik 2003) için bulunan verim katsayıları ile L-fenilalanin prosesi sonuçları mertebede olarak uyumlu olduğu bulunmuştur. Shu ve Liao (2002) *Corynebacterium glutamicum* ile L-fenilalanin üretiminde oksijen aktarım hızını artırarak ürün inhibisyonunu azaltmayı başardıklarını bildirmişlerdir. *Corynebacterium glutamicum* ile üretim ortamına farklı başlangıç derişimlerinde L-fenilalanin eklemişler ve farklı karıştırma hızlarında L-fenilalanin üretim kinetiğini incelemişlerdir. Sonuç olarak başlangıç L-fenilalanin derişimini optimize ederek ve oksijen aktarım hızının artırılması ile ürün inhibisyonunun azaldığı ve L-fenilalanin üretiminin de arttığını bildirmişlerdir.

Oksijen aktarım koşuluna bağlı olarak biyoreaktörde kalma süresiyle hücre-dışına aktarılan amino asitler ile organik asitler ve maksimum derişimleri Çizelge 4.13'de verilmiştir. İncelenen oksijen aktarım koşullarında L-fenilalanin yanında aspartik asit, glutamik asit, asparajin, glisin ve; organik asitlerden ise α -ketoglutarik, glukonik, formik, sitrik, maleik, malik, okzalik, pirüvik, laktik asitlerin üretim ortamına aktarıldığı bulunmuştur. Proses süresince ortama aktarılan maksimum toplam amino asit derişimi

L-fenilalanin üretimi açısından optimum koşul olan MOT1’de $C_{AA}=1.751 \text{ kgm}^{-3}$, en düşük derişim ise LOT2’de $C_{AA}=0.892 \text{ kgm}^{-3}$ ’dir. Proses süresince ortama aktarılan toplam organik asit en yüksek derişimi MOT2’de $C_{OA}=1.527 \text{ kg m}^{-3}$, en düşük LOT’de $C_{OA}=0.550 \text{ kg m}^{-3}$, en iyi oksijen aktarım koşulu MOT1’de ise 1.379 kg m^{-3} ’dir.

Oksijen aktarım karakteristikleri

pMK4::*aroA*::*aroH* taşıyan *r-B.subtilis* ile L-fenilalanin üretiminde farklı oksijen aktarım koşullarında üretim prosesi süresince oksijen aktarım parametreleri hesaplanmıştır (Çizelge 4.14). İncelenen oksijen aktarım koşullarında L-fenilalanin ve *r-B.subtilis* profilleri dikkate alınarak biyoproses üç periyota ayrılmıştır. MOT1 işletim koşullunda K_{La} değerleri periyot II’de bölgesinde çözünmüş oksijen derişimi sıfır olduğu için prosesin başında ($t=0.5 \text{ st}$) ve $t>12 \text{ st}$ ’ten sonra belirlenebilmiştir. LimOT, LOT1 LOT2 koşullarında MOT1 ve MOT2 koşulları için ise önce artmakta sonra da azalmaktadır. Her periyotta hız kısıtlayıcı basamağın belirlenebilmesi için OD ve OTR_{maks} değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 4.14). Oksijen aktarım parametrelerinden bir diğeri olan oksijen tüketim hızının ($-r_O$), incelenen farklı oksijen aktarım koşullarında, biyoprosesin ilk periyotunda OTR ’den büyük değerlere sahip iken biyoprosesin diğeri periyotlarında farklılık göstermektedir. $-r_O$ ve OTR değerleri merteye olarak uyumlu olup LimOT, LOT1, LOT2, MOT1 ve MOT2 koşullarında pMK4::*aroH* taşıyan *r-B.subtilis* A263 ile gerçekleştirilen deney seti verileri kullanılarak hesaplanan $-r_O$ değerleri ile aynı koşullarda pMK4::*aroA*::*aroH* taşıyan *r-B.subtilis* A263 ile elde edilen $-r_O$ değerleri merteye olarak uyumludur. Kimyasal tepkimeli kütle aktarım hızının maksimum fiziksel kütle aktarım hızına oranı olarak tanımlanan artma faktörü E ($=K_{La}/K_{La0}$) incelenen tüm oksijen aktarım koşulunda 1’den büyüktür. Bu durum, biyoreaktörde gerçekleşen oksijen tüketim hızının kütle aktarım hızında artmaya neden olduğunu göstermektedir. Boyutları film tabakası mertebesinde olan mikroorganizma tanecikleri de kimyasal tepkimeli kütle aktarım hızının artışına destek olabilmektedir (Beenackers 1993).

Maksimum oksijen tüketim hızının maksimum kütle aktarım hızına oranı olarak tanımlanan Damköhler sayısı (Da) (Çalık vd. 2000) ile oksijen tüketim hızının

maksimum oksijen tüketim hızına oranı olarak tanımlanan etkinlik katsayısı (η) (Çalık vd. 2000) bazı periyotlarda oksijen tüketim hızının veya tüketilen oksijen başına hücre veriminin bulunamamasından dolayı hesaplanamamıştır (Çizelge 4.14). Da sayısı LimOT, LOT1, LOT2 ve MOT2 (III periyot) ve MOT1 (periyot II) işletim koşulunda $Y_{X/O}$ verim katsayısının sıfır olması nedeniyle hesaplanamamıştır. Da işletim koşulluna göre farklılık göstermektedir. LimOT, LOT1, MOT1 ve MOT2 oksijen aktarım koşulları için periyot I'de 1'den küçük değerlere sahiptir. Oksijen aktarım kısıtlamasının etkin olduğu bu periyotta çözünmüş oksijen derişimi hızlı bir şekilde azalmaktadır. Periyot II'de ise LimOT, LOT1 ve LOT2 koşulları için Da sayısı mertebe olarak uyumludur. L-fenilalanin üretimi için en iyi koşul olan MOT1 için periyot I'de oksijen aktarım kısıtlamalı iken periyot III'te kütle aktarım kısıtlamalıdır. LimOT, LOT1, LOT2, MOT1 ve MOT2 koşullarında pMK4::aroH taşıyan *r-B.subtilis* A263 ile gerçekleştirilen deney seti verileri kullanılarak hesaplanan Da sayısal değerleri ile aynı koşullarda pMK4::aroA::aroH taşıyan *r-B.subtilis* A263 ile elde edilen Da sayısal değerleri mertebe olarak uyumludur. Etkinlik katsayıları ise 0.004-0.99 değerleri arasındadır. Şekil 4.23 incelendiğinde çözünmüş oksijen derişimi prosesin ilk 3 saati içerisinde hızla azaldığından oksijen tüketim hızı maksimum oksijen tüketim hızına yakın olduğu için etkinlik katsayısı ilk periyotlarda 1'e yakın değerlerdedir. İlerleyen periyotlarda oksijen tüketim hızının azalması ve maksimum oksijen tüketim hızının artmasıyla etkinlik katsayısı ($\eta < 1$) sıfıra yakın değerlerdedir. MOT1 koşulu için periyot I'de etkinlik katsayısı 0.99 iken periyot III'te bu değer 0.004'tür.

L-fenilalanin üretiminde araştırılan oksijen aktarım koşulları için deney verileri kullanılarak sırasıyla tüketilen substrat ve oksijen başına üretilen hücre verimi ($Y_{X/S}$, $Y_{X/O}$) ile tüketilen substrat ve oluşan hücre başına L-fenilalanin verimi ($Y_{P/S}$, $Y_{P/X}$) hesaplanmış ve sonuçlar Çizelge 4.15'de verilmiştir. Çizelge 4.15'te hesaplanan verim katsayısı $Y_{P/S}$ aynı zamanda tepkime girdisine göre ürün seçimliliğini tanımlamaktadır. İncelenen beş oksijen aktarım koşulunda, hücrenin durgunluk fazına girmesinden ve substrat tüketim hızının azalmasından dolayı, $Y_{X/S}$ kalma süresinin artışıyla genel olarak azalmakta ve en yüksek değere ($Y_{X/S}=2.24$) L-fenilalanin üretimi için en iyi olan MOT1 koşulunda ulaşılmıştır. Tüketilen oksijen başına hücre verimi ise Çizelge 4.14'deki $-r_O$ değerlerinden yararlanılarak hesaplanmıştır. Düşük çözünmüş oksijen

derişimlerinde oksijen tüketim hızının ($-r_O$) hesaplanamaması ve hücrenin durgunluk fazına girmesi ile r_X değerlerinin sıfıra eşit olması nedeniyle $Y_{X/O}$ verim katsayısı değeri genelde sıfıra eşittir. LimOT koşulu için periyot II'de $Y_{X/O}$ değeri 0.02, LOT2 koşulu için 0.03, MOT2 için 0.37 olarak belirlenmiştir. Hücre başına L-fenilalanin verim katsayısı $Y_{P/S}$ incelendiğinde, periyot I'den ve periyot II'ye artmaktadır; periyot III'te ise LimOT ve LOT2 koşulları için genelde kalma süresiyle arttığı, LOT1 ve MOT2'de ise hücrelerin durgunluk fazına girmesinden dolayı biyoprosesin sonlarına doğru sıfır olduğu bulunmuştur. En yüksek $Y_{P/X}$ değerine (31.00) MOT1 koşulunda ulaşılmıştır.

Araştırma grubumuzda *Bacillus* türü mikroorganizmalarla yapılan diğer araşırmalar (Çalık vd. 2000) için bulunan verim katsayıları ile L-fenilalanin üretim prosesi sonuçları mertebe olarak uyumludur.

Metabolik akı analizi

Bu yüksek lisans çalışması kapsamında yapılan metabolik akı analizi, literatürde L-fenilalanin üretimi ile ilgili yapılan çalışmadan (Özçelik vd. 2004) sonra yapılan ikinci çalışma olmaktadır. (Çalık 1998, Çalık ve Özdamar 2002) tarafından serin alkali proteaz üretimi için geliştirilen *Bacillus licheniformis* için 105 metabolit ve 147 tepkimeden oluşan matematik model, *Bacillus subtilis* için modifiye edilerek kullanılmıştır. Metabolik akı analizi *Bacillus subtilis*'te oksijen aktarım koşullarına bağlı olarak moleküler oksijenin merkez döngü ve yolizlerindeki tepkimelerin hızlarını belirgin bir şekilde etkilediğini göstermiştir.

Hücreiçi tepkime hızlarının (akıların) pMK4::aroA::aroH taşıyan r-*Bacillus subtilis* A263 için çoğalma, ürün ve yan-ürün oluşumu sırasındaki dağılımı L-fenilalanin üretim prosesinin geliştirilmesi için tepkime yolizindeki önemli özelliklerin belirlenmesi amacıyla belirlenmiştir. Hücre çoğalma, L-fenilalanin, glukoz tüketim ve yan-ürünlerin profilleri dikkate alındığında, hücre çoğalmasının log faz süreci ve L-fenilalanin üretiminin başladığı periyot I ($0 < t \leq 6$ st), periyot II ($6 < t \leq 21$ st) üstel çoğalma fazı süreci ve, periyot III ($21 < t \leq 30$ st) üstel çoğalma fazının sonu aynı zamanda da L-fenilalanin

üretim hızının maksimum olduğu bölge olmak üzere 5 farklı oksijen aktarım koşulunda üç periyot için metabolik akı analizi yapılmıştır.

LimOT, LOT1, LOT2, MOT1 ve MOT2 oksijen aktarım koşullarında pMK4::aroH::aroA taşıyan *r-B.subtilis* A263 ile L-fenilalanin üretiminde glukozun karbon kaynağı olarak kullanılması glikoliz yolizi amino asitlerin ve hücre bileşenlerinin girdileri olan G6P, F6P, T3P, PG3 ve PEP üretimi için önemlidir ve incelenen oksijen aktarım koşullarında her üç periyotta aktif durumdadır.

Glikoliz yolizinden TCA döngüsüne dallanma noktaları olan anaplerotik reaksiyonlardan Mal'dan Pyr'ın sentezlendiği R36 tepkimesi MOT1 koşulu için periyot II ve III'te aktiftir. Glikoliz yolizinde AcCoA'nın sentezlendiği R13 tepkimesinin akısı MOT1 koşulu için ise periyot I'de sıfır olduğu için TCA döngüsü aktif değildir ve döngüdeki dallanma noktası metabolitleri α KG ve OA döngü dışında üretilmiştir.

Karbon kaynağı olarak glukoz kullanıldığından ATP hem glikoliz yolizinde substrat seviyesinde fosforilasyon tepkimesi R43 ile hem de R124 ve R125 oksidatif fosforilasyon tepkimeleriyle üretilmiş, kalma süresiyle ATP üretim hızı düşmüştür. Bununla birlikte hücrelerin durgunluk fazına ulaşmasıyla ATP üretimi daha çok R124 tepkimesiyle gerçekleşmiştir. Hücre oluşum hızları ise beklendiği gibi kalma süresiyle azalmıştır.

L-fenilalanin üretimine yönelik geliştirilen pMK4::aroH taşıyan *r-B.subtilis* A263 (Özçelik vd. 2004) ile karbon kaynağı olarak glukozun kullanıldığı tanımlanmış ortamda, 0.5 dm^3 çalışma hacimli kesikli biyoreaktörlerde $Q_0/V_R = 0.35 \text{ vvm}$, $N = 750 \text{ dk}^{-1}$, $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH}_0 = 6.8$ işletim koşulunda aromatik amino asit yolizindeki hücre içi tepkime akılarına etkisini incelemişlerdir. Aromatik amino asit yolizi tepkimelerinin akıları kalma süresinin artmasıyla önce artmış sonra da azalmıştır. Genetik modifikasyonunu yapıldığı korizmattan prefenat oluşum tepkimesinin akısı $t = 10 \text{ st}$ 'te $t = 8 \text{ st}$ 'e göre 5- kat arttığını bildirmişlerdir.

L-fenilalanin üretiminde hücre içi metabolik akı analizi yapılan bu yüksek lisans çalışmasında en yüksek L-fenilalanin üretimine ulaşılan MOT1 koşuluna ait hücre içi temel metabolik yol izi akıları değerleri ile Özçelik vd. (2004) çalışmasında L-fenilalanin üretiminin en yüksek olduğu $Q_0/V=0.35$ vvm, $N=750$ dk⁻¹ koşuluna ait değerler ile kıyaslanmıştır. L-fenilalanin üretim prosesinin t=3, 9 ve 21 st, kalma süresinde TCA döngüsü akı değerleri Özçelik vd. (2004) 'ye göre yüksek olup, pentoz fosfat yol izi tepkime akıları ise düşüktür. Aromatik amino asit yol izinde DAHP sentetaz enziminin katalizlediği tepkime akısı t=10 st'te yaklaşık 2- kat yüksektir.

5.3 Üç rekombinant *B.subtilis*'in Biyoproses Karakteristikleri

Pilot-ölçek biyoreaktör sisteminde pMK4::aroH taşıyan r-*B. subtilis* A263, pMK4::aroA taşıyan r-*B. subtilis* A263 ve pMK4::aroA::aroH taşıyan r-*B. subtilis* A263 L-fenilalanin üretim performansları ve biyoproses özellikleri MOT1 oksijen aktarım koşulunda karşılaştırılmıştır.

pH ve çözünmüş oksijen derişiminin değışimleri genel olarak paralellik göstermekte; oksijen aktarım koşuluna da bağılı olarak pH önce belli bir kalma süresine kadar farklı hızlarda azalmakta ve sonra değışmemektedir (Şekil 4.31). En fazla pH düşüşü pMK4::aroA::aroH taşıyan r-*B.subtilis* A263'te gözlenmiştir. pH değışimi ortama salgılanan H⁺ iyonlarından kaynaklanmaktadır. Çizelge 4.16 ve Çizelge 4.17 incelendiğinde, biyoreaktör üretim ortamında en yüksek amino- ve organik- asit derişimlerine pMK4::aroA::aroH taşıyan r-*B.subtilis* A263'e ulaşıldığından, pH düşüşüne de hidrojen iyonu kaynağı olarak başta organik ve amino asitlerin neden olduğu düşünülürse, bu sonuç beklenmelidir. Hücre ve substrat derişimlerinin kalma süresi ile değışim profilleri incelendiğinde, periyot III'te hücreler durgunluk fazına ulaşmakta ve substrat tüketim hızı da azalmaktadır. Doğal *B.subtilis* A263, pMK4::aroH taşıyan r-*B. subtilis* A263, pMK4::aroA taşıyan r-*B. subtilis* A263, pMK4::aroA::aroH taşıyan r-*B. subtilis* A263 ile sırasıyla başlangıç glukoz derişiminin %75, %71, %69 ve %68'i tüketilmiştir. L-fenilalanin derişiminin kalma süresi ve mikroorganizma türü ile değışimi incelendiğinde, tanımlanmış üretim ortamında doğal *B. subtilis* A263 ile 0.12 kg m⁻³, pMK4::aroH taşıyan r-*B. subtilis* A263 ile 0.83 kg m⁻³,

pMK4::*aroA* taşıyan *r-B. subtilis* A263 ile 0.85 kg m^{-3} , pMK4::*aroA*::*aroH* taşıyan *r-B. subtilis* A263 ile 1.5 kg m^{-3} L-fenilalanin üretimi olmaktadır.

Doğal ve *r-Bacillus subtilis* A263 hücreleri için üretim ortamına salgılanan amino ve organik asitler ile bunların ortamdaki maksimum toplam derişimleri ve L-fenilalaninin toplam amino asit derişimine oranı olarak tanımlanan ürün seçimliliği S_p Çizelge 4.18’de verilmiştir. Buna göre toplam amino asit derişimi aromatik amino asit yolizindeki moleküler tasarım doğrultusunda artmıştır. Doğal *B.subtilis* A263 için ortamdaki toplam amino asit derişimi 0.367 kg m^{-3} , pMK4::*aroH* taşıyan *B. subtilis* A263 için 0.450 kg m^{-3} , pMK4::*aroA* taşıyan *r-B. subtilis* A263 için 1.055 kg m^{-3} ve pMK4::*aroA*::*aroH* taşıyan *B. subtilis* A263 için ise 1.751 kg m^{-3} olarak belirlenmiştir. $S_{\text{Ü}}$ ’de toplam amino asit derişimine paralel olarak artmıştır. Maksimum S_p , pMK4::*aroA*::*aroH* taşıyan *B. subtilis* A263 ile, yüksek bir değer $S_p = 0.89$ elde edilmiştir. Üretim ortamına aktarılan toplam organik asit derişimleri doğal *B.subtilis* A263, pMK4::*aroH* taşıyan *B. subtilis* A263, pMK4::*aroA* taşıyan *r-B. subtilis* A263 ve pMK4::*aroA*::*aroH* taşıyan *B. subtilis* A263 için sırasıyla 0.865 kg m^{-3} , 1.065 kg m^{-3} , 0.758 kg m^{-3} ve 1.379 kg m^{-3} olarak bulunmuştur.

Oksijen aktarım karakteristikleri

Doğal *B. subtilis* A263, pMK4::*aroH* taşıyan *B. subtilis* A263, pMK4::*aroA* taşıyan *r-B. subtilis* A263 ve pMK4::*aroA*::*aroH* taşıyan *B. subtilis* A263 ile MOT1 oksijen aktarım koşulu için K_{La} , E (K_{La}/K_{La0}), OTR, OTR_{maks} , $-r_O$, OD, Da , ve η değerlerinin biyoproses süresince değişimi hesaplanarak Çizelge 4.19’da verilmiştir. Çizelge 4.19’da periyot I’de ($0 < t < 6$), periyot II’de ($6 < t < 21$), periyot III’te ($21 < t < 30$) olarak tanımlanmıştır. Biyoreaktör sistemlerine ön-sıvı ortamdan mikroorganizma aşılması yapılmadan önce ($t < 0$) fiziksel kütle aktarım katsayısı olan K_{La0} değerleri ölçülmüştür. MOT1 koşulu için mikroorganizma aşılması yapılmadan önce ($t < 0$) K_{La0} değeri 0.012 s^{-1} olarak ölçülmüştür. Doğal *B.subtilis* A263 ile MOT1 işletim koşullunda periyot II’de bölgesinde çözünmüş oksijen derişimi sıfır olduğu için K_{La} değerleri prosesin periyot I ve III’te belirlenebilmiştir. MOT1 koşullunda pMK4::*aroH* taşıyan *B. subtilis* A263, pMK4::*aroA* taşıyan *r-B. subtilis* A263 için sıvı faz kütle aktarım katsayısı K_{La}

değeri periyottan-periyota ilerledikçe azalmakta, pMK4::*aroA*::*aroH* taşıyan *B. subtilis* A263 için ise önce artmakta sonra da azalmaktadır. Kimyasal tepkimeli kütle aktarım hızının maksimum fiziksel kütle aktarım hızına oranı olarak tanımlanan artma faktörü $E (=K_L a / K_{La0})$ 1'den büyüktür. Bu durum, biyoreaktörde gerçekleşen oksijen tüketim hızının fiziksel kütle aktarım hızında artmaya neden olduğunu göstermektedir. Damköhler sayısı (Da) doğal *B. subtilis* A263, pMK4::*aroH* taşıyan *B. subtilis* A263 ve pMK4::*aroA*::*aroH* taşıyan *B. subtilis* A263 için periyot I'de, pMK4::*aroA* taşıyan r-*B. subtilis* A263 için ise periyot I ve II'de 1'den küçüktür. Periyot I'de proseslerin biyokimyasal tepkime kısıtlanmalı olduğunu göstermektedir. Da sayısı doğal *B. subtilis* A263 ve pMK4::*aroA* taşıyan *B. subtilis* A263, için periyot II ve III'te, pMK4::*aroH* taşıyan *B. subtilis* A263 için ise periyot III'te $Y_{X/O}$ verim katsayısının sıfır olmasından dolayı hesaplanamamıştır. Oksijen tüketim hızının maksimum oksijen tüketim hızına oranı olarak tanımlanan etkinlik katsayısı (η) bazı kalma sürelerinde oksijen tüketim hızının veya tüketilen oksijen başına hücre veriminin bulunamamasından dolayı hesaplanamamıştır. Etkinlik katsayısı ise 0.006-0.98 değerleri arasındadır. Şekil 4.32 incelendiğinde çözünmüş oksijen derişimi prosesin ilk 3 saati içerisinde hızla azaldığından oksijen tüketim hızı maksimum oksijen tüketim hızına yakın olduğu için etkinlik katsayısı ilk periyotlarda 1'e yakın değerlerdedir. İlerleyen periyotlarda oksijen tüketim hızının azalması ve maksimum oksijen tüketim hızının artmasıyla etkinlik katsayısı sıfıra yakın değerlerdedir.

MOT1 oksijen aktarım koşulunda oksijen aktarım parametrelerinden bir diğeri olan oksijen tüketim hız değerleri ($-r_O$) doğal ve r-*B. subtilis* A263 hücreleri için biyoprosesin ilk periyotunda OTR değerlerinden daha büyüktür.

Doğal *B. subtilis* A263, pMK4::*aroH* taşıyan *B. subtilis* A263, pMK4::*aroA* taşıyan r-*B. subtilis* A263 ve pMK4::*aroA*::*aroH* taşıyan *B. subtilis* A263 ile MOT1 oksijen aktarım koşulunda gerçekleştirilen L-fenilalanin üretim prosesi deney verileri kullanılarak sırasıyla tüketilen substrat ve oksijen başına üretilen hücre verimi ($Y_{X/S}$, $Y_{X/O}$) ile tüketilen substrat ve oluşan hücre başına L-fenilalanin verimi ($Y_{P/S}$, $Y_{P/X}$) hesaplanmış ve sonuçlar Çizelge 4.20'de verilmiştir. En yüksek $Y_{X/S}=1.24$ değerine maksimum L-fenilalanin derişimi elde edilen pMK4::*aroA*::*aroH* taşıyan *B. subtilis*

A263 ile ulaşılmıştır. Tüketilen oksijen başına hücre verimi ise Çizelge 4.19'daki $-r_O$ değerlerinden yararlanılarak hesaplanmıştır. Düşük çözünmüş oksijen derişimlerinde $-r_O$ hesaplanamaması ve hücrenin durgunluk fazına girmesi ile r_X değerlerinin sıfıra eşit olması nedeniyle $Y_{X/O}$ verim katsayısı değeri genelde sıfıra eşittir. pMK4::*aroH* taşıyan r-*B.subtilis* A263 için periyot I ve II'de sırasıyla 0.42, 0.71, 0.27, 0.67; pMK4::*aroA* taşıyan r-*B.subtilis* A263 için periyot II'de 0.98 olarak hesaplanmıştır. Bunun yanısıra $Y_{P/S}$ değerleri karşılaştırıldığında periyot I'de azalmakta, periyot II için önce artmakta sonra da azalmakta, periyot III için ise doğal *B.subtilis* A263 ve pMK4::*aroA*::*aroH* taşıyan *B. subtilis* A263 için önce artmakta sonra da azalmakta, pMK4::*aroH* taşıyan *B. subtilis* A263, pMK4::*aroA* taşıyan r-*B. subtilis* A263 için ise önce azalmakta sonra da artmaktadır. $Y_{P/X}$ değerleri karşılaştırıldığında en yüksek $Y_{P/X}$ değerine (31.00) pMK4::*aroA*::*aroH* taşıyan *B. subtilis* A263 ile ulaşılmıştır.

Metabolik akı analizi

Doğal *B. subtilis* A263 ile pMK4::*aroH* taşıyan r-*B. subtilis* A263, pMK4::*aroA* taşıyan r-*B. subtilis* A263 ve pMK4::*aroA*::*aroH* taşıyan r-*B. subtilis* A263'lerin L-fenilalanin üretimi açısından optimum koşul olan MOT1 oksijen aktarım koşulunda gerçekleştirilen metabolik akı analizi sonuçlarına göre glikoliz yolizinin genel olarak aktif olduğu ve tepkime akılarının glukozun substrat olarak kullanılmasına bağlı olarak kalma süresiyle tepkime akılarının azaldığı belirlenmiştir. Pentoz fosfat yolizi için dallanma noktası olarak görev yapan R5P doğal *B.subtilis* A263 ile periyot I'de G6P, periyot II'de için G6P ve F6P ile T3P'den, periyot III'te ise F6P ile T3P'den, pMK4::*aroH* taşıyan r-*B. subtilis* A263 ile periyot I için F6P ile T3P, periyot II'de G6P ve F6P ile T3P'den, periyot III'te ise sadece F6P ile T3P'den, pMK4::*aroA* taşıyan r-*B. subtilis* A263 ile periyot I, II, III'te F6P ile T3P'den, pMK4::*aroA*::*aroH* taşıyan r-*B. subtilis* A263 ile periyot II'de G6P, periyot I, II ve III için F6P ile T3P'den üretilmiştir.

Anaplerotik reaksiyonlardan OA'dan Pyr'ın sentezlendiği R37 tepkimesi pMK4::*aroA* taşıyan r-*B. subtilis* A263 ile MOT1 koşulu için periyot I ve II'de aktif; Mal'dan Pyr'ın sentezlendiği R36 tepkimesi pMK4::*aroH* taşıyan r-*B. subtilis* A263 ile periyot II ve

III'te, pMK4::aroA taşıyan r-*B. subtilis* A263 için periyot I ve II'de, pMK4::aroA::aroH taşıyan r-*B. subtilis* A263 için ise periyot II ve III'te aktif olup doğal *B.subtilis* A263 için aktif değildir. Pyr'den OA'nın sentezlendiği R38 tepkimesi doğal *B.subtilis* A263 için periyot I, II, III'te; pMK4::aroH taşıyan r-*B. subtilis* A263 için periyot II ve III'te; pMK4::aroA taşıyan r-*B. subtilis* A263 için periyot II'de aktif olup pMK4::aroA::aroH taşıyan r-*B. subtilis* A263 için aktif değildir.

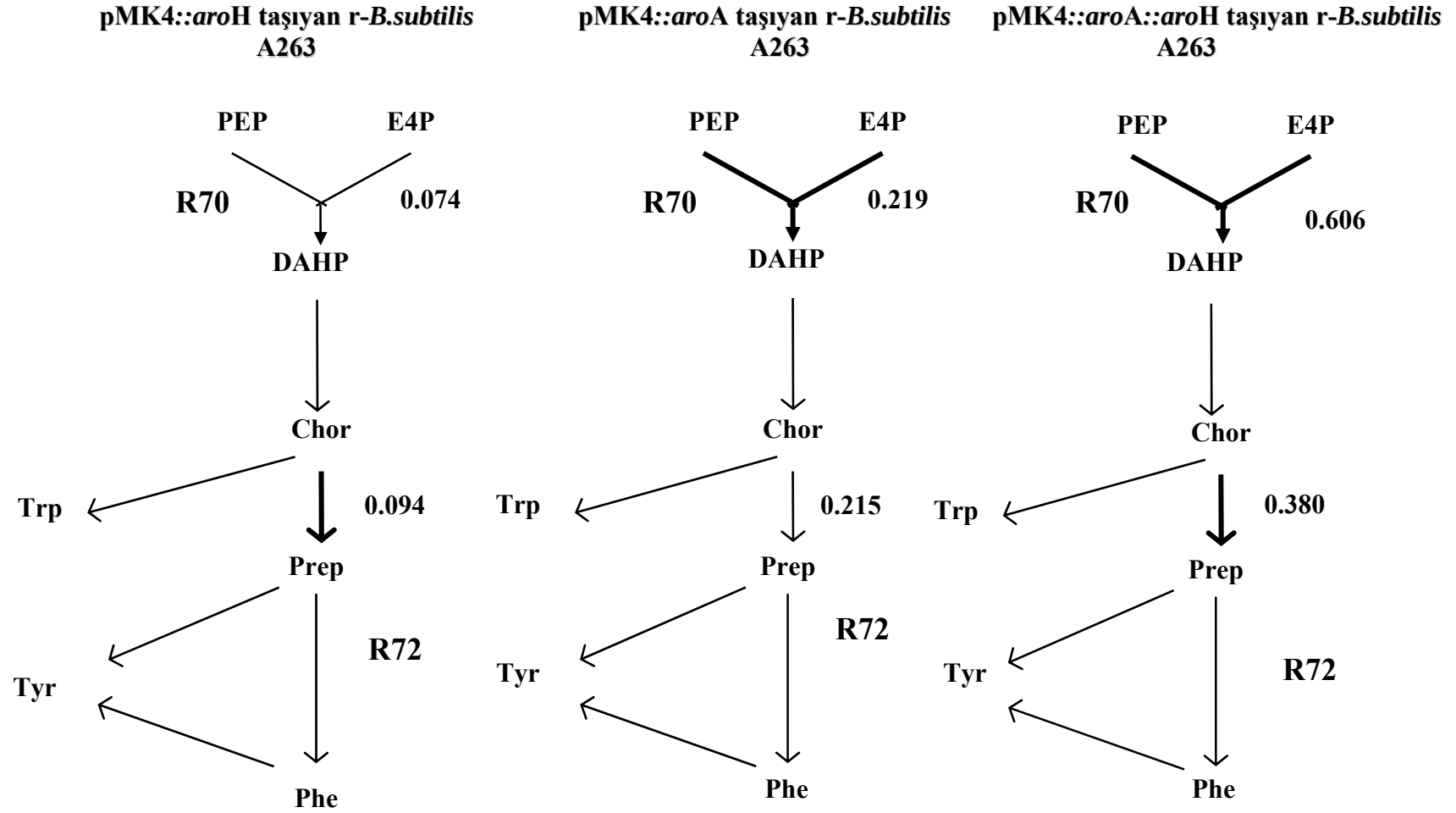
Glikoliz yolizinde AcCoA'nın sentezlendiği R13 tepkimesinin akısı doğal *B.subtilis* A263 için periyot II'de, pMK4::aroH taşıyan r-*B. subtilis* A263 ve pMK4::aroA taşıyan r-*B. subtilis* A263 için periyot I ve III'te ve pMK4::aroA::aroH taşıyan r-*B. subtilis* A263 için periyot I'de sıfır olduğu için TCA döngüsü aktif değildir ve döngüdeki dallanma noktası metabolitleri α KG ve OA döngü dışında üretilmiştir. α KG incelenen oksijen aktarım koşullarında R50, R55, R56, R58, R59, R64, R68, R72, R73 ve R79 tepkimeleriyle sentezlenmiştir.

Toplam ATP üretim akıları doğal *B. subtilis* A263, pMK4::aroH taşıyan r-*B. subtilis* A263, pMK4::aroA taşıyan r-*B. subtilis* A263 ve pMK4::aroA::aroH taşıyan r-*B. subtilis* A263 için, sırasıyla, periyot I'de 17.503, 20.122, 20.47, 28.429 mmol g⁻¹ k.hücre st⁻¹; periyot II'de 5.281, 16.058, 29.673, 30.129; periyot III'te ise 3.206, 0.887, 6.371, 9.455 mmol g⁻¹ k.hücre st⁻¹ olmuştur.

Aromatik grup amino asitlerin yolizi tepkimeleri karşılaştırıldığında R70-74 tepkimelerinin akıları kalma süresiyle önce artmakta sonra da azalmaktadır. Aromatik amino asit yolizinde ilk dallanma noktasından ikinci dallanma noktasına kadar olan PEP+E4P'den DAHP oluşum R70 tepkime akısı kalma süresiyle önce artmış sonra da azalmıştır. Doğal *B.subtilis* A263 için R70 tepkimesinin akısı periyot II'de periyot I'de değerinden yaklaşık 1.8-kat, pMK4::aroH taşıyan r-*B. subtilis* A263 için 2.8-kat, pMK4::aroA taşıyan r-*B. subtilis* A263 için 4.2-kat ve, pMK4::aroA::aroH taşıyan r-*B. subtilis* A263 için ise 5-kat daha yüksektir. Aromatik amino asit yolizindeki kısıtlayıcı basamaklardan sorumlu olan *aroA* ve *aroH* genlerinin klonlanmasıyla aromatik amino asit yolizine giden tepkimenin arttığı ve darboğazların ortadan kalktığı açıktır. Kalma süresiyle L-fenilalanin sentez tepkimesi R73'ün akısı önce artmış sonra da azalmıştır.

Doğal *B.subtilis* A263 için R73 tepkimesinin akısı periyot II’de periyot I değerinden yaklaşık 1.1-kat, pMK4::*aroH* taşıyan *r-B. subtilis* A263 için 1.8-kat, pMK4::*aroA* taşıyan *r-B. subtilis* A263 için 4-kat ve pMK4::*aroA*::*aroH* taşıyan *r-B. subtilis* A263 için ise 7.5-kat daha yüksektir. Aromatik amino asit yolizinde üretimi gerçekleşen tirozin üretim tepkimesinin (R74) akısı ve triptofan üretim tepkimesinin (R75) akısı doğal *B. subtilis* A263, pMK4::*aroH* taşıyan *r-B. subtilis* A263, pMK4::*aroA* taşıyan *r-B. subtilis* A263 için kalma süresiyle azalmıştır ve, periyot III’te tirozin ve triptofan üretimi çok azdır. pMK4::*aroA*::*aroH* taşıyan *r-B. subtilis* A263 için ise periyot III’te tirozin ve triptofan üretimi yoktur. *Bacillus* türü mikroorganizmalarda aromatik amino asit yolizi regülasyonuna göre tirozin, triptofan ve L-fenilalanin amino asitlerinin üçü ortamda bulunduğu R70 numaralı tepkimeyi katalizleyen DAHP sentetaz enzimi inhibe olmaktadır (Nagarajan 1993). Metabolik tasarım ile geliştirilen rekombinant mikroorganizmalar ile L-fenilalanin üretiminde üretim ortamında tirozin ve triptofan bulunmamaktadır. Bunun sebebi ise hücre-içinde üretilen tirozin ve triptofanın katabolizma tepkimeleriyle tüketilmesidir. Aromatik amino asit yolizi regülasyonu açısından ele alındığında yukarıda belirtilen üç amino asitten sadece L-fenilalaninin üretim ortamında bulunması nedeniyle DAHP sentetaz enzimi inhibe olmamakta; hücre-içinde üretilen tirozin ve triptofanın DAHP sentetaz enzimine inhibisyon etkisi ise R70 numaralı tepkimeye yönelik metabolik tasarım sonucu iki-gen içeren pMK4::*aroA*::*aroH* taşıyan *r-B. subtilis* ile azaltılmıştır.

Sonuç olarak, metabolik mühendislik prensipleriyle birincil ve ikincil kısıtlayıcı basamaklar olarak belirlenmiş olan DAHP sentetaz (gen: *aroA*) ve korizmat mutaz (gen: *aroH*) enzimlerinin katalizlediği tepkimeler ve bu iki konuma yönelik olarak rekombinant-*Bacillus subtilis* geliştirilmesi ile aromatik amino asit yolizi tepkimelerinin akıları önemli ölçüde artmış ve böylece daha yüksek verim seçimlilikte L-fenilalanin üretimi gerçekleşmiştir.



Şekil 5.1 Aromatik amino asit yolizleri geliştirilmiş üç farklı metabolik mühendislik tasarımı *r-B.subtilis*'in periyot III hücreiçi tepkime akılları

Şekil 5.1’de aromatik amino asit yolizindeki hedef tepkimelerin katalizörü olan enzimlerin sentezini gerçekleştiren genleri kullanarak yapılan metabolik tasarımlarla geliştirilen üç *r-B.subtilis*’in hücre-içi tepkime akıları ve tasarımların yolizi akılarındaki yaptığı artış gösterilmektedir. Buna göre aromatik amino asit yolizindeki ilk dallanma noktasındaki hedef gen olan *aroA* geninin klonlanmasıyla R70 numaralı tepkime akısı ikinci dallanma noktasındaki hedef gen olan *aroH* geninin klonlanmasıyla elde edilen hücre-içi tepkime akısına göre 3- kat, her iki genin klonlanmasıyla geliştirilen mikroorganizma ile elde edilen hücre-içi tepkime akısı pMK4::pMK4::*aroH* taşıyan *r-B.subtilis* A263 ve pMK4::*aroA* taşıyan *r-B.subtilis* A263’e göre sırasıyla 8.2- ve 2.8- kat yüksektir. Aromatik amino asit yolizindeki iki önemli hedef genlerin klonlanmasıyla aromatik amino asit yolizi akıları ve buna bağlı olarak da L-fenilalanin üretim akısı ve verim artmıştır.

Çizelge 5.1 Üç rekombinant plasmidi taşıyan *B.subtilis* A263 ile biyoreaktöre aktarılan toplam amino asit derişimi, L-fenilalanin derişim ve seçimliliği, ve hücreiçi tepkime akılarının değişimi

AA Yolizindeki MM Tasarımı	Periyot	C_{AA} , (kg m ⁻³)	C_{Phe} , (kg m ⁻³)	S_{Phe} (kg/kg)	R#70		R#71		R#72	
					Akı	Artış	Akı	Artış (%)	Akı	Artış
Doğal (Referans)	I	0.044	0.018	0.509	0.037	1.19	0.037	1.19	0.059	1.10
	II	0.350	0.122		0.044		0.044		0.065	
	III	0.275	0.140		0.035		0.035		0.046	
pMK4:: <i>aroH</i> (R#72)	I	0.131	0.040	0.722	0.055	2.84	0.055	2.84	0.069	1.77
	II	0.404	0.270		0.156		0.156		0.122	
	III	0.432	0.312		0.074		0.074		0.094	
pMK4:: <i>aroA</i> (R#70)	I	0.420	0.340	0.805	0.074	4.19	0.074	4.19	0.074	4.14
	II	0.842	0.660		0.310		0.310		0.306	
	III	1.055	0.850		0.219		0.219		0.215	
pMK4:: <i>aroA</i> :: <i>aroH</i> (R#70+R#72)	I	0.432	0.420	0.875	0.097	5.27	0.097	5.27	0.078	7.52
	II	1.182	1.040		0.511		0.511		0.587	
	III	1.713	1.500		0.606		0.606		0.380	

Şekil 5.1’de aromatik amino asit yolizindeki metabolik mühendislik tasarımı ile geliştirilen üç *r-B.subtilis* A263 ile ortama aktarılan toplam amino asit derişimi kalma süresiyle arttmaktadır. Buna paralel olarak da üretilen L-fenilalanin derişimi ve S_p olarak tanımlanan toplam amino asite göre seçimlilik de kalma süresi ile artmaktadır. Araştırmanın temel amacı doğrultusunda, yapılan metabolik mühendislik tasarımlar sonucu tek-gen *aroA* klonlaması ile *aroH*’nin klonlandığı (Özçelik 2003, Özçelik vd. 2004) çalışmaya göre akılar ve verim daha çok artmış; iki gen klonlaması ile *pMK4::aroA::aroH* taşıyan *r-B.subtilis* A263 ile de aromatik grup amimino asit yolizi akıları yükselmiş ve L-fenilalanine yönlenmiştir. Karbon kaynağı glukoza göre L-fenilalanin seçimliliği $Y_{p/S}$ kalma süresiyle genelde artmaktadır. Aromatik amino asit yolizindeki hedef tepkimelerin akıları periyot II’de periyot I’e göre artmakta; periyot III’te ise genelde azalmaktadır. R70 ve R72 hücre-içi tepkime akılarındaki en fazla artış *pMK4::aroA::aroH* taşıyan *r-B.subtilis* A263 ile ulaşılmıştır. En fazla L-fenilalanin derişimine de geliştirilen bu mikroorganizmayla ulaşılmış ve metabolik akı analiz sonuçları da bu sonucu desteklemiştir.

6. SONUÇLAR

Bu yüksek lisans çalışmasında elde edilen sonuçlar toplu olarak aşağıda verilmiştir.

6.1 Rekombinant Mükroorganizma Geliştirilmesi

1. Aromatik amino asit yolizinde DAHP sentetaz (gen: *aroA*) enziminin katalizlediği ilk tepkime ve korizmat mutaz (gen: *aroH*) enziminin katalizlediği korizmattan prefenat iki kısıtlayıcı konuma yönelik olarak *aroA* geni, *aroH* geni içeren ve içermeyen plasmidlere paralel olarak klonlanmış ve iki *r-B.subtilis* A263 geliştirilmiştir.

6.2 Laboratuvar ölçekli üretim

1. Doğal *B.subtilis* A263, pMK4::*aroA* taşıyan *r-B.subtilis* A263, pMK4::*aroH* *r-B.subtilis* A263 ve pMK4::*aroA*::*aroH* *r-B.subtilis* A263 ile $V_R=0.11 \text{ dm}^3$ çalışma hacimli biyoreaktörlerde, $T=37 \text{ }^\circ\text{C}$, $N=200 \text{ dk}^{-1}$ ve $\text{pH}_0=6.8$ işletme koşullarında glukozun karbon olarak kullanıldığı tanımlanmış ortamda en fazla L-fenilalanin üretimine pMK4::*aroA*::*aroH* *r-B.subtilis* A263 ($C_{\text{phe}}=1.38 \text{ kgm}^{-3}$) ile ulaşılmıştır.

2. Doğal *B.subtilis* A263, pMK4::*aroH* taşıyan *r-B. subtilis* A263, pMK4::*aroA* taşıyan *r-B. subtilis* A263, pMK4::*aroA*::*aroH* taşıyan sırasıyla başlangıç glukozunun %79, %61, %53 ve %72'si tüketilmiştir.

6.3 Pilot ölçekli üretim

1. Laboratuvar ölçekteki en uygun ortam koşulları kullanılarak gerçekleştirilen pilot-ölçek deneylerinde en yüksek L-fenilalanin derişimine MOT1 (0.5 vvm, 500 dk^{-1}) koşulunda $t=30 \text{ st}$ 'te 1.5 kgm^{-3} olarak bulunmuştur.

2. Ortam pH'ı L-fenilalanin üretimine bağlı olarak düşmüş ve MOT2 koşulunda en düşük değeri olan 4.93' e ulaşmıştır.

3. Çözünmüş oksijen derişimleri LOT2 ve MOT1 koşullarında $t=1.5$ st'te kalma süresinde sıfıra düşmüş ve prosesin 8 st'inden sonra tekrar artmaya devam etmiş ve sırasıyla prosesin $t=15$ st ve $t=24$ st'lerden sonra sabitlenerek 0.13 ve 0.09 mol/m^3 derişim aralığında sabitlenmiş; LimOT, LOT1 ve MOT2 koşullarında $t=2$ st kalma süresinde çözünmüş oksijen derişimi düşmüş ve prosesin 8 st'inden sonra $t=18$ st'e kadar artmaya devam etmiş ve sırasıyla 0.19 , 0.057 ve 0.18 mol/m^3 aralığında sabitlenmiştir.
4. İncelenen oksijen aktarım koşulunda ortamdaki glukozun %71-84'ü tüketilmiştir.
5. Uygulanan oksijen aktarım koşulları arasında en yüksek sıvı faz hacımsal kütle aktarım katsayısı değeri olan $K_{La}=0.037 \text{ s}^{-1}$ 'e periyot II'de MOT2 koşulunda ulaşılmıştır.
6. En yüksek oksijen tüketim hızına ($2.42 \cdot 10^{-3} \text{ molm}^{-3}\text{s}^{-1}$) LOT1 koşulunda ulaşılmıştır.
7. Doğal *B. subtilis* A263 ile pMK4::*aroH* taşıyan r-*B. subtilis* A263, pMK4::*aroA* taşıyan r-*B. subtilis* A263 ve pMK4::*aroA*::*aroH* taşıyan r-*B. subtilis* A263'lerin L-fenilalanin üretimi açısından optimum koşul olan MOT1 oksijen aktarım koşulunda L-fenilalanin üretim performansları karşılaştırılmış ve doğal *B.subtilis* A263'e göre r-*B.subtilis* A263'ler ile sırasıyla 2.23, 6.07 ve 6.4 kat artış sağlanmıştır.
8. Doğal *B.subtilis* A263, r-*B. subtilis* A263, pMK4::*aroH* taşıyan r-*B. subtilis* A263, pMK4::*aroA* taşıyan r-*B. subtilis* A263, pMK4::*aroA*::*aroH* taşıyan sırasıyla başlangıç glukozunun %75, %71, %69 ve %68'i tüketilmiştir.
9. Metabolik akı analizi ile oksijen aktarım koşullarına bağlı olarak moleküler oksijenin merkez döngü ve yolizlerindeki tepkimelerin hızlarını belirgin bir şekilde etkilediği bulunmuştur.

10. Metabolik akı analizi ile L-fenilalanin üretimi açısından en uygun koşulda aromatik amino asit yolizindeki darboğaz oluşturan tepkimelerin akılarında yaklaşık olarak 5 kat artış sağlanmıştır.

11. Metabolik akı analizi ile aromatik amino asit yolizinde önemli bir dallanma noktası olan korizmat'tan prefenat tepkimesi ile Tyr ve Trp üretimine rastlanmamış ve metabolik akının L-fenilalanin tepkimesine doğru kaydığı belirlenmiştir.

12. Doğal *B. subtilis* A263 , pMK4::*aroH* taşıyan r-*B. subtilis* A263, pMK4::*aroA* taşıyan r-*B. subtilis* A263 ve pMK4::*aroA*::*aroH* taşıyan r-*B. subtilis* A263 L-fenilalanin üretimi açısından optimum koşul olan MOT1 oksijen aktarım koşulunda gerçekleştirilen metabolik akı analizi sonucu L-fenilalanin üretim tepkimesindeki (R72) akı artışı doğal *B.subtilis* A263 'e göre periyot I için sırasıyla 1.2, 1.25 ve 1.32, periyot II için 2, 4.7, 9.0- kat artmıştır.

6.4 Hedeflenen Çalışmalar

Aromatik amino asit yolizndeki hedef genlerin metabolik mühendislik tasarımı ile klonlanmasıyla geliştirilen pMK4::*aroA* taşıyan r-*B.subtilis* A263 ve pMK4::*aroA*::*aroH* taşıyan r-*B.subtilis* A263 mikroorganizmaları için üretim ortamı (tanımlanmış ve kompleks) optimize edilerek endüstriyel olarak L-fenilalanin üretimi gerçekleştirilmesi bu çalışmadan sonra hedeflenen basamak olmalıdır.

EKLER

EK 1 Genetik mühendisliği araştırma programında kullanılan çözeltilerin bileşimi

EK 2 *Bacillus*'tan miniprep plasmid DNA izolasyonunda kullanılan çözeltiler

EK 3 DNS Yöntemi ile toplam indirgenmiş şeker analizi için reaktif hazırlanması

EK 4 Mikroorganizma derişimi için kalibrasyon eğrisi

EK 5 Glukoz derişimi için kalibrasyon eğrisi

EK 6 *aroA* geninin nükleik asit dizini

EK 7 *aroA* geni ileri primer dizini ve termodinamik özellikleri

EK 8 *aroA* geni geri primer dizini ve termodinamik özellikleri

**EK 9 Genetik Mühendisliği araştırma programında kullanılan
markerlar ve büyüklükleri**

**EK 10 GAMS paket programı ile metabolik akı analizi için
matematik modelin çözümünde kullanılan program**

EK 11 Deney verileri

EK 1 Genetik mühendisliği araştırma programında kullanılan çözeltilerin bileşimi

LB	10 g/L Tripton
	5 g/L Maya Özütü
	10 g/L NaCl

LBA	10 g/L Tripton
	5 g/L Maya Özütü
	10 g/L NaCl
	15 g/L Agar

Çözelti I	50 mM Glukoz
	25 mM Tris-HCl (pH=8.0)
	10 mM EDTA

Çözelti II	0.2 N NaOH
	% 1 SDS

Çözelti III	5 M Potasyum asetat
	11.5 (h/h) Asetik asit

Denaturasyon Çözeltisi	0.5 N NaCl
	0.5 N NaOH

Nötralleştirici Çözelti	1.5 N NaCl
	0.5 M Tris-HCl

EK 1 Genetik mühendisliği araştırma programında kullanılan çözeltilerin bileşimi
(devam)

SET	75 mM NaCl
	25 mM EDTA
	20 mM Tris-HCl (pH=7.5)

20*SSC	175 g/l NaCl
	88.2 Tris-Na sitrat

10 XTBE	108 g/l Tris
	55 g/l Borik asit
	9.3 g/l EDTA

10 XTE	0.1 M Tris-HCl
	0.01 M EDTA (pH=7.5)

EK 2 *Bacillus*'tan miniprep plasmid DNA izolasyonunda kullanılan çözeltiler

TSE Tamponu

Bileşen	Derişim
Tris-HCl, pH=8.0	10 mM
NaCl	300 mM
EDTA	10 mM

Çözelti A

Bileşen	Derişim (mM)
Tris-HCl, pH=8.1	10 mM
NaCl	50 mM
EDTA	10 mM
Sakkaroz	%8 (a/h)

Çözelti B

Bileşen	Derişim
NaOH	0.2 M
SDS	%1 (a/h)

Çözelti C

Bileşen	Derişim
Potasyum asetat	5 mM
Asetik asit (glacial)	60 ml
Su	Hacim 100 ml'ye tamamlanacak şekilde eklenir.

EK 3 DNS Yöntemi ile toplam indirgenmiş şeker analizi için reaktif hazırlanması

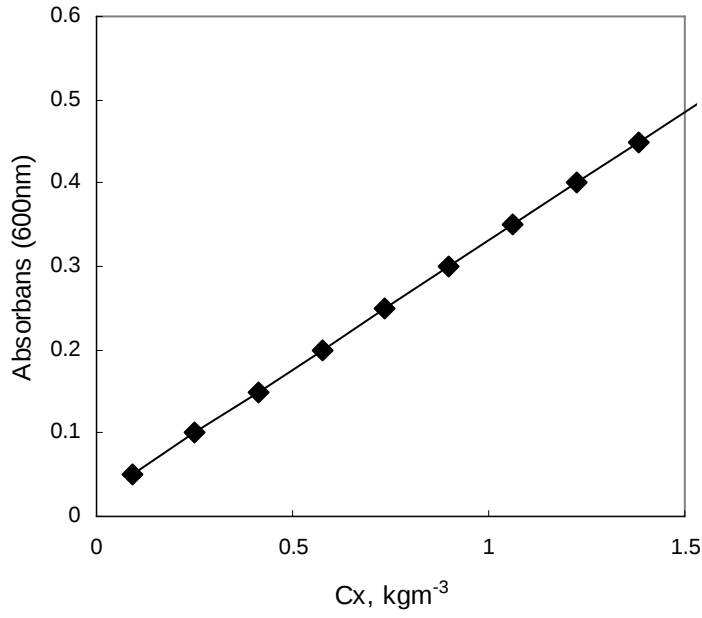
1. a) 880 cm³, %1 (a/h)'lik DNS çözeltisi hazırlanır.
8.8 g dinitrosalisilik asit (DNS) tartılarak 880 cm³ saf suda çözülür.
b) 225 g ROCHELLE tuzu (sodyum potasyum tartarat) çözeltiye eklenerek karıştırılır.
c) Bu çözeltiye 300 cm³ %4.5 NaOH çözeltisi eklenir.
2. a) 22 cm³ %10 NaOH çözeltisi hazırlanır.
2.2 g NaOH 22 cm³ saf suda çözülür.
b) Bu çözeltiye 10 g kristalize fenol katılır ve karışıma 100 cm³ saf su ilave edilir.
c) Bu alkali fenol karışımından 60 cm³ alınarak 6.9 g NaHCO₃ ile karıştırılır.

Birinci basamakta elde edilen DNS-alkali çözeltisine ikinci basamakta elde edilen çözeltiye eklenerek ROCHELLE tuzu çözününceye kadar karıştırılır. Hazırlanan çözelti koyu renkli bir şişede saklanır ve hazırlandıktan 48 st sonra kullanılır.

EK 4 Mikroorganizma derişimi için kalibrasyon eğrisi

Mikroorganizma derişimleri $Cx = \frac{Absorbans - 0.02223}{1.8538} * SO$ kalibrasyonu
kullanılarak hesaplanmıştır.

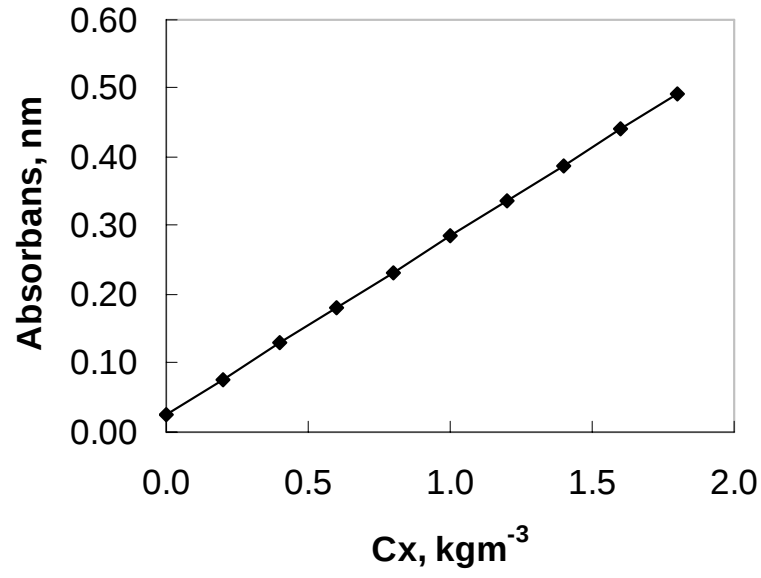
$$m=0.3125 \text{ nm kg}^{-1} \text{ m}^3$$



EK 5 Glukoz derişimi için kalibrasyon eğrisi

Glukoz derişimleri $C_G = (Absorbans * 3.8576 - 0.0976) * SO$ kalibrasyonu kullanılarak hesaplanmıştır.

$$m=0.25 \text{ nm kg}^{-1}\text{m}^3$$



EK 6 *aroA* geninin nükleik asit dizini

B. subtilis 168|BG10375|*aroA*: 1074 bp - 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase / chorismate mutase-isozyme 3

```
tgtaa
aaaacccttgaacattgccctcacatcatgtaggtagc
ttcatagattactttatcacttaaaagcgttgggtaat
aaagtagagttttataaaaatttttgtatttcagtatt
tccatttgggaattactttagtaagatgcatgataacta
caaaataaaaaatgaatgtgcagggaaggatgaaaaaa
1 - atg agc aac aca gag tta gag ctt tta agg
31 - cag aaa gca gac gaa tta aac cta caa att
61 - tta aaa tta atc aac gaa cgc ggc aat gtt
91 - gta aaa gag atc ggt aaa gcg aag gaa gca
121 - cag ggt gtc aac cga ttt gac cct gtc aga
151 - gaa cgc aca atg tta aac aat atc att gaa
181 - aac aat gac ggc ccg ttc gaa aat tca acc
211 - atc cag cac att ttt aaa gag ata ttc aaa
241 - gcc ggt tta gag ctt cag gaa gaa gat cac
271 - agc aaa gcg ctg ctt gtc tcc cgc aag aaa
301 - aaa cct gaa gat aca att gtt gat atc aaa
331 - ggc gaa aaa atc gga gac ggc cag caa aga
361 - ttc att gtc ggc cca tgt gcg gta gag agc
391 - tat gag cag gta gct gaa gtc gct gca gct
421 - gcg aaa aaa caa ggc att aaa att ttg cgc
451 - ggt gga gcc ttt aag cct cgt acg agc cca
481 - tac gat ttc caa ggc ctt ggt gtt gaa ggc
511 - ctt caa att tta aaa cgt gta gcg gat gaa
541 - ttt gat ctg gcg gtt atc agt gaa atc gta
571 - act ccg gct cat atc gaa gaa gcg ctg gac
601 - tac att gat gtc att caa atc gga gcg cgc
631 - aac atg caa aac ttc gaa ttg ctg aaa gcg
661 - gcc ggc gcc gtg aaa aag cca gtg ctt ctg
691 - aag cgc ggt ctt gct gca acg atc tct gaa
721 - ttc atc aat gct gct gaa tac atc atg tca
751 - caa gga aat gac caa att atc ctt tgt gag
781 - cgc gga atc aga aca tat gaa aca gca acg
811 - aga aac acg ctg gat att tca gct gtg ccg
841 - att ttg aaa caa gaa acg cat ttg cca gtc
871 - ttt gtt gat gtt acg cat tca aca ggc cgc
901 - cgt gac ctc ttg ctt ccg aca gct aaa gcc
931 - gct tta gcg atc ggt gct gat ggc gta atg
961 - gct gag gtt cac cct gat ccg tca gtc gca
991 - ctt tct gac tct gct cag caa atg gcg att
1021 - cct gaa ttc gaa aaa tgg ctg aat gaa ctg
1051 - aag cca atg gtg aaa gtc aac gct
taattgaacaatccaaaaggccgcgctgcggcctttttt
tatgcttttctcgtttatttagttataaaaaaccaagtata
cgttttcatcatctataaaaacgtgtataatttcatgag
aagtaattaaatttgatgaataatgaaaaataatgtaca
ctactgacttacgcttacaaatcataaacgacataaattcggac
```


EK 8 *aroA* geni geri primer dizini ve termodinamik özellikleri

aroA geri primer+ *SalI*

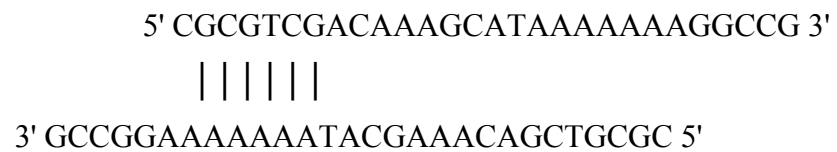
cgcgtcgacaaagcataaaaaaggccg

	1.txt
	29 nt.
	press a key to continue
	Position
	& Length
	of fragm.
	1 28
	Td [°C]
	82.7
	ΔG
	kcal/mol
	-55.3

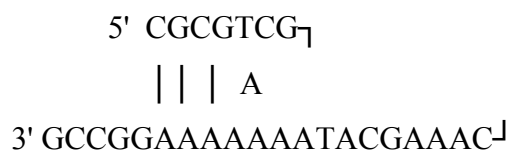


	ΔH
	kcal/mol
	-241.7

Dimer formation:

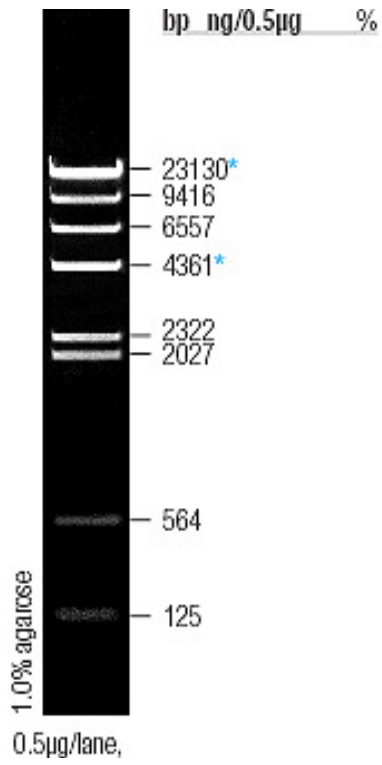


Self-complementarity:

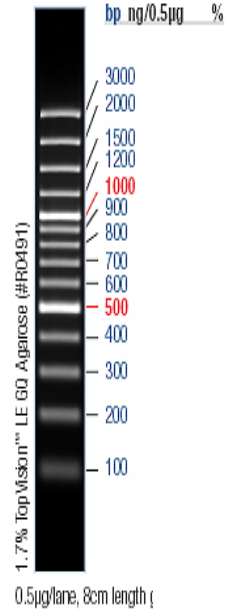


EK 9 Genetik Mühendisliği araştırma programında kullanılan markerlar ve büyüklükleri

λDNA HindIII



100 bp DNA Ladder plus



**EK 10 Gams paket programı ile metabolik akı analizi için matematik modelin
çözümünde kullanılan program**

SET I / 1 * 5000/;

VARIABLES

J (I)

DD

Z;

POSITIVE VARIABLE J, DD ;

J.UP(I) = 350;

EQUATIONS

SS

PEP

Pyr

G6P

F6P

ATP

CO2

R5P

NADPH

T3P

E4P

PG3

NADH

Lac

AcCoA

Ac

Cit

GLOX

Mal

ICit

AKG

Succ

SuccCoA

FADH2

Fum

OA

DHF

Gly

NH3

MTHF

MeTHF

MetTHF

THF

Gln

Glu

CaP

ADP

Pi

Chor
Phe

**EK 10 Gams paket programı ile metabolik akı analizi için matematik modelin
çözümünde kullanılan program (devam)**

Tyr
PRPP
IGP
PPi
Ser
Trp
Asp
Asn
ASPSA
mDAP
Lys
HSer
Cys
Met
Thr
Ile
Pro
Orn
Citr
Arg
AMP
H2S
Ala
Kval
Val
Leu
His
PRAIC
IMP
GTP
GDP
GMP
UMP
UTP
CTP
UDP
CDP
dATP
dGTP
dCTP
dTTP
GL3P
C140
C141
PA
UDPNAG
UDPNAM
CMPKDO
CDPEtN
UDPGlc

ADPHep
G1P

**EK 10 Gams paket programı ile metabolik akı analizi için matematik modelin
çözümünde kullanılan program (devam)**

S7P
XYL5P
RIB5P
Gluc6P
Ldihy
Ltet
Proteaz
Glc
F10THF
Amy
IFN
NP
OX
Form
Bla
DGloc
Gloc

OBJECTIVE;

OBJECTIVE .. Z =E= DD;

SS .. J('179') =E= 0;

Glc .. J('1') - J('804') =E= 0;

OA .. + J('550') - J('49') - J('50') + J('61') - J('75') =E= 0;

OX .. + J('802') - J('803') =E= 0;

Form .. + J('800') - J('801') - J('802') + J('803') =E= 0;

PEP .. J('13') - J('14') - J('1') - J('26') - 2*J('91') - J('137') - J('172') =E= 0;

PYR .. - J('800') + J('801') - J('550') + J('14') + J('1') - J('40') + J('41') + J('47') + J('65') - J('69')
- 2*J('70') - J('78') - J('86') + J('90') + J('95') - J('29') + J('49') + J('604') + J('608') =E= 0;

G6P .. J('1') - J('2') + J('3') - J('4') + J('10') - J('9') =E= 0;

ATP .. + J('14') - J('181') - J('11') + J('22') - J('23')
+ J('42') - J('43') + J('56') - J('57') - J('73') - J('74') - J('76')
- J('77') - J('85') - J('91') - J('98') - J('100') - J('101') - J('103')
- 4*J('104') - J('106') - J('107') - J('108') + J('109')
- J('112') - J('113') - J('115') - J('117') - J('118')
- J('121') - J('124') - J('126') + J('127') - 2*J('128')
- 6*J('133') - 6*J('134') - 7.2*J('135') - 2*J('145')
+ 2*J('155') + J('156') - 2*J('165') - J('173') -
J('176') - 41.139*J('179') - 5.5*J('180') - 5.5*J('190') - 5.5*J('191') - J('607') - 5.5*J('700') =E= 0;

CO2 .. - J('802') + J('803') - J('550') + J('49') + J('8') + J('47') + J('53')
+ J('55') + J('72') + J('83') + J('93') + J('94') + J('86') + J('95')

$$- J('104') + J('116') - J('145') - J('148') + J('184') - J('161') \\ + J('162') + J('173') + J('29') + J('602') + J('603') + J('611') + 2*J('612') = E = 0;$$

EK 10 Gams paket programı ile metabolik akı analizi için matematik modelin

çözümünde kullanılan program (devam)

$$\text{NADPH} \dots + J('306') + J('4') - J('97') + J('8') + J('47') + J('53') - J('70') - \\ J('77') - J('80') - J('84') - J('86') - J('91') \\ - 2*J('100') - J('101') - J('132') - 12*J('133') \\ - 11*J('134') - 14*J('135') - J('137') - J('147') - J('149') \\ + J('150') - 4*J('165') - J('112') - J('113') - J('124') - J('128') - J('300') + J('301') - J('303') + J('602') - \\ J('605') \\ - J('610') = E = 0;$$

$$\text{PG3} \dots - J('13') + J('22') - J('23') + J('26') - J('64') = E = 0;$$

$$\text{NADH} \dots + J('22') - J('23') - J('40') + J('41') - J('155') \\ + J('55') + J('61') + J('64') + J('72') + 2*J('74') \\ + J('94') + J('106') + J('116') - J('148') + J('184') + J('29') + J('300') - J('301') + 2*J('603') \\ + J('607') + J('609') + 3*J('612') + J('613') = E = 0;$$

$$\text{Lac} \dots J('40') - J('41') = E = 0;$$

$$\text{AcCoA} \dots + J('800') - J('801') - J('50') - J('42') + J('43') - J('63') - J('68') - J('72') \\ - J('101') - 7*J('133') - 7*J('134') - 8.2*J('135') - \\ J('169') + J('29') - J('90') - J('81') + J('603') + 2*J('607') + J('609') + J('610') \\ + J('611') + J('613') = E = 0;$$

$$\text{Ac} \dots J('42') - J('43') + J('68') + 2*J('90') + J('101') + J('81') = E = 0;$$

$$\text{Cit.} \dots J('50') - J('51') = E = 0;$$

$$\text{GLOX} \dots J('62') - J('63') = E = 0;$$

$$\text{Mal} \dots - J('47') + J('59') - J('61') + J('63') = E = 0;$$

$$\text{ICit} \dots J('51') - J('53') - J('62') = E = 0;$$

$$\text{AKG} \dots + J('53') - J('97') - J('55') + J('64') - J('65') + J('69') + J('71') + J('72') \\ + J('74') + J('75') + J('81') + J('86') + J('93') + J('94') \\ + J('101') - J('602') - J('605') - J('603') - J('607') - J('611') - J('612') = E = 0;$$

$$\text{Succ} \dots J('56') - J('57') - J('58') + J('62') + J('611') = E = 0;$$

$$\text{SuccCoA} \dots J('55') - J('56') + J('57') - J('611') + J('612') + J('603') = E = 0;$$

$$\text{FADH2} \dots J('58') - J('156') + 2*J('603') + J('607') + J('612') + J('613') = E = 0;$$

$$\text{Fum} \dots J('58') - J('59') + J('103') + J('104') + J('114') + J('600') + J('611') = E = 0;$$

$$\text{DHF} \dots - J('147') + J('128') = E = 0;$$

$$\text{Gly} \dots J('66') - J('67') - J('104') + J('148') - J('184') - 0.58*J('179') - 35*J('180') - 51*J('190') \\ - 3*J('191') - 48*J('192') + J('609') - 16*J('700') = E = 0;$$

$$\text{NH3} \dots - J('97') - J('121') + J('86') + J('90') - J('98') - J('148') + J('184') + J('163')$$

$$+ J('600') + J('601') + J('602') + J('604') + J('608') - J('95') = E = 0;$$

EK 10 Gams paket programı ile metabolik akı analizi için matematik modelin çözümünde kullanılan program (devam)

$$\text{MTHF} \dots - J('90') + J('149') = E = 0;$$

$$\text{MeTHF} \dots - J('183') + J('150') + J('606') = E = 0;$$

$$\text{F10THF} \dots J('183') - J('104') - J('105') = E = 0;$$

$$\text{MetTHF} \dots J('66') - J('67') - J('128') - J('148') + J('184') - J('149') - J('150') = E = 0;$$

$$\text{THF} \dots - J('66') + J('67') + J('90') + J('104') + J('105') \\ + J('147') + J('148') - J('184') - J('606') = E = 0;$$

$$\text{Gln} \dots - J('74') - J('76') + J('98') - 2 * J('104') - J('106') - J('145') \\ - J('169') - 0.25 * J('179') - 7 * J('180') - 29 * J('190') - 10 * J('191') - 24 * J('192') - J('605') - 8 * J('700') = E = 0;$$

$$\text{Glu} \dots J('306') + J('97') + J('106') + J('145') + J('169') - 0.25 * J('179') - 5 * J('180') \\ - J('64') + J('65') - J('69') - J('71') - J('72') - J('75') + J('76') - J('81') \\ - J('86') - J('93') - J('94') - J('98') \\ - J('100') - 2 * J('101') + 2 * J('104') - 23 * J('190') - 15 * J('191') - 40 * J('192') + 2 * J('602') + 2 * J('605') + \\ J('606') + J('603') \\ + J('607') + J('611') + J('612') - 21 * J('700') = E = 0;$$

$$\text{CaP} \dots - J('102') - J('116') + J('145') = E = 0;$$

$$\text{ADP} \dots - J('14') + J('181') + J('11') - J('22') + J('23') - J('42') + J('43') - J('56') + J('57') \\ + J('77') + J('85') + J('91') + J('98') + J('100') + J('101') \\ + 4 * J('104') + J('107') + J('108') - J('109') + J('113') + 2 * J('115') \\ + J('117') + J('118') + J('121') + J('124') + J('126') - J('127') \\ + 2 * J('128') + 6 * J('133') + 6 * J('134') + 7.2 * J('135') + 2 * J('145') \\ - 2 * J('155') - J('156') + J('165') + J('173') + 41.139 * J('179') + 5.5 * J('180') + 5.5 * J('190') + 5.5 * J('191') \\ + J('607') + 5.5 * J('700') = E = 0;$$

$$\text{Pi} \dots J('64') + J('181') - J('22') + J('23') - J('42') + J('43') - J('56') + J('57') + \\ J('74') + J('77') + J('85') + 4 * J('91') + J('98') + J('100') + J('101') + J('102') \\ + 4 * J('104') + J('114') + J('116') + J('121') + 6 * J('133') + 6 * J('134') + 7.2 * J('135') \\ + J('145') - 2 * J('155') - J('156') + J('167') - J('168') + J('165') + 2 * J('166') + J('137') + 2 * J('172') \\ + 41.139 * J('179') + 5.5 * J('180') + 5.5 * J('190') + 5.5 * J('191') + J('12') + J('607') + 5.5 * J('700') = E = 0;$$

$$\text{Chor} \dots J('91') - J('93') - J('94') - J('95') = E = 0;$$

$$\text{Phe} \dots J('93') - 0.17 * J('179') - 4 * J('180') - J('303') - 20 * J('190') - 8 * J('191') - 20 * J('192') - 7 * J('700') - \\ \text{DD} = E = 0.655;$$

$$\text{Tyr} \dots J('94') - 0.13 * J('179') - 13 * J('180') + J('303') - 28 * J('190') - 4 * J('191') - 32 * J('192') - J('611') - \\ 6 * J('700') = E = 0;$$

$$\text{PRPP} \dots J('73') - J('74') - J('104') - J('95') - J('116') = E = 0;$$

$$\text{IGP} \dots J('95') - J('96') = E = 0;$$

$$\text{PPi} \dots 2 * J('74') + J('76') + J('95') + J('103') + J('104') + J('106')$$

$$+ J('116') + J('128') + J('136') + \\ J('165') - J('166') + J('169') + J('172') + J('173') + J('176') =E= 0;$$

EK 10 Gams paket programı ile metabolik akı analizi için matematik modelin çözümünde kullanılan program (devam)

$$\text{Ser} \dots J('64') - J('66') + J('67') - J('68') - J('96') \\ - J('173') - 0.377 * J('179') - 32 * J('180') - 55 * J('190') - 13 * J('191') - 43 * J('192') - J('608') - 11 * J('700') \\ =E= 0;$$

$$\text{Trp} \dots J('96') - 0.05 * J('179') - 1 * J('180') - 14 * J('190') - 2 * J('191') - 4 * J('192') - J('610') - 3 * J('700') =E= 0;$$

$$\text{Asp} \dots J('75') - J('76') - J('77') - J('103') - J('104') \\ - J('114') - J('116') - 0.22 * J('179') - 9 * J('180') - 44 * J('190') - 11 * J('191') - 30 * J('192') - J('600') + \\ J('601') - 23 * J('700') =E= 0;$$

$$\text{Asn} \dots J('76') - 0.22 * J('179') - 18 * J('180') - 54 * J('190') - 16 * J('191') - 23 * J('192') - J('601') - \\ 13 * J('700') =E= 0;$$

$$\text{ASPSA} \dots J('77') - J('78') - J('84') =E= 0;$$

$$\text{mDAP} \dots J('81') - J('83') =E= 0;$$

$$\text{HSer} \dots J('84') - J('85') - J('90') =E= 0;$$

$$\text{Cys} \dots J('68') - J('90') - 0.09 * J('179') - 1 * J('190') - 5 * J('191') - 1 * J('192') - J('604') =E= 0;$$

$$\text{Met} \dots J('90') - 0.14 * J('179') - 5 * J('180') - 10 * J('190') - 7 * J('191') - 8 * J('192') - 4 * J('700') =E= 0;$$

$$\text{Thr} \dots J('85') - J('86') - 0.24 * J('179') - 20 * J('180') - 45 * J('190') - 9 * J('191') - 35 * J('192') - J('609') - \\ 23 * J('700') =E= 0;$$

$$\text{Ile} \dots J('86') - 0.27 * J('179') - 10 * J('180') - 35 * J('190') - 7 * J('191') - 32 * J('192') - J('603') - \\ 14 * J('700') =E= 0;$$

$$\text{Pro} \dots J('100') - 0.2 * J('179') - 10 * J('180') - J('306') - 23 * J('190') - 6 * J('191') - 17 * J('192') - 11 * J('700') \\ =E= 0;$$

$$\text{Orn} \dots J('101') - J('102') - 0.0593 * J('179') =E= 0;$$

$$\text{Citr} \dots J('102') - J('103') =E= 0;$$

$$\text{Arg} \dots J('103') - 0.28 * J('179') - 4 * J('180') - 24 * J('190') - 12 * J('191') - 14 * J('192') - J('602') - 14 * J('700') \\ =E= 0;$$

$$\text{AMP} \dots J('73') + J('76') + J('103') + J('106') + J('114') - \\ J('115') + J('165') =E= 0;$$

$$\text{H2S} \dots - J('68') - J('90') + J('165') + J('604') =E= 0;$$

$$\text{Ala} \dots - J('65') + J('69') - 0.5352 * J('179') - 40 * J('180') - 49 * J('190') - 10 * J('191') - 47 * J('192') + J('610') \\ - 24 * J('700') =E= 0;$$

$$\text{Kval} \dots J('70') - J('71') - J('72') =E= 0;$$

Val .. $J('71') - 0.4 \cdot J('179') - 31 \cdot J('180') - 32 \cdot J('190') - 6 \cdot J('191') - 32 \cdot J('192') - J('612') - 15 \cdot J('700')$ =E= 0;

**EK 10 Gams paket programı ile metabolik akı analizi için matematik modelin
çözümünde kullanılan program (devam)**

Leu .. $J('72') - 0.42 \cdot J('179') - 16 \cdot J('180') - 36 \cdot J('190') - 22 \cdot J('191') - 33 \cdot J('192') - J('607') - 27 \cdot J('700')$ =E= 0;

His .. $J('74') - 0.09 \cdot J('179') - 5 \cdot J('180') - 16 \cdot J('190') - 3 \cdot J('191') - 18 \cdot J('192') - J('606') - 1 \cdot J('700')$ =E= 0;

PRAIC .. $J('74') + J('104') - J('105')$ =E= 0;

IMP .. $J('105') - J('106') - J('114')$ =E= 0;

GTP .. $- J('114') + J('108') - J('109') - 0.2 \cdot J('179')$ =E= 0;

GDP .. $J('107') - J('108') + J('109') + J('114') - J('113')$ =E= 0;

GMP .. $J('106') - J('107')$ =E= 0;

UMP .. $J('116') - J('117')$ =E= 0;

UTP .. $J('118') - J('136') - J('121') - J('169') - 0.13 \cdot J('179')$ =E= 0;

CTP .. $J('121') - J('127') + J('126') - J('172') - J('173') - 0.12 \cdot J('179')$ =E= 0;

UDP .. $J('117') - J('118') - J('128')$ =E= 0;

CDP .. $J('127') - J('126') - J('124')$ =E= 0;

dATP .. $J('112') - 0.02 \cdot J('179')$ =E= 0;

dGTP .. $J('113') - 0.02 \cdot J('179')$ =E= 0;

dCTP .. $J('124') - 0.02 \cdot J('179')$ =E= 0;

dTTP .. $J('128') - 0.02 \cdot J('179')$ =E= 0;

Lys .. $J('83') - 0.32 \cdot J('179') - 9 \cdot J('180') - 30 \cdot J('190') - 8 \cdot J('191') - 37 \cdot J('192') - J('613') - 24 \cdot J('700')$ =E= 0;

GL3P .. $J('132') - 0.129 \cdot J('179')$ =E= 0;

C140 .. $J('133') - 0.0235 \cdot J('179')$ =E= 0;

C141 .. $J('134') - 0.0235 \cdot J('179')$ =E= 0;

PA .. $J('135') - 0.259 \cdot J('179')$ =E= 0;

UDPNAG .. $J('169') - J('137') - 0.0433 \cdot J('179')$ =E= 0;

UDPNAM .. $J('137') - 0.0276 \cdot J('179')$ =E= 0;

$$\text{CMPKDO} \dots J('172') - 0.0235 * J('179') = E = 0;$$

**EK 10 Gams paket programı ile metabolik akı analizi için matematik modelin
çözümünde kullanılan program (devam)**

$$\text{CDPEtN} \dots J('173') - 0.0235 * J('179') = E = 0;$$

$$\text{UDPGLC} \dots J('136') - 0.0157 * J('179') = E = 0;$$

$$\text{ADPHep} \dots J('176') - 0.0235 * J('179') = E = 0;$$

$$\text{G1P} \dots J('2') - J('3') - J('136') - 0.154 * J('179') = E = 0;$$

$$\text{S7P} \dots - J('34') + J('35') + J('38') - J('39') - J('176') = E = 0;$$

$$\text{XYL5P} \dots - J('30') + J('31') + J('34') - J('35') + J('36') - J('37') = E = 0;$$

$$\begin{aligned} \text{F6P} \dots & J('9') - J('10') - J('11') + J('12') \\ & - J('36') + J('37') - J('38') + J('39') - J('169') = E = 0; \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{T3P} \dots & + 2 * J('11') - 2 * J('12') - J('22') + J('23') - J('34') + J('35') - J('36') + J('37') \\ & + J('38') - J('39') + J('96') - J('132') = E = 0; \end{aligned}$$

$$\text{RIB5P} \dots - J('32') + J('33') + J('34') - J('35') = E = 0;$$

$$\begin{aligned} \text{R5P} \dots & + J('8') + J('30') - J('31') + J('32') - J('33') - J('73') \\ & - J('172') = E = 0; \end{aligned}$$

$$\text{E4P} \dots + J('36') - J('37') - J('38') + J('39') - J('91') = E = 0;$$

$$\text{Gluc6P} \dots J('4') - J('8') = E = 0;$$

$$\text{Ldihy} \dots J('78') - J('80') = E = 0;$$

$$\text{Ltet} \dots J('80') - J('81') = E = 0;$$

$$\text{Proteaz} \dots J('180') = E = 0;$$

$$\text{Amy} \dots J('190') = E = 0;$$

$$\text{IFN} \dots J('191') = E = 0;$$

$$\text{NP} \dots J('192') = E = 0;$$

$$\text{Bla} \dots J('700') = E = 0;$$

$$\text{DGloc} \dots J('804') - J('805') = E = 0;$$

$$\text{Gloc} \dots J('805') = E = 0;$$

EK 11 Deney Verileri

1. “Rekombinant Hücrelerin L-Fenilalanin Üretim Performanslarının Kıyaslanması” deney verileri (T=37 °C, N=200 dk⁻¹, pH₀=7.0, SO=1/6)

t. st	C _x , kg m ⁻³			
	Doğal <i>B.subtilis</i> A263	pMK4:: <i>aroH</i> taşıyan r- <i>B.subtilis</i> A263	pMK4:: <i>aroA</i> taşıyan r- <i>B.subtilis</i> A263	pMK4:: <i>aroA::aroH</i> taşıyan r- <i>B.subtilis</i> A263

	A(600nm)	Cx	A(600nm)	Cx	A(600nm)	Cx	A(600nm)	Cx
0	0.32	0.16	0.32	0.16	0.32	0.16	0.32	0.16
3	0.468	0.24	0.54	0.28	0.43	0.22	0.58	0.30
6	0.969	0.51	0.80	0.42	1.025	0.54	0.73	0.38
9	1.099	0.58	1.61	0.86	1.43	0.76	1.16	0.61
12	1.66	0.88	2.25	1.20	1.88	1.00	1.41	0.75
15	2.75	1.47	2.36	1.26	2.12	1.13	2.07	1.10
18	3.25	1.74	3.07	1.64	2.7	1.37	2.36	1.26
21	3.68	1.97	2.96	1.58	2.64	1.41	2.75	1.47
24	3.92	2.1	2.94	1.57	2.75	1.47	3.05	1.63
27	3.73	2.0	2.92	1.56	2.77	1.48	3.03	1.62

t. st	C _G . kg m ⁻³							
	Doğal <i>B.subtilis</i> A263		pMK4:: <i>aroH</i> taşıyan r- <i>B.subtilis</i> A263		pMK4:: <i>aroA</i> taşıyan r- <i>B.subtilis</i> A263		pMK4:: <i>aroA</i> :: <i>aroH</i> taşıyan r- <i>B.subtilis</i> A263	
	A(550nm)	C _G	A(550nm)	C _G	A(550nm)	C _G	A(550nm)	C _G
0	2.61	10	2.61	10	2.61	10	2.61	10
3	2.047	7.8	2.02	7.9	2.33	8.9	2.05	7.8
6	1.97	7.5	1.99	7.8	2.28	8.7	1.995	7.6
9	1.66	6.3	1.66	6.3	1.99	7.6	1.788	6.8
12	1.35	5.1	1.61	6.1	1.97	7.5	1.43	5.4
15	1.24	4.7	1.50	5.7	1.79	6.8	1.30	4.9
18	1.04	3.9	1.45	5.5	1.63	6.2	1.24	4.7
21	0.98	3.7	1.30	4.9	1.50	5.7	1.22	4.6
24	0.85	3.2	1.24	4.7	1.45	5.5	1.09	4.1
27	0.57	2.1	1.04	3.9	1.24	4.7	0.75	2.8

EK 11 Deney Verileri (devam)**Standart Alan= 57145**

t. st	Doğal <i>B.subtilis</i> A263		pMK4:: <i>aroH</i> taşıyan r- <i>B.subtilis</i> A263		pMK4:: <i>aroA</i> taşıyan r- <i>B.subtilis</i> A263		pMK4:: <i>aroA</i> :: <i>aroH</i> taşıyan r- <i>B.subtilis</i> A263	
	Alan	C _{Phe}	Alan	C _{Phe}	Alan	C _{Phe}	Alan	C _{Phe}
0	83	0.0003	139	0.0005	194	0.0007	277	0.001
3	277	0.001	277	0.001	831	0.003	55413	0.2
6	1108	0.004	1385	0.005	33248	0.12	83120	0.3
9	16624	0.06	24936	0.09	80349	0.29	130221	0.47
12	19395	0.07	27707	0.1	99744	0.36	182864	0.66
15	22165	0.08	47101	0.17	108056	0.39	180093	0.65
18	52643	0.19	102515	0.37	116368	0.42	188405	0.68
21	55413	0.2	105285	0.38	119139	0.43	221653	0.8
24	58184	0.21	113597	0.41	157928	0.57	335251	1.21
27	58184	0.21	116368	0.42	174552	0.63	382352	1.38

EK 11 Deney Verileri (*devam*)

2. “Oksijen Aktarımı Etkileri ” deney verileri (T=37 °C, pH₀=6.8)

t. st	C ₀ ; mmol dm ⁻³					pH				
	MOT2	MOT1	LOT2	LOT1	LimOT	MOT2	MOT1	LOT2	LOT1	LimOT
0	0.24	0.19	0.22	0.22	0.22	6.88	6.89	6.92	6.86	6.89
0.5	0.14	0.08	0.07	0.17	0.18	6.89	6.92	6.90	6.86	6.96
1.0	0.09	0.03	0.03	0.12	0.16	6.89	6.91	6.93	6.87	6.93
1.5	0.09	0.00	0.00	0.07	0.13	6.88	6.90	6.92	6.85	6.91
2.0	0.14	0.00	0.00	0.09	0.13	6.87	6.87	6.89	6.84	6.89
2.5	0.13	0.00	0.00	0.10	0.19	6.86	6.85	6.87	6.83	6.87
3.0	0.16	0.00	0.00	0.12	0.17	6.86	6.81	6.85	6.83	6.85
3.5	0.20	0.00	0.00	0.13	0.16	6.86	6.79	6.83	6.83	6.83
4.0	0.19	0.00	0.00	0.14	0.17	6.84	6.77	6.81	6.82	6.81
4.5	0.18	0.00	0.00	0.14	0.16	6.82	6.75	6.78	6.80	6.80
5.0	0.12	0.01	0.00	0.13	0.16	6.81	6.73	6.76	6.65	6.79
5.5	0.09	0.00	0.00	0.08	0.14	6.80	6.70	6.72	6.65	6.76
6.0	0.10	0.00	0.00	0.07	0.13	6.79	6.69	6.71	6.64	6.75
6.5	0.12	0.00	0.00	0.07	0.15	6.78	6.68	6.70	6.64	6.74
7.0	0.14	0.00	0.00	0.06	0.19	6.76	6.68	6.70	6.61	6.73
7.5	0.14	0.00	0.00	0.06	0.19	6.76	6.68	6.66	6.61	6.73

EK 11 Deney Verileri (devam)**2. “Oksijen Aktarımı Etkileri ” deney verileri (devam)**

8.0	0.09	0.00	0.00	0.06	0.21	6.75	6.67	6.64	6.59	6.73
8.5	0.15	0.01	0.00	0.06	0.22	6.74	6.66	6.62	6.58	6.73
9.0	0.22	0.04	0.00	0.06	0.22	6.71	6.64	6.56	6.57	6.73
9.5	0.23	0.04	0.00	0.06	0.22	6.69	6.64	6.54	6.56	6.72
10.0	0.24	0.03	0.00	0.07	0.22	6.66	6.63	6.49	6.55	6.71
10.5	0.24	0.04	0.00	0.09	0.22	6.63	6.61	6.45	6.54	6.70
11.0	0.23	0.05	0.01	0.09	0.22	6.59	6.59	6.40	6.53	6.70
11.5	0.24	0.08	0.01	0.10	0.22	6.55	6.54	6.33	6.53	6.68
12.0	0.24	0.12	0.02	0.11	0.22	6.49	6.49	6.27	6.51	6.66
12.5	0.24	0.12	0.02	0.10	0.22	6.47	6.46	6.23	6.51	6.64
13.0	0.24	0.13	0.02	0.10	0.23	6.42	6.38	6.16	6.50	6.62
13.5	0.24	0.13	0.02	0.10	0.23	6.37	6.31	6.16	6.49	6.59
14.0	0.24	0.13	0.02	0.10	0.22	6.31	6.24	6.04	6.46	6.56
14.5	0.24	0.14	0.03	0.10	0.21	6.27	6.00	5.99	6.40	6.53
15.0	0.24	0.16	0.03	0.10	0.21	6.21	6.09	5.92	6.34	6.49
15.5	0.24	0.18	0.03	0.09	0.21	6.13	5.96	5.83	6.28	6.42
16.0	0.24	0.18	0.04	0.09	0.21	6.09	5.91	5.79	6.19	6.39
16.5	0.24	0.19	0.04	0.09	0.21	6.04	5.82	5.72	6.13	6.35
17.0	0.24	0.19	0.06	0.09	0.21	5.97	5.71	5.63	6.16	6.29

EK 11 Deney Verileri (devam)**2. “Oksijen Aktarımı Etkileri ” deney verileri (devam)**

17.5	0.24	0.19	0.07	0.09	0.22	5.89	5.58	5.55	6.09	6.22
18.0	0.24	0.19	0.07	0.09	0.22	5.81	5.46	5.48	6.06	6.16
18.5	0.24	0.19	0.08	0.09	0.22	5.71	5.33	5.39	5.84	6.07
19.0	0.24	0.19	0.09	0.09	0.22	5.61	5.21	5.31	5.78	5.97
19.5	0.24	0.19	0.10	0.09	0.22	5.52	5.15	5.26	5.71	5.89
20.0	0.24	0.19	0.10	0.10	0.22	5.45	5.10	5.21	5.67	5.81
20.5	0.24	0.19	0.11	0.10	0.22	5.38	5.07	5.18	5.63	5.74
21.0	0.24	0.19	0.11	0.10	0.22	5.36	5.06	5.17	5.53	5.72
21.5	0.24	0.19	0.11	0.10	0.22	5.34	5.05	5.15	5.47	5.68
22.0	0.24	0.19	0.11	0.10	0.23	5.27	5.04	5.14	5.44	5.61
22.5	0.24	0.19	0.12	0.10	0.23	5.15	5.01	5.11	5.37	5.49
23.0	0.24	0.19	0.12	0.10	0.23	5.15	5.01	5.09	5.29	5.42
23.5	0.24	0.19	0.13	0.10	0.23	5.09	5.00	5.08	5.26	5.34
24.0	0.24	0.19	0.12	0.09	0.23	5.03	5.00	5.08	5.17	5.28
24.5	0.24	0.19	0.13	0.09	0.23	4.99	5.00	5.07	5.13	5.21
25.0	0.24	0.19	0.13	0.09	0.23	4.97	5.01	5.07	5.17	5.19
25.5	0.25	0.19	0.13	0.09	0.23	4.96	5.01	5.08	5.15	5.14
26.0	0.25	0.19	0.13	0.09	0.23	4.95	5.01	5.08	5.10	5.11
26.5	0.25	0.19	0.12	0.09	0.22	4.95	5.01	5.08	5.10	5.09

EK 11 Deney Verileri (*devam*)

2. “Oksijen Aktarımı Etkileri ” deney verileri (*devam*)

27.0	0.25	0.18	0.13	0.09	0.22	4.95	5.01	5.06	5.09	5.10
27.5	0.25	0.19	0.13	0.09	0.22	4.94	5.02	5.06	5.12	5.12
28.0	0.25	0.19	0.13	0.09	0.22	4.94	5.01	5.06	5.14	5.14
28.5	0.25	0.18	0.13	0.09	0.22	4.94	5.03	5.07	5.11	5.14
29.0	0.25	0.18	0.13	0.09	0.22	4.93	5.01	5.06	5.16	5.14
29.5	0.25	0.18	0.13	0.09	0.22	4.93	5.01	5.07	5.13	5.15
30.0	0.25	0.19	0.12	0.09	0.22	4.93	5.01	5.07	5.13	5.15

EK 11 Deney Verileri (devam)

2. “Oksijen Aktarımı Etkileri ” deney verileri (devam)

t. st	$C_X; \text{kg dm}^{-3}$					$C_G; \text{kg dm}^{-3}$					$C_{pHe}; \text{kg dm}^{-3}$				
	MOT2	MOT1	LOT2	LOT1	LimOT	MOT2	MOT1	LOT2	LOT1	LimOT	MOT2	MOT1	LOT2	LOT1	LimOT
0	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	10	10	10.0	10	10	0	0.05	0.01	0.035	0
3.0	0.29	0.33	0.33	0.430	0.4	8.18	7.45	9.3	9.14	8	0.153	0.26	0.18	0.2	0.01
6.0	0.47	0.47	0.42	0.528	0.44	7.8	7.18	7.6	7.5	7.2	0.28	0.42	0.24	0.3	0.14
9.0	0.63	0.68	0.65	0.576	0.49	6	6.26	6.8	6.9	7	0.32	0.5	0.28	0.32	0.17
12.0	0.89	0.89	0.87	0.750	0.68	5.1	5.54	5.8	6.2	6.5	0.43	0.84	0.32	0.44	0.25
15.0	0.93	1.2	0.91	0.940	0.702	4	4.7	4.9	5.95	6.2	0.51	0.86	0.43	0.46	0.34
18.0	1	1.33	0.95	1.210	0.81	3.1	3.8	4.2	4.7	6	0.54	0.97	0.48	0.47	0.47
21.0	1.1	1.48	1.12	1.310	0.89	2	3.6	3.6	3.9	5.1	0.6	1.04	0.56	0.67	0.49
24.0	1.12	1.49	1.24	1.320	1.01	1.8	3.2	3.2	2.8	4.3	0.71	1.35	0.64	0.86	0.53
27.0	1.13	1.49	1.25	1.320	1.05	1.7	2.6	3.0	2.1	3.7	0.79	1.56	0.68	0.9	0.69
30.0	1.13	1.49	1.26	1.330	1.06	1.6	2.2	2.9	1.8	2.5	0.82	1.5	0.75	0.9	0.67

EK 11 Deney Verileri (devam)

3. “Metabolik Tasarımların L-Fenilalanin Üretimine Etkisi” deney verileri (T=37 °C, Q₀/V_R=0.5 vvm, N=500 dk⁻¹, pH₀=6.8)

t. st	C ₀ ; mmol dm ⁻³				pH			
	Doğal <i>B.subtilis</i> A263	pMK4:: <i>aroH</i> taşıyan <i>r-B.subtilis</i> A263	pMK4:: <i>aroA</i> taşıyan <i>r-B.subtilis</i> A263	pMK4:: <i>aroA::aroH</i> taşıyan <i>r-B.subtilis</i> A263	Doğal <i>B.subtilis</i> A263	pMK4:: <i>aroH</i> taşıyan <i>r-B.subtilis</i> A263	pMK4:: <i>aroA</i> taşıyan <i>r-B.subtilis</i> A263	pMK4:: <i>aroA::aroH</i> taşıyan <i>r-B.subtilis</i> A263
0	0.16	0.15	0.14	0.16	6.81	6.86	6.84	6.89
0.5	0.09	0.14	0.11	0.05	6.90	6.86	6.84	6.92
1.0	0.07	0.14	0.08	0.02	6.90	6.87	6.84	6.91
1.5	0.08	0.14	0.05	0.00	6.89	6.85	6.82	6.90
2.0	0.08	0.05	0.06	0.00	6.90	6.84	6.81	6.87
2.5	0.08	0.06	0.06	0.00	6.87	6.83	6.79	6.85
3.0	0.05	0.07	0.08	0.00	6.86	6.83	6.81	6.81
3.5	0.00	0.07	0.08	0.00	6.87	6.83	6.78	6.79
4.0	0.00	0.08	0.09	0.00	6.85	6.82	6.78	6.77
4.5	0.00	0.08	0.09	0.00	6.84	6.80	6.75	6.75
5.0	0.00	0.07	0.08	0.00	6.84	6.65	6.62	6.73
5.5	0.00	0.09	0.05	0.00	6.80	6.65	6.61	6.70
6.0	0.00	0.10	0.05	0.00	6.78	6.64	6.59	6.69
6.5	0.00	0.09	0.04	0.00	6.76	6.64	6.57	6.68
7.0	0.00	0.07	0.04	0.00	6.77	6.61	6.57	6.68
7.5	0.00	0.06	0.04	0.00	6.75	6.61	6.53	6.68
8.0	0.00	0.05	0.04	0.00	6.74	6.59	6.52	6.67
8.5	0.00	0.05	0.04	0.00	6.74	6.58	6.49	6.66
9.0	0.00	0.03	0.04	0.00	6.73	6.57	6.47	6.64
9.5	0.00	0.03	0.04	0.00	6.73	6.56	6.48	6.64

EK 11 Deney Verileri (devam)**3.“Metabolik Tasarımların L-Fenilalanin Üretimine Etkisi ” deney verileri (devam)**

10.0	0.00	0.03	0.05	0.00	6.72	6.55	6.48	6.63
10.5	0.00	0.02	0.06	0.00	6.71	6.54	6.45	6.61
11.0	0.00	0.02	0.06	0.01	6.70	6.53	6.43	6.59
11.5	0.00	0.03	0.06	0.00	6.69	6.53	6.43	6.54
12.0	0.00	0.03	0.07	0.02	6.69	6.51	6.40	6.49
12.5	0.00	0.03	0.06	0.02	6.66	6.51	6.40	6.46
13.0	0.00	0.02	0.06	0.01	6.63	6.50	6.38	6.38
13.5	0.00	0.02	0.06	0.01	6.61	6.45	6.39	6.31
14.0	0.00	0.02	0.06	0.01	6.59	6.43	6.36	6.24
14.5	0.01	0.02	0.06	0.02	6.59	6.43	6.30	6.00
15.0	0.01	0.03	0.06	0.02	6.57	6.36	6.23	6.09
15.5	0.00	0.02	0.06	0.03	6.55	6.32	6.20	5.96
16.0	0.01	0.02	0.06	0.03	6.51	6.34	6.18	5.91
16.5	0.02	0.02	0.06	0.03	6.49	6.28	6.18	5.82
17.0	0.02	0.02	0.06	0.04	6.47	6.26	6.13	5.71
17.5	0.02	0.02	0.06	0.05	6.44	6.28	6.10	5.58
18.0	0.02	0.03	0.06	0.05	6.43	6.26	6.07	5.46
18.5	0.02	0.02	0.06	0.06	6.41	6.24	6.01	5.33
19.0	0.02	0.03	0.06	0.07	6.42	6.22	5.88	5.21
19.5	0.01	0.03	0.06	0.07	6.39	6.15	5.77	5.15
20.0	0.01	0.03	0.06	0.08	6.41	6.12	5.68	5.10
20.5	0.01	0.03	0.06	0.08	6.42	6.07	5.63	5.07
21.0	0.01	0.04	0.06	0.08	6.42	5.95	5.59	5.06
21.5	0.01	0.04	0.06	0.08	6.42	5.84	5.50	5.05

EK 11 Deney Verileri (*devam*)

3. “Metabolik Tasarımların L-Fenilalanin Üretimine Etkisi ” deney verileri (*devam*)

22.0	0.01	0.03	0.06	0.08	6.43	5.74	5.44	5.04
22.5	0.01	0.04	0.06	0.09	6.42	5.74	5.43	5.01
23.0	0.01	0.04	0.06	0.09	6.43	5.72	5.39	5.01
23.5	0.01	0.04	0.06	0.09	6.41	5.67	5.35	5.00
24.0	0.01	0.05	0.06	0.09	6.41	5.63	5.33	5.00
24.5	0.01	0.04	0.06	0.09	6.39	5.61	5.29	5.00
25.0	0.01	0.04	0.06	0.09	6.41	5.59	5.27	5.01
25.5	0.01	0.04	0.06	0.09	6.39	5.60	5.23	5.01
26.0	0.01	0.04	0.06	0.09	6.41	5.57	5.26	5.01
26.5	0.01	0.04	0.06	0.09	6.40	5.57	5.22	5.01
27.0	0.01	0.04	0.06	0.09	6.39	5.59	5.21	5.01
27.5	0.01	0.04	0.06	0.09	6.38	5.57	5.21	5.02
28.0	0.01	0.04	0.06	0.09	6.38	5.55	5.19	5.01
28.5	0.01	0.04	0.06	0.09	6.39	5.56	5.19	5.03
29.0	0.01	0.04	0.06	0.09	6.38	5.57	5.19	5.01
29.5	0.01	0.04	0.06	0.09	6.39	5.55	5.19	5.01
30.0	0.01	0.04	0.06	0.09	6.36	5.54	5.17	5.01

3. “Metabolik Tasarımların L-Fenilalanin Üretimine Etkisi ” deney verileri (devam)

t. st	C _X ; kg dm ⁻³								C _G ; kg dm ⁻³							
	Doğal <i>B.subtilis</i> A263		pMK4:: <i>aroH</i> taşıyan <i>r-B.subtilis</i> A263		pMK4:: <i>aroA</i> taşıyan <i>r-B.subtilis</i> A263		pMK4:: <i>aroA::aroH</i> taşıyan <i>r-B.subtilis</i> A263		Doğal <i>B.subtilis</i> A263		pMK4:: <i>aroH</i> taşıyan <i>r-B.subtilis</i> A263		pMK4:: <i>aroA</i> taşıyan <i>r-B.subtilis</i> A263		pMK4:: <i>aroA::aroH</i> taşıyan <i>r-B.subtilis</i> A263	
	A(600nm)	C _X	A(600nm)	C _X	A(600nm)	C _X	A(600nm)	C _X	A(550nm)	C _G	A(550nm)	C _G	A(550nm)	C _G	A(550nm)	C _G
0	0.32	0.16	0.32	0.16	0.32	0.16	0.25	0.16	2.61	10.00	2.61	10.00	2.61	10.00	2.61	10.00
3.0	1.60	0.848	1.40	0.744	0.94	0.496	0.64	0.430	2.10	8.00	2.30	8.76	2.44	9.32	1.96	7.45
6.0	2.08	1.110	1.71	0.910	1.34	0.712	0.90	0.528	1.84	7.00	2.00	7.60	2.17	8.29	1.89	7.18
9.0	2.40	1.280	1.99	1.064	1.53	0.810	1.29	0.576	1.60	6.07	1.79	6.80	1.94	7.37	1.65	6.26
12.0	2.79	1.488	2.30	1.224	1.76	0.936	1.68	0.750	1.32	5.00	1.53	5.80	1.63	6.20	1.46	5.54
15.0	3.14	1.680	2.82	1.504	2.132	1.136	2.25	0.940	1.11	4.20	1.30	4.93	1.45	5.51	1.24	4.7
18.0	3.28	1.756	2.94	1.570	2.53	1.350	2.49	1.210	0.99	3.71	1.12	4.23	1.24	4.69	1.01	3.8
21.0	3.31	1.770	3.07	1.640	2.72	1.450	2.77	1.310	0.90	3.38	0.96	3.60	1.11	4.20	0.96	3.6
24.0	3.37	1.800	3.05	1.640	2.73	1.460	2.79	1.320	0.81	3.03	0.86	3.20	1.0	3.76	0.85	3.2
27.0	3.40	1.816	3.05	1.630	2.77	1.480	2.79	1.320	0.72	2.69	0.79	2.95	0.93	3.50	0.70	2.6
30.0	3.40	1.817	3.05	1.630	2.78	1.484	2.79	1.330	0.69	2.56	0.77	2.86	0.83	3.12	0.59	2.2

3. “Metabolik Tasarımların L-Fenilalanin Üretimine Etkisi ” deney verileri (*devam*)
(Standart Alan=68.170)

t. st	C _{phe} ; kg dm ⁻³							
	Doğal <i>B.subtilis</i> A263		pMK4:: <i>aroH</i> taşıyan <i>r-B.subtilis</i> A263		pMK4:: <i>aroA</i> taşıyan <i>r-B.subtilis</i> A263		pMK4:: <i>aroA</i> :: <i>aroH</i> taşıyan <i>r-B.subtilis</i> A263	
0	3.246	0.01	9916	0.03	12560	0.04	16526	0.05
3.0	5.194	0.02	11568	0.04	59494	0.18	85936	0.26
6.0	5.843	0.02	13221	0.04	112377	0.34	138819	0.42
9.0	10.063	0.03	33052	0.10	125598	0.38	165261	0.5
12.0	22.074	0.07	52883	0.16	138819	0.42	277638	0.84
15.0	23.048	0.07	57180	0.17	175176	0.53	284248	0.86
18.0	26.943	0.08	72715	0.22	184100	0.56	320606	0.97
21.0	39.604	0.12	89241	0.27	218144	0.66	343742	1.04
24.0	42.525	0.13	105767	0.32	244586	0.74	446204	1.35
27.0	46.421	0.14	108741	0.33	257807	0.78	515613	1.58
30.0	45.447	0.14	103123	0.31	280943	0.85	495782	1.5

ÖZGEÇMİŞ

Adı&Soyadı : Yasemin Demirci

Doğum Yeri : Rize

Doğum Tarihi : 21.04.1981

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce, Almanca

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise: Gebze Anadolu Lisesi

Lisans: Ankara Üniversitesi

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi

Yayınları (SCI ve diğerleri)

a) Yurt-dışı Yayın

1. Demirci, Y., Çalık, P., Çalık, G., Özdamar, T.H. 2005. Metabolic engineering of L-phenylalanine pathway in *Bacillus subtilis*. Journal of Biotechnology 118S1, 12. European Congress on Biotechnology Abstracts, P124, Kopenhag.

b) Kongre ve Sunuşlar

1. Demirci, Y., Çalık, P., Çalık, G., Özdamar, T.H. 2005. L-fenilalanin üretimi için iki-gen klonlama stratejisiyle rekombinant *Bacillus subtilis* geliştirilmesi. 14. Biyoteknoloji Kongresi, Sözlü sunuş, Eskişehir.

2. Demirci, Y., Çalık, P., Çalık, G., Özdamar, T.H. 2005. Metabolic engineering of L-phenylalanine pathway in *Bacillus subtilis*. 12. European Congress on Biotechnology Abstracts, Kopenhag.

KAYNAKLAR

- Aiba, S., Humphery, A.E., and Milles, N.F. 1973. Biochemical Engineering, Academic Press Inc. New York.
- Arbige, M. V., Bulthuis, B.A., Schultz, J., and Crabb, D. 1993. Fermentation of *Bacillus* In: *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria: biochemistry, physiology, and molecular genetics. Sonenshein, A.L., Hoch, J.A. and Lorch, R. (Editors). American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Atkinson, B., and Mavituna, F. 1991. Biochemical Engineering and Biotechnology. 2nd Edition, Handbook, Macmillan Publishers Ltd.,
- Bailey, J.E. and Ollis, D.F. 1986., Biochemical Engineering Fundamentals, 2nd ed. McGraw Hill. New York.
- Blanch, W.H. and Clark, S.D. 1997. Biochemical Engineering, Marcel Dekker, Inc. New York.
- Bloom, V.M., Freyer, G.A. and Micklos, D.A. 1996. Laboratory DNA Science, The Benjamin/Cummings Publishing Company, INC.
- Bandyopadhyay, B. and Humprey, A.E. 1967. Dynamic measurement of the volumetric oxygen transfer coefficient in fermentation systems, Biotechnology and Bioengineering, vol 9, p:533-544
- Bron, S. 1990. Plasmids. In: Molecular Biology Methods for *Bacillus*. Harwood, C.R. and Cutting, S.M.(Editors). John Wiley and Sons Ltd, New York.
- Brücknet, R. 1992. A series of shuttle vectors for *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*, Gene, 122, 187-192.
- Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E. 1974. Bergey's manual of determinative Bacteriology, 8th Edition, The Williams Wilkins Company, Baltimore.
- Bullock, W. O., Frenandez, J. M. and Short, J. M. 1987. XL1-Blue- A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with β -Galactosidase Selection. Biotechniques, vol 5,p:376.
- Çalık, P. 1998. Serin Alkali Proteaz Enzimi Üretimi için Biyoproses Geliştirilmesi. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara.
- Çalık, P. and Özdamar, T.H. 2002. Bioreaction network flux analysis for industrial microorganisms: A review. Reviews in Chemical Engineering 18(6):553-596.

- Çalık, P., Çalık, G. and Özdamar, T.H. 1998. Oxygen transfer effects in serine alkaline protease fermentation by *Bacillus licheniformis*: Use of citric acid as the carbon source. *Enzyme and Microbial Technology*. 23:451-461.
- Çalık, P., Çalık, G., Takaç, S., Özdamar, T.H. 1999. Metabolic flux analysis for serine alkaline protease fermentation by *Bacillus licheniformis* in a defined medium: Effect of the oxygen transfer rate. *Biotechnology and Bioengineering* 64(2):151-167.
- Çalık, P., Takaç, S., Çalık, G., Özdamar, T.H. 2000a. Serine alkaline protease overproduction capacity of *Bacillus licheniformis*. *Enzyme and Microbiol. Technology*. 26(1):45-60.
- Çalık, P., Çalık, G., Özdamar, T.H. 2000b. Oxygen Transfer Strategy and its Regulation Effects in Serine Alkaline Protease Production by *Bacillus licheniformis*, *Biotechnology and Bioengineering* 69(3): 301-311.
- Çalık, P., Tomlin, G., Oliver, S.G. and Özdamar, T.H. 2003. Overexpression of a serine alkaline protease in *Bacillus licheniformis* and its impact on the metabolic reaction network. *Enzyme and Microbial Technology* 32(6):706-720.
- Çalık, P. 1998. Serin Alkali Proteaz Enzimi Üretimi için Biyoproses Geliştirilmesi, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara.
- Çalık, P., Bilir, E., Özçelik, İ.Ş., Çalık, G., and Özdamar, T.H. 2004. Inorganic compounds have dual effect on recombinant protein production: influence of anions and cations on serine alkaline protease production. 96:194-200.
- Förberg, C. and Haggström, L. 1987. Effects of cultural on the production of L-phenylalanine from a plasmid-harboring *E.coli* strain. *Applied Microbiology and Biotechnology* 26: 136-140
- Flores, N., Xiao, J., Berry, A., Bolivar, F. and Valle, F. 1996. Pathway engineering for the production of aromatic compounds in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology*. vol 14. p:620-623.
- Gerigk, E. M., Sprenger, G., Bongaerts, J., Nkwenkwa, G. E, Bujnicki, R. and Akors, R. 2002. Process control for enhanced L-phenylalanine production using different recombinant *E.coli* strains. *Biotechnology and Bioengineering* 80 (7) : 746-754

- Gil, G. H., Kim, S. R., Bae, J. C. and Lee, J. H. 1985. Pilot- scale production of L-phenylalanine from D-glucose. *Enzyme and Microbial Technology* 7: 370 - 372
- Glazer, A. N. And Nikaido, H. 1995. *Microbial biotechnology: Fundamentals Of Applied Biotechnology*, W.H. Freeman And Company, USA.
- Glick, B.R. and Pasternak, J.J. 1994. *Molecular Biotechnology: Principles And Applications Of Recombinant DNA*, ASM Press, Washington D.C.
- Harwood, C.R., Rosemary, D.C. and Ian, C.H. 1990. The *Bacillus* cell envelope and secretion. In: *Molecular Biology Methods for Bacillus*. Harwood, C.R. and Cutting, S.M.(Editors). John Wiley and Sons Ltd, New York.
- Horton, R.M., Hunt, H.D., Ho, S.N., Pullen, J.K. and Pease, L.R. 1989. Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension, *Gene*, 77:61-68.
- Hwang, S. O, Gil, G. H, Cho, Y. J, Kang, K. R, Lee, J. H. and Bae, J. C. 1985. The fermentation process for L-phenylalanine production using an auxotrophic regulatory mutant of *E.coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 22: 108-113
- Ikeda, M. and Katsumata, R. 1993. Phenylalanine production by metabolically engineered *C.glutamicum* with the pheA gene of *E.coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 39: 318-323.
- Ikeda, M. and Katsumata, R. 1992. Metabolic engineering to produce tyrosine or phenylalanine in a tyrtophan – producing *C. glutamicum* strain. *Applied and Enviromental Microbiology* 58 (3): 781-785.
- İleri, N., Çalık, P., 2006. Effects of pH strategy on endo- and exo- metabolome profiles and sodium potassium hydrogen ports of beta-lactamase-producing *Bacillus licheniformis*, *Biotechnology Progress*, 22(2):411-419.
- Ito, H., Sato, K., Matsui K., Sano K., Nakamori S. and Tanaka T. 1990a. Cloning and characterization of genes responsible for m-fluoro-D,L-phenylalanine resistance in *B.lactofermentum*. *Agricultural and Biological Chemistry*, vol 54, 707-713

- Ito, H., Sato, K., Matsui K., Sano K., Enel H. and Hirose Y. 1990b. Molecular breeding of a *B.lactofermentum* L-phenylalanine producer using a cloned prephenate dehydratase gene. *Applied Microbiology and Biotechnology*. vol 33, 190-195
- Kalender, N. 2000. Serin alkali proteaz geni *subC Bacillus* plasmidlerine klonlanarak rekombinant biyokatalizör ile alkali proteaz üretimi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara.
- Kırk, R.E. and Othmer, D.F. 1994. *Encyclopedia of Chemical Technology*, 4th Edition, The interscience Encyclopedia Inc., New York.
- Konstantinov, K.B, Nishio, N. and Yoshida, T. 1990. Glucose feeding strategy accounting for the decreasing oxidative capacity of recombinant *E.coli* in fed-batch cultivation for phenylalanine production. *Journal of Fermentation and Bioengineering*
- Lehninger, A.L.1979. *Biochemistry*, 2nd ed., Worth Publishers Inc., New York.
- Lewin, B. 1994. *Genes VII*, Oxford University Press, Oxford.
- Maiti, T.K. and Chatterjee, S. P. 1991a. Production of L-phenylalanine by double auxotrophic mutants of *Arthrobacter globiformis*: Optimization of C and N-source. *Folia Microbiologica* , 36(3): 234-239.
- Maiti, T.K. and Chatterjee, S.P. 1991b. L-phenylalanine production by double auxotrophic mutants of *Arthrobacter globiformis*. *Folia Microbiologica*, 36(3): 234-239.
- Maiti, T.K. Chatterjee, S. P. 1993. L-Phenylalanine Production by Double Analogue Resistant Mutants of *Arthrobacter globiformis*. *Acta Biotechnologica*. 13,87-95
- Miller, G.L. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31:p.426-428
- Nagarajan, V.1993. Protein secretion. In: *Bacillus subtilis* and Other-Gram positive Bacteria: biochemistry, physiology, and molecular genetics. Sonenshein, A.L., Hoch, J.A. and Lorch, R., (Editors). American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Nielsen, J. and Villadsen, J. 1994. *Bioreaction Engineering Principles*, New York.
- Ozaki, A., Katsumata, R., Oka T. and Furuya A. 1985. Cloning of the genes concerned in phenylalanine biosynthesis in *C.glutamicum* and its application to breeding

- of a phenylalanine producing strain. *Agricultural and Biological Chemistry*, 49(10), 2925-2930
- Özçelik , İ., Çalık, P., Çalık, G. and Özdamar, T. H. 2004 . Metabolic engineering of aromatic group amino acid pathway in *Bacillus subtilis* for L-phenylalanine production, *Chemical Engineering Science*. 59 (22-23): 5019-5026.
- Özçelik, İ. 2003. Genetik mühendisliği ve metabolik yolizi mühendisliği teknikleriyle L-Fenilalanin üretimi için biyoteknolojik proses geliştirilmesi, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara
- Pekin, B. 1980. Biyokimya mühendisliği, Ege Üniv. Kim. Fak. Yayınları, İzmir
- Polen, T., Kramer, M., Bongaerts, J., Wubbolts, M. and Wendisch, V.F. 2005. The global gene expression response of *Escherichia coli* to L-phenylalanine. *Journal of Biotechnology* 115, p:221-237.
- Sambrook, J. and Russell, D.W. 2001. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sambrook, Fritsch and Maniatis, 1995. *A laboratory manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sheety, K , Crawford, D. L. and Pometto, A. L. 1986 . Production of L-phenylalanine from starch by analog-resistant mutants of *Bacillus polymyxa*. *Applied and Environmental Microbiology* 52 (4): 637-643.
- Shu, C.H. and Liao, C.C. 2002. Optimization of L-phenylalanine production by *C.glutamicum* under product feedback inhibition by elevated oxygen transfer rate. *Biotechnology and Bioengineering* 77 (2): 131-141
- Smith, Wood. 1991. *Molecular Biology and Biotechnology*, Chapman and Hall Limited, Hong Kong.
- Stephanopoulos, G. 1998. *Metabolic Engineering, Biotechnology and Bioengineering*, Vol.58, 119-120.
- Stephanopoulos, G.N., Aristidou, A.A. and Nielsen, J. 1998. *Metabolic Engineering: Principals and Methodologies*, Academic Press, New York.
- Stryer, L. 1995. *Biochemistry*, 4th Edition, W.H. Freeman and Company, New York.
- Takagi, M., Nishio, Y., Oh, G. and Yoshida, T. 1996. Control of L-phenylalanine production by dual feeding of glucose and tyrosine. *Biotechnology and Bioengineering*. 52: 653-660.

- Watson, J.D., Gilman, M., Witkowski, J. and Zoller, M. 1992. Recombinant DNA, 2nd Edition, Scientific American Books, W.H. Freeman and Co.
- Weikert, C., Sauer, U. and Bailey, J. E. 1998. Increased phenylalanine production by growing and nongrowing *E.coli* strain CWML2. Biotechnological Progress 14: 420-424.
- Yang, Y. T., Bennet, G. N. and San, K.Y. 1998. Genetic and metabolic engineering. Process Biotechnology, EJB Electronic Journal of Biotechnology, vol. 1, no.3.
- Yanisch-Perron, C., Viera, J. and Messing, J. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide Sequences of the M13mp18 and pUC19 Vectors, Gene, 33, 103-119.