



**T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
HAMİDİYE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**OLİGOTROFİK BAKTERİLER
YARDIMIYLA DÜŞÜK MALİYETLİ
REKOMBİNANT TERMOSTABİL ENZİM
ÜRETİMİ**

MUSTAFA TANKUŞ

**TEZ DANIŞMANI
DR. ÖĞR. ÜYESİ AHMET KATI**

**BİYOTEKNOLOJİ ANA BİLİM DALI
BİYOTEKNOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
ŞUBAT/2024**

İTHAF

Bu tezi değerli anneme, babama ve abime ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının planlanması, şekillenmesi ve sonuçlanmasında desteğini her zaman gösteren tez danışmanım sayın hocam Dr. Öğr. Üyesi Ahmet KATI'ya,

Hayatım boyunca aldığım kararları destekleyerek, maddi manevi arkamda duran ve bana güvenen canım ailem; babam Ersin TANKUŞ, annem Hatice TANKUŞ ve abim Ahmet TANKUŞ'a,

Lisans ve lisansüstü sürecimin çoğunda yanımda olan Miray KARAMEŞE'ye,

Laboratuvardaki çalışma arkadaşlarım Gamze BALCI, Caner ERÇİN ve İrem ALTUNTAŞ'a,

Tez çalışmalarımda yol gösterici değerli fikirleri ve malzemeler konusunda yardımcı olan Doç. Dr. Huri BULUT, Dr. Öğr. Üyesi Emrah EROĞLU, Doç. Dr. Sevde ALTUNTAŞ, Dr. Ersin KARATAŞ ve Melike SEÇİLMİŞ'e,

Teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

İTHAF.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar LİSTESİ.....	viii
RESİMLER LİSTESİ	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
ÖZET	xiii
ABSTRACT.....	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. OLİGOTROFİK BAKTERİLER.....	2
2.1.1. Oligotrofik Bakteriler	2
2.1.2. Oligotrofik Bakterilerin Özellikleri	4
2.2. REKOMBİNANT ENZİMLER.....	7
2.2.1. Rekombinant Enzim Üretimi	8
2.2.3. Termostabil Enzimler	11
2.2.4. Termostabil Enzim Üretimi	12
2.2.5. Termostabil Enzimlerin Önemi	13
2.3. <i>TAQ</i> DNA POLİMERAZ	13
2.3.1. <i>Taq</i> DNA Polimeraz Moleküler Yapısı	14
2.3.2. Tedavisinde <i>Taq</i> DNA Polimeraz Kullanılan Hastalıklar	14
2.3.3. Piyasadaki <i>Taq</i> DNA Polimeraz Üreticileri.....	15
2.3.4. <i>Taq</i> DNA Polimeraz Pazarı	15
2.4. FERMANTASYON TEKNOLOJİSİ	15
2.4.1. Fermantasyon Teknolojisinin Önemi.....	16
2.4.2. Fermantasyon Ortamının Optimizasyonu	17
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	20
3.1. MATERYAL	20
3.2. METOT.....	21
3.2.1. Oligotrofik Bakteri Seçimi ve Tanımlanması	21
3.2.1.1. Oligotrofik bakteri seçilmesi	21
3.2.1.2. Oligotrofik bakterinin filogenetik olarak tanımlanması:	21
3.2.1.3. Oligotrofik bakterinin fenotipik olarak tanımlanması:	21

3.2.2. Plazmit Transformasyonu	22
3.2.2.1. Plazmit izolasyonu	22
3.2.2.2. Kompetent oligotrofik bakterinin hazırlanması	23
3.2.2.3. Transformasyon koşulları	24
3.2.3 Oligotrofik Bakteride <i>Taq</i> DNA Polimeraz Ekspresyonu	24
3.2.4. <i>Taq</i> DNA Polimeraz Saflaştırılması ve Tanımlanması.....	24
3.2.4.1. <i>Taq</i> DNA saflaştırılması	24
3.2.4.2. SDS-PAGE	25
3.2.5 <i>Taq</i> DNA Polimeraz Aktivitesi.....	25
3.2.6 Ölçek Büyütme Çalışmaları.....	26
4. BULGULAR.....	27
4.1. OLİGOTROFİK BAKTERİ SEÇİMİ VE TANIMLANMASI.....	27
4.1.1. Oligotrofik Bakteri Seçilmesi	27
4.1.2. Oligotrofik Bakterinin Filogenetik Olarak Tanımlanması.....	27
4.1.3. Oligotrofik Bakterinin Fenotipik Olarak Tanımlanması	29
4.1.4. Oligotrofik Bakterinin Büyüme Yeteneğinin Araştırılması.....	30
4.2. TRANSFORMASYONUN DOĞRULANMASI	33
4.3. <i>TAQ</i> DNA POLİMERAZ EKSPRESYONUNUN SDS-PAGE ile DOĞRULANMASI	35
4.4. <i>TAQ</i> DNA POLİMERAZ AKTİVİTESİ	37
4.5. ÖLÇEK BÜYÜTME ÇALIŞMALARI	43
5. TARTIŞMA	50
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	54
KAYNAKLAR	55
EKLER.....	59

TABLolar LİSTESİ

Tablo 4.1: Seçilen oligotrofik bakterinin NCBI veritabanı ile filogenetik olarak karşılaştırılması.....	28
Tablo 4.2: Oligotrofik <i>K.oxytoca</i> 'nın biyokimyasal test sonuçları.....	29
Tablo 4.3: Kalıp DNA olarak bakteriyel genomik DNA ile kurulan PCR ürünlerinin Resim 4.5'deki agaroz jel içerikleri	39
Tablo 4.4: Laboratuvarda üretilen PCR tamponuyla pozitif sonuç alınan Resim 4.6'daki agaroz jeldeki PCR ürünlerinin içerikleri	41
Tablo 4.5: Ticari PCR tamponuyla pozitif sonuç alınan Resim 4.7'deki agaroz jeldeki PCR ürünlerinin içerikleri	43
Tablo 4.6: Şekil 4.13'deki örneklerin elde edildiği biyoreaktörlerde çalışılan bakteri, sıcaklık ve LB değişkenleri.....	46
Tablo 4.7: Ölçek büyütme çalışmalarında Resim 4.9'daki PCR içerikleri ve agaroz jel sıralaması	48

RESİMLER LİSTESİ

Resim 4.1: İzole edilen plazmitlerin agaroz jel görüntüsü.....	34
Resim 4.2: <i>E.coli</i> BL21 zamana bağlı olarak alınan SDS-PAGE görüntüsü.....	35
Resim 4.3: Transforme oligotrofik <i>Klebsiella oxytoca</i> 'nın zamana bağlı olarak alınan SDS-PAGE görüntüsü.....	36
Resim 4.4: <i>E.coli</i> BL21 ve oligotrofik <i>K.oxytoca</i> 'nın SDS-PAGE görüntüsü.	37
Resim 4.5: Tez kapsamında elde edilen <i>Taq</i> DNA polimerazlar ile kurulan PCR ürünlerinin agaroz jelde meydana gelen leke görüntüsü..	38
Resim 4.6: Tez kapsamında üretilen <i>Taq</i> DNA polimerazlar ile laboratuvarında üretilmiş PCR tamponu ile kurulmuş PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü..	40
Resim 4.7: Tez kapsamında üretilen <i>Taq</i> DNA polimerazlar ile ticari PCR tamponu ile kurulmuş PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.	42
Resim 4.8: Ölçek büyütme çalışmaları kapsamında; <i>E.coli</i> BL21 ve oligotrofik <i>K.oxytoca</i> 'nın farklı sıcaklıklar ve farklı LB konsantrasyonlarından elde edilen süpernatantların SDS-PAGE görüntüsü.....	45
Resim 4.9: Ölçek büyütme operasyonlarında <i>E.coli</i> BL21 ve oligotrofik <i>K.oxytoca</i> 'nın farklı sıcaklıklar ve farklı LB konsantrasyonlarından elde edilen süpernatantlar ile kurulan PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.....	47

ŞEKİLLER LİSTESİ

- Şekil 2.1:** Oligotrofik bakterilerin yaşam alanları (biorender.com kullanılarak çizilmiştir.) 3
- Şekil 2.2:** Oligotrofik ortamda meydana gelen değişimler (biorender.com kullanılarak çizilmiştir.)..... 6
- Şekil 2.3:** Rekombinant enzimlerin avantajları (biorender.com kullanılarak çizilmiştir.).... 8
- Şekil 2.4:** Rekombinant enzim üretimi (biorender.com kullanılarak çizilmiştir.)..... 9
- Şekil 2.5:** Termostabil enzimlerin avantajları (biorender.com kullanılarak çizilmiştir.) 12
- Şekil 4.1:** 8 numaralı koloninin standart ve seyrek agarlarda büyüme yeteneği 27
- Şekil 4.2:** 37 °C’de oligotrofik *K. oxytoca*’nın farklı besiyeri konsantrasyonlarında OD₆₀₀ değerleri 31
- Şekil 4.3:** 37 °C’de oligotrofik *K. oxytoca*’nın farklı besiyeri konsantrasyonlarında CFU/mL değerleri 31
- Şekil 4.4:** Oda sıcaklığında *E.coli* BL21 ve oligotrofik *K. oxytoca*’nın OD₆₀₀ değerleri.... 32
- Şekil 4.5:** Oda sıcaklığında *E.coli* BL21 ve oligotrofik *K. oxytoca*’nın CFU/mL değerleri 32
- Şekil 4.6:** Biyoreaktör ortamında OD büyüme eğrisi 44
- Şekil 4.7:** Biyoreaktör ortamında CFU/mL büyüme eğrisi 45
- Şekil 4.4:** Oda sıcaklığında *E.coli* BL21 ve oligotrofik *K.oxytoca*’nın OD600 değerleri... 32
- Şekil 4.5:** Oda sıcaklığında *E.coli* BL21 ve oligotrofik *K.oxytoca*’nın CFU/mL değerleri 33

SİMGELER VE KISALTMALAR

APS	: Amonyum Persülfat
bp	: Baz Çifti
<i>B.subtilis</i>	: <i>Bacillus subtilis</i>
CFU	: Koloni Oluşturan Birim
cm	: Santimetre
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	: Deoksiribo Nükleotid Trifosfat
<i>E.coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
EDTA	: Etilen Diamin Tetraasetik Asit
EMB	: Eozin Metilen Mavisi
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
IPTG	: İzopropil Tiyogalaktozit
iNTP	: Nükleosit Trifosfatlar
<i>K.oxytoca</i>	: <i>Klebsiella oxytoca</i>
KAH	: Küçük Alarmon Hidrolaz
KAS	: Küçük Alarmon Sentetaz
KCl	: Potasyum Klorür
kDa	: Kilodalton
kV	: Kilovolt
LB	: Luria-Bertani Besiyeri
mg	: Miligram
MgCl₂	: Magnezyum klorür
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
NCBI	: National Center for biotechnology Information

ng	: Nanogram
NP-40	: Nonidet P-40
PBS	: Fosfat Tamponlu Salin
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
ppGpp	: Guanozin 50-Difosfat 30-Difosfat
pppGpp	: Guanozin 50-Trifosfat 30-Difosfat
RNA	: Ribobükleik Asit
rpm	: Dakikada Devir Sayısı
rRNA	: Ribozomal RNA
<i>S.aureus</i>	: <i>Staphylococcus aureus</i>
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat – Poliakrilamid Jel Elektroforez
SMM	: Spizizen Minimal Medyum
<i>Taq</i>	: <i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	: Tetrametilendiamin
TGS	: Tris-Glisin-SDS
μF	: Mikrofarad
μL	: Mikrolitre
μM	: Mikrolitre

OLİGOTROFİK BAKTERİLER YARDIMIYLA DÜŞÜK MALİYETLİ REKOMBİNANT TERMOSTABİL ENZİM ÜRETİMİ

ÖZET

Amaç: Endüstride üretilen enzimlerin girdi maliyetinin büyük kısmı besiyeri kaynaklıdır. Düşük konsantrasyonlarda gelişme ve üreme yeteneği olan oligotrofik bakteriler, besiyeri maliyetini düşürmek için mükemmel bir potansiyel taşımaktadır. Endüstride *Taq* DNA polimeraz üretimi için standartlaştırılmış suşlara alternatif olarak oligotrofik bakterilerin kullanılması besiyeri maliyetlerinin azaltılmasını sağlayacaktır. Çalışma kapsamında düşük besiyeri konsantrasyonunda büyüme yeteneğine sahip oligotrofik bakteriler aracılığıyla yapılan fermantasyon sayesinde besiyeri maliyetini azaltarak termostabil *Taq* DNA polimeraz üretimi yapılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çevresel izolatlardan oligotrofik bakteri seçimi yapıldı. Seçilen organizma 16S rRNA dizilemesi ile *Klebsiella oxytoca* olarak tanımlandı. Kompetent hale getirildikten sonra satın alınan *Taq* DNA polimeraz kodlayan plazmitlerin oligotrofik *K.oxytoca*'ya transformasyonu gerçekleştirildi. İlgili enzimlerin laboratuvar koşullarında ve büyük hacimde oligotrofik bakterideki ekspresyon, saflaştırma ve aktivite deneyleri gerçekleştirilerek oligotrofik bakterinin rekombinant DNA teknolojisindeki kullanılma potansiyeli incelendi.

Bulgular: *Taq* DNA polimeraz enzimi, laboratuvar ölçeğinde standart besiyerinde, endüstriyel ölçekte standart besiyeri ve 1:10 oranında seyreltilmiş LB'de ekspresyon analizi ve iki farklı tampon çözeltisinde aktivite deneyleri gerçekleştirildi. Bu çalışmalar neticesinde *K.oxytoca* *Taq* DNA'nın eksprese edildiği, ölçek büyütme çalışmaları neticesinde biyoreaktör üretimine uygun olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada kullanılan plazmitteki *Taq* DNA polimeraz enzimi kontrol suşu olan *E.coli*'de ve *K.oxytoca*'da başarılı şekilde eksprese edilmiştir. Özellikle oligotrofik *K.oxytoca*'nın ekspresyon kabiliyeti önemli bir bulgu olarak ortaya çıkmıştır. Ancak *Taq* DNA polimeraz'ın PCR aktivitesi farklı tampon çözeltileri denenmesine rağmen *K.oxytoca*'da pozitif sonuç vermemiştir.

Sonuç: Oligotrofik bakteride eksprese edilen *Taq* DNA polimerazın ileride yapılacak çalışmalar sonucunda aktivite gösteren ve ticari açıdan verimli *Taq* DNA polimeraz üretimi sağlanabilecektir.

Anahtar Kelimeler: Besiyeri maliyeti, Fermantasyon, *Klebsiella oxytoca*, Oligotrofik bakteri, *Taq* DNA polimeraz



LOW-COST RECOMBINANT THERMOSTABLE ENZYME PRODUCTION WITH THE HELP OF OLIGOTROPHIC BACTERIA

ABSTRACT

Aim: Most of the input cost of industrially produced enzymes originates from the medium. Oligotrophic bacteria, which are capable of growing and reproducing at low concentrations, have excellent potential to reduce medium costs. Using oligotrophic bacteria as an alternative to standardized strains for *Taq* DNA polymerase production in industry will reduce medium costs. Within the scope of the study, it was aimed to produce thermostable *Taq* DNA polymerase by reducing the cost of the medium through fermentation by oligotrophic bacteria capable of growing in low medium concentration.

Materials and Methods: Oligotrophic bacteria were selected from environmental isolates. The selected organism was identified as *Klebsiella oxytoca* by 16S rRNA sequencing. After becoming competent, the purchased *Taq* DNA polymerase-encoding plasmids were transformed into oligotrophic *K.oxytoca*. Expression, purification and activity experiments of the relevant enzymes in laboratory conditions and in scale-up of oligotrophic bacteria were carried out to examine the potential of oligotrophic bacteria to be used in recombinant DNA technology.

Results: Expression analysis of *Taq* DNA polymerase enzyme was carried out in standard medium on a laboratory scale, in standard medium on an industrial scale and in LB diluted at a ratio of 1:10, and activity experiments were carried out in two different buffer solutions. As a result of these studies, it was determined that *K.oxytoca* *Taq* DNA was expressed and was suitable for bioreactor production as a result of scale-up studies. The *Taq* DNA polymerase enzyme in the plasmid used in the study was successfully expressed in the control strain *E.coli* and *K.oxytoca*. In particular, the expression ability of oligotrophic *K.oxytoca* emerged as an important finding. However, the PCR activity of *Taq* DNA polymerase did not give positive results in *K.oxytoca* despite trying different buffer solutions.

Conclusion: As a result of future studies of *Taq* DNA polymerase expressed in oligotrophic bacteria, active and commercially efficient *Taq* DNA polymerase production will be possible.

Key Words: Fermentation, *Klebsiella oxytoca*, Medium cost, Oligotrophic bacteria, *Taq* DNA Polymerase



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Besiyeri maliyeti, fermantasyon maliyetinin yaklaşık %30'unu oluşturmaktadır. Fermantasyon sonucu üretilen biyoteknolojik ürünler için bakterilerin kullandığı besiyeri, ürün verimliliği açısından kritik önem taşımaktadır. Aynı durum *Taq* DNA polimeraz üretimi için de geçerlidir. Büyük ölçüde standart suş olan *Escherichia coli* BL21 ile üretilen *Taq* DNA polimerazın çok büyük bir pazar olduğu düşünüldüğünde, üretiminde kullanılan besiyeri maliyetinin önemi de artmaktadır. Bu noktada oligotrofik bakteriler, besinin çok kısıtlı bulunduğu ortamlarda bile verimli bir şekilde üreme ve gelişme yeteneğine sahip olmalarıyla iyi bir alternatif olarak öne çıkmaktadır. Bu bakterilerin düşük konsantrasyondaki besiyeri ihtiyacı sayesinde, endüstriyel fermantasyonda kullanılması besiyeri maliyetinin azaltma potansiyeli barındırmaktadır.

Gerçekleştirilen çalışma kapsamında düşük besiyeri konsantrasyonunda büyüme yeteneğine sahip oligotrofik bakterinin tanımlanması gerçekleştirilecektir. Bakterinin büyüme ve fenotipik karakteristiklerinin yanında filogenetik olarak tanımlanacaktır. Ardından oligotrofik bakteri kompetent hale getirilerek *Taq* DNA polimeraz kodlayan plazmit ile transforme hale getirilecektir. Oligotrofik bakteriden elde edilecek *Taq* DNA polimerazın ekspresyon ve aktivite deneyleri gerçekleştirilmesinin ardından ölçek büyütme operasyonu gerçekleştirilecektir. Üretilen düşük maliyetli *Taq* DNA polimerazın endüstride kullanılma potansiyeli araştırılacaktır.

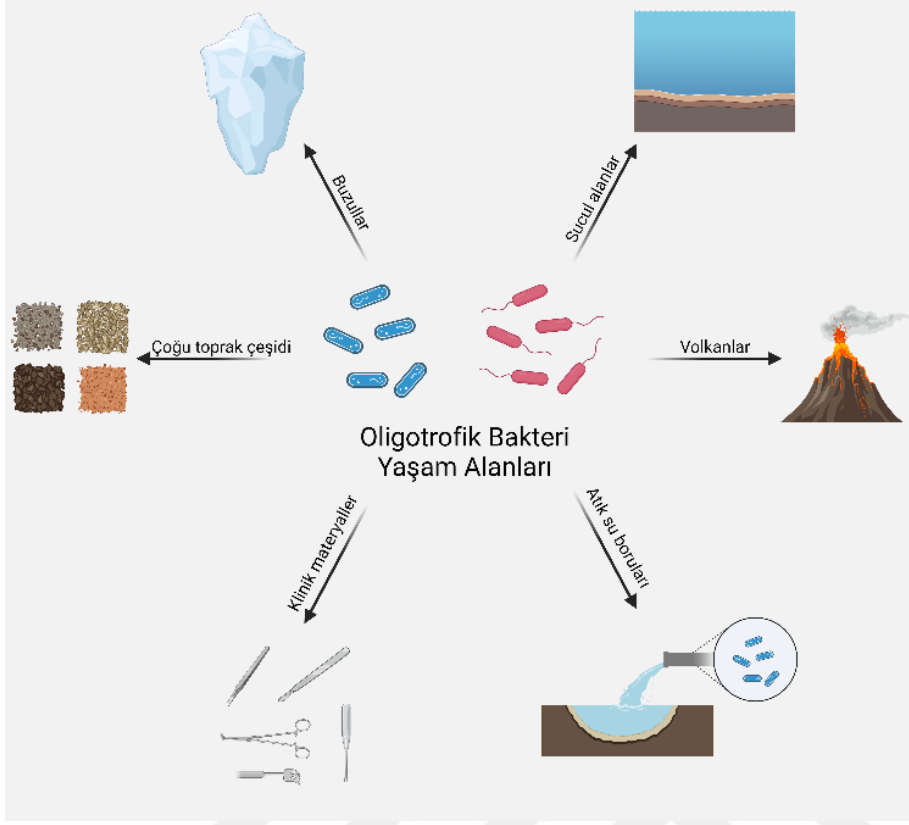
2. GENEL BİLGİLER

2.1. OLİGOTROFİK BAKTERİLER

2.1.1. Oligotrofik Bakteriler

Heterotrofik bakteriler, karbon kaynağı olarak organik maddeleri kullanırlar. Enerjiyi ise bu organik maddelerin indirgenme yükseltgenme reaksiyonlarından elde etmektedirler. Heterotrofik bakteriler, ortamdaki besin kaynağına bağlı olarak gelişme yeteneklerine göre oligotrofik ve kopiotrofik bakteriler olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Düşük besin konsantrasyonlarında büyüme yeteneğine sahip oligotrofik bakteriler ve bunun tersi yaşam tarzına sahip, düşük konsantrasyonda gelişme gösteremeyen kopiotrofik bakterilerdir. Bu belirsiz tanımlamanın nedeni, bir oligotrof ve kopiotrof bakterinin tam olarak neyi tanımladığına dair bir fikir birliği oluşmamasıdır. Ancak bu yaşam stratejisine sahip bakterilerin farklı fizyolojik özellikleri sayesinde çevresel değişikliklere farklı tepkiler gösterdikleri düşünülmektedir. Örneğin kopiotrofik bakteriler daha yüksek Michaelis-Menten sabitine, K_s değeri ve spesifik büyüme oranına sahipken, oligotrofik bakteriler daha yüksek substrat affinitesine sahiptir (1).

Oligotrofik bakteriler doğada enerji kaynağı düşük olan ortamlarda bulunurlar. Doğal oligotrof ortamlar, 0,5 mg/L çözülmüş organik karbon içeren veya 0,1-50 nanomolar düşük molekül ağırlıklı organik bileşen konsantrasyonlarına sahip ortamlar olarak tanımlanmıştır (2). Bazı kaynaklarda konsantrasyon 10 ug/l'ye kadar çıkmaktadır (3). Doğada, açık okyanus suları ve organik madde açısından fakir topraklar oligotrofik bakterilerin gelişip üremelerini devam ettirebileceği ortamlardır (Şekil 2.1). Doğal oligotrof ortamlar her ne kadar 1-15 mg/l serbest karbon içeren konsantrasyonlar olarak tanımlansa da, gerçekte deniz suyunda bu oran çok daha düşüktür (4). Su ortamında organik madde miktarı litrede yaklaşık birkaç miligram serbest karbondur (5). Bu nedenle açık denizlere hakim olan bakteriler oligotroflardır.



Şekil 2.1: Oligotrofik bakterilerin yaşam alanları (biorender.com kullanılarak çizilmiştir.)

Doğadaki oligotrofik bakteriler yaşam tarzına göre zorunlu ve fakültatif oligotrof olarak ikiye ayrılmaktadır. Zorunlu oligotrofik bakteriler sadece enerji kaynağının çok kısıtlı olduğu ortamlarda gelişme yeteneğine sahipken, fakültatif oligotrof bakteriler enerji kaynağı bakımından fakir bölgelerin yanı sıra enerji kaynağı yüksek ortamlarda da gelişme yeteneğine sahiptir.

Doğadaki oligotrofik bakteri popülasyonunun çok büyük bir kısmı kültürlenemez bakterilerden oluşmaktadır (6). Laboratuvar ortamındaki ideal şartlarda kültürlenemeyen bu bakteriler, literatüre “yaşayabilir ama kültürlenemez” (YAK) olarak girmiştir (7). Kültürlenemeyen bakteri oranı o kadar fazladır ki, doğada bulunan mikroorganizmaların %99’undan fazlasının bugüne kadar keşfedilmediği düşünülmektedir. YAK bakterileri, ölü hücrelerden farklı olarak, metabolik ve solunum aktifliklerini korumaktadır. Plazmik ve genomik DNA içeriklerini korurlar. Hücresel bütünlüğe sahiptirler (8). Canlı hücrelerden farkları ise besin taşınımı, metabolik ve solunum aktiviteleri göreceli olarak çok düşük olmasıdır.

2.1.2. Oligotrofik Bakterilerin Özellikleri

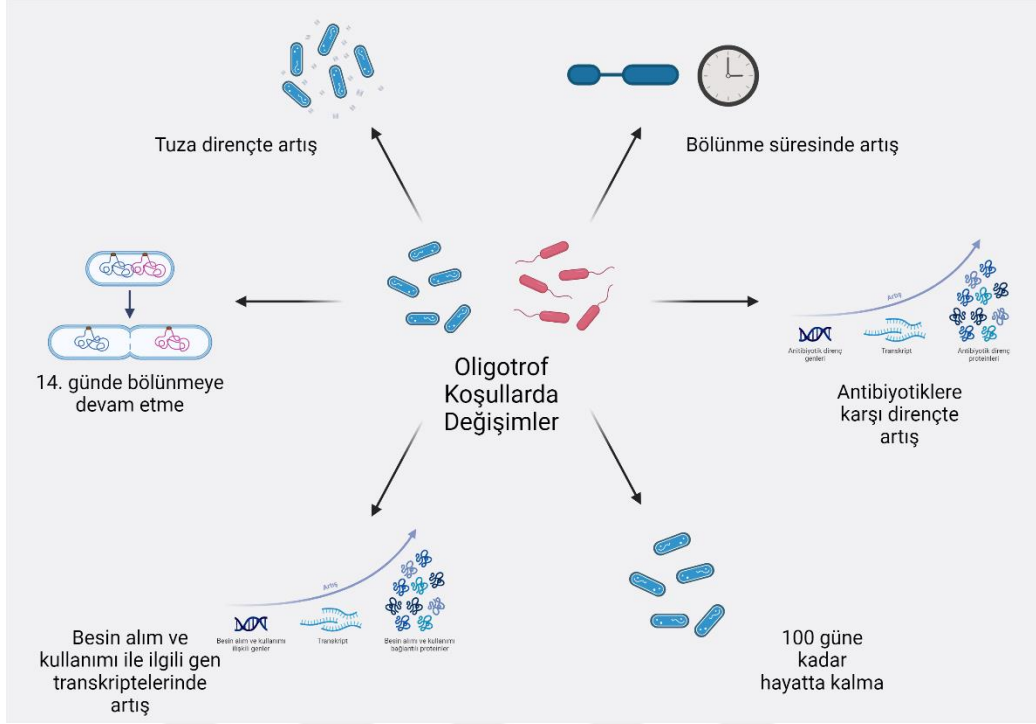
Oligotrofik bakterilerin açlığa verdikleri yanıtın moleküler temelleri kısmen aydınlatılabilmektedir. Bakteriler, sahip oldukları katı yanıt sistemi sayesinde çevresindeki besin mevcudiyetine yanıt verebilme yeteneğine sahiptir. Bu yanıt transkripsiyon ve transkripsiyon sonrası düzeyde gerçekleşir. Açlığa karşı verilen yanıt Rel/Spohomolog (RSH) ve küçük alarmon sentetaz (KAS) proteinleri tarafından üretilen, guanozin 50 - difosfat 30 -difosfat (ppGpp) ve guanozin 50 -trifosfat 30 -difosfat (pppGpp) sentezi ile yönetilir. Bu iki molekülün kompleksine d(p)ppGpp adı verilir. Bu füzyon molekül bakteri açlık durumundayken gram negatif bakterilerde RNA polimeraza bağlanarak, gram pozitiflerde ise başlatıcı nükleosit trifosfatlar (iNTP) oranını değiştirerek önemli transkripsiyonel değişiklikler meydana getirir. Transkripsiyonunu etkilediği genler genel olarak hücre büyümesi ve bölünmesini içeren genlerdir. *Bacillus subtilis* ile yapılan bir dizi çalışmada açlık durumundaki ikinci günden itibaren hücrelerin boylarında %40 oranında azalma meydana gelmesi hücre büyümesi ile ilgili genlerin ekspresyonunun azaldığını kanıtlamaktadır (9). d(p)ppGpp ilgili genlerin ekspresyonunun azalmasında görev alarak hücre büyümesi ve bölünmesinin kısıtlanmasında rol oynar. Ayrıca açlık stresine cevap görevindeki genlerin upregülasyonunda da görev alır. Bu genler besin alımı ve kullanımı ile ilgili genlerdir. Bakterilerin açlık stresine cevabı d(p)ppGpp füzyonu tarafından ikincil olarak yönetilse de, bu füzyon proteinin hücre içinde birikmesinde birçok protein rol oynar. Küçük alarmon sentetazlar, (p)ppGpp sentaz domaini ve küçük alarmon hidrolaz (KAH) proteinlerinden oluşur. KAS ve KAH proteinleri (p)ppGpp seviyelerinden sorumludur. Açlığa karşı verilen yanıt transkripsiyonel düzeyinin yanında post-transkripsiyonel olarak da kontrol ederler (10).

Oligotrofik bakterilerin açlık durumlarında hayatta kalmak için transkripsiyonel yanıtların yanında fizyolojik olarak da yanıt verdikleri bilinmektedir. Açlık durumundaki bir bakterinin yüzey özellikleri ve substratlara bağlanmadaki affinitesi kritik öneme sahiptir (11). Çünkü besine olan affinitenin artması bakterinin ortamdaki zaten kısıtlı olan besini daha verimli şekilde kullanması anlamına gelir. *Pseudomonas* sp. ile yapılan bir çalışmada açlığın dördüncü saatinden itibaren bakteriyi daha hidrofilik ve yapışkan hale getiren nötr ekzopolisakkarit sekresyonu rapor edilmiştir (12). Başka bir çalışmada ise açlık durumundaki hücrelerin yüzey hidrofobikliğinde artış meydana gelmiştir (13). Mikroorganizmaların yüzeyinde açlığa yanıt olarak hidrofilik veya hidrofobikliğin

artması o anda içerisinde bulunan çevreye göre hangisinin daha verimli olacağına göre değişkenlik göstermesi muhtemeldir. Yine açlık durumlarındaki bakterilerin yüzey pürüzlülüğünde artış meydana gelirken boylarının küçüldüğü bilinmektedir (13, 11). İlginç bir sonuç olarak, açlık durumlarda bakterilerde öncelikle metabolizma hızı artar ve yeni proteinler oluşturulur. Ayrıca, hücre duvar sentezi ve membrandaki lipid moleküllerinin bileşiminde değişiklikler meydana gelir. Bu gelen değişiklikler sonucunda cansız yüzeylere yapışkanlık artar (11). Bu da biyofilm oluşumu ile sonuçlanır. Oligotrofik bakterilerin oluşturduğu biyofilmler önemlidir. Özellikle besin alımı ve kullanımı konusunda artan affiniteyle beraber besin kıtlığı olmayan bölgelerde oluşan biyofilmlerden farklılık gösterirler.

Sucul ekosistemde baskın türleri oluşturan oligotrofik bakterilerin büyümesi ve bölünmesi açlık stresine bağlıdır. Hücre kaderini belirleyen bu mekanizmalar alım ve taşıma, ozmotik bütünlük, zar potansiyelinin korunması ve hücre içi-dışı metabolik enerji rezervlerinin kontrolü gibi önemli süreçlerde rol oynar (11).

B. subtilis ile yapılan bir dizi deneyde oligotrofik bakterilerin doğasına ilişkin birçok detay ortaya çıkmıştır. İlgili çalışmada genetik mühendisliği teknikleri sayesinde sporulasyona uğrama yeteneğini kaybeden *B. subtilis* bakterileri kullanılmıştır. Besiyeri olarak ise glikoz kaynağı olarak sadece %0,5 glikoz içeren Spizizen Minimal Medium (SMM) ve SMM'in glikoz kaynağı içermeyen versiyonu açlık tamponu kullanılmıştır. Hücreler, SMM içerisinde 100 günden fazla süre boyunca hayatta kalmıştır. Ayrıca açlık durumundaki hücrelerin bölünme süresi 100 kattan fazla artmıştır. Açlık tamponundaki hücreler ampisilin ve kloramfenikole karşı dirençli hale gelmiştir. Hücreler açlık durumunda sadece bazal hücresel bileşenlerini ürettiğinden çeşitli antibiyotiklerin hedefindeki hücresel bileşenlerin bazıları açlık durumundaki hücrelerde üretilmeyecektir. Bu durumda açlık durumundaki hücrelere karşı antibiyotiğin etkisiz olması kaçınılmazdır. Besin alımı ve kullanımı ile ilgili genlerin açlık durumundaki hücrelerde transkripsiyonunun arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca hiçbir karbon kaynağı içermeyen açlık tamponundaki hücrelerin 14. günde bölünmeye devam ettiği rapor edilmiştir. Yapay deniz suyu ile yapılan deneylerde de açlık durumundaki *B. subtilis* bakterilerinin tuza karşı daha dirençli olduğu gösterilmiştir (Şekil 2.2) (9).



Şekil 2.2: Oligotrofik ortamda meydana gelen değişimler (biorender.com kullanılarak çizilmiştir.)

Oligotrofik ortam, az miktarda bulunan besin nedeniyle aşırı bir rekabetçi ortam yaratmaktadır. Oligotrofik ortamda bulunan hücreler için diğer hücrelerin ölmesi üzerine ortama salınan protein gibi makromoleküller hayati önem taşımaktadır. Daha önceki çalışmalarda durağan fazdaki *B. subtilis* hücrelerinin diğer hücreleri öldürmek için ortama öldürme faktörleri saldığı rapor edilmiştir (14). Bu kannibalizm fenotipinin oligotrofik ortamda gerçekleştiğı henüz bildirilmese de, yapılacak çalışmalar ile keşfedilmesi mümkündür.

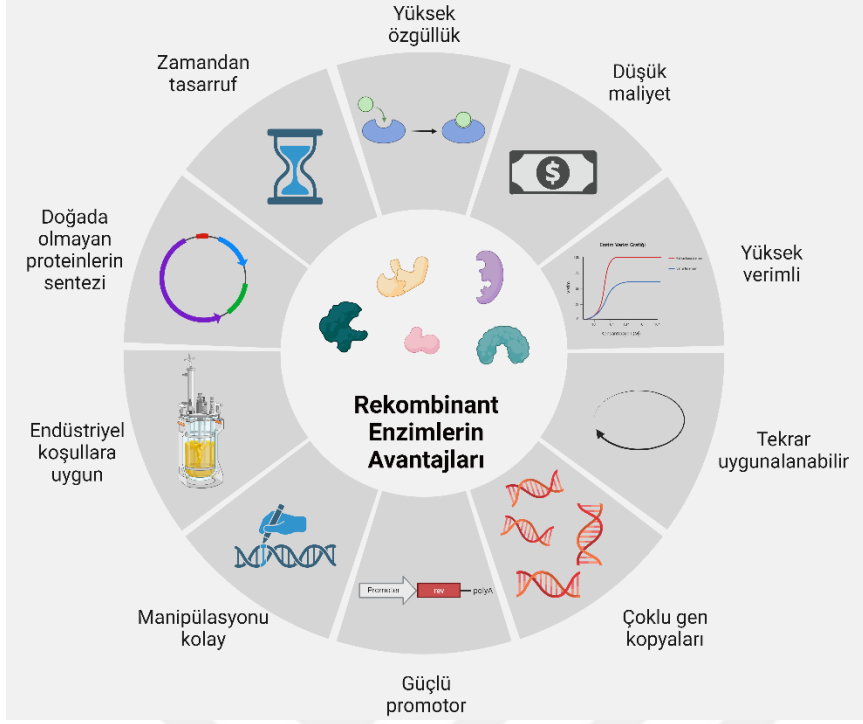
2.1.3. Oligotrofik Bakterilerin Önemi

Doğa, mikroorganizmalar için son derece verimsiz ve kısıtlıdır. Okyanusların yaklaşık üçte birinin oligotrofik olduğu düşünülmektedir. Dünya biyosferinin ise en az yarısının oligotrofik olduğu tahmin edilmektedir (2). Bu oligotrofik ortamlara hükmeden bakteriler oligotroflardır. Dolayısıyla doğada en yaygın olarak bulunan oligotrofik mikroorganizmaların fizyolojik ve moleküler mekanizmalarını anlamak son derece önemlidir.

Besinin kısıtlı olduğu her ortamda oligotrofik bakterilerin oluşturduğu biyofilmlere rastlamak mümkündür. Endüstride metal yüzeylerde, su dağıtım sistemlerinde, oligotrofik göllerde, yeraltı sularında sıklıkla rastlanmaktadır (15,16,17). Ayrıca oligotrofik biyofilmlerin antibiyotik direncine önemli ölçüde katkı sağladığı bilinmektedir (18). Antibiyotik direnci günümüz tıp dünyasının baş etmeye çalıştığı en büyük sorunlardan bir tanesidir. Hastanelerde aseptik koşullarda dahi oligotrofik bakterilere rastlandığı bilinmektedir (19). Mikroorganizmalardaki çoklu antibiyotik direnci nedeniyle her yıl yüzbinlerce kişi hayatını kaybetmektedir. Oligotrofik bakterilerin antibiyotik direnci geliştirmeye yatkınlığının derinlemesine araştırılması ve çözüm önerilerinin geliştirilmesi binlerce insanın hayatını kurtarma potansiyeli taşımaktadır.

2.2. REKOMBİNANT ENZİMLER

Enzimler yüksek katalitik seviyeleri ve özgülükleri sayesinde endüstride önemli yer edinmiştir. Özellikle ilaç ve gıda sanayisinde kullanılan geleneksel kimyasallara karşı iyi ve çevreci alternatif oluştururlar. Bu nedenle sürekli büyüyen ve dünyanın en büyük endüstrilerinden biri haline gelmiştir. Bu büyük pazarın ihtiyaçlarına cevap vermek için doğal enzimler yetersiz kalmaktadır. Çünkü doğası gereği doğal enzimler düşük verimlidir. Tekrar uygulanabilirlik oranı düşüktür ve zorlu endüstriyel üretim koşullarında optimizasyonları çok zordur (20). Rekombinant enzimler sayesinde bu sorunlar aşılabilmektedir. Güçlü promotor dizileri, çoklu gen kopyaları sayesinde rekombinant enzim üretimi, vahşi tip suşlardan yüzlerce kat daha verimli bir şekilde ekspresyon gerçekleştirilir (21). Rekombinant DNA teknolojisi sayesinde endüstrinin ihtiyacı olan rekombinant enzimler verimli bir şekilde kısa sürelerde büyük miktarlarda üretilebilmektedir (Şekil 2.3).



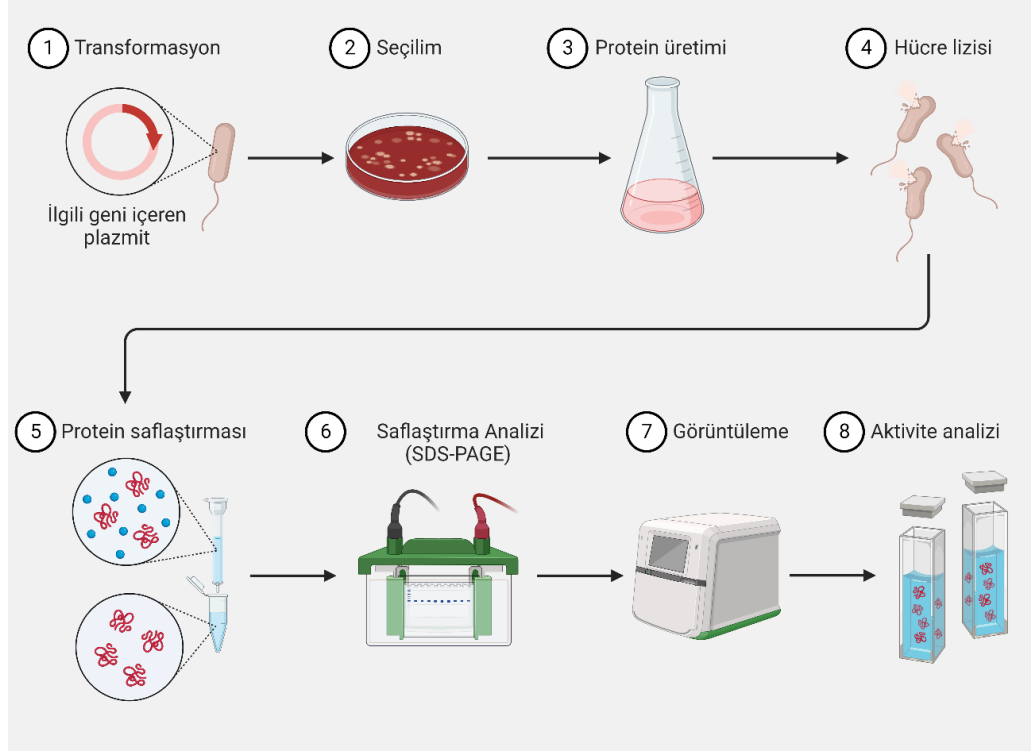
Şekil 2.3: Rekombinant enzimlerin avantajları (biorender.com kullanılarak çizilmiştir.)

Rekombinant DNA teknolojisi, bir organizmanın genetik materyalinin başka bir organizmaya ait başka bir genetik materyal ile manipüle edilerek istenilen ürünün elde edilmesini sağlayan teknolojidir. Rekombinant DNA teknolojisi, uygun vektör aracılığıyla istenilen gen sekansına sahip çeşitli kaynaklardan DNA fragmanlarının üretimi yapacak organizmaya dahil edilmesini içerir. Söz konusu rekombinant DNA fragmanlarının ürünleri olan proteinler olunca, bunlar rekombinant protein olarak adlandırılırlar ve birçok alanda uygulamaları mevcuttur. Tarımda, zararlılara karşı arttırılmış dirence sahip bitkiler, çevresel kirliliğe karşı biyoremediyasyon uygulamaları, kanser tedavisi, genetik hastalıklar ve diyabet bu teknolojinin kullanıldığı başlıca alanlardır (22). Deterjan, gıda ve nişasta işleme endüstrisinde kullanılan enzimlerin %60'dan fazlası rekombinant enzimlerdir (21).

2.2.1. Rekombinant Enzim Üretimi

Rekombinant protein üretimi için protein ekspresyon sistemi, protein saflaştırma sistemi ve protein tanımlama sisteminin olması gereklidir. İlk olarak istenilen gen izole edilmelidir. İzole edilen genin PCR ile amplifikasyonu yapıldıktan sonra seçilen vektör içerisine klonlanmalıdır. Bu noktada vektör seçimi rekombinant DNA teknolojinini en

önemli adımdan biridir. Uyumsuz vektör seçimi tüm sürecin başarısız olmasına neden olabilir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4: Rekombinant enzim üretimi (biorender.com kullanılarak çizilmiştir.)

Klonlama stratejisinde birçok önemli parametre mevcuttur. Hangi promotörün ve etiket molekülünün kullanılacağı, replikasyon orijini seçimi ve tüm bu elementlerin konumu gibi konular dikkate alınmalıdır (23). Aynı şekilde ekspresyon vektörü içerisinde yer alan fonksiyonel genlerin yerleşimi yani vektör topolojisi de rekombinant enzim üretimi için iyi bir mühendislik ile tasarlanması noktalardan biridir.

Rekombinant protein üretiminde plazmitler önemli birer bileşendir. Rekombinant protein üretimi söz konusu olduğunda protein ifadesi vahşi tip suşlarla yapılan protein üretiminden daha karmaşıktır ve plazmite bağlı olarak optimizasyon gereklidir. Bu optimizasyon için birkaç önemli nokta vardır. İlk olarak, istenen proteini kodlayan gendeki kodonlar konakçı hücreler için optimize edilmelidir. Bu gen poli-adenozin kuyruğu ve ribozom bağlanma bölgesine sahip olmalıdır. Gen, ekspresyonunu indükleme veya baskılama özelliğine sahip olan promotör kontrolü altında olmalıdır (24). Genin bu

özelliğinin yanında plazmitin bir bütün olarak stabilitesi de önemlidir ve konakçıya bağlı olarak birçok parametreden etkilenir. Konakçının üssel büyüme fazı boyunca gerçekleşen aşırı ekspresyondan dolayı plazmit stabilitesini olumsuz etkilemektedir. Aynı şekilde konakçının büyüme hızı da plazmit stabilitesini etkiler. Plazmitlerin stabilitesi kendi yapısından da etkilenir. Örneğin plazmitin uzunluğu arttıkça stabilitesinde düşüş meydana gelmektedir. Plazmit stabilitesi, plazmitin içsel parametreleri ve konakçının dışında, fermantasyon ortamından da çokça etkilenmektedir. Örneğin, ortam sıcaklığında meydana gelen artış plazmiti olumsuz etkiler. Ortam bileşimi de stabilizeyi etkileyen faktörler arasındadır (25).

Rekombinant enzim üretiminde bir başka önemli bileşen konakçıdır. Endüstride rekombinant enzim üretimi için kullanılacak ideal organizmanın birkaç özelliği barındırması beklenmektedir. Genetik stabilite, inhibitör ve ürün toleransı, eş zamanlı olarak birden fazla şeker kullanımı, düşük pH ve sıcaklıklarda devam eden fermantasyon yeteneği ve son olarak endüstriyel ölçekteki üretimlerde laboratuvar ölçeğindeki gibi yüksek verim vermesi ideal konakçıdan beklenen özelliklerdir. Sıralanan bu özelliklerin bazıları organizmaların genetik olarak manipüle edilmesi ile organizmaya kazandırılabilir (26). Endüstride rekombinant protein üretimi için en çok kullanılan organizmalar başta *Escherichia coli* olmak üzere, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Pichia pastoris* organizmalarıdır. Birçok rekombinant proteinin özellikle *E.coli*'de gerçekleştirilmesinin birkaç nedeni vardır. Ucuz, yüksek yoğunlukta ve hızlı kültür koşulları, iyi bilinen genetiği ve genetik manipülasyonun kolaylığının yanında *E.coli* ile uyumlu şekilde geliştirilmiş birçok aracın olması nedeniyle *E.coli* rekombinant DNA teknolojisinde en sık kullanılan organizmadır (27). Bu avantajlarının yanı sıra *E.coli*'nin kritik noktalarda olumsuz özellikleri de vardır. Glikosilasyon eksikliği, ökaryotik rekombinant proteinler için vazgeçilmez olan post-translasyonel modifikasyonlar konusundaki yetersizliği, ekspresyon aşamasındaki sınırlamalar ve en önemlisi, rekombinant proteinlerin *E.coli* içerisinde sıklıkla biyolojik olarak aktif olmayan inkülizyon cisimcikleri şeklinde çökelti oluşturmasıdır (28). Fermantasyon sürecinde organizma kaynaklı zorluklar alternatif türlerin keşfedilmesi ve endüstriye entegre edilmesi ile aşılabılır.

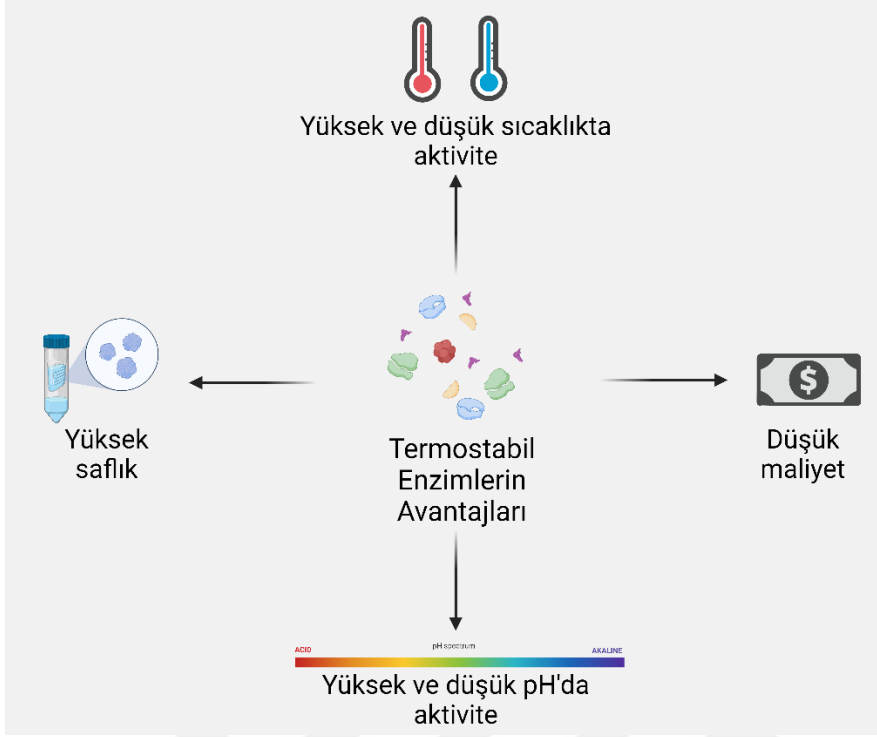
Endüstride kullanılacak organizmanın güvenli olması son derece önemlidir. Rekombinant enzim teknolojisi ile patojenik veya toksin üreten organizmaların enzimleri güvenli konaklarda verimli şekilde ifade edilebilmektedir. Son olarak, protein

mühendisliğinin ileri teknikleri sayesinde enzim stabilitesi, aktivitesi ve özgülüğü geliştirilerek endüstride kullanılmaya uygun yeni ve verimli enzimler üretmek rekombinant enzim teknolojisi sayesinde mümkün olmuştur (21).

Endüstride kullanılma potansiyeline sahip işlevsel genlere sahip organizmalar aynı zamanda laboratuvar koşullarında yetiştirilmesi elverişsiz mikroorganizmalar olabilmektedir. Bu nedenle kaynak organizmaya ait bir geni kullanmak için rekombinant DNA teknolojisine başvurulur.

2.2.3. Termostabil Enzimler

50 °C'nin üzerinde optimum büyüme sıcaklığına sahip bakteriler termofiller olarak adlandırılmaktadır (29). Termofilik organizmaların protein, nükleik asit ve enzimler gibi hücrel bileşenleri ise termostabildir (30). Mezofilik bakterilerin enzimleri 35 °C'den sonra aktivitelerini kademeli olarak kaybederler. Yaklaşık 55-60 °C'den sonra ise aktivitesini tamamen kaybetmektedirler. Termofilik bakterilerin enzimleri olan, termostabil enzimler ise termofilik mikroorganizmanın büyümesi için optimum sıcaklıklardan bile yüksek daha yüksek sıcaklıklarda stabil ve aktif kaldığı tespit edilmiştir (31). Yüksek sıcaklığın yanı sıra, termostabil enzimlerin asidik ve alkali koşullarda da stabil kaldığı bilinmektedir. Termofillerin enzimlerinin bu denli dayanıklı olmasının birkaç sebebi vardır. Yüksek miktarda eksprese ettikleri şaperoninler sayesinde yanlış katlanmış veya denatüre olmuş proteinlerinin işlevsel yapıya kavuşmasını sağlamaktadırlar. Ayrıca enzimlerindeki disülfid bağları, elektrostatik etkileşimler ve hidrofobik etkileşimleri kullanarak enzimlerinin yüksek sıcaklıklarda stabilitesini korurlar (Şekil 2.5) (30).



Şekil 2.5: Termostabil enzimlerin avantajları (biorender.com kullanılarak çizilmiştir.)

2.2.4. Termostabil Enzim Üretimi

Termostabil enzimler, yüksek sıcaklıklardaki stabiliteleri nedeniyle endüstride sıklıkla tercih edilen enzim türleridir. Termostabil amilazlar, ksilanazlar, selülazlar, kitinazlar, proteazlar, lipazlar ve DNA polimerazlar endüstride en fazla üretimi yapılan termostabil enzimlerdir. Gıda, kağıt, deterjan, ilaç ve petrol endüstrileri, termostabil enzimlerin en yaygın kullanıldığı endüstrilerdir. Termostabil enzim kaynağı olan organizmalar genelde iyi çalışılmamış veya laboratuvar koşullarında yetiştirilmesi elverişsiz olan organizmalardan oluşmaktadır. Çünkü bu organizmaların doğal yaşam ortamları 80 °C ile 115 °C arasında değişen sıcaklıklardan oluşmaktadır (30). Bu noktada devreye rekombinant DNA teknolojisi girmekte ve termostabil enzim üretimi için iyi çalışılmış ve laboratuvarında ucuz ve kolay üretilebilen organizmalar seçilerek ekspresyon suşu olarak kullanılmaktadır. Genetik ve protein mühendisliği teknikleri sayesinde yüksek sıcaklık, aşırı yüksek veya düşük pH, oksitleyici ve indirgeyici maddelere ve organik çözücülere karşı stabil enzimler, mezofilik konağa klonlanması ve ekspresyonu ile hızlı ve ucuz bir şekilde termostabil enzim üretimi mümkün olmuştur.

2.2.5. Termostabil Enzimlerin Önemi

Genin izolasyonunun ardından laboratuvar ortamında yetiştirilmesi kolay - genellikle *E.coli*- çeşitli organizmalara transformasyon sayesinde doğal olarak üretilmesi imkansız rekombinant proteinler kolaylıkla üretilir. Buna örnek olarak *Taq* DNA polimeraz üretimidir. PCR teknolojisinde DNA denatürasyonu için sıcaklığın 95 °C'ye kadar çıkarılmasının ardından primerlerin bağlanması için yaklaşık 55 °C olmalıdır. Erken dönem PCR uygulamalarında *E.coli*'den elde edilen DNA Polimeraz I Klenow fragmenti denatürasyon için gerekli olan 95 °C sıcaklıkta stabil olmamakta ve işlevini kaybetmektedir. Her döngüde denatürasyon ve bağlanma aşamasından sonra ortama DNA polimeraz eklenmesi gereklidir. Bu işlem PCR'a hem maliyet hem de zaman açısından inanılmaz bir yük getirmektedir. Bu duruma çözüm bulmak isteyen araştırmacılar termofilik organizmaların DNA polimeraz genlerine yönelmiştir. Termofilik organizmaların proteinleri de organizmanın kendisi gibi sıcaklığa dayanıklı ve yüksek sıcaklıklarda dahi stabil kalma yeteneğine sahiptir. Ancak bu organizmalar genellikle laboratuvar ortamında yetiştirilmesi zor olan arkelerden oluşmaktadır. *Thermus aquaticus* bakterisinden elde edilen *Taq* DNA polimeraz daha sonra genetik mühendisliği sayesinde tasarımı yapılan plazmite aktarılmıştır. Ardından bu plazmitin *E.coli*'ye transformasyonu gerçekleştirilmiştir. Rekombinant DNA teknolojisi ile tüm sürecin sonunda aktif ve laboratuvar koşullarında kolaylıkla üretilen *Taq* DNA polimeraz ortaya çıkmıştır.

2.3. TAQ DNA POLİMERAZ

Taq DNA polimeraz, *Thermus aquaticus* bakterisinden elde edilen DNA polimerazdır. Bakteri hidrotermal bacaların çevresinde yaşadığından bu bakterinin enzimleri de yüksek sıcaklıklarda bozulmayarak aktivitelerini koruma yeteneğine sahiptir. Bu nedenle *Taq* DNA polimeraz PCR'da en sık kullanılan enzimdir.

Taq DNA polimerazın optimum çalışma sıcaklığı 70-80 °C'dir ve 7,8-8,3 pH'ta maksimum etkinliği gösterir (32). *Taq* DNA polimerazın hata oranı her bir döngü için 2×10^{-4} nükleotit olarak hesaplanmıştır (33).

Taq DNA polimerazın PCR dışında en büyük kullanım alanı dizilemedir. Yüksek GC oranına sahip şablonları amplifiye ederken gerçekleşen hata oranı, diğer polimerazlardan daha düşüktür ve yüksek sıcaklık, düşük tuz konsantrasyonu gibi

koşullarda dahi iyi bir aktivite sergilemektedir (34). Bu sayede sekanslama sırasında oluşan saç tokası yapıları yüksek sıcaklıklarda açılarak *Taq* DNA polimeraz tarafından okumanın yapılması mümkün olmaktadır.

Yerli veya rekombinant her *Taq* DNA polimerazda 5'-3' ekzonükleaz aktivitesi mevcuttur. Ancak 5'-3' nükleaz aktivitesinin primerleri degrades etme ihtimali mevcuttur. N terminal delesyonu ile yapılan ve bu aktiviteyi yok eden bir çalışmada daha yüksek ürün verimi ile sonuçlanmıştır (33).

Taq DNA polimerazın bir dezavantajı 3' uçlara kalıp DNA'ya tamamlayıcı olmayan nükleotitler ekleme eğiliminde olmasıdır. Bu durum özellikle PCR ürünlerin klonlandığı çalışmalarda sorun oluşturmaktadır (33).

2.3.1. *Taq* DNA Polimeraz Moleküler Yapısı

Taq DNA polimeraz, bu alanda en çok çalışılmış *E.coli* DNA polimeaz I Klenow fragmenti ile homoloji gösterir (35). *Taq* DNA polimeraz yaklaşık 94 kDa ağırlığındadır (36). Diğer polimazlarda olduğu gibi avuç içi, parmaklar ve baş parmak olmak üzere üç domainden oluşur ve sağ el şeklini andırırlar (37). Avuç içi domaini polimerizasyon reaksiyonundan sorumlu olan bölgedir. Parmaklar domaini nükleosid trifosfat ile şablon DNA ile etkileşimden sorumludur. Baş parmak ise dubleks DNA'nın konumlandırılmasında görev alır (38). İki değerlikli iyonların varlığı polimerazların aktivitesi için ortak bir özelliktir (37). *Taq* DNA polimerazın polimerizasyon aktivitesi için iki değerlikli metal iyonu gerekli olsa da, 3'-5' ekzonükleaz aktif bölgesinde iki değerlikli metal iyonları için gerekli olan karboksilat kalıntıları eksiktir. Bu nedenle *Taq* DNA polimeraz 3'-5' ekzonükleaz aktivitesinden yoksundur (42). Bu aktivite polimerizasyon sırasında yanlış eklenen bazların yapıdan çıkarılarak doğru eşleşmelerin gerçekleşmesini sağlamaktadır. Polimerizasyonun aslına uygunluğunu 2-3 kat arttırdığı tespit edilmiştir (30). 3'-5' ekzonükleaz aktivitesinin yokluğu *Taq* DNA polimeraz için bir dezavantaj oluşturmaktadır.

2.3.2. Tedavisinde *Taq* DNA Polimeraz Kullanılan Hastalıklar

DNA polimeraz, özellikle PCR ve dizileme tekniklerini içeren her alanda sıklıkla kullanılmaktadır. Yıllar geçtikçe daha fazla genetik bozukluk tanımlanması ve bu bozukluklar için geliştirilen gen terapilerinde DNA polimeraza başvurulmaktadır. Kistik fibrozis, orak hücreli anemi, bazı kanser çeşitleri, kas distrofisi gibi rahatsızlıklar aktif

olarak araştırılıp tedavisinde DNA polimeraza başvuru bazı rahatsızlıklardandır (41). Termotabil DNA polimerazın bir alanı da viral veya bakteriyel enfeksiyonların PCR ile teşhisidir. Özellikle pandeminin başlangıcından beri PCR tabanlı teknolojilerin kullanımı artmıştır. Bu durum termotabil DNA polimeraz pazarına da olumlu yansımaktadır (42).

2.3.3. Piyasadaki *Taq* DNA Polimeraz Üreticileri

Taq DNA polimeraz üretimi ve optimizasyonu birçok araştırmacı ve özel şirket tarafından iyi çalışılmış olsa da, ticari sır nedeniyle literatürdeki bilgiler kısıtlıdır (36). Piyasada başta Kuzey Amerika şirketleri olmak üzere birçok önemli şirket bulunmaktadır. Thermo Fisher, Hoffmann-La Roche, Merck, Qiagen, Agilent, Takara Bio, Genescript Illumina, New England Biolabs ve Promega piyasadaki arzı karşılayan en büyük üreticilerdir (42).

2.3.4. *Taq* DNA Polimeraz Pazarı

DNA polimeraz pazarı 2021’de 327 milyon ABD doları iken 2031’e kadar bu pazarın 568,3 milyon ABD dolarına ulaşması beklenmektedir. Hastaneler, moleküler teşhis şirketleri, biyofarmasötik şirketleri, teşhis laboratuvarları, akademik ve araştırma enstitüleri başta olmak üzere DNA polimeraz çok geniş alanda kullanılmaktadır. Termotabil DNA polimerazlar ise bu alanlarda özellikle moleküler biyolojide PCR teknolojisinde çok sıklıkla tercih edilir. Ancak reaktiflerin yüksek maliyeti, bu alandaki kalifiye personel eksikliğinin pazar payını düşürücü etkileri olacağı tahmin edilse de, DNA polimerazın kullanım alanını içeren teknolojilerin henüz yeni olması nedeniyle önümüzdeki 10 yıl boyunca DNA polimeraz pazarının büyüyeceği öngörülmektedir (42).

2.4. FERMANTASYON TEKNOLOJİSİ

Fermantasyon terimi, bir substratın, kofaktör aracılı indirgenme yükseltgenme reaksiyonları ile son ürüne dönüşmesini sağlayan tepkilemeler dizisine verilen metabolik bir kavramdır (43). Fermantasyon prosesleri laboratuvar ölçeği olarak adlandırılan küçük hacimlerde optimize edildikten sonra endüstriyel ölçek operasyonlarına geçilir. Laboratuvar ölçeğinde yapılan fermantasyon, endüstriyel ölçeğe göre daha basit olmakla birlikte önemli zorlukları barındırmaktadır. Özellikle erlen içerisinde gerçekleştirilen fermantasyonda katı bileşenlerin çözünmemesi ve homojen şekilde dağılması, köpürme, fermantasyon ortamındaki bileşenlerin ürünlerin saflaştırması üzerindeki

büyük ve belirsiz etkisi bu zorluklardan birkaçıdır (44). Endüstriyel fermantasyon koşullarının aksine, laboratuvar ölçeğinde araştırmacının fermantasyon prosesi üzerindeki etkisi daha az kontrole sahiptir. Gider açısından bakıldığında, endüstriyel ölçekten daha az maliyetli olduğundan büyük ölçeğe geçişte ilk olarak fermantasyon prosesi laboratuvar koşullarında optimize edilmekte ve daha sonra ölçek büyütme operasyonu gerçekleştirilmektedir.

Genel olarak mikroorganizmaların kullanıldığı endüstriyel fermantasyon sürecinde kesikli fermantasyon, kesikli beslemeli fermantasyon ve sürekli fermantasyon olmak üzere başlıca üç proses vardır. Kesikli fermantasyonda fermantasyonun gerçekleştiği ortam, sıcaklık ve pH ayarlandıktan sonra ilgili mikroorganizma inokülasyonu gerçekleştirilir. Bunu izleyen süreçte proseste herhangi bir girdi çıktı olmaz ve ortamdaki substrat bitinceye dek fermantasyonun ürünlerinin oluşması beklenir. Kesikli beslemeli fermantasyonun kesikli fermantasyondan farkı, azalan substrat ile beraber ortama substrat eklenerek ürün oluşumuna teşvik edilmesidir. Sürekli fermantasyonda ise ortama sürekli besin girdisinin olmasının yanında ortamdaki mikroorganizma ve ürünler çekilir. Böylece fermantasyon ortamında süreklilik ve denge sağlanmış olur. Endüstriyel fermantasyon terimi bu üç uygulamayı da kapsayan geniş bir çalışma alanını ifade etmek için kullanılır.

2.4.1. Fermantasyon Teknolojisinin Önemi

Fermantasyon teknolojisi, ilaç, kimya, gıda endüstrilerinde ve enerji üretiminde pahalı bileşiklerin üretiminde kullanılan bir biyoprosesdir (45). Pazarın sürekli artan taleple beraber sürdürülebilir üretim ile uygun maliyetli arz sağlama ihtiyacı fermantasyonda ortaya çıkmıştır.

Fermantasyonun ilaç sektöründe çok geniş bir kullanım alanı mevcuttur. Bakteriyel ve fungal hücrelerin kullanılarak antifungal, antiviral, antibakteriyel ve antiparazitik moleküllerin sentezlenmesinde sıklıkla fermantasyon teknolojilerine başvurulur. Gen terapisi, monoklonal antikor üretimi ve bazı rekombinant enzimlerin üretiminde ökaryotik organizmaların merkezinde bulunduğu fermantasyon yapılır (46).

Fermantasyonun gıda endüstrisindeki en büyük rolü probiyotiklerdir. Probiyotik terimi, insan sağlığı için yararlı bakterileri tanımlamak için kullanılır (47). Probiyotik gıdaların; antioksidan etkisi, kardiyovasküler hastalıklar ve kansere karşı önleyici etkisi,

diyabet ve obezite gibi kronikleşmiş hastalıklara karşı koruyucu olduğu bilinmektedir (48). Fermantasyonun gıda endüstrisindeki bir başka yeri ise mikrobiyal enzimlerdir. Probiyotik dışında gıda endüstrisinde, süt ürünlerinde, fırın ürünlerinde, alkollü içecek üretiminde, meyve-sebze ve tohum yağı ürünlerinde, et ve balık ürünlerinde fermantasyon teknolojisine başvurulur (47).

Etanol, fosil yakıtlardan gelen enerji kaynaklarına alternatif olan en önemli yenilebilir enerji kaynaklarından biridir. Fermantasyonun enerji endüstrisindeki en büyük rolü biyoetanol üretimidir. Fermantasyonda besiyeri kaynağı olarak mısır koçanı, buğday ve pirinç samanı gibi tarımsal atıkların yanı sıra ormancılık ve kağıt endüstrisindeki atık ürünlerin kullanılması etanol fermantasyonunun sürdürülebilir kılmaktadır. Küresel ölçekte sürekli artan enerji ihtiyacının bir kısmını temiz ve güvenli bir yöntem olan fermantasyon teknolojisi ile üretileceği düşünülmektedir (49).

2.4.2. Fermantasyon Ortamının Optimizasyonu

Fermantasyon ortamı, sadece üretim maliyetinin yanı sıra saflaştırma maliyetini de önemli ölçüde etkilemektedir (50). Fermantasyon ortamının optimizasyonunun asıl amacı, fermantasyon biyoprosesinin maliyet açısından daha rekabetçi hale getirmek ve atık yan ürünlerin oluşumunu en aza indirmektir (45). Fermantasyonda kullanılacak organizmaya bağlı olarak ortam optimize edilmelidir. Fermantasyonda sıklıkla kullanılan *E.coli* ve *Bacillus subtilis* gibi bazı yaygın suşlar için standardize edilmiş fermantasyon ortamları vardır (50). Ancak besiyeri tasarımı; maliyet, zaman ve deneyler açısından son derece zorlu bir süreçtir. Endüstride sürekli yeni suşlar denendiğinden besiyeri tasarım deneylerine sıklıkla başvurulur (44).

Fermantasyon ortamındaki karbon kaynakları, mikrobiyal üretim performansı ve tüm prosesin maliyetini etkilediğinden optimize edilmesi gereken en önemli bileşenlerden birisidir (50). Karbon kaynakları mikroorganizmalarda birincil ve ikincil metabolitlerin üretiminde ve hücre büyümesinde rol alır. Karbon kaynağını metabolize etme hızı metabolitlerin üretiminin yanı sıra daha hızlı biyokütle oluşumunu sağlar. Fermantasyon ile üretilmiş bir ürünün fiyatı genellikle en fazla karbon kaynağının maliyetinden etkilenir (45). Bu nedenle karbon kaynağının sürdürülebilir olmasının yanında ucuz yolla elde edilmesi önemlidir. Hayvan/insan atıkları, gıda atıkları, protein hidrolizatları ve lignoselülozlar bol miktarda bulunduğu ve ucuz olduğundan en sık tercih edilen karbon kaynaklarıdır (50).

Optimizasyon sürecine ilgili organizmanın fermantasyon ürününü ürettiğini kanıtladıktan sonra başlanır. Fermantasyon ve saflaştırma birbirini etkilediğinden iki proses de birlikte optimize edilmelidir. Fermantasyonda gerçekleştirilen optimizasyonda her seferinde bir faktör değiştirilmesi veya aynı anda farklı faktörlerin değiştirilmesiyle yapılan deneyleri kapsar. Bu deneylerin çıktısı olan ürüne dair parametreler istatistiksel analizler kullanılarak gerçekleştirilir. Ürünün özelliklerini, kalitesini ve miktarını etkileyen bu değişkenleri tanımlamak araştırmacının en önemli görevlerinden biridir (25). Geleneksel optimizasyon yöntemlerinde dört farklı yol izlenir (45).

2.4.2.1. Uzaklaştırma: Tasarlanan besiyeri ile üretim yapılır. Üretim sonucundaki çıktılar istatistiksel olarak analiz edilir. Ardından besiyerinden bileşenler tek tek uzaklaştırılır.

2.4.2.2. Takviye: Farklı karbon ve azot kaynakları fermantasyon ortamına eklenir. Eklenen maddelerin metabolit üretimi üzerindeki etkileri istatistiksel olarak değerlendirilir.

2.4.2.3. Değiştirme: Takviye deneylerinde elde edilen sonuçlara göre optimum sonuç veren karbon ve azot kaynaklarının birbirine göre oranı ayarlanır.

2.4.2.4. Fiziksel parametreler: Fermantasyon sürecinde pH, sıcaklık, çalkalama ve havalandırma gibi fiziksel parametreler de standartlaştırılır.

Fermantasyonda optimizasyon iki kademeli yaklaşımla yapılmaktadır. İlk olarak parametreye bağlı olarak elde edilen ürünün miktarı, ikinci aşamada ise elde edilen proteinin özelliğinin incelenmesi ve tanımlanması olarak iki aşamada optimizasyon gerçekleştirilir (25).

Büyük ölçekli fermantasyonda antibiyotikler, ekspresyon indükleyiciler gibi pahalı ürünlerden kaçınılmalıdır. Bu maliyetlerden kaçınmak için birkaç alternatif yol geliştirilmiştir. Plazmit stabilizasyonu için kullanılan antibiyotiklerin kullanımından kaçınmanın bir yolu, hedef genin konakçı genomuna entegrasyonudur. İndükleyici maliyetinden kurtulmanın bir yolu ise, konakçı genomunda kurucu genin promotörü kontrolü altına hedef geni kopyalamaktır. Böylece hücre, ortamda indükleyici olmadan doğal hücre döngüsüne devam ederken hedef genin ekspresyonunu sağlar. Klonlama tekniklerindeki tüm gelişmelere rağmen, kromozomdaki entegrasyon bölgesi seçimi hala önemli bir zorluk olmaya devam etmektedir (50).

Literatürde fermantasyon ürününün aşırı ekspresyonu ile ilgili birçok çalışma mevcuttur. Bu çalışmalar genellikle hücrenin tüm kaynaklarını ürün oluşumu için yönlendirmeye ve rakip yollar devre dışı bırakmaya odaklanmıştır. Ancak fermantasyon verimliliğini etkileyen en önemli etkenlerden birisi metabolik enerjinin verimli bir şekilde kullanılmasıdır. Fermantasyonda kullanılan organizmanın metabolik enerji tasarrufu ile daha yüksek kalite ve miktarda ürün oluşumu gerçekleşir (43). Bu nedenle fermantasyon ile ilgili çalışmalar organizmaları ürüne yönlendirmekten daha çok enerji tasarrufuna odaklanmalıdır.

Oligotrofik bakteriler açlık durumundayken enerji tasarrufu ve ortamdaki besini daha verimli şekilde kullandığı bilinmektedir. Bu nedenle fermantasyon için oligotrofik bakterilerin kullanılması ve bu bakterilerin enerji tasarrufu konusundaki yeteneklerinin aydınlatılması için daha fazla çalışma yapılmalıdır. Ayrıca oligotrofik bakterilerin fermantasyon işlemlerinde kullanılması ve verimliliğinin standart suşlarla karşılaştırılması önemli bir potansiyel taşıyan alandır. Ürüne giden yolda fermantasyon ile kimyasal üretim arasında önemli bir rekabet mevcuttur. Fermantasyon teknolojisi maliyeti itibarıyla genelde bu rekabette geride olan taraftır. Fermantasyondaki maliyetinin yaklaşık %30'luk kısmı kısmı besiyeri giderleri oluşturmaktadır (51). Oligotrofik bakterilerin düşük besiyeri konsantrasyonunda büyüme ve gelişme kapasitelerinin yanında metabolik enerji tasarrufları sayesinde fermantasyon teknolojisinin en büyük dezavantajı olan besiyeri maliyetinin hafifletme süreci daha verimli hale getirme potansiyeli mevcuttur. Ancak literatürde oligotrofik özellikteki bakteri ile düşük besiyeri konsantrasyonunda fermantasyon uygulaması çalışılmamıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. MATERYAL

LB broth (Miller) (L3522), LB broth agar (L3147), magnezyum klorür (208337), Triton X-100 (T8787), 2-mercaptoetanol (M-3148), Nonidet P 40 (74385) ve Tween-20 (P1379) Sigma Aldrich'ten (St. Louis, MO, USA) satın alınmıştır. PBS, Thermo Fisher Scientific'den (USA) satın alınmıştır. Genomik DNA Kit (E1075) ve Laemmli Tamponu (LSB-4x) EcoTech'ten (Turkey) satın alınmıştır. Premix *Taq*TM DNA Polymerase (R004A), TaKaRa Bio Inc.'den (Shiga, Japan) satın alınmıştır. PureYieldTM Plasmid Miniprep System Promega'dan (Madison, WI, USA) (A1223) satın alınmıştır. %10 Mini-PROTEAN® TGX Stain-FreeTM Protein Gel, 10x Tris/Glycine/SDS Elektroferez Tamponu (1610772EDU), TEMED (1610800), Coomassie Brilliant Blue (1610400) BioRad'dan (Hercules, CA, ABD) satın alınmıştır. dNTP Mix (her bir nükleotit 10 mM) (P031) Vazyme'dan (China) satın alınmıştır. Amonyumpersülfat (7727-54-0), potasyum klorür (7447-40-7) ve dekstroz (14431-43-7) Merck (Germany) satın alınmıştır. Tris-HCl (1185-53-1) Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, USA) satın alınmıştır. Agaroz (50004) Lonza Biosence'den (Lonza, USA) satın alınmıştır. EDTA Disodyum (625-060-LG), IPTG (800-050-IG), ampisilin (400-110-IG) Multicell Wisent'ten (Quebec, Canada) satın alınmıştır. Lizozim (PC0710) Vivantis'ten (Malezya) satın alınmıştır. İzoprofil alkol (67-63-0) Tekkim Kimya'dan (Türkiye) satın alınmıştır. Gliserin ve hidrojen peroksit YasinTeknik'ten (Türkiye) satın alınmıştır. Asetik asit (Glasiyel) 100% Anyhdrous (901.013.2500) İnterlab (İstanbul, Türkiye) satın alınmıştır. EMB agar, arjinin dihidrolaz broth, lizin dekarboksilaz broth HiMedia (Mumbai, India) satın alınmıştır.

Deney sürecinde; otoklav (Hirayama), santrifüj, hassas tartı (Ohaus), inkübatör (Mommert), çalkalamalı inkübatör (Stuart), PCR güç ünitesi, Chemidoc (Bio-Rad), spektrofotometre (Multiskan SkyHigh Microplate Spectrophotometer Thermo Fisher Scientific), vorteks (Benchmark), ısıtıcı blok (IKA), su banyosu (Julaba), distile su cihazı (Mes MP), koloni sayım cihazı (Isolab), Minifors (Infors HT) cihazları kullanılmıştır.

3.2. METOT

3.2.1. Oligotrofik Bakteri Seçimi ve Tanımlanması

3.2.1.1. Oligotrofik bakteri seçilmesi: Daha önce çevreden izole edilmiş ve gliserol stoğa alınmış bakteriler, standart LB agar, 1:10, 1:100 ve 1:1000 oranlarında su ile seyreltilmiş LB agarlara ekimi yapıldı. Bir gecenin ardından beş farklı konsantrasyonda da üreme yeteneği gösteren bakteriler seçildi.

3.2.1.2. Oligotrofik bakterinin filogenetik olarak tanımlanması: Seçilen bakteriden 10 mL LB içerisine ön kültür yapıldı. Bir gecenin ardından Ecotech Genomic DNA Kit kullanılarak genomik DNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen genomik DNA kalıp DNA olarak kullanılarak PCR reaksiyonu kuruldu. PCR reaksiyonu Takara Premix Taq™ DNA Polymerase kullanılarak gerçekleştirildi. Evrensel 16S rRNA primerleri olan 27F (Macrogen - AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) ve 1492R (Macrogen - TACGGYTACCTTGTTACGACTT) primerleri kullanıldı (52). Sanger Dizileme ile 16S rRNA dizilemesi analizine gönderildi.

3.2.1.3. Oligotrofik bakterinin fenotipik olarak tanımlanması:

3.2.1.3.a EMB Agar Testi (53): EMB agar gram-negatif bakteriler için seçici besiyeridir. Bu besiyerinde Gram negatif bakteriler büyürken, Gram pozitif bakteriler büyüyememektedir. Test için hazır besiyeri kullanılmıştır. Yapılan EMB agar testinde pozitif kontrol olarak *E.coli*, negatif kontrol olarak *S. aureus* kullanılmıştır. EMB agara ekimin ardından bir gün sonra *E.coli* ile test grubunda büyüme gözlemlendi. Negatif kontrolde ise herhangi bir büyüme gözlemlenmedi.

3.2.1.3.b Katalaz testi (54): Bakterilerdeki katalaz enzim aktivitesinin belirlenmesi için yapılmaktadır. Test için %30 konsantrasyonunda H₂O₂ çözeltisi hazırlanarak filtreden geçirildi. Temizlenen lama hazırlanan çözeltiden pipet yardımıyla birkaç damla damlatıldı. Daha sonra katı besiyerinde büyütülmüş bir günlük kültürlerden öze yardımıyla alınarak su içerisinde çözüldü. Son olarak bakteriler lamdaki H₂O₂ ile karıştırıldı. Pozitif kontrol grubu olarak *S.aureus*, negatif kontrol grubu olarak *Enterobacter* kullanıldı.

3.2.1.3.c İndol testi (55): Triptofan aminoasidi mikroorganizmalar tarafından parçalanması durumunda indol molekülü oluşur. İndol testi ise ortamda indol birikiminin dolayısıyla bakterinin triptofanı parçalamasının belirlenmesi için kullanılır. Bu deney için, LB içerisinde büyütülen kültüre Kovac's indol damlatıldı. Pozitif kontrol grubu olarak *Escherichia coli*, negatif kontrol grubu olarak *Pseudomonas* kullanıldı.

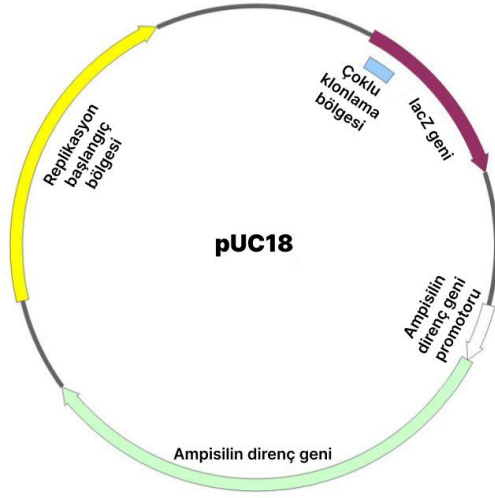
3.2.1.3.d Metil kırmızı testi (56): Metil kırmızı testi, bakterinin glikozu metabolize etme yeteneğini test etmek için kullanılır. Bunun için 0,1 gram metil kırmızı boyası 300 mL %95 etanol içerisinde çözüldü. Hacim 500 mL'ye çift distile su ile tamamlandı. Kültürler LB içerisinde 48 saat büyütüldükten temiz tüplere aktarıldı. 2,5 mL kültür için 5 damla hazırlanan metil kırmızı boyası damlatıldı. Pozitif kontrol grubu olarak *Escherichia coli*, negatif kontrol grubu olarak *Klebsiella pneumoniae* kullanıldı.

3.2.1.3.e Arjinin dekarboksilaz testi (57): Arjinin dekarboksilaz testi, mikroorganizmanın arjinin aminoasidinde bulunan karboksilaz grubunu uzaklaştırarak karbondioksit oluşturma yeteneğini test etmek için kullanılır. Bu reaksiyonun temeli bakteride dekarboksilaz enzim aktivitesine dayanır. Test için hazır besiyeri kullanıldı. 100 mL distile su içerisinde 1,93 gram arjiniin dihidrolaz besiyeri çözüldü ve otoklav ile sterilize edildi. Hazırlanan besiyerlerine kültürlerin ekimi yapıldı. Pozitif kontrol grubu olarak *Enterobacter cloacae*, negatif kontrol grubu olarak *Klebsiella pneumoniae* kullanıldı.

3.2.1.3.f Lizin dekarboksilaz testi (57): Lizin dekarboksilaz testi, mikroorganizmanın lizin aminoasidinde bulunan karboksilaz grubunu uzaklaştırarak karbondioksit oluşturma yeteneğini test etmek için kullanılır. Bu reaksiyonun temeli bakteride dekarboksilaz enzim aktivitesine dayanır. Test için hazır besiyeri kullanıldı. 100 mL distile su içerisinde 1,4 gram lizin dihidrolaz besiyeri çözüldü ve otoklav ile sterilize edildi. Hazırlanan besiyerlerine kültürlerin ekimi yapıldı. Pozitif kontrol grubu olarak *Escherichia coli*, negatif kontrol grubu olarak *Enterobacter* kullanıldı.

3.2.2. Plazmit Transformasyonu

3.2.2.1. Plazmit izolasyonu: *Thermus aquaticus* YT-1 suşu DNA polimeraz genini içeren pUC18 plazmit vektörü, *E.coli* JM109 suşundan izole edildi. İzolasyon için PureYield™ Plasmid Miniprep System kullanıldı (Şekil 3.1).



Şekil 3.1: Tez kapsamında kullanılan pUC18 vektörünün yapısı (biorender.com kullanılarak çizilmiştir.)

3.2.2.2. Kompetent oligotrofik bakterinin hazırlanması (58): Oligotrofik bakteri 37 °C’de büyütüldü. OD₆₀₀’de 0,2 değerine geldiğinde 5500 rpm’de 10 dakika +4 °C’de santrifüj edildi. OD ölçümleri Multiskan SkyHigh Microplate Spektrofotometre cihazında yapıldı. Ardından süpernatant atıldı. Sırasıyla 250 mL soğuk çift distile su ve 20 mL %10 soğuk gliserol ile yıkama yapıldı. Son olarak %10 soğuk gliserol içerisinde stoklanarak daha sonra kullanılmak üzere -80 °C’ye kaldırıldı.

Seçilen bakteri 400 mL sıvı LB besiyerine tek koloni ekimi yapıldı. Kültür OD₆₀₀’de 0,2 değerine gelince 5500 rpm’de +4 °C’de 10 dakika santrifüj edildi. 250 mL çift distile su ile yıkama yapıldı. 20 mL %10 konsantrasyonunda soğuk gliserol ile resüspanse edildi ve yıkandı. Daha sonra pellet %10’luk soğuk gliserol ile resüspanse edildi ve -80 °C stoğa kaldırıldı.

3.2.2.3. Transformasyon koşulları (58): Elektroporasyon ile transformasyon işlemi BioRad Gene Pulser Xcell Elektroporasyon cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Alan kuvveti 12,5 kV/cm olarak ayarlandı. Paralel direnç 200 ohm, zaman sabiti 4,5 seçildi. Kapasitans 25 µF olarak seçildi. Cihaza ait küvete 40 µL kompetent oligotrofik bakteri aktarıldı. Ardından uygun hacim 50 ng plazmit aktarıldı ve transformasyon gerçekleştirildi. Transformasyonun ardından bakteri-plazmit karışımı 1 mL LB broth besiyerine aktarıldı ve bir saat 35 °C’de inkübe edildi. İnkübasyonun ardından 100 µg/mL Ampisilin içeren agarlara ekim yapıldı. Aynı şekilde *E.coli* JM109’dan izole edilen plazmitlerin ekspresyon suşu olan *E.coli* BL21’e transformasyonu gerçekleştirildi.

3.2.3. Oligotrofik Bakteride *Taq* DNA Polimeraz Ekspresyonu

Transforme hücrelerden, 100 µg/mL ampisilin konsantrasyonunda LB Broth besiyerinde ön kültür hazırlandı. Bir gecenin ardından aynı konsantrasyonda Ampisilin içeren 250 mL LB Broth’a %10 oranında ön kültürden inokülasyon yapıldı. OD₆₀₀’de 0,6 değerine gelinceye kadar 37 °C’de 180 rpm’de inkübe edildi. Kültür, OD₆₀₀’de 0,6 değerine gelince 1 mM IPTG ile indüklemeye yapıldı ve aynı şartlarda bir gece inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından kültür 50 mL’lik falkonlara dağıtıldı ve 6000 rpm’de 30 dakika santrifüj edildi. Ardından süpernatant atıldı ve pelletler saflaştırma yapılmak üzere -80 °C’ye kaldırıldı.

3.2.4. *Taq* DNA Polimeraz Saflaştırılması ve Tanımlanması

3.2.4.1. *Taq* DNA saflaştırılması (59): 50 mL kültürden elde edilen pellet 4 mg/mL lizozim içeren Tampon A’da (50 mM Tris-HCl, 50 mM dekstroz, 1 mM EDTA, pH 7,9) çözüldü. Daha sonra 15 dakika oda sıcaklığında 50 rpm’de inkübasyona bırakıldı. Daha sonra Tampon A ile eşit hacimde Tampon B (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1 mM EDTA, %0,5 Tween-20, %0,5 NP-40, pH 7,9) eklendi. 75 °C’de 1 saat su banyosunda inkübasyona bırakıldı. Son olarak 6000 rpm’de oda sıcaklığında 30 dakika santrifüj edildi ve süpernatant, protein karakterizasyonu ve *Taq* DNA polimeraz aktivitesinin ölçümü için temiz bir eppendorfa aktarıldı.

3.2.4.2. SDS-PAGE (60): Protein denatürasyonu için 9:1 oranında EcoTech 4x Laemmli Tamponu ve 2-Mercaptoetanol, karıştırılarak yükleme boyası oluşturuldu. Yükleme boyası ile örnekler 1:1 oranında karıştırılarak 95 °C’de 10 dakika boyunca ısıtıcı blokta bekletildi. Daha sonra 10 dakika boyunca buzda inkübe edildi. Denatüre olan örnekler +4 °C’ye kaldırıldı.

SDS-PAGE deneyleri BioRad TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Starter Kit, %10 kullanılarak gerçekleştirildi. Cam tabakalar birleştirildi ve ayrıca sabitlendi. Alt jel için kit içerisinde bulunan kimyasallardan uygun hacimlerde eklendi. Kit dışında, alt jel için 30 µL %10 APS ve 3 µL TEMED eklendi. Bu karışım dikkatli bir şekilde cam tabakaların arasına döküldü. Üzerine jelin düzgün polimerleşmesi için yaklaşık 2 mL izopropanol eklendi. Yarım saat polimerizasyon işleminin gerçekleşmesi için beklendi. Ardından izopropanol kurutma kağıdı ile sistemden çekildi ve üst jel yine kit içerisinde bulunan prosedüre göre hazırlandı. Kit dışından, 10 µl %10 APS ve 2 µl TEMED eklendi. Karışım camlar arasına dikkatlice döküldü taraklar yerleştirildi. Yarım saat polimerizasyon gerçekleşmesi için beklendi. Daha sonra ayraçlardan çıkartılan jeller tanka yüklendi. 10x TGS elektroforez tamponu 1x’e seyreltilerek yürütme tamponu olarak kullanıldı. Örnekler her kuyucuğa 20’şer µL olacak şekilde yüklendi ve 120 Volt gerilimde yaklaşık 1 saat yürütme yapıldı.

Jel boyaması için Commasie Blue çözeltisi hazırlandı. Hazırlanması için 250 mL etanol ve 50 mL glasiyel asetik asite Coomassie Brilliant Blue 0,5 gram eklenerek distile su ile 500 mL’ye tamamlandı.

Yürütmenin ardından jel dikkatli bir şekilde camlar arasından çıkarıldı. Ardından bir kutu içerisine hazırlanan Commasie Blue çözeltisi eklendi. Jeller bu çözelti içerisine yatırıldı. 30 dakika oda sıcaklığında 50 rpm’de inkübe edildi. Daha sonra 3 defa distile su ile yıkaması yapıldı. Son olarak tekrar distile su içerisine alındı ve bir gece oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.

SDS-PAGE jellerinin görüntülenmesinde ChemiDoc cihazı kullanıldı. Commasie Blue filtresi ile görüntüler alındı.

3.2.5 Taq DNA Polimeraz Aktivitesi

PCR tamponu olarak laboratuvarında üretilen 1x PCR Tamponu (53) (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, %0,1 Triton X-100, pH 9) hazırlandı. Taq DNA polimerazın aktivite

göstermesi için 4 mM MgCl₂ çözeltisi hazırlandı. dNTP olarak Vazyme 10 mM dNTP Mix kullanıldı. Kalıp DNA olarak Green cGull plazmit dizisi kullanıldı. Plazmit dizisi EK-1'de verilmiştir. PCR reaksiyonlarında kalıp DNA için özel tasarlanmış primerler kullanıldı. Primer sekansları EK-2'de verilmiştir. PCR reaksiyonları için BioRad T100 Polimeraz Zincir Reaksiyonu Cihazı kullanıldı. Agaroz jel yürütmesinde nükleik asit boyası olarak Orange Dye ve Tibo Gold kullanıldı. Agaroz jellerinin görüntülenmesinde ChemiDoc cihazı kullanıldı. SYBER-GOLD filtresi ile görüntüler alındı.

3.2.6 Ölçek Büyütme Çalışmaları

Tez çalışması kapsamında pozitif kontrol olarak kullanılan *E.coli* BL21 ve oligotrofik *K.oxytoca* biyoreaktör çalışmalarında kademeli fermantasyon stratejisi uygulanmıştır. Bu stratejiye göre; serbest oksijen oranı minimum %60, maksimum karıştırma hızı 500 rpm, maksimum havalandırma hızı ise 1,5 Litre/dakika olarak ayarlanmıştır.

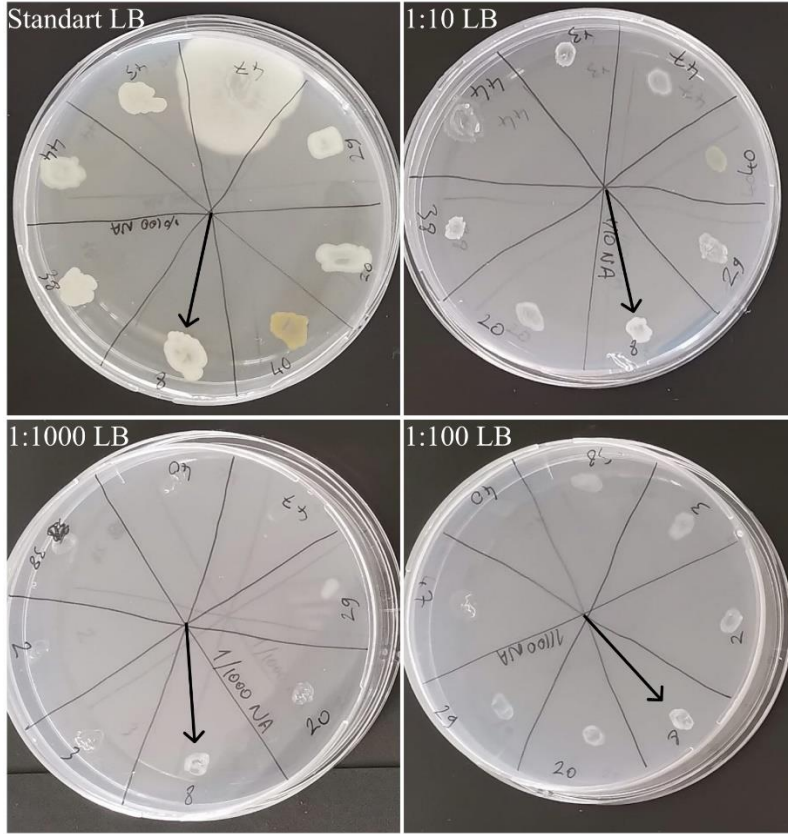
E.coli BL21 standart LB'de 37 °C ve 25 °C, *K.oxytoca* standart LB 37 °C ve 25 °C, *K.oxytoca* 0,1 LB 37 °C ve 25 °C olmak üzere toplam altı farklı koşulda biyoreaktör ortamında ölçek büyütme çalışmaları yapılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. OLİGOTROFİK BAKTERİ SEÇİMİ VE TANIMLANMASI

4.1.1. Oligotrofik Bakteri Seçilmesi

Sırasıyla; standart LB, 10 kat seyrek LB, 100 kat seyrek LB ve 1000 kat seyrek LB agarlarda büyüme yeteneğine sahip 8 numaralı koloni oligotrofik bakteri olarak seçildi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1: 8 numaralı koloninin standart ve seyrek agarlarda büyüme yeteneği

4.1.2. Oligotrofik Bakterinin Filogenetik Olarak Tanımlanması

Seçilen oligotrofik bakteriye DNA izolasyonu ardından, PCR ile amplifikasyon yapıldı. Sekansa gönderilen numunelerin sonucu NCBI veritabanı ile karşılaştırıldı.

Yapılan analiz sonucunda mikroorganizmanın sekansına en yakın benzerlik PCR ile çoğaltılan kısım 16S rRNA bölgesi olduğundan *Klebsiella oxytoca* bakterisinin LUB178 suşu olarak belirlendi.

Tablo 4.1: Seçilen oligotrofik bakterinin NCBI veritabanı ile filogenetik olarak karşılaştırılması

Tanım	Bilimsel İsim	Benzerlik Yüzdesi
<i>Klebsiella oxytoca</i> suşu CAV1015 kromozomu, tüm genom	<i>Klebsiella oxytoca</i>	%99,51
<i>Klebsiella oxytoca</i> suşu LUB178 16S rRNA geni, kısmi dizi	<i>Klebsiella oxytoca</i>	%99,51
<i>Klebsiella oxytoca</i> suşu CAV1335, tüm genom	<i>Klebsiella oxytoca</i>	%99,51
<i>Klebsiella oxytoca</i> suşu CAV1099 tüm genom	<i>Klebsiella oxytoca</i>	%99,51
<i>Klebsiella oxytoca</i> suşu 2022CK-00498 kromozomu, tüm genom	<i>Klebsiella oxytoca</i>	%99,51
<i>Klebsiella oxytoca</i> suşu ST34 kromozomu, tüm genom	<i>Klebsiella oxytoca</i>	%99,51
<i>Klebsiella oxytoca</i> suşu IR5392 kromozomu, tüm genom	<i>Klebsiella oxytoca</i>	%99,51
<i>Klebsiella oxytoca</i> suşu FDAARGOS_1334 kromozomu, tüm genom	<i>Klebsiella oxytoca</i>	%99,51

Tablo 4.1: (devam)

<i>Klebsiella oxytoca</i> suşu RHBSTW-00373 kromozomu, tüm genom	<i>Klebsiella oxytoca</i>	%99,51
<i>Klebsiella oxytoca</i> suşu NCTC 11356 genom düzenegi, kromozom 1	<i>Klebsiella oxytoca</i>	%99,44

4.1.3. Oligotrofik Bakterinin Fenotipik Olarak Tanımlanması

K. oxytoca, fenotipik olarak karakterize edilmesi amacıyla farklı testlere tabi tutulmuştur. Bu testler ışığında, EMB agarda büyüebildiği için Gram-negatif olduğu ve aynı zamanda laktoz ve sakkarozu parçalayabilme yeteneğine sahip olduğu tespit edilmiştir. Katalaz testine tabi tutulduğunda, H₂O₂'yi parçalayabildiği tespit edilmiştir. Yapılan indol testi ile bakterinin triptofanı başarılı şekilde katalize edebildiği gözlemlenmiştir. Metil kırmızı testi ile bakterinin glikozu metabolize edemediği tespit edilmiştir. Arjinin dekarboksilaz testinde bakterinin arjinin dekarboksilaza sahip olmadığı tespit edilmiştir. Lizin dekarboksilaz testinde bakterinin lizin dekarboksilaza sahip olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 4.2: Oligotrofik *K. oxytoca*'nın biyokimyasal test sonuçları

Test	Kontroller	Sonuç
EMB Agar	Pozitif kontrol: <i>Escherichia coli</i> Negatif kontrol: <i>Staphylococcus aureus</i>	+
Katalaz	Pozitif kontrol: <i>Staphylococcus aureus</i> Negatif kontrol: <i>Enterobacter</i> sp.	+

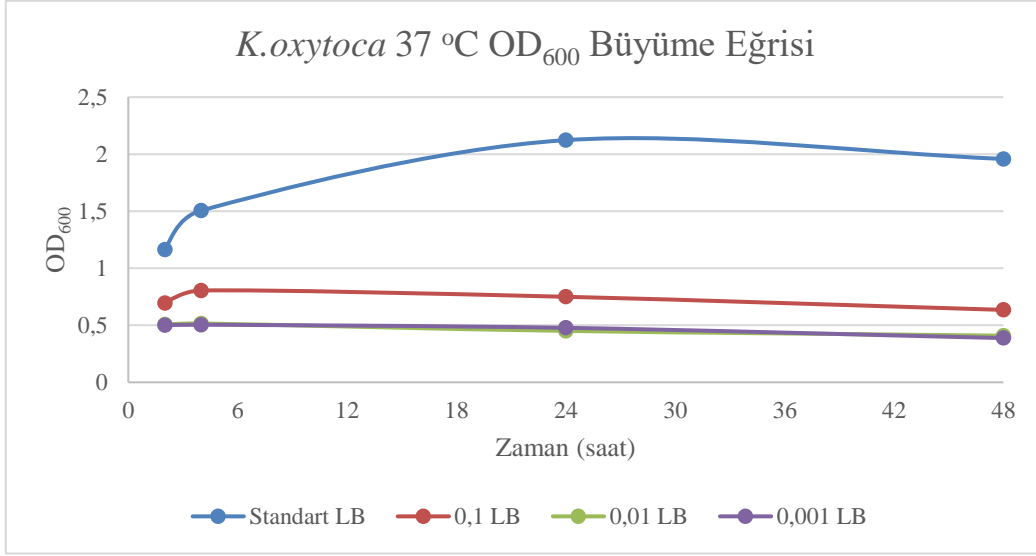
Tablo 4.2: (devam)

İndol	Pozitif kontrol: <i>Escherichia coli</i> Negatif kontrol: <i>Pseudomonas sp.</i>	+
Metil Kırmızı	Pozitif kontrol: <i>Escherichia coli</i> Negatif kontrol: <i>Klebsiella pneumoniae</i>	-
Arjinin Dekarboksilaz	Pozitif kontrol: <i>Enterobacter cloacae</i> Negatif kontrol: <i>Klebsiella pneumoniae</i>	-
Lizin Dekarboksilaz	Pozitif kontrol: <i>Escherichia coli</i> Negatif kontrol: <i>Enterobacter sp.</i>	+

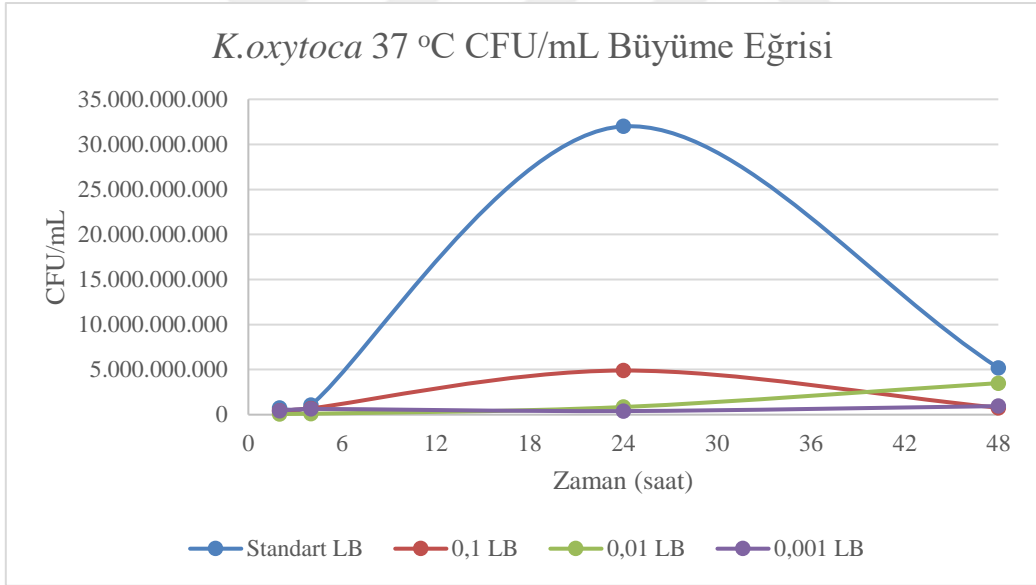
EMB Agar: Eozin Metilen Mavisi

4.1.4. Oligotrofik Bakterinin Büyüme Yeteneğinin Araştırılması

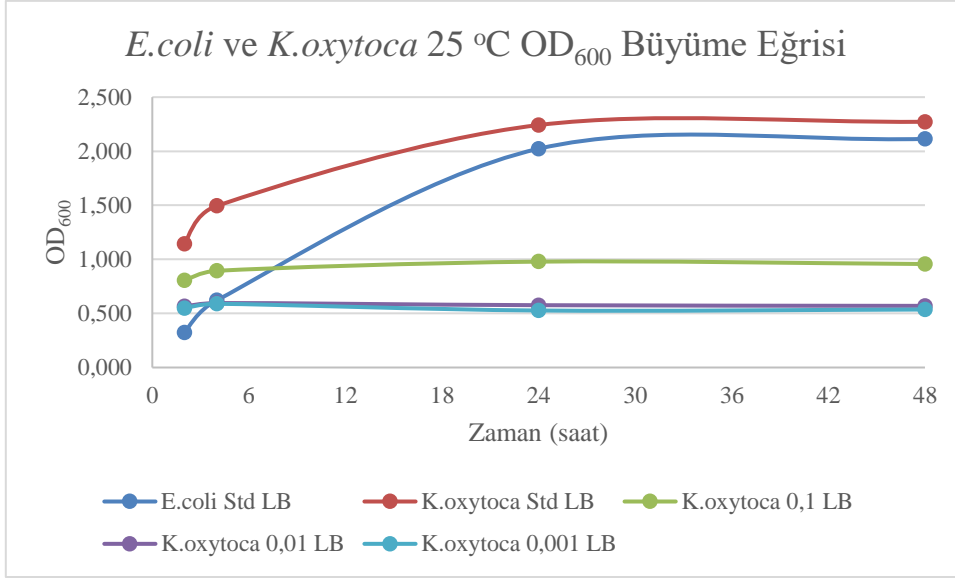
Oligotrofik *K.oxytoca*'nın büyüme verimliliği araştırılması için optimal büyüme sıcaklığı olan 37 °C'de belirli saatlerde OD ve CFU ölçümü yapıldı. Ayrıca olası bir fermantasyon prosesinde kullanılan enerjiyi düşürme potansiyeli taşıyıp taşımadığını araştırmak için oda sıcaklığında belirli zaman aralıklarında OD ve CFU ölçümü yapıldı.



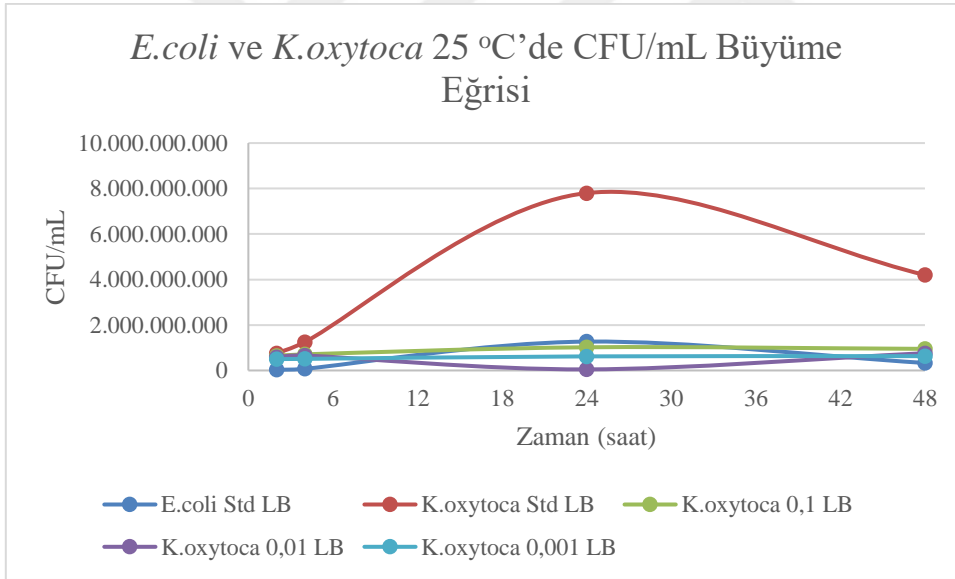
Şekil 4.2: 37 °C’de oligotrofik *K. oxytoca*’nın farklı besiyeri konsantrasyonlarında OD₆₀₀ değerleri



Şekil 4.3: 37 °C’de oligotrofik *K. oxytoca*’nın farklı besiyeri konsantrasyonlarında CFU/mL değerleri



Şekil 4.4: Oda sıcaklığında *E.coli* BL21 ve oligotrofik *K. oxytoca*'nın OD₆₀₀ değerleri



Şekil 4.5: Oda sıcaklığında *E.coli* BL21 ve oligotrofik *K. oxytoca*'nın CFU/mL değerleri

Şekil 4.2'de oligotrofik *K.oxytoca*'nın 37 °C'de farklı besiyeri konsantrasyonlarında büyüme verimliliği araştırılmıştır. Yapılan analize göre oligotrofik *K.oxytoca* 0,1 LB'de verimli bir şekilde büyüme göstermiştir. Ancak 0,01 LB ve 0,001 LB'de verimli bir şekilde büyümemiştir.

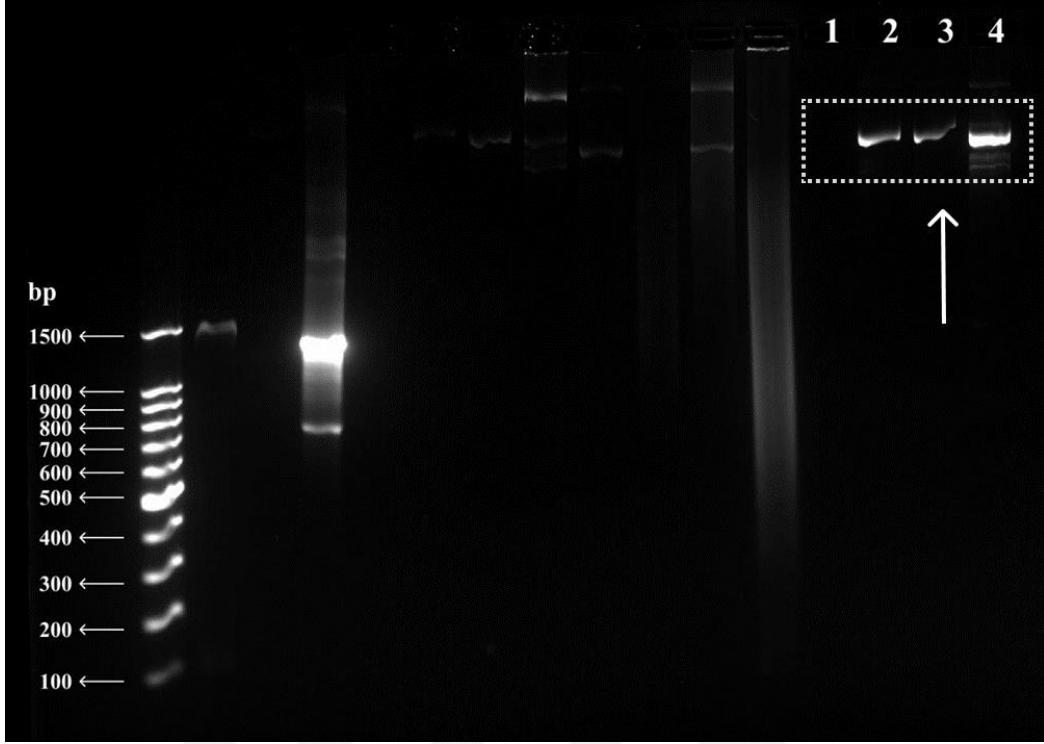
Şekil 4.3’de fermantasyon ortamındaki birey sayısını araştırmak için belirli zaman aralıklarında CFU/mL deneyleri yapılmıştır. İlk analiz, 37 °C’de yapılmıştır. Yirmi dördüncü saatte standart LB’de bulunan oligotrofik *K.oxytoca*’nın, 0,1 LB’de bulunan *K.oxytoca*’dan yaklaşık 6 kat fazla birey oluşturduğu tespit edilmiştir.

Şekil 4.4’de oligotrofik *K.oxytoca*’nın besiyeri maliyetindeki kazancın yanı sıra oda sıcaklığındaki büyüme verimliliği, fermantasyonda standart suş olan *E.coli* BL21 ile karşılaştırılmıştır. Yapılan analiz sonucunda standart LB konsantrasyonlarında oligotrofik bakterinin *E.coli*’den çok daha hızlı şekilde büyüdüğü gözlemlenmiştir. 0,1 LB konsantrasyonunda ikinci ve dördüncü saatlerde standart LB içerisindeki *E.coli*’den daha hızlı ürediği, yirmi dördüncü saatte ikisinin eşitlendiği anlaşılmıştır. Fermantasyon prosesinin değişkenlik göstermekle birlikte genellikle bir günlük süreç olduğundan, bir gün içerisinde oda sıcaklığında 0,1 LB içerisindeki oligotrofik *K.oxytoca*’nın büyüme verimliliği, standart LB içerisindeki *E.coli*’den daha yüksektir.

Şekil 4.5’de CFU/mL ile ilgili bir diğer yapılan deney ise oda sıcaklığındadır. Bu deneyde, oligotrofik *K.oxytoca*’nın farklı LB konsantrasyonlarındaki birey sayısı ile *E.coli* BL21’in standart LB’deki birey sayısı karşılaştırılmıştır. Standart LB’deki oligotrofik *K.oxytoca*’nın birey sayısı ikinci saatte *E.coli* ile neredeyse aynıken, fark dördüncü saatten itibaren açılmış ve yirmi dördüncü saatte maksimuma yaklaşmıştır. Maksimum noktada birey sayısı *E.coli*’den yaklaşık 8 kat fazladır. 0,1 LB’de bulunan *K.oxytoca*’nın birey sayısı ise ikinci, dördüncü ve yirmi dördüncü saatte *E.coli* BL21 ile aynıdır. 0,01 LB ve 0,001 LB’de bulunan *K.oxytoca* ise ikinci ve dördüncü saatte *E.coli* ile yaklaşık aynıken, sonraki saatlerde *E.coli* ile rekabet edemeyecek kadar düşüktür. Büyüme verimliliği açısından, oda sıcaklığında 0,1 LB’de bulunan oligotrofik *K.oxytoca*’yı ekspresyon suşu olarak kullanmak, yine oda sıcaklığında bulunan standart LB’deki *E.coli*’yi ekspresyon suşu olarak kullanmak ile eşdeğerdir.

4.2. TRANSFORMASYONUN DOĞRULANMASI

İlgili plazmitin oligotrofik *K.oxytoca*’ya başarıyla transfer edilip edilmediğini araştırmak için plazmit izolasyonları yapılmış ve ürünleri agaroz jelde yürütülmüştür.



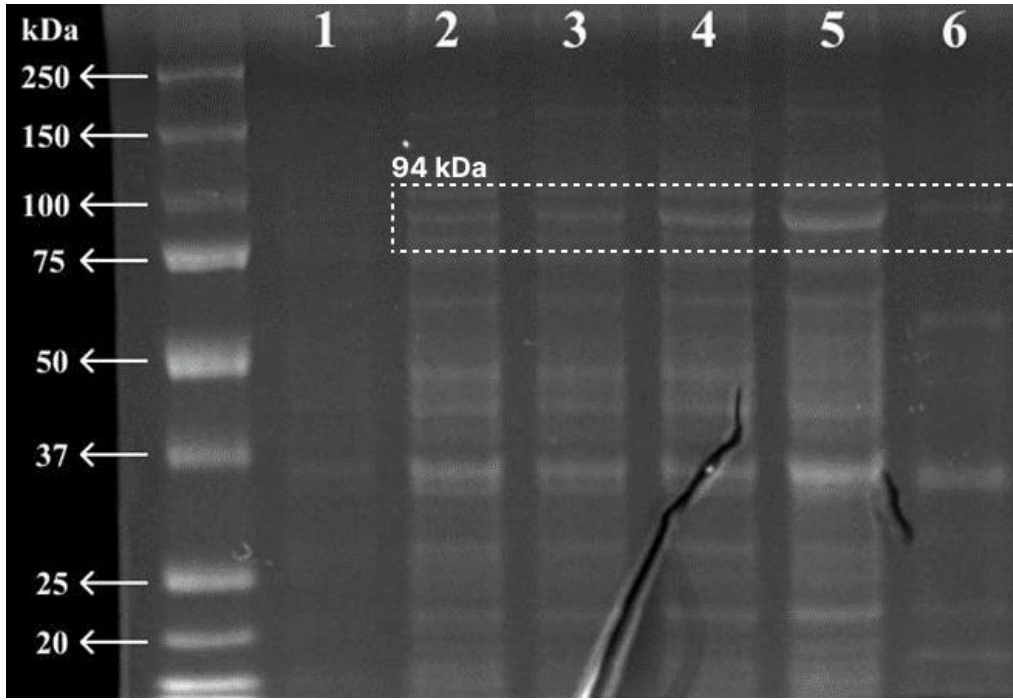
Resim 4.1: İzole edilen plazmitlerin agaroz jel görüntüsü.

Resim 4.1’de 1 numaralı kuyu, transforme olmamış *K.oxytoca*’ya PureYield™ Plasmid Miniprep Sistem ile muamele edilmiş örnektir. İkinci ve üçüncü kuyular PureYield™ Plasmid Miniprep Sistem ile plazmitleri izole edilmiş *E.coli* JM109 hücrelerini dördüncü kuyu ise yine aynı kit ile izole edilmiş oligotrofik *K.oxytoca* hücrelerini göstermektedir.

Resim 4.1’deki sonuçlara göre oligotrofik *K.oxytoca* transformasyon öncesinde herhangi bir plazmit izine rastlanmazken, transformasyondan sonra plazmitin kaynak hücresi olan *E.coli* JM109 ile aynı baz çifti uzunluğunda plazmite sahip olduğu bulunmuştur.

4.3. TAQ DNA POLİMERAZ EKSPRESYONUNUN SDS-PAGE ile DOĞRULANMASI

Taq DNA polimeraz enziminin *E.coli* BL21’de ve oligotrofik *K.oxytoca*’da eksprese edildiğini doğrulamak için fermantasyon sırasında zamana bağlı örnekler alınarak SDS-PAGE analizi yapılmıştır (Resim 4.2 ve Resim 4.3). Daha sonra saflaştırılmış örnekler ile SDS-PAGE analizi yapılmıştır (Resim 4.4).

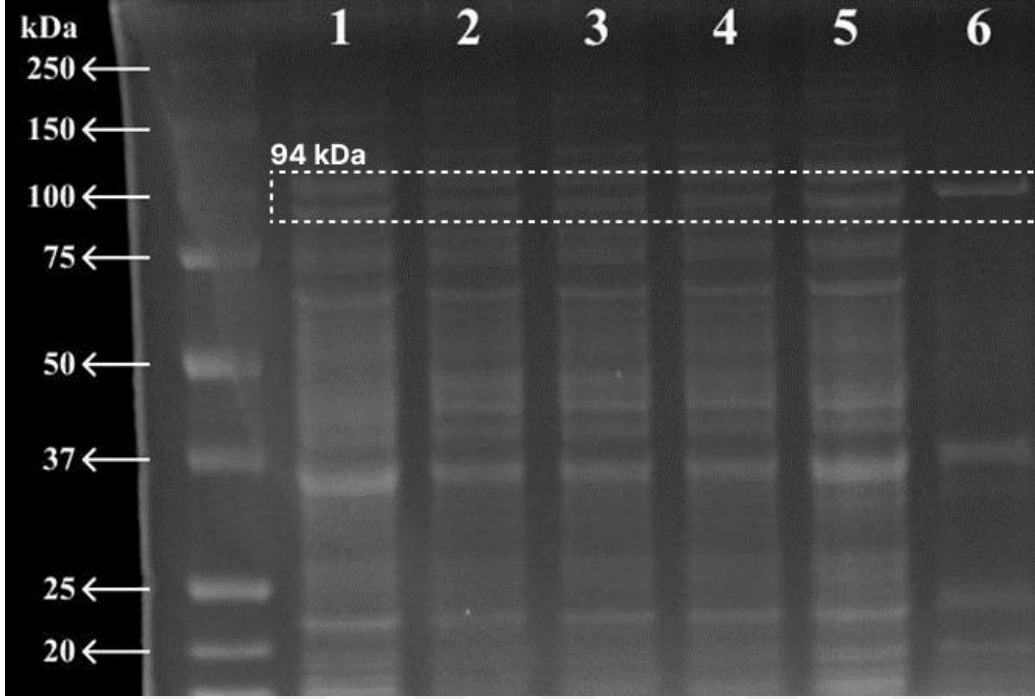


Resim 4.2: *E.coli* BL21 zamana bağlı olarak alınan SDS-PAGE görüntüsü.

Resim 4.2’de birinci kuyu ön kültür, ikinci kuyu IPTG indüklenme sonrası ikinci saat, üçüncü kuyu IPTG sonrası dördüncü saat, dördüncü kuyu IPTG sonrası altıncı saat, beşinci kuyu IPTG indüklemenin bir gece sonrasında alınan örneklerdir. Bu örnekler saflaştırma protokolü uygulanmadan denatürasyon protokolü ile SDS-PAGE yapılmıştır. Altıncı kuyu ise, bir gece IPTG’de bekletilen örneğin saflaştırma protokolü uygulanmış örnektir. Bu örnek PCR reaksiyonu başarılı olan örnektir.

Resim 4.2’deki sonuçlara göre *E.coli* BL21 hücresinde IPTG sonrası zamanda 94 kDa’da zaman bağlı olarak bant kalınlaşması gözlemlenmiştir. Altıncı kuyucukta ise yine *E.coli* BL21’den elde edilmiştir ve 94 kDa net bir bant gözükmektedir. Altıncı

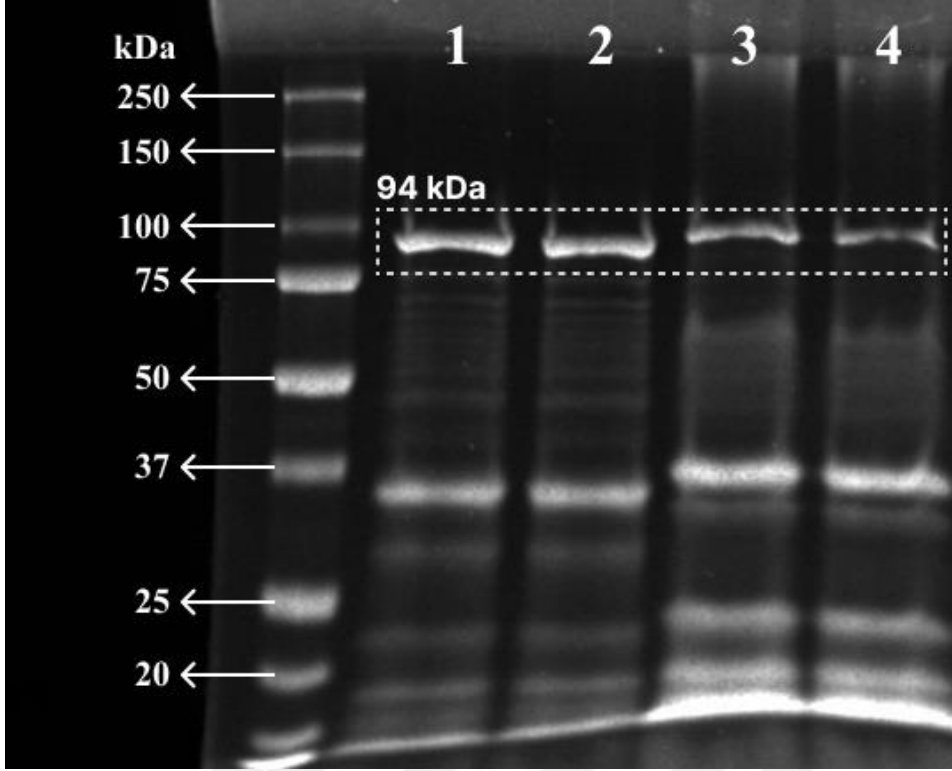
kuyuya yüklenen süpernatanttan alınan örnek ile kurulan PCR reaksiyonu pozitif sonuç vermiştir.



Resim 4.3: Transforme oligotrofik *Klebsiella oxytoca*'nın zamana bağlı olarak alınan SDS-PAGE görüntüsü.

Resim 4.3'de birinci kuyu ön kültür, ikinci kuyu IPTG indüklenme sonrası ikinci saat, üçüncü kuyu IPTG sonrası dördüncü saat, dördüncü kuyu IPTG sonrası altıncı saat, beşinci kuyu IPTG indüklemenin bir gece sonrasında alınan örneklerdir. Altıncı kuyu ise, bir gece IPTG'de bekletilen örneğin saflaştırma protokolü uygulanmış örnektir. Bu örneğin PCR reaksiyonu başarılı olamamıştır.

Resim 4.3'deki sonuçlara göre oligotrofik *K.oxytoca*'da tıpkı *E.coli* BL21'deki gibi 94 kDa'da *Taq* DNA polimeraz bantları görülmektedir. Ancak bu bantlar zamana bağlı olarak kalınlaşma göstermemiştir.



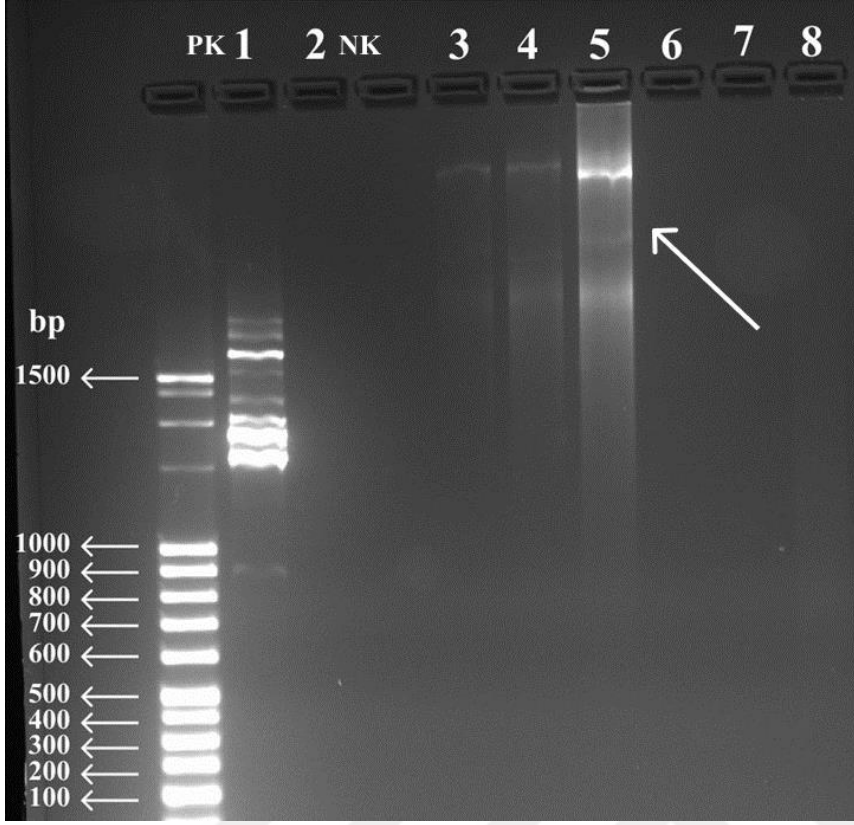
Resim 4.4: *E.coli* BL21 ve oligotrofik *K.oxytoca*'nın SDS-PAGE görüntüsü.

Resim 4.4'de ilk iki kuyu pozitif kontrol olan *E.coli* BL21 hücrelerinden elde edilen saflaştırılmış protein örnekleridir. Üçüncü ve dördüncü kuyu ise transforme oligotrofik *K.oxytoca*'dan elde edilmiş süpernatant örnekleridir.

Resim 4.4'a göre, *E.coli* BL21 ve oligotrofik *K.oxytoca* net şekilde 94 kDa'da bant içermektedir.

4.4. *TAQ* DNA POLİMERAZ AKTİVİTESİ

Tez kapsamında *E.coli* BL21 ve oligotrofik *K.oxytoca*'dan elde edilen *Taq* DNA polimeraz ile *E.coli* bakteriyel genomik DNA ve evrensel 16S rRNA 27F ve 1492R primerleri ile PCR reaksiyonları kurulmuştur. Bu PCR reaksiyonların ürünleri agaroz jelde yürütülmüştür. Agaroz jel görüntüsü Resim 4.5'de verilmiştir.



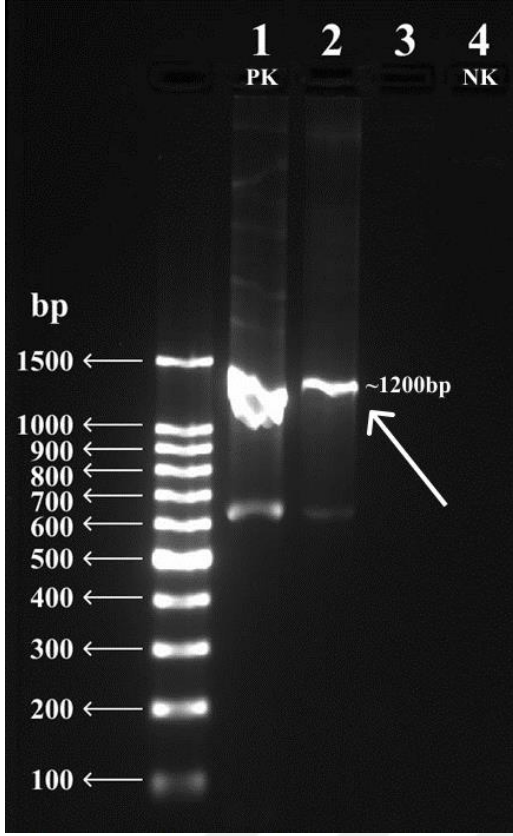
Resim 4.5: Tez kapsamında elde edilen *Taq* DNA polimerazlar ile kurulan PCR ürünlerinin agaroz jelde meydana gelen leke görüntüsü.

Resim 4.5 kurulan PCR reaksiyonlarının leke görüntüsünden dolayı net bir nükleik asit bandı elde edilememiştir ve reaksiyonlar başarısız olmuştur. Kuyu içerikleri Tablo 4.3’de verilmiştir.

Tablo 4.3: Kalıp DNA olarak bakteriyel genomik DNA ile kurulan PCR ürünlerinin Resim 4.5'deki agaroz jel içerikleri

Kuyu Sırası	100 ng/ μ L kalıp DNA	10 μ M 27F primer	10 μ M 1492R primer	2x ticari PCR tamponu	<i>E.coli</i> BL21 süpernatant	Transforme oligotrofik <i>K.oxytoca</i> süpernatant	Ticari <i>Taq</i> DNA polimeraz	Nükleaz içermeyen su	Toplam hacim
1.kuyu (PK)	1 μ L	1 μ L	1 μ L	12,5 μ L			1 μ L	13,5 μ L	30 μ L
2. kuyu (NK)	1 μ L	1 μ L	1 μ L	12,5 μ L				14,5 μ L	30 μ L
3. kuyu	1 μ L	1 μ L	1 μ L	12,5 μ L	2 μ L			12,5 μ L	30 μ L
4. kuyu	1 μ L	1 μ L	1 μ L	12,5 μ L	4 μ L			10,5 μ L	30 μ L
5. kuyu	1 μ L	1 μ L	1 μ L	12,5 μ L	10 μ L			4,5 μ L	30 μ L
6. kuyu	1 μ L	1 μ L	1 μ L	12,5 μ L		2 μ L		12,5 μ L	30 μ L
7. kuyu	1 μ L	1 μ L	1 μ L	12,5 μ L		4 μ L		10,5 μ L	30 μ L
8. kuyu	1 μ L	1 μ L	1 μ L	12,5 μ L		10 μ L		4,5 μ L	30 μ L

μ L: mikrolitre. μ M: mikromolar. mM: milimolar. ng: nanogram. NK: negatif kontrol. PK: pozitif kontrol. *K.oxytoca*: *Klebsiella oxytoca*. *E.coli*: *Escherichia coli*. DNA: deoksiribo nükleik asit. dNTP: deoksiribo nükleotid trifosfat. PCR: polimeraz zincir reaksiyonu.



Resim 4.6: Tez kapsamında üretilen *Taq* DNA polimerazlar ile laboratuvarında üretilmiş PCR tamponu ile kurulmuş PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.

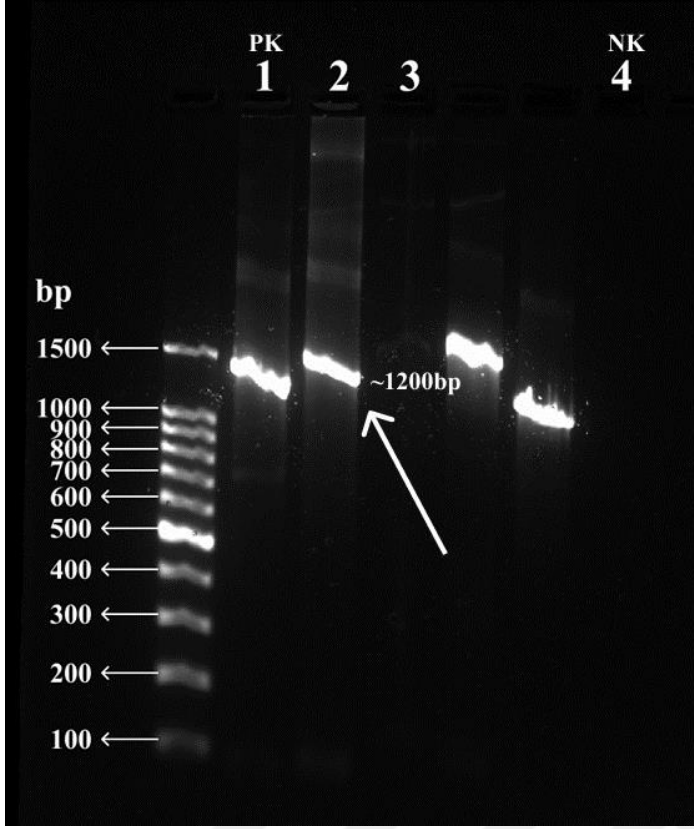
Resim 4.6'da ok, *E.coli* BL21'den üretilen *Taq* DNA polimeraz ile hazırlanan ve başarılı olmuş PCR reaksiyonunu göstermektedir. Kuyu içerikleri Tablo 4.4'de verilmiştir.

Tablo 4.4: Laboratuvarıda üretilen PCR tamponuyla pozitif sonuç alınan Resim 4.6'daki agaroz jeldeki PCR ürünlerinin içerikleri

Kuyu Sırası	100 ng/ μ L kalıp DNA	10 μ M geri primer	10 μ M ileri primer	Ticari <i>Taq</i> DNA polimeraz	Üretilen PCR tamponu	<i>E.coli</i> BL21 süpernatant	Transfome oligotrofik <i>K.oxytoca</i> süpernatant	25 mM MgCl ₂	100 μ M dNTP karışımı	Toplam hacim
1. kuyu (PK)	1 μ L	1 μ L	1 μ L	1 μ L	18 μ L			2 μ L	1 μ L	25 μ L
2. kuyu	1 μ L	1 μ L	1 μ L		17 μ L	2 μ L		2 μ L	1 μ L	25 μ L
3. kuyu	1 μ L	1 μ L	1 μ L		17 μ L		2 μ L	2 μ L	1 μ L	25 μ L
4. kuyu (NK)	1 μ L	1 μ L	1 μ L		19 μ L			2 μ L	1 μ L	25 μ L

μ L: mikrolitre. μ M: mikromolar. mM: milimolar. ng: nanogram. NK: negatif kontrol. PK: pozitif kontrol. *K.oxytoca*: *Klebsiella oxytoca*. *E.coli*: *Escherichia coli*. DNA: deoksiribo nükleik asit. dNTP: deoksiribo nükleotid trifosfat. PCR: polimeraz zincir reaksiyonu. MgCl₂: magnezyum klorür.

Resim 4.6'ya göre, tez kapsamında laboratuvarıda üretilmiş PCR tamponu ve *E.coli* BL21 süpernatantı ile kurulan PCR reaksiyonu pozitif sonuç vermiştir. Ancak oligotrofik *K.oxytoca* süpernatantı ile kurulan PCR reaksiyonu başarılı sonuç vermemiştir.



Resim 4.7: Tez kapsamında üretilen *Taq* DNA polimerazlar ile ticari PCR tamponu ile kurulmuş PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.

Resim 4.7'e göre, ticari PCR tamponu ve *E.coli* BL21 süpernatantı ile kurulan PCR reaksiyonu pozitif sonuç vermiştir. Kuyu içerikleri Tablo 4.5'de verilmiştir.

Tablo 4.5: Ticari PCR tamponuyla pozitif sonuç alınan Resim 4.7'deki agaroz jeldeki PCR ürünlerinin içerikleri

Kuyu Sırası	100 ng/ μ L kalıp DNA	10 μ M geri primer	10 μ M ileri primer	Ticari <i>Taq</i> DNA polimeraz	Ticari 10x PCR tamponu	<i>E.coli</i> BL21 süpernatant	Transfome oligotrofik <i>K.oxytoca</i> süpernatant	100 μ M dNTP	Nükleaz içerme yen su	Toplam hacim
1. kuyu (PK)	1 μ L	1 μ L	1 μ L	1 μ L	2,5 μ L			1 uL	17,5 μ L	25 μ L
2. kuyu	1 μ L	1 μ L	1 μ L		2,5 μ L	2 μ L		1 uL	16,5 μ L	25 μ L
3. kuyu	1 μ L	1 μ L	1 μ L		2,5 μ L		2 μ L	1 μ L	16,5 μ L	25 μ L
4. kuyu (NK)	1 μ L	1 μ L	1 μ L		2,5 μ L			1 uL	18,5 μ L	25 μ L

μ L: mikrolitre. μ M: mikromolar. mM: milimolar. ng: nanogram. NK: negatif kontrol. PK: pozitif kontrol. *K.oxytoca*: *Klebsiella oxytoca*. *E.coli*: *Escherichia coli*. DNA: deoksiribo nükleik asit. dNTP: deoksiribo nükleotid trifosfat. PCR: polimeraz zincir reaksiyonu.

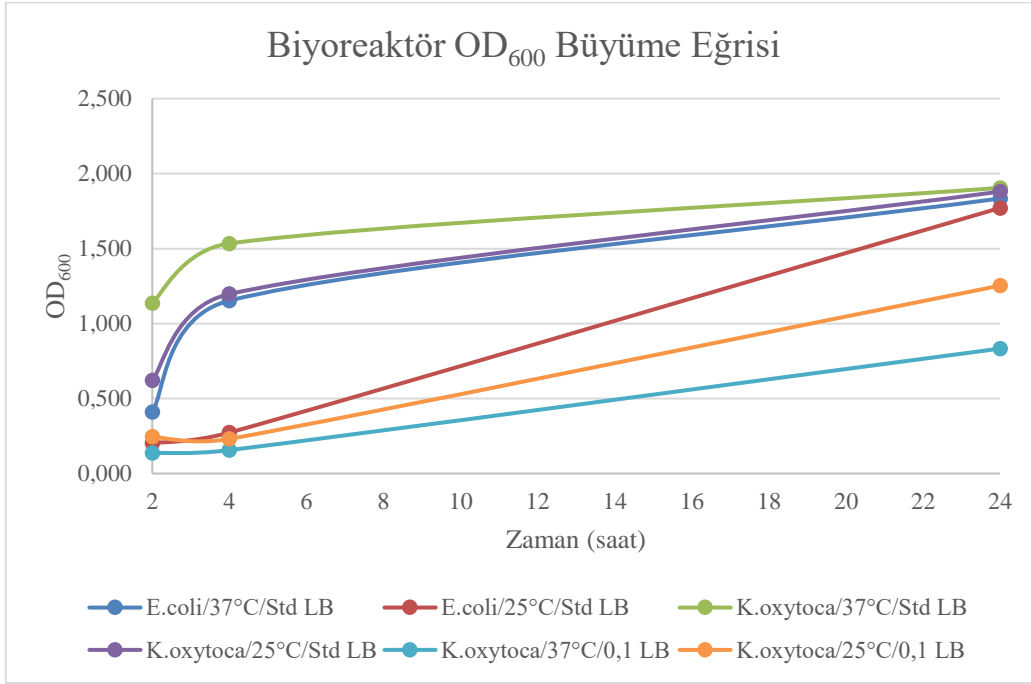
Resim 4.7'de ok ile gösterilen kuyu, ticari PCR tamponu ve *E.coli* BL21 süpernatantı ile kurulan PCR reaksiyonu pozitif sonuç vermiştir. Ancak oligotrofik *K.oxytoca* süpernatantı ile kurulan PCR reaksiyonu başarılı sonuç vermemiştir.

4.5. ÖLÇEK BÜYÜTME ÇALIŞMALARI

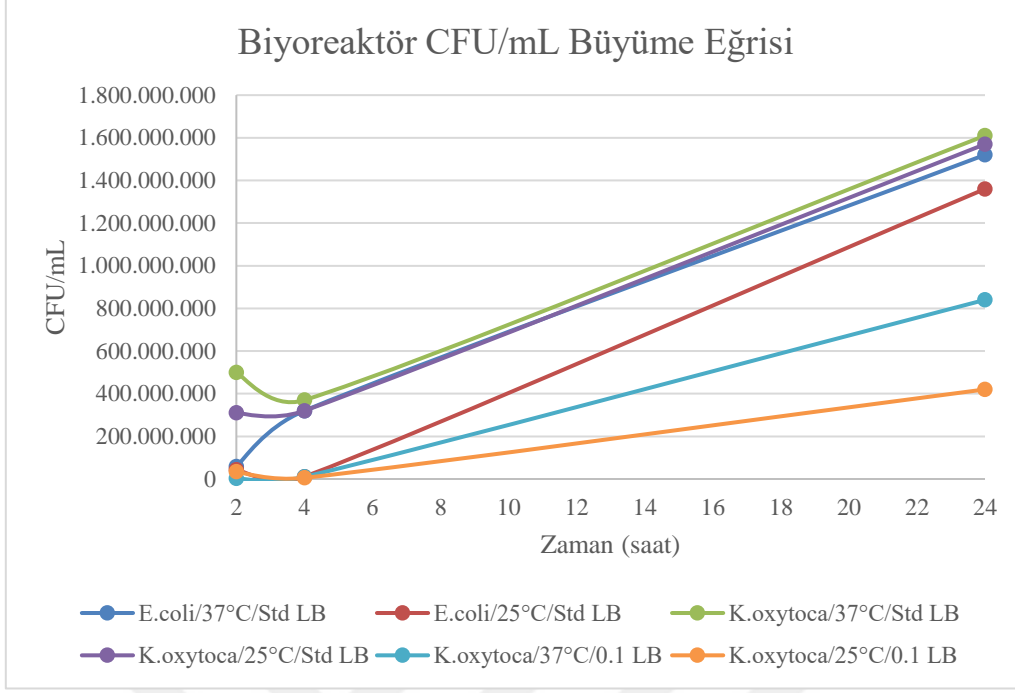
Ölçek büyütme çalışmaları kapsamında, 6 farklı grupta çalışılmıştır (Tablo 4.6). Bu gruplardan ikinci, dördüncü ve yirmi dördüncü saatlerde örnekler alınarak biyoreaktör ortamında büyüme verimliliği araştırılmıştır (Şekil 4.6 ve Şekil 4.7).

OD sonuçlarına göre, oligotrofik *K.oxytoca* 37 °C’de en verimli büyümeyi gerçekleştiren grup olmuştur. Yirmi dördüncü saatin sonunda 0,1 LB dışındaki gruplar yaklaşık aynı OD₆₀₀ değerlerine ulaşmıştır.

CFU sonuçları OD₆₀₀ sonuçları ile benzer sonuçlar vermiştir. Ancak yirmi dördüncü saatte 0,1 LB’de oda sıcaklığında oligotrofik *K.oxytoca* daha fazla birey oluşturmuştur.

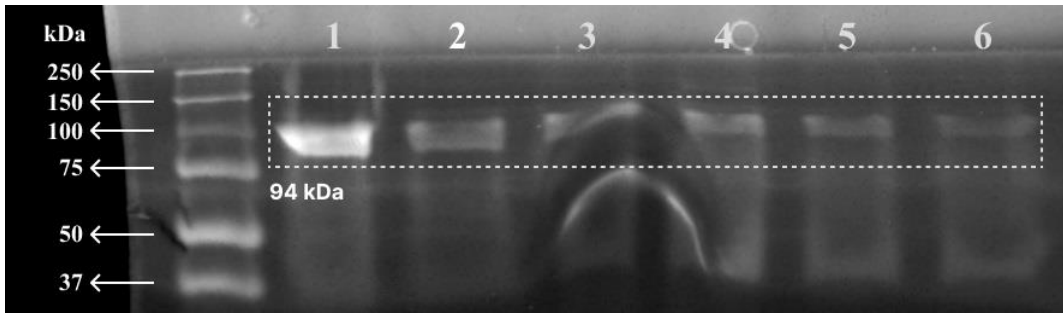


Şekil 4.6: Biyoreaktör ortamında OD büyüme eğrisi



Şekil 4.7: Biyoreaktör ortamında CFU/mL büyüme eğrisi

Taq DNA polimerazın oligotrofik *K. oxytoca*'da endüstriyel ölçekteki üretimi hakkında bilgi sahibi olmak amacıyla ölçek büyütme çalışmaları yapılmıştır. Ölçek büyütme çalışmalarında elde edilen SDS-PAGE görüntüsü Resim 4.8'de, kurulan PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü ise Resim 4.9'da verilmiştir.



Resim 4.8: Ölçek büyütme çalışmaları kapsamında; *E. coli* BL21 ve oligotrofik *K. oxytoca*'nın farklı sıcaklıklar ve farklı LB konsantrasyonlarından elde edilen süpernatantların SDS-PAGE görüntüsü.

Resim 4.8'e göre, tüm gruplarda *Taq* DNA polimeraz ekspresyonu gözlemlenmiştir. Kuyu içerikleri Tablo 4.6'da verilmiştir.

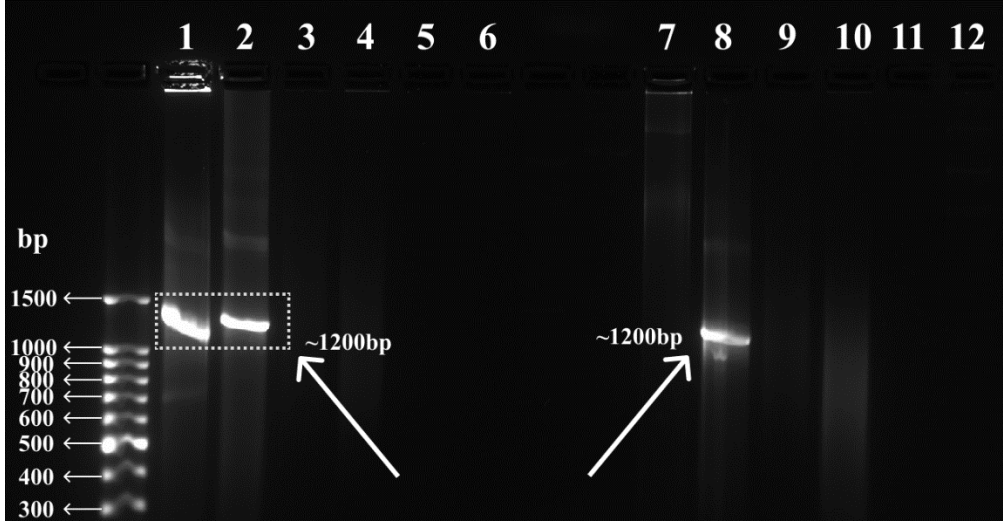
Tablo 4.6: Şekil 4.13’deki örneklerin elde edildiği biyoreaktörlerde çalışılan bakteri, sıcaklık ve LB değişkenleri

Kuyu sırası	<i>E.coli</i> BL21	Oligotrofik <i>K.oxytoca</i>	37 °C	25 °C	Standart LB	0,1 LB
1.kuyu	✓		✓		✓	
2.kuyu	✓			✓	✓	
3.kuyu		✓	✓		✓	
4.kuyu		✓		✓	✓	
5.kuyu		✓	✓			✓
6.kuyu		✓		✓		✓

K.oxytoca: *Klebsiella oxytoca*. *E.coli*: *Escherichia coli*. DNA: deoksiribo nükleik asit. LB: Luria-Bertani besiyeri.

Birinci kuyu; 37 °C’de, standart LB içeren biyoreaktör ortamında ekspresyon bakterisi olarak kullanılan *E.coli* BL21’den elde edilen süpernatant, ikinci kuyu; 25 °C’de, standart LB içeren biyoreaktör ortamında, ekspresyon bakterisi olarak kullanılan *E.coli* BL21’den elde edilen süpernatant, üçüncü kuyu; 37 °C’de, standart LB içeren biyoreaktör ortamında ekspresyon bakterisi olarak oligotrofik *K.oxytoca*’dan elde edilen süpernatant, dördüncü kuyu; 25 °C’de standart LB içeren biyoreaktör ortamında ekspresyon bakterisi olarak oligotrofik *K.oxytoca*’dan elde edilen süpernatant, beşinci kuyu; 37 °C’de, 0,1 LB içeren biyoreaktör ortamında ekspresyon bakterisi olarak oligotrofik *K.oxytoca*’dan elde edilen süpernatant, altıncı kuyu; 25 °C’de, 0,1 LB içeren biyoreaktör ortamında ekspresyon bakterisi olarak oligotrofik *K.oxytoca*’dan elde edilen süpernatant örneklerini içermektedir.

Ölçek büyütme çalışmalarında tüm gruplarda 94 kDa’da net bir bant görüntüsü vardır.



Resim 4.9: Ölçek büyütme operasyonlarında *E.coli* BL21 ve oligotrofik *K.oxytoca*'nın farklı sıcaklıklar ve farklı LB konsantrasyonlarından elde edilen süpernatantlar ile kurulan PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.

Resim 4.9'da bir iki ve sekizinci kuyularda PCR reaksiyonu pozitif sonuç vermiştir. Reaksiyonun pozitif sonuç verdiği tüm gruplarda süpernatant *E.coli* BL21'den elde edilmiştir. Birinci ve ikinci kuyularda laboratuvarında üretilmiş PCR tamponu kullanılmış, sekizinci Kuyuda ise ticari PCR tamponu kullanılmıştır. Oligotrofik *K.oxytoca* süpernatantları ile kurulan hiçbir reaksiyon pozitif sonuç vermemiştir. Reaksiyon içerikleri Tablo 4.6'da verilmiştir.

Tablo 4.7: Ölçek büyütme çalışmalarında Resim 4.9'daki PCR içerikleri ve agaroz jel sıralaması

Ku yu Sır ası	100 ng/ μ L kalp DNA	10 m μ geri pri mer	10 μ M ileri prime r	Üretil en PCR tamp onu	Ticar i 10x PCR tamp onu	<i>E.coli</i> BL21 süpernatnt	Transforme oligotrofik <i>K.oxytoca</i> süpernatant	100 mM dNTP	25 mM Mg Cl ₂	Nü klea z içer mey en Su	Topla m hacim
1. kuy u	1 μ L	1 μ L	1 μ L	17 μ L		2 μ L (37 °C, Standart LB)		1 μ L	2 μ L		25 μ L
2. kuy u	1 μ L	1 μ L	1 μ L	17 μ L		2 μ L (25 °C, Standart LB)		1 μ L	2 μ L		25 μ L
3. kuy u	1 μ L	1 μ L	1 μ L	17 μ L			2 μ L (37 °C, Standart LB)	1 μ L	2 μ L		25 μ L
4. kuy u	1 μ L	1 μ L	1 μ L	17 μ L			2 μ L (25 °C, Standart LB)	1 μ L	2 μ L		25 μ L
5. kuy u	1 μ L	1 μ L	1 μ L	17 μ L			2 μ L (37 °C, 0,1 LB)	1 μ L	2 μ L		25 μ L
6. kuy u	1 μ L	1 μ L	1 μ L	17 μ L			2 μ L (25 °C, 0,1 LB)	1 μ L	2 μ L		25 μ L
7. kuy u	1 μ L	1 μ L	1 μ L		2,5 μ L	2 μ L (37 °C, Standart LB)		1 μ L		16,5 μ L	25 μ L

Tablo 4.7: (devam)

8. kuy u	1 µL	1 µL	1 µL		2,5 µL	2 µL (25 °C, Standart LB)		1 µL		16,5 µL	25 µL
9. kuy u	1 µL	1 µL	1 µL		2,5 µL		2 µL (37 °C, Standart LB)	1 µL		16,5 µL	25 µL
10. kuy u	1 µL	1 µL	1 µL		2,5 µL		2 µL (25 °C, Standart LB)	1 µL		16,5 µL	25 µL
11. kuy u	1 µL	1 µL	1 µL	2,5 µ			2 µL (37 °C, 0,1 LB)	1 µL		16,5 µL	25 µL
12. kuy u	1 µL	1 µL	1 µL	2,5 µ			2 µL (25 °C, 0,1 LB)	1 µL		16,5 µL	25 µL

µL: mikrolitre. µM: mikromolar. mM: milimolar. ng: nanogram. NK: negatif kontrol. PK: pozitif kontrol. *K.oxytoca*: *Klebsiella oxytoca*. *E.coli*: *Escherichia coli*. DNA: deoksiribo nükleik asit. dNTP: deoksiribo nükleotid trifosfat. PCR: polimeraz zincir reaksiyonu. MgCl₂: magnezyum klorür. LB: Luria-Bertani Besiyeri.

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında oligotrofik özellik taşıyan bakteride *Taq* rekombinant DNA polimeraz ekspresyonu yapılmış ve edilen *Taq* DNA polimerazın aktivitesi PCR ile test edilmiştir.

Ho ve arkadaşlarına göre oligotrofik bakterilerin ekolojik dağılımları hakkında literatürde net bir şekilde karşılığı yoktur (1). Bu nedenle tez kapsamında, standart LB'nin yanında; 1:10, 1:100 ve 1:1000 oranlarında seyreltilmiş LB'lerde büyüme yeteneği gösteren bakteriler oligotrofik bakteri olarak tanımlanmıştır. Bu bakterilerden 8 numaralı organizma *Taq* DNA polimeraz için ekspresyon suşu olarak seçilmiştir (Şekil 4.1). Seçilen bakterinin filogenetik olarak tanımlanması için 16S rRNA dizilemesi yapılmıştır. Bakterilerde temel işlev genleriyle tanımlama alanında 16S rRNA tanımlaması en sık kullanılan yöntemlerden biridir. Wang ve arkadaşlarına göre, bu yöntemde DNA-DNA etkileşimi kullanıldığından en yakın akraba olan bakterilerin bile ayırımına olanak sağlar (61). 16S rRNA dizilemesi sonrasında yapılan filogenetik analiz, 8 numaralı mikroorganizmanın %99.51 doğruluk oranında *Klebsiella oxytoca* olarak sonuç vermiştir. Literatürde %97'nin altındaki benzerlik oranına ait benzerlikler farklı tür olarak sınıflandırılmaktadır (62). Bu veriler göz önüne alındığında seçilen oligotrofik bakteri, *Klebsiella oxytoca* olarak tanımlanmıştır. Seçilen *K. oxytoca*'nın biyokimyasal testleri yapılmıştır. Gram-negatif bakteriler seçici besiyeri olan EMB besiyerinde *K. oxytoca*, Vanhooren'ın literatüre bildirdiği sonuç ile uyumlu şekilde gram negatiftir (63). Katalaz testinde seçilen organizmanın, Vanhooren ve arkadaşlarının *K. oxytoca* için literatürde bildirdiği şekilde hidrojen peroksiti başarı ile ayrıştırabildiği görülmüş ve katalaz pozitif sonuç vermiştir (63). Seçilen organizma *K. oxytoca*'nın Maslow ve arkadaşlarının literatürdeki bilgisiyle uyumlu olarak indol pozitif sonuç vermiştir (64). Fenotipik özelliği araştırılan organizma, Rath ve arkadaşlarının *K. oxytoca* için literatüre bildirdiği sonuçları ile uyumlu şekilde metil kırmızı testinde sarı halk gözlemlenerek negatif sonuç vermiştir (65). Seçilen organizma Lal ve arkadaşlarının Amerikan Mikrobiyoloji Derneği'nde yayınlanan makaleye göre *K. oxytoca* ile uyumlu şekilde arjinin dekarboksilaz negatiftir (66). Oligotrofik *K. oxytoca*, Hansen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya ve Amerikan Mikrobiyoloji Derneği'nin sonuçlarıyla uyumlu şekilde pozitif grup ile beraber besiyerinde mavi renk oluşturmuştur (66,67).

Fermentasyon teknolojisi, kimyasal üretim ile olan rekabetinde maliyet ve zaman açısından geridedir. Fermentasyonun geleceğinde enerji tasarrufu sayesinde kimyasal üretim ile rekabeti için önemli bir kazanım olacağı tahmin edilmektedir. Bunun nedenle Chen ve arkadaşlarına göre, 25 °C'den 50 °C'ye kadar olan geniş bir spektrumda verimli şekilde büyüme gösterebilen organizmalar fermentasyonun geleceği açısından önemli bir potansiyel taşımaktadır (69). Yapılan analizler sonucunda *K.oxytoca*'yı optimal sıcaklıkta 0,1 oranında seyreltilmiş LB besiyerinde büyüme verimi ile, standart ekspresyon suşu olan *E.coli* BL21'i standart LB'de büyüme veriminin benzer olduğu sonucuna varılmıştır. Bu sonuçlara göre, oligotrofik *K.oxytoca* ile yapılan fermentasyon işleminde besiyeri maliyetinin 1:10 oranında seyreltilerek kullanılma potansiyeli taşımaktadır. Fermentasyon teknolojisinde besiyeri maliyeti tüm fermentasyon proses maliyetinin %30'undan sorumlu olduğundan, besiyeri maliyetindeki 1:10 oranında azalması durumunda, genel verimlilik formülüne göre (Verim = Çıktı / Girdi) tüm sürecin verimliliği %37 oranında artacaktır.

Tez kapsamında kullanılan pUC18 plazmiti, *Taq* DNA polimeraz kodlayan ve antibiyotik seçilimi olarak ampisilin direnç geni içermektedir. *K.oxytoca*'nın geniş spektrumda β-laktamaz üreten bir bakteri olduğundan ampisiline karşı antibiyotik direnci bulunmaktadır (70,71). Bu nedenle antibiyotik seçilimi ile transformasyon doğrulaması yapılamamıştır. Ancak yapılan plazmit izolasyonu sayesinde *Taq* DNA polimerazı kodlayan pUC18 plazmitinin oligotrofik *K.oxytoca* hücrelerine verimli bir şekilde aktarıldığı anlaşılmıştır.

Taq DNA polimerazın ekspresyonunun analizi için yapılan SDS-PAGE çalışmalarında, *E.coli* BL21 ve oligotrofik *K.oxytoca*'dan 94 kDa civarında kalın bantlar elde edilmiştir. Roayaei ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalara göre *Taq* DNA polimerazın 94 kDa olduğu bilinmektedir (72). Resim 4.3'de IPTG indüklemesi olmayan ön kültürü barındıran kuyuda da zayıf bir bant gözükmemektedir. Her ne kadar bu görüntü soru işareti yaratsa da, Fang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda SDS-PAGE'de IPTG indüklemesinden önce *Taq* DNA polimeraz bantlarına rastlanabilmektedir (73). Bu nedenle oligotrofik *K.oxytoca*'nın *Taq* DNA polimerazı başarılı şekilde eksprese ettiği sonucuna ulaşılmaktadır.

Tez kapsamında üretilen *Taq* DNA polimerazlar ile kalıp DNA olarak *E.coli* genomik DNA, primer olarak evrensel 16S rRNA primerleri olan 27F ve 1492R

primerleri kullanılmıştır. *E.coli*'nin ürettiği *Taq* DNA polimeraz ile kurulmuş reaksiyonların ürünlerini barındıran kuyularda enzim miktarına bağlı olarak artan leke görüntüsü ortaya çıkmıştır. Kalıp DNA'nın aşırı yüklenmiş olması, yüksek voltajda yürütme, örneklerin degrades olması, yüksek tuz konsantrasyonu gibi sorunların lekelenmeye neden olduğu bilinmektedir (74,75). Ancak bu gerekçeler saf *Taq* DNA polimeraz ile kurulan PCR reaksiyonları için geçerlidir. Tez kapsamındaki lekelenmenin nedeni, tez kapsamında uygulanan saflaştırma protokolünün ileri bir saflaştırma yöntemi olmadığından, *Taq* DNA polimeraz olarak kullanılan süpernatantın, diğer proteinlerle ve hücresel nükleik asit karışımından oluşması veya hücre içeriğinin kalıp DNA'yı degrade etmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca kalıp DNA olarak kullanılan *E.coli* genomuna, *Taq* DNA polimeraz içeren süpernatantta bulunan nükleik asitlerin rastgele bağlanarak leke görüntüsü verdiği düşünülmektedir. Sonuç olarak, tez kapsamında üretilen rekombinant *Taq* DNA polimerazların, kalıp DNA olarak bakteriyel genomik DNA'nın kullanıldığı PCR reaksiyonlarında kullanılamayacağı sonucuna ulaşılmıştır. Kalıp DNA ve primerlerin değiştirildiğinde ise *E.coli* BL21'den elde edilen *Taq* DNA polimerazlar pozitif sonuç vermiştir. Ancak oligotrofik *K.oxytoca*'dan elde edilen *Taq* DNA polimerazlar negatif sonuç vermiştir. Dolayısıyla *Taq* DNA polimeraz oligotrofik *K.oxytoca*'da eksprese olmakta ancak aktivitesini kaybetmektedir. Yamagi ve arkadaşlarına göre, *Taq* DNA polimerazın parmak domainin alt bölgesinde bulunan Glu-742 ve Ala-743 bölgelerinde meydana gelen mutasyonların enzimin uzama işlevini yerine getirmesi için kritik öneme sahip olduğunu göstermiştir (76). *Taq* DNA polimerazın oligotrofik *K.oxytoca*'da ekspresyonu sırasında kritik aminoasit bölgelerine meydana gelebilecek mutasyonların enzimin aktivitesini yok etmiş olabileceği düşünülmektedir. Bunun yanında, rekombinant proteinin N ve C terminal dizilerindeki aminoasilere göre hücre içerisindeki proteazların saldırısına karşı duyarlılığı değişkenlik gösterebilir. Genel olarak, N terminalinde Arjinin, lösin, lizin, fenilalanin, triptofan ve tirozin varlığı proteazlara karşı daha hassas hale getirdiği bilinmektedir. Ayrıca C terminal dizisinde apolar aminoasitlerin bulunması rekombinant enzimleri daha savunmasız hale getirebilmektedir (27). Rekombinant *Taq* DNA polimeraz dizisine bakıldığında C terminalinde apolar bir aminoasit olan Prolin olduğu görülmektedir (77,78). Bu durumda oligotrofik *K.oxytoca*'da üretilen rekombinant *Taq* DNA polimerazın hücre içi proteaz saldırıları nedeniyle aktivitesini kaybetmiş olabileceği söylenebilmektedir. Ayrıca, rekombinant enzimlerin aşırı

sentezi de onları proteazlara karşı savunmasız kıldığı bilinmektedir (79). Tüm bu bilgiler göz önüne alındığında, oligotrofik *K.oxytoca*'da üretilen *Taq* DNA polimerazın aktivitesini kaybetme nedeninin en olası ihtimali, hücre içi proteazlardan korunamaması olduğu sonucuna varılabilir. Ancak net bir sonuca varmak ve *Taq* DNA polimerazın oligotrofik *K.oxytoca*'da düşük maliyetle üretimini yapmak için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Ölçek büyütmek için araştırmacıların önünde birçok zorluk vardır. Konağın seçilmesi, istenmeyen yan ürünlerin eliminasyonu, metabolik yolların yüksek verimli ve ileri teknolojik araçlarla metabolik analizi, rekombinant ürünler için bu ürüne karşı mikroorganizmanın toleransı gibi detaylar ölçek büyütme konusunda araştırmacıların karşısına çıkan en büyük zorluklardır (80). Tez kapsamında yapılan ölçek büyütme operasyonlarında oligotrofik *K.oxytoca* laboratuvar ölçeği ile benzer sonuçlar verdiği tespit edilmiştir. Oligotrofik *K.oxytoca*'nın oda sıcaklığında ve 0,1 LB konsantrasyonunda dahi *Taq* DNA polimeraz ürettiği tespit edilmiştir (Şekil 4.13). Bu sonuçlara göre, oligotrofik *K.oxytoca*, Lee ve arkadaşlarının ileri sürdüğü şekilde ileri teknoloji kullanılarak zorlu süreçlerden geçmesine gerek olmadan verimli şekilde *Taq* DNA polimeraz ekspresyonu sağlanma potansiyeli barındırmaktadır.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu tez çalışması kapsamında 100 kadar izolat içerisinde seçilen oligotrofik bakteri filogenetik olarak *Klebsiella oxytoca* olarak tanımlanmıştır. Bu bakterinin optimal sıcaklıkta; standart LB, 1:10, 1:100 ve 1:1000 oranında seyreltilmiş LB'lerdeki büyüme karakteristiği ortaya çıkarılmıştır. Aynı şekilde, fermantasyon sürecindeki maliyeti azaltmak amacıyla, optimal sıcaklığın yanında oda sıcaklığında da farklı konsantrasyonlardaki LB'lerdeki büyüme karakteristiği ortaya çıkarılarak, yaygın olarak ekspresyon suşu olarak kullanılan *E.coli* BL21 ile kıyaslanmıştır. Yapılan analizler sonucu, oligotrofik bakterinin optimal sıcaklıkta 1:10 oranında seyreltilmiş LB ile standart ekspresyon suşu olan *E.coli* BL21'i standart LB'de optimal sıcaklıkta aynı verimi verdiği değerlendirilmiştir. Fermantasyon besiyeri maliyetinin 1:10 oranında azaltılması tüm fermantasyon proses verimliliğini %37 oranında arttırdığı sonucuna ulaşılmıştır.

Oligotrofik *K.oxytoca* kompetent hale getirilmiştir. *E.coli* JM109'dan izole edilen *Taq* DNA polimeraz içeren plazmit ile transforme edilmiştir. Eş zamanlı olarak, ilgili plazmit, ekspresyon suşu olan *E.coli* BL21'e transfer edilmiştir. Transformasyon, agaroz jel ile doğrulanmıştır. Daha sonra yapılan laboratuvar ve endüstriyel ölçekteki fermantasyon deneylerinde oligotrofik *K.oxytoca*'nın *Taq* DNA polimeraz ekspresyonu gerçekleştirdiği gözlemlenmiştir. Eksprese olan proteinlerden *Taq* DNA polimeraza ait olan bantlar SDS-PAGE'de gösterilmiştir. Ancak ekspresyonu gerçekleştirilen *Taq* DNA polimerazın aktivitesini kaybettiği gözlemlenmiştir. Laboratuvar ve endüstriyel ölçeklerde üretilen *Taq* DNA polimeraz ile kurulan PCR reaksiyonları başarılı olamamıştır.

Sonuç olarak, oligotrofik *K.oxytoca*, aktiviteye engel olan koşulların optimizasyonu ile düşük maliyetli *Taq* DNA polimeraz üretimi için önemli bir potansiyel taşımaktadır. Bu konuda yeni çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Ho, A., Di Lonardo, D. P., & Bodelier, P. L. E. (2017). Revisiting life strategy concepts in environmental microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, *93*(3), 1–14.
2. Mittelman, M. W., & Jones, A. D. G. (2018). A Pure Life: The Microbial Ecology of High Purity Industrial Waters. *Microbial Ecology*, *76*(1), 9–18.
3. Senechkin, I. V., Speksnijder, A. G. C. L., Semenov, A. M., van Bruggen, A. H. C., & van Overbeek, L. S. (2010). Isolation and Partial Characterization of Bacterial Strains on Low Organic Carbon Medium from Soils Fertilized with Different Organic Amendments. *Microbial Ecology*, *60*(4), 829–839.
4. Martin, P., & MacLeod, R. A. (1984). Observations on the Distinction Between Oligotrophic and Eutrophic Marine Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, *47*(5), 1017–1022.
5. Ishida, Y., Imai, I., Miyagaki, T., & Kadota, H. (1982). Growth and uptake kinetics of a facultatively oligotrophic bacterium at low nutrient concentrations. *Microbial Ecology*, *8*(1), 23–32.
6. Lauro, F. M., McDougald, D., Thomas, T., Williams, T. J., Egan, S., Rice, S., DeMaere, M. Z., Ting, L., Ertan, H., Johnson, J., Ferriera, S., Lapidus, A., Anderson, I., Kyrpides, N., Munkf, A. C., Detterg, C., Hang, C. S., Brown, M. V., Robb, F. T., ... Cavicchioli, R. (2009). The genomic basis of trophic strategy in marine bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(37), 15527–15533.
7. Oliver, J. D. (2010). Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, *34*(4), 415–425.
8. Bodor, A., & Bounedjoum, N. (2020). *Challenges of unculturable bacteria : environmental perspectives*. 4, 1–22. <https://doi.org/10.1007/s11157-020-09522-4>.
9. Gray, D. A., Dugar, G., Gamba, P., Strahl, H., Jonker, M. J., & Hamoen, L. W. (2019). Extreme slow growth as alternative strategy to survive deep starvation in bacteria. *Nature Communications*, *10*(1), 1–12.
10. Boutte, C. C., & Crosson, S. (2013). Bacterial lifestyle shapes stringent response activation. *Trends in Microbiology*, *21*(4), 174–180.
11. Kjelleberg, S., Hermansson, M., Mårdén, P., & Jones, G. W. (1987). The transient phase between growth and nongrowth of heterotrophic bacteria, with emphasis on the marine environment. *Annual Review of Microbiology*, *41*, 25–49.
12. Wrangstadh, M., Conway, P. L., & Kjelleberg, S. (1986). The production and release of an extracellular polysaccharide during starvation of a marine *Pseudomonas* sp. and the effect thereof on adhesion. *Archives of Microbiology*, *145*(3), 220–227.
13. Kjelleberg, S., & Hermansson, M. (1984). Starvation-induced effects on bacterial surface characteristics. *Applied and Environmental Microbiology*, *48*(3), 497–503.
14. Stevick, P. T., Soule, M., & Ayala, F. J. (2003). Cannibalism by Sporulating Bacteria. *Science*, *301*(July), 510–513.
15. Wainwright, M., Barakah, F., al-Turk, I., & Ali, T. A. (1991). Oligotrophic micro-organisms in industry, medicine and the environment. *Science Progress*, *75*(298 Pt 3–4), 313–322.
16. Vila-Costa, M., Bartrons, M., Catalan, J., & Casamayor, E. O. (2014). Nitrogen-Cycling Genes in Epilithic Biofilms of Oligotrophic High-Altitude Lakes (Central Pyrenees, Spain). *Microbial Ecology*, *68*(1), 60–69.
17. Williamson, W. M., Close, M. E., Leonard, M. M., Webber, J. B., & Lin, S. (2012). Groundwater Biofilm Dynamics Grown In Situ Along a Nutrient Gradient. *Ground Water*, *50*(5), 690–703.
18. Singh, R., Ray, P., Das, A., & Sharma, M. (2010). Penetration of antibiotics through *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *65*(9), 1955–1958.
19. Tada, Y., Ihmori, M., & Yamaguchi, J. (1995). Oligotrophic bacteria isolated from clinical materials. *Journal of Clinical Microbiology*, *33*(2), 493–494.
20. Trono, D. (2019). Recombinant Enzymes in the Food and Pharmaceutical Industries. In *Advances in Enzyme Technology, First Edition*. Elsevier B.V.
21. Adrio, J. L., & Demain, A. L. (2010). Recombinant organisms for production of industrial products. *Bioengineered Bugs*, *1*(2), 116–131.
22. Khan, S., Ullah, M. W., Siddique, R., Nabi, G., Manan, S., Yousaf, M., & Hou, H. (2016). Role of recombinant DNA technology to improve life. *International Journal of Genomics*, *2016*.
23. Celie, P. H. N., Parret, A. H. A., & Perrakis, A. (2016). Recombinant cloning strategies for protein expression. *Current Opinion in Structural Biology*, *38*, 145–154.
24. Rudge, S. R., & Ladisch, M. R. (2020). Industrial Challenges of Recombinant Proteins. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, *171*, 1–22.

25. Thiry, M., & Cingolani, D. (2002). Optimizing scale-up fermentation processes. *Trends in biotechnology*, 20(3), 103–105.
26. Bothast, R. J., Nichols, N. N., & Dien, B. S. (1999). Fermentations with new recombinant organisms. *Biotechnology progress*, 15(5), 867–875.
27. Fakruddin, M., Mohammad Mazumdar, R., Bin Mannan, K. S., Chowdhury, A., & Hossain, M. N. (2013). Critical Factors Affecting the Success of Cloning, Expression, and Mass Production of Enzymes by Recombinant *E. coli*. *ISRN Biotechnology*, 2013(3), 1–7.
28. Gellissen, G., Strasser, A. W. M., & Suckow, M. (2005). Key and Criteria to the Selection of An Expression Platform. *Production of Recombinant Proteins*, 1–5.
29. Drejer, E. B., Hakvåg, S., Irla, M., & Brautaset, T. (2018). Genetic tools and techniques for recombinant expression in thermophilic bacillaceae. *Microorganisms*, 6(2).
30. Haki, G. D., & Rakshit, S. K. (2003). Developments in industrially important thermostable enzymes: A review. *Bioresource Technology*, 89(1), 17–34.
31. D’Auria, S., Nucci, R., Rossi, M., Gryczynski, I., Gryczynski, Z., & Lakowicz, J. R. (1999). The β -glycosidase from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*: Enzyme activity and conformational dynamics at temperatures above 100°C. *Biophysical Chemistry*, 81(1), 23–31.
32. Lawyer, F. C., Stoffel, S., Saiki, R. K., Chang, S. Y., Landre, P. A., Abramson, R. D., & Gelfand, D. H. (1993). High-level expression, purification, and enzymatic characterization of full-length *Thermus aquaticus* DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity. *Genome Research*, 2(4), 275–287.
33. Kramer, M. F., & Coen, D. M. (2001). Enzymatic amplification of DNA by PCR: standard procedures and optimization. *Current Protocols in Immunology / Edited by John E. Coligan ... [et Al.]*, Chapter 10, 1–14.
34. Innis, M. A., Myambo, K. B., Gelfand, D. H., & Brow, M. A. D. (1988). DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(24), 9436–9440.
35. Soo Hyun Eom, Wang, J., & Steitz, T. A. (1996). Structure of Taq polymerase with DNA at the polymerase active site. In *Nature* (Vol. 382, Number 6588, pp. 278–281).
36. Sadeghi, H. M., Hoseini, S., Miroliaei, M., Moazen, F., Panjehpour, M., & Rastegari, A. (2012). Optimization of Taq DNA polymerase enzyme expression in *Escherichia coli*. *Advanced Biomedical Research*, 1(1), 82.
37. Zhao, G., & Guan, Y. (2010). Polymerization behavior of Klenow fragment and Taq DNA polymerase in short primer extension reactions. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 42(10), 722–728.
38. Steitz, T. A. (2020). DNA polymerases: Structural diversity and common mechanisms. *Structural Insights into Gene Expression and Protein Synthesis*, 318–321.
39. Kim, Y., Eom, S. H., Wang, J., Lee, D. S., Suh, S. W., & Steitz, T. A. (1995). Crystal structure of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. In *Nature* (Vol. 376, Number 6541, pp. 612–616).
40. Bębenek, A., & Ziuzia-Graczyk, I. (2018). Fidelity of DNA replication—a matter of proofreading. *Current Genetics*, 64(5), 985–996.
41. Reports And Data. DNA Polimeraz Market Erişim 18.12.2023, <https://www.reportsanddata.com/report-detail/dna-polymerase-market>
42. Future Market Insights. DNA Polimeraz Market. Erişim 18.12.2023, <https://www.futuremarketinsights.com/reports/dna-polymerase-market>
43. Folch, P. L., Bisschops, M. M. M., & Weusthuis, R. A. (2021). Metabolic energy conservation for fermentative product formation. *Microbial Biotechnology*, 14(3), 829–858.
44. Kennedy, M., & Krouse, D. (1999). Strategies for improving fermentation medium performance: A review. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 23(6), 456–475.
45. Singh, V., Haque, S., Niwas, R., Srivastava, A., Pasupuleti, M., & Tripathi, C. K. M. (2017). Strategies for fermentation medium optimization: An in-depth review. *Frontiers in Microbiology*, 7(JAN).
46. Rahman, M. (2013). Medical applications of fermentation technology. *Advanced Materials Research*, 810, 127–157.
47. Ali Al-Maqtari, Q., AL-Ansi, W., & Ali Mahdi, A. (2019). Microbial enzymes produced by fermentation and their applications in the food industry-A review. *International Journal of Agriculture Innovations and Research*, 8(1), 2319–1473.
48. Wood, B. E., & Ingram, L. O. (1992). Ethanol production from cellobiose, amorphous cellulose, and crystalline cellulose by recombinant *Klebsiella oxytoca* containing chromosomally integrated *Zymomonas mobilis* genes for ethanol production and plasmids expressing thermostable cellulase genes fr. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(7), 2103–2110.

49. Lin, Y., & Tanaka, S. (2006). Ethanol fermentation from biomass resources: Current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69(6), 627–642.
50. Jong An Lee, Hyun Uk Kim, Jeong-Geol Na, Yoo-Sung Ko, Jae Sung Cho, Sang Yup Lee, (2023). Factors affecting the competitiveness of bacterial fermentation, *Trends in Biotechnology*, 798-816.
51. Rodrigues, L. R., Teixeira, J. A., & Oliveira, R. (2006). Low-cost fermentative medium for biosurfactant production by probiotic bacteria. *Biochemical Engineering Journal*, 32(3), 135–142.
52. Frank, J. A., Reich, C. I., Sharma, S., Weisbaum, J. S., Wilson, B. A., & Olsen, G. J. (2008). Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(8), 2461–2470.
53. Lal, A., & Cheeptham, N. (2007). Eosin-Methylene Blue Agar Plates Protocol. *ASM Microbe Library*, September 2007, 1–7. <http://www.microbelibrary.org/component/resource/laboratory-test/2869-eosin-methylene-blue-agar-plates-protocol>
54. Reiner, K. (2013). *Catalase Test Protocol*. November 2010, 1–9. <http://www.microbelibrary.org/library/laboratory-test/3226-catalase-test-protocol>
55. MacWilliams, M. P. (2009). Indole Test Protocol. American Society for Microbiology for Microbiology, December 2009, 1–9.
56. Mcdevitt, S. (2009). Methyl Red and Voges-Proskauer Test Protocols. *American Society for Microbiology*, December 2009, 1–9.
57. Lal, A., & Cheeptham, N. (2015). Decarboxylase Broth Protocol. *American Society for Microbiology*, September 2015, 1–10.
58. Jeong, K. J., Lee, H. S., Lee, S. Y., & Chang, Y. K. (1998). Efficient transformation of *Klebsiella oxytoca* by electroporation. *Biotechnology and BioProcess Engineering*, 3(1), 48–49.
59. Desai, U. J., & Pfaffle, P. K. (1995). Single-step purification of a thermostable DNA polymerase expressed in *Escherichia coli*. *BioTechniques*, 19(5), 780–784.
60. LAEMMLI, U. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
61. Wang, X., Jordan, I. K., & Mayer, L. W. (2014). A Phylogenetic Perspective on Molecular Epidemiology. In *Molecular Medical Microbiology*. Elsevier Ltd.
62. Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, perils, and pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(9), 2761–2764.
63. P.T. Vanhooren, S. De Baets, G. Bruggeman, E.J. Vandamme (1999), *KLEBSIELLA*, *Encyclopedia of Food Microbiology*, 1107-1115.
64. Maslow, J. N., Brecher, S. M., Adams, K. S., Durbin, A., Loring, S., & Arbeit, R. D. (1993). Relationship between indole production and differentiation of *Klebsiella* species: Indole-positive and -negative isolates of *Klebsiella* determined to be clonal. *Journal of Clinical Microbiology*, 31(8), 2000–2003.
65. Rath, S., & Padhy, R. N. (2014). Prevalence of two multidrug-resistant *Klebsiella* species in an Indian teaching hospital and adjoining community. *Journal of Infection and Public Health*, 7(6), 496–507.
66. Lal, A., & Cheeptham, N. (2015). Decarboxylase Broth Protocol. *American Society for Microbiology*, September 2015, 1–10.
67. Hansen, D. S., Aucken, H. M., Abiola, T., & Podschun, R. (2004). Recommended test panel for differentiation of *Klebsiella* species on the basis of a trilateral interlaboratory evaluation of 18 biochemical tests. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(8), 3665–3669.
68. Meng, W., Zhang, Y., Cao, M., Zhang, W., Lü, C., Yang, C., Gao, C., Xu, P., & Ma, C. (2020). Efficient 2,3-butanediol production from whey powder using metabolically engineered *Klebsiella oxytoca*. *Microbial Cell Factories*, 19(1), 1–10.
69. Chen, G. Q., & Liu, X. (2021). On the future fermentation. *Microbial Biotechnology*, 14(1), 18–21.
70. Ameshe, A., Engda, T., & Gizachew, M. (2022). Antimicrobial Resistance Patterns, Extended-Spectrum Beta-Lactamase Production, and Associated Risk Factors of *Klebsiella* Species among UTI-Suspected Patients at Bahir Dar City, Northwest Ethiopia. *International Journal of Microbiology*, 2022, 4–6.
71. Singh, L., Cariappa, M. P., & Kaur, M. (2016). *Klebsiella oxytoca*: An emerging pathogen? *Medical Journal Armed Forces India*, 72, S59–S61.
72. Roayaei, M., & Galehdari, H. (2008). Cloning and Expression of *Thermus aquaticus* DNA polymerase in *Escherichia coli*. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 1(1), 1–5.
73. Fang, N., Zhong, N., Yang, Y., Guo, Y., & Ji, S. (2016). Data of expression and purification of recombinant Taq DNA polymerase. *Data in Brief*, 9, 81–84.
74. Jegasothy, H., Wootton, M., & Fairclough, R. J. (2000). Agarose gel electrophoresis of wheat starch. *Journal of Cereal Science*, 31(1), 75–78.

75. Armstrong, J. A., & Schulz, J. R. (2008). *Agarose Gel Electrophoresis OVERVIEW AND PRINCIPLES*. 1–20.
76. Yamagami, T., Ishino, S., Kawarabayasi, Y., & Ishino, Y. (2014). Mutant Taq DNA polymerases with improved elongation ability as a useful reagent for genetic engineering. *Frontiers in Microbiology*, 5(SEP), 1–10.
77. Unitprot. Taq DNA Polimeraz Dizisi. Erişim 18.12.2023, <https://www.uniprot.org/uniprotkb/B6VA24/entry>
78. NCBI. Taq DNA Polimeraz Dizisi. Erişim 18.12.2023, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/ACJ02109.1>
79. Schumann, W., & Ferreira, L. C. S. (2004). Production of recombinant proteins in Escherichia coli. *Genetics and Molecular Biology*, 27(3), 442–453.
80. Lee, S. Y., & Kim, H. U. (2015). Systems strategies for developing industrial microbial strains. *Nature Biotechnology*, 33(10), 1061–1072.



EKLER

EK-1.PCR'da Kalıp DNA Olarak Kullanılan Plazmit Sekansı

CTCGAGATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCCGGGGTGGTGCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCACTGCACCACCGGCAAGCTGCCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCTTCGGCTACGGCCTGATGTGCTTCGCCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACTCTATGCGCGGAGTGCATGGACTCATCTCTGCGGATCGCTATTCCCTGTTCCCTTGTCTGTGAGGACAGCCCTAAAGACAAATTCCTCATCAGCCGCCTCTTTGATGTTGCTGAAGGTTCAACATTGGAGGAAGCCTCAAATAACTGTATCCGTTTAGAGTGGAACAAAGGCATTGTGGGACATGTGGCAGCTTTTGGCGAGCCCTTGAACATCAAAGATGCCTATGAGGACCCCCGTTCAATGCAGAAGTTGACCAAATTACAGGCTACAAGACACAAAGTATCCTTTGTATGCCAATTAAGAACCACAGGGAAGAGGTTGTTGGTGTAGCTCAGGCCATCAACAAGAAATCAGGAAATGGTGGGACCTTCACTGAAAAGATGAAAAGGACTTTGCGGCCTACTTGGTGAATGTTTTTACGCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCTACCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAATTCGAAGCTT

EK-2.PCR'da Kullanılan Primer Dizileri

SalI-cGull-Geri Primer: ATAGTCGACTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC

BamHI-cGull-İleri Primer: ATAGGATCCATGGTGAGCAAGGGCGAGGA