



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



REKOMBİNANT DNA TEKNOLOJİSİ İLE FLORESAN PROTEİN ÜRETİMİ

Yüksek Lisans Tezi

Ebru KABOĞLU

Biyomühendislik Anabilim Dalı

İzmir
2024

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

REKOMBİNANT DNA TEKNOLOJİSİ İLE
FLORESAN PROTEİN ÜRETİMİ

Ebru KABOĞLU

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Gaye Öngen Özgen
İkinci Danışmanı: Prof. Dr. Serap Evran

Biyomühendislik Anabilim Dalı
Biyomühendislik Yüksek Lisans Programı
Sunuş Tarihi: 13.08.2024

İzmir
2024

Ebru Kaboğlu tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “REKOMBİNANT DNA TEKNOLOJİSİ İLE FLORESAN PROTEİN ÜRETİMİ” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 13.08.2024 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Gaye Öngen Özgen

.....

Raportör Üye: Dr. Öğr. Üyesi İsmail Hakkı Akgün

.....

Üye: Doç. Dr. Ali Oğuz Büyükkileci

.....

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Rekombinant DNA teknolojisi ile Floresan Protein Üretimi” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

Ebru KABOĞLU

13 / 08 / 2024

ÖZET

REKOMBİNANT DNA TEKNOLOJİSİ İLE FLORESAN PROTEİN ÜRETİMİ

KABOĞLU, Ebru

Yüksek Lisans Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Gaye Öngen Özgen

İkinci Danışman: Prof. Dr. Serap Evran

Ağustos 2024, 34 sayfa

Otoindüklenabilir kültür ortamları kullanılarak gerçekleştirilen biyoproses uygulamalarında bir operatör gereksinimi duyulmaması ayrıca sentetik indükleyici uygulamaları ile karşılaştırıldığında da üretim ortamı maliyetinin düşük olması ve sisteme müdahale ihtiyacını azaltması açısından değerlendirildiğinde büyük ölçekli üretim proseslerinde *E. coli* gibi protein ekspresyonunu *lac* operonu kontrolünde gerçekleştiren hücreler için sıklıkla tercih edilen kültür ortam koşulunu sağlamaktadır. Bu çalışmada, *E. coli*'de rekombinant yeşil floresan protein üretimi bir model olarak seçilerek üretimde farklı kültür koşulları değerlendirilmiştir ve en uygun koşul üzerinden maliyeti azaltmaya yönelik bir optimizasyon çalışması yapılmıştır. Sonuçta optimize edilen yeni ortamda 1,18 mg/ml konsantrasyonunda geleneksel IPTG indüklemesi yapılan LB ortamında ise 0,6 mg/ml konsantrasyonunda protein elde edilmiştir. Yapılan optimizasyon çalışması ile birlikte kültür ortamındaki tripton konsantrasyonu % 33,6 oranında azaltılmıştır ve daha düşük maliyetli bir üretim ortam kompozisyonu elde edilmiştir. Optimize edilen yeni üretim ortamı ve kontrol olarak IPTG indüklemesi yapılan LB üretim ortamında 2L karıştırmalı tank biyorektörde gerçekleşen üretimlerde protein konsantrasyonunda LB ortamında %130 optimize edilen yeni ortamda %45,2 artış hesaplanmıştır. Bu bulgular, verimli ve uygun maliyetli büyük ölçekli rekombinant protein üretimi için optimize edilmiş ortamın potansiyelini vurgulamaktadır.

Anahtar sözcükler: Otoindüksiyon, yeşil floresan protein, *E.coli*, optimizasyon



ABSTRACT**FLUORESCENT PROTEIN PRODUCTION WITH
RECOMBINANT DNA TECHNOLOGY**

KABOGLU, Ebru

MSc in Bioengineering

Supervisor: Prof. Dr. Gaye Ongen Ozgen

Co-Supervisor: Prof. Dr. Serap Evran

August 2024, 34 page

Using autoinducible culture media in bioprocess applications eliminates the need for an operator and, compared to synthetic inducer applications, reduces production costs and the need for system intervention. This makes it a preferred culture condition for large-scale production processes involving cells like *E. coli* that express proteins under the control of the lac operon. In this study, recombinant green fluorescent protein production in *E. coli* was selected as a model, and different culture conditions were evaluated. An optimization study was conducted to reduce costs based on the optimal condition identified. As a result, in the optimized new medium, a protein concentration of 1.18 mg/ml was obtained, while in the traditional IPTG-induced LB medium, a concentration of 0.6 mg/ml was achieved. The optimization reduced the tryptone concentration in the culture medium by 33.6%, resulting in a more cost-effective production medium composition. In the production processes carried out in a 2L stirred-tank bioreactor, protein concentration increases of 130% in the LB medium and 45.2% in the optimized new medium were calculated. These findings highlight the potential of the optimized medium for efficient and cost-effective large-scale recombinant protein production.

Keywords: Autoinduction, green fluorescent protein, *E.coli*, optimization

ÖNSÖZ

Yeşil Floresan Protein (GFP), organizmaların biyolojik süreçlerini görünür kılmak için yaygın olarak kullanılmakta olan biyolojik bir belirteçtir. Bununla birlikte GFP tıp, enerji, tekstil alanlarında yenilikçi ürünleri kapsayan uygulama alanlarında da yer almaktadır. 2019 yılına ait verilerde GFP üretimi yıllık 1,6 milyar dolar pazar payına ulaşmıştır ve pazardaki payı her geçen yıl artmaktadır. Ancak, GFP'nin geniş çapta kullanımı, üretim maliyetleri ile ilgili zorlukları da beraberinde getirmektedir. Bu nedenle GFP üretiminde maliyetleri azaltmaya yönelik yeni stratejilerin geliştirilmesi ve optimizasyon çalışmaları ile birlikte endüstriyel üretimlere entegre edilebilmesi bir ihtiyaç haline gelmiştir.

Bu çalışma GFP üretim maliyetlerini düşürmek amacıyla gerçekleştirilen deneysel çalışmaların detaylı bir incelemesini sunmaktadır. Çalışmanın temel hedefi GFP üretiminde daha ekonomik bir ortam kompozisyonunun elde edilmesidir. Biyoproses çalışmalarında ortam maliyeti toplam üretim maliyetlerinin yaklaşık % 30 ila 40'ını oluşturmaktadır. Bu doğrultuda literatürde var olan üretim stratejileri değerlendirilerek alternatif stratejilerin araştırılması ve geliştirilmesi gibi konular ele alınmıştır.

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde emeği geçen tüm ekip arkadaşlarıma ve danışmanlarıma teşekkür ederim. Özellikle, çalışmanın her aşamasında desteklerini esirgemeyen ve değerli katkılarıyla çalışmayı zenginleştiren danışmanlarıma şükranlarımı sunarım. Ayrıca, laboratuvar olanakları ve gerekli teknik alt yapısı ile deneysel çalışmalarımı kolaylıkla yapmamı sağlayan üniversitemize teşekkür etmek isterim.

GFP üretim maliyetlerinin azaltılmasına yönelik bu çalışmaların, biyoteknoloji alanındaki bilimsel ilerlemeye katkı sağlayacağına inanıyorum. Çalışmanın, gelecekte yapılacak olan benzer projelere rehberlik etmesi ve bilimsel topluluğa faydalı olması dileğiyle.



İÇİNDEKİLER

ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xviii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
3. MATERYAL VE METOT.....	9
3.1. Mikroorganizma Türü.....	9
3.2. Kültür Ortamı ve Üretim Koşulları	9
3.3. Floresans Yoğunluğu Ölçümü.....	10
3.4. Deneysel Tasarım.....	10
3.5. Bradford Yöntemi ile Toplam Protein Miktarının Belirlenmesi.....	11
3.6. Karıştırılmalı Tank Biyoreaktöründe Ölçek Büyütme Çalışması.....	11

4. BULGULAR.....	12
4.1. Üretim Ortam Kompozisyonlarının Karşılaştırılması	12
4.2. Deneysel Tasarım ile Elde Edilen Bulgular	13
4.2.1. Deneysel Tasarımın İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi.	14
4.2.2. Deneysel Tasarımda Optimizasyon Verilerinin İncelenmesi	16
4.2.3. Optimizasyon Verilerinin Doğrulanması.....	17
4.4. Ölçek Büyütme Çalışması	19
5. TARTIŞMA	23
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	26
TEŞEKKÜR	33
ÖZGEÇMİŞ	34

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1: Yeşil Floresan Protein kaynağı <i>Aequorea victoria</i> (Bilal, A. Mir, et al., 2015)	5
Şekil 2.2: (a)Yeşil floresan proteinin ve kromoforun yapısı (b) GFP kromofor oluşumu (Nam, Ki Hyun., 2023)	6
Şekil 4.1: OD600nm’de hücre yoğunluğu/ üretim ortamları grafiği *p<0.05	12
Şekil 4.2: Floresan yoğunluğu/ üretim ortamları grafiği *p<0.05	13
Şekil 4.3: Floresan yoğunluğuna ait “Predicted vs Actual” Grafiği	16
Şekil 4.4: OD600nm hücre yoğunluğuna ait “Predicted vs Actual” Grafiği	16
Şekil 4.5: Optimizasyon Verileri	17
Şekil 4.6: LED transluminatörde floresan ışıma görüntüleri (A: LB (IPTG indüklemesi var), B: LB (IPTG indüklemesi yok), C,D,E: Opt. Otoindüksiyon ortamları)	18
Şekil 4.7: BSA kalibrasyon grafiği	18
Şekil 4.8: Biyoreaktörde OD600nm’de hücre yoğunluğu/ üretim ortamları grafiği *p<0.05	19
Şekil 4.9: 2L Biyoreaktörde optimum üretim ortamının takip edilen parametreleri	20

Şekil 4.10: 2L Biyoreaktörde LB üretim ortamının takip edilen parametreleri	20
Şekil 4.11: Biyoreaktörde zamana karşı floresan yoğunluğu grafiği	22
Şekil 4.12: Biyoreaktörde üretimlerin 24. saat görüntüleri (I: Opt. Otoindüksiyon ortamı II: LB ortamı).....	22



ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 4.1: OD600nm’de hücre yoğunluğu/ üretim ortamları ANOVA değerleri.....	12
Çizelge 4.2: Floresan yoğunluğu/ üretim ortamları ANOVA değerleri	13
Çizelge 4.3: Merkezi Kompozit Tasarım.....	14
Çizelge 4.4: Floresan yoğunluğu ANOVA.....	14
Çizelge 4.5: Floresan yoğunluğuna ait istatistiksel uygunluk	14
Çizelge 4.6: OD600nm hücre yoğunluğu ANOVA.....	15
Çizelge 4.7: OD600nm hücre yoğunluğuna ait istatistiksel uygunluk	15
Çizelge 4.8: Doğrulama deneyi için öngörülen denemeler.....	17
Çizelge 4.9: Doğrulama Deneyi Sonuçları	17

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
-----------------	-----------------

°C	Derece Celcius
----	----------------

%	Yüzde
---	-------

μl	Mikrolitre
----	------------

kDa	KiloDalton
-----	------------

mM	Milimolar
----	-----------

Å	Angström
---	----------

g	Gram
---	------

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
--------------------	-----------------

GFP	Yeşil Floresan Protein
-----	------------------------

IPTG	izopropil β-d-1-tiyogalaktopiranosid
------	--------------------------------------

OD	Optik Yoğunluk
----	----------------

PBS	Phosphate Buffer Saline
-----	-------------------------

dk	Dakika
----	--------

rpm	devir/dk
-----	----------

LB	Luria-Bertani Broth
----	---------------------

RNA	Ribonükleik asit
-----	------------------

BSA	Bovine Serum Albumin
-----	----------------------

1. GİRİŞ

Rekombinant protein ekspresyon sistemlerinin ortaya çıkışı biyoteknolojik üretimde köklü bir değişime yol açmıştır. Bu değişim gıda, tarım, kimya, biyofarmasötik gibi endüstrilerinde büyüme faktörleri ve hormonlar, antikorlar, enzimler ve aşılar gibi katma değeri yüksek ürünlerin üretimi gerçekleştirilmiştir ve biyoekonomiye büyük ölçüde katkıda bulunmuştur (Ow, Dave Siak-Wei, et al., 2021).

Rekombinant protein üretiminde ilk adım üretmek istenen proteinin kodunu içeren genin genetik mühendisliği teknikleri ile kaynağından izole edilmesi ve uygun bir vektöre klonlanması ile başlamaktadır. Klonlanan geni içeren vektör hedef organizmaya transformasyon, transdüksiyon veya transfeksiyon yöntemlerinden biri kullanılarak aktarılmaktadır (Streather, Bree R., et al., 2023). Gen aktarımı gerçekleştirilmiş mikroorganizma uygun üretim koşullarında üretilmektedir ve bu süreçte translasyon ve transkripsiyon mekanizmaları tarafından hedef protein hücrede yüksek seviyelerde eksprese olmaktadır. Rekombinant protein ekspresyonu sonrası, hedef rekombinant protein üretim ortamından katı-sıvı ayırma teknikleri kullanılarak ayrılma ve saflaştırma teknikleri kullanılarak ortamdan izole edilmektedir. İzole edilen protein karakterizasyonu, protein mühendisliği teknikleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Eskandari, Azadeh, et al., 2024).

Gram-negatif bir bakteri olan *Escherichia coli* (*E. coli*), kapsamlı olarak araştırılmış genetik geçmişi, yüksek hücre yoğunluğuna kısa sürelerde ulaşabilme kapasitesi, genetik olarak kolayca manipüle edilebilir olması ve endüstriyel ölçekte uygulanabilirliği nedeniyle rekombinant protein üretimi için mevcut konakçı türleri arasında birincil mikroorganizma olarak yer almaktadır (Santos, Sara PO, et al., 2022). *E. coli*'de protein ekspresyonu genellikle *lac* operonu kontrolünde gerçekleşir ve indükleyici laktoz ya da laktozun sentetik analogu olan izopropil β -d-1-tiyogalaktopiranosid (IPTG) kullanılır. (Marschall, et al., 2017). IPTG, *lac* operonunu aktif hale getirerek T7 RNA polimeraz/promoter sistemi gibi güçlü transkripsiyonel araçlar aracılığıyla yüksek seviyede hedef protein üretimi sağlamaktadır. Ancak, IPTG'nin kullanımı hem maliyetli hem de operatör

müdahalesi gerektirdiğinden, üretim sürecini optimize etmek için alternatif oto-indüksiyon ortamları geliştirilmiştir (Studier, F. William., 2018).

Otoindüksiyon, hücre yoğunluğuna bağlı olarak protein ekspresyonunu teşvik eden bileşenleri içeren ortam kompozisyonlarının kullanıldığı bir yöntemdir. Bu yöntemde, kültür ortamında glikoz, laktoz ve gliserol gibi karbon kaynaklarının kombinasyonu kullanılmaktadır (Xu, Jianlin, et al., 2012). Hücrelerin karbon kaynaklarını sıra ile tüketmesi sağlanmaktadır. Hücreler glikozu tükettikten sonra laktozu karbon kaynağı olarak kullanır. Böylece indüksiyon gerçekleşir ve protein üretimi sağlanır (Mostovenko, et al., 2011). Otoindüksiyon ortamları, IPTG gibi kimyasal indükleyicilere olan ihtiyacı ortadan kaldırmaktadır ve üretim süreçlerinin daha ekonomik ve operasyonel olarak daha basit hale getirmektedir (Isakova, Alina, et al., 2023).

Protein ekspresyon düzeyi ve üretim verimi, ortam bileşimi, pH, karıştırma hızı, havalandırma hızı, sıcaklık, inokulum konsantrasyonu, indükleyici konsantrasyonu, indüksiyon süresi ve besleme stratejileri gibi çeşitli parametrelere göre değişmektedir (Subramaniam, R. et al., 2018). Biyoproseslerde etkin ortam optimizasyonu yoluyla ürün veriminin maksimuma çıkarılması, ölçek büyütme sürecinde kritik bir faktördür. Üretim giderlerinin yaklaşık %30-40'ının üretim ortamı maliyetinin oluşturduğu göz önüne alındığında, üretim ortamı kompozisyonunun endüstriyel ölçek dikkate alınarak oluşturulması kritik öneme sahiptir (Hajji, M. et al., 2008). Guo, et al., yapmış oldukları çalışmada *Streptomyces diastatochromogenes*'den Poli-ε-L-lizin üretiminde Yanıt Yüzey Metodu ile üretim ortamındaki glukoz, maya ekstraktı ve amonyum sülfat konsantrasyonunu optimize ederek Poli-ε-L-lizin verimini başlangıç üretim koşullarına göre çalkalamalı üretimlerde konsantrasyon cinsinden %43,1 oranında, 5L'lik biyoreaktör üretimlerinde ise %56,4 oranında arttırdıklarını bildirmiştir. (Guo, et al., 2018). Chew et al. ise *E. coli*'den Yeşil Floresan Protein (GFP) üretiminde çalkalama hızı (rpm), sıcaklık (°C), başlangıç üretim ortam pH değeri, indükleyicinin konsantrasyonu (mmol/L), indüksiyon süresi (h) ve inokulum hacmi (ml) parametrelerini Box-Behnken tasarımı ile optimize etmiştir ve optimize edilen koşullarda GFP üretiminin verimi başlangıç koşullara göre 0,025 g/L'den 0,241 g/L'ye çıkarılmıştır (Chew, et al., 2012). GFP, hücrel biyoloji ve protein

mühendisliği alanında raportör protein olarak protein dinamiklerini anlamaya yönelik çalışmalarda yaygın kullanımı nedeni ile protein ekspresyon sistemlerinin optimizasyonu için ideal bir modeldir (DeBlasio, et al., 2010).

GFP üretimi hem akademik araştırmalarda hem de endüstriyel uygulamalarda protein ekspresyon sistemlerinin etkinliğini değerlendirmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. GFP'nin parlak floresans ışıma vermesi, protein ekspresyonunu ve hücre içi lokalizasyonunu kolayca izlemeyi sağlamaktadır. Bu nedenle biyoproses optimizasyonu için etkili bir araçtır (Soleja, Neha, et al., 2018).

Bu çalışmanın amacı, *E. coli*'de rekombinant protein üretiminde otoindüksiyon ortamlarının etkinliğini ve ortam optimizasyonunun biyoproses maliyetleri üzerine etkilerini araştırmayı amaçlamaktadır. Özellikle GFP üretimi üzerinden yeni üretim ortamı kompozisyonlarının geleneksel IPTG bazlı indüksiyon sistemlerine kıyasla sağladığı avantajlar değerlendirilmiştir. Bu bağlamda optimize edilen otoindüksiyon ortamının biyoteknolojik uygulamalarda protein üretimini nasıl daha etkin ve ekonomik hale getirdiği incelenmiştir. Çalışmanın bulguları, biyoteknolojik açıdan ortam optimizasyonu ile protein üretim süreçlerinin geliştirilmesine katkı sağlayacak ve otoindüksiyon ortamlarının ekonomik olması nedeni ile daha geniş bir uygulama yelpazesinde kullanılmasına olanak tanıyacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

Ticari olarak genellikle ilaç endüstrisi tarafından üretimi gerçekleştirilen GFP proteini tanı kitlerinde belirteç görevi görmesi nedeniyle yüksek saflıkla ve hacimde üretimi önem teşkil etmektedir. Tanı kitlerinden Raportör Gen Test Kiti pazarı GFP içermektedir ve bu pazar 2019 yılında yıllık 1,6 milyar dolarlık bir piyasa değerine ulaşmıştır. Dünya çapında rekombinant GFP üretimi pazarında Assay Genie, MyBiosource, Abnova, Novus Biologicals ve abcam gibi biyoteknoloji şirketleri GFP Assay Kitlerini piyasaya sürmüştür. GFP'nin piyasa değeri mg başına yaklaşık 350 ila 600 Amerikan doları arasında değişmektedir (Torres-Acosta, et al., 2021). Son yıllarda GFP'nin üretim maliyetlerini düşürmek ve üretim verimliliklerinin artırılmasına yönelik birçok çalışma yayınlanmıştır. GFP'nin rekombinant üretim teknolojileri kullanılarak üretilmesi için günümüze kadar farklı üretim stratejileri geliştirilmiştir. Lopes, et. al. yapmış olduğu çalışmada LB ortamında GFP üretiminde çalkalama hızı, indükleyici konsantrasyonu ve indüksiyon süresi olmak üzere üç farklı parametre çalkalama hızı 100, 150 ve 200 rpm, IPTG konsantrasyonu 0,005, 0,010 ve 0,025 mM ve indüksiyon süresi 2., 6. ve 10. saat şeklinde denenmiştir. Çalışmanın sonuçları üretim ortamı bileşenleri ve ortam bileşenlerinin konsantrasyonları açısından değerlendirildiğinde IPTG konsantrasyonlarının OD 600 nm'de hücre yoğunluğuna ve GFP konsantrasyonuna etki etmediği ya da ihmal edilebilir düzeyde etkisi olduğu bulgusuna ulaşılmıştır. Dolayısıyla indükleyici konsantrasyonunun azaltılması üretim maliyetlerini azaltmada etkili bir parametre olarak tespit edilmiştir (Lopes, et. al., 2019). Menacho-Melgar et. al. yaptıkları çalışmada fostat tükenmesi yoluyla otoindüklenebilir suşlar geliştirmiş ve geliştirilen bu suşların üretimi için otoindüksiyon ortamı optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen bu metot ile gen ekspresyon seviyeleri toplam hücresel proteinin %55'ine ulaştığı raporlanmıştır. Patentlenen bu çalışma durağan fazda fosfatın tükenmesi ile tetiklenen otoindüksiyona dayanmaktadır ve yüksek protein ekspresyonu sağlaması amaçlanmıştır (Menacho-Melgar et al., 2020).

Ticari olarak önemli bir yere sahip olan GFP'nin keşfi, 1960 yılında Osamu Shimomuro et. al. yaptığı çalışmaya dayanmaktadır ve ilk olarak *Aequorea victoria* denizanası türünden elde edilmiştir (Shimomura et al., 1962). Prasher et. al. ise

GFP'yi 1992 yılında klonlamıştır (Prasher et al., 1992). Yabani tip GFP'nin sekansı ilk kez 1992 yılında Prasher et. al. tarafından literatüre kazandırılmıştır. (Prasher et al., 1992). Chalfie et al. GFP'nin ökaryotlarda hem de prokaryotlarda ekspresyonunu raporlamıştır (Chalfie et al., 1994). Aynı çalışmada GFP'nin yeşil floresan yaydığı tespit edilmiştir. 1996 yılında yabani GFP ve mutant GFP'nin (S65T) üçüncül yapısı bildirilmiştir. Böylece floresan yapı çözülerek mutant floresan protein üretimi gerçekleştirilmiştir (Kong et al., 2011). GFP'nin keşfi ve yapısının detaylı olarak anlaşılması, biyokimyada ve moleküler biyolojide önemli ilerlemelere yol açmıştır. GFP'nin keşfi ile ilgili yapılan çalışmalar nedeniyle 2008 yılında Nobel Kimya Ödülü Osamu Shimomura, Martin Chalfie ve Roger Tsien'e verilmiştir (Ferreira et al., 2022).



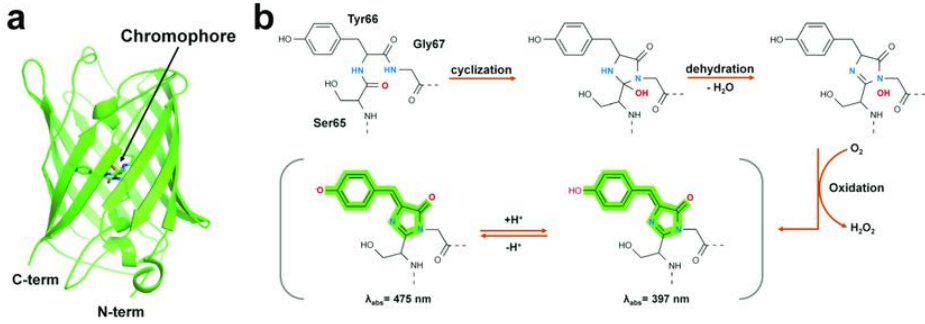
Şekil 2.1:Yeşil Floresan Protein kaynağı *Aequorea victoria* (Bilal, A. Mir, et al., 2015)

GFP, 238 amino asitten oluşan 27 kDa'luk, yüksek çözünürlüğe ve stabiliteye sahip bir polipeptit zinciridir ve 509 nm dalga boyunda yeşil ışık yaymaktadır (Liu et al., 2015; Wymelenberg et al., 2018; Kermani, 2023). Proteinin katlanmış halinde, Ser65-Tyr66-Gly67 (S65, Y66, G67) amino asitlerinden oluşan kromofor bölgesi bulunmaktadır ve GFP'nin floresan özelliklerinde protein katlanması ve moleküler yapısının önemli bir rolü bulunmaktadır (Ansari et al., 2016).

Çapı yaklaşık 24 Å ve yüksekliği 42 Å olan GFP, 11 β -sheetlik fiçı benzeri bir yapıya sahiptir ve β -sheetler bir kutunun duvarlarını oluşturmaktadır (Zimmer, 2002). Ayrıca α -heliks bu kutunun ortasından çapraz geçmektedir (Zimmer, 2002). GFP'nin kromoforu, α -heliksin merkezinde yer almaktadır (Li et al., 2015). Kromofor grubu 65-67 pozisyonlarındaki aminoasit kalıntılarının

posttranskripsiyonel modifikasyonu ile oluşmaktadır (Chudakov et al., 2010). Kromofor GFP’de ışık yayan kısım olarak bilinmektedir ve p-hidroksibenziliden-2,3-dimetilimidazolinon (HBDI)'un anyonik formudur (Svendsen et al., 2017). Kromofor grubundaki 65. pozisyonundaki aminoasitin (Ser65) yan zinciri değişebilirken Try66 ve Gly67 tüm GFP benzeri proteinlerde korunmuştur (Chudakov et al., 2010; Kubala et al., 2010). Kromofor kapsüllenmiştir ve β -sheetin yüzeyini kaplayan hidrojen bağları ile büyük ölçüde çözücünden korunmaktadır (Craggs, 2009). Kromoforda hem nötr fenol hem de anyonik fenolat kromoforda bulunmaktadır ve fenol ile fenolat oranının 6:1 olduğu tahmin edilmektedir (Chan et al., 2022). Kromoforu oluşturmak için herhangi bir kofaktöre ihtiyaç duymadan yalnızca moleküler oksijen gerekmektedir (Scott et al., 2017).

Tsien, GFP'nin doğal floresans özelliklerini arttırmak için genetik mutasyon ve protein mühendislikleri teknikleri ile çeşitli mutantlarını geliştirerek, farklı renklerde floresan veren proteinler elde etmiş ve bu sayede hücre biyolojisi çalışmalarında yeni ufuklar açmıştır (Tsien, Roger Y., 1998).



Şekil 2.2:(a)Yeşil floresan proteinin ve kromoforun yapısı (b) GFP kromofor oluşumu (Nam, Ki Hyun., 2023)

GFP, protein miktarının ölçümü, proteinlerin hücre içindeki yerinin tespiti, moleküler görüntüleme ve hücre-hücre interaksyonunun tespiti gibi amaçlarla farklı biyoteknolojik alanlarda kullanılmaktadır (Kamiyama et al., 2015). Splint-GFP teknolojisi ile farklı protein-protein interaksyonunun verimli bir şekilde izlenebilmektedir (Chan et al., 2022). GFP, proteinlerin aktivitesini tespit etmek için in vivo olarak protein biyosensörü uygulamalarında da rol almaktadır (Chan et al., 2022). Özellikle biyosensör uygulamalarında GFP’nin floresan özellikleri, yüksek stabilite sahip olması ve mutasyona uğramama yetenekleri nedeni ile yaygın

olarak kullanılmaktadır (Tian et al., 2023). Cieri et. al. canlı hücrelerde in vivo olarak organel yakınlığını tespit etmek amacıyla organeller yakın olduğunda floresan verecek şekilde tasarlanmış split-GFP tabanlı bir sensör geliştirmiştir (Cieri et al., 2017). Cai et. al. canlı hücrelerde mitokondri fonksiyon bozukluğunun tespit etmek amacıyla viskozite ölçümünü gerçekleştirebilecek GFP-kromofor tabanlı bir floresan probu geliştirmiştir (Cai et al., 2021). Gerçek zamanlı değişikliklerin tespitinde hızlı ve takip edilebilir bir yöntem olmasıyla GFP bazlı problemlerin geliştirilmesi biyoteknolojik açıdan önemlidir.

GFP, biyobelirteç özelliği ile hem hayvan hem de bitki hücrelerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Li ve Chye, 2009). GFP'nin, ziraat alanında kullanımı patojen-konakçı ilişkisinin tespiti ve bitkilerde GFP veriminin artırılması gibi konuları kapsamaktadır. Nandakumar et. al. yapmış olduğu çalışmadan şeker kamışı için patojen olan *Colletotrichum falcatum*'un konak kolonizasyonunu ve yayılımını ortaya koymak amacıyla GFP etiketli *C. falcatum* geliştirilmiştir (Nandakumar et al., 2020). GFP, patojen-konakçı etkileşimleri hakkında bilgi sahibi olmak ve bu bilgilerin bitkilerin hastalıklara direnç kazandırması için tarımsal stratejiler geliştirmek amacıyla kullanılması söz konusudur. GFP'nin mikrobiyal kaynaklar kullanılarak rekombinant üretimi yanı sıra tıbbi açıdan önemli bir bitki olan tatlı fesleğen bitkisel kaynaklı GFP üreticisi olarak öne çıkmakta ve doğal yolla GFP üretebilmektedir. Tatlı fesleğen bitkisi düşük konsantrasyonda GFP üretebilmekte ancak üretilen GFP zayıf floresan özellik göstermektedir. Bu sorunların aşılması Sindarovka ve Kuchuk'in, geliştirilmiş ekspresyon sistemleri ile GFP verimini arttırmaya yönelik çalışmaları ile mümkün olmuştur (Sindarovka ve Kuchuk, 2023).

Tıp alanında tümör tedavilerinde gen ekspresyon çalışmalarında GFP biyobelirteç olarak yaygın kullanım alanına sahiptir. Günümüzde tümör tedavisinde lazer kaynakları kullanılmaktadır. Ancak çevredeki sağlıklı dokulara zarar verilmeden tedavi uygulanabilmesi için sıcaklık kontrolü önemlidir. Lahoz et. al. yaptıkları çalışmada sıcaklık değişikliklerinin tespiti ve izlenmesi için *E. coli*'de eksprese edilen GFP'yi kullanmışlardır (Lahoz et al., 2017). Blesa et. al. Parkinson hastalığında gen terapisi uygulamıştır ve kan-beyin bariyeri geçerek ilgili dokuya ulaşım ulaşmadığı GFP yoluyla izlenmiştir (Blesa et al., 2023)

Yaygın kullanım alanlarına ve geniş pazar payına sahip GFP'nin rekombinant üretimi ve üretim maliyetlerinin düşürülmesine yönelik geliştirilen optimizasyon stratejileri her geçen gün önem kazanmaktadır.



3. MATERYAL VE METOT

3.1. Mikroorganizma Türü

Yeşil floresan protein üretimi için, *E. coli* BL21(DE3) suşu Ege Üniversitesi Biyokimya Bölümü'nden temin edilmiştir.

3.2. Kültür Ortamı ve Üretim Koşulları

Ön kültür için, 250 ml'lik ErlenMayer şişesine 50 ml LB Broth (LB: 10 g/L bakto-tripton, 5 g/L maya ekstraktı, 5 g/L NaCl pH:6.8) hazırlanmıştır ve otoklav ile 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Dondurulmuş stoklardan bir öze yardımı ile alınan *E. coli* hücrelerinin son konsantrasyonu 100 mg/ml ampisilin içeren LB ortamına aşılması gerçekleştirilmiştir. Kültür ortamı 37°C'de ve 250 rpm'de 18 saat boyunca bir çalkalayıcıda gece boyunca kültüre edilmiştir. Otoindüksiyon ortamları;

- A (2.9 g/L glukoz, 11.17 g/L gliserol, 7.6 g/L laktoz, 4 g/L (NH₄)₂HPO₄, 3.3 g/L KH₂PO₄, 1.55 g/L sitrik asit, 0.59 g/L MgSO₄, pH: 6.8, Li, Zhaopeng et. al, 2011)
- B (2.9 g/L glukoz, 11.17 g/L gliserol, 7.6 g/L laktoz, 4 g/L (NH₄)₂HPO₄, 3.3 g/L KH₂PO₄, 1.55 g/L sitrik asit, 0.59 g/L MgSO₄, iz elementler, pH:6.8 Li, Zhaopeng et. al, 2011)
- C (0,5 g/L glukoz, 2 g/L laktoz 35 g/L tripton, 20 g/L maya ekstraktı, 3,3 g/L (NH₄)SO₄, 6,8 g/L KH₂PO₄, 7,1 g/L Na₂HPO₄, 0,15 g/L MgSO₄, pH:6.8, Mehrnoosh Fathi-Roudsari et. al, 2018) 250 ml'lik ErlenMayer'de 50ml olarak hazırlanmıştır ve otoklav ile 121°C'de 15 dk sterilize edilmiştir.

Ön kültür, nihai konsantrasyonu 100 mg/ml ampisilin içeren otoindüksiyon ortamlarına ve kontrol LB ortamına %2'lik (v/v) olarak üç tekrarlı hali ile aktarılmıştır. Kültür ortamı, OD_{600nm}'de 0.6-0.8 aralığına ulaşana kadar 37°C'de ve 250 rpm'de bir çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. İstenilen OD aralığına ulaşıldığında, inkübasyon sıcaklığı 25°C'ye düşürülmüştür ve LB ortamına 0,5 mM izopropil-b-D-1-tiyogalaktopiranosidin (IPTG) nihai konsantrasyonunun eklenmesiyle indüksiyon yapılmıştır. Kültür ortamları 25°C sıcaklıkta, 250 rpm çalkalama hızında 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin

tamamlanmasının ardından hücreler, 4°C’de 30 dakika boyunca dakikada 4000 rpm hızında santrifüjleme yoluyla toplanmıştır ve floresans yoğunluğu ölçümü için +4°C’de saklanmıştır.

3.3. Floresans Yoğunluğu Ölçümü

Hücre pelleti, PBS tamponu (pH: 7,4) ile iki kere yıkamaya tabi tutulmuştur. Yıkama sonrası hücre pelletinin üzerine 500mM NaCl içeren 100mM potasyum fosfat tamponu her 1 g pellet için 10 ml olacak şekilde eklenmiştir ve 15ml’lik falkon tüplere aktarılmıştır. Hücre parçalama işlemi için falkonlar buz üzerine alınmıştır ve ultrasonik homojenizatör (%40 Amp, 03-06 Pulser) ile 5 ila 7 dakika arasında parçalama işlemi gerçekleştirilmiştir. Hücre kalıntılarını uzaklaştırma için örnekler 2 ml’lik ependorflara alınmıştır ve 15000 rpm’de 30 dakika boyunca santrifüj gerçekleştirilmiştir. Süpernatantlar temiz ependorflara aktarılmıştır. Yeşil Floresan Protein yoğunluğu, Agilent Technologies tarafından Santa Clara, CA, ABD’de üretilen bir Cary Eclipse spektrofotometresi ile 395 nm’de uyarma (5 nm’lik bir uyarma yarığı ile) ve 509 nm’de emisyon (10 nm’lik bir emisyon yarığı ile) değerlerinde ölçülmüştür.

3.4. Deneysel Tasarım

Otoindüksiyon ortamlarının birbirleri arasında ve kontrol olarak seçilen LB ortamı ile arasındaki OD600nm’de hücre yoğunluğu ve floresans yoğunluğu farkları değerlendirilmiştir ve optimizasyona yönelik yapılacak deneysel tasarım için kültür ortamı seçilmiştir. Deney tasarımı ve analizi, Design Expert İstatistik Yazılımı (Sürüm 13.0.0, State-Ease Inc., Minneapolis, MN) kullanılarak yapılmıştır. Üretim maliyetlerinin %70’ini oluşturan tripton ve maya ekstraktı konsantrasyonları floresan protein üretiminde ortam içeriği optimizasyonu için değişken faktörler olarak seçilmiştir. Bu değişkenlerin optimal seviyelerini belirlemek için Merkezi Kompozit Tasarım kullanılmıştır. Faktör değerlerinin aralıkları tripton için üst sınırı 35 g/L, alt sınırı 10 g/L; maya ekstraktı için ise üst sınırı 20 g/L alt sınırı ise 5 g/L olarak belirlenmiştir. Optimizasyon için OD600nm’de hücre yoğunluğu ve floresans yoğunluğu olmak üzere iki farklı değişken izlenmiştir. Toplam 13 deney yapılmıştır. Deneysel tasarımdaki optimizasyon verileri üç tekrarlı deneyler ile valide edilmiştir.

3.5. Bradford Yöntemi ile Toplam Protein Miktarının Belirlenmesi

Sonikasyon sonrası His etiketli yeşil floresan proteinleri, Ni-NTA manyetik agaroz boncuklarına bağlanmıştır ve elüsyon için hazırlanan B tamponu (50mM KH₂PO₄, 300 mM NaCl, 500 mM imidazol) ile elüe edilmiştir. Elüe edilen proteinlerin kantitatif ölçümü Bradford yöntemi ile gerçekleştirilmiştir (Bradford, 1976). Bu yöntemde BSA (Bovine Serum Albümin) standartları kullanılarak kalibrasyon grafiği çizilmiştir. Örnekler 5 kat ve 10 kat seyreltilmiştir. 96 well-plate'lere 10 µl örnekler ve üzerine 200 µl Bradford çözeltisi eklenip 10 dakika inkübe edilmiştir ve ardından absorbans değerleri spektrofotometrede 595 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Değerler kalibrasyon grafiğindeki denklemde yerlerine yazılmıştır ve protein konsantrasyonları mg/ml cinsinden hesaplanmıştır.

3.6. Karıştırma Tank Biyoreaktöründe Ölçek Büyütme Çalışması

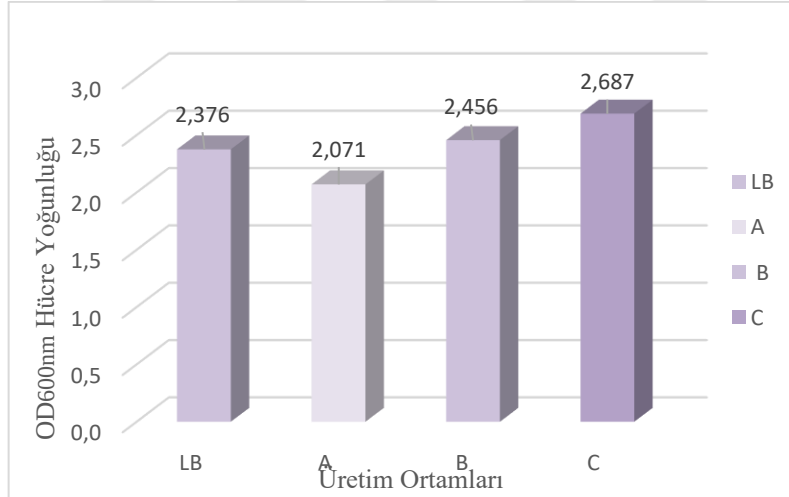
Ölçek büyütme çalışmasında yeşil floresan protein üretimi 2L çalışma hacmine sahip "Sartorius Biostat®B plus" biyoreaktöründe gerçekleştirilmiştir. Biyoreaktörde 1 L çalışma hacminde üretim yapılmıştır. Üretim ortam kompozisyonu olarak önceki deneylerde optimize edilen otoindüksiyon ortamı ve kontrol olarak LB üretim ortamları denenmiştir. Biyoreaktöre aşılama hacimce %2'lik (v/v) olacak şekilde gerçekleştirilmiştir ve üretim ortamlarının başlangıç pH'ı 6,8 olarak ayarlanmıştır. Reaktörde pH, karıştırma hızı, sıcaklık, havalandırma hızı gibi parametreler otomasyon sistemi ile izlenmiştir ve düzenlenmiştir. Çözünmüş oksijen konsantrasyonunun %25 doygunlukta sabit tutulduğu kaskat sistemine göre havalandırma hızı 0.3-1 vvm arasında; karıştırma hızı ise 250-750 rpm arasında otomatize edilmiştir. Hücrelerin optik yoğunluğu 600 nm'de spektrofotometre ile ölçülmüştür ve 600 nm'de hücre yoğunluğu 0.4-0.6 aralığına ulaştığında her denemede sıcaklık 25'ye düşürülmüştür. LB ortamı denemelerinde sıcaklık indüksiyonu ile birlikte nihai konsantrasyonu 0,5 mM olacak şekilde IPTG eklenerek indükleme yapılmıştır. Biyoreaktörde üretim süresi 24 saat olarak belirlenmiştir. Optimize edilen otoindüksiyon ortamı için 3 tekrarlı deneme LB ortamı için iki tekrarlı denemeler yapılmıştır. Üretim sonunda hücreler santrifüj ile hasat edilerek Bradford Yöntemi ile toplam protein konsantrasyonu mg/ml cinsinden hesaplanmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Üretim Ortam Kompozisyonlarının Karşılaştırılması

GFP üretiminde üretim için literatürde var olan 4 farklı üretim ortamı; LB, A, B ve C ile üç tekrarlı denenmiştir. Grafikler üç tekrarlı ölçümlerin ortalaması alınarak hazırlanmıştır. Şekil 4.1’de sunulan üretim ortamları ve OD600 nm’de 24. saatteki hücre yoğunluğu değerleri Çizelge 4.1’ de belirtilen ANOVA değerleri ile istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmuştur. En düşük hücre konsantrasyonu OD 2,07 ile **A** ortamında tespit edilmiştir İz elementleri içermesi nedeni ile **B** ortamında OD 2,46 ile A ortamından (OD 2,07) daha yüksek hücre konsantrasyonuna ulaşmasına neden olmuştur.

En yüksek hücre yoğunluğuna ise 2,69 OD ile **C** ortamında ulaşılmıştır.



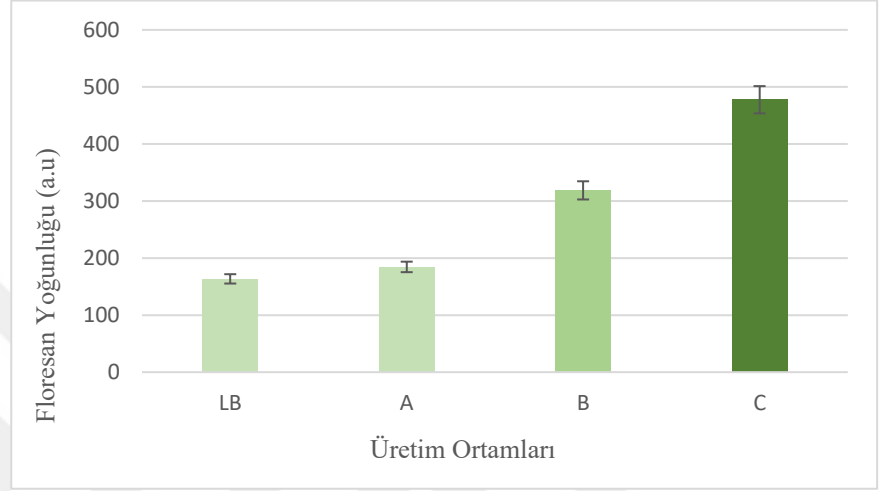
Şekil 4.1:OD600nm’de hücre yoğunluğu/ üretim ortamları grafiği *p<0.05

Çizelge 4.1: OD600nm’de hücre yoğunluğu/ üretim ortamları ANOVA değerleri

ANOVA						
Varyans Kaynağı	SS	df	MS	F	P-değeri	F ölçütü
Gruplar Arasında	0,584240917	3	0,194746972	162,0191	1,68081E-07	4,066181
Gruplar İçinde	0,009616	8	0,001202			
Toplam	0,593856917	11				

Şekil 4.2’de, 4 farklı üretim ortamında üretimi gerçekleştirilen hücrelerde üretim sonunda farklı floresan protein yoğunlukları ölçülmüştür. Ortam

kompozisyonu farklılıkları ile floresan yoğunluğu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır. En düşük floresans yoğunluğuna A ortamı lizatından en yüksek floresan yoğunluğu ise C ortamı lizatından ölçülen değerler ile ulaşılmıştır. Floresan proteinin hücre içi bir protein olduğu göz önüne alındığında biyokütlenin artışı ile floresan yoğunluğunun artışı arasında bir korelasyon olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.2:Floresan yoğunluğu/ üretim ortamları grafiği *p<0.05

Çizelge 4.2:Floresan yoğunluğu/ üretim ortamları ANOVA değerleri

ANOVA						
Varyans Kaynağı	SS	df	MS	F	P-değeri	F Ölçütü
Gruplar Arasında	189140	3	63046,65	73,0425	3,73E-06	4,066181
Gruplar İçinde	6905,202	8	863,1503			
Toplam	196045,2	11				

4.2. Deneysel Tasarım ile Elde Edilen Bulgular

Merkezi Kompozit Tasarım ile elde edilen floresan ölçüm değerleri ve hücrelerin 600 nm’de optik yoğunlukları Çizelge 4.3’ te sunulmuştur.

Çizelge 4.3:Merkezi Kompozit Tasarım

Std	Run	Factor 1 A:Tryptone	Factor 2 B:Yeast Extract	Response 1 Intensity	Response 2 OD600
1	3	10	5	163.62	2.351
2	7	35	5	321.23	2.49
3	9	10	20	416.75	2.614
4	13	35	20	415.95	2.647
5	10	4.82233	12.5	281.26	2.594
6	5	40.1777	12.5	462.92	2.585
7	1	22.5	1.8934	214.67	2.313
8	12	22.5	23.1066	512.88	2.736
9	4	22.5	12.5	428.32	2.682
10	2	22.5	12.5	421.99	2.668
11	8	22.5	12.5	413.84	2.648
12	6	22.5	12.5	383.03	2.665
13	11	22.5	12.5	392.99	2.623

4.2.1. Deneysel Tasarımın İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

Floresan yoğunluğuna ait ANOVA değerleri p-değeri 0,0003 (Çizelge 4.4) ve R^2 değeri 0,94 (Çizelge 4.5) değeri istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmuştur. İstatistiksel olarak "lack of fit" (uyumsuzluk) değerinin "not significant" (önemsiz) olması, modelin veriye iyi uyduğunu ve modeldeki varyasyonun büyük ölçüde açıklanmış olduğunu göstermektedir. Bu, sistematik bir uyumsuzluğun olmadığını ifade eder (Wahhab, et al., 2024). Dolayısıyla floresan yoğunluklarına ait verilerin model ile uyumlu olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.4:Floresan yoğunluğu ANOVA

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	1.126E+05	5	22523.37	24.64	0.0003	significant
A-Tryptone	21395.12	1	21395.12	23.41	0.0019	
B-Yeast Extract	74032.18	1	74032.18	81.00	< 0.0001	
AB	6273.43	1	6273.43	6.86	0.0344	
A ²	5302.37	1	5302.37	5.80	0.0469	
B ²	7019.57	1	7019.57	7.68	0.0276	
Residual	6397.69	7	913.96			
Lack of Fit	4906.17	3	1635.39	4.39	0.0936	not significant
Pure Error	1491.52	4	372.88			
Cor Total	1.190E+05	12				

Çizelge 4.5:Floresan yoğunluğuna ait istatistiksel uygunluk

Std. Dev.	30.23		R²	0.9462
Mean	371.50		Adjusted R²	0.9078
C.V. %	8.14		Predicted R²	0.6873
			Adeq Precision	15.5514

Tasarımdaki bir diğer yanıt olan OD600nm'de hücre yoğunluğuna ait ANOVA değerleri p-değeri 0,0005 (Çizelge 4.6) ve R^2 değeri 0,93 (Çizelge 4.7) ile anlamlı bir fark oluşturmuştur. Lack of fit" (uyumsuzluk) değerinin anlamlı olması, yani "significant" çıkması, modelin veri setine iyi uymadığını ve modelin veriyi yeterince temsil etmediğini göstermektedir (Reza, et al., 2024). Dolayısıyla OD600nm hücre yoğunluklarına ait verilerin model ile uyumlu olmadığı tespit edilmiştir. Fakat modelin doğruluğunu artırmak için iki farklı "response" (yanıt) seçildiği için bu uyumsuzluk elimine edilmiştir.

Çizelge 4.6:OD600nm hücre yoğunluğu ANOVA

	Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
	Model	0.1812	5	0.0362	20.68	0.0005	significant
	A-Tryptone	0.0032	1	0.0032	1.81	0.2205	
	B-Yeast Extract	0.1296	1	0.1296	73.95	< 0.0001	
	AB	0.0028	1	0.0028	1.60	0.2460	
	A ²	0.0121	1	0.0121	6.91	0.0340	
	B ²	0.0383	1	0.0383	21.87	0.0023	
	Residual	0.0123	7	0.0018			
	Lack of Fit	0.0102	3	0.0034	6.66	0.0492	significant
	Pure Error	0.0020	4	0.0005			
	Cor Total	0.1934	12				

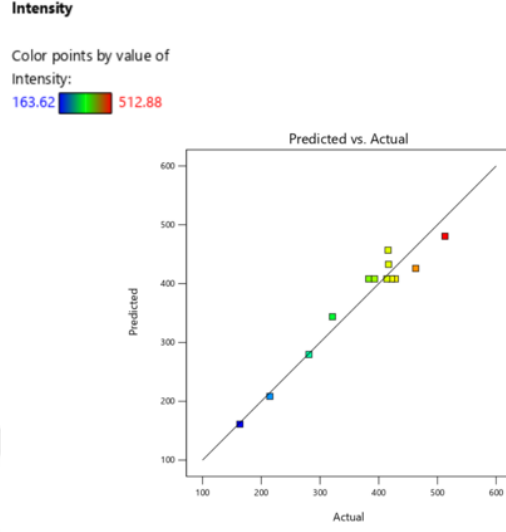
Çizelge 4.7:OD600nm hücre yoğunluğuna ait istatistiksel uygunluk

	Std. Dev.	0.0419		R²	0.9366
	Mean	2.59		Adjusted R²	0.8913
	C.V. %	1.62		Predicted R²	0.6078
				Adeq Precision	12.6582

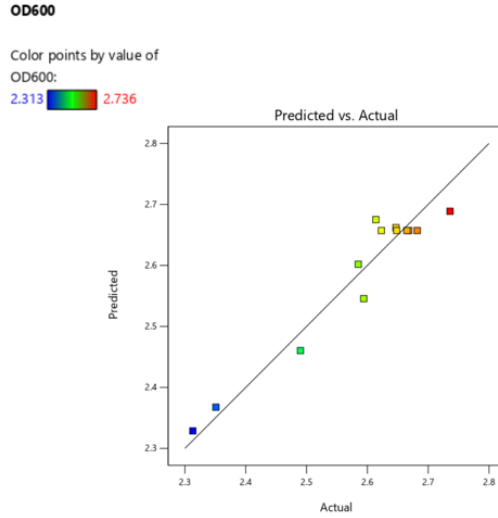
"Predicted vs Actual" grafiği, model tarafından tahmin edilen değerler ile gerçek (gözlenen) değerlerin karşılaştırmasını görsel olarak sunan bir grafikdir. Bu grafik, modelin performansını ve doğruluğunu değerlendirmek için sıkça kullanılmaktadır. Grafik, yatay ekseninde gerçek değerleri (actual), dikey ekseninde ise model tarafından tahmin edilen değerleri (predicted) göstermektedir (Sen, et al., 2012). Mükemmel bir modelde, tahmin edilen değerler (predicted) ile gerçek değerler (actual) $y = x$ doğrusu üzerinde yer almaktadır. Noktaların bu çizgiye yakın olması, modelin veriyi iyi açıkladığını göstermektedir (Nezhad, et al., 2024).

Şekil 4.3'te floresan yoğunluğuna ait, Şekil 4.4'te ise OD600nm hücre yoğunluğuna ait "Predicted vs Actual" grafikleri verilmiştir. Grafiklerdeki

noktaların $x=y$ doğrularına olan yakınlıkları oluşturduğumuz modelin verilerimiz ile örtüştüğünü göstermektedir.



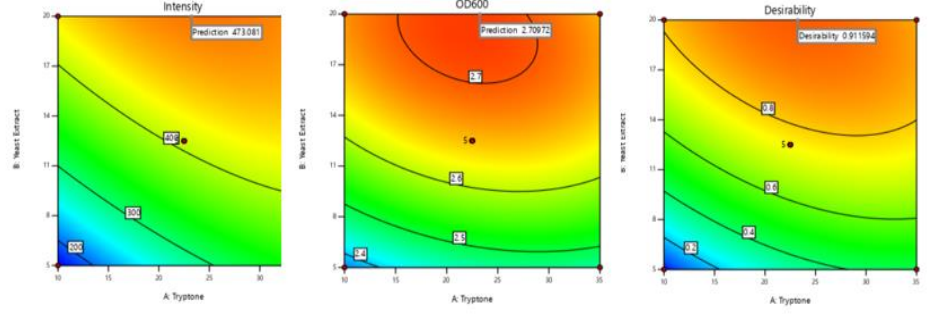
Şekil 4.3:Floresan yoğunluğuna ait “Predicted vs Actual” Grafiği



Şekil 4.4:OD600nm hücre yoğunluğuna ait “Predicted vs Actual” Grafiği

4.2.2. Deneysel Tasarımda Optimizasyon Verilerinin İncelenmesi

Deneysel tasarımda tripton ve maya ekstraktın konsantrasyonlarının belirlenen aralıklarda tutulduğu, floresan ve Od60nm hücre yoğunluğunun maksimize edildiği noktalarda %91 doğrulukla tahmin edilen optimum veriler Şekil 4.5’te gösterilmiştir.



Şekil 4.5:Optimizasyon Verileri

Tasarım aynı zamanda optimum koşulların doğrulanabileceği 8 farklı deneme setini öngörmüştür. Bu deneme setleri Çizelge 4.8’de gösterilmektedir.

Çizelge 4.8:Doğrulama deneyi için öngörülen denemeler

Number	Tryptone	Yeast Extract	Intensity	OD600	Desirability
1	23.232	20.000	473.081	2.710	0.912
2	23.321	20.000	473.141	2.710	0.912
3	23.131	19.999	473.005	2.710	0.912
4	23.015	19.999	472.914	2.710	0.912
5	23.490	20.000	473.252	2.709	0.912
6	22.901	20.000	472.826	2.710	0.912
7	22.501	20.000	472.465	2.710	0.911
8	22.198	19.999	472.154	2.710	0.911

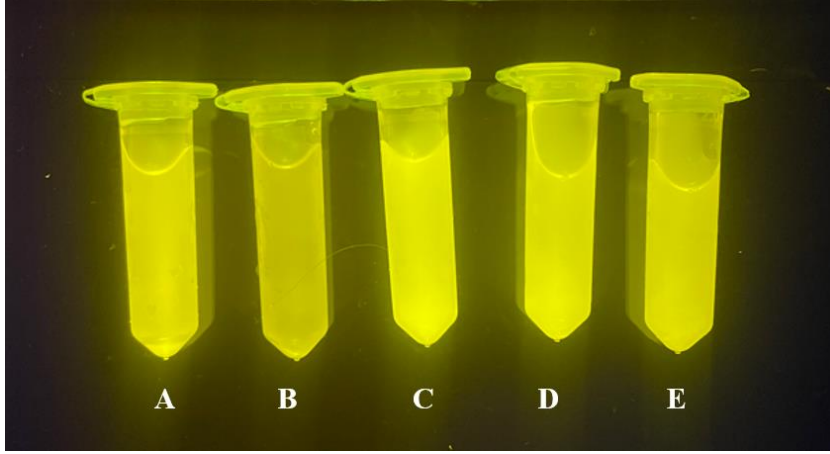
4.2.3. Optimizasyon Verilerinin Doğrulanması

Çizelge 4.8’deki iki numaralı deneme seti üç tekrarlı olarak kurulmuştur. Optimizasyon sonuçları Çizelge 4.9’da gösterilmektedir. Deneysel tasarımdaki optimizasyon verileri Çizelge 4.9’da gösterildiği gibi valide edilmiştir.

Çizelge 4.9:Doğrulama Deneyi Sonuçları

Floresan Yoğunluğu(Intensity)	OD600 _{nm} Hücre yoğunluğu
476.22	2,757
483.46	2,758
463.16	2,659

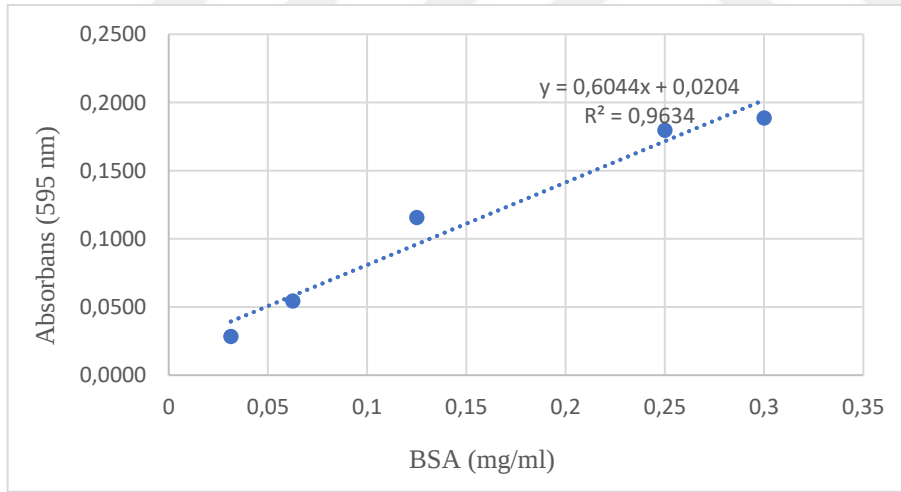
LED transluminatörde farklı üretim ortamlarından alınan lizatların floresan ışığa görüntüleri Şekil 4.6’da sunulmuştur.



Şekil 4.6: LED transluminatörde floresan ışıma görüntüleri (A: LB (IPTG indüklemesi var), B: LB (IPTG indüklemesi yok), C,D,E: Opt. Otoindüksiyon ortamları)

4.3. Bradford Yöntemi ile Toplam Protein Konsantrasyonu Verileri

Bradford yöntemi ile konsantrasyon aralığı 0,0305-0,3 mg/ml aralığında olan BSA standartları ile OD 595 nm’de spektrofotometrik ölçümler sonucu çizilen kalibrasyon grafiği Şekil 4.7’de gösterilmektedir.

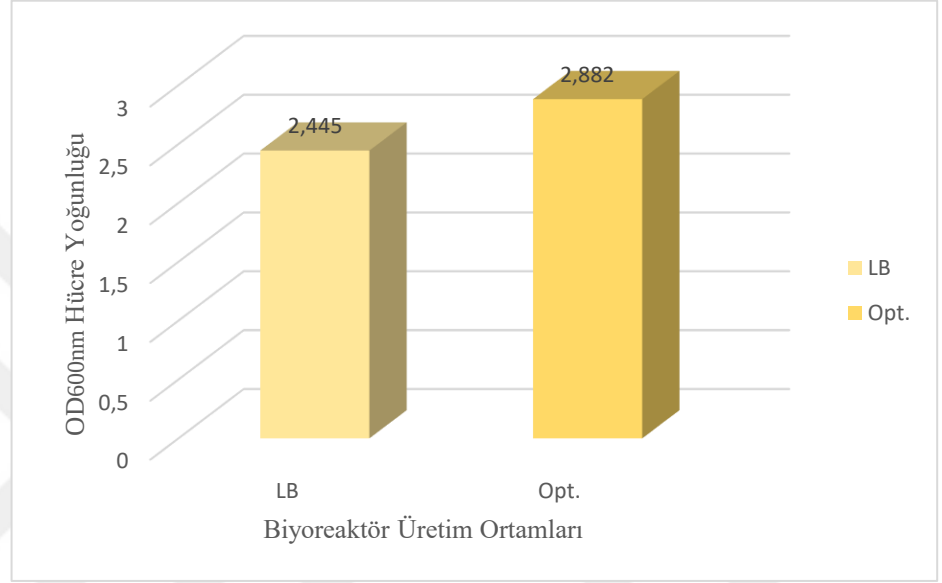


Şekil 4.7:BSA kalibrasyon grafiği

Erlen üretimlerinde optimize edilen ortamda protein miktarının kantitatif ölçümünde 1,21 mg/ml protein konsantrasyonu tayin edilmiştir. Kontrol amaçlı üretilen LB ortamında bu değer 0,62 mg/ml protein konsantrasyonudur.

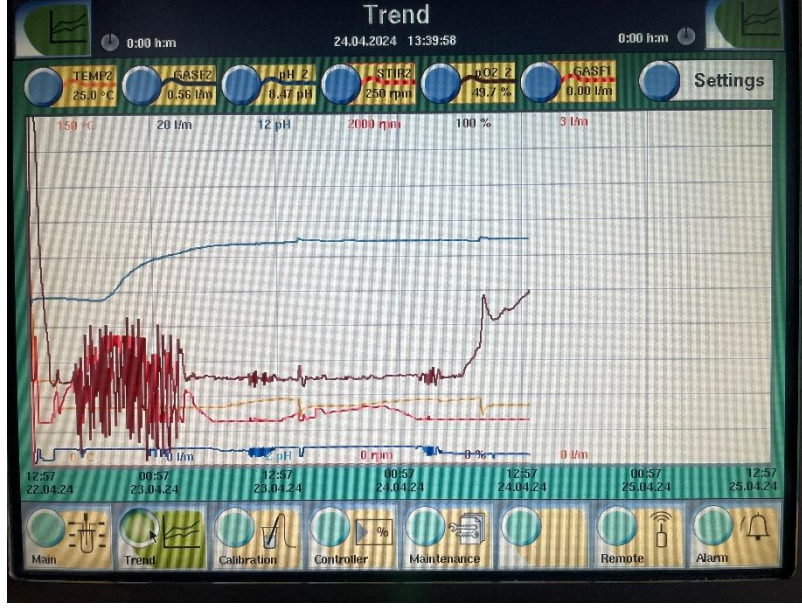
4.4. Ölçek Büyütme Çalışması

Optimize edilen üretim ortamında 2L'lik karıştırmalı biyoreaktörde ölçek büyütme çalışması yapılmıştır. Biyoreaktördeki üretimler optimum ortam ve LB üretim ortamı için iki tekrarlı olacak şekilde deneysel tasarım gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.8'de biyoreaktörde optimum üretim ortamında ve kontrol olarak LB üretim ortamında üretimin 24. saatinde OD 600 nm'de hücre yoğunlukları sunulmuştur.



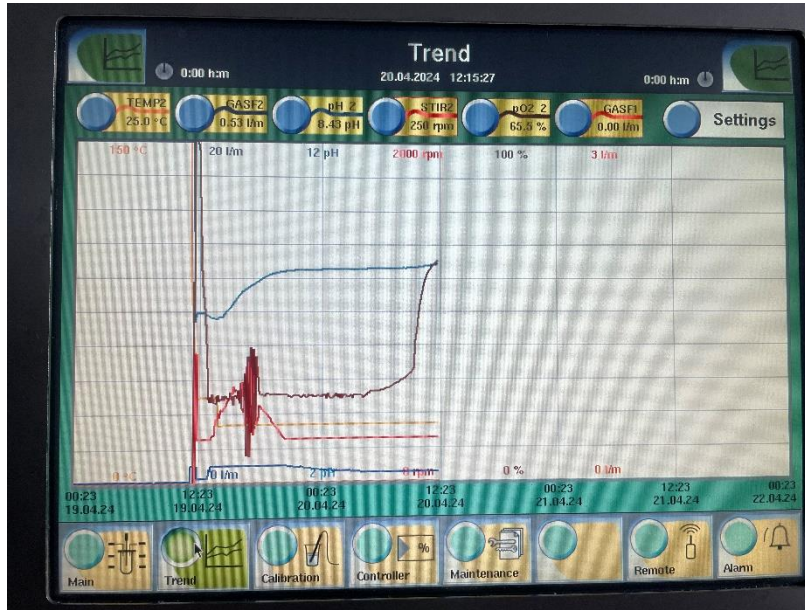
Şekil 4.8: Biyoreaktörde OD600nm'de hücre yoğunluğu/ üretim ortamları grafiği *p<0.05

Biyoreaktörde optimum üretim ortamı ve LB üretim ortamına ait takip edilen üretim parametreleri Şekil 4.9 ve 11'de sunulmuştur. Şekil 4.9 ve Şekil 4.10'da hücre yoğunluğunun artması ile birlikte çözünmüş oksijen konsantrasyonunun sabit tutulması amacı ile biyoreaktörde karıştırma hızı (rpm) ve havalandırma hızının (v/v/m) kaskat sistemine bağlanmıştır. Biyoreaktörde her iki ortamın üretimin başlangıç pH'sı 6.8 olarak ayarlanmıştır. 24 saatlik üretim sonunda bu değer oluşan metabolitlerin de etkisi ile optimum üretim ortamında 8.42 LB ortamında ise 8.43 pH değerine yükselmiştir. LB üretim ortamında biyoreaktörde üretimin 18. saatinde çözünmüş oksijen konsantrasyonunun yükselmesi hücrelerin ölüm fazına geçtiğini göstermektedir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9:2L biyoreaktörde optimum üretim ortamının takip edilen parametreleri

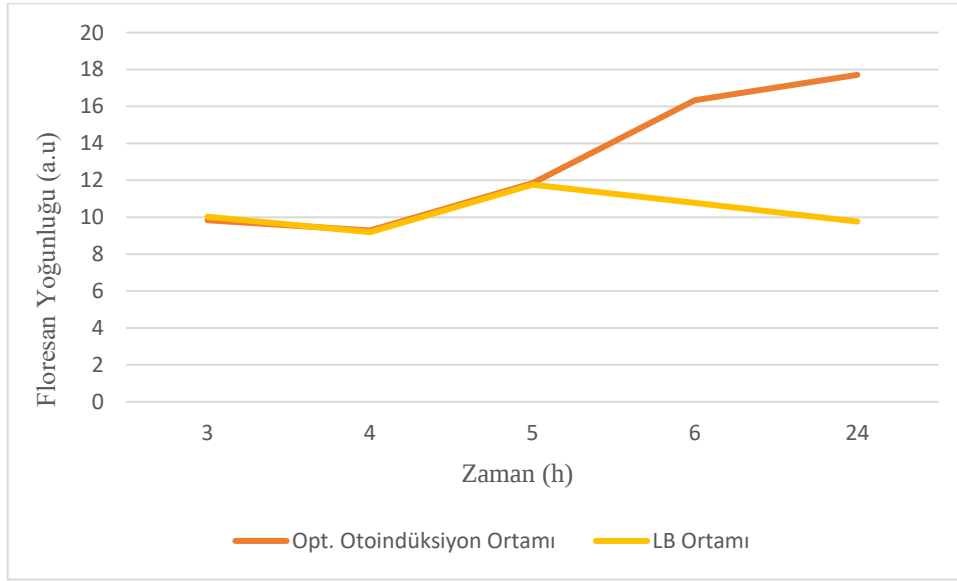
Optimum üretim ortamı kullanılarak yapılan 2L biyoreaktörde yapılan üretimde üretim parametreleri ilk deneme setinde 24 saat ikinci deneme setinde 72 saat boyunca izlenmiştir. Optimum üretim ortamında hücreler üretimin 33. saatinde çözünmüş oksijen konsantrasyonunun artması ile birlikte ölüm fazına geçtiği saptanmıştır. LB ortamında hücrelerin optimum ortama göre daha hızlı ölüm fazına geçmesinin nedenin hücrenin kullandığı karbon ve azot kaynaklarının tükenmesi ile ilişkilendirilmiştir.



Şekil 4.10:2L biyoreaktörde LB üretim ortamının takip edilen parametreleri

24 saatlik üretim sonunda optimum ortam ve LB ortamlarından alınan hücreler gerekli işlem basamakları gerçekleştirilerek Bradford yöntemi ile toplam protein miktarları ölçülmüştür. Toplam protein miktarı ölçümü için her iki ortamda da iki tekrarlı üretimler yapılmıştır. Biyoreaktör üretimlerinde Bradford yöntemi sonucu optimum ortamda 2,21 mg/ml konsantrasyonunda protein üretildiği LB ortamında ise 1,92 mg/ml konsantrasyonunda protein üretildiği hesaplanmıştır. Çalkalamalı kültür üretimleri ile biyoreaktör üretimlerinden elde edilen toplam protein (mg/ml) sonuçları karşılaştırıldığından LB ortamında çalkalama kültür üretiminde 0,62 mg/ml protein biyoreaktör üretiminde 1,92 mg/ml konsantrasyonunda protein elde edilmesi %130'luk bir artışa saptanmıştır. Optimum üretim ortamı için ise bu artış çalkalama kültür üretimlerinde 1,21 mg/ml biyoreaktörde ise 2,21 mg/ml protein konsantrasyon değerleri ile %45,2 olarak hesaplanmıştır. Ölçek büyütme çalışmasında daha fazla hücre yoğunluğuna ve protein konsantrasyonuna ulaşmasının reaktörde çalkalamalı kültür üretimlerine göre gaz-sıvı kütle transfer veriminin yüksek olması dolayısıyla çözünmüş oksijen ve besinlerin reaktörde eşit dağılımından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Biyoreaktörde optimum üretim ortamında ve LB üretim ortamından 37°C sıcaklıkta üretim başlatılmıştır. Hücre yoğunluğu OD600nm'de 0.4-0.6 aralığına ulaştığında sıcaklık her iki ortamda da 25°C'ye düşürülmüştür. LB üretim ortamına IPTG ile indükleme yapılmıştır. Sıcaklık düşürüldükten sonraki 1., 2., 3., 4., ve 24. saat örnekleri alınmıştır. Örnekler OD600nm 0.5 değerine ulaşana kadar gerekli seyreltmeler yapılmıştır ve biyokütlenin floresan yoğunluğu ölçülmüştür. Şekil 4.11'de gösterildiği gibi optimum üretim LB üretim ortamına göre floresan yoğunluğunda % 44,8'lik bir artış olduğu hesaplanmıştır.



Şekil 4.11: Biyoreaktörde zamana karşı floresan yoğunluğu grafiği

Biyoreaktörde üretimi tamamlanan hücrelerin 24. saat görüntüleri Şekil 4.12’de sunulmuştur.



I



II

Şekil 4.12: Biyoreaktörde üretimlerin 24. saat görüntüleri (I: Opt. Otoindüksiyon ortamı
II: LB ortamı)

5. TARTIŞMA

GFP proteinin *E. coli*'de rekombinant üretimlerine yönelik gerçekleştirilen deney tasarımı üretim ortamı koşullarının hücre konsantrasyonu floresan protein yoğunluğu üzerine etkisi araştırılmıştır ve tespit edilen en uygun koşulda maliyeti düşürmeye yönelik bir optimizasyon çalışması gerçekleştirilmiştir. En yüksek hücre konsantrasyonuna (OD) 2,68 değeri ile ticari olarak üretimi FORMEDIUM tarafından yapılan C ortamında ulaşılmıştır. C ortamında 35 g/L tripton ve 20 g/L maya ekstraktı bulunmaktadır. Hücre konsantrasyonu (OD) 2.37 olan LB ortamında ise 10 g/L tripton ve 5 g/L maya ekstraktı bulunmaktadır. C ortamı ile LB ortamı karşılaştırıldığında ortamdaki azot kaynaklarının konsantrasyonunun (tripton ve maya ekstraktı) hücre yoğunluğunu doğrudan etkilediği düşünülmektedir. Üretim ortamları birbirlerine göre hücre yoğunlukları bakımından kıyaslandığında sırasıyla en yüksek; C, B, LB, A ortamlarında hücre yoğunlukları OD 600nm'de 2.68, 2.46, 2.37, 2.07 şeklinde elde edilmiştir. A ve B ortamı içeriği bakımında aynı makro elementleri içermektedir. Birbirleri arasındaki tek fark A ortamı B ortamında bulunan iz elementlerini içermemektedir. Dolayısıyla üretimdeki makro elementlerin aynı olduğu koşullarda iz elementlerin hücre yoğunluğuna etki ettiği saptanmıştır. Demir (Fe), çinko (Zn), bakır (Cu), manganez (Mn), kobalt (Co), nikel (Ni) ve molibden (Mo) gibi iz elementleri, üretim ortamında bakterilerin çeşitli fizyolojik ve biyokimyasal süreçleri etkilemektedirler (Folsom, et. al 2015). Costa et. al. yapmış olduğu çalışmada farklı konsantrasyonlardaki eser element çözeltisinin *Granulicella* cinsine ait iki asidobakteri suşunun (5B5 ve WH15) büyümesi üzerindeki etkisini değerlendirmiştir. Mn^{2+} ile zenginleştirilen üretim ortamı Fe^{2+} , Zn^{2+} , BO_3^{3-} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , MoO_4^{2-} iyonlarını içeren diğer yedi metal tuzu bulunan üretim ortamı ile karşılaştırıldığında en yüksek hücre konsantrasyonuna Mn^{2+} ilave edilmiş üretim ortamında ulaşılmıştır ve yapılan proteomik analizlerle de ortamdaki Mn^{2+} 'nin enzimatik aktiviteyi arttırmada önemli olduğunu sonucuna ulaşılmıştır (Costa et. al., 2020).

Bulgular bölümünde sunulan OD 600 nm'de hücre yoğunluğu (Şekil 4.1) ve floresan protein yoğunluğu (Şekil 4.2) değerleri arasında R^2 değeri 0.71 olan bir korelasyon saptanmıştır. Yoshida et. al. yapmış olduğu çalışmada *E. coli*'de GFP

ekspresyonunu arttırmaya yönelik sentetik kültür ortamı geliştirmek amacıyla derin sinir ağları ve Bayesian optimizasyonu kullanılarak 31 farklı üretim ortam bileşeni değerlendirilmiştir ve 81 farklı kültür ortamı geliştirilmiştir. Hücre konsantrasyonunun artması ile floresan yoğunluğunun artması arasında R^2 değeri 0.74 olan bir korelasyon ortaya konmuştur (Yoshida, et. al., 2024). Bu tez çalışması kapsamında elde edilen bulgular Yoshida et. al. çalışmasının bulguları ile paralellik göstermektedir. Tez çalışması kapsamında, C ve LB ortamında hücrelerin floresan ışımaya miktarlarının, toplam hücre yoğunluğu ile normalize edilerek karşılaştırılması yapılmıştır. İki farklı deney sonucu incelenmiştir: İlk durumda C ortamında 477.53 a.u. floresan yoğunluğu ve 2.69 hücre yoğunluğu, LB ortamında ise 163.55 b a.u. floresan yoğunluğu ışımaya ve 2.0 hücre yoğunluğu ölçülmüştür. Her hücre başına düşen ışımaya oranları $\text{Oran} = \frac{\text{Floresan yoğunluğu}}{\text{OD600nm hücre yoğunluğu}}$ şeklinde hesaplanmıştır. C ortamında hücre başına düşen ortalama ışımaya miktarı yaklaşık 177.56 birim olarak bulunmuştur. LB ortamında ise hücre başına düşen ortalama ışımaya miktarı 81.78 birim olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar, C ortamındaki hücrelerin daha yüksek bir floresan verimliliğine sahip olduğunu göstermektedir. Hücre başına düşen ışımaya oranı, C ortamında LB ortamına göre yaklaşık iki kat daha yüksektir. Bu farklılık, ortam kompozisyonundan kaynaklanıyor olabilir.

Literatürdeki farklı üretim ortamlarının hücre konsantrasyonu ve hücre konsantrasyonuna bağlı floresan yoğunluğu açısından değerlendirildiğinde GFP üretimi için en uygun üretim ortamı kompozisyonu C ortamında tespit edilmiştir. Üretimde C ortamının maliyetini düşürerek mevcut üretim ortamlarına göre daha ekonomik üretim ortamı oluşturmak amacıyla Design Expert İstatistik Yazılımı ile ortam bileşiminin %75'ini oluşturan tripton ve maya ekstraktı konsantrasyonlarını azaltmaya yönelik bir optimizasyon çalışması gerçekleştirilmiştir. Deneysel tasarım istatistiksel olarak değerlendirildiğinde floresan yoğunluğuna ait p- değeri 0,0003 ve R^2 0,94 değeri ile OD600nm'de hücre yoğunluğuna ait ise p-değeri 0,0005 ve R^2 0,93 ile istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmiştir. Deneysel tasarımda 0,91 doğrulukla öngörülen optimizasyon verileri valide edilmiştir ve sonuçta tripton konsantrasyonu %33,6 oranında azaltılmıştır. Tripton konsantrasyonundaki bu azalış ile üretim ortam maliyetleri düşürülmüştür.

Bu tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen optimizasyon çalışmasında tripton (10g/L) ve maya ekstraktın (5 g/L) minimum konsantrasyonları OD600nm’ de hücre konsantrasyonu OD 2.35 değeri ve floresans yoğunluğunu 163.6 a.u değeri ile en düşük sonucu vermiştir. Bu sonuç yüksek verimde GFP üretimi için tasarlanan otoindüksiyon ortamında maya ekstraktı bulunmasının kritik öneme sahip olduğunu ortaya koymuştur. Seiga Tachibana et. al. yapmış olduğu çalışmada farklı maya ekstraktı konsantrasyonlarının, *E.coli*’nin hücre konsantrasyonunu arttırması ve yeşil floresan proteini (GFP) üretimi üzerindeki etkilerini incelendiğinde ortam içeriğinde maya ekstraktının konsantrasyonunun GFP üretimi üzerine arttırıcı yönde etkili olduğu ortaya konulmuştur. Seiga Tachibana ver et. al. yapmış olduğu bu çalışmada maya ekstraktı içeren ortamdaki biyokütle konsantrasyonu maya ekstraktı içermeyen kontrol örnekleri ile karşılaştırıldığında 3 ila 5 kat arasından, GFP verimleri ise 1,5 ila 2 kat arasından daha yüksek bulunduğu bildirilmiştir. (Tachibana, S., 2021).

Bu tez çalışması kapsamında GFP üretimi için optimize edilen otoindüksiyon üretim ortamında protein konsantrasyonu 1,21 mg/ml olarak saptanmıştır. Kontrol amaçlı üretilen ve IPTG ile indüklemesi gerçekleştirilen LB ortamında ise bu değer 0,62 mg/ml protein konsantrasyonudur. Optimize edilen otoindüksiyon ortamından elde edilen protein konsantrasyonu IPTG indüklemesi gerçekleştirilen LB ortamında elde edilen protein konsantrasyonu ile karşılaştırıldığında 2 katı fazla konsantrasyonda GFP proteini üretimi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bu sonuç William Studier’in IPTG kullanılarak standart indüksiyon yöntemi ile gerçekleştirilen GFP proteini üretimi ile otoindüksiyon ortamında gerçekleştirilen üretim karşılaştırıldığında otoindüksiyon ortamında kültür hacmi başına genellikle daha yüksek düzeyde GFP proteini üretildiği sonucu ile benzerlik göstermektedir (Studier, 2014).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

GFP üretimine yönelik literatürde var olan üretim ortam kompozisyonları değerlendirildiğinde hücre optik yoğunluğu ve floresan yoğunluğu arasında doğrusal bir ilişki olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Aynı zamanda üretim ortamları içerikleri açısından değerlendirildiğinde maya ekstraktı ve tripton konsantrasyonu ve iz element içerip içermemesi üretimde ortam bileşim kompozisyonu oluşturulurken dikkate alınması gereken besin maddeleri olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Bu nedenle *E. coli*'de GFP protein üretimi için bu besin maddelerinin konsantrasyonları değerlendirilmesi gereken bir unsurdur.

Deneysel tasarımda optimizasyon sonuçları valide edilmiştir ve üretimde başlangıç ortamına göre tripton konsantrasyonu %33,4 oranında azaltılarak çalışmanın hedefi olan daha ekonomik bir üretim ortam kompozisyonu elde edilmiştir. Gelecekteki çalışmalarda bu yeni ortam kompozisyonu ile karıştırma hızı, havalandırma hızı gibi parametreler üzerinden yeni bir optimizasyon çalışması geliştirilip üretimde iyileştirmeler yapılabilir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Ansari, A. M., Ahmed, A. K., Matsangos, A. E., Lay, F., Born, L. J., Marti, G., ... & Sun, Z.** (2016). Cellular GFP toxicity and immunogenicity: potential confounders in in vivo cell tracking experiments. *Stem cell reviews and reports*, 12, 553-559.
- Bilal, A. Mir, et al.** "Bioinformatic Techniques on Marine Genomics." Springer Handbook of Marine Biotechnology (2015): 295-306.
- Cai, L., Li, H., Yu, X., Wu, L., Wei, X., James, T. D., & Huang, C.** (2021). Green fluorescent protein GFP-chromophore-based probe for the detection of mitochondrial viscosity in living cells. *ACS Applied Bio Materials*, 4(3), 2128-2134.
- Chalfie, Martin, et al.** "Green fluorescent protein as a marker for gene expression." *Science* 263.5148 (1994): 802-805.
- Chan, K. Y., Kwong, Y. H. H., & Szeto, D. M.** (2022). Green fluorescent protein: its development, protein engineering, and applications in protein research. *Journal of Young Investigators*, 25(3).
- Chew, Few Ne, et al.** "Statistical optimization of green fluorescent protein production from Escherichia coli BL21 (DE3)." *Preparative Biochemistry and Biotechnology* 42.6 (2012): 535-550.
- Chin, D. P., Shiratori, I., Shimizu, A., Kato, K., Mii, M., & Waga, I.** (2018). Generation of brilliant green fluorescent petunia plants by using a new and potent fluorescent protein transgene. *Scientific Reports*, 8(1), 16556.
- Chudakov, D. M., Matz, M. V., Lukyanov, S., & Lukyanov, K. A.** (2010). Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues. *Physiological reviews*, 90(3), 1103-1163.
- Cieri, D., Vicario, M., Giacomello, M., Vallese, F., Filadi, R., Wagner, T., ... & Cali, T.** (2018). SPLICS: a split green fluorescent protein-based contact site sensor for narrow and wide heterotypic organelle juxtaposition. *Cell Death & Differentiation*, 25(6), 1131-1145.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Craggs, T. D.** (2009). Green fluorescent protein: structure, folding and chromophore maturation. *Chemical Society Reviews*, 38(10), 2865-2875.
- DeBlasio, Stacy L., Anne W. Sylvester, and David Jackson.** "Illuminating plant biology: using fluorescent proteins for high-throughput analysis of protein localization and function in plants." *Briefings in functional genomics* 9.2 (2010): 129-138.
- Eskandari, Azadeh, et al.** "Essential factors, advanced strategies, challenges, and approaches involved for efficient expression of recombinant proteins in *Escherichia coli*." *Archives of microbiology* 206.4 (2024): 152.
- Ferreira, J. R., Esteves, C. I., Marques, M. M. B., & Guieu, S.** (2022). Locking the GFP Fluorophore to Enhance Its Emission Intensity. *Molecules*, 28(1), 234.
- Guo, F., Zheng, H., Cheng, Y., Song, S., Zheng, Z., & Jia, S.** (2018). Medium optimization for ϵ -poly-L-lysine production by *Streptomyces diastatochromogenes* using response surface methodology. *Letters in applied microbiology*, 66(2), 124-131.
- Hajji, M., Rebai, A., Gharsallah, N., & Nasri, M.** (2008). Optimization of alkaline protease production by *Aspergillus clavatus* ES1 in *Mirabilis jalapa* tuber powder using statistical experimental design. *Applied microbiology and biotechnology*, 79, 915-923.
- Heim, Roger, Andrew B. Cubitt, and Roger Y. Tsien.** "Improved green fluorescence." *Nature* 373.6516 (1995): 663-664.
- Isakova, Alina, et al.** "Application of an Autoinduction Strategy to Optimize the Heterologous Production of an Antitumor Bispecific Fusion Protein Based on the TRAIL Receptor-Selective Mutant Variant in *Escherichia coli*." *Molecular Biotechnology* 65.4 (2023): 581-589.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Kamiyama, D., Sekine, S., Barsi-Rhyne, B., Hu, J., Chen, B., Gilbert, L. A., ... & Huang, B.** (2016). Versatile protein tagging in cells with split fluorescent protein. *Nature communications*, 7(1), 11046.
- Kermani, A. A.** (2023). Applications of fluorescent protein tagging in structural studies of membrane proteins. *The FEBS Journal*.
- Kong, Jia, et al.** "Green fluorescent protein inspired fluorophores." *Advances in Colloid and interface Science* 285 (2020): 102286.
- Kubala, M. H., Kovtun, O., Alexandrov, K., & Collins, B. M.** (2010). Structural and thermodynamic analysis of the GFP: GFP-nanobody complex. *Protein Science*, 19(12), 2389-2401.
- Lahoz, F., Martín, I. R., Walo, D., Freire, R., Gil-Rostra, J., Yubero, F., & Gonzalez-Elise, A. R.** (2017). Enhanced green fluorescent protein in optofluidic Fabry-Perot microcavity to detect laser induced temperature changes in a bacterial culture. *Applied Physics Letters*, 111(11).
- Li HY, Chye ML.** Use of GFP to investigate expression of plant-derived vaccines. *Methods Mol Biol.* 2009;515:275-85. doi: 10.1007/978-1-59745-559-6_19. PMID: 19378126; PMCID: PMC7120478.
- Liu, S. S., Wei, X., Dong, X., Xu, L., Liu, J., & Jiang, B.** (2015). Structural plasticity of green fluorescent protein to amino acid deletions and fluorescence rescue by folding-enhancing mutations. *BMC biochemistry*, 16, 1-11.
- Lopes, Camila, et al.** "Improving the cost effectiveness of enhanced green fluorescent protein production using recombinant Escherichia coli BL21 (DE3): Decreasing the expression inducer concentration." *Biotechnology and Applied Biochemistry* 66.4 (2019): 527-536.
- Marschall, Lukas, Patrick Sagmeister, and Christoph Herwig.** "Tunable recombinant protein expression in E. coli: promoter systems and genetic constraints." *Applied microbiology and biotechnology* 101 (2017): 501-512.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Mostovenko, Ekaterina, André M. Deelder, and Magnus Palmblad.** "Protein expression dynamics during *Escherichia coli* glucose-lactose diauxie." *BMC microbiology* 11 (2011): 1-6.
- Nam, Ki Hyun.** "Fluorescent Protein-Based Metal Biosensors." *Chemosensors* 11.4 (2023): 216.
- Nandakumar, M., Malathi, P., Sundar, A. R., & Viswanathan, R.** (2020). Use of green fluorescent protein expressing *Colletotrichum falcatum*, the red rot pathogen for precise host–pathogen interaction studies in sugarcane. *Sugar Tech*, 22, 112-121.
- Nezhad, Marzieh Rashnavadi, et al.** "Robust and comprehensive predictive models for methane hydrate formation condition in the presence of brines using black-box and white-box intelligent techniques." *International Journal of Hydrogen Energy* 77 (2024): 612-624.
- Ow, Dave Siak-Wei, et al.** "Technological Advances Improving Recombinant Protein Production in Bacteria." *Frontiers in Microbiology* 12 (2021): 729472.
- Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G., & Cormier, M. J.** (1992). Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*, 111(2), 229-233.
- Reza, Arif, Lide Chen, and Xinwei Mao.** "Response surface methodology for process optimization in livestock wastewater treatment: A review." *Heliyon* (2024).
- Santos, Sara PO, et al.** "Engineering an optimized expression operating unit for improved recombinant protein production in *Escherichia coli*." *Protein Expression and Purification* 199 (2022): 106150.
- Scott, Spencer R., et al.** "A stabilized microbial ecosystem of self-limiting bacteria using synthetic quorum-regulated lysis." *Nature microbiology* 2.8 (2017): 1-9.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Sen, Ashish, and Muni Srivastava.** Regression analysis: theory, methods, and applications. Springer Science & Business Media, 2012.
- Shimomura, O., Johnson, F. H., & Saiga, Y.** (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea. *Journal of cellular and comparative physiology*, 59(3), 223-239.
- Sindarovska, Y., & Kuchuk, M.** (2023). Viral-based expression cassettes ensure high level production of recombinant green fluorescent protein (GFP) in sweet basil (*Ocimum basilicum*) plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 154(1), 121-130.
- Soleja, Neha, et al.** "Role of green fluorescent proteins and their variants in development of FRET-based sensors." *Journal of biosciences* 43 (2018): 763-784.
- Streather, Bree R., et al.** "Author Spotlight: The Production of Recombinant Proteins." *JoVE (Journal of Visualized Experiments)* 196 (2023): e65442.
- Studier, F. William.** "T7 expression systems for inducible production of proteins from cloned genes in *E. coli*." *Current Protocols in Molecular Biology* 124.1 (2018): e63.
- Studier, F. William.** "Stable expression clones and auto-induction for protein production in *E. coli*." *Structural genomics: general applications* (2014): 17-32.
- Subramaniam, R., Thirumal, V., Chistoserdov, A., Bajpai, R., Bader, J., & Popovic, M.** (2018). High-density cultivation in the production of microbial products. *Chemical and biochemical engineering quarterly*, 32(4), 451-464.
- Svendsen, A., Kiefer, H. V., Pedersen, H. B., Bochenkova, A. V., & Andersen, L. H.** (2017). Origin of the intrinsic fluorescence of the green fluorescent protein. *Journal of the American Chemical Society*, 139(25), 8766-8771.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Tian, F., Xu, G., Zhou, S., Chen, S., & He, D.** (2023). Principles and applications of green fluorescent protein-based biosensors: a mini-review. *Analyst*, 148(13), 2882-2891.
- Torres-Acosta, Mario A., et al.** "Economic analysis of the production and recovery of green fluorescent protein using ATPS-based bioprocesses." *Separation and Purification Technology* 254 (2021): 117595.
- Tsien, Roger Y.** "The green fluorescent protein." *Annual review of biochemistry* 67.1 (1998): 509-544.
- Wahhab, Hamad I. Al Abdul, Waqas Rafiq, and Mohammed Khaliludin.** "Modeling and design optimization of dense graded modified crumb rubber asphalt mixtures using response surface methodology." *Construction and Building Materials* 435 (2024): 136895.
- Wymelenberg, A. V., Cullen, D., Spear, R. N., Schoenike, B., & Andrews, J. H.** (2018). Expression of green fluorescent protein in *Aureobasidium pullulans* and quantification of the fungus on leaf surfaces. *Biotechniques*, 23(4).
- Xu, Jianlin, et al.** "Galactose can be an inducer for production of therapeutic proteins by auto-induction using *E. coli* BL21 strains." *Protein expression and purification* 83.1 (2012): 30-36.
- Folsom, James Patrick, and Ross P. Carlson.** "Physiological, biomass elemental composition and proteomic analyses of *Escherichia coli* ammonium-limited chemostat growth, and comparison with iron-and glucose-limited chemostat growth." *Microbiology* 161.8 (2015): 1659-1670.
- Costa, Ohana YA, et al.** "Impact of different trace elements on the growth and proteome of two strains of *Granulicella*, class "Acidobacteriia". *Frontiers in Microbiology* 11 (2020): 1227.
- Tachibana, Seiga, Tai-Ying Chiou, and Masaaki Konishi.** "Machine learning modeling of the effects of media formulated with various yeast extracts on heterologous protein production in *Escherichia coli*." *MicrobiologyOpen* 10.3 (2021): e1214.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmalarında bana her zaman yol gösteren, desteklerini ve emeklerini esirgmeden her zaman beni teşvik eden değerli danışman hocam Prof. Dr. Gaye Öngen Özgen' e saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamda karşılaştığım sorunlara farklı bir bakış açısıyla yaklaşmamı sağlayıp ufku genişleterek çözmeme yardımcı olan ikinci danışman hocam Prof. Dr. Serap Evran'a saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamda benimle laboratuvar deneyimlerini paylaşarak tezimin deneysel süreçlerinde benden desteklerini esirgemeyen Dr. Ahmet Düzel'e teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin her aşamasında gerekli teknik desteği sağlayan E.Ü. Biyokimya Bölümü, Prof. Dr. Serap Evran Laboratuvar Ekibine teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans tezimin uygulamalarını kolaylıkla yapabilmeme altyapı oluşturan E.Ü. Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü'ne teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak hayatımın tüm aşamasından benden sevgi, saygı ve desteklerini esirgemeyen başta sevgili annem Belgin Kaboğlu olmak üzere, aileme bana verdiği destekler için sonsuz teşekkür ve minnetlerimi sunarım

ÖZGEÇMİŞ

Ebru Kaboğlu 2014 yılında Nevvar Salih İşören Anadolu Lisesinden mezun oldu. 2014 yılında Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümünü kazandı ve 2019 yılında mezun oldu. 2021-2022 yılları arasında Duru Yeşil Gübre Üretim San. Ltd. Şti.'de Ar-Ge mühendisi pozisyonunda çalıştı. 2021 yılında Ege Üniversitesi Biyomühendislik Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. Bu tez çalışması kapsamında poster bildirisi VIII. Ulusal Biyomühendislik Kongresi “Biyomühendislik Uygulamaları”nda “Rekombinant Floresan Protein Üretimi” başlığı ile sunulmuştur.

