

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

REKOMBİNANT *Bacillus subtilis* HÜCREİÇİ TEPKİME SİSTEMİNİN
GENOM-SEVİYEDE ARAŞTIRILMASI

Pınar KOCABAŞ

KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2017

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Pınar Kocabaş tarafından hazırlanan “**Rekombinant *Bacillus subtilis* Hücreiçi Tepkime Sisteminin Genom-Seviyede Araştırılması**” konulu tez çalışması 27.02.2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından **oy birliği** ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı’nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.



Danışman : Prof. Dr. H. Tunçer ÖZDAMAR
Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

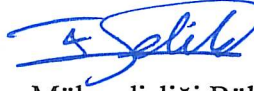
Jüri Üyeleri:



Başkan: Prof. Dr. Timur DOĞU
Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü

Üye : Prof. Dr. Güzide ÇALIK GARCIA 
Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Pınar ÇALIK 
Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü

Üye : Yrd. Doç. Dr. Eda ÇELİK 
Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü

Üye : Prof. Dr. H. Tunçer ÖZDAMAR 
Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Atila YETİŞEMİYEN
Enstitü Müdürü

ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

27.02.2017



Pınar KOCABAŞ

ÖZET

Doktora Tezi

REKOMBİNANT *Bacillus subtilis* HÜCREİÇİ TEPKİME SİSTEMİNİN GENOM-SEVİYEDE ARAŞTIRILMASI

Pınar KOCABAŞ

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. H. Tunçer ÖZDAMAR

Doktora tez araştırmasının ilk basamağında *B. subtilis*'in yeni genom dizin analizi (Belda vd. 2013) ve anotasyonuna dayanan 719 genle ilişkili 1083 tepkime ve 743 metabolitten oluşan üçüncü- nesil genom seviye model (GEM) *iBsu1144* oluşturulmuştur. *iBsu1144*'nin doğruluğu belirlendikten sonra *iBsu1144* Kunst vd. (1997) ve Barbe vd.(2009)'nin genom anotasyonlarına dayalı, sırasıyla birinci- ve ikinci- nesil GEM'lerle karşılaştırılmıştır. *iBsu1144*'nin serin alkali proteaz fermentasyon prosesinin karakteristik üçüncü periyodu için düşük, orta, ve yüksek oksijen aktarım koşullarına (LOT, MOT, ve HOT) ait verilerle (Çalık vd. 1999) işletilerek elde edilen tepkime hızları 102 metabolit ve 133 tepkimeyle oluşturulan BsBRM-1999 (Çalık vd. 1999) modelinin tepkime hızlarıyla karşılaştırılmış; BsBRM-1999 ile farklı akı değerlerine sahip tepkime sayısının en çok MOT, sonra HOT'ta olduğu bulunmuştur. Buna rağmen sonuçlar BsBRM-1999'nin doğru tepkimelerle oluşturulduğunu ve akı analizi için kullanılabilir bilgiler verdiğini; ancak, *iBsu1144* ile daha kesin akı sonuçlarıyla birlikte, oluşturulan gen-enzim-tepkime verileriyle metabolik mühendislik tasarımları için güçlü bir bilgi platform oluşturmaktadır. Böylece, akı-değişkenliği analiziyle rekombinant protein üretiminde konak hücre oluşturmak için silinebilecek genler belirlenmiştir. Yeni üçüncü- nesil GEM *iBsu1144* kullanılarak bulunan SAP üretimi sonuçları, ikinci- nesil GEM *iBsu1103V2* kullanılarak hesaplanan sonuçlarla da kıyaslanmıştır. Doktora çalışmasının ikinci kısmında, konak hücre *B. subtilis* ile rekombinant insan büyüme hormonu (rhGH) üretim biyoprosesi için oksijen aktarımının gen ekspresyonları ve tepkime hızlarına etkileri mikrodizin ve akı analizleriyle düşük- (LOT), orta- (MOT), ve yüksek- (HOT) oksijen aktarım koşullarında biyoprosesin karakteristik üçüncü periyodu için belirlenmiştir. %99.5'den yüksek güven aralığıyla gerçekleştirilen tek yönlü varyans analizi sonucu oksijen aktarımından etkilenen 50 gen birimi belirlenmiştir. Gen ekspresyonları ve akı değerlerinin oksijen aktarımıyla değişimlerinin farklı olduğu *yaaE*, *gdh*, *ydjL*, *yisZ*, *yloI*, *kbl*, *pksK*, ve *mmgD* genlerinin metabolik mühendislik hedef genleri olduğu bulunmuştur. Akı-değişkenliği analiziyle rhGH üretiminin MOT koşulunda kapalı-tepkimelerin enzimlerini kodlayan genler konak hücre oluşturmak için hedef konumlar olarak seçilmiştir. Üçüncü- nesil GEM *iBsu1144*-rhGH'nin birinci- ve ikinci- nesil GEM'ler ile rhGH üretimi için karşılaştırmalı analizleri, *iBsu1144*-rhGH'nin gen-enzim-tepkime verileriyle birlikte oluşturulması ve bağlantısız tepkimeler içermemesi nedenleriyle doğru sonuçlar ürettiğini transkriptom analizleri destekleyerek göstermiştir. Son olarak ise, rhGH üretiminin MOT koşulunda Period II'den Periyod III'e geçişin transkriptoma ve tepkime hızlarına dinamik etkileri belirlenmiştir.

Şubat 2017, 377 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Bacillus subtilis*, genom, matematik model, proteaz üretimi, rhGH üretimi, oksijen aktarımı, transkriptom

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

GENOME-SCALE INVESTIGATION OF RECOMBINANT *Bacillus subtilis* INTRACELLULAR REACTION SYSTEM

Pınar KOCABAŞ

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

Supervisor: Prof. Dr. H. Tunçer ÖZDAMAR

The third- generation genome-scale model (GEM) *iBsu1144* for *B.subtilis* based on its recent resequencing (Belda *et al.* 2013) and reannotation was reconstructed. After its validation *iBsu1144* linked to 719 genes, 1083 reactions, and 743 metabolites was compared with the first- and second- generation GEMs which were based on the genome annotations of Kunst *et al.* (1997) and Barbe *et al.* (2009), respectively. The reaction fluxes were calculated at three oxygen transfer conditions for serine alkaline protease fermentation using *iBsu1144* and compared with those of the biochemical-reactions based model, so-called BsBRM-1999, containing 102 metabolites and 133 reactions (Çalık *et al.* 1999) to make an assessment on the predictive power of the two models. The number of divergent fluxes in BsBRM-1999 are the highest at MOT and then at HOT. Common reactions of the central metabolism shows that BsBRM-1999 was constructed with accurate reactions; therefore, BsBRM-1999 can give reliable information for flux analyses. Nevertheless, more precise and elaborate results obtained with *iBsu1144* based on gene-enzyme-reaction data can be used for creative metabolic designs to generate host cells. Further, the reaction fluxes of the central carbon metabolism of the third- generation GEM *iBsu1144* were compared with those of the second- generation GEM (Tanaka vd. 2013) for SAP production. In the second part of the thesis, influences of oxygen transfer on the gene expressions and reaction fluxes of rhGH producing *B.subtilis* were elucidated for the characteristic third period of the fermentation process. Microarray analysis revealed 50 probe sets to be significantly affected by oxygen transfer with one-way analysis of variance with the confidence greater than %99.5. *yaaE*, *gdh*, *ydjL*, *yisZ*, *yloI*, *kbl*, *pksK*, and *mmgD* genes which had inconsistent transcriptional and metabolic responses were revealed as metabolic engineering sites. Genes of blocked reactions in Period III at MOT were determined using flux variability analysis, as candidates for deletion to construct improved host cells. The overview of the comparison of the third generation GEM *iBsu1144*-rhGH with the second and first generation GEM reveals that due to the recent re-sequencing and related annotations, the third- generation GEM, so called *iBsu1144*-rhGH reports precise results due to the absence of unconnected reactions based on the updated gene-enzyme-reaction data, supported by transcriptome data. Lastly the effects of transition from Period II to Period III on the transcriptome and reaction fluxes of rhGH producing *B.subtilis* were evaluated at MOT.

February 2017, 377 pages

Key Words: *Bacillus subtilis*, genome, mathematical model, protease production, rhGH production, oxygen transfer, transcriptome

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

“Rekombinant *Bacillus subtilis* hücreiçi tepkime sisteminin genom-seviyede araştırılması” konulu doktora tez araştırması, *B. subtilis*’in mikro-biyoreaktör olarak rekombinant biyomoleküllerin özellikle rekombinant proteinler enzimlerin ve terapötik farmasötik proteinlerin üretimi için metabolik mühendislik prensipleriyle etkin tasarlanabilmesi amacıyla yapılmıştır. Bu temel amaç çerçevesinde, reaksiyon mühendisliği bilim dalı içinde biyokimyasal reaksiyon mühendisliği prensipleriyle 2013’te üçüncü kez dizini analizlenen *B. subtilis* DNA molekülünün gen dizinleri ve bağlantılı olarak yapılan gen-annotasyon çalışmaları temelinde “*B. subtilis* reaksiyon ağı-2016” oluşturulmuştur. Gen-enzim-reaksiyon verileri oluşturularak, arkasından kompleks tepkime sistemi içindeki henüz annotasyonu-yapılmamış, yani “genin kodladığı enzimin katalizlediği tepkimenin stokiyometrisi” henüz belli olmayan ve sistemde bağlantısızlığa neden olan reaksiyonlar çıkarılarak, “kütle korunum temelli *B. subtilis* genom-seviye matematik modele temel reaksiyon ağı” oluşturulmuş ve izoterm koşullar için sistemdeki her bileşen için kütle-korunum denklemi kurularak yeni “genom seviye model” oluşturulmuştur. Matematik modelin çözümü iki protein, birincisi endüstriyel enzim serin alkali proteaz (SAP), ikincisi ise farmasötik protein rekombinant insan büyüme hormonu (rhGH) üretim proseslerine uygulanmıştır. Her iki proste biyoreaktör işletim parametresi “oksijen aktarımının” tanımlanmış düşük-, orta-, ve yüksek-oksijen aktarım koşullarında yapılmış deney verileri kullanılmış; oksijen aktarımının fermentasyon prosesleri süresince *B. subtilis* genomunu oluşturan genlerin transkripsiyonuna, diğer deyişle gen ekspresyonuna” ve bağlantılı olarak enzim sentezine ve sonuçta tepkime hızlarına etkilerini birlikte analiz edebilmek için sadece rhGH üretiminde, kalma süresine karşı alınan hücre örneklerinin mikro-dizin analizleri yapılmıştır.

ODTÜ Kimya Mühendisliği Bölümü’nden 2002’de mezun olduktan sonra hemen, ODTÜ KM Bölümü “Endüstriyel Biyoteknoloji ve Metabolik Mühendislik Araştırma Grubunda” Prof. Dr. Pınar ÇALIK yönetiminde çok sevdiğim bilim dalında yüksek lisans çalışmalarımı Temmuz 2004’te tamamladıktan sonra, University of California, Davis’e doktora yapmak, o zamanki hayalim ABD’de gerçekleştirmek için gittim. Bornova Anadolu Lisesi, arkasından ODTÜ ortamlarındaki alıştığım sosyal yaşantı şeklinin çok değişmesi bir tarafta, 2006’da ABD’de başlayan krizin habercisi durumundaki “öğretim üyelerinin araştırma projelerindeki azlık”, seçtiğim bilim dalında tez konusu seçim alternatifini neredeyse bırakmadığından, hiç ilgimi çekmeyen bir tahlılın genetiği ile ilgili bir konuyu istemeyerek-seçerek, yapılmaması gereken yanlış yaptım ve 2005 sonunda ayrılarak İzmir’e döndüm. Yeterli hazırlıkla gitmediğimi sonra farkettiğim bu deneyimden dört şey öğrendim: 1) yurtdışına gitmek için herhangi bir doktora konusu seçilmez; 2) doktorada asıl önemli olan heyecan-, sevgi-, ve mutluluk- yaratan konu seçmektir; 3) gelecek ve başarısız olma kaygısından kurtulmak gerekir; ve 4) bir atasözündeki gibi: “Hızlı gitmek istiyorsan, yalnız git... eğer uzağa gitmek istiyorsan, işte o zaman insanlarla birlikte ol”. ABD’deki koşullarda yaşama dair çok şey öğrenerek geldim, benim oraya gitmeme vesile olan, ve orada tanıdığım, birlikte yaşadığım, ve arkadaşım olan herkese bana olan iyi davranışları, ve incelikleri için çok teşekkür ederim.

2002-2004 arasında yüksek lisans çalışmalarımı gerçekleştirirken, Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü’ne “YL eş-danışmanım” Prof.Dr.H. Tunçer Özdamar’ın birlikte-yönettiği Biyokimyasal Reaksiyon Mühendisliği Laboratuvarı’na amino asit analizlerini yapmak için gidiyordum. O süreçte, aklımda sadece Amerika’da yaşama ve bilim yapma hedefi vardı, fakat ODTÜ’de hocam Prof. Dr. Pınar Çalık’ın kurduğu laboratuvar gibi, Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü’nde Biyokimyasal Reaksiyon Mühendisliği Araştırma Grubu’nun “Biyokimya Mühendisliği Laboratuvarı”, “Endüstriyel Biyoteknoloji”, ve “Metabolik ve Genetik Mühendisliği Laboratuvarları”na, labratuvarların işleyişine, sahip olduğu ruha, düzene

de hayran kalmıştım. Şubat 2006'da tekrar ODTÜ'de doktora düşündüm, ancak başvurular kapalı olunca Ankara Üniversitesi KM Bölümü'nde Prof.Dr.Tunçer Özdamar ile doktora yapmak için AÜ Fen Bilimleri Enstitüsüne başvururdum.

Son 1.5 yılda yıprandığımdan, etkin başlayabilmek için biraz zamanın geçmesi ve motivasyonumun yükselmesi gerekiyordu. Doktora konusunun seçimi öğrencinin doğru seçim yapması gereken süreç olduğu için, 2006 yılından 2008 yılına kadar karşılaştığım ilk zorluk araştırma grubunun disiplinine ve kurallarına tekrar alışmak, konsantrasyonumu yüksek tutmak, ve doktora konumu seçmektir. Kuramsal ağırlığı fazla olan bir çalışmaya daha uygun olduğuma hocalarımla birlikte karar vererek 2008 yılında *B. subtilis* için genom-seviye model oluşturma çalışmalarına başladım. Moleküler genetik yöntemlerle daha önce araştırma yapmadığımdan, 1997 yılında yayımlanan Kunst vd'nin *B. subtilis* genom dizin analizlerinin "tamamen doğru olduğu ve değişmeyeceği" önyargısı ile çalışmalarımı sürdürürken, sırasıyla 2013 ve sonra 2014'de gecikmeli olarak Barbe vd. (2009) ve Belda vd.(2013) çalışmalarıyla genom analizlerinin iki kez yenilendiğini gördüm. İki kez tekrar başa dönerek, genom-seviye model oluşturma çalışmalarım tekrarlı ve uzun bir süreç içinde gerçekleşti. Böylece, Belda vd.(2013)'nin genom analizine dayalı yeni ve üçüncü- nesil genom seviye model iBs1144 2015'in başında tamamlandı.

Doktora çalışmalarımdaki önemli darboğaz hizmet alımıyla yapılması planlanan mikrodizin analizlerinin planlandığı gibi TÜBİTAK 109R025 proje dökümanında belirtilen yurtiçi merkezi araştırma laboratuvarında yapılamaması ve Roche İzlanda Laboratuvarlarında örneklerin heba edilmesi oldu. Sonuçta, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü hizmet alımı ile, hocam Prof.Dr.Güzide Çalık'ın Enstitüdeki grupla etkin çalışmaları sonucunda başarılı ve yöntemlerin oturması önemli zaman kaybı ile oldu ve analizler yapılabilir.

İyi bir bilim insanı olarak gelişmemde ve yetişmemde önemli katkılar sağlayan, üretim yaparak insanlığa faydalı olmanın önemini aşıl原因; doğru, derin, geniş, özgür, eleştirel, ve yaratıcı düşünmeyi; bağımsız, zarif, ve insiyatif sahibi olarak doğru olanı yapmayı; disiplinli, uyum içinde etkin çalışmayı; sabırlı, enerjik olmanın önemini ve her işin özenle ve kaliteli yapılması gerektiğini öğrenmeme vesile olan; değerli birikimini öğrencileriyle paylaşarak bilimde, kimya mühendisliği dalında yeteneklerimin gelişmesine destek veren, araştırmalarımda her aşamasında tartışma olanağı bulduğum danışman-hocam Sayın Prof.Dr. H. Tunçer ÖZDAMAR'a teşekkür ederim. Araştırmalarıma ve yaşama geniş bir ufukla bakmayı öğreten, "içinde olduğum anı değerlendirerek yaşarsam" geleceğin de iyi olacağı felsefesini aşıl原因arak "gelecek" endişelerimi gideren, başarılı biri olmaktan önce değerli bir insan olmanın önemini vurgulayan, çalışmalarımda çok önemli katkılarda bulunan; problemlere doğru, rahat, esnek ve objektif bakmayı öğreterek problemleri çözme isteğimi ve motivasyonumu her zaman artıran; Tez İzleme Komitesinde değerli akademik katkılar veren ve tartışan, çok değerli-hocam Sayın Prof.Dr. Güzide ÇALIK'a sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

ODTÜ'de "Endüstriyel biyoteknolojiyle" tanışmanın verdiği heyecanla, çok mutlu gerçekleştirdiğim yüksek lisans çalışmamın danışmanı olan; yüksek lisans sonrası Amerika'da doktora çalışma olanağı bulmama destek veren; zor günlerimde sağladığı maddi ve manevi destekle her konuda bana yardımcı olan; üretme sevincini ve enerjisini aşıl原因ayan, doğru, yaratıcı, hızlı, pratik düşünmeyi ve birlikte çalışmanın ve işbirliğinin önemini öğreterek bana ilham veren; doktora tezimde genom seviye modelin oluşturulması ve doğrulanması süreçlerinde çok büyük ve önemli katkıları olan, bana akı analizini öğreten; Tez İzleme Komitesi toplantıları, araştırma grubu toplantıları, ve ODTÜ Kimya Mühendisliği Bölümü'nde çalışmalarına çok büyük katkılarda bulunan, ODTÜ Kimya Mühendisliği Endüstriyel Biyoteknoloji ve Metabolik Mühendislik Laboratuvarını daima kullanmama izin veren, makale yazma sürecindeengin tecrübelerini bana aktaran, kendisinin öğrencisi olma şansını bana verdiği için sonsuz minnet duyduğum, tüm TİK toplantılarına katılarak önemli katkılarla çalışmalarına yön veren, lisans-

üstü öğrencileriyle opera ve baleye davet ederek ve hediye ettiği güzel kitapla her zaman moral veren, çok değerli-hocam Sayın Prof.Dr. Pınar ÇALIK'a (ODTÜ) sonsuz teşekkür ederim.

Tez izleme Komitesi toplantılarında değerli eleştiri ve önerileriyle, pozitif enerjisiyle doktora çalışmalarına ve kimya mühendisliği bilim dalında yetişmemde önemli katkıları olan çok değerli-hocam Sayın Prof.Dr. Timur DOĞU'ya (ODTÜ) çok teşekkür ederim.

Doktora çalışmalarına TUBİTAK:BİDEB-2211 yurtiçi doktora bursu ile başladım. TUBİTAK'a doktorama verdiği önemli destek için teşekkür ederim. 2010 yılında Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü'nde araştırma görevlisi kadrosunda çalışmaya başladım.

Doktora çalışmalarım sırasında insan büyüme hormonu üretimi için yaptığı biyoreaktör deneyleriyle akı ve mikrodizin analizleri için gerekli deneysel örnek ve veri üreten, kendisinden yaşama dair çok şey öğrendiğim, değerli arkadaşım, meslektaşım Doktora öğrencisi Özge Deniz YILMAZ'a, bana çalışmalarım sırasında her zaman yardımcı olan, meslektaşlarım KYM Zülbiye ULUŞAN ve KYM Hande AFŞAR'a teşekkür ederim. Ayrıca ODTÜ Kimya Mühendisliği Endüstriyel Biyoteknoloji Laboratuvarı'ndan Vahideh Anghardi, Işık Haykır, ve Özge Ata'ya yardımları ve arkadaşlıkları için teşekkür ederim.

Sevgili babam Sayın Prof. Dr. Kemal KOCABAŞ, sevgili annem Sayın Prof. Dr. Ayfer KOCABAŞ, sevgili kardeşim KM, YM, PDEng Irmak KOCABAŞ ARKILIÇ, ve tüm büyüklerime ve, Ankara Üniversitesi'ndeki ve ODTÜ'deki hocalarıma, araştırma görevlisi arkadaşlarıma, dostlarıma varlıkları, anlayışları, toleransları, yardımları, ve destekleri için minnettarım.

Pınar KOCABAŞ
Ankara, Şubat 2017

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI

ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER DİZİNİ.....	xxi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xxiv
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xxviii
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Biyoteknoloji ve endüstriyel biyoteknolojik üretim.....	2
1.2 Hücreiçi tepkime hızlarının hesaplanması için araç: GEM.....	4
1.3 Doktora tezinin kapsamı.....	6
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ.....	9
2.1 <i>Bacillus subtilis</i>	9
2.1.1 <i>Bacillus subtilis</i> 'te protein salgılanması.....	10
2.2 <i>Bacillus subtilis</i> 'te Rekombinant Protein Üretimi.....	13
2.2.1 <i>Bacillus subtilis</i> 'te serin alkali proteaz üretimi.....	14
2.2.2 <i>Bacillus subtilis</i> 'te rekombinant insan büyüme hormonu üretimi.....	24
2.3 Hücreiçi Tepkime Sistemi.....	26
2.3.1 Hücreiçi tepkimeler.....	26
2.3.1.1 Glikoliz yolizi.....	27
2.3.1.2 Glikoneogenesis yolizi.....	30
2.3.1.3 Pentoz fosfat yolizi.....	32
2.3.1.4 TCA döngüsü.....	34
2.3.2 Taşınım.....	36
2.3.2.1 Serbest Yayınma (Difüzyon).....	37
2.3.2.2 Kolaylaştırılmış Difüzyon.....	38
2.3.2.3 Aktif taşınma.....	39
2.4 Metabolik Akı Analizi.....	40
2.4.1 Biyokimyasal tepkime temelli matematik modeller.....	44
2.4.2 Genom-seviye matematik modeller.....	47

2.4.3 <i>Bacillus</i> için metabolik akı analizi çalışmaları	49
2.4.3.1 Az tanımlı matematik modellerle gerçekleştirilen MAA çalışmaları.....	49
2.4.3.2 Tam tanımlı matematik modellerle gerçekleştirilen MAA çalışmaları.....	56
2.4.3.3 Çok tanımlı matematik modellerle gerçekleştirilen MAA çalışmaları.....	57
2.5 <i>Bacillus subtilis</i> için Oluşturulan Genom Seviye Matematik Modeller.....	59
2.6 Mikrodizin Analizi.....	63
2.7 <i>Bacillus subtilis</i> 'te Mikrodizin Analizi.....	67
2.7.1 Gen silinmesi/eklenmesinin etkileri.....	68
2.7.2 Yabancı genlerin ekspresyonlarının etkileri.....	75
2.7.3 Oksijenli ve oksijensiz çoğalmanın karşılaştırılması.....	76
2.7.4 Sıcaklığın etkileri.....	76
2.7.5 Taşınan moleküllerin etkileri.....	77
2.7.6 Kısıtlılık ve stresin etkileri.....	79
2.7.7 Diğer çalışmalar.....	81
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	85
3.1 Mikroorganizma.....	85
3.1.1 Serin alkali proteaz üretimi.....	85
3.1.2 İnsan büyüme hormonu üretimi.....	85
3.2 rhGH Üretiminde Hibrit-Genin Konak <i>Bacillus subtilis</i> Suşlarına Aktarılması.....	86
3.2.1 Elektroporasyonla plasmid DNA'nın <i>Bacillus subtilis</i> 'e transferi.....	86
3.2.1.1 Eppendorf elektroporasyon yöntemi: <i>B.subtilis</i> 'e transformasyon.....	86
3.2.1.2 <i>Bacillus subtilis</i> 'ten miniprep plasmid DNA izolasyonu.....	87
3.3 Üretim Deneyleri.....	89
3.3.1 <i>Bacillus licheniformis</i> ile SAP üretim deneyleri.....	89
3.3.1.1 Katı ortam.....	89
3.3.1.2 Önsıvı ortamı.....	89
3.3.1.3 Üretim Ortamı.....	89
3.3.2 Rekombinant <i>Bacillus subtilis</i> ile rhGH Üretim Deneyleri.....	90
3.3.2.1 Mikrobank (mikroorganizma saklama sistemi)	90
3.3.2.2 Katı çoğalma ortamı.....	90
3.3.2.3 Ön-sıvı çoğalma ortamı.....	91
3.3.2.4 Sıvı çoğalma ortamı	91

3.3.2.5 Ölçek büyültme adımları ve üretim ortamı....	92
3.3.3 Biyoreaktör sistemi....	92
3.3.3.1 Pilot-ölçek biyoreaktör sisteminde farklı oksijen-aktarım koşullarında üretim.....	93
3.3.3.2 Biyoreaktör ön hazırlıkları.....	94
3.3.3.3 Biyoreaktör sterilizasyonu.....	94
3.3.3.4 Biyoreaktörün steril üretim ortamı ile doldurulması.....	95
3.3.3.5 Oksijen elektrodu kalibrasyonu.....	96
3.3.3.6 Fermentasyonun başlatılması	96
3.4 Analitik Yöntemler.....	97
3.4.1 Mikroorganizma derişimi.....	97
3.4.2 Glukoz derişimi.....	97
3.4.3 Amino asit derişimleri.....	98
3.4.4 Organik asit derişimleri.....	99
3.4.5 SAP aktivitesi.....	100
3.4.6 rhGH derişimi.....	100
3.4.7 rhGH tayini: SDS–PAGE ve WESTERN-BLOT yöntemleri.....	101
3.4.7.1 SDS-PAGE yöntemi.....	102
3.5 RNA’dan Ters Transkripsiyon ile cDNA Sentezi ve Mikrodizin Analizleri.....	103
3.5.1 cDNA sentezi (QIAGEN kit ile).....	103
3.5.2 cDNA’nın saflaştırılması (QIAGEN MinElute Kit)	104
3.5.3 cDNA fragmentasyonu.....	104
3.5.4 Uç işaretleme.....	105
3.5.5 Hibridizasyon (49 Format-Standart Affymetrix Prosedürü).....	105
3.5.6 Yıkama – Boyama – Tarama (Genechip Operating Software).....	106
3.6 Hücreiçi Tepkime Hızlarının Bulunması.....	108
4. BULGULAR VE TARTIşMA.....	110
4.1 <i>B. subtilis</i> Genom-Seviye Modelinin Oluşturulması: <i>iBsu1144</i>	110
4.1.1 <i>iBsu1144</i> ’ün doğruluğu.....	113
4.1.2 Serin alkali proteaz üretiminde oksijen aktarımının hücreiçi tepkime hızlarına etkilerinin <i>iBsu1144</i> ile belirlenmesi	118
4.1.3 <i>iBsu1144</i> sonuçlarının biyokimyasal tepkime temelli modelle karşılaştırılması.	125

4.1.4 iBsu1144 sonuçlarının ikinci nesil GEM ile karşılaştırılması.....	128
4.1.5 SAP üretimi için metabolik mühendislik analizleri.....	133
4.1.5.1 <i>B.subtilis</i> 'te SAP sentezini artırmaya yönelik metabolik mühendislik analizi.....	133
4.1.5.2 <i>B.subtilis</i> 'te SAP üretimini artırmak için konak hücre oluşturmaya yönelik metabolik mühendislik analizi.....	134
4.2 Oksijen Aktarımının Rekombinant İnsan Büyüme Hormonu Üreten <i>Bacillus subtilis</i> Tepkime Sistemine Etkilerinin Transkripsiyonel Düzeyde İncelenmesi.....	136
4.2.1 RMA transkriptom verileri ve tepkime hızlarının analizleri.....	140
4.2.1.1 Glikoliz yolizi.....	140
4.2.1.2 TCA döngüsü.....	143
4.2.1.3 Pentoz fosfat yolizi.....	146
4.2.1.4 Piruvat nodu tepkimeleri.....	149
4.2.1.5 Serin-grubu amino asit yolizi.....	153
4.2.1.6 Alanin-grubu amino asit yolizi.....	156
4.2.1.7 Aromatik asit grubu amino asit yolizi.....	158
4.2.1.8 Aspartik asit grubu amino asit yolizi.....	160
4.2.1.9 Glutamik asit grubu amino asit yolizi.....	163
4.2.1.10 Histidin sentez yolizi.....	165
4.2.2 Transkriptom verilerinin BsRN-2016 ve iBsu1144-rhGH sonuçlarına dayalı ANOVA analizi.....	167
4.2.3 rhGH üretimi için metabolik mühendislik analizleri.....	168
4.2.3.1 <i>B.subtilis</i> 'te rhGH üretimini artırmaya yönelik metabolik mühendislik analizi.....	168
4.2.3.2 <i>B.subtilis</i> 'te rhGH üretimini artırmak için konak hücre oluşturmaya yönelik metabolik mühendislik analizi.....	170
4.2.4 iBsu1144 sonuçlarının literatürdeki GEM'lerle karşılaştırılması.....	172
4.2.4.1 iBsu1144 sonuçlarının birinci nesil GEM ile karşılaştırılması.....	172
4.2.4.2 iBsu1144 sonuçlarının ikinci nesil GEM ile karşılaştırılması.....	176
4.2.5 Rekombinant İnsan Büyüme Hormonu Üretiminin MOT koşulunda Periyod II'den Periyod III'e geçişin <i>Bacillus subtilis</i> Tepkime Sistemine Etkilerinin Transkripsiyonel Düzeyde İncelenmesi.....	180
4.2.5.1 Glikoliz yolizi.....	181
4.2.5.2 TCA döngüsü.....	183
4.2.5.3 Pentoz fosfat yolizi.....	185

4.2.5.4 Piruvat nodu.....	186
4.2.5.5 Serin grubu amino asitlerin yolizi.....	190
4.2.5.6 Alanin grubu amino asitlerin yolizi.....	192
4.2.5.7 Aromatik asit grubu amino asitlerin yolizi.....	193
4.2.5.8 Aspartik asit grubu amino asitlerin yolizi.....	195
4.2.5.9 Glutamik asit grubu amino asitlerin yolizi.....	198
4.2.5.10 Histidin sentezi yolizi.....	199
4.2.6 Transkriptom verilerinin BsRN-2016 ve iBsu1144-rhGH sonuçlarına dayalı ANOVA analizleri.....	201
5. SONUÇLAR.....	202
5.1 <i>B. subtilis</i> Genom-Seviye Model iBsu1144.....	202
5.2 <i>B. subtilis</i> Tepkime Sisteminin Oksijen Aktarımına Cevabının Transkripsiyonel Seviyede Analizi.....	206
KAYNAKLAR.....	211
EKLER.....	246
EK 1 <i>Bacillus</i> Türlerinde Metabolik Akı Analizi (MAA) Çalışmaları.....	247
EK 2 <i>Bacillus subtilis</i> 'le Gerçekleştirilen Mikrodizin Çalışmaları.....	250
EK 3 <i>B. subtilis</i> Tepkime Sistemi BsRN-2016.....	257
EK 4 <i>B. subtilis</i> Genom-Seviye Model iBsu1144.....	261
EK 5 SAP üretiminde Periyot III'te LOT, MOT, ve HOT koşullarında iBsu1144 ile hesaplanan tepkime hızları ve analizleri	266
EK6 BsBRM-1999 (Çalık vd. 1999) ve iBsu1144 akılarının karşılaştırılması.....	286
EK 7 SAP üretiminin MOT koşulu için iBsu1144 kullanılarak gerçekleştirilen akı değişkenliği analizi	287
EK 8 SAP üretiminin MOT koşulu için iBsu1144 kullanılarak gerçekleştirilen akı değişkenliği analiz sonuçlarının Morimoto vd. (2008) ile karşılaştırılması.....	293
EK 9 <i>B. subtilis</i> Genom-Seviye Model iBsu1144-rhGH	297
EK 10 rhGH biyoprosesinde LOT, MOT, ve HOT'ta Periyot III için iBsu1144-rhGH ile hesaplanan tepkime hızları ve analizleri	302
EK 11 <i>B. subtilis</i> 'ten rhGH üretim biyoprosesinde PIII (t=16 st) için LOT, MOT, ve HOT koşullarına ait RMA değerleri ve iç-düzen geni <i>tyrS</i> 'in ekspresyonuna dayanarak hesaplanan yolizi gen ekspresyon oranları (ER).....	317
EK 12 <i>B. subtilis</i> 'ten rhGH üretiminde (Özdamar vd. 2009) oksijen aktarım koşullarından önemli ölçüde etkilenen prob setleri veya birimleri	328

EK 13 rhGH üretimi için MOT koşulunda Periyod III için gerçekleştirilen akı değişkenliği analizi sonuçları	336
EK 14 rhGH üretimi için MOT koşulunda Periyod III için gerçekleştirilen akı değişkenliği analizi sonuçlarının Morimoto vd. (2008) ile karşılaştırılması.....	342
EK 15 rhGH üretiminin MOT koşulunda Periyod II ve III için hesaplanan iBsu1144-rhGH tepkime hızları ve oranları.....	345
EK 16 <i>B.subtilis</i> 'ten rhGH üretiminin MOT koşulunda PII ve PIII'e ait RMA değerleri ve iç düzen geni <i>tyrS</i> 'e dayanan ekspresyon oranları (ER).....	358
EK 17 <i>B.subtilis</i> 'ten rhGH üretiminin (Özdamar vd. 2009) MOT koşulunda kalma süresinden etkilenen mikrodizin prob setleri	369
ÖZGEÇMİŞ.....	375

SİMGELER DİZİNİ

A	Metabolik tepkime ağının stokiyometrik katsayı matrisi
c(t)	Metabolit birikim vektörü
c₁(t)	Hücre dışı metabolit birikim vektörü
c₂(t)	Hücre içi metabolit birikim vektörü
C_C	Başlangıç sitrat derişimi (kg m ⁻³)
K	Bir tepkimenin termodinamik denge sabiti
N	Karıştırma hızı (dk ⁻¹)
p değeri	Karşılaştırılan değerlerin aynı olduğunu kabul eden sıfır hipotezinin (H ₀) reddedilmesini sağlayan en düşük anlamlılık değeri
P/O	Harcanan oksijen atomu başına oluşan ATP molekül sayısı
Q_o	Hava giriş hızı (m ³ /dk)
Q_o/V_R	Birim sıvı hacmine gönderilen gaz hızı, vvm: hacim hacim ⁻¹ dk ⁻¹
r(t)	Tepkime hız vektörü
r_i	<i>i</i> - metabolitinin tepkime hızı/akısı, mmol/(g _{KH} st)
T	Sıcaklık, °C
t	Kalma süresi, s veya st
V	Biyoreaktörün toplam hacmi, dm ³
V_R	Biyoreaktörün çalışma (sıvı) hacmi, dm ³
X_{ie}	Tepkimenin kısıtlayıcı <i>i</i> bileşeni için denge dönüşümü
Z	Amaç fonksyonu
μ	Spesifik çoğalma hızı, s ⁻¹ veya st ⁻¹
α_i	<i>i</i> -bileşenin ilgili tepkimedeki stokiyometrik katsayısı
α_{ai}-PSR	Hücre dışında tespit edilmeyen <i>i</i> amino asitin protein sentez tepkimesindeki stokiyometrik katsayısı
ΔG_R^o	Tepkimenin standart koşullardaki Gibbs serbest değişim enerjisi
ΔG_{f i}^o	<i>i</i> -bileşenin standart koşullardaki Gibbs serbest oluşum enerjisi
Σr_{ai}	<i>i</i> -amino asitin toplam sentez hızı, mmol/(g _{KH} st)

Kısaltmalar

Ac	asetat
AcCoA	asetil koenzim A
Ala	L-alanin
APGC	6-fosfo-D-glukonat
Arg	L-arginin
Asn	L-asparagin
Asp	L-aspartat
AspSa	aspartat semialdehit
ANOVA	tek yönlü varyans analizi
BsRN-2016	<i>Bacillus subtilis</i> tepkime sistemi-2016
BsBRM-1999	biyokimyasal tepkime temelli model (Çalık vd. 1999)
Cit	sitrat
Citr	sitrulin

Chor	korisimat
Cys	L-sistein
ER	bir genin iki farklı koşuldaki ekspresyonlarının oranı
E4P	eritiroz 4-fosfat
F6P	fruktoz 6-fosfat
Fum	fumarat
G6P	glukoz 6-fosfat
G3P	gliseraldehit 3-fosfat
GlcD	glukoz
GlcN	glukonat
Gln	L-glutamin
Glu	L-glutamat
Gly	L-glisin
GEM	genom seviye model
HOT	yüksek oksijen-aktarım koşulu ($N=800\text{rpm}$, $Q_0/V_R=1.0\text{vvm}$)
His	L-histidin
Hom	homoserin
iBsu844-rhGH	844 gen temelli modifiye 1.nesil GEM (Özdamar vd. 2010)
iBsu1144	3. nesil yeni genom seviye model
iBsu1144-rhGH	iBsu1144 modelinin rhGH üretimi için uygulanan formu
iBsu1103V2-SAP	1103 gen temelli modifiye 2.nesil GEM'in SAP üretimi için uygulanan formu (Tanaka vd. 2013)
iBsu1103V2-rhGH	1103 gen temelli modifiye 2.nesil GEM'in rhGH üretimi için uygulanan formu (Tanaka vd., 2013)
I3dhdp	2,3-dihidroipikolinat
I6dap2	meso-2,6-diaminoheptandiyonat
ICit	izositrat
Ile	L-izolözin
LOT	düşük oksijen-aktarım koşulu ($N=500\text{rpm}$, $Q_0/V_R=0.2\text{ vvm}$)
Lac	laktat
Leu	L-lözin
Lys	L-lizin
MOT	orta oksijen-aktarım koşulu ($N=750\text{rpm}$, $Q_0/V_R=0.5\text{vvm}$)
MAA	metabolik akı analizi
Mal	malat
Met	L-metiyonin
N	karıştırma hızı, rpm
Oaa	okzaloasetat
Orn	ornitin
OA	oksijen aktarımı
PFY	pentoz fosfat yolizi
PSS	yaklaşık yatışkın koşul
PI	periyot I
PII	periyot II
PIII	periyot III
PIV	periyot IV
PEP	fosfofenolpürivat
Phe	L-fenilalanin

Pi	inorganik ortofosfat
Pro	L-prolin
PRPP	5-fosfat-D-ribozilpirofosfat
Pyr	pürivat
R#	iBsu1144 ya da iBsu1144-rhGH tepkime numarası
*R#	BsRN-2016 tepkime numarası
R#=#	R# nolu tepkimenin gerçek hız/akı değeri
rhGH	rekombinant insan büyüme hormonu
R5P	ribüloz 5-fosfat
Ru5pD	riboz 5-fosfat
R _{LF-i}	hız kısıtlayıcı amino asit fonksyonu, $R_{LF-i} = \alpha_{ai-PSR} / \sum r_{ai} \text{ (g}_{KH} \text{ st/mmol)}$
RMA	<i>Robust Multi-array Average</i> : Gen çiplerine ait verilerden gen ekspresyon matrisini oluşturmada kullanılan algoritmadır; çip görüntülerinin arka-plan düzeltilmesi, normalizasyonu, toparlanması yapılarak problemlerle elde edilen ısıma değerlerinin 2 tabanına göre logaritmaları alınarak gen ekspresyonları hesaplanır
rpm	dakikada devir sayısı, dk ⁻¹
SAP	serin alkali proteaz
S7P	sedoheptuloz-7-fosfat
Ser	L-serin
Succ	süksinat
SucCoA	süksinat koenzim A
TCA	trikarboksilik asit
Thdp	1,2,4,5-tetrahidrodipikolinat
Thr	L-treonin
Trp	L-triptofan
Tyr	L-tirozin
Umob	3-metil-2-okzobutanonat
UPG	3-fosfo-D-gliserat
Val	L-valin
vvm	reaksiyon hacmi başına dakikada biyoreaktöre beslenen hava miktarı
Xu5pD	ksiloz 5-fosfat
α KG	α -ketoglutarat

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 <i>aprE</i> ekspresyonu Kontrol Mekanizması.....	18
Şekil 2.2 Glikoliz yolizi.....	28
Şekil 2.3 Glikoneogenesis yolizi.....	31
Şekil 2.4 Pentoz fosfat yolizi.....	33
Şekil 2.5 Oksijenli ortamda gerçekleşen tepkimeler	35
Şekil 2.6 TCA döngüsü.....	35
Şekil 2.7 Gram-pozitif ve gram-negatif bakterilerdeki hücre zarflarının yapıları.....	36
Şekil 2.8 Difüzyon.....	37
Şekil 2.9 Kolaylaştırılmış difüzyon	38
Şekil 2.10 İkincil aktif taşıma: a) simport, b) antiport, c) uniport.....	40
Şekil 2.11 Kütle korunum denklemlerinin (KKD) kurulacağı sistem: yarıkesikli mikro-biyoreaktör	42
Şekil 2.12 Affymetrix mikrodizin deneyinin akım şeması.....	67
Şekil 3.1 Chemap AG- FZ 3000 pilot ölçek biyoreaktör sistemi....	92
Şekil 4.1 <i>iBsu1144</i> 'in oluşturulması.....	110
Şekil 4.2 <i>iBsu1144</i> metabolik haritası.....	112
Şekil 4.3.a. Hücre, sitrat, ve serin alkali proteaz derişimlerinin kalma süresi ve oksijen aktarım koşullarıyla değişimi b. pH ve çözünmüş oksijen derişiminin kalma süresi ve oksijen aktarım koşullarıyla değişimi	119
Şekil 4.4 SAP üretiminde <i>iBsu1144</i> ile hesaplanan TCA döngüsü akıları, mmol/(g _{KH} st).....	120
Şekil 4.5 SAP üretiminde <i>iBsu1144</i> ile hesaplanan piruvat dallanma noktasındaki tepkime hızları, mmol/(g _{KH} st).....	121
Şekil 4.6 SAP üretiminde <i>iBsu1144</i> ile hesaplanan glikoneogenesis tepkime hızları, mmol/(g _{KH} st).....	122
Şekil 4.7 SAP üretiminde <i>iBsu1144</i> ile hesaplanan pentoz fosfat yolizi tepkime hızları, mmol/(g _{KH} st).....	124
Şekil 4.8 SAP üretiminin MOT koşulu için sırasıyla <i>iBsu1144</i> (siyah) ve <i>iBsu1103V2-SAP</i> (kırmızı) ile hesaplanan TCA döngüsü akıları, mmol/(g _{KH} st).	129
Şekil 4.9 SAP üretiminin MOT koşulu için sırasıyla <i>iBsu1144</i> (siyah) ve <i>iBsu1103V2-SAP</i> (kırmızı) ile hesaplanan piruvat nodu akıları, mmol/(g _{KH} st).	130
Şekil 4.10 SAP üretiminin MOT koşulu için sırasıyla <i>iBsu1144</i> (siyah) ve <i>iBsu1103V2-SAP</i> (kırmızı) ile hesaplanan glikoneogenesis yolizi akıları, mmol/(g _{KH} st).	131

Şekil 4.11 SAP üretiminin MOT koşulu için sırasıyla <i>iBsu1144</i> (siyah) ve <i>iBsu1103V2-SAP</i> (kırmızı) ile hesaplanan pentoz fosfat yolizi akıları, mmol/(g _{KH} st).	132
Şekil 4.12 rhGH üretiminin <i>iBsu1144</i> -rhGH tepkimeleriyle oluşum haritası.....	138
Şekil 4.13.a. rhGH üretiminde çözünmüş oksijen derişimi ve ortam pH'ının kalma süresi ve oksijen aktarım hızıyla değişimleri .b. rhGH üretiminde glukoz ve hücre derişimlerinin kalma süresi ve oksijen aktarım hızıyla değişimleri c. rhGH derişiminin kalma süresi ve oksijen aktarım hızıyla değişimi.....	139
Şekil 4.14 rhGH biyoprosesinin üçüncü periyodunda LOT, MOT, HOT için <i>iBsu1144</i> -rhGH ile hesaplanan glikoliz yolizi tepkime hızları (mmol/(g _{KH} st)) ve RMA verileri kullanılarak iç-düzen geni <i>tyrS</i> 'e dayanarak hesaplanan yolizi genlerinin ekspresyon oranları (ER).....	142
Şekil 4.15 rhGH biyoprosesinin üçüncü periyodunda LOT, MOT, HOT için <i>iBsu1144</i> -rhGH ile hesaplanan TCA döngüsü tepkime hızları (mmol/(g _{KH} st)) ve RMA verileri kullanılarak iç-düzen geni <i>tyrS</i> 'e dayanarak hesaplanan yolizi genlerinin ekspresyon oranları (ER).....	144
Şekil 4.16 rhGH biyoprosesinin üçüncü periyodunda LOT, MOT, HOT için <i>iBsu1144</i> -rhGH ile hesaplanan PFY tepkime hızları (mmol/(g _{KH} st)) ve RMA verileri kullanılarak iç-düzen geni <i>tyrS</i> 'e dayanarak hesaplanan yolizi genlerinin ekspresyon oranları (ER).....	147
Şekil 4.17.a rhGH biyoprosesinin üçüncü periyodunda LOT, MOT, HOT için <i>iBsu1144</i> -rhGH ile hesaplanan Pyr nodu tepkime hızları (mmol/(g _{KH} st)) ve RMA verileri kullanılarak iç-düzen geni <i>tyrS</i> 'e dayanarak hesaplanan yolizi genlerinin ekspresyon oranları (ER). b rhGH biyoprosesinin üçüncü periyodunda LOT, MOT, HOT için <i>iBsu1144</i> -rhGH ile hesaplanan Pyr nodu tepkime hızları (mmol/(g _{KH} st)) ve RMA verileri kullanılarak iç-düzen geni <i>tyrS</i> 'e dayanarak hesaplanan yolizi genlerinin ekspresyon oranları (ER).....	150
Şekil 4.18 rhGH biyoprosesinin üçüncü periyodunda LOT, MOT, HOT için <i>iBsu1144</i> -rhGH ile hesaplanan serin-grubu amino asit yolizi tepkime hızları (mmol/(g _{KH} st)) ve genleri. R100'ün geni bilinmiyor.....	155
Şekil 4.19 rhGH biyoprosesinin üçüncü periyodunda LOT, MOT, HOT için <i>iBsu1144</i> -rhGH ile hesaplanan alanin-grubu amino asit yolizi tepkime hızları (mmol/(g _{KH} st)) ve genleri. R34 ve R210'un genleri bilinmemektedir.....	157
Şekil 4.20 rhGH biyoprosesinin üçüncü periyodunda LOT, MOT, HOT için <i>iBsu1144</i> -rhGH ile hesaplanan aromatik amino asit yolizi tepkime hızları (mmol/(g _{KH} st)) ve genleri.....	159
Şekil 4.21 rhGH biyoprosesinin üçüncü periyodunda LOT, MOT, HOT için <i>iBsu1144</i> -rhGH ile hesaplanan aspartik asit grubu amino asit yolizi tepkime hızları (mmol/(g _{KH} st)) ve genleri.....	161

Şekil 4.22 rhGH biyoprosesinin üçüncü periyodunda LOT, MOT, HOT için iBsu1144-rhGH ile hesaplanan glutamik asit grubu amino asit yolizi tepkime hızları (mmol/(g _{KH} st)) ve genleri.....	164
Şekil 4.23 rhGH biyoprosesinin üçüncü periyodunda LOT, MOT, HOT için iBsu1144-rhGH ile hesaplanan histidin sentezi tepkime hızları (mmol/(g _{KH} st)) ve genleri.....	166
Şekil 4.24 rhGH üretiminin MOT koşulu için sırasıyla iBsu1144-rhGH (siyah) ve iBsu844-rhGH (mavi) ile hesaplanan glikoliz yolizi akıları, mmol/(g _{KH} st).....	173
Şekil 4.25 rhGH üretiminin MOT koşulu için sırasıyla iBsu1144-rhGH (siyah) ve iBsu844-rhGH (mavi) ile hesaplanan piruvat nodu akıları, mmol/(g _{KH} st).....	174
Şekil 4.26 rhGH üretiminin MOT koşulu için sırasıyla iBsu1144-rhGH (siyah) ve iBsu844-rhGH (mavi) ile hesaplanan TCA döngüsü akıları, mmol/(g _{KH} st).....	175
Şekil 4.27 rhGH üretiminin MOT koşulu için sırasıyla iBsu1144-rhGH (siyah) ve iBsu844-rhGH (mavi) ile hesaplanan pentoz fosfat yolizi akıları, mmol/(g _{KH} st).....	176
Şekil 4.28 rhGH üretiminin MOT koşulu için sırasıyla iBsu1144-rhGH (siyah) ve iBsu1103V2-rhGH (kırmızı) ile hesaplanan glikoliz yolizi akıları, mmol/(g _{KH} st).....	177
Şekil 4.29 rhGH üretiminin MOT koşulu için sırasıyla iBsu1144-rhGH (siyah) ve iBsu1103V2-rhGH (kırmızı) ile hesaplanan piruvat nodu akıları, mmol/(g _{KH} st).....	178
Şekil 4.30 rhGH üretiminin MOT koşulu için sırasıyla iBsu1144-rhGH (siyah) ve iBsu1103V2-rhGH (kırmızı) ile hesaplanan TCA döngüsü akıları, mmol/(g _{KH} st).....	179
Şekil 4.31 rhGH üretiminin MOT koşulu için sırasıyla iBsu1144-rhGH (siyah) ve iBsu1103V2-rhGH (kırmızı) ile hesaplanan pentoz fosfat yolizi akıları, mmol/(g _{KH} st).....	180
Şekil 4.32 rhGH üretiminin MOT koşulunda Periyod II ve Periyod III'te iBsu1144-rhGH ile hesaplanan glikoliz yolizi tepkime hızları (mmol/(g _{KH} st)) ve RMA verileri kullanılarak iç-düzen geni <i>tyrS</i> 'e dayanarak hesaplanan yolizi genlerinin ekspresyon oranları (ER)	182
Şekil 4.33 rhGH üretiminin MOT koşulunda Periyod II ve Periyod III'te iBsu1144-rhGH ile hesaplanan TCA döngüsü tepkime hızları (mmol/(g _{KH} st)) ve RMA verileri kullanılarak iç-düzen geni <i>tyrS</i> 'e dayanarak hesaplanan yolizi genlerinin ekspresyon oranları (ER).....	184
Şekil 4.34 rhGH üretiminin MOT koşulunda Periyod II ve Periyod III'te iBsu1144-rhGH ile hesaplanan PFY tepkime hızları (mmol/(g _{KH} st)) ve RMA verileri kullanılarak iç-düzen geni <i>tyrS</i> 'e dayanarak hesaplanan yolizi genlerinin ekspresyon oranları (ER).....	186

Şekil 4.35.a rhGH üretiminin MOT koşulunda Periyod II ve Periyod III'te iBsu1144-rhGH ile hesaplanan Pyr nodu tepkime hızları (mmol/(g _{KH} st)) ve RMA verileri kullanılarak iç-düzen geni <i>tyrS</i> 'e dayanarak hesaplanan yolizi genlerinin ekspresyon oranları (ER) b rhGH üretiminin MOT koşulunda Periyod II ve Periyod III'te iBsu1144-rhGH ile hesaplanan Pyr nodu tepkime hızları (mmol/(g _{KH} st)) ve RMA verileri kullanılarak iç-düzen geni <i>tyrS</i> 'e dayanarak hesaplanan yolizi genlerinin ekspresyon oranları (ER).....	189
Şekil 4.36 rhGH üretiminin MOT koşulunda Periyod II ve Periyod III'te iBsu1144-rhGH ile hesaplanan serin-grubu amino asit yolizi tepkime hızları (mmol/(g _{KH} st)) ve genleri.....	191
Şekil 4.37 rhGH üretiminin MOT koşulunda Periyod II ve Periyod III'te iBsu1144-rhGH ile hesaplanan alanin-grubu amino asit yolizi tepkime hızları (mmol/(g _{KH} st)) ve genleri.....	193
Şekil 4.38 rhGH üretiminin MOT koşulunda Periyod II ve Periyod III'te iBsu1144-rhGH ile hesaplanan aromatik amino asit yolizi tepkime hızları (mmol/(g _{KH} st)) ve genleri.....	195
Şekil 4.39 rhGH üretiminin MOT koşulunda Periyod II ve Periyod III'te iBsu1144-rhGH ile hesaplanan aspartik asit grubu amino asit yolizi tepkime hızları (mmol/(g _{KH} st)) ve genleri.....	197
Şekil 4.40 rhGH üretiminin MOT koşulunda Periyod II ve Periyod III'te iBsu1144-rhGH ile hesaplanan glutamik asit grubu amino asit yolizi tepkime hızları (mmol/(g _{KH} st)) ve genleri.	199
Şekil 4.41 rhGH üretiminin MOT koşulunda Periyod II ve Periyod III'te iBsu1144-rhGH ile hesaplanan histidin sentezi tepkime hızları (mmol/(g _{KH} st)) ve genleri.....	200

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 <i>B.subtilis</i> 'te <i>aprE</i> ekspresyonunu etkileyen proteinler, özellikleri, ve işlevleri	15
Çizelge 2.2 Proteaz üretimiyle ilgili kaynaklar: Araştırılan parametreler.....	20
Çizelge 2.3 Proteaz üretimiyle ilgili kaynaklar: Sonuçlar.....	21
Çizelge 3.1 Rekombinant <i>Bacillus subtilis</i> için katı-ortam bileşimi.....	90
Çizelge 3.2 Rekombinant <i>Bacillus subtilis</i> için ön-sıvı çoğalma ortamı bileşimi.....	91
Çizelge 3.3 Rekombinant <i>B. subtilis</i> için glukoz temelli tanımlı üretim ortamı bileşimi.....	91
Çizelge 3.4 Pilot-ölçekte rhGH üretimi için uygulanan koşullar ve kısaltmaları.....	93
Çizelge 3.5 Amino asit analizi için New-Pico yöntemi gradyen koşulları.....	99
Çizelge 3.6 Amino asitlerin analizlenmesi için uygulanan koşullar.....	99
Çizelge 3.7 Organik asitlerin analizlenmesi için uygulanan koşullar.....	100
Çizelge 3.8 HPCE analiz koşulları.....	101
Çizelge 3.9 cDNA Sentez Bileşenleri.....	103
Çizelge 3.10 Primer Hibridizasyon Çözeltisi.....	103
Çizelge 3.11 Fragmentasyon Reaksiyonu Bileşenleri.....	104
Çizelge 3.12 cDNA İşaretlenme Reaksiyon Karışımı.....	105
Çizelge 3.13 Hibridizasyon Çözeltisinin Bileşimi.....	105
Çizelge 3.14 2X Tamponunun Bileşimi.....	106
Çizelge 3.15 12X MES Tamponunun Bileşimi.....	106
Çizelge 3.16 Yıkama-A Tamponu Bileşimi.....	107
Çizelge 3.17 Yıkama-B Tamponu Bileşimi.....	107
Çizelge 3.18 Streptavidin çözeltisinin bileşen ve miktarları.....	107
Çizelge 3.19 Antikor çözeltisi bileşen ve miktarları.....	107
Çizelge 3.20 SAPE çözeltisinin bileşen ve miktarları.....	107
Çizelge 4.1 <i>Bacillus subtilis</i> genom seviye modelleri (GEM).....	114
Çizelge 4.2 <i>Bacillus subtilis</i> GEM'lerinin oluşturulması ve doğrulanmasında kullanılan veri tipleri.....	115
Çizelge 4.3 <i>B.subtilis</i> GEM'lerinin oluşturulması ve doğrulanmasında en uygun akı dağılımlarının hesaplanması için kullanılan stratejiler.....	116
Çizelge 4.4 <i>B. subtilis</i> GEM'lerinin oluşturulma ve doğrulanma süreçlerinde kullanılan veri tiplerine dayanan doğrulukları.....	117

Çizelge 4.5 SAP üretiminde oksijen aktarımının amino asit yolizlerine yönelen akılara etkileri.....	123
Çizelge 4.6 SAP üretiminde oksijen aktarımının ATP üretimine etkileri.....	124
Çizelge 4.7 Amino asit sentez yolizlerine yönelen tepkimeler için akı oranlarının oksijen aktarımıyla değişimi	127
Çizelge 4.8 rhGH üretiminde oksijen aktarımının iBsu1144-rhGH ile hesaplanan ATP üretim hızına etkileri.....	146
Çizelge 4.9 rhGH üretiminde oksijen aktarımının amino asit yolizlerine yönelen akılara etkileri.....	153
Çizelge 4.10 rhGH üretiminin MOT koşulunda Periyod II ve Periyod III için iBsu1144-rhGH ile hesaplanan ATP üretim hızları.....	185
Çizelge 4.11 rhGH üretiminin MOT koşulunda Periyod II ve Periyod III için iBsu1144-rhGH ile hesaplanan amino asit yolizlerine yönelen metabolik akılar, mmol/(g _{KH} st).....	190

1. GİRİŞ

“Rekombinant *Bacillus subtilis* hücreiçi tepkime sisteminin genom-seviyede araştırılması” konulu doktora tezi, kimyasal reaksiyon mühendisliği içinde “biyoteknolojik proseslerle protein üretiminin” yüksek verim ve seçimlilikte yapılabilmesi için “biyokimyasal reaksiyon mühendisliği prensipleriyle” biyoreaktör içinde *mikro-biyoreaktör* olarak işlev gören *B. subtilis* içinde hücreiçi tepkime sisteminde molekülün üretiminin gerçekleşmesi için “metabolik tasarım” yapabilmek amacıyla planlanmıştır. Bunun için, hücreiçi tepkime sistemindeki tepkimelerin bilinmesi, bu birikim üzerine hücreiçi tepkime ağı (sistemi) oluşturulması ve kompleks tepkime sistemi grubuna giren hücreiçi tepkime sisteminin matematik modelinin kurulması gerekmektedir. Hücreiçi tüm tepkimelerin bilinmesi için önce DNA dizin analizinin yapılması gerekir; aynı araştırma konsorsiyumu tarafından 1997’de ilk- (Kunst vd. 1997), 2009’da ikinci- (Barbe vd. 2009) ve, 2013’te üçüncü- (Belda vd. 2013) *B. subtilis* DNA dizin- veya diğer adıyla genom analizi yapılmış ve gelişen cihazlarla yanlışlar düzeltilerek 16 yıl içinde genom analizinin geliştirilerek doğruya çok yakın belirlendiği kabul edilebilir. Herbir genom analizinden sonra gen-tepkime ilişkisi çok sayıda araştırmacı tarafından araştırılmıştır; bu çerçevede genom temelli *B. subtilis* modelleri: Kunst vd. (1997) temelinde belirlenen tepkimelerle ilk *B. subtilis* genom-seviye model 2007’de (Oh vd. 2007) olmak üzere birinci-nesil üç model, Barbe vd. (2009) temel alınarak ikinci-nesil üç model yayınlanmıştır. Belda vd. (2013) temel alınarak üçüncü-nesil ilk model bu doktora tez araştırmasıyla kurulan *iBsu1144*’tür.

Genom seviye tepkime sistemi kurulması ve temel alınarak reaksiyon mühendisliği prensipleriyle kurulan matematik modelin işletilip analizlerin yapılması için ürünün seçilmesi ve bağlantılı fermentasyon deneylerinin en uygun biyoreaktör işletim koşullarında yapılıp kalma süresine karşı girdilerin azalma ve ürün ve yan-ürünlerin oluşumlarının bulunması gerekir. Bu çerçevede kurulan *B. subtilis* genom seviye matematik modelin sınanması için: **i)** serin alkali proteaz (SAP) enzimi ve, **ii)** rekombinant insan büyüme hormonu (rhGH), üretimi seçilmiştir. SAP ve rhGH üretim deneylerinde, biyoreaktör işletim parametresi oksijen aktarımının düşük-, orta- ve yüksek- değerlerinde deneyler yapılarak, oksijen aktarımının *B. subtilis* hücreiçi

tepkime sistemine ve öncesinde genlerin transkripsiyonuna ve bağlantılı olarak tepkimelerinin enzimlerinin sentezine perturbatif etki yapılmış ve sonuçlar analiz edilmiştir.

Rekombinant insan büyüme hormonu (rhGH) deneyleri yapılırken kalma süresine karşı alınan *B. subtilis* hücre örneklerinin mikrodizin analizleri de yapılmış ve genlerinin transkripsiyon verileri elde edilmiştir. rhGH üretimi için hesaplanan tepkime hızları ile tepkimelerin enzimlerinin sentezinden sorumlu genlerin transkripsiyon sonuçları birlikte kullanılarak, rhGH için analizlerde derinlik elde edilmesi amaçlanmıştır. Bu çerçevede: **i)** *B. subtilis* için son genom-dizin analizi Belda vd. (2013) temel alınarak hücre içi tepkime ağı BsRN-2016'nın gen-enzim-tepkime verileriyle kurulması, **ii)** reaksiyon mühendisliği prensipleriyle genom seviye model (GEM) iBsu1144 tepkime sistemi oluşturulması ve izoterm işletim için kütle-korunum temelli matematik modelin kurulması, **iii)** GEM'in SAP ve rhGH üretimleri için biyoreaktör verileriyle ayrı- ayrı işletimi SAP ve rhGH üretimleri için her bir oksijen aktarım koşulunda tepkime hızlarının/akıların hesaplanması, ve **iv)** yalnız rhGH üretimi için *B. subtilis* hücre örneklerinin mikrodizin analizlerinin yapılması ve genlerinin transkripsiyon verileri elde edilerek akı sonuçlarıyla birlikte analiz edilerek metabolik tasarımlar için sonuçlar elde edilmesi, doktora tezinin çerçevesini oluşturmaktadır.

1.1 Biyoteknoloji ve endüstriyel biyoteknolojik üretim

Biyoteknoloji “biyolojik organizmaların, biyolojik sistemlerin veya biyolojik proseslerin üretim ve servis endüstrilerine uygulanması” olarak tanımlanır (OECD 1982). Kronolojik sırayla, temel biyokimyasal maddeler (özellikle organik asitler, amino asitler) 1953'te Japonya'da amino asitlerin üretimi, kimya mühendislerinin inorganik ve organik moleküllerden sonra biyokimyasal moleküllerin üretimini ve, biyokimya mühendisliğinin ve zaman içinde biyokimyasal reaksiyon mühendisliği bilim dalının temellerinin gelişimini başlatmıştır. 1970-1990 arasında amino asitlerden sonra endüstriyel enzim üretimi endüstriyel biyoteknolojik ürünler arasında, antibiyotiklerin içinde olduğu farmasötik maddeler ürün grubu yanında etki değeri büyük üçüncü grup olmuştur. Moleküler genetik yöntemlerin gelişimiyle, özellikle polimeraz zincir

tepkimesi (PCR) ve termal-döngü cihazının 1988’de bir Nobel ödülü ile bilim alanına girmesiyle özellikle rekombinant protein üretimi endüstriyel biyoteknolojik ürünler grubu içinde antibiyotiklerin oluşturduğu üretim ağırlığını çok daha artırarak birim fiyatı çok yüksek ürünler üretim dönemini açmıştır.

Endüstriyel enzim üretimi için merkez Avrupa’dır. Önemli kuruluşlar Novo Industri A/S (Danimarka), Gist-Brocades (Hollanda), ve Chr. Hansen Holding A/S (Danimarka)’dır. Ticari önemi olan enzimlerin üretimlerinin % 60’ını proteazlar oluşturur. Proteazlar peptit bağlarını hidrolize eden enzimlerdir. Serin alkali proteaz (EC 3.4.21.14) en önemli endüstriyel enzimlerdendir; deterjan, gıda, deri, ve fotoğraf endüstrisinde kullanılmaktadırlar. Serin alkali proteazın deterjan endüstrisinde kullanımı toplam mikrobiyal enzim satışlarının % 35’ini oluşturur. SAP katalitik aktivitesi için serin gereklidir ve yaklaşık olarak pH=10’da en yüksek aktiviteyi gösterir (Çalık 1998, Çalık vd. 2001).

Biyomoleküllerin biyoteknolojik proseslerle üretiminde ürün verimi ve seçimliliği mikroorganizmanın üretim kapasitesi ile sınırlıdır. Hücrenin istenen biyomolekülü doğal olarak üretmediği durumlarda, ilk olarak metabolik mühendislik tasarımı ile yabancı geni taşıyan rekombinant plasmid tasarımı yapılarak, istenilen ürünü üretebilme potansiyeli olan rekombinant mikroorganizma geliştirilir. Doğal olarak insan metabolizmasında sentezlenen bir biyomolekülün üretimi hedeflendiğinde, insan genomundan biyomolekülün üretiminden sorumlu gen izole edilip taşıyıcı DNA moleküllerine (plasmidlere) kovalent bağlarla bağlanır. Uygun bir konak hücreye transfer edilip orada çoğaltıldıktan sonra rekombinant-DNA mikroorganizma içine transfer edilerek geni taşıyan uygun rekombinant mikroorganizma elde edilerek çok iyi tasarlanmış biyoreaktör ve üretim koşullarıyla rekombinant farmasötik proteinlerin üretimleri yüksek verimlilik ve seçimlilikle gerçekleştirilebilir (Özdamar ve Çalık 2013).

Amerika Birleşik Devletleri farmasötik proteinler sektöründe liderdir ve 2000 yılı toplam satışı yaklaşık \$ 10 Milyar değerindedir; bu değer on yılda iki-katı aşarak artmıştır. rhGH ilk kez 1985’te Genentech (ABD) tarafından Protropin ürün-adıyla N-

ucunda metiyonin bulunan ve 192 amino asit içeren yapıda üretilmiştir. 1986'da Eli Lilly 191 amino asitten oluşan rhGH'yi Humatrope ürün-adıyla üretmiş ve doğala özdeş farklı kimyasal yapıya sahip olduğu için FDA (ABD) tarafından lisans verilmiştir. rhGH üreticileri Eli Lilly, Genentech, Pharmacia & Upjohn Company, Novo Nordisk, ve Sero Laboratories'dir. Genetik yapısı ilk (1995) belirlenmiş olması nedeniyle *Escherichia coli* farmasötik proteinlerin üretiminde en yaygın kullanılmakta olan mikroorganizmadır. Hücre-içi protein üretimi yapabilen *E. coli*'de karşılaşılan protein degradasyonu problemi bilim insanlarını alternatif konak mikroorganizmaları aramaya yöneltmiştir (Özdamar ve Çalık 2013).

Genom analizi tamamlanan ikinci bakteri olan *Bacillus subtilis* ve *Bacillus* grubu bakteriler ise, sentezledikleri bazı proteinleri (enzimleri) hücre-dışına salgılama özellikleriyle, bakteriler içinde farmasötik protein üretimi için önemli bir alternatif oluşturmaktadır (Özdamar ve Çalık 2013). Genetik bilgi birikiminin gelişmiş olduğu, toksik ve patojenik olmayan, ürettiği proteinleri (enzimleri) hücre dışına aktarabilen *Bacillus* grubu bakteriler değeri \$700-800 milyon olan endüstriyel enzimler, antibiyotikler, insektisidler, nükleotid, ve amino asitlerin üretimleri için kullanılırlar. *Bacillus* türü bakteriler serin alkali proteaz üretebilen bakteri grubudur. *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, ve *Bacillus amyloliquefaciens* serin alkali proteaz üretimi için potansiyel bakterilerdir (Çalık 1998). *Bacillus* grubu ayrıca rekombinant protein üretimi için konak hücre olarak kullanılırlar. *Bacillus* grubu bakterilerle rekombinant pertussis toksin alt-birimi, β -laktamaz, proinsulin, α -galaktosidaz, insan epidermal çoğalma faktörü, insan atrial α -faktörü, insan serum albümini, α_2 -interferon, ve makrofaj plasminojen aktivatörü gibi birçok protein üretilmektedir (Özdamar ve Çalık 2013).

1.2 Hücreiçi tepkime hızlarının hesaplanması için araç: GEM

Genom dizini belirlenen hücrelerin gen işlevleri bulunup, hücreiçi tepkimeleri katalizleyen tüm enzimler ve katalizledikleri stokiyometrik tepkimelerin tümü belirlendiğinde hücreiçi tepkime sistemi genom seviyede belirlenmiş olur. Hücreiçi tepkime sistemi oluşturulduktan sonra, reaksiyon mühendisliği prensipleriyle kütle-

korunum temelli genom seviye matematik modeller (GEM) kurulabilir (Çalık ve Özdamar 2002, Oberhardt vd. 2009). Genom seviye matematik modeller bir hücreye uygulanabilecek genetik ve çevresel değişikliklerin biyomolekül üretimine, çoğalmaya etkilerini tahmin edebilme güçleri nedeniyle metabolik mühendislik tasarımı oluşturma ve üretimin artırılması açısından önemlidir (Price vd. 2004, Teusink ve Smid 2005, Oberhardt vd. 2009, Blazeck ve Alper 2010, Hao vd. 2013). *B. subtilis*'in genom dizinini ilk defa Kunst vd. (2007) belirlemiştir. Ardından Barbe vd. (2009) ve Belda vd. (2013) dizindeki olası hataları gidermek amacıyla *B.subtilis* genom dizinini güncellemiştir. Moleküler biyoloji, genetik, biyoinformatik, ve biyokimyada gerçekleşen paralel gelişmelerle birlikte *B.subtilis* gen-enzim-tepkime ilişkileri, yani genom anotasyonu da güncellenmiştir. *B. subtilis* genomunun işlevleriyle aydınlatılması yönünde ilerleyen araştırmalar *B.subtilis* GEM oluşturma çalışmalarını etkilemiştir. *B. subtilis* için literatürde altı GEM oluşturulmuştur: Kunst vd. (1997)'un genom dizinine dayalı gen-enzim-tepkime bilgisiyle oluşturulan birinci- nesil GEM'ler (Oh vd. 2007, Goelzer vd. 2008, Henry vd. 2009), ve Barbe vd. (2009)'nin genom dizinine dayalı ikinci- nesil GEM'ler (Tanaka vd.2013, Hao vd.2013, Leyn vd. 2013). Özdamar vd.(2010), birinci- nesil GEM Oh vd. (2007)'yi modifiye ederek *r-B.subtilis*'te hücre-dışı bir terapötik protein üretimi (Özdamar vd.2009) için kullanmışlar; rekombinant terapötik bir protein için ilk kez hücreiçi akıları analiz etmiştir. Literatürde Belda vd.(2013)'nın genom dizinine dayalı bir GEM yoktur.

Bir biyomolekülün üretimin artırılmasında GEM'lerin kullanılmasının yanı sıra, gen çipleriyle bir hücredeki tüm genlerin ekspresyon seviyelerinin aynı anda hesaplanmasını sağlayan, çok çıktılı mikrodizin analizi de önemli bir araçtır (Kuipers 1999). Gen çipleriyle gerçekleştirilen transkriptom analizleri: **i)** mutasyonların, genetik, ve çevresel değişikliklerin etkilerini belirlemek, **ii)** hücreiçi kontrol mekanizmalarını anlamak, hipotezleri sınamak, yolizlerini aydınlatmak, birlikte ekspres edilen genleri belirlemek ve üretimle ilişkili genleri belirleyerek metabolik mühendislik stratejileriyle fermentasyon proseslerini geliştirmek (Hermann vd. 2004), ve **iii)** basit hücreler oluşturma hedefiyle genom küçültme çalışmaları için (Ball 2007, Drubin vd. 2007, Forster ve Church 2007) kullanılmıştır. Dolayısıyla mikrodizin analiziyle üretimle ilişkili genler belirlenip üretimi artırıcı metabolik mühendislik stratejileri oluşturulabilir,

çevresel ve genetik etkilerin gen ekspresyonlarına etkileri incelenerek hücre içi kontrol mekanizmaları aydınlatılabilir, ve işlevi bilinmeyen genler aydınlatılabilir (Winzeler vd.1999, Ye vd. 2000, Ye vd.2001, Conway ve Schoolnik 2003, Conway ve Schoolnik 2003, Dharmadi ve Gonzalez 2004, Kumar vd. 2005). Literatürde *B. subtilis* ile ilgili birçok mikrodizin çalışması gerçekleştirilmiştir (Steil vd. 2003, Blencke vd. 2003, Berka vd. 2003, Allenby vd. 2005, Lin vd. 2005), fakat *B.subtilis*'te terapötik proteinlerin üretimlerinde transkriptom analizinin yapıldığı bir çalışma yoktur.

1.3 Doktora tezinin kapsamı

Doktora tez araştırmasının ilk aşamasında *B. subtilis* için gerçekleştirilen güncel genom anotasyonunun (Belda vd. 2013) sağladığı gen-enzim-tepkime ilişkileriyle *B.subtilis*'ten rekombinant protein üretimi için 743 metabolit ve 719 genle ilişkili 1083 tepkime içeren üçüncü- nesil GEM *iBsu1144* oluşturulmuştur. *iBsu1144*'nin doğruluğu belirlendikten sonra *iBsu1144*'nin tepkimeleri Kunst vd. (1997) ve Barbe vd. (2009)'nin genom anotasyonlarına dayalı, sırasıyla birinci- ve ikinci- nesil GEM'lerle karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Reaksiyon mühendisliği açısından duyarlılığı yüksek tepkime hızlarının hesaplanabilmesi için *B.subtilis*'teki tüm tepkimelerin matematik modelde kullanılması gerektiği düşüncesi doktora tezinde sınanan ilk hipotezdir. Bu kapsamda, tezin ikinci aşamasında *iBsu1144* *Bacillus* türleriyle bir proteinin üretimi için 102 metabolit ve 133 tepkimeyle oluşturulan ilk biyokimyasal tepkime temelli matematik modelle (Çalık vd. 1999) karşılaştırılmıştır. Biyokimyasal tepkime temelli model BsBRM-1999'ın akı analizi sonuçları (Çalık vd. 1999) serin alkali proteaz (SAP) biyoprosesinin üçüncü periyodu için düşük- (LOT), orta- (MOT), ve yüksek- (HOT) aktarım koşulunun verileriyle çözümü gerçekleştirilen *iBsu1144*'nin akı değerleriyle her iki modeldeki ortak 85 tepkime için karşılaştırılmıştır. Sonuçlar gen-enzim-tepkime verilerinin mevcut olmadığı zamanlarda oluşturulan BsBRM-1999 (Çalık vd. 1999)'nin doğru tepkimelerle oluşturulduğunu, akı analizi için güvenilir bilgi verdiğini; fakat *iBsu1144*'ün gen-enzim-tepkime bilgisiyle, daha hassas ve detaylı sonuçların elde edilerek rekombinant protein üretiminde konak hücre oluşturma amacıyla metabolik mühendislik tasarımlarının oluşturulabileceğini göstermektedir. Rekombinant protein üretiminde konak hücre oluşturmak için silinebilecek genler akı

değişkenliği analiziyle belirlenmiştir. Ayrıca üçüncü- nesil GEM iBsu1144 ile ikinci- nesil GEM iBsu1103V2 (Tanaka vd. 2013) sonuçları SAP üretimi için değerlendirilmiştir.

Oksijen aktarımının *B.subtilis*'te gen ekspresyonlarını etkileyerek hücre içi tepkime hızlarını değiştirmesi nedeniyle hücre dışı rekombinant insan büyüme hormonu (rhGH) üretimini etkilediği düşüncesi doktora tezimin sınanan ikinci hipotezidir. Bu kapsamda doktora tez araştırmamın üçüncü aşamasında *B.subtilis*'ten rhGH üretiminde oksijen aktarımının gen ekspresyonları ve hücre içi tepkime hızlarına etkileri mikrodizin ve akı analizleriyle düşük, orta ve yüksek oksijen aktarım koşullarında (LOT-, MOT-, ve HOT-), rhGH biyoprosesinin üçüncü periyodu için açığa çıkartılmıştır. %99.5'dan yüksek güven aralığıyla gerçekleştirilen tek yönlü varyans analizi sonucu oksijen aktarımından etkilenen 50 gen birimi belirlenmiştir. Gen ekspresyonları ve akı değerlerinin oksijen aktarımıyla değişimlerinin farklı olduğu *yaaE*, *gdh*, *ydjL*, *yisZ*, *yloI*, *kbl*, *pksK*, ve *mmgD* genlerinin metabolik mühendislik hedef noktaları olduğu saptanmıştır. Akı değişkenliği analiziyle rhGH üretiminin MOT koşulunda kapalı tepkimelerin genleri konak hücre oluşturma hedefi için seçilmiştir. Ayrıca rhGH üretiminde üçüncü- nesil GEM iBsu1144-rhGH'nin birinci- ve ikinci- nesil GEM'ler ile karşılaştırmalı analizleri iBsu1144-rhGH'nin güncel gen-enzim-tepkime bilgisiyle oluşturulması ve bağlantısız tepkimeler içermemesi nedenleriyle doğru sonuçlar ürettiğini transkriptom verileriyle destekleyerek göstermiştir. En son olarak rhGH üretiminin MOT koşulunda Period II'den Periyod III'e geçişin transkriptoma ve tepkime hızlarına etkileri belirlenmiştir.

Sonuç olarak, **“Rekombinant *Bacillus subtilis* Hücre içi Tepkime Sisteminin Genom-Seviyede Araştırılması”** isimli doktora çalışması üç-araştırma programıyla sürdürülmüştür. Bu çerçevede doktora tezimin kapsamı:

1. *B. subtilis* için gerçekleştirilen güncel genom anotasyon çalışmasına (Belda vd. 2013) dayanarak *B.subtilis*'ten rekombinant protein üretimi için 1083 tepkime ve 743 metabolit içeren, kütle korunum temelli genom-seviye matematik model iBsu1144'nin oluşturulması, doğruluğunun belirlenmesi, ve üçüncü- nesil

iBsu1144'nin Kunst vd. (1997) ve Barbe vd. (2009)'nin genom dizinlerine dayalı, sırasıyla birinci- ve ikinci- nesil GEM'lerle karşılaştırılması,

2. Üçüncü- nesil GEM *iBsu1144*'nin SAP üretimi için **i**) 133 tepkime ve 102 metabolit ile oluşturulan biyokimyasal tepkime temelli model BsBRM-1999 (Çalık vd. 1999), ve **ii**) ikinci- nesil GEM *iBsu1103V2* (Tanaka vd. 2013) sonuçlarıyla karşılaştırılarak literatüre katkılarının değerlendirilmesi,
3. *B.subtilis*'ten rhGH üretiminin üçüncü periyodu için oksijen aktarımının gen ekspresyonlarına ve hücreiçi tepkime hızlarına etkilerinin mikrodizin ve akı analizleriyle düşük, orta, ve yüksek oksijen aktarım koşullarında (LOT, MOT ve HOT) belirlenmesi, akı değişkenliği analiziyle konak hücre oluşturma hedefiyle silinebilecek genlerin belirlenmesi, üçüncü- nesil GEM *iBsu1144*-rhGH'nin rhGH üretiminin MOT koşulunun üçüncü periyodu için birinci- ve ikinci- nesil GEM'ler ile transkriptom destekli karşılaştırmalı analizleri, rhGH üretiminin MOT koşulunda Period II'den Periyod III'e geçişin transkriptoma ve tepkime hızlarına etkilerinin birlikte belirlenerek değerlendirilmesidir.

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 *Bacillus subtilis*

Genellikle toprak ve su kaynaklarında bulunan *Bacillus* türü mikroorganizmalar, oksijenli ve oksijensiz ortamda yaşayabilen, prokaryotik, spor oluşturabilen, patojenik olmayan, gram-pozitif, ve çubuk şeklindeki bakterilerdir (Kunst vd. 1997). Birçok farklı hücre-dışı endüstriyel enzimi doğal olarak yüksek derişimlerde salgılayan (Kunst vd. 1997); pürin nükleositlerini, antibiyotikleri, böcek ilaçlarını, vitaminleri üreten (Arbige vd. 1993, Çalık vd. 2001), ve rekombinant protein üretiminde konak hücre olarak kullanılan (Özdamar vd. 2009) *Bacillus* türü mikroorganizmalar endüstriyel olarak önemli birçok cinsi kapsar.

Bununla birlikte *Bacillus* türleri arasında rekombinant DNA teknoloji bilgi birikimi en çok gelişen (Simonen ve Palva 1993), biyokimyası, fizyolojisi, ve genetiği 50 yıldan fazla bir süreden beri incelenen ve genom dizini açıklanan *B. subtilis* en iyi tanımlanmış prokaryotik, gram-pozitif mikroorganizmadır. Genom dizini ilk defa Kunst vd. (1997) tarafından belirlenen, *Bacillus* türleri içinde on yıldan fazla bir süredir model olan *Bacillus subtilis* genom dizini ile gen-enzim-tepkime ilişkileri bilimsel gelişmelerin verdiği motivasyonla dizin belirleme sürecindeki hataları düzeltmek amacıyla Barbe vd. (2009), ve ardından Belda vd. (2013) tarafından güncellenmiştir. Belda vd. (2013) 4,215,606 baz çiftine (bp) sahip *B. subtilis*'in 4458 genom birimine sahip olduğunu göstermiştir. Toplam 4463 gene sahip *B. subtilis*'te (Belda vd. 2013, Genoscope) en az 4463 hücreiçi tepkime olması beklenir. Fakat şu anda gen dizinlerinin işlevleri ve sorumlu oldukları tepkimelerin hepsi bilinmemektedir. Dolayısıyla *B. subtilis* hücreiçi tepkime sisteminin tamamen aydınlatılması zaman isteyen bir süreçtir. *B. subtilis*'in doğal olarak salgıladığı proteinler hücre dışı ortamdaki polimerleri parçalamakla sorumlu amilaz, DNaz, RNaz, lipaz, ve proteaz enzimleridir (Tjalsma vd. 2000, Westers vd. 2004). Endotoksin üretmeyen ve birçok enzimi doğal olarak hücre dışı ortama yüksek derişimlerde ($\geq 20 \text{ kg m}^{-3}$) salgılayan *B. subtilis* endüstriyel biyoproseslerde ürünlerin saflaştırma maliyetinin azaltılmasını sağlar (Harwood vd. 1992, Westers vd. 2004, Oh vd. 2007, Harwood ve Cranenburgh 2008). Son yıllarda *B. subtilis*'i yabancı

(rekombinant) proteinlerin üretiminde konak hücre olarak kullanmak ve geliştirmek amacıyla birçok çalışma yapılmıştır (Harwood vd. 1992, Kunst vd. 1997, Harwood ve Cranenburgh 2008). Buna karşın *B. subtilis* ile düşük derişimlerde rekombinant protein üretilmektedir (mg/m^3 - $\mu\text{g/m}^3$) (Harwood ve Cranenburgh 2008). *B. subtilis*'le rekombinant protein üretimindeki temel darboğazlar rekombinant proteinlerin proteazlar tarafından hücreiçi ve hücredişı ortamda parçalanması, yabancı proteinlerin *B. subtilis* salgılama sistemine uyum sağlayamamasıdır (Harwood ve Cranenburgh 2008). Bu darboğazları aşabilmek için birçok proteaz geni silinmiş *B. subtilis* türleri geliştirilmiştir (Harwood ve Cranenburgh 2008).

Yabancı proteinlerin üretimini artırmak için genomda yan ürünleri kodlayan genlerin silinmesi, istenen ürünün saflaştırılmasının kolaylaştırılması açısından önemlidir. Genomun küçültülmesi, hücreiçi metabolit ve enerji kaynaklarının boş yere harcanmamasını sağlar. Böylece metabolizma gerekli ve istenen gen ürünlerinin üretiminin artırılmasına doğru yönlendirilebilir (Westers vd. 2004). Kobayashi vd. (2003) *B. subtilis*'in zenginleştirilmiş LB ortamında yaşayabilmesi için 271 genin gerekli olduğunu deneysel olarak belirlemiştir. Çoğalma için gerekli genler çoğunlukla bilgi işleme, hücre zarfı sentezi, hücre şeklinin belirlenmesi, hücre bölünmesi, ve hücre enerjisi işlevlerine sahiptir (Kobayashi vd. 2003). Fischer ve Sauer (2005) *B. subtilis*'te gen silmenin hücreiçi tepkime hızları ve dallanma noktalarındaki akı dağılımları üzerindeki etkilerini araştırmıştır. *B. subtilis* merkezi karbon yolizi metabolizmasıyla ilgili farklı genleri silinmiş 137 *B. subtilis* suşuyla gerçekleştirilen ^{13}C -ile etiketli glukoz deneyleri sonucu kütle izotop dağılımlarının sayısallaştırılmasıyla gerçekleştirilen metabolik akı oranı analiziyle glikoliz yolizindeki dallanma noktasından pentoz fosfat yolizine giden akının gen silinmelerinden önemli ölçüde etkilenmediği belirlenmiştir.

2.1.1 *Bacillus subtilis*'te protein salgılanması

Bacillus türlerinde sitoplazma hücre zarıyla çevrilidir. Hücre zarı ise teikoik veya teikuronik asit gibi anyonik heteropolimerlerden oluşan ve peptidoglikan içeren hücre duvarı ile çevrilidir. Proteinler sitoplazmada sentezlenir, hücre zarına ve duvarına veya hücredişı ortama aktarılırlar (Simonen ve Palva 1993). *B. subtilis*'in salgıladığı

proteinler doğal polimerlerin hidrolizinde kullanılan proteaz, lipaz, karbohidraz, DNaz, ve RNazlardır. Bu tip parçalayıcı enzimler, çevredeki değişimlere adapte olabilmek için sıkça sentezlenerek hücrenin varolan kaynaklardan en uygun şekilde yararlanmasını sağlarlar. Ardından parçalanmış substratlar hücre içine alınır. Salgılanan bir diğer ikinci grup protein ise hücre yoğunluğunu hissetmek, sporlanma, ve kompetans gelişiminden sorumlu olan küçük PhrA-PhrK proteinleridir. Bu proteinler salgılanmalarından ve daha küçük peptitlere işlenmelerinden sonra sitoplazmadaki fosfotazlara inhibisyon yapmak için hücre içi ortama aktarılırlar (Tjalsma vd. 2000). Parçalayıcı enzimler ve Phr proteinleri dışında hücre dışına salgılanan proteinlerin çoğu substratın hücreye bağlanması, protein salgılanması işlerinden sorumludurlar, ve görevlerini tamamlamak için hücre zarı-hücre duvarı arayüzeyinde kalmalıdırlar. Bu proteinleri kaybetmemek için, hücre zarına veya duvarına bağlanmalarını sağlayacak yağ tabakaları eklenir. Alternatif olarak bu proteinlerin bir kısmı hücre zarı-hücre duvarı arayüzeyinde piline benzeyen yapılar oluştururlar (Tjalsma vd. 2000).

Hücre dışına taşınan proteinler, hücre içinde amino-uçlarında sinyal peptit olacak şekilde sentezlenirler. Sitoplazmada kalacak proteinlerle hücre dışına taşınacak proteinler arasındaki fark hücre dışına aktarılabilecek proteinlerde bulunan sinyal peptitlerdir. Sinyal peptitler sayıları 18-35 arasında değişen amino asitlerden oluşur (Simonen ve Palva 1993). Sinyal peptit ve protein bütününe preprotein denir. *B.subtilis*'te salgılanan proteinlerin çoğu sinyal peptite sahiptir (Tjalsma vd. 2000). Preproteinin sitoplazmadan hücre zarına veya hücre zarından hücre duvarına geçişine translokasyon denir (Simonen ve Palva 1993). Sinyal peptitler üç kısımdan oluşurlar. Sinyal peptitlerin pozitif yüklü amino bölgesinin translokasyon mekanizmasıyla etkileşime geçtiği, translokasyon sırasında hücre zarındaki negatif yüklü yağ tabakalarıyla etkileşime geçtiği önerilmektedir (Tjalsma vd. 2000). Amino bölgesini takip eden hidrojen bölgesi ise, hücre zarı içinde α -heliks yapısını almaktadır. Hidrojen bölgesinden sonra gelen karbon bölgesi, sinyal peptidazın tanıdığı parçalama bölgesini içerir. *B.subtilis*'te dört çeşit sinyal peptit vardır. Bunlar Sec yolizi sinyal peptitleri, lipoproteinlerde bulunan sinyal peptitler, piline benzeyen proteinlerdeki sinyal peptitler, ve ABC taşıyıcılarıyla taşınan bakteriyosin ve feromonlarda bulunan sinyal peptitler (Tjalsma vd. 2000). Bazı hücre dışı proteinler, sinyal peptitleriyle protein arasında propeptit olacak şekilde

sentezlenirler. Propeptitler translokasyon sonrasında proteinden ayrılırlar. Propeptitler uzun ve kısa olmak üzere ikiye ayrılırlar. Uzun propeptitler proteazlara özgüdür. Bilinen tüm hücre dışı *Bacillus* proteazları hem sinyal peptit hem de propeptit taşıyan preproenzimler olarak sentezlenirler. Birçok çalışma propeptitlerin proteazların hücre zarından geçmesinden sonra katlanmalarında ve aktifleşmelerinde görev yaptığını göstermiştir. Subtilisin (alkali serin proteaz) ve nötral proteaz en çok araştırılmış olan *Bacillus* proteazlarıdır. Subtilisindeki propeptit 77 aminoasitten oluşurken, nötral proteazdaki propeptit 200 aminoasitten oluşur. Küçük propeptitler *B.amyloliquefaciens*'in RNazında, *B.subtilis*'in α -amilazında, *B.cereus* ve *B.licheniformis*'in β -laktamazında vardır (Simonen ve Palva 1993). *B.subtilis*'te propeptit uzunluğu 8 aminoasitten (amilaz) 194 aminoasite (nötral proteaz) kadar değişebilmektedir. Kısa propeptitlerin belirli bir işlevi yokken, uzun propeptitlerin iki önemli görevi vardır: Proteazların hücre zarından geçişlerinden önce aktif hale geçmelerini önlemek ve proteazlar hücre zarını geçtikten sonra onların katlanıp aktifleşmesini katalizlemektir. Uzun propeptitler translokasyon sonrasında otokatalitik olarak proteinden ayrılırlar (Tjalsma vd. 2000).

B.subtilis'te proteinlerin birçoğu hücre dışına Sec yolizi ile salgılanır. Bununla birlikte, alternatif yolizleri de bulunur. Bunların ilki, yeni aydınlatılmış Tat yolizidir. Bu yoliziyle aktarılan proteinlerin sinyal peptitlerinde çift arjinin motifi vardır. Bu yolizi, katlanmış preproteinlerin taşınımı için gelişmiş olabilir. İkinci olarak prepiline benzeyen yapıların hücre dışına taşınımı için bir yolizi bulunmaktadır. Kompetansın geliştirilmesinde kullanılan bu proteinlerin sinyal peptitleri kendilerine özeldir. En son taşınım yolizi ise peptit antibiyotiklerinin taşınımından sorumlu ABC taşıyıcılarıdır (Tjalsma vd. 2000). *B.subtilis*'te Sec salgılama yolizinde 6 ana bileşen vardır. Sitoplazmadaki çaperonlar, translokasyon cihazı (SecA), translokasyon kanalının bileşenleri (SecYEG ve SecDF-YajC), sinyal peptidaz, sinyal peptit peptidazları, ve hücre zarının trans kısmındaki katlanma faktörleridir. Hücre dışına salgılanacak proteinlerin çoğu Sec yolizinin translokasyon kanalından geçerken katlanmamış olmalıdır. Bunun için preproteinlere bağlanan çaperonlar, onların sitoplazmada katlanmalarını ve agregasyonlarını engellerler (Tjalsma vd. 2000). Aksi takdirde hücre zarından taşınım gerçekleşmez. Proteinin hücre zarına doğru hareketi sinyal peptit,

çaperon, veya her ikisi sayesinde gerçekleşir (Simonen ve Palva 1993). Yani çaperonların bir kısmı salgılanmaya adanmıştır ve proteinleri translokaza götürmeye yardım ederler (Tjalsma vd. 2000). Proteinin hücre zarından geçişi enerji isteyen bir mekanizmadır. Translokaz denen protein kompleksi taşınımı kolaylaştırır (Simonen ve Palva 1993). Preproteinin translokasyonunda ardışık basamaklar vardır. İlk olarak SecA asidik fosfolipidlere ve SecY'ye bağlanır. SecB ve SecA aktive olur. Preproteinin SecA'ya bağlanmasından sonra, ATP SecA'ya bağlanır ve hidroliz edilir. ATP'nin SecA'ya bağlanması SecA'da yapısal değişikliklere yol açar. SecB serbest bırakılır, SecA'nın karboksil ucu hücre zarına girer. Bu durum preproteinin kısa bir bölümünün translokasyonunu sağlar. SecA'nın ATP'yi hidroliz etmesiyle preprotein salınır ve SecA ortamdan ayrılır. SecA tarafından başlatılan protein translokasyonu proteine ATP bağlanması ve hidroliz adımlarıyla proton motif gücüyle devam ettirilir. SecY, SecE, ve SecG'nin heterotrimer yapıdaki kompleksi translokasyon kanalının esasını oluştururlar. SecY, SecE, ve SecG *B.subtilis*'in hücre zarı proteinleridir. SecD-SecF translokazın birleştirilmesi ve translokasyon kanalını sinyal peptitler ile yanlış katlanmış proteinlerden temizleme işlevlerine sahiptir (Tjalsma vd. 2000). Sinyal peptidazlar sinyal peptitleri, karbon bölgeleri hücre zarında gözükmeye başladıklarında preproteinlerden ayırırlar. Bu tepkime proteinin hücre zarından salınımı için gereklidir. Protein hücre zarından bırakılıp dördüncül yapısına ulaşmak üzere katlanır. En son olarak sinyal peptitler sinyal peptit peptidazları tarafından parçalanıp hücre zarından çıkartılırlar. Translokasyon kanalını terkeden proteinler hücre zarının trans bölgesinde katlanmak zorundalardır. Bu ortamda birçok proteaz bulunduğu için hızlı ve doğru katlanma önemlidir. Hücre zarının trans bölgesinde gerçekleşen katlanma foldaz denen hücre dışı katalizörler tarafından gerçekleştirilir. Bakterilerde bulunan foldazlar peptidil-prolil bağlarının cis-trans izomerizasyonunu katalizleyen PPIazlar ve disülfid bağlarının oluşumunu veya izomerizasyonunu katalizleyen tiol-disülfid oksidoredüktazlarıdır. Hücre duvarının yapısı protein salgılanmasında problem oluşturur (Tjalsma vd. 2000).

2.2 *Bacillus subtilis*'te Rekombinant Protein Üretimi

Doktora tez çalışmasında *B. subtilis* için oluşturulan genom seviye matematik modelin literatüre getirdiği katkıların belirlenmesi, *B. subtilis* ile serin alkali proteaz ve

rekombinant insan büyüme hormonu üretimlerinde oksijen aktarımının gen ekspresyonlarına ve hücre içi tepkime hızlarına etkilerinin incelenip üretimdeki darboğaz noktaların saptanarak üretimin iyileştirilmesine yönelik metabolik mühendislik tasarımlarının oluşturulması amaçlanmıştır. Dolayısıyla bu bölümde literatürdeki serin alkali proteaz ve rekombinant insan büyüme hormonu üretimleriyle ilgili gerçekleştirilen çalışmalar değerlendirilmiştir.

2.2.1 *Bacillus subtilis*'te serin alkali proteaz üretimi

Bacillus grup bakteriler tarafından üretilen serin alkali proteaz (SAP) (EC 3.4.21.14) en önemli endüstriyel enzimlerdendir. Deterjan, gıda, deri, fotoğraf endüstrisinde yaygın kullanılır; peptit bağlarının hidrolizini kataliz eder. SAP enzimi serin içerir, pH=10'da en yüksek aktiviteyi gösterir. SAP'ın amino asit dizini onu üreten mikroorganizmanın genomundaki SAP'ı kodlayan gen dizinine bağlı olarak değişebilir. Fakat serin alkali proteazlar hangi mikroorganizmadan üretilirse üretilsin yapılarındaki histidin, aspartik asit, ve serin katalitik üçlü olacak şekilde katlanarak aktif-konum oluşturur. Molekül ağırlıkları 15-30 kDa aralığındadır ve izoelektrik noktaları yaklaşık pI=9'dur.

B. subtilis'te proteaz sentezinin genetik kontrol mekanizması araştırılmıştır (Çalık vd. 2001). *B. subtilis* açlık koşullarında çoğalmayı durdurur ve durumu iyileştirmek için hareketliliğini artırır, hareketli hücreler kimyasal maddelere yönelir ya da uzaklaşır (kemotaksi), yaşadığı ortamda varsa protein ve/veya nişastayı hidroliz etmek için proteaz ve/veya amilazları sentezleyerek hücre-dışına aktarır. Bunlar da çoğalmayı sürdüremezse hücreler spor oluşturur (Kunst vd. 1997). *B. subtilis*'te durgunluk fazının başında başlayan proteaz sentezi sporlanma (Ferrari vd. 1988) ve hücre dışı karbon ve(ya) azot kaynaklarının yüksek derişimiyle baskılanır (Honjo vd. 1990). *B. subtilis*'te SAP'ı kodlayan *aprE* geninin ekspresyonu birçok protein tarafından kontrol edilir. *aprE* ekspresyonunu etkileyen 15 proteinin özellikleri ve işlevleri çizelge 2.1'de özetlemiştir (Smith 1993). *aprE* ekspresyonuyla ilgili DegS-DegU dışında ekspresyon artırıcı en az altı pozitif kontrol proteini (Spo0A, DegR, ProB, DegQ, SenS, ve TenA) ve ekspresyon azaltıcı üç negatif kontrol proteini (ScoC, SinR, ve AbrB) vardır. DegU *aprE*'ye doğrudan bağlanır (Ogura vd. 2003). ScoC, SinR, ve AbrB *aprE* ekspresyonunu

Çizelge 2.1 *B.subtilis*'te *aprE* ekspresyonunu etkileyen proteinler, özellikleri, ve işlevleri

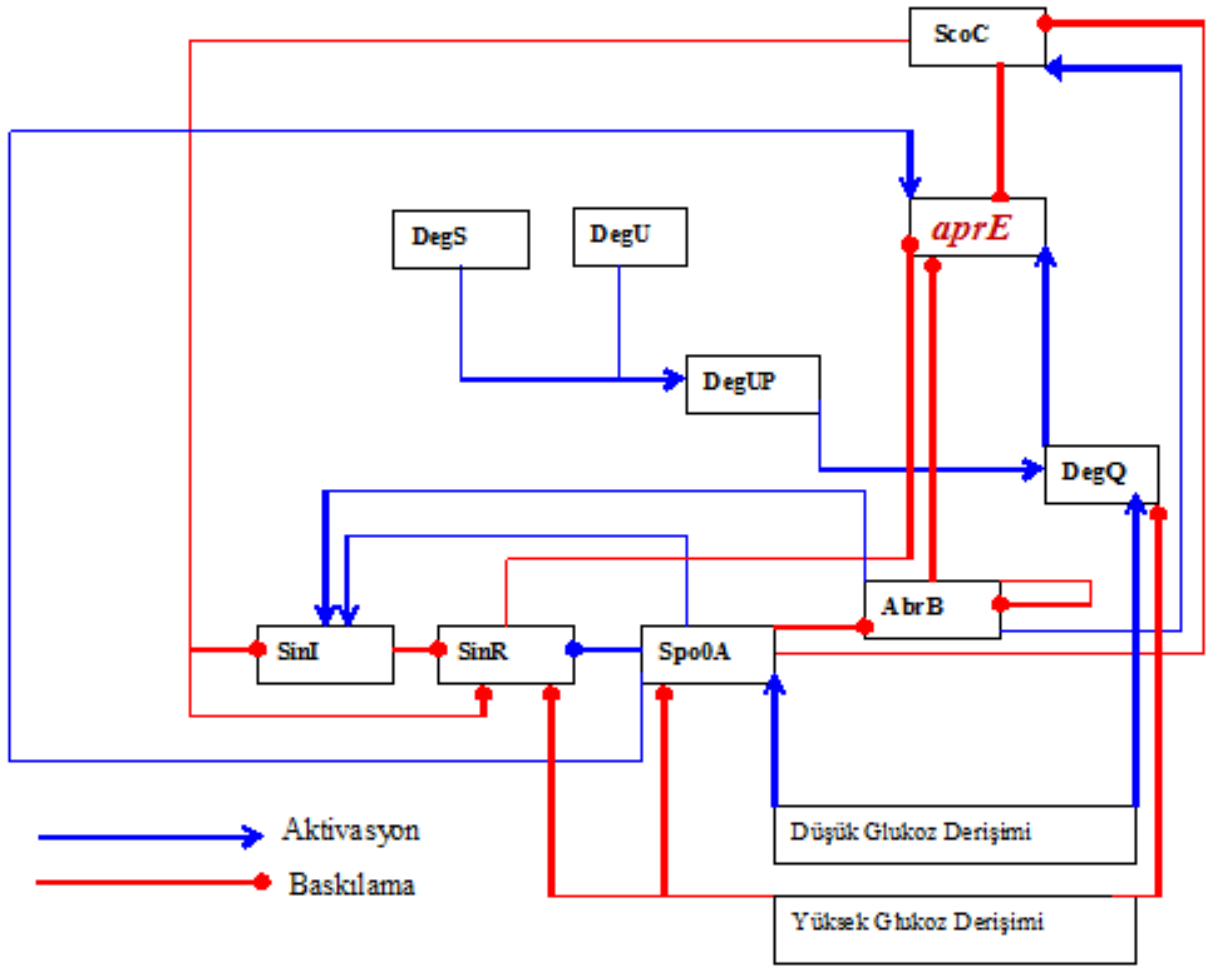
Protein	İşlev	Özellik
AbrB	<i>spo0H</i> , <i>spoVG</i> , <i>spo0E</i> , <i>aprE</i> , ve <i>nprE</i> regulonlarının baskılanması. <i>comK</i> ve <i>hpr</i> 'nin aktivasyonu.	Ekspresyonu sürekli. Kompetans yani bakterinin ortamdaki DNA'ları alabilme yetisi için gereklidir.
TenA	<i>aprE</i> , <i>nprE</i> , <i>sacB</i> , ve <i>phoA</i> 'nın aktivasyonu.	DegS-DegU'ya ihtiyaç duyar.
TenI	TenA'nın baskılanması.	-
SenS	<i>aprE</i> , <i>nprE</i> , ve <i>amyE</i> 'nin aktivasyonu.	Ekspresyonu sürekli.
ScoC	<i>nprE</i> , <i>aprE</i> , ve <i>sin</i> 'in baskılanması.	Ekspresyonu çoğalma tarafından kontrol edilir. AbrB tarafından aktive edilir.
DegR	<i>aprE</i> , <i>nprE</i> , ve <i>sacB</i> 'nin aktivasyonu.	DegS-DegU'ya ihtiyaç duyar. Ekspresyonu sürekli. <i>degSU</i> (Hy) mutasyonları <i>degR</i> ekspresyonunu düşürür.
Spo0A	<i>abrB</i> 'nin baskılanması. <i>spoIIA</i> , <i>spoIIE</i> , ve <i>spoIIG</i> 'nin aktivasyonu.	Çoğalma sırasında ekspres edilir. Glukoz tarafından baskılanır. DNA'ya bağlanan bir proteindir. Çift başlatıcıya (promoter) sahiptir.
SinR	<i>hag</i> ve <i>comK</i> 'nin aktivasyonu. <i>aprE</i> , <i>nprE</i> , <i>spoIIA</i> , <i>spoIIE</i> , <i>spoIIG</i> , ve <i>sinI</i> 'nin baskılanması.	DNA'ya bağlanan bir proteindir. Hareket, kompetans, otolizin üretimi için gereklidir. <i>spo0A</i> ve <i>spo0H</i> 'a ihtiyaç duyar. Hpr, SinI, ve glukoz tarafından baskılanır. Sporlanmayı baskılar.

Çizelge 2.1 *B.subtilis*'te *aprE* ekspresyonunu etkileyen proteinler, özellikleri ve işlevleri (devam)

Protein	İşlev	Özellik
DegQ	<i>aprE</i> , <i>nprE</i> , ve <i>amyE</i> 'nin aktivasyonu. Kompetans ve hareketliliğin baskılanması.	Ekspresyonu çoğalma tarafından kontrol edilir. Glukoz ve amino asitler tarafından baskılanır. DegS/DegU, ComP/ComA, ve ComQ'ya ihtiyaç duyar. Aktivasyon için DegS/DegU'ya ihtiyaç duyar.
ComA	Sporlanmanın baskılanması.	Ekspresyonu sürekli. <i>degQ</i> ekspresyonu için gereklidir. Aktivasyon için ComP'ye ihtiyaç duyar.
DegU	<i>sacB</i> , <i>degQ</i> ekspresyonu, ve kompetansın aktivasyonu.	Ekspresyonu sürekli. Aktivitesi için DegS tarafından fosforlanması gerekir. <i>degSU</i> (Hy) mutasyonları <i>aprE</i> , <i>nprE</i> ve <i>amyE</i> ekspresyonlarını artırır ve kamçı oluşumunu, sporlanmayı baskılar.
DegT	<i>aprE</i> ve <i>sacB</i> ekspresyonunun artırılması.	-
Pai 1	<i>aprE</i> , <i>nprE</i> , <i>sacB</i> , ve <i>phoB</i> ekspresyonlarının ve sporlanmanın baskılanması.	-
Pai 2	Çoğalmanın gerçekleştirilmesi.	-
SinI	SinR'nin baskılanması.	<i>sinP1</i> tarafından ekspres edilir. Glukoz tarafından baskılanır.

doğrudan baskılar (Smith 1993, Çizelge 2.1). Durgunluk fazında *B.subtilis*'te sporlanma için gereken Spo0A proteini fosforlanarak proteazın üstel çoğalma fazında sentezlenmesine engel olan *abrB* genini baskılar ve hemen ardından *aprE* ekspresyonu artar (Perego vd. 1988, Ferrari vd. 1988, Olmedo vd. 1990). Spo0A proteaz üretimini azaltan *scoC*'nin ekspresyonunu da baskılar (Perego ve Hoch 1988, Shafikhani vd. 2002). *spo0* mutasyonlarının hücre dışı proteaz üretimini azalttığı bildirilmiştir (Ferrari vd. 1986, Çizelge 2.1). *AbrB* *aprE*, *spoVG*, *spo0E* ve *abrB* ekspresyonunu baskımlarken *scoC* ekspresyonunu artırır (Strauch vd. 1989). SinR *aprE*'yi negatif yönde kontrol eder (Gaur vd. 1988, Gaur vd. 1991, Çizelge 2.1). SinI, SinR'nin *aprE*'ye bağlanmasına engel olur (Bai vd. 1993, Çizelge 2.1). Spo0A ve ScoC *sinI*'nin pozitif ve negatif kontrol proteinleridir (Shafikhani vd. 2002). *sinI* ekspresyonu *AbrB* yokluğunda azalır (Shafikhani vd. 2002).

Shimotsu ve Henner (1986) *degQ*'ya yaptıkları mutasyonla *aprE* ekspresyonunu 7-kat artırmıştır. Benzer bir sonuç *degS*'ye yapılan mutasyonla da elde edilmiştir. Yang vd. (1986) *degQ* ve yüksek kopya sayısına sahip plazmit içeren *B. subtilis*'lerin yüksek derişimlerde proteaz ürettiklerini bildirmiştir. *B. subtilis*'te parçalayıcı enzimlerin üretimi *degQ* ve *degR* ile kontrol edilir. *degQ* ekspresyonu DegS-DegU ve ComP-ComA ile artar. ComA ve DegU fosforlanarak *degQ* ekspresyonunu artırır. *degQ* ekspresyonu glukoz ile azalır, karbon kaynaklarının yokluğuyla artar. Dolayısıyla *degQ* ekspresyonu üstel fazda düşüktür, durgunluk fazında artar (Msadek vd. 1991). ComP/ComA ve DegS/DegU *B. subtilis*'te proteaz, α -amilaz, levansukraz, β -glukanazı içeren hidroliz edici enzimleri kodlayan genlerin ekspresyonlarını kontrol eden, sinyal iletimiyle ilgili protein çiftleridir. DegS tarafından fosforlanan DegU, DegQ ve DegR hidroliz edici enzimlerin sentezini artırır. DegS/DegU protein çifti tarafından kontrol edilen *degQ*'ya yapılan *degQ*(Hy), *degU*'ya yapılan *degU*(Hy), ve *mecA* mutasyonları hidroliz edici enzimlerin üretimini artırır (Msadek vd. 1990, Kunst vd. 1994). Bu bilgilerin ışığında SAP enzimini kodlayan *aprE* geni kontrol mekanizması şekil 2.1'de özetlenmiştir. Kırmızı ve mavi oklar, sırasıyla, pozitif ve negatif regülasyonu gösterir (Şahin 2010).



Şekil 2.1 *aprE* Ekspresyonu Kontrol Mekanizması

Bacillus grup-bakterilerden SAP üretimiyle ilgili 2001 yılına kadar yapılan yayınlar üç tema altında özetlenmiştir Çalık vd. (2001): İlk bölümde hücre dışı SAP sentezinin regülasyonu ile ilgili çalışmalar sunulmuştur. İkinci bölümde ortam tasarımı ve biyoreaktör işletim parametrelerinin SAP üretimi ve yan-ürün oluşumlarına etkilerini inceleyen çalışmalar, üçüncü bölümde ise SAP üretimi için gerçekleştirilen metabolik akı analizi çalışmaları özetlenmiştir. SAP üretimiyle ilgili 1981-1996 yıllarındaki çalışmalar doğal *Bacillus* grup-bakterilerle yapılmıştır. Bu araştırmalarda genellikle karbon, azot, fosfat kaynağı, ve inorganik iyon gibi ortam bileşenlerinin etkileri incelenmiştir (Çalık vd.2001). Ancak daha sonra, 1998-2004 arasında SAP üretimi ile ilgili önemli yayınlar yapılmış ve biyoreaktör işletim koşullarının, oksijen aktarım koşullarının ve pH işletim koşullarının ürün, yan-ürün dağılımlarına ve hücre içi tepkime

hızlarına olan etkileri araştırılmıştır. *B.licheniformis* hücreiçi tepkime sistemi biyokimyasal tepkime-temelli model ile oluşturulmuş, hücreiçi tepkime hızları (akılar) hesaplanmış, darboğaz tepkimeler bulunmuş, rekombinant mikroorganizma geliştirilmiş, tanımlı ortamdan sonra kompleks ortam tasarımı ile üretim artışı ve inorganik iyonların etkileri araştırılmıştır (Çizelge 2.2 ve 2.3). 1998-2004 yıllarında yapılan çalışmalar SAP üretimini 13- kat artırmıştır: 1998 öncesi en yüksek SAP aktivitesi $A_{SAP}=441 \text{ U/cm}^3$ iken, araştırma grubumuzun araştırmalarıyla beş yıl sonra 2003 yılında elde edilen en yüksek aktivite 5350 U/cm^3 olmuştur (Çizelge 2.3). 2004'den bugüne kadar ise SAP üretimi için yapılan yayınlar: **i)** yeni mikroorganizmaların bulunması ve **ii)** SAP'ın yeni metotlarla, örneğin, α -amilazla birlikte üretimi, şeklinde denemelerdir. Çizelge 2.3'teki yayınlar üzerine, SAP üretiminde biyoreaktör işletim koşullarının ve fermentasyon karakteristiklerinin geliştirilmesine yönelik bir çalışma yoktur.

Çalık vd. (1998) *B. licheniformis*'te oksijen aktarımının SAP üretimi ile yan ürünlerden amino- ve organik- asitler, nötral proteaz, ve amilaz üretimlerine etkilerini belirlemiştir. Üretim için saptanan en uygun sitrik asit derişimiyle oksijen aktarımının SAP üretimi ve yan ürün dağılımı üzerindeki etkileri biyoreaktörde hava giriş hızının 1 vvm olduğu, karıştırma hızının, sırasıyla, $N=150, 500, \text{ ve } 750 \text{ dk}^{-1}$ olduğu düşük- (LOT), orta- (MOT), ve yüksek- (HOT) oksijen aktarım koşullarında incelenerek en yüksek SAP aktivitesine MOT'ta ulaşmıştır. Çalık ve Özdamar (1999) *B. licheniformis*'te SAP üretimi için 105 metabolit ve 147 tepkimeden oluşan biyokimyasal-tepkime temelli model geliştirmiştir. Model kullanılarak kurulan kütle-korunum temelli matematik modelin özellikleri Bölüm 2.4.1'de ayrıntılarıyla özetlenmiştir. Çalık vd. (1998)'nin MOT koşuluna ait biyoreaktör verileri kullanılarak, biyoprosesin üç periyoduna ait hücreiçi akı dağılımları hesaplanarak değerlendirilmiştir (Çalık ve Özdamar 1999). Arkasından, Çalık vd. (1999) oluşturdukları matematik modeli kullanarak ilk defa *B. licheniformis*'ten SAP üretimi için oksijen aktarımının hücreiçi tepkime hızları üzerindeki etkilerini araştırmıştır. Sitratin substrat olarak kullanıldığı, hava giriş hızının $Q_0/V_R=1 \text{ vvm}$ ve karıştırma hızlarının $N=150, 500, \text{ ve } 750 \text{ dk}^{-1}$

Çizelge 2.2 Proteaz üretimiyle ilgili kaynaklar: Araştırılan parametreler

Mikroorganizma	Araştırılan parametreler											Ortam	Kaynak
	Ortam bileşenleri					Biyoreaktör işletim parametreleri							
	C	N	P	YE	I	pH	T	N	Q _o /V _R	% DO	DR		
<i>B. licheniformis</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	Ta	Çalık vd. (1998)
<i>B. licheniformis</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	Ta	Çalık vd. (2000)
<i>B. licheniformis</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	Ta	Çalık vd. (2002)
<i>B. licheniformis</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ta	Çalık vd. (2003)
r- <i>B. licheniformis</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ta	
r- <i>B. licheniformis</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	Ta	Çalık vd. (2003)
r- <i>B. alvei</i> , r- <i>B. subtilis</i> , r- <i>B. sphaericus</i> , r- <i>B. licheniformis</i> , r- <i>B. firmus</i> , r- <i>B. coagulans</i> , r- <i>B. cereus</i> , r- <i>B. badius</i> , r- <i>B. amyloliquefaciens</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ta	Çalık vd. (2003)
r- <i>B. licheniformis</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	K	Çalık vd. (2003)
r- <i>B. cereus</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	K	
r- <i>B. amyloliquefaciens</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	K	
r- <i>B. subtilis</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	K	
r- <i>B. subtilis</i>	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	K	Çalık vd. (2003)
r- <i>B. licheniformis</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	Ta	Çalık vd. (2004)
r- <i>B. subtilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	K	Çalık vd. (2004)

C, N, P, I- karbon, azot, fosfat, inorganik iyon kaynakları; YE, maya özütü; pH, hidrojen iyonu derişimi; T, sıcaklık; N, karıştırma hızı (dk⁻¹); Q_o/V_R, birim hacme gönderilen gaz hızı (vvm); % DO, çözülmüş oksijen yüzdesi; DR, seyreltme hızı (vvm); O, ortam; Ta, tanımlı ortam; YTa, yarı-tanımlı ortam; K, kompleks ortam; r-, rekombinant.

Çizelge 2.3 Proteaz üretimiyle ilgili kaynaklar: Sonuçlar

Mikroorganizma	Biyoreaktör İşletim Koşulları						A _{max}	Kaynak
	İ	T	pH	V _R	N	Q _o /V _R		
<i>B. licheniformis</i>	K	37	7.25 _{UC}	2.00	750	0.2	680	Çalık vd. (2002)
<i>B. licheniformis</i>	K	37	7.25 _{UC}	2.00	750	0.5		
<i>B. licheniformis</i>	K	37	7.00 _{C,UC}	2.00	750	0.5	390	Çalık vd. (2002)
<i>B. licheniformis</i>	K	37	7.25 _{C,UC}	2.00	750	0.5		
<i>B. licheniformis</i>	K	37	7.5 _{C,UC}	2.00	750	0.5		
<i>B. licheniformis</i>	K	37	7.25 _{UC}	2.00	750	0.5	390	Çalık vd. (2003)
r- <i>B. licheniformis</i>	K	37	7.25 _{UC}	2.00	750	0.5	650	
r- <i>B. licheniformis</i>	K	37	6.8 _{C,UC}	2.00	750	0.5	900	Çalık vd. (2003)
r- <i>B. licheniformis</i>	K	37	7.1 _{C,UC}	2.00	750	0.5		
r- <i>B. licheniformis</i>	K	37	7.25 _{C,UC}	2.00	750	0.5		
9 r- <i>Bacillus</i> türü	K	37	7.25 _{UC}	0.22	200	-	950	Çalık vd. (2003)
4 r- <i>Bacillus</i> türü	K	37	7.10 _{UC}	-	500	0.5	2250	Çalık vd. (2003)
	K	37	7.10 _{UC}	-	750	0.5		
r- <i>B. subtilis</i>	K	37	7.10 _{UC}	2.20	750	0.5	5350	Çalık vd. (2004)
<i>B. licheniformis</i>	K	37	7.25 _{UC}	0.22	200	-	1338	Çalık vd. (2004)

İ, işletim; T, sıcaklık (°C); K, kesikli; YK, yarı-kesikli işletim; pH, başlangıç hidrojen iyonu derişimi; C, kontrollu pH; UC, kontrolsüz pH işletimi; V_R, biyokimyasal tepkime hacmi (dm³); N, karıştırma hızı (dk⁻¹); Q_o/V_R, birim hacme gönderilen gaz hızı (vvm); A_{max}, en yüksek aktivite (U/ml); *, EPE / ml; r-, rekombinant.

olduğu araştırma koşullarından elde edilen biyoreaktör verileri kullanılarak, SAP'ın hücre içi birikiminin minimize edilmesiyle modelin çözümü gerçekleştirilmiştir. Akı analizi sonuçları kullanılarak, aspartattan asparajine yönelen düşük akı değeri nedeniyle asparajin sentetaz veya aspartat kinazın potansiyel metabolik mühendislik konumları olduğuna karar verilmiştir. Diğer bir çalışmada ise, Çalık vd. (2000) *B. licheniformis* 'te oksijen aktarımının SAP üretimi ve yan ürün dağılımlarına etkisini dokuz farklı oksijen aktarım koşulu oluşturarak araştırmıştır. En yüksek SAP aktivitesine hava giriş hızının $Q_o/V_R=0.5$ vvm ve karıştırma hızının $N=750 \text{ dk}^{-1}$ olduğu koşulda ulaşılmıştır. Ayrıca oksijen aktarımı için bir strateji geliştirilmiştir: Üretimin ilk 24 saatinde $Q_o/V_R=0.2$ vvm ve $N=750 \text{ dk}^{-1}$, $t>24$ st'ten sonra $Q_o/V_R=0.5$ vvm ve $N=750 \text{ dk}^{-1}$ 'lik oksijen aktarım koşulu uygulamaktır. Uygulanan strateji SAP üretimini artırmıştır.

Çalık vd. (2002) doğal *B.licheniformis*'te pH- kontrollu ve kontrolsüz işletim koşullarının SAP üretimine etkilerini araştırmıştır. SAP üretimi için pH- kontrolsüz işletiminin, pH- kontrollu işletimden daha iyi olduğu gösterilmiştir. Üretim için uygun koşul başlangıç pH'ının 7.25 olduğu pH-kontrolsüz işletimdir (Çizelge 2.3).

Çalık vd. (2003a) pHV1431::*subC* plazmitini dokuz farklı *Bacillus* türüne aktarıp, üretim performanslarını mikrobiyolojik hava filtreli biyoreaktörlerde araştırmıştır. Tüm rekombinant (r-) *Bacillus* türleri Monod kinetiğine uymuştur. r-*Bacillus* türleri arasında doğal mikroorganizmaya göre en yüksek aktivite r-*B. sphaericus* ile elde edilmiştir. r-*B. alvei* ve r-*B. amyloliquefaciens*'teki düşük SAP üretimlerinin restriksiyon enzimlerinin sentezinden kaynaklanabileceği bildirilmiştir. r-*B. sphaericus* ve r-*B. licheniformis* en yüksek ve kararlı SAP aktivitesine sahip mikroorganizmalar olarak saptanmıştır. Çalık vd. (2003b) SAP sentezinden sorumlu *subC* genini pHV1431 plazmitine klonlayıp, pHV1431::*subC*'yi *B. licheniformis*'e aktarmıştır. Rekombinant mikroorganizmanın mikrobiyolojik hava filtreli biyoreaktörde çoğalmasının Monod modeline uyduğu belirlenmiştir. Biyoreaktörde $t=43$ st için rekombinant *B. licheniformis* ile elde edilen aktivite doğal *B.licheniformis* ile elde edilen aktivitenin 1.7 katıdır. Çalık vd. (2003c) biyoreaktörde pHV1431::*subC* plazmiti taşıyan rekombinant *B.licheniformis*'te pH'ın SAP üretimine etkisini araştırmıştır. pH- kontrolsüz ve pH- kontrollu oluşturulan altı

koşul incelenmiştir. En yüksek SAP aktivitesine pH-kontrolsuz, $pH_0=7.10$ koşulunda $t=21$ st'te ulaşılmıştır. SAP üretim hızının ve hücre çoğalmasının pH- kontrolsuz işletimde daha yüksek olduğu gösterilmiştir.

Çalık vd. (2003d) pHV1431::*subC* plazmiti taşıyan dört rekombinant mikroorganizmanın kimyasal ve fiziksel ön işlemlerden geçirilmiş, farklı fruktoz ve glukoz, sukroz derişimlerdeki melaslı ortamlarla SAP üretimlerini mikrobiyolojik hava filtreli biyoreaktörlerde incelemiştir. En yüksek SAP aktivitesine 20 kg/m^3 'lük başlangıç sukroz derişiminde fiziksel ön işlemde geçirilmiş melaslı ortamda *r-B. subtilis* ile ulaşılmıştır. Daha sonra biyoreaktörlerde *r-B. subtilis*'le oksijen aktarımının SAP üretimi üzerindeki etkileri hava giriş hızının $Q_0/V_R=0.5$ vvm olduğu iki farklı karıştırma hızında ($N=500, 750 \text{ dk}^{-1}$) incelenmiştir. En yüksek SAP aktivitesine $Q_0/V_R=0.5$ vvm, $N=750 \text{ dk}^{-1}$ 'lık oksijen aktarımı koşullarında $t=36$ st'te ulaşılmıştır.

Çalık vd. (2003e) pHV1431::*subC* plazmiti taşıyan *r-B. subtilis*'te SAP üretimi için kompleks ortam tasarlamıştır. SAP üretimi için karbon (glukoz, sukroz, melas, soya) ve azot ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, kazein, soya) kaynakları ile inorganik bileşiklerin etkileri incelenmiştir. Öncelikle farklı derişimlerde soya, glukoz, ve $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ içeren kompleks ortamların SAP üretimine etkisi incelenmiştir. Ardından soya ve melas, kazein ve sukroz ile inorganik moleküllerin ($\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, MgCl_2 , MgSO_4 , CaCl_2 , NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4) üretime etkileri araştırılmıştır. En yüksek SAP aktivitesine $C_{\text{soya}}=20 \text{ kg/m}^3$, $C_{\text{sukroz}}=15 \text{ kg/m}^3$, $C_{\text{Na}_2\text{HPO}_4}=0.021 \text{ kg/m}^3$, ve $C_{\text{NaH}_2\text{PO}_4}=2.81 \text{ kg/m}^3$ bileşimine sahip kompleks ortamda ulaşılmıştır. Tasarlanan ortamın üretime etkileri biyoreaktörde $Q_0/V_R=0.5$ vvm, $N=750 \text{ dk}^{-1}$ işletim koşullarında incelenmiştir.

Çalık vd. (2004) *r-B. licheniformis* ile mikrobiyolojik hava filtreli biyoreaktörlerde inorganik bileşiklerin SAP üretimine etkilerini araştırmıştır. İlk olarak Mn^{2+} içeren MnSO_4 , MnCl_2 , $\text{Mn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 'un, sonra Mg^{2+} içeren MgSO_4 , MgCl_2 , $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 'in, ardından $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ ve $\text{Mn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 'in birlikte, farklı derişimlerde üretime etkileri araştırılmıştır. SAP üretimi MgCl_2 derişiminin 0.6 mmol/m^3 ve daha yüksek derişimlerinde MgCl_2 derişimiyle azalırken, MgSO_4 SAP üretimini düşürmüştür. En yüksek SAP aktivitesine $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ derişiminin 0.4

mmol/m³ olduğu koşulda ulaşılmıştır. SAP aktivitesi Cl⁻ ve SO₄²⁻ ile azalmıştır. Üretimde pH kontrolü için en uygun asitin asetik asit olduğu bildirilmiştir. Çalık vd. (2004) melaslı ortamda çoğalan *r-B. subtilis* ile oksijen aktarımının SAP üretimi üzerindeki etkilerini dört farklı hava giriş hızında ve iki farklı karıştırma hızında incelemiştir. En yüksek SAP aktivitesine Q_o/V_R=0.5 vvm, N=750 dk⁻¹ koşullarında t=36 st'te ulaşılmıştır.

2.2.2 *Bacillus subtilis*'te rekombinant insan büyüme hormonu üretimi

Hücre dışı enzimleri doğal olarak yüksek derişimlerde salgılayan *Bacillus* türü mikroorganizmalar biyoproseslerde ayırma işlemlerini kolaylaştırmakta ve ürün maliyetini azaltmaktadırlar. Bununla birlikte *Bacillus* türleri arasında genom analizi tamamlanmış olan ve genetik mühendisliği açısından bilgi birikimi en fazla olan mikroorganizma *B. subtilis*'tir. Bu kapsamda *Bacillus* grubu mikroorganizmalar ve özellikle *B. subtilis* ile rekombinant insan büyüme hormonu (rhGH) üretimi endüstriyel öneme sahiptir (Franchi vd. 1991, Kajino vd.1997).

Bacillus türleriyle yapılan ilk bilimsel çalışma Nakayama vd. (1988)'ne aittir. Nakayama vd. (1988) *B. amyloliquefaciens*'e ait doğal proteaz geninin başlatıcı ve pre-sinyal dizinlerini içeren phGH324 ve phGH526 plazmitlerini geliştirmiştir. phGH526, transkripsiyon terminatörüne sahip olmayan phGH324'ün tersine, nötral proteaz terminatörü taşır. Plazmitler *B. subtilis* MT500'e aktarıldıktan sonra zengin çoğalma ortamında hücre dışı rhGH üretim kapasiteleri karşılaştırılmıştır. phGH526'lı hücrelerde 40 mg/dm³ rhGH üretilirken, phGH324 taşıyanlarda üretimin 10- kat az olduğu saptanmıştır. Üretimdeki farklılığın nötral proteaz terminatör aktivitesinden kaynaklandığı belirtilmiştir. Ayrıca oksijen derişimiyle rhGH üretiminin azaldığı, çoğalmayla ise rhGH üretiminin arttığı saptanmıştır. Üretilen rhGH'nin doğallıyla aynı yapıda olduğu belirlenmiştir. Franchi vd. (1991) üretim ortamında çözünebilen öncüller aracılığıyla rhGH'nin saflaştırılması hedefiyle farklı öncül dizinlere sahip pSM214, pSM215, pSM274, pSM250 plazmitlerini geliştirmiştir. Bu plazmitleri içeren rekombinant *B.subtilis*'ler ile zengin ortamda rhGH üretimi gerçekleştirilmiştir. Kajino vd. (1997) rhGH'nin hücre dışı üretimi için MWP, L4, R2L4, ve L15 sinyal dizinleriyle

pNU211hGH, pNU211L4hGH, pNU211R2L4hGH, ve pNU211L15hGH plazmitlerini geliştirmiştir. Hücre dışı proteaz aktivitesi düşük olan ve yabancı proteinleri yüksek derişimlerde üreten *B. brevis* konak hücre olarak seçilmiştir. R2L4 sinyal peptidini kullanarak amino terminal ve orta bölgelerin bazik ve hidrofobik olma özelliklerini artırmak rhGH üretimini 12- kat artırmıştır (148 mg/L). Üretim ortamı ve işletim parametreleri optimize edilerek hGH üretimi 240 mg/L'ye artırılmıştır

zdamar vd. (2009) *B. subtilis*'te hücre dışı rekombinant insan büyüme hormonu (rhGH) retmek için serin alkali proteaz sentezi ve salgılanmasını taklit eden original bir ekspresyon sistemi oluşturmuştur. Ekspresyon sistemi iki DNA parçasından oluşan tasarlanmış bir hibrit-gen içerir. Bu parçalar: (1) *B. licheniformis*'in serin alkali proteaz enzimini kodlayan *subC* geninin sinyal (*pre*-) dizini ve (2) hGH proteinini kodlayan cDNA'dır. Hibrit-gen pMK4 plazmitine klonlanıp *B. subtilis*'te *deg* başlatıcısı (promoter) altında ekspres edilmiştir. pMK4::*pre(subC)::hGH* taşıyan *B. subtilis* ile hücre dışı üretilen en yüksek rhGH derişimi t=32 st'te $C_{rhGH} = 70$ mg/L'dir. Üretilen rhGH yapısının Food and Drug Agency (ABD) onayı almış standart ile aynı yapıda olduğu MALDI-ToF MS analizi ile kanıtlanmıştır. Ayrıca, pMK4::*pre(subC)::hGH* ile pMK4 taşıyan *B. subtilis*'lerin fermentasyon karakteristikleri karşılaştırılmıştır. pMK4::*pre(subC)::hGH* taşıyan *B. subtilis*'te hücre dışı organik asit derişiminin daha yüksek, pMK4 taşıyan *B. subtilis*'te hücre dışı amino asit derişiminin daha yüksektir (zdamar vd. 2009). Daha sonra, zdamar vd.(2010) pMK4::*pre(subC)::hGH* taşıyan *B. subtilis* ve sadece pMK4 taşıyan *B. subtilis*'in hücre içi tepkime hızlarını 1340 tepkime içeren genom seviye modelle hesaplayarak hGH geninin hücre içi tepkime hızlarına etkilerini ve genomla etkileşimini incelemiştir. Her iki mikroorganizmada fermentasyon boyunca aktif ve inaktif tepkimelerin değişimi belirlenmiştir.

alık vd. (2016) pMK4::*pre(subC)::hGH* taşıyan ve *scoC* geni silinmiş *B. subtilis*'te rhGH'nin yarı-kesikli üretiminde verim ve verimliliği artırmak amacıyla kesikli işletimden yarı kesikli işletime geçiş süresi (t_T) ve spesifik çoğalma hızı (μ) parametreleriyle sürekli besleme akımı tasarlamıştır. *B. subtilis*'in kesikli-biyoreaktör verilerine dayanarak üretim ortamının üç bileşeni sürekli beslenmek üzere seçilmiştir. Yarı-kesikli biyoreaktörde retimnin modellenmesiyle t_T 'de başlatılacak sürekli

besleme akımının tasarımı gerçekleştirilmiştir, besleme akımının debisinin hesaplanmasında kullanılan t_T ve μ parametrelerinin en uygun değerleri 4 st ve 0.125 st^{-1} olarak belirlenmiştir. Böylece kesikli işleme göre verim 36% artırılmıştır ve fermentasyon süresi 8 saat azalırken, rhGH verimliliği 2.4- kat artırılmıştır.

2.3 Hücreiçi Tepkime Sistemi

Metabolik mühendislik reaksiyon mühendisliği prensiplerine dayanan metabolik akı analizi ve metabolik kontrol analizleriyle tüm hücreiçi tepkime sisteminin modellenerek incelenmesi, darboğaz tepkimelerin belirlenmesi, hız kısıtlayıcı tepkimelerin yok edilmesi/durdurulması, veya tepkime sistemine yeni tepkimelerin eklenmesi suretiyle hücre özelliklerinin değiştirilmesini ve istenen doğal/yabancı ürünlerin üretimlerini artırmayı hedefler. Dolayısıyla hedef mikroorganizmada gerçekleşen tüm tepkimelerin belirlenmesi hücreiçi tepkime hızlarının matematik modelle doğru şekilde hesaplanması için önemlidir. Hücrelerin çoğalıp yaşayabilmeleri için çoğalma ortamındaki besinlerin hücreiçine aktarılmaları, ardından hücreiçine aktarılan besinlerin parçalanmaları, ve(ya) oluşan temel yapı taşlarının hücreiçi tepkimelerle daha büyük biyomoleküllere ve hücreye dönüşmeleri gerekir. Sentezlenen biyomoleküller hücre dışı ortama aktarılırlar (Nielsen ve Villadsen 1994). Dolayısıyla metabolizmada gerçekleşen tepkimeler iki gruba ayrılabilir: Sitoplazmaya aktarılan molekülleri hücre bileşenleri ve ürünlere dönüştüren hücreiçi tepkimeler ve taşıyım tepkimeleri.

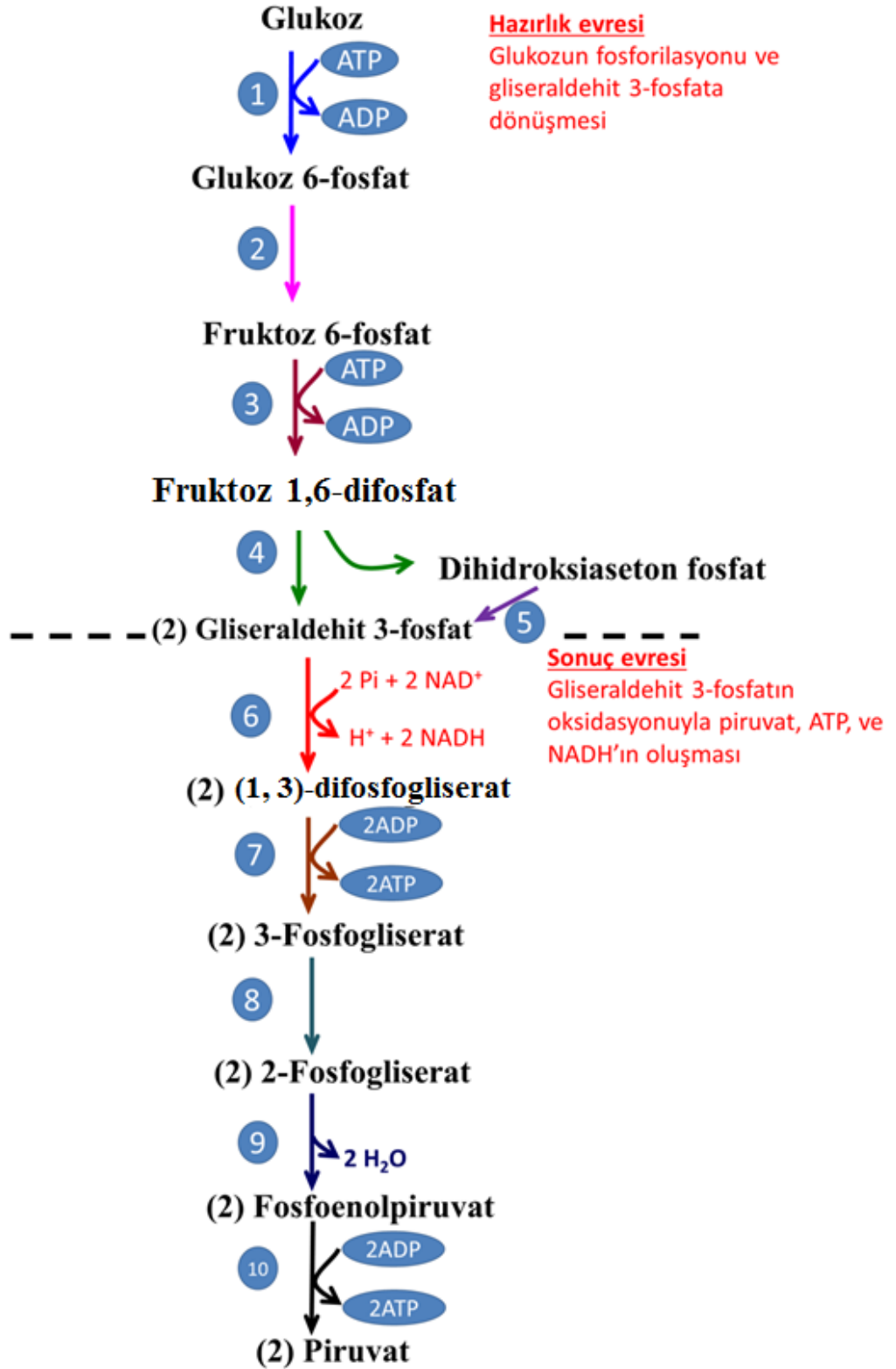
2.3.1 Hücreiçi tepkimeler

İçlerinde binden fazla tepkimenin gerçekleştiği mikroorganizmalar, istenen endüstriyel biyomolekülü sentezleyen ya da sentezleyebilecek mikro-reaktörlerdir. Hücrenin yaşaması için gerekli enerjiyi üretmek, sentezlenen enerjiyi farklı moleküler formlara çevirmek, hücreiçine aktarılan besinleri parçalayarak temel yapı taşlarını oluşturup onlardan DNA, RNA, protein gibi makromolekülleri sentezlemek amacıyla hücreiçinde gerçekleşen tepkimelerin tümüne metabolizma denir. Metabolizma katabolizma ve anabolizma olarak ikiye ayrılır. Karbonhidrat, yağ, protein gibi makromoleküllerin parçalanarak amino asit, organik asit, ve üre gibi daha basit ve küçük moleküllere

dönüşmesine katabolizma denir. Oluşan basit moleküllerden enzim katalitik tepkimelerle protein, RNA, DNA, yağ, polisakkarit, ve karbonhidrat gibi büyük makromoleküllerin sentezlenmesine ise anabolizma denir (Şenver Özçelik 2003). Hücre çoğalması için gerekli enerji kaynağı genellikle karbon kaynaklarıdır. Karbon kaynakları CO₂, laktik asit, asetik asit, etanol gibi metabolik ürünlere dönüşürken ATP, NADH, NADPH oluşur. NADPH anabolik tepkimeler ile tüketilirken, NADH oksidatif fosforilasyon gibi katabolik tepkimelerle tüketilir. Bazı mikroorganizmalarda glukoz hücreiçine taşınırken glukoz-6-fosfata (G6P) dönüşür. Glikoliz, pentoz fosfat yolizi, ve TCA döngüsünde G6P'ın sırasıyla piruvat, NADPH, riboz-5-fosfat, asetil-CoA, CO₂ ve su gibi küçük moleküllere dönüşerek temel yapı taşlarına parçalanması katabolizma tepkimelerine en iyi örnektir (Nielsen ve Villadsen 1994). Anabolizma tepkimeleriyle - küçük moleküllerin polimerleşmesiyle- proteinler, RNA, DNA, yağ, lipopolisakkaritler, peptidoglikanlar, ve glikojen gibi makromoleküller sentezlenir. Anabolik tepkimelerle ATP'nin yüksek enerjili fosfat bağının koparılması ve NADPH'ın oksidasyona uğrayarak elektronların serbest hale geçmesiyle Gibbs serbest enerjisi tüketilir. Çoğalma ortamı ve biyoreaktör işletim koşullarına göre makromoleküllerin sentezlenmesi için gerekli enerji miktarı, ribozom büyüklüğü, indirgeyici ve yükseltgeyici moleküllerin derişimleri değişir (Nielsen ve Villadsen 1994). Hücreiçinde gerçekleşen tepkimelerin tümüne metabolizma, tepkimelerdeki girdi ve ürünlerine ise metabolit denilir. Tepkimelerin oluşturdukları yolizlerine metabolik yolizi denir. Temel merkezi karbon metabolizmasına ait yolizleri glikoliz, glikoneogenesis, TCA döngüsü, ve pentoz fosfat yolizleridir (Şenver Özçelik 2003). Yapısal olarak korunan merkezi karbon metabolizması her hücrede vardır, makromoleküllerin sentezi için gerekli kofaktörlerin, yapı taşlarının sentezlenmesini sağlar. Tepkimelerin ve yolizlerinin işleyişleri genomdaki farklılıklar nedeniyle hücre türlerine göre değişir (Fuhrer vd. 2005).

2.3.1.1 Glikoliz yolizi

Bilim dünyasında aydınlatılan ilk yolizi glikolizdir. Glikoliz yolizinde, altı-karbonlu bir glikoz molekülü ardışık 10 enzim-katalitik tepkime ile iki tane üç-karbonlu piruvat molekülüne parçalanır. Glikoliz yolizinin ardışık tepkimeleri gerçekleşirken glukozdan serbest bırakılan enerjinin bir kısmı ATP ve NADH formunda korunur (Şekil 2.2).

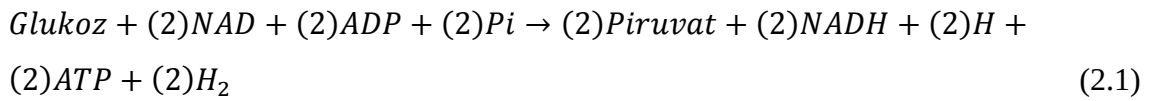


Şekil 2.2 Glikoliz yolizi (Nelson ve Cox 2008)

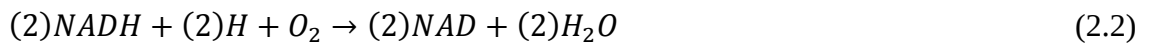
Glikoliz yolizi iki fazdan oluşur: hazırlık ve sonuç evreleri (Nelson ve Cox 2008). Yolizinin ilk beş tepkimesini içeren hazırlık evresinde altı-karbonlu bir glukoz molekülü, iki kere ATP ile fosforlanarak iki adet üç-karbonlu gliseraldehit 3-fosfata parçalanır. Glukoz birinci tepkimede ve fruktoz 6-fosfat üçüncü tepkimede ATP tüketimiyle fosforlanarak fruktoz 1,6-difosfat oluşur. Bununla birlikte bir izomerleşme tepkimesi olan ikinci tepkime üçüncü ve dördüncü tepkimeler için önemlidir. Fruktoz 1,6-difosfat dördüncü tepkimede iki adet üç-karbonlu moleküle parçalanır: dihidroksiaseton fosfat ve gliseraldehit-3-fosfat; bu parçalanma tepkimesi yolizine ismini verir. Hazırlık evresinin en son evresinde dihidroksiaseton fosfat gliseraldehit-3-fosfata isomerleşir (Şekil 2.2, Nelson ve Cox 2008).

Sonuç evresinde her bir gliseraldehit-3-fosfat molekülü oksidasyona uğrar ve fosforlanarak altıncı tepkimede 1,3-difosfoglisarat oluşur. İki tane 1,3-difosfoglisarat yedinci tepkimeden onuncu tepkimeye iki adet piruvata dönüşürken ortaya enerji açığa çıkar. Dört adet ADP dört adet ATP'ye fosforlanarak enerji korunur.

Sonuç olarak glikoliz yolizinin hazırlık evresinde tüketilen iki ATP molekülü nedeniyle, tüketilen bir glukoz molekülü başına net olarak iki ATP molekülü sentezlenir, bir glukoz molekülü başına oluşan iki NADH formunda enerji oluşup korunur. Şekil 2.2'de gösterilen glikoliz yolizinin net tepkimesi aşağıda verilmiştir (Nelson ve Cox 2008):



Bakterilerde glikoliz yoliziyle sitoplazmada oluşan iki NADH molekülünün, oksijenli koşullarda elektron-taşıyım zincirinde tekrar NAD'a oksidasyonu gerçekleşir, açığa çıkan elektronlar sayesinde O_2 indirgenerek H_2O oluşur:



NADH'tan O_2 'e gerçekleşen elektron aktarımı solunumla bağlantılı fosforilasyon tepkimeleri aracılığıyla ATP sentezi için gerekli enerjiyi sağlar. İki gliseraldehit 3-fosfat

molekölünden iki NAD molekülüne iki hidrid iyonu formunda dört elektron taşınır. Glikoliz yolizi enerji oluşturan diğer yolizleriyle uyumlu bir şekilde ATP üretimi ve tüketimini dengelemek için genom tarafından sıkı bir kontrol altındadır. Birinci tepkimeyi katalizleyen heksokinaz, üçüncü tepkimeyi katalizleyen fosfo-fruktokinaz 1, onuncu tepkimeyi katalizleyen piruvat kinaz kontrol edilen enzimlerdir (Nelson ve Cox 2008).

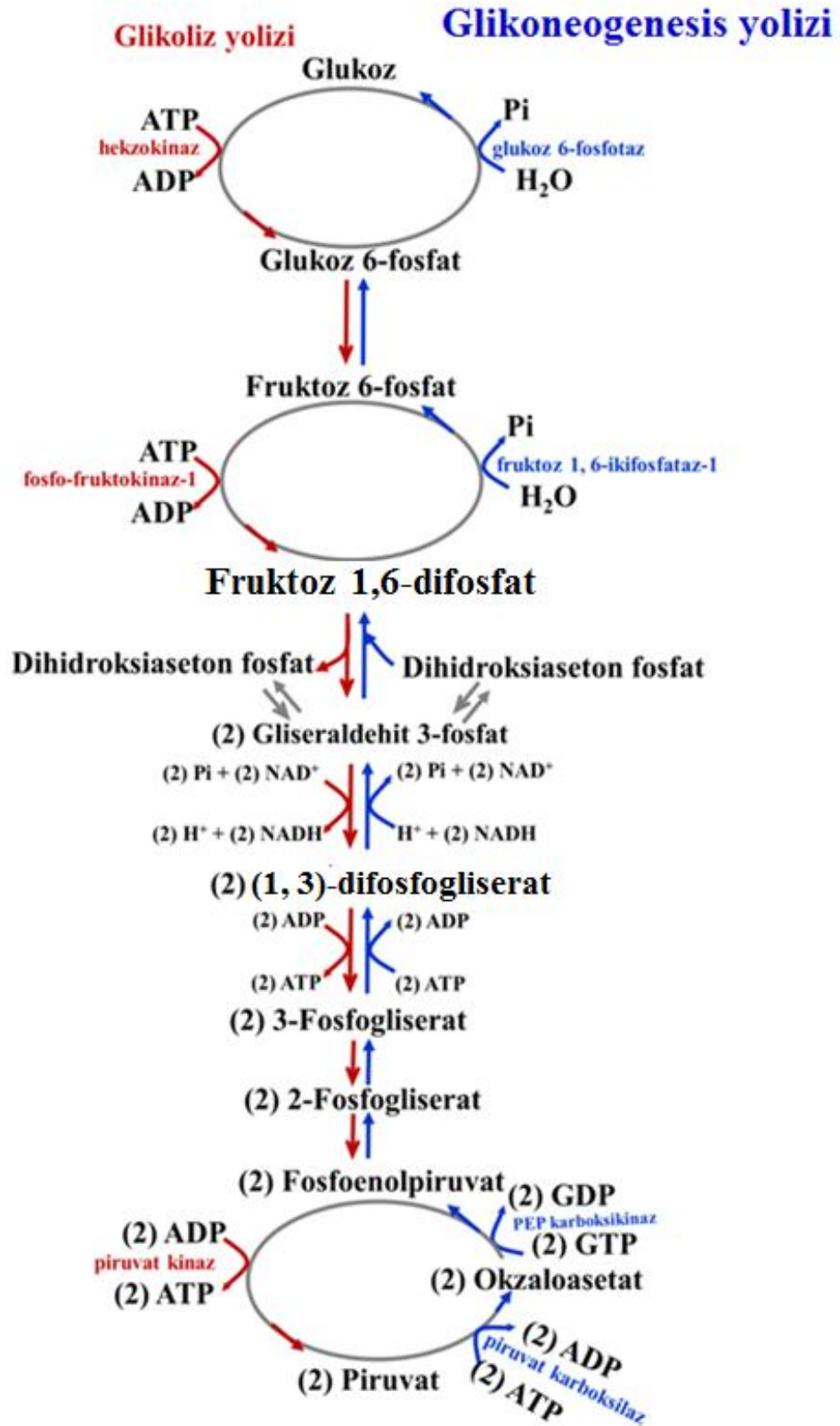
2.3.1.2 Glikoneogenesis yolizi

Hücreiçindeki glukoz varlığı yeterli olmadığında karbonhidrat olmayan moleküllerden glukoz sentezleyen tepkimelere glikoneogenesis yolizi denir (Nelson ve Cox 2008, Şekil 2.3). Birçok mikroorganizmada piruvat, asetat, laktat, ve TCA döngüsü ara ürünleri gibi iki veya üç karbonlu organik bileşikler ile glikoneogenesis yolizi başlar (Voet vd. 2002, Nelson ve Cox 2008).

Glikoneogenesis ve glikoliz yolizleri zıt yönde çalışan yolizleridir; aynı yolizi değildir. Glikoneogenesis yolizinin on tepkimesinden yedi tanesi glikoliz tepkimelerinin tersidir: glikoneogenesis yolizindeki yedi tepkime glikoliz yolizindeki enzimlerle katalizlenir.

Hücreiçindeki üç glikoliz tepkimesi tersinmezdir; bu üç tepkime glikoneogenesis yolizinde yoktur. Bu üç tepkime: heksokinaz'ın katalizlediği glukozdan glukoz 6-fosfat sentezi, fosfofruktokinaz-1'in katalizlediği fruktoz 6-fosfattan fruktoz 1,6-difosfat sentezi, ve piruvat kinaz'ın katalizlediği fosfoenolpiruvattan piruvat sentezidir. Glikoneogenesis yolizinde bu üç tepkime farklı enzimler katalizörlüğünde (glukoz 6-fosfataz, fruktoz 1,6-difosfataz-1, PEP karboksikinaz, piruvat karboksilaz) glukozun sentezi yönünde gerçekleşir (Şekil 2.3).

Hücrede enerji üretimi için diğer substratlar yeterince bulunduğundan, asetil-CoA piruvat karboksilaz aktivitesini artırarak glikoneogenesis yolizinin tepkime hızlarını artırır. Glikoliz ve glikoneogenesis yolizleri zıt yönlerde kontrol edilir; sistem yani hücre aynı anda iki yolizini kullanarak enerjisini harcamaz (Nelson ve Cox 2008).



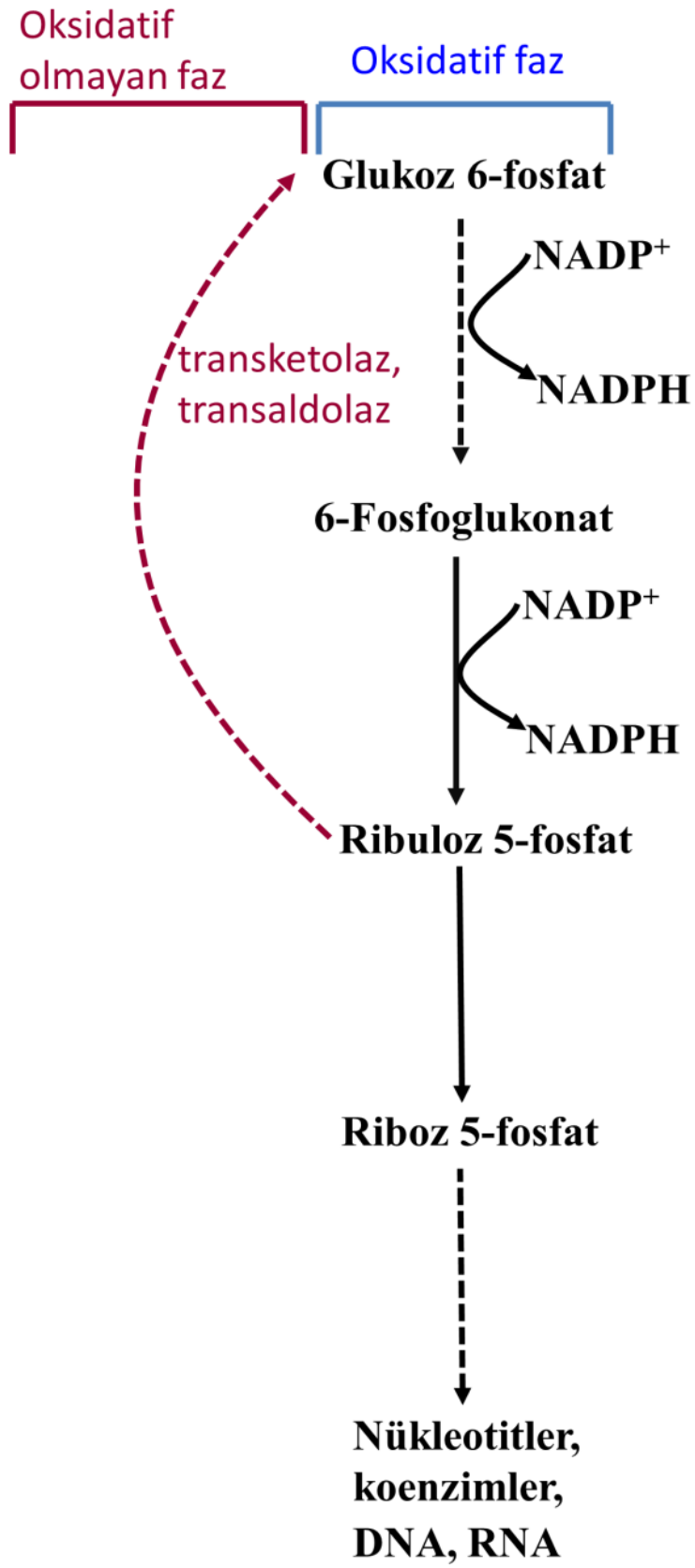
Şekil 2.3 Glikoneogenesis yolizi (Nelson ve Cox 2008)

2.3.1.3 Pentoz fosfat yolizi

Pentoz fosfat yolizinin (PFY) temel ürünleri riboz-5-fosfat ve NADPH'tır. Nükleotit, koenzim, DNA, ve RNA sentezi için öncül bir madde olan riboz-5-fosfatın ve elektron taşıyıcı NADPH'ın sentezlendiği PFY oksidatif ve oksidatif olmayan iki fazdan oluşur. Oksidatif PFY'nin ilk tepkimesi glukoz 6-fosfat dehidrojenaz katalizörlüğünde glukoz 6-fosfatın tersinmez olarak 6-fosfoglukono- δ -laktone oksitlenerek açığa çıkan elektronların NADP tarafından alınıp NADPH'a aktarılmasıdır. Ardından lakton laktonaz katalizörlüğünde 6-fosfoglukonata hidroliz edilir. 6-fosfoglukonat 6-fosfoglukonat dehidrojenaz katalizörlüğünde tersinmez olarak ketopentoz ribuloz 5-fosfata dönüşürken açığa ikinci bir NADPH molekülü çıkar. Ribuloz 5-fosfat fosfopentoz izomeraz katalizörlüğünde riboz-5-fosfata dönüştürülür.

Pentoz fosfatları glukoz 6-fosfata (G6P) dönüştüren tepkimeler transketolaz ve transaldolaz ile katalizlenir. G6P'ın glikoliz ya da pentoz fosfat yolizlerine aktarımı NADP ve NADPH derişimlerinin oranı ile belirlenir (Nelson ve Cox 2008, Şekil 2.4). Hücrenin NADPH ihtiyacı riboz-5-fosfat ihtiyacından fazla olunca transaldolaz ve transketolaz katalizörlüğündeki tepkimeler ile riboz-5-fosfat glikoliz yolizi ara-ürünlerine dönüştürülür (Voet vd. 2002). Oluşan gliseraldehit-3-fosfat ve fruktoz 6-fosfat glikoliz ve oksidatif fosforilasyon tepkimeleri aracılığıyla tüketilebilir ya da glikoneogenesis yolizi aracılığıyla glukoz 6-fosfat sentezlenmesine yol açabilir. Riboz-5-fosfat ihtiyacı NADPH ihtiyacından yüksek olduğunda, riboz-5-fosfat sentezine transaldolaz ve transketolaz tepkimeleri aracılığıyla metabolik akı aktarılır.

PFY tepkime hızları ve dolayısıyla NADPH üretimi glukoz-6-fosfatı 6-fosfoglukono- δ -laktone dönüştüren glukoz-6-fosfat dehidrojenazın tepkime akı değeriyle kontrol edilir. Glukoz-6-fosfat dehidrojenaz aktivitesi NADP derişimiyle kontrol edilir. Hücre NADPH'ı tüketip hücreiçinde NADP derişimi arttığı zaman, glukoz-6-fosfat dehidrojenazın tepkime akı değeri artırılarak NADPH üretimi artırılır (Voet vd. 2002).

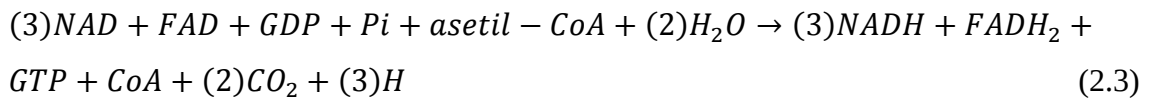


Şekil 2.4 Pentoz fosfat yolizi (Nelson ve Cox 2008)

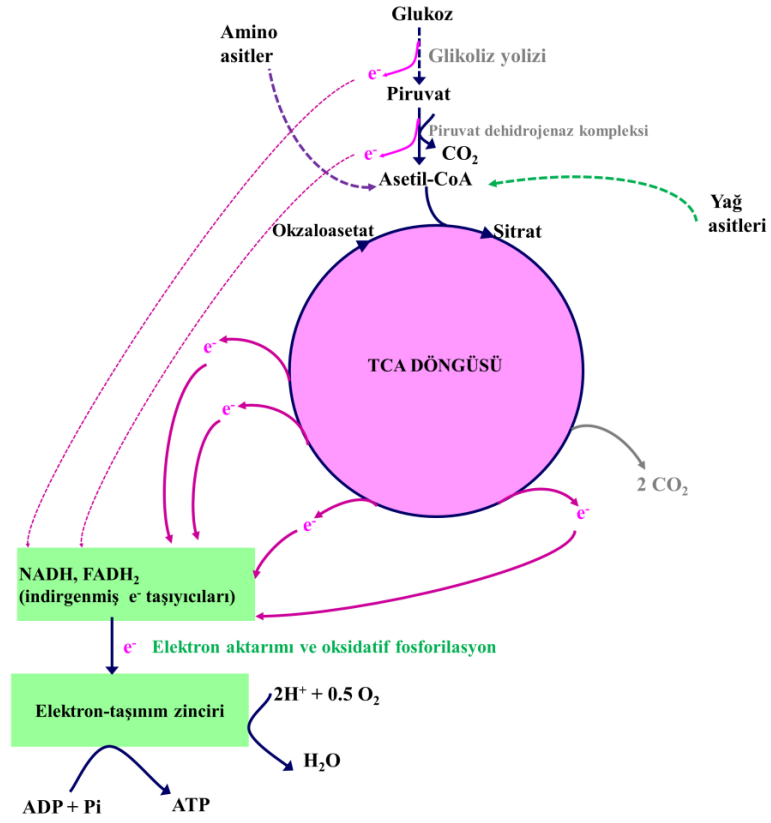
2.3.1.4 TCA döngüsü

Hücre sel solunum temel olarak O_2 tüketimiyle hücre içine aktarılan organik moleküllerin önce glikoliz yolu, TCA döngüsü tepkimeleri, ardından elektron taşıma zinciri ve oksidatif fosforilasyon tepkimeleri aracılığıyla daha küçük moleküllere parçalanarak CO_2 , H_2O , ve ATP'ye dönüşmesidir. Oksijenli solunum sırasında glikoliz yolu ve TCA döngüsünde oluşan $FADH_2$, $NADH$ formundaki elektron taşıyıcı moleküller hücre zarındaki elektron taşıma zinciri enzimlerinin katalizlediği tepkimeler sonucunda FAD , NAD formuna geçerken, taşıdıkları elektronlar sayesinde O_2 indirgenerek H_2O oluşur ve eş zamanlı olarak oksidatif fosforilasyonla ATP sentezlenir (Nelson ve Cox 2008, şekil 2.5).

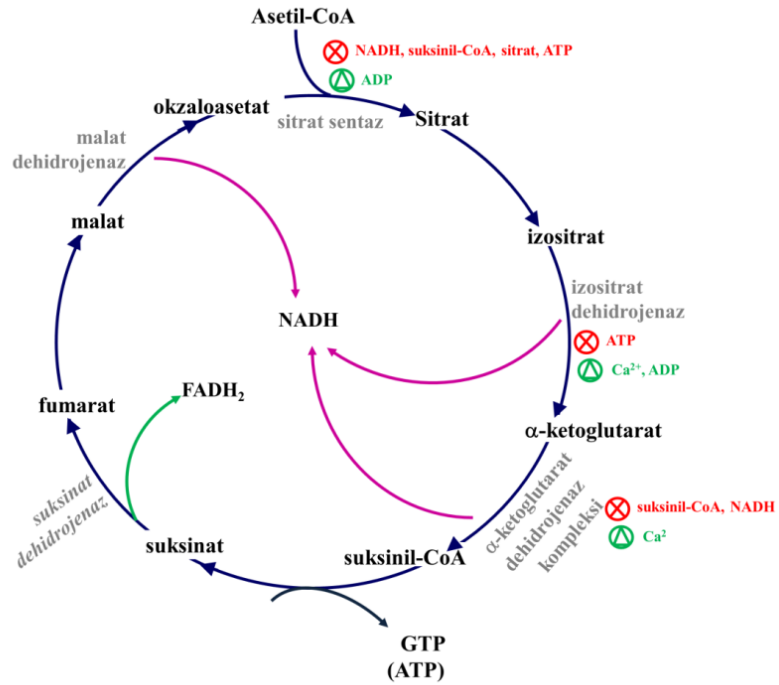
TCA döngüsü amino asit, yağ asidi, glukoz gibi birçok metabolitin asetil-CoA'ya parçalanmasıyla enerji oluşturur. TCA döngüsünde parçalanmış substratlar CO_2 'e oksitlenirken enerjileri $FADH_2$, $NADH$ formunda korunur. TCA döngüsünde oksidasyona uğrayan her asetil-CoA molekülü başına üç $NADH$, bir $FADH_2$, bir ATP ya da bir GTP molekülü sentezlenir. Sekiz ardışık tepkimeden oluşan TCA döngüsü çok-basamaklı bir katalizöre benzetilebilir. Sitrat oksaloasetata dönüştürülürken iki CO_2 molekülü oluşur. TCA döngüsünde oluşan birçok molekül anabolizma tepkimeleri için girdi olarak da kullanılır. Şekil 2.6'da gösterilen TCA döngüsünün net (özet) tepkimesi aşağıda verilmiştir (Voet vd. 2002, Nelson ve Cox 2008):



TCA döngüsünün hızı piruvatın asetil-CoA'ya dönüşme hızıyla, sitrat sentez, izositrat dehidrojenaz, ve α -ketoglutarat dehidrojenaz aktiviteleriyle kontrol edilir. Bu akımlar tepkimelerin girdi ve ürün değişimlerine bağlıdır: ATP ve $NADH$ değişimlerinin yüksek olması baskılayıcı, NAD ve ADP değişimlerinin yüksek olması aktive edicidir. Piruvat dehidrojenaz katalizörlüğünde piruvattan asetil-CoA oluşumu ATP, asetil-CoA, $NADH$, ve yağ asitlerinin yüksek değişimlerinde baskılanırken; AMP, NAD , CoA'nın yüksek değişimlerinde artar (Nelson ve Cox 2008, Şekil 2.6).



Şekil 2.5 Oksijenli ortamda gerçekleşen tepkimeler (Nelson ve Cox 2008)

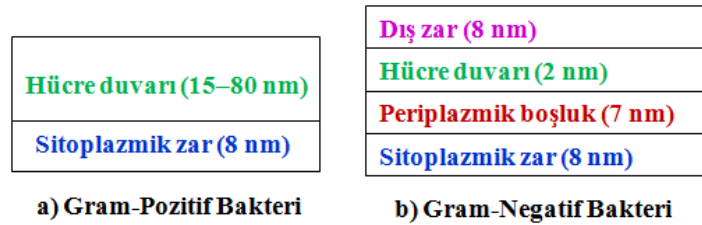


Şekil 2.6 TCA döngüsü (Nelson ve Cox 2008)

Enzim inhibitör ve aktivatörleri, kırmızı ve yeşille gösterilmiştir.

2.3.2 Taşınım

Hücre duvarı ve zarı sitoplazmayı çevreleyen, birlikte hücre zarfı olarak adlandırılan yapılardır. Hücre zarfının kimyasal yapısı, moleküllerin sitoplazma ve çoğalma ortamı arasındaki taşınımında belirleyicidir. Fosfolipitlerden oluşan hücre zarı, bileşimi çoğalma sırasında değişebilen, esnek bir yapıya sahiptir. Birçok küçük molekül kolayca hücre duvarından geçebildiği için taşınım olayları büyük ölçüde sitoplazmik zar tarafından belirlenir. Protein gibi daha büyük moleküller hücre duvarından ancak özel mekanizmalarla geçebilmektedir. Şekil 2.7’de hücre zarfının yapıları gösterilmiştir (Nielsen ve Villadsen 1994). Gram-pozitif bakterilerin hücre duvarı ortalama 35 nm kalınlığında iken, gram-negatif bakterilerin hücre duvarı daha incedir. Gram negatif bakterilerde moleküler elek görevini gören bir dış zar ve periplazmik boşluk vardır. Periplazmik boşlukta proteaz, nükleaz gibi birçok hidrolitik enzim vardır. Dolayısıyla hücre dışı ortamdan sitoplazmaya gerçekleşen taşınım olayları karmaşıktır. Periplazmik boşluğun işlevinin parçalanmış substratların bağlanma proteinleriyle sitoplazmaya aktarılması olduğu düşünülmektedir (Şekil 2.7).

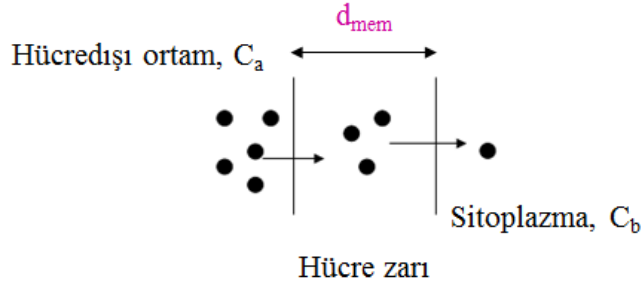


Şekil 2.7 Gram-pozitif ve gram-negatif bakterilerdeki hücre zarfının yapıları

Hücre içi ve hücre dışı ortam arasında önemli bir engel olan sitoplazmik zar da üç farklı taşınım mekanizması vardır: Serbest yayınma (difüzyon), kolaylaştırılmış yayınma, ve aktif taşınım. İlk iki mekanizmayla moleküller herhangi bir enerjiye gerek olmadan, yüksek derişimden düşük derişime doğru aktarılırlar, üçüncü mekanizmada bir molekül ancak enerji tüketimiyle düşük derişimden yüksek derişimli bölgeye aktarılabilir (Nielsen ve Villadsen 1994).

2.3.2.1 Serbest Yayınma (Difüzyon)

Difüzyonda bir maddenin kendisine geçirgen olan sitoplazmik zardan taşınım hızı derişim gradyeni ile doğru orantılıdır (Şekil 2.8). Madde azalan derişim yönünde hücre zarından sitoplazmaya geçer. Dolayısıyla difüzyon sırasında serbest enerjideki değişim ($\Delta G_{TAŞINIM}$) negatiftir, difüzyon kendiliğinden olur (Bailey ve Ollis 1986). Bir molekülün fosfolipitlerden oluşan zardan difüzyonla aktarımı üç basamaktan oluşur. 1) molekül hücre dışı ortamdan hücre zarına aktarılır, 2) hücre zarında moleküler difüzyon gerçekleşir, ve 3) molekül hücre zarından sitoplazmaya geçer. Genellikle sitoplazmanın özellikleri hücre dışı ortamın özelliklerine benzer. Dolayısıyla birinci ve üçüncü basamaklar birbirlerine benzer, hız kısıtlayıcı basamak hücre zarındaki moleküler difüzyondur. Hücre zarının arayüzeyindeki derişimin maddenin su fazındaki derişime eşit olduğu kabul edilir, böylece dağılma katsayısı olan K_{par} bir maddenin hücre zarındaki çözünürlüğünün sudaki çözünürlüğüne oranı olarak tanımlanır. Dolayısıyla, moleküler difüzyon sonucu bir maddenin d_{mem} kalınlığındaki hücre zarından sitoplazmaya kütesel aktarım hızı (J , $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) Fick yasası ile denklem 2.4'teki gibi tanımlanır (Nielsen ve Villadsen 1994, Stephanopoulos vd. 1998).



Şekil 2.8 Difüzyon

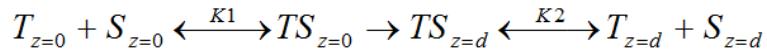
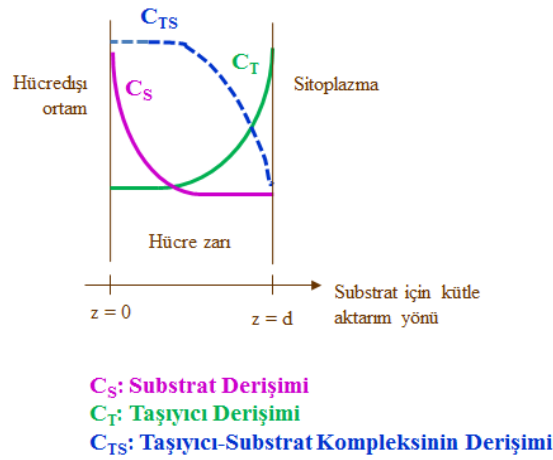
$$J_{Difüzyon} = \frac{D_{mem}}{d_{mem}} K_{par} (C_a - C_b) = P (C_a - C_b), \frac{\text{mol}}{\text{m}^2 \text{s}} \quad (2.4)$$

Denklem 2.1'de D_{mem} maddenin hücre zarındaki difüzyon katsayısını (m^2/s), d_{mem} hücre zarının kalınlığını (m), C_a maddenin hücre-dışı derişimini (mol/m^3), C_b maddenin hücre-içi derişimini (mol/m^3), P maddenin geçirgenliğini (m/s) gösterir. Etanol, asetik asit,

oksijen, su, NH₃, karbondioksit, yağ asitleri, ve bazı alkoller difüzyon ile taşınan moleküllerdir (Nielsen ve Villadsen 1994, Stephanopoulos vd. 1998).

2.3.2.2 Kolaylaştırılmış Difüzyon

Birçok molekül hücre zarındaki düşük çözünürlükleri nedeniyle difüzyonla düşük hızlarda taşınırlar (Stephanopoulos vd. 1998). Bu tip moleküllerin hücre zarındaki taşıyıcı proteinler ile enerji gerektirmeyen bir mekanizmayla taşınmasına kolaylaştırılmış difüzyon (*facilitated diffusion*) denir. Kolaylaştırılmış difüzyon olayı, substrat-taşıyıcı kompleksiyle serbest taşıyıcıların varsayılan denge tepkimeleri, ve taşınım olayının hız kısıtlayıcı tepkimesi Barbero vd.(1995), Nielsen ve Villadsen (1994) ve Stephanopoulos vd. (1998)'den yararlanılarak hazırlanan şekil 2.9'da gösterilmiştir.



Şekil 2.9 Kolaylaştırılmış difüzyon

Kolaylaştırılmış difüzyon sadece serbest halde taşıyıcı bir protein varlığıyla gerçekleşebilir; hızı düşük substrat derişimlerde birinci, yüksek substrat derişimlerde sıfıncı mertebedir (Nielsen ve Villadsen 1994). Taşıyıcı protein tersinir olarak hücre dışındaki belirli bir moleküle bağlanır, ardından şekilsel değişiklik geçirerek molekülü hücre zarından geçirir. Sitoplazmada taşıyıcı protein tersinir bir tepkimeyle

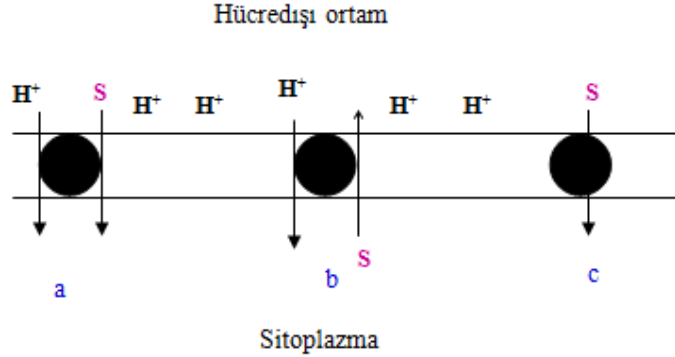
molekülden ayrılır. Taşıyıcı protein hücreiçindeki bir moleküle bağlanarak onu yüksek derişimden düşük derişimdeki hücre dışı ortama aktarabilir (Shuler ve Kargı 1992). Dolayısıyla kolaylaştırılmış difüzyonun serbest difüzyona benzeyen özelliği derişim farkının azalan yönünde gerçekleşmesidir, fakat kolaylaştırılmış difüzyon serbest difüzyona göre daha hızlı gerçekleşir (Shuler ve Kargı 1992, Nielsen ve Villadsen 1994, Stephanopoulos vd. 1998). Şekil 2.9’da gösterilen kolaylaştırılmış difüzyonun hızı (J_{KD}) taşıyıcı-substrat kompleksi veya serbest taşıyıcının derişimi açısından denklem 2.5 ile gösterilir (Stephanopoulos vd. 1998):

$$J_{KD} = \frac{D_{TS}}{d_{zar}} (C_{TS,z=0} - C_{TS,z=d}) = \frac{D_T}{d_{zar}} (C_{T,z=0} - C_{T,z=d}), \frac{mol}{m^2s} \quad (2.5)$$

2.3.2.3 Aktif taşınma

Aktif taşınım, kolaylaştırılmış difüzyona moleküllerin hücre zarındaki proteinlerle taşınması açısından benzerlik gösterir; fakat aktif taşınımında moleküller hücre zarındaki proteinlerle derişim gradyeninin ters yönünde aktarılır. Bir molekülün düşük derişimden yüksek derişime aktif taşınım ile aktarılabilmesi ancak enerji tüketimiyle gerçekleşir. Elektrostatik, H^+ , Na^+ gradyenleri, ve ATP’nin hidrolizi aktif taşınımın enerji kaynaklarıdır (Shuler ve Kargı 1992). Birincil aktif taşınımında ATP ile ATP’nin hidrolizi sonucu açığa çıkan enerji ile eş anlı olarak Na^+ , K^+ , Ca^{+2} , ve H^+ gibi iyonlar düşük derişimden yüksek derişime doğru hücre zarından aktarılırlar (Şenver  z elik 2003). İkincil aktif taşınımında bir maddenin hücre zarından geçiş diğer bir maddenin eş anlı taşınımıyla gerçekleşir. Eğer her iki molekül aynı yönde aktarılıyorsa taşınım simport, ters yönde aktarılıyorsa taşınım antiport denir. İyonlar elektrokimyasal bir potansiyelle aktarılıyorsa taşınım uniport denir (Şekil 2.10). Mikroorganizmalar tarafından karbon kaynaklarının hücreiçine alınması ikincil aktif taşınım ile gerçekleşir. Aktif taşınımında grup transferi önemli bir süreçtir. Grup transferiyle bir maddenin taşınımı molekülün hücreiçi tepkimelerle başka moleküllere dönüőmesiyle doğrudan ilişkilidir. Bakterilerde farklı karbon kaynaklarının hücreiçine aktarımı grup transferine örnek olan fosfotransferaz sistemiyle gerçekleşir. Bu süreçte fosfotransferaz proteinleri

karbon kaynağı olan moleküle fosfat grubu ekler. Glikoz, laktoz gibi karbon kaynakları ve amino asitler bakterilerde aktif taşımla aktarılır (Nielsen ve Villadsen 1994).



Şekil 2.10 İkincil aktif taşıma: a) simport, b) antiport, c) uniport

2.4 Metabolik Akı Analizi

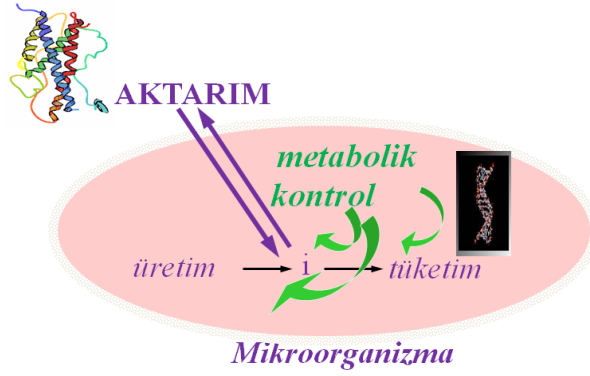
Çoğalma, ürün ve yan-ürün oluşumları sürecinde hücre içi reaksiyon ağındaki akıları ve dağılımlarını hesaplamak, hücrenin fizyolojisini anlamak için yeni bilgilerle hücre içi tepkime sistemindeki regülasyonların önemli özelliklerini ortaya çıkarır (Çalık ve Özdamar 2002). Fermentasyon prosesleri birçok parametre ve değişkene bağlıdır; özellikle biyoreaktör içinde yarı-kesikli mikrobiyoreaktör olarak işlev gören, içinde binler mertebesinde tepkimenin gerçekleştiği mikroorganizmanın içinde bulunduğu biyoreaktör işletim koşullarından etkilenir. Biyoproses sürecinde parametreler arasındaki ilişkiyi kurmak için hücre içi tepkime sisteminin modellenmesi önemlidir. Bu kapsamda, metabolik akı analizi biyokimyasal reaksiyon mühendisliğinin hücre tepkime sistemine uygulanarak sistemin analizi için gerekli özgün bir araçtır (Çalık ve Özdamar 2002). Akı analizi (Çalık ve Özdamar 2002):

- hücre içi tepkime hızlarını hesaplamak,
- organizmanın teorik metabolik kapasitesini hesaplamak,
- ortam bileşimini değiştirmek,
- biyoreaktör işletim koşullarını geliştirmek,
- farklı yollarının varlıklarını tespit etmek,
- ölçülmemiş hücre dışı akıları hesaplamak,
- alternatif yollarının etkilerini incelemek,
- hücrelerin fizyolojik durumlarını aydınlığa kavuşturmak,

- i) rekombinant biyomolekül üretimi için konak hücre seçmek, ve metabolik kontrol analizinin de kullanımıyla
- j) hücre içi yollarındaki akı değişimlerini ve hız kısıtlayıcı basamakları tahmin ederek üretimde verim ve seçiciliği artırmak için biyoreaktör performansını en iyi duruma getirmek amacıyla hücre ve biyoreaktör arasındaki etkileşimleri tanımlamak,
- k) hücre içi akı dağılımlarında olası esnek olmayan noktaları belirlemek ve önemli dallanma noktaları ile darboğazları bulmak,
- l) çevresel değişikliklerin etkilerini belirlemek,
- m) genomların metabolik özelliklerini analizleyerek genotip ve fenotip arasındaki ilişkiyi yorumlamak,
- n) metabolik mühendislik çalışmalarına yönelik temel hazırlamak,
- o) genetik değişikliklerin etkilerini belirlemek (Oberhardt vd.2009),
- p) gen-enzim-tepkime bilgisiyle üretimi artırmak için genomdan silinmesi ya da genomda bulunması gereken genleri belirlemek (Burgard vd. 2004), ekspresyonu artırılması gerekli genleri saptamak için yararlıdır.

Her mikorganizma kendisine has hücre içi tepkime sistemiyle özgün yarı-kesikli bir mikrobiyoreaktör olarak davranır. Biyoreaktör sıvı-fazını oluşturan sıvı-ortamdaki tüm girdiler (substratlar) hücre içine; hücre içinden de ardışık tepkimelerle kullanılmayan küçük molekülü metabolitlerin birikim yapanları ile, başta hidrojen iyonu olmak üzere fazla organik- ve amino asitlerle, hücre dışına aktarım özelliği olan proteinler hücre dışına aktarılırlar. Biyoreaktör işletim koşulları ile hücre içi tepkimeler, istenen biyomolekülü üretme potansiyeli olan hücreyi, hücre içi reaksiyon ağı üzerinden istenen molekülün üretimi için yönlendirilebilir (Çalık ve Özdamar 2002). Bu nedenle MAA uygulanabilmesi için, mikorganizmanın özgün hücre içi tepkime sisteminin tam ve doğru olarak gen-enzim-tepkime ilişkileri oluşturarak belirlenmesi gereklidir. Bu çerçevede, hücre içi tepkimelerin stokiyometrilere, tepkimeleri katalizleyen enzimlerin genleri, genlerin kodladığı enzim veya enzimlerle birlikte bilinmeli ve tepkime sistemindeki her bir tepkime termodinamik olarak teker teker analizlenerek tersinir olup-olmadıkları belirlenmelidir. Sonuç olarak, hücrenin kimyasal bileşimini içeren hücre sentez tepkimesi ile ürün oluşum tepkimesini de içeren hücre içi reaksiyon ağı doğru

oluşturulmalıdır. Hücreiçi tepkime sistemi merkezi karbon metabolizması, yani: glikoliz, glikoneogenesis, pentoz fosfat yolizi, TCA döngüsü, anaplerotik tepkimeleri içermelidir (Çalık ve Özdamar 2002). İkinci adımda yarı-kesikli mikro-biyoreaktör olarak işlev yapan hücrenin (Şekil 2.11) tepkime sistemindeki her bir molekül (metabolit) için kütle korunum denklemleri kurulur (Çalık vd. 1999, Çalık ve Özdamar 2002). Her bir kütle korunum denkleminde (KKD), molekülün (metabolitin) hücreiçi tepkimelerle net oluşum hızıyla (r_{Ri}), molekülün hücreiçine veya hücre dışına net aktarım hızının (r_{Ti}) cebirsel toplamı, molekülün hücreiçindeki birikim hızına eşittir (Çalık ve Özdamar 2002):



Şekil 2.11 Kütle korunum denklemlerinin (KKD) kurulacağı sistem: yarı-kesikli mikro-biyoreaktör

Şekil 2.11'deki hücreiçi i - metaboliti için oluşturulan KKD'i denklem 2.6'da verilmiştir:

$$r_{Ri} + r_{Ti} = d(C_i)/dt \quad (2.6)$$

Burada i metaboliti için r_{Ri} net-tepkime hızı, r_{Ti} net-aktarım hızı, ve $d(C_i)/dt$ hücreiçinde birikim hızıdır. Tüm hücreiçi metabolitler için KKD'leri denklem-2.6 yapısında oluşturulduktan sonra, lineer skalar-yapıdaki adi diferansiyel denklem sistemi düzenlenir ve denklem- 2.7 yapısında vektör diferansiyel denklemle aşağıdaki gibi tanımlanır (Çalık vd. 1999, Çalık ve Özdamar 2002):

$$\mathbf{A} * \mathbf{r}(t) = \mathbf{c}_1(t) + \mathbf{c}_2(t) \quad (2.7)$$

$\mathbf{A}$: hücreiçi tepkime sisteminin stokiyometrik katsayı matrisi,

$\mathbf{r}(t)$: hücre içi metabolik akı vektörü,
 $\mathbf{c}_1(t)$: hücre dışı metabolit birikim vektörü,
 $\mathbf{c}_2(t)$: hücre içi metabolit birikim vektörüdür.

Hücre dışı metabolitlerin birikim hızları ve dolayısıyla $\mathbf{c}_1(t)$, kesikli biyoreaktörlerde dinamik koşullarda yapılan deneylerde analizin yapıldığı t kalma süresinde hücre dışı metabolit derişiminin kalma süresiyle değişimini gösteren eğriye çizilen teğetin eğiminin hesaplanmasıyla bulunur. Hücre içi metabolitler için yaklaşık-yatışkın koşul varsayımı kullanılabilir. Böylece, $\mathbf{c}_2(t)$ sıfıra eşitlenir; vektör diferansiyel denklem- 2.7 denklem- 2.8'e dönüştürülür (Çalık vd. 1999, Çalık ve Özdamar 2002):

$$\mathbf{A} * \mathbf{r}(t) = \mathbf{c}_1(t) \quad (2.8)$$

Lineer vektör diferansiyel denklem-2.8 ile, mikroorganizmanın tanımlanan hücre içi tepkime sisteminin kütle-korunum temelli matematik modeli oluşturulmuş olur. Kütle korunum denklemlerini gösteren lineer adi diferansiyel denklem sistemi vektörel yapıda tanımlanırken, $m \times n$ stokiyometrik katsayı matrisi $\mathbf{A}$ oluşturulur. Burada m tepkime sistemindeki metabolit sayısını, n tepkime sayısını gösterir. Matematik modelin çözümüyle hesaplanması amaçlanan akılar, tepkime hızlarını içeren $n \times 1$ kolon vektör $\mathbf{r}$ bileşenleridir. Kütle korunum temelli matematik model- çözülürken, modeldeki tepkime sayısı (n) ve metabolit sayısının (m) birbirine göre büyüklükleri çözüm yöntemini etkiler. Eğer $m > n$ ise model doğruya yaklaşık bir sonuç verir. Lineer adi diferansiyel denklem sisteminin çözümü en küçük kareler yöntemiyle belirlenir. $m < n$ ise model optimizasyonla çözülür, belirli bir amaç fonksyonu tanımlanmalıdır. Modelin bilinmeyenleri olan hücre-içi tepkime hızlarını (akılarını) bulmak amacıyla amaç fonksiyonu Z (Çalık ve Özdamar 2002):

$$Z = \sum \alpha_i * r_i \quad (2.9)$$

olarak tanımlanır. Burada α_i metabolitlerin stokiyometrik katsayılarıdır. r_i hızlarının lineer kombinasyonu olan denklem 2.9 minimize edilerek, denklem-2.8 çözülür.

Metabolik akı analizine (MAA) temel yaklaşım Aiba ve Matsuoka (1979) tarafından yapılmıştır. Daha sonra, Papoutsakis (1984) ve Papoutsakis ve Meyer (1985) MAA metodolojisine katkı yapmıştır. Akı dağılımlarındaki önemli dallanma noktalarını belirlemek için metabolik tepkimelerin stokiyometrik analizlerine dayanan yöntem kemostat deney verileri kullanılarak Stephanopoulos ve Vallino (1991) tarafından özetlenmiştir. Daha sonra Nielsen ve Villadsen (1994), daha sonra Stephanopoulos vd. (1998) kitaplarında MAA yöntemine yer vermiştir. Metabolik akı analizi metodolojisi gerikarışmalı reaktör olarak işletilen kemostat biyoreaktör deney verileri kullanılarak başlamıştır (Stephanopoulos ve Vallino 1991, Vallino ve Stephanopoulos 1993, Varma ve Palsson 1995). Kemostat sistemde yataşkın koşulda hücre dışı metabolit birikim vektörü sıfıra eşit olacağından (denklem-2.8), vektörel yapıdaki kütle korunum denklemi aşağıdaki gibidir ve çözümü ile akılar hesaplanır (Nielsen ve Villadsen 1994):

$$\mathbf{A} \cdot \mathbf{r}(t) = 0 \quad (2.8)$$

2.4.1 Biyokimyasal tepkime temelli matematik modeller

Biyokimyasal tepkime temelli matematik modeller, mikroorganizmaların genom dizinlerinin bilinmediği, gen-enzim-tepkime ilişkileri ve gen işlevlerinin önemli ölçüde belirlenmediği durumda, biyokimyasal tepkime bilgi birikimiyle kurulan matematik modellerdir. Biyokimyasal tepkime temelli modeller, Bölüm 2.4'te belirtilen amaçlar için kullanılabilir. Bu bölümde 2002 yılına kadar *Bacillus* türlerinde SAP üretimiyle ilgili oluşturulan biyokimyasal tepkime temelli matematik model ve akı analizi (MAA) çalışmaları özetlenmiştir. 2002 yılı ve sonrasında gerçekleştirilen MAA çalışmaları Bölüm 2.4.3'te incelenmiştir.

Çalık ve Özdamar (1999) *B. licheniformis*'te SAP üretimi için $m=105$ metabolit, $n=147$ tepkimeden oluşan kütle korunum temelli stokiyometrik bir model geliştirmiştir. Genom dizini 2004'de açıklanan *B. licheniformis* (Veith vd. 2004) için 1999'da hücre içindeki tepkimelerin çoğu bilinmemekteydi. Dolayısıyla *Bacillus* türlerindeki temel tepkimelerin *B. licheniformis*'te olması gerektiği düşünülerek tüm *Bacillus* tepkimeleri araştırılmış ve matematik modelin oluşturulmasında kullanılmıştır. *Bacillus* türlerine ait

glikoliz yolizi, karbon kaynaklarının hücreiçine taşınımından sorumlu PTS (fosfoenolpiruvat-şeker fosfotransferaz sistemi), TCA döngüsü, pentoz fosfat yolizi, anaplerotik, ve aminoasitlerin birbirine dönüşüm tepkimeleri ile *B. subtilis*'e ait amino asit sentez tepkimeleri matematik modele eklenmiştir. CO_2 , NH_4^+ , ve fosfatın taşınım tepkimeleri pasif difüzyon varsayımıyla modele eklenmiştir. Yaşam için ATP tüketim tepkimesi diğer metabolik yolizi çalışmalarında bulunan haliyle modele alınmıştır. Elektron taşınım sisteminde P/O oranı iki alınmıştır. SAP enziminin oluşum tepkimesi *B. licheniformis* tarafından sentezlenen SAP'ın amino asit bileşiminden yararlanılarak oluşturulmuştur. Nükleotitlerin, yağ asitlerinin, tek karbonlu moleküllerin, ve hücre bileşenlerinin sentez tepkimeleri modele eklenmiştir. *B. licheniformis* veya *B. subtilis*'in hücre bileşenleri bilinmediği için *E. coli*'nin hücre oluşum tepkimesi kullanılmıştır. Hücre bileşimi sabit kabul edilmiştir. *B. licheniformis*'ten SAP üretimini tasvir eden, sitratın karbon kaynağı olarak tüketildiği modelin çözümü kesikli biyoreaktör verileriyle gerçekleştirilerek hücreiçi tepkime hızları hesaplanmıştır. Çözüm simpleks algoritmasıyla gerçekleştirilirken amaç fonksyonu proteaz sentez hızıyla proteaz salgılanma hızı arasındaki fark olarak tanımlanmıştır. Hücreiçinde minimum SAP birikim hızı varsayımıyla çözülen modelin sonuçları amino asit derişimlerinin SAP sentezindeki önemini gösterir (Çalık ve Özdamar 1999). Çalık vd. (1999) ilk defa *B. licheniformis*'ten SAP üretimi için, oksijen aktarımının hücreiçi tepkime hızları üzerindeki etkilerini incelemiştir. Sitratın substrat olarak kullanıldığı, hava giriş hızının $Q_0/V_R=1$ vvm ve karıştırma hızlarının $N=150, 500, \text{ ve } 750 \text{ dk}^{-1}$ olduğu araştırma koşullarından elde edilen biyoreaktör verileri kullanılarak, SAP'ın hücreiçi birikiminin minimize edilmesiyle $m=102$ metabolit, $n=133$ tepkime içeren modelin çözümü gerçekleştirilmiştir. Modelde kullanılan varsayımlar tüm hücrelerin özdeş olması, NADPH'tan NADH oluşumunun tersinir olup enerjiye ihtiyaç duymaması, NADPH, NADH, ve FADH'ın enerji bakımından eşit olması, sporlanma tepkimelerinin dikkate alınmaması, hücre bileşiminin sabit olmasıdır. Sonuçlar TCA yolizinde α -ketoglutarattan glutamik asit grubu ve okzaloasetattan aspartik asit grubu aminoasitlere giden akıların büyük ölçüde oksijen aktarım koşullarına bağlı olduğunu, hatta TCA yolizini malat veya okzaloasetattan glikoneogenesis yolizine bağlayan anaplerotik tepkimelerin oksijen aktarım koşullarından etkilendiğini göstermiştir. Çoğalma ve ATP üretim hızları oksijen aktarım hızıyla artmıştır. SAP sentezinden önce başlayan

sporlanma için gerekli olan aspartik asit grubu amino asitlerinin yolizi tüm oksijen aktarım koşullarında aktiftir. Aspartat'tan asparajine yönelen düşük akı değeri nedeniyle asparajin sentetaz veya aspartat kinazın potensiyel metabolik mühendislik konumları olduğuna karar verilmiştir. Bu çalışmadaki düşük, orta, ve yüksek oksijen aktarım koşullarında elde edilen metabolik akılar oksijen aktarımı stratejisi tasarımını sağlamıştır. Çalık vd. (2000) *B. licheniformis*'in teorik SAP üretim kapasitesini, sitrat tüketim hızının belirli bir değerinde farklı çoğalma hızları için hesaplamıştır. Akı dağılımı SAP sentez hızının maksimize edilmesiyle bulunmuştur. Analizde deneysel veriler kullanılmamıştır. Ayrıca SAP fermentasyonunun kesikli biyoproses verilerini kullanarak teorik veriye dayalı kapasite analizi (TDC) yapılmıştır. Her iki analizde m=105 metabolit, n=147 tepkime içeren matematiksel model ve hücre içi metabolitler için yaklaşık-yatışkın koşul varsayımı kullanılmıştır; en yüksek ve düşük akı değerlerini alan amino asit grupları sırasıyla aspartik asit ve aromatik amino asit grubudur. Sonuçlar SAP üretiminin teorik olarak artırılabilirliğini göstermiştir. Benzer akı dağılımı veren her iki analizde piruvatın SAP üretimini kontrol eden önemli bir dallanma noktası olduğu ortaya çıkartılmıştır. Ayrıca asparajin sentezinin dışında anaplerotik tepkimelerden piruvata giden akılar da *B. licheniformis*'ten SAP üretimi için hız kısıtlayıcı basamak olabilir. *subC* geninin düşük transkripsiyonu, hücre duvarından SAP taşınımı, ve SAP'ın hücre zarı proteazları tarafından parçalanması üretimi azaltabilir. Çalık vd. (2000) SAP üretiminde oksijen aktarımının üretim kapasitesine etkilerini incelemiştir. Hücre içi tepkime hızları minimum SAP birikimi varsayımının yapıldığı teorik veri analizi (TDA) ve maksimum SAP sentezi varsayımının yapıldığı teorik veri kapasite analizi (TDC) ile bulunmuştur. Düşük oksijen aktarımında tüm fermentasyon boyunca orta oksijen aktarımının durağanlık ve başlangıç fazında, yüksek oksijen aktarımının SAP üretimi fazında TDA ve TDC analizlerinin SAP sentez akıları birbirine yakındır. TDA ve TDC analizleri SAP üretiminin oksijen aktarım stratejisiyle ve *subC* geninin bir plazmite klonlanıp *B. licheniformis*'e aktarılmasıyla artırılabilirliğini gösterir.

Çalık ve Özdamar (2001) *B. licheniformis*'te çeşitli substratların (glukoz, asetat, süksinat, malat, sitrat) SAP, nötral proteaz (NP), α -amilazın üretimine etkilerini teorik üretim kapasite analiziyle incelemiştir. Amaç fonksyonu olarak sırasıyla maksimum

çoğalma hızı, SAP, nötral proteaz, α -amilaz üretimleri kullanılmıştır. SAP, NP, α -amilaz için oluşturulan her üç modelde, maksimum hücre oluşumu için glukoz girdisi kullanılmıştır. En yüksek ve düşük SAP, nötral proteaz, α -amilaz sentez hızları glukoz ve sitratın kullanıldığı koşullarda elde edilmiştir. SAP ve nötral proteaz için okzaloasetat ve piruvatın, α -amilaz için okzaloasetatın kritik ana dallanma noktaları olduğu ortaya çıkmıştır. Sonuç olarak SAP ve nötral proteaz sentezi için alanin grubu ve aspartat grubuna giden akılar, α -amilaz sentezi için aspartik asit grubu amino asitlerin akıları yüksek olmalıdır.

2.4.2 Genom-seviye matematik modeller

20. yüzyılın sonuna kadar bir organizmanın tepkimeleriyle ilgili matematik model oluşturulmak istenildiğinde sahip olunan bilgiler azdı. Biyokimya, fizyoloji, ve genetik bilim dallarındaki tüm birikim kullanılarak organizma içinde gerçekleşen tepkimelerin sınırlı sayıda bölümü ancak biliniyordu. Fakat son 20 yılda genom bilimindeki ilerlemeler sayesinde birçok organizmanın genom dizini açıklanıp genlerinin işlevleri, gen-enzim-tepkime bilgileri oluşturulmaya başlanmıştır. Dolayısıyla birçok organizmada gerçekleşen tepkimeler gen-enzim-tepkime ilişkileriyle aydınlatılmaya başlamıştır (Durot vd. 2009, Genomes OnLine Database). Genom dizini belirlenen organizmaların genlerinin işlevleri, gen-enzim-tepkime ilişkileri bulunup hücreiçi tepkimeleri katalizleyen tüm enzimler ve katalizledikleri tepkimelerin tümü stokiyometrik ve termodinamik olarak belirlendiğinde hücreiçi tepkime sistemi genom seviyede belirlenmiş olur. Biyomoleküllerin biyoteknolojik proseslerle üretimi için, hücreiçinde gerçekleşen tepkimeler belirlenip hücreiçi tepkime sistemi oluşturulduktan sonra, reaksiyon mühendisliği prensipleriyle kütle-korunum temelli genom seviye matematik modeller kurulabilir. Herbir hücre-içi bileşik için kütle korunum denklemi kurularak oluşturulan matematik modelin çözümü hücreiçi tepkime hızlarını verir. Böylece hücreiçi tepkime sistemi için genom bilgileri, biyokimyasal veriler, ve fizyoloji üzerine oluşan tüm birikim kullanarak genom seviye modeller oluşturulur (Schilling ve Palsson 1998, Oberhardt vd. 2009). Genom seviye matematik modeller oluşturulurken veritabanları kullanılır (Durot vd. 2009, Blazeck ve Alper 2010). Şu ana kadar bakteri, arkea, ve ökaryot sınıfındaki birçok hücre için 50'den fazla genom seviye model

yayınlanmıştır (Oberhardt vd. 2009). Genom seviye matematik modeller ile biyokimyasal tepkime temelli modeller, Bölüm 2.4’de belirtilen amaçlar için kullanılır. Genom seviye modeller Bölüm 2.4’de -o ve p’de- belirtilen, genetik değişikliklerin etkilerini belirlemek (Oberhardt vd.2009), gen-enzim-tepkime bilgisiyle üretimi artırmak için genomdan silinmesi ya da genomda bulunması gereken genleri belirlemek (Burgard vd. 2004), ekspresyonu artırılması gerekli genleri saptamak için kullanılır. Genom seviye modeller akı analizi için kullanılırken tepkime sistemindeki bağlantısız tepkimeler belirlenerek tepkime sisteminden silinmelidir. Ayrıca genomda tanımlanamayan genlere atıfta bulunan tepkimeler için biyokimyasal, genetik, veya fizyolojik bilimsel kanıtların bulunması gerekir. Bununla birlikte yaşam için gerekli enerjinin değerlendirilmesi, hücre bileşiminin bilinmesi, ve tepkimelerin tersinirliklerinin saptanabilmesi için termodinamik bilgiler gereklidir (Teusink ve Smid 2005). Genom seviye modeller kontrol mekanizması içermedikleri taktirde, sadece hücre teorik metabolik potansiyelini tahmin edebilir. Fakat bir hücrenin enerji kaynakları tüm genlerin aynı anda ve sürekli çalışması için yetersizdir. Dolayısıyla sadece temel hücresel fonksyonları sağlayan proteinleri kodlayan genler sürekli olarak açıktır, geri kalan genlerin transkripsiyonu kontrol altında ve kapalıdır. Eğer bir protein hücre için gerekliyse, hücredeki sinyal sistemi o proteini kodlayan genin transkripsiyonunu başlatır. Böylece gen açık konuma gelir (GENE-ON). Benzer şekilde, ihtiyaç duyulmayan bir proteini kodlayan gen açık konumda değildir-transkripsiyonu yapılmaz (GENE-OFF) (Glick ve Pasternak 2003). Hepsinin aynı anda çalışması bir kontrol mekanizmasıyla engellenen genlerin oluşturdukları sistem elektronik devreye benzetilebilir (Savageau 2001). Dolayısıyla genlerin sürekli çalışıyor olması varsayımı doğal olarak yanlış tahminlere yol açar.

Genom modellerin sinyal iletimi, genetik ve metabolik kontrol mekanizmaları içermeleri mikroorganizmaların davranışlarını daha doğru tahmin edebilmelerini sağlayacaktır (Covert vd. 2001, 2004; Covert ve Palsson 2002, 2003). Dolayısıyla hücredeki tüm süreçleri (kinetik, sinyal iletim olayları, her türlü regülasyon, transkripsiyon/ translasyon, protein sentezi, sporlanma, protein salgılama gibi) içeren bir model kurmak sistem biyolojisinin ve metabolik mühendisliğin nihai hedefidir (Lee vd. 2008, Feist vd. 2009, Oberhardt vd. 2009).

2.4.3 *Bacillus* için metabolik akı analizi çalışmaları

Metabolik akı analizi metodolojisi geriakışmalı reaktör olarak işletilen kemostat biyoreaktör deney verileri kullanılarak başlamıştır (Stephanopoulos ve Vallino 1991, Vallino ve Stephanopoulos 1993, Varma ve Palsson 1995). Kemostat sistemde yataşkın koşulda hücre dışı metabolit birikim vektörü $c_1(t)$ (denklem 2.8) sıfıra eşit olacağından, denklem-2.8 denklem 2.10'a indirgenir ve yataşkın koşul için çözüm yapılır (Nielsen ve Villadsen 1994):

$$A * r(t) = 0 \quad (2.10)$$

Çalık ve Özdamar (1999) ilk defa kesikli işletilen biyoreaktör verileriyle $c_1(t)$ vektörünü hesaplanması ve kullanımına dayanan denklem-2.8'in çözümünü gerçekleştirerek akı analizi gerçekleştirmiştir. Bu kapsamda endüstriyel mikroorganizmalar için 2002'ye kadar gerçekleştirilen metabolik akı analizi çalışmaları Çalık ve Özdamar (2002) tarafından özetlenmiştir. *Bacillus* türleriyle 2002'den itibaren az, tam, ve çok tanımlı hücre içi tepkime sistemleri için oluşturulan matematik modeller ile gerçekleştirilen metabolik akı analizi çalışmaları bu bölümde sırasıyla EK 1 ile desteklenerek özetlenmiştir.

2.4.3.1 Az tanımlı matematik modellerle gerçekleştirilen MAA çalışmaları

Az tanımlı tepkime sistemleri için oluşturulan matematik modeller ($n > m$) ile gerçekleştirilen 33 çalışma vardır. Çalışmalar EK 1 çizelge 1'deki çizelgede yer alan bilgilerle desteklenerek özetlenmiştir. 33 çalışmadan 8'inde genom seviye matematik model, 24 çalışmada biyokimyasal tepkime temelli matematik model ile akı analizi gerçekleştirilmiştir. Tek bir çalışmada genom seviye modelin tepkime sistemi onda birine indirgenerek akı analizi yapılmıştır. Genom seviye modellerle yapılan akı analizlerinde Oh vd. (2007) ve Henry vd. (2009)'nin *B.subtilis* genom modellerinden yararlanılmıştır. 2002 yılında *Bacillus* türleriyle ilgili iki çalışma gerçekleştirilmiştir: İlk çalışmada Christiansen vd. (2002) ^{13}C ile işaretli glukoz ortamında çoğaltılmış, savinaz

üreten *B. clausii* için matematiksel model ile hesaplanan ve deneysel olarak saptanan akıları karşılaştırmıştır. Deneysel akılarla en iyi örtüşen akı dağılımları evrimsel algoritmayla tahmin edilmiştir (Schmidt ve Isaacs 1995). PFY akılarının çoğalma hızıyla arttığı saptanmıştır. Piruvat metabolizmasında deneysel olarak saptanan iki döngü matematik modele eklenmiştir (EK 1 Çizelge 1).

Çalık vd. (2002) SAP üreten *B. licheniformis*'te kontrolsüz pH işletiminin ($pH_0 = 7.00, 7.25, 7.50$) hücre içi akı dağılımına etkisini fermentasyonun iki periyodu için incelemiştir. Çoğalma fazında glikoliz yolizi ve TCA döngüsü akılarının başlangıç pH'ı ile arttığı saptanmıştır. Proton derişim farkının artmasıyla enerji tüketiminin arttığı vurgulanmıştır. SAP üretim fazında en düşük ve yüksek glikoliz yolizi akı değerleri sırasıyla $pH_0 = 7.50$ ve 7.00 'de elde edilirken, TCA döngüsü, amino asit sentez, SAP sentez akıları en yüksek değerlerini $pH_0 = 7.25$ 'te almıştır. Çalık vd. (2003) biyokimyasal tepkime temelli matematik modelle ($m=105, n=148$) pHV1431::subC plazmitini taşıyan rekombinant *B. licheniformis* ile SAP üretiminde kontrolsüz ve kontrollü pH işletim koşullarının ($pH_0 = 6.8, 7.10, 7.25$) hücre içi tepkime hızlarına etkilerini incelemiştir.

Çalık vd. (2003) SAP üreten doğal ve rekombinant *B. licheniformis*'lerin hücre içi tepkime hızlarını karşılaştırmıştır. SAP sentez periyodunda glikoliz yolizi, pentoz fosfat yolizi, TCA döngüsü, ve amino asit sentez yolizi akılarının rekombinant *B. licheniformis*'te yüksek olduğu saptanmıştır. subC geninin ekspres edilmesiyle glikoliz yolizi dışındaki tüm yozizlerinin normalize akı değerleri önemli ölçüde değişmiştir (EK 1 Çizelge 1). Zamboni ve Sauer (2003) deneysel olarak bulunan akı oranları, glukoz, asetat tüketim hızları, ve çoğalma hızını kullanarak matematik modelin çözümünü gerçekleştirmiştir. TCA döngüsü akılarının saytokrom aa3 oksidaz enzimini kodlayan genin silinmesiyle azaldığını saptamıştır (EK 1 Çizelge 1). Zamboni vd.(2004) ^{13}C -etiketleme deneyleri için %20 (a/a) $[U-^{13}C]$ -glukoz içeren ortamda çoğaltılan *B. subtilis*'in GC-MS'le belirlenen hücre içi amino asit dağılımları ve fizyolojik verileri kullanılarak *B. subtilis* için oluşturulan matematik modelin (Dauner ve Sauer 2001) çözümünü gerçekleştirilip ^{13}C -temelli akı analizi gerçekleştirmiştir. Riboflavin üretiminin yüksek olduğu koşullarda, riboflavin pentoz öncüllerinin yalnızca oksidatif

olmayan pentoz fosfat yolizinde sentezlendiği gösterilmiştir. Fuhrer vd.(2005) ^{13}C izleyici deneyleri ve ardından GC-MS analiziyle tespit edilen hücre içi amino asitlerinin izotopomer yapısının kullanımına dayanan, ^{13}C -sınırlamalı metabolik akı analizi gerçekleştirmiştir. Deneysel olarak hesaplanan akı oranları ve fizyolojik veriler kullanılarak çözümü gerçekleştirilen matematik modelle *B. subtilis* dahil yedi farklı bakterinin mutlak akıları hesaplanıp karşılaştırılarak merkezi karbon yolizlerindeki farklılıklar açığa çıkartılmıştır (EK 1 Çizelge 1). Lerondel vd.(2006) $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ ile etiketli glukoz ortamında çoğaltılan *B. subtilis* hücrelerini hidroliz edip, hidrolizat türevlerini GC-MS ile analizlemiştir. Amino asitlerin kütle izotop dağılımları, akı oranlarının FiatFlux yazılımıyla hesaplanmasında kullanılmıştır. Akı analizi YtsJ'nin malattan piruvat dönüşümünde görev aldığını doğrulamıştır. Matematik modelin niteliği çalışmada belirtilmemiştir. Zhu vd.(2006) asetat oluşumunu azaltmak için kullandıkları *B. subtilis pta⁻*'a asetolaktat sentezi kodlayan geni aktararak riboflavin verimini % 50 artırmıştır. *B. subtilis pta⁻* ve rekombinant *B. subtilis*'in hücre içi akıları karşılaştırılmıştır. Rekombinant *B. subtilis*'te TCA döngüsü akılarının ve ATP/ADP oranının önemli ölçüde arttığı gösterilmiştir. ATP derişiminin artması nedeniyle riboflavin sentezinin artmış olabileceği belirtilmiştir (EK 1 Çizelge 1).

Çalık ve İleri (2007) β -laktamaz üreten *B. licheniformis*'te kontrollu pH işletiminin ($\text{pH}_c = 6.5, 7.0, \text{ ve } 7.5$) hücre içi akı dağılımına etkilerini akı analiziyle araştırmıştır. Biyoproses üç periyoda ayrılmıştır: β -laktamaz sentezinin başladığı çoğalma fazı ($0 < t < 6$ st), geçiş fazı ($6 < t < 8$ st), ve β -laktamaz sentezinin arttığı durgunluk fazı. Biyoproses boyunca merkezi karbon yolizleri aktiftir. Birinci periyotta yan ürünlere yönelen akılar en yüksek ve düşük değerlerini $\text{pH}_c = 7.0$ ve 7.5 'ta almıştır, fakat β -laktamaz sentez akısı önemli ölçüde değişmemiştir. Üçüncü periyotta yan ürün ve β -laktamaz sentez akıları en yüksek değerlerini $\text{pH}_c = 7.5$ ve $\text{pH}_c = 7.0$ 'ta almıştır. β -laktamaz üretimini artırmak için önerilen strateji fermentasyon ortamının başlangıç pH'ını 7.5 'a ayarlamak, ortam pH'ı 7.0 'ye inince $\text{pH}_c = 7.0$ işletimine geçilmesidir (EK 1 Çizelge 1).

Fürch vd. (2007) hidrolaz üreten rekombinant *B. megaterium*'da farklı karbon kaynaklarının (glukoz veya piruvat) merkezi karbon yolizi akılarına etkilerini incelemiştir. ^{13}C ve ^{12}C izotoplarıyla etiketli karbon kaynaklarında çoğaltılan *B.*

megaterium'da her iki izotopun amino asitlere bağlanma oranını belirlemek amacıyla kurutulmuş hücre pelletleri hidrolize edilip hidrolizatlar türevlendirilmiş ve GC/MS'le analizlenmiştir. Böylece glukoz ve piruvat ortamında çoğaltılan *B. megaterium*'in GC/MS'le elde edilen $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ oranları kullanılarak akı oranları elde edilmiştir. 23 tepkime ve 16 metabolitten oluşan *B. megaterium* matematik modeli akı oranları ile hücre dışı akılar kullanılarak çözülmüştür (EK 1 Çizelge 1). Hidrolaz üretiminin piruvatın kullanıldığı koşulda daha yüksek olduğu saptanmıştır. Metabolik akı analizi sonucunda piruvat ile piruvat nodu ve TCA döngüsü akılarının arttığı, glukoz ile pentoz fosfat yolizi akılarının artıp TCA döngüsü akılarının azaldığı saptanmıştır. Fürch vd. (2007) [U- ^{13}C] glukoz ortamında çoğaltılan *B. megaterium* DSM319, MS941, WH320, ve WH323 türlerinin merkezi karbon yolizi akılarını belirleyip karşılaştırmıştır. Kurutulmuş hücre pelletleri hidrolize edilip hidrolizatlar türevlendirilmiş ve GC/MS ile analizlenmiştir. *B. megaterium* için 23 tepkime ve 14 metabolitle oluşturulan matematik modelinin çözümü dört farklı tür için akı oranları ile deneysel olarak ölçülen hücre dışı akılar kullanılarak gerçekleştirilmiştir (EK 1 Çizelge 1). Glikoliz, PFY, ve TCA döngüsü akıları mikroorganizmalarla değişmemiştir. Bununla birlikte piruvattan okzaloasetat ve malattan piruvat sentezlenmesini sağlayan anaplerotik tepkime akılarının kimyasal mutajenesis geçirmiş WH320 ve WH323'te önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir. Vary vd. (2007) *B. megaterium*'den endüstriyel rekombinant protein üretimi için akı analizi çalışmalarını, genom dizinini, doğal plazmitlerini, oluşturulan vektör sistemleriyle ilgi literatürde yer alan çalışmaları incelemiştir. Mahadevan ve Lovley (2008) hücre içi tepkimeleri üç sınıfa ayırmıştır: (1) yaşam için vazgeçilemez tepkimeler (essential reactions), (2) aktif olmayan tepkimeler, ve (3) şartlı aktif ve yaşam için vazgeçilebilir tepkimeler. Bu temel kapsamında *E. coli*, *B. subtilis*, *S. cerevisiae*, *M. barkeri*, *G. sulfurreducens*'te yaşam için vazgeçilemez tepkimelerin, aktif olmayan tepkimelerin, şartlı aktif ve yaşam için vazgeçilebilir tepkimelerin tepkime sistemindeki yüzdeleri, içlerinde gen-enzim-tepkime ilişkisinin bulunduğu genom seviye modeller ile çoğalmanın maksimize edilmesiyle hesaplanmıştır, değerlendirilmiştir. *E. coli* ve *B. subtilis*'te yaşam için vazgeçilemez gen yüzdesinin (10%) *S. cerevisiae*'ninki gibi düşük olduğu saptanırken, *G. sulfurreducens* ve *M. barkeri*'de bu oranın daha yüksek olduğu (% 30) belirlenmiştir. Oh vd. (2007)'nin *B. subtilis* için oluşturduğu GEM kullanılmıştır (EK 1 Çizelge 1).

Rantanen vd. (2008) ^{13}C izotopomer verileriyle belirlenen hücre içi akı oranlarının model tarafından doğru tahmin edilmesine dayanan özgün bir metod geliştirerek *B. subtilis* ile *S. cerevisiae*'ye uygulamıştır (EK 1 Çizelge 1). Boghigian vd. (2010) *B. subtilis*, *E. coli*, ve *S. cerevisiae* için oluşturulan genom-seviye matematik modelleri kullanarak 6-deoksieritronolid B üretimini incelemiştir (EK 1 Çizelge 1). *B. subtilis*'ten gen silinmelerinin 6-deoksieritronolid B üretimine etkileri Oh vd. (2007)'nin oluşturduğu GEM kullanılarak incelenmiştir. Kleijn vd. (2010) *B. subtilis* için malatın, glukozdan sonra tercih edilen ikinci karbon kaynağı olduğunu göstermiştir. Malatın glukozla birlikte nasıl parçalandığını araştırmak amacıyla üç koşulda ^{13}C 'e dayalı akı analizi gerçekleştirilmiştir: $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ ile etiketli glukoz içeren ortamda çoğalan *B. subtilis*, $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ ile etiketli malat içeren ortamda çoğalan *B. subtilis*, $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ ile etiketli glukoz ve malat içeren ortamda çoğalan *B. subtilis*. Her üç koşulda amino asitlerin ^{13}C dağılımı elde edilmiştir. Oh vd. (2010)'un oluşturdukları GEM'in indirgenmiş hali kullanılarak ^{13}C - ile etiketli karbon kaynağı tüketimine dayanan deneylerle elde edilen hücre içi amino asit dağılımıyla en iyi uyuşmayı veren akı seti elde edilmiştir (EK 1 Çizelge 1). Akı analizi malatın öncelikle glikoneogenesis tepkimeleriyle parçalandığını göstermiştir. Glukoz ve malatın birlikte tüketilmesi ile TCA döngüsü akılarının azaldığı saptanmıştır. Özdamar vd. (2010) rekombinant *B. subtilis*'te insan büyüme hormonu (*hGH*) geninin hücre içi tepkime sistemine etkilerini incelemiştir. *pMK4::pre(subC)::hGH* taşıyan *B. subtilis* (rBsHGH) ve sadece *pMK4* taşıyan *B. subtilis* (rBsP)'e ait biyoreaktör verileriyle genom seviye modelin çözümü gerçekleştirilerek rhGH üreten ve üretmeyen *B. subtilis*'lerin hücre içi tepkime hızlarını hesaplanmış ve karşılaştırılmıştır (EK 1 Çizelge 1). rBsHGH ve rBsP'lerin aktif tepkimelerinin periyotlara göre değişimi incelendiğinde, *B. subtilis*'te rhGH üretimini sağlayan yabancı genin hücre çoğalmasını dördüncü periyodun sonuna kadar uzattığı sonucuna varılmıştır. rhGH üretimini artırmak amacıyla üçüncü ve beşinci periyotlar arasında çoğalma hızını $0.02\text{-}0.08 \text{ st}^{-1}$ değerinde sağlayacak üstel besleme stratejisi önerilmiştir. Motamedian ve Naeimpoor (2011) en iyi optimum akı dağılımını matematik model ile hesaplamıştır (EK 1 Çizelge 1). Karışık tamsayı lineer programlama (mixed integer linear programming) ve minimum enerji gereksinimi ile çözümü gerçekleştirilen model beş farklı en uygun akı dağılımı sonucunu üretmiştir.

Beş farklı sonuçtan asit üretiminin olmadığı ve glukoz tüketim hızının minimum olduğu çözüm en iyi çözüm olarak seçilmiştir.

Motamedian ve Naeimpoor (2011) Oh vd.(2007)'nin *B. subtilis* için oluşturdukları GEM'i kullanarak çeşitli karbon (glukoz, sukroz, gliserol, laktat, ve sitrat) ve azot kaynakları (amonyum klorür, sodyum nitrat, üre, ve histidin) kullanıldığında çoğalma ortamındaki pH değişimlerini tahmin etmiştir (EK 1 Çizelge 1). pH değişiminin tahmini, model kullanılarak hücre zarındaki proton değişim akısının hesaplanmasına dayanır. Karbon kaynaklarından glukoz, sukroz, ve gliserolün çoğalma ortamının pH'ını düşürürken, sitrat ve laktatın çoğalma ortamının pH'ını artırdığı saptanmıştır. Azot kaynaklarından sadece amonyum klorürün ortam pH'ını düşürdüğü tahmin edilmiştir. Ayrıca çeşitli karbon ve azot kaynaklarının hücre verimine etkisi, pH'ın çoğalmaya etkisi teorik olarak incelenmiştir. Model tahminleri deneysel sonuçlarla değerlendirilmiştir.

Basler vd. (2012) Oh vd. (2007)'nin *B. subtilis* için oluşturdukları GEM'i kullanarak tepkime sistemine hücre verimini artıracak tepkimeler eklemenin etkilerini araştırmıştır (EK 1 Çizelge 1). Rühl vd. (2012) azot kısıtlılığı ve durgunluk fazındaki *B. subtilis*'i incelemiştir. Akı analizi durgunluk fazında yüksek PFY akıları nedeniyle yüksek derişimde NADPH üretimi olduğunu göstermiştir. Transkriptom analizi, genleri silinmiş mikroorganizmalarla durgunluk fazında gerçekleştirilen ¹³C-akı analizi, ²H-etiketleme deneyleri birleştirilerek NADPH üretiminin yüksek olmasının nedeninin transhidrojenasyon döngüleri olduğu gösterilmiştir (EK 1 Çizelge 1). Rühl vd. (2012) ¹³C ile etiketli glukoz içeren ortamda çoğaltılan *B. subtilis* için hücreiçi akıları iki farklı yöntemle tahmin etmiştir: LC-MS/MS analiziyle (1) hücreiçindeki parçalanmamış moleküllerin, (2) hücreiçindeki parçalanmamış ve parçalanmış moleküllerin ¹³C-verileriyle korunumu gerçekleştirilmiştir. Çalışmada hücreiçindeki parçalanmış moleküllere ait verilerle PFY, glikoliz ve TCA döngüsü akılarının daha doğru şekilde tahmin edildiği gösterilmiştir (EK 1 Çizelge 1).

Srivastava vd. (2012) D-riboz üreten *B. pumilus* ATCC 21951 *tkt⁻* 'de glukoz, inorganik fosfat, çözünmüş oksijen, ve amino asit derişimlerinin hücreiçi akıları önemli ölçüde

etkilediğini matematik modelin deneysel verilerle çözümü ile belirlemiştir. Ayrıca matematik modelde hücre sentezinin maksimizasyonunun amaç fonksiyonu olarak kullanılmasının sadece üstel çoğalma fazında deneysel verilerle uyumlu hücre içi akılar sağladığı saptanmıştır. Bununla birlikte modelin tahmin ve deneysel olarak ölçülen akılar arasındaki farkların karelerinin toplamının minimizasyonuna dayalı, lineer olmayan bir algoritmanın kullanımıyla hem çoğalma hem de üretim fazlarında deneysel verilerle uyumlu hücre içi akılar elde edilmiştir (EK 1 Çizelge 1).

Choon vd. (2013) Henry vd. (2009)'nin oluşturduğu GEM'i 763 tepkimeli bir matematik modele indirgeyerek etanol üretimi için gen silmenin etkilerini incelemiştir. Song vd. (2013) *B. subtilis*'te havalandırma hızının lipaz üretimine etkilerini akı analiziyle incelemiştir. Akı analizi sonuçlarına dayanarak lipaz üretimi için en uygun oksijen aktarım stratejisi oluşturulmuştur: Fermentasyonun başında yüksek oksijen aktarımı uygulanırken, lipaz üretim fazında çözünmüş oksijen derişimi basamak etkisiyle belirli bir değere azaltılır. Oluşturulan stratejiyle lipaz aktivitesi %51 artmıştır. Zou vd. (2013) *B. megaterium* için GEM oluştururken Oh vd. (2007) ve Henry vd. (2009)'nin oluşturduğu GEM'lerdeki tepkimeleri kullanarak hücre içi tepkime sistemindeki bağlantısızlıkları gidermiştir. *B. megaterium*'un çeşitli karbon ve azot kaynaklarında çoğalıp çoğalamayacağı ve yaşaması için gerekli genler tahmin edilerek, elde edilen sonuçlarla GEM geliştirilmiştir (EK 1 Çizelge 1).

Hörl vd. (2013) 13 adi diferansiyel denklem içeren matematik modelin çözümünü yatışkın olmayan hal için topladıkları ^{13}C verileriyle gerçekleştirerek *B. subtilis*'te PEP, Oaa, ve Pyr nodlarındaki akı oranlarını tahmin etmiştir. Tepper ve Shlomi (2013) yatışkın-koşul MS/MS verilerinin akı analizinde kullanımına dayanan bir yöntem geliştirmiştir. Yöntem *B. subtilis*'e ait modellerin MS/MS verileriyle işletimleriyle akı tahmini için kullanılmıştır, standart MAA'ne göre akı tahminlerini iyileştirmiştir. Liu vd. (2014) metabolitlerin ^{13}C etiketlenme verileriyle belirlenen akı oranlarının kullanımına dayanan akı analiziyle şikimik asit üreten, genetiği değiştirilmiş iki *B. subtilis* türünün tepkime hızlarını karşılaştırarak şikimik yolizi, TCA döngüsü, PEP ve E4P dallanma noktalarındaki tepkime hızlarında önemli akı değişimleri saptamıştır (EK 1 Çizelge 1). Sonuçlara dayanarak geliştirilen mikroorganizmayla üretilen en yüksek

şikimik asit miktarı 3.46 g/L'dir. Toya vd. (2014) çoğalma ortamına glutamat eklemenin ve genomu indirgenmiş *B. subtilis* türü kullanmanın selüloz üretiminin artırdığını bulmuştur. ¹³C verilerine dayanan metabolik akı analiziyle glutamatın PFY akılarını artırdığı, genomu indirgenmiş *B. subtilis*'te glikoliz yolizi akılarının daha düşük olduğu saptanarak NADPH üretimindeki artışın selüloz üretimini artırmış olabileceği sonucuna varılmıştır (EK 1 Çizelge 1). Choon vd. (2014) oluşturdukları yeni algoritmayla gerçekleştirdikleri "Differential Bees akı analizinin (DBFBA)" literatürdeki metodlara göre performansını *E.coli*, *B.subtilis*, ve *C.thermocellum* için değerlendirmiştir.

Henry vd. (2009)'nin 1437 tepkimeyle oluşturduğu GEM'in 763 tepkimeye indirgenmiş hali kullanılarak *B.subtilis* için analiz gerçekleştirilmiştir. Çalışmalar DBFBA'nın hesaplama hızı, kararlılık, çoğalma hızı, ve istenen fenotipleri tahmin etme açısından literatürdeki metodlara göre daha iyi performans gösterdiği ortaya çıkartılmıştır. Lakshmanan vd. (2015) *B.subtilis*'in toplam NADPH üretim potansiyelini Oh vd. (2007)'nin oluşturduğu GEM ile incelemiştir. Tüm karbon kaynaklarında (glukoz, gliserol, ve zayloz) oksijenli ve oksijensiz koşullarda, merkezi karbon metabolizmasında NADP'ye bağlı enzimlerin yeterli derişimlerde olmamasından dolayı, çok düşük miktarda NADPH sentezi gerçekleştiği ortaya çıkmıştır (EK 1 Çizelge 1).

2.4.3.2 Tam tanımlı matematik modellerle gerçekleştirilen MAA çalışmaları

Tam tanımlı hücreiçi tepkime sistemi için oluşturulan matematik model ($m = n$) ile gerçekleştirilen iki metabolik akı analizi çalışması vardır (EK 1 Çizelge 2). Zhang vd.(2012) poli(γ -glutamik asit) (PGA) üreten *B. subtilis*'in çoğalma ortamına farklı oksijen vektörlerini eklemenin etkilerini incelemiştir. PGA derişim ve moleköl ağırlığının n-hekzan, n-hekzadekan, ve en çok n-heptan ile arttığı, fakat n-dodekan ile azaldığı saptanmıştır. Çoğalma ortamına n-heptan ve n-dodekan eklemenin etkileri değerlendirilmiştir. N-heptanlı ortamda çoğaltılan *B. subtilis*'in normalize glikoliz ve TCA döngüsü akıları, n-dodekanlı ortamdakilere göre daha yüksek, PFY normalize akıları n-dodekanlı ortamdakilere göre daha düşüktür. Akı analizi sonuçları n-heptanlı ortamda n-dodekanlı ortama göre ATP sentezinin ve NADH/NAD⁺ oranının artması nedeniyle PGA üretiminin arttığını göstermiştir. Zeng vd.(2014) *B. subtilis*'te sıcaklığın

poli(γ -glutamik asit) üretimine etkilerini akı analiziyle $T = 28, 37, \text{ ve } 45^\circ\text{C}$ için incelemiştir (EK 1 Çizelge 2). Akı analizi ve enzim aktivite sonuçları izositrattan 2-okzoglutarata ve 2-okzoglutarattan glutamata yönelen akılardaki artışın izositrat dehidrojenaz ve glutamat dehidrojenaz enzimlerindeki yüksek aktiviteden kaynaklandığını, ve dolayısıyla poli(γ -glutamik asit) üretiminin arttığını gösterir.

2.4.3.3 Çok tanımlı matematik modellerle gerçekleştirilen MAA çalışmaları

Çok tanımlı matematik modeller ($m > n$) ile gerçekleştirilen on akı analizi çalışması vardır. Matematik modellerin hiçbirisi genom seviye değildir. Araştırmalar EK 1 Çizelge 3'teki çizelgede yer alan bilgilerle desteklenerek özetlenmiştir. Ma vd.(2002) akı analiziyle hesaplanan yaşam katsayısının çoğalma hızıyla doğru orantılı olduğunu ve P/O oranıyla değiştiğini belirlemiştir. Westers vd.(2003) GC-MS ile belirlenen kütle dağılımları, *B. subtilis* için kurulan matematik modeli (Sauer vd. 1996), ve olasılıksal denklemleri (Fischer ve Sauer 2003) kullanarak doğal ve genomu küçültülmüş *B. subtilis*'lerin merkezi karbon yollarındaki akı oranlarını karşılaştırmıştır (EK 1 Çizelge 3). Fischer ve Sauer (2005) ^{13}C izleyicisine dayanan akı analiziyle farklı genleri silinmiş 137 *B. subtilis* türündeki akı dağılımlarını belirleyip karşılaştırmıştır. % 20 (a/a) $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ ve % 80 (a/a) $[\text{1-}^{13}\text{C}]$ ile etiketli glukoz karışımlarını içeren ortamda çoğaltılan *B. subtilis*'in hücre içi amino asitleri GC-MS ile analizlenip MATLAB'a dayalı FiatFlux yazılımıyla amino asit sinyallerinin kütle spektrumları hesaplanmıştır. Amino asitlerin kütle dağılımları onların metabolik öncülleriyle eşleştirilerek akı oranı analizi gerçekleştirilmiştir. Glikoliz ve PFY arasındaki akı paylaşımının genetik pertürbasyonlardan etkilenmediği saptanmıştır. Gen silinmelerinden etkilenmeyen glukoz-6-fosfata göre, asetil-CoA'daki akı paylaşımının esnek olduğu saptanmıştır. Ayrıca *B. subtilis*'in hücre sentezini maksimize edecek şekilde yaşamadığı gösterilmiştir. Akıların tahmini için sekiz metabolit ile kütle korunum denklemi oluşturulurken akı oranlarının kullanılmasıyla dört lineer bağımsız denklem oluşturulmuştur. Denklem sayısı bilinmeyen sayısından az olduğu için sistem çok tanımlıdır. Schilling vd. (2007) organik asitlerin (suksinat ve glutamat) *B. subtilis*'e etkilerini transkriptom ve akı analizleriyle incelemiştir (EK 1 Çizelge 3). Organik asit varlığında glukoz-6-fosfattan PFY'e yönelen akının arttığı, okzaloasetat oluşumunun

azalıp laktat sentezinin arttığı belirlenmiştir. Her iki analiz organik asitler varlığında asetil-CoA'nın TCA döngüsünde kullanılmak yerine asetata dönüştürüldüğünü gösterir. Skolpap vd. (2007) rekombinant α -amilaz ve proteaz üreten *B. subtilis* için gerçekleştirdikleri akı analizi ile amaç fonksiyonunun metabolitlere duyarlılıklarını saptamıştır. Supudomchok vd. (2008) *B. subtilis* için GEM kullanarak dört farklı biyomoleköl (serin, sistein, aspartat, ve treonin) çoğalma ortamına eklemenin etkilerini incelemiştir. Model tahminlerinin amaç fonksiyonuyla değiştiği saptanmıştır (EK 1 Çizelge 3). Tannler vd. (2008) *B. subtilis*'te *ccpN* geninin silinmesinin etkilerini GC-MS analizleriyle elde edilen ^{13}C -verilerinin kullanımına dayanan akı ve transkriptom analizleriyle incelemiştir. *ccpN* yokluğunda hücre içi akılar glikoliz yolizinden ziyade PFY'e yönelmiştir, PFY'de saptanan yüksek akı değerlerinin GapA ve GapB gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenazları ile sağlandığı belirlenmiştir. Ayrıca *ccpN* yokluğunda aspartat sentezine yönelen akının azalması nedeniyle çoğalma hızının düştüğü bulunmuştur (EK 1 Çizelge 3).

Yang vd. (2008) hücre içi akıları ^{13}C -verileriyle tahmin edebilmek için hibrit bir algoritma geliştirmiştir. *B. subtilis* için oluşturulan model geliştirilen algoritma ve ^{13}C ile etiketli suksinat ve glutamat içeren ortamda çoğaltılan *B. subtilis*'ten elde edilen deneysel veriler kullanılarak çözülmüştür, hücre içi tepkime hızları hesaplanarak değerlendirilmiştir (EK 1 Çizelge 3). Duan vd.(2010) riboflavin üreten *B. subtilis*'te glukoz-6-fosfat dehidrojenazın (G6PDH) ekspresyonunun hücre içi tepkime hızlarına etkilerini incelemiştir. *B. subtilis*'te G6PDH'nin ekspresyonu sonucunda riboflavin üretimi % 25 artmıştır. Akı analiziyle G6PDH'nin ekspresyonu sonucunda PFY akılarının arttığı saptanmıştır, bunun nedeni riboflavin sentezinde öncül olan Ru5P derişiminin artmasıdır. G6PDH'nin ekspresyonunda riboflavin sentezinin artma nedeninin yüksek Ru5P derişimi olduğu saptanmıştır (EK 1 Çizelge 3).

Li vd. (2012) *B. subtilis* için oluşturdukları modeli kullanarak izobütanol üretimini artırmak amacıyla laktat dehidrojenaz (LDH) ve piruvat dehidrojenaz (PDHC) enzimlerinin silinmesi gerektiğini tahmin etmiştir (EK 1 Çizelge 3). *B. subtilis*'te PDHC ve LDH enzimlerinin silinmesi sonucu maksimum izobütanol veriminin 2.3- katına çıkması model tahminlerinin ve deneysel sonuçların uyumlu olduğunu göstermiştir.

Chen vd.(2013) başlangıç glukoz derişiminin (80, 100, ve 120 g/L) adenozin üreten *B. subtilis*'un hücreiçi tepkime hızlarına etkilerini incelemiştir. Glukoz-6-fosfat, piruvat, ve asetil-CoA dallanma noktalarındaki akı dağılımlarının adenozin üretimini etkilediği ve glukoz derişiminden etkilendiği belirlenmiştir (EK 1 Çizelge 3).

2.5 *Bacillus subtilis* için Oluşturulan Genom Seviye Matematik Modeller

Gram-pozitif mikroorganizmalar için model olan *B. subtilis*'in 4100 protein-kodlayan gen içeren genomu (Kunst vd. 1997) on yıldan fazla bir süre için gen-enzim-tepkime bilgisiyle önemli bir kaynak olmuştur. Gen dizinlerinin belirlenmesinde kullanılan tekniklerin verimli, hızlı ve duyarlılığı yüksek olacak şekilde geliştirilmesiyle birlikte gen işlevlerinin saptanmasında kullanılan altyapılardaki ilerlemeler Barbe vd. (2009)'ni *B. subtilis* genom dizinini ve gen işlevlerini tekrar belirlemek için motive etmiştir. Bu kapsamda Barbe vd. (2009), Kunst vd. (1997)'nin hatalarını ve gen işlevlerinin yanlış saptanma olasılığını (Gilks vd. 2002) gidermek amacıyla genomu tekrar analizleyerek *B. subtilis*'te 4422 genom birimi, 4244 protein kodlayan gen saptamıştır, ayrıca 1300 tepkimeden oluşan bir tepkime sistemi ve 280 metabolik yolizi oluşturmuştur (<http://genocyc.pasteur.fr>, 2009). Barbe vd. (2009)'den dört sene sonra, Belda vd. (2013) *B. subtilis*'in genom dizin analizini güncellemiştir, genom birimi sayısı 4458'e çıkarken 1217 genin işlevi tekrar belirlenmiştir. Güncellenen genom dizini ve işlevleri *B. subtilis*'te genom büyüklüğünün 4,215,606 bp olduğunu gösterir. Ayrıca 4463 genom birimi, 4535 CDS (protein kodlayan dizin), ve 4259 hatasız CDS vardır. 4463 genom biriminin 4208'i CDS, 5'i ekzon, 51'i fCDS (CDS parçası), 88'i misc_RNA (çeşitli RNA), 1'i çeşitli birim (misc_feature), 86 tRNA geni, 30 rRNA geni içerir (Belda vd. 2013, <https://www.genoscope.cns.fr/agc/microscope/metabolism/microcyc> 2009). Belda vd. (2013) gen işlevlerini güncelleyip bu bilgileri literatürle doğrulayarak 1083 CDS ve 310 yoliziyle ilişkili 1097 tepkimeden oluşan bir tepkime sistemi oluşturmuştur (<http://microcyc.genoscope.fr/BACSU7/organism-summary> 2014), fakat model oluşturulmamış, akı analizi gerçekleştirilmemiştir.

B. subtilis için GEM oluşturma çalışmaları (Oh vd. 2007, Goelzer vd. 2008, Henry vd. 2009, Özdamar vd. 2010, Tanaka vd. 2013, Leyn vd. 2013, Hao vd. 2013) hücrenin tam

olarak tanımlanması yönünde biyokimya, genetik, biyoinformatik ve genom bilimlerindeki ilerlemelerle birlikte gelişmektedir. *Bacillus* türleri için *B. subtilis*'in biyokimyasal tepkimelerine dayanarak protein üretimi için oluşturulan, 102 metabolit ve 133 tepkime içeren ilk matematik modelden (Çalık vd. 1999) yaklaşık 10 sene sonra, Oh vd. (2007) *B. subtilis* için ilk GEM'i oluşturmuştur. Model Kunst vd. (1997)'nin genom anotasyonu, yani gen-enzim-tepkime bilgisi ve biyokimyasal bilgileri temelinde oluşturulmuştur, doğrulama süreciyle geliştirilmiştir. *B. subtilis* genomunun %19'unu içeren, bir başka deyişle 844 ORF ile ilişkili 1020 tepkime içeren modelde tepkimelerin %89'u genlerle ilişkilidir. Oh vd. (2007) oluşturdukları genom seviye modeli iki veri grubuyla doğrulamıştır. Her iki veri grubuyla hesaplama ve değerlendirmelerdeki temel varsayımlar, hücre sentez tepkimesinin amaç fonksyonu seçilerek maksimize edilmesi ve canlılık için en küçük çoğalma hızının 10^{-8} st^{-1} seçilmesidir. *B. subtilis*'in çoğalma açısından, en iyinin altında performans sergilediği gösterildiği için (Fischer ve Sauer, 2005) amaç fonksyonunun maksimize edilmesi hücrenin en yüksek hızda çoğaldığı koşullar için doğru olabilir. Doğrulama sürecinin ilk aşamasında Oh vd.(2007) çeşitli karbon, azot, fosfor, ve kükürt kaynaklarında *B.subtilis*'in çoğalıp çoğalmadığını deneysel olarak belirlemiştir. Ardından GEM ile farklı substratlarda çoğalma hızı hesaplanmıştır, elde edilen sonuçlar deneysel sonuçlarla kıyaslanmıştır. GEM ile farklı substratlarda çoğalma hızı hesaplanırken substrat tüketim hızı $5 \text{ mmol}/(\text{g}_{\text{KH}} \text{ st})$ varsayılmıştır. Varsayımın sonuçları etkileyeceği çalışmada vurgulanmıştır. Oksijenin taşınım hızı $1 \times 10^6 - 0 \text{ mmol}/(\text{g}_{\text{KH}} \text{ st})$ aralığındadır. Test edilen substratlar dışındaki diğer hücre dışı metabolitlerin taşınım hızları $0 - 1 \times 10^6 \text{ mmol}/(\text{g}_{\text{KH}} \text{ st})$ aralığında varsayılmıştır. Oh vd.(2007) GEM'e 53 taşıyıcı protein ve tepkimelerini ekleyerek, farklı substratlarda çoğalmaya dayalı model tahminlerinin doğruluğunu geliştirmiştir. Doğrulamanın ikinci aşamasında *B. subtilis*'in yaşaması için gerekli gen bilgisi (Kobayashi vd. 2003) kullanılmıştır. Oh vd.(2007) maya özütü ve triptona dayalı LB ortamı varsayarak LB ortamında gen silmenin çoğalmaya etkilerini GEM ile tahmin etmiştir. Modelin doğruluğu substrat tüketim verileri için %74, gen silme verileri için % 94 bulunmuştur.

Goelzer vd. (2008) *B. subtilis* merkezi karbon metabolizması için hücre içi tepkime sisteminin ve kontrol ağının birleştirildiği bir GEM oluşturmuştur. Literatür ve veri tabanları kullanılarak oluşturulan GEM'de 563 tepkime, 65 transkripsiyon faktörü, 9

sigma faktörü, transkripsiyon ve translasyon seviyesinde 21 genetik regülasyon vardır. Goelzer vd.(2008) GEM doğrulama sürecinde LB ve minimal ortamda gen silmenin, karbon ve azot kaynaklarının çoğalma üzerindeki etkilerini tahmin ederek sonuçları Kobayashi vd.(2003), Fisher ve Sauer (2005), ve Oh vd. (2007)'nin sonuçlarıyla karşılaştırmıştır. Goelzer vd.(2008)'nin doğrulamadaki temel varsayımı LB ortam bileşimidir. Bununla birlikte işlev ve kontrol mekanizması bilinmeyen genlerin transkripsiyonlarının sürekli olduğu varsayılmıştır. Minimal ortamda gen silmenin etkileri % 98 doğrulukla tahmin edilmiştir. Henry vd. (2009) SEED veritabanına dayanan genom anotasyonu ile iBsu1103'ü oluşturmuştur. iBsu1103'te 1,103 genle ilişkili 1,437 tepkime vardır. Oh vd.(2007)'e göre genomun daha büyük bir kısmını, yani 25%'ini içeren iBsu1103'te tepkimelerin 88%'i genlerle ilişkilidir. Oh vd.(2007) ve Henry vd.(2009)'de 810 tepkime ile 997 gen-protein-tepkime ilişkisi aynıdır. iBsu1103'te 1,403 tepkimenin Gibbs serbest enerji değişimleri grup katkı yöntemiyle tahmin edilerek hesaplanmıştır, tepkimelerin tersinir olup olmamaları varsayımlarla belirlenmiştir. iBsu1103'te *B.subtilis*'in çoğalmayı maksimize edecek şekilde yaşadığı, minimum ve maksimum metabolit aktivitelerinin 0.01 ve 20 mM olduğu, tüm ABC taşıyıcı tepkimelerinin tersinmez olduğu, metabolit aktivitelerinin 1mM varsayılarak hesaplandığı milimolar Gibbs serbest enerji değişimlerinin (-2, +2) kcal/mol aralığında olma durumunda tepkimelerin tersinir olduğu, LB ortam bileşimi varsayılmıştır. iBsu1103 ile gen silmenin, farklı substratların, ve gen aralığı silmenin çoğalmaya etkileri, sırasıyla, Kobayashi vd. (2003), Oh vd. (2007), ve Morimoto vd. (2008)'nin verileriyle değerlendirilmiştir. iBsu1103'nin doğruluğu Oh vd.(2007)'den daha yüksektir.

Barbe vd. (2009) tarafından güncellenen *B. subtilis* genom dizini ve ardından gerçekleşen genom anotasyonu güncelleme çalışmaları GEM oluşturma çalışmalarına yön vermiştir. İlk çalışmada, Tanaka vd.(2013) iBsu1103 (Henry vd.2009)'e dayanan iBsu1103V2'yi oluşturmuştur: iBsu1103V2 iBsu1103'e benzer şekilde 1103 genle ilişkili 1451 tepkime, yani genomun % 25'ini kapsar. iBsu1103V2 iBsu1103'e göre 79 değişim içerir. Bu değişimler gen-protein-tepkime ilişkisindeki 33 değişim, hücre çoğalma tepkimesinde değişim, iki yeni metabolit, 16 yeni tepkime, iki tepkimenin silinmesi, dokuz tepkimenin yönünün değişmesi, dört tepkimenin tersinirliğinin

değişmesi, ve çoğalma ortamı bileşimiyle ilgili 12 değişimdir. *iBsu1103V2*'nin 65 tepkimesi Barbe vd.(2009)'ne dayanır. *iBsu1103V2*'nin temel varsayımları *B. subtilis*'in çoğalmayı maksimize edecek şekilde yaşaması ve LB ortam bileşimidir. *iBsu1103V2* doğrulanırken Kobayashi vd. (2003), Oh vd. (2007), Morimoto vd. (2008)'nin verilerini kullanmanın yanı sıra *B. subtilis* kromozom bölgelerini silmeye dayalı deney sonuçları (Tanaka vd. 2013) kullanılmıştır. *iBsu1103V2* gen ve gen aralığını silmenin etkilerini doğru tahmin etme gücü açısından *iBsu1103*'ten üstündür. Bu arada Leyn vd.(2013) *B. subtilis* 168 and on *Bacillus* türü için genom seviye transkripsiyonel kontrol ağı oluşturmuştur. *B. subtilis* transkripsiyonel kontrol ağı 129 transkripsiyon faktörünün etkilediği 953 gen ve 24 RNA'nın hedeflediği 140 operon içerir. Hao vd. (2013) 1147 gen ve 1742 tepkime içeren *iBsu1147*'yi *iBsu1103* (Henry vd. 2009)'e dayanarak oluşturmuştur. *iBsu1147*'deki 1424 tepkime *iBsu1103* tepkimeleriyle aynıdır. *iBsu1103*'deki 12 tepkime *iBsu1147*'ye güncellenerek eklenirken, bir *iBsu1103* tepkimesi *iBsu1147*'ye eklenmemiştir. *iBsu1147*'nin 64 tepkimesi, yani tepkimelerin %4'ü Barbe vd. (2009)'nin genom anotasyon bilgisini içerir. Temel varsayımlar yaşam enerjisinin 5.85 mmol/(g_{KH} st) olması, LB ortamı bileşimi ve oksijen taşınım hızının en düşük değerinin 1000 mmol/(g_{KH} st) seçilmesidir. Hao vd. (2009) *iBsu1147*'yi farklı karbon kaynaklarında çoğalma verileriyle (Dauner vd. 2002, Dauner ve Sauer 2001), tek gen silme verileriyle, ve Morimoto vd.(2008)'nin yaşam için gereksiz gen bölgelerini silme verileriyle doğrulamıştır. Doğrulama sırasında, hücre sentez tepkimesi amaç fonksyonu olarak seçilmiştir. *iBsu1147* farklı karbon kaynaklarındaki çoğalma verileriyle doğrulanırken yaşam enerjisi 9.9 mmol/(g_{KH} st)'a ayarlanmıştır. Tek gen silmenin etkileri çoğalmanın LB ortamında gerçekleşmesiyle tahmin edilmiştir. Morimoto vd. (2008)'nin sildiği, SubtiList veritabanına dayanan, yaşam için gereksiz 910 genden 124'ü *iBsu1147*'de vardır (Hao vd. 2009). Hao vd. (2009) hücre sentez tepkimesini amaç fonksyonu seçerek, glukoz tüketim hızını 1.8 mmol/(g_{KH} st) alarak yaşam için gereksiz genleri silmenin etkilerini incelemiştir. Michna vd.(2014) *B. subtilis* için vazgeçilemez olduğu belirtilen 36 genin vazgeçilebilir olduğunu saptamıştır. Ayrıca *B.subtilis*'in hücre verimini maksimize etmeden yaşadığı deneysel olarak gösterilmiştir (Fischer ve Sauer 2005). Dolayısıyla literatürdeki GEM'lerin doğrulukları şüphelidir ve geliştirilmelidir.

2.6 Mikrodizin Analizi

Genom dizini ve işlevlerinin anlaşılmasına dayanan genom biliminin üç ayağı vardır: proteom, metabolom, ve transkriptom analizi (Kuipers 1999). Bir hücrenin proteomu, metabolomu, ve transkriptomu sırasıyla o hücrenin genomunun sentezlediği tüm proteinler, tüm metabolitler, ve ekspres ettiği tüm mRNA'lardır. Hücre-içinde protein oluşurken ilk olarak o proteinin sentezinden sorumlu genden transkripsiyonla mRNA, mRNA'dan translasyon mekanizmasıyla protein sentezlenir (Glick ve Pasternak 2003). Transkriptom, proteom, ve metabolom araştırmalarının birleştirilmesi hücrenin moleküler düzeyde kapsamlı ve derinlemesine anlaşılmasını sağlar. Genom bilimi aracılığıyla metabolik mühendislik için kullanılabilecek değerli bilgiler üretilebilir. Bu bilgiler hücrelerin hedef molekülleri istenen verim ve seçicilikte üretmeleri için çok faydalı olacaktır (Kuipers 1999, Brul vd. 2002).

Genotipin araştırılması, genom haritasının oluşturulması, ve dizin analizinin yanı sıra mRNA miktarının yarı-sayısal hesaplanmasında kullanılan gen çipleri (Dharmadi ve Gonzalez 2004, Winzeler vd.1999) ile gerçekleştirilen transkriptom analizleriyle oluşturulan hipotezler biyokimyasal, fizyolojik, ve genetik çalışmalarla doğrulanmalıdır (Ye vd. 2000). Mikrodizin analizleri hipotezlerin test edilmesi, metabolik yollarının aydınlatılması, birlikte kontrol edilen veya üretimle ilişkili genlerin belirlenmesi (Conway ve Schoolnik 2003, Ye vd. 2000), karşılaştırmalı gen ekspresyonu çalışmaları (Kumar vd. 2005), gen ekspresyonlarının çevresel ve genetik etkilerle değişimlerinin bulunması (Conway ve Schoolnik 2003, Dharmadi ve Gonzalez 2004), ve işlevi bilinmeyen genlerle ilgili bilgilerin geliştirilmesinde (Ye vd. 2001) kullanılır. Benzer ekspresyon profiline sahip genler fonksyonları bilinmeyen genlerle ilgili bilgileri artırabilir (Kuipers 1999).

DNA mikroarrayleri bir hücrenin tüm genlerinin transkripsiyonlarını aynı anda analiz ederler (Kuipers 1999). Bir cm^2 'lik bir alana bir hücrenin tüm genlerinin sıdırıldığı gen çipleri binlerce DNA noktasından oluşan küçük, camdan yapılmış karelerdir (Kumar vd. 2005). Gen çiplerinde dolgu maddesi olarak silika, cam malzemeler veya membran kullanılır (Kumar vd.2005). Cam malzemeler aminosilan ve poli-L-lizinle etkileşime

sokulur ve nükleik asitlerin onlara bağlanması sağlanır (Kumar vd. 2005). Dolayısıyla gen çipleri özel olarak hazırlanmış cam malzemelerin belirli yerlerinde sentezlenmiş veya belirli yerlerine bağlanmış nükleik asit molekülleri içerirler. Bu nükleik asitler PCR ürünleri veya oligonükleotit olabilir. Örneklerden elde edilen mRNA'lar komplementer DNA (cDNA)'ya dönüştürülüp floresanla boyanırlar. Floresanla boyalı veya etiketli cDNA molekülleri gen çiplerinde nükleik asit içeren noktalara Watson-Crick baz eşleşmesi temelinde hidrojen bağları ile bağlanır. Örnekteki hedef dizinin miktarı ona tamamlayıcı olan gen çipi probunun fiziksel konumundaki sinyal yoğunluğunun ölçümüyle tahmin edilir. Gen çipleriyle tüm genomun analizini aynı anda yapmak mümkündür. DNA ve oligonükleotit olmak üzere iki çeşit gençipi vardır. DNA gençipi bir cam malzemeye tutturulmuş plazmit klonları veya DNA parçalarını içerir. Bu tip gen çiplerinde santimetre kare başına 100 probdan daha fazla nükleik asit vardır. Gen çipleri gözenekli nitroselüloz veya naylon membranlar üzerinde üretilirler (Winzeler vd.1999). DNA (cDNA) gen çiplerini oluşturmak için genellikle 500-2000 baz büyüklüğündeki nükleik asit problemleri kullanılır. Bu problemler PCR ürünleri ya da DNA parçalarıdır. PCR ürünleri naylon veya camdan oluşan katı bir matrisin üzerindeki tanımlı yerlere, robotik mikrosplotting cihazının kullanımıyla yerleştirilir (Winzeler vd.1999, Murphy 2002). Naylon gen çipi kullanmanın avantajı naylon membranların dört veya beş kere kullanılabilmesidir. Camdan yapılma gen çiplerinin temel avantajı camın düşük floresansı nedeniyle arka plan hatasının az olmasıdır. Hem cam hem de membran matrislerde her çip elemanı birkaç nanolitre PCR ürününün çipin ilgili noktalarına bırakılmasıyla oluşur. Robotik spotting cihazı kapiller hareketle PCR ürünlerini (0.2 µl) bir tabaktan çeker ve gen çiplerinin özel yerlerine bırakır. Her bir nokta yaklaşık 100 µm çapındadır (Murphy 2002). PCR ürünleri gen çipleri üzerine bırakıldıktan sonra yüzeye kovalent bağlarla sabitlenir ve denatüre edilirler. Oligonükleotit gen çipleri 50 bazdan kısa olan ve dizinleri bilinen nükleik asit parçalarından oluşur. Bu nükleik asitler cam yüzeyin belirli noktalarına kovalent bağlarla tutturulur (Winzeler vd.1999).

Mikrodizin deneylerinde ilk adım hücreden toplam RNA'nın izolasyonudur (Dharmadi ve Gonzalez 2004). Daha sonra örnekten elde edilen RNA ters transkripsiyonla cDNA'ya çevrilir (Winzeler vd.1999, Murphy 2002). cDNA ters transkripsiyon

sırasında ya da sonrasında etiketlenir. Sıkça kullanılan etiketleme biçimleri Cy3, Cy5 gibi floroforların kullanımı, biyotin/enzim tespiti, ve radyoetikettir (Dharmadi ve Gonzalez 2004). cDNA florosanla boyandıktan sonra etiketlenmiş hedef gen çipine enjekte edilir (Winzeler vd.1999). Böylece hedefle gen çipi probu arasında Watson-Crick baz eşleşmesine dayanan hibridizasyon gerçekleşir: birbirine tamamlayan bazlar arasında hidrojen bağları oluşur (Murphy 2002). Probla hedef arasındaki hibridizasyon miktarı örnekteki belirli bir dizinin miktarının sayısal bir ölçüsüdür (Murphy 2002). Hibridizasyon 2-20 saat sürer. Oligonükleotitlerin hibridizasyonu 42-50°C arasında, DNA gen çiplerinin hibridizasyonu 55-70°C arasında gerçekleştirilir (Winzeler vd.1999). Hibridizasyon için hedef derişimi, sıcaklık, tampon çözelti, ve tuz derişimi gibi parametrelerin optimizasyonu gereklidir (Kumar vd.2005). Daha sonra gen çipleri bağlanmamış moleküllerin giderilmesi için yıkanır. Gen çipinin her bir noktasına ne kadar nükleik asitin bağlandığını belirlemek amacıyla gen çipleri lazerle taranır ve açığa çıkan florosan miktarı kaydedilir (Winzeler vd.1999, Murphy 2002). Gen çipinin her bir noktasında açığa çıkan florosan ışığının yoğunluğu gen çipinin yüzeyini tarayan bir mikroskopla belirlenerek kaydedilir. Taranan görüntü analiz edilir ve hibridizasyon miktarı tespit edilir (Winzeler vd.1999).

Gen çiplerinden toplanan görüntü verilerine uygulanan ilk analiz arka plan görüntüsünün giderilmesi, filtrasyon ve normalizasyondur. Tüm bu basamaklar çipler arasındaki sistematik varyasyonun yok edilmesine katkıda bulunurken grupların karşılaştırılmasını sağlar (Murphy 2002).

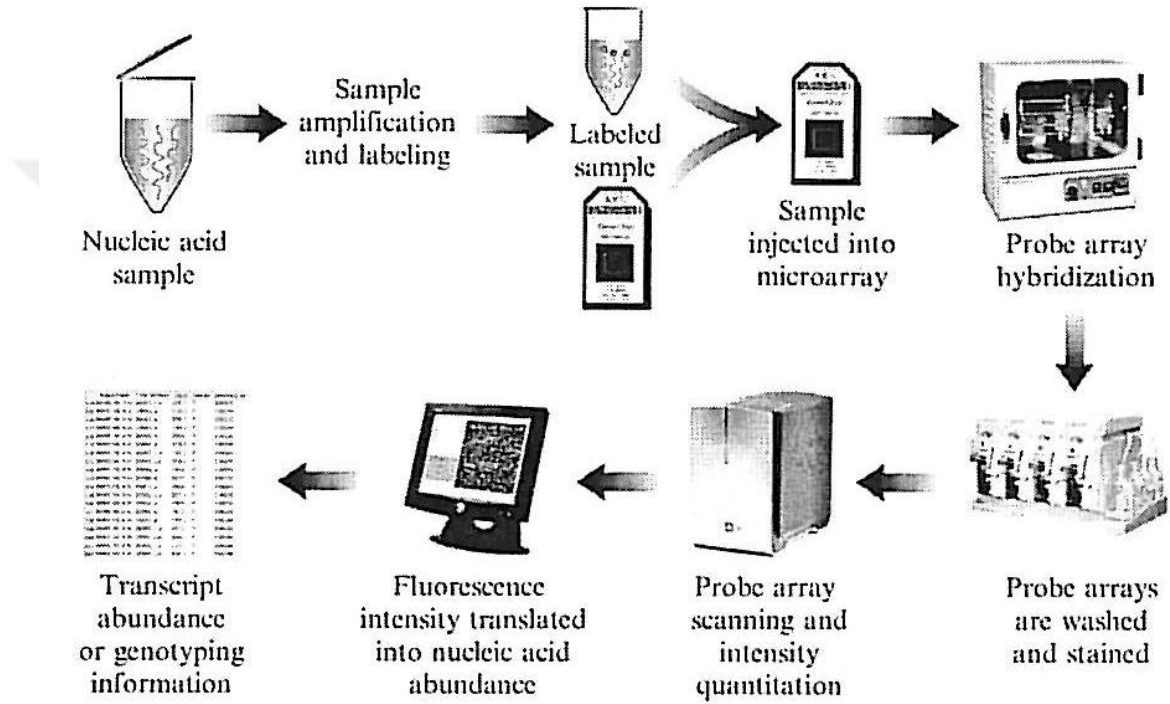
Gen çipleri lazerle taranınca iki çeşit kaynaktan görüntü yoğunluğu açığa çıkar: 1) gen çiplerine bağlanmış mRNA'nın görüntüsü, 2) nükleik asit içermeyen alanın görüntüsü. Görüntüleme yazılımı sayesinde ortalama bir arka plan görüntü şiddeti hesaplanır. Farklı gen çiplerinden elde edilen ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılabilmesi için tüm gen çiplerinin verileri normalize edilmelidir. Normalizasyon farklı gen çiplerinin standart bir yoğunluk değere göre karşılaştırılmasını içerir. Bu değer gen çipinin tüm görüntü yoğunluğu, gen çipindeki tüm genlerin yoğunluğu, veya ekspresyonu sabit olan genlerin görüntü yoğunluğu olabilir. Verilerin logaritması alınarak ekspresyon değerlerinin dağılım karakteristiği iyileştirilebilir. Gen çipi verilerinin istatistiksel olarak

analizlenmesi gerekir (Murphy 2002). Verilerdeki değişkenlik ve hatalar yok edildikten sonra genlerin birbirine göre miktarları elde edilebilir (Dharmadi ve Gonzalez 2004).

Bir mikrodizin deneyi güvenilir sonuçlar elde etmek amacıyla hem biyolojik hem de teknik kopyalar içermelidir. Biyolojik kopyalar sonuçlardaki varyasyonun örneklerin geldiği populasyondan kaynaklandığını belirler. mRNA ekspresyonundaki değişimleri açığa çıkartmak için en az üç kopya örneğın kullanılması önerilir. Teknik kopyalar ölçümlerin doğruluğunu artırır (Dharmadi ve Gonzalez 2004). Mikrodizin teknolojisindeki istatistiksel sorunlar nedeniyle sonuçların doğruluğunun bağımsız, farklı bir metodla sınanması gerekir. Mikrodizin analiz sonuçlarının doğrulanmasında pahalı bir metod olan sayısal gerçek zamanlı PCR kullanılabilir. Oligonükleotit gen çipleri alanındaki endüstriyel lider Affymetrix Şirketi'dir, binlerce oligonükleotidi cam yüzeylerde taşıyan gen çipleri üretir. 5 µg toplam RNA'nın biyotinlenmiş parçalarıyla (35-200 baz) gen çiplerinin hibridizasyonu Affymetrix Fluidics sistemiyle gerçekleşir. Hibritlenen prob streptavidin-phycoerythrin konjugasyonu ile teşhis edilir ve floresan görüntü Affymetrix Mikroarray okuyucu ile elde edilir (Murphy 2002).

Affymetrix gen çipleri ile ekspresyonların analizi birçok teknoloji ürününün bir arada kullanılmasıyla gerçekleşir. Bir mikrodizin deneyinde kullanılanlar gen çipleri, standardize edilmiş deneyler, kimyasallar, fluidiks sistemi, hibridizasyon ocağı, tarayıcı, ve veri analiz araçlarıdır. Tüm cihazlar birlikte çalıştırılmak üzere tasarlanmıştır ve hibridizasyon ocağı dışındaki tüm cihazlar GeneChip'i çalıştıran yazılımla yönetilir. En fazla 64 gen çipi alabilen hibridizasyon ocağı hibridizasyon için gerekli olan sürekli döngüyü ve uygun sıcaklığı sağlar. Hibridizasyondan sonra gen çipleri mikroarray fluidics istasyonuna taşınır. Fluidics istasyonu veri tutarlılığını ve tekrarlanabilirliğini çok etkileyen yıkama ve boyama (etiketleme) işlemlerini gerçekleştirir. Fluidics istasyonu aynı anda dört gen çipini yıkayıp boyayabilir (Dalma-Weiszhausz vd.2006). Gen çipine tutunmayan nükleik asitler düşük ve yüksek şiddetteki yıkamaların birleşimiyle gen çiplerinden giderilir. Yıkamanın şiddeti tampon çözeltinin tuz derişimi, sıcaklığı, ve yıkama süresiyle fluidics istasyonu tarafından kontrol edilir. Diğer aşamada, hedef moleküller floresanlı SAPE (streptavidin-fikoritrin) ile boyanır. Fluidics istasyonu GCOS yazılımını kullanan bir bilgisayarla kontrol edilir. Tarayıcı gen çipine

hibritleşmiş nükleik asitlere bağlı floroforları harekete geçiren bir lazer kullanan mikroskoptur. Tarayıcı 65000 farklı florosan yoğunluğunu çözebilir. Tarama işlemi sırasında, toplanan florosan değerleri elektronik sinyallere, onlar da sayısal değerlere dönüştürülür. Bu değerler görüntü veri dosyası (.dat file) olarak kaydedilir (Dalma-Weiszhausz vd.2006). Affymetrix mikrodizin deneyinin akım şeması şekil 2.12’de gösterilmiştir.



Şekil 2.12 Affymetrix mikrodizin deneyinin akım şeması (Dalma-Weiszhausz vd.2006)

2.7 *Bacillus subtilis*'te Mikrodizin Analizi

Literatürde *B. subtilis* ile ilgili yapılan mikrodizin çalışmaları EK 2 Çizelge 1-7’de özetlenmiştir. *B. subtilis* ile biyomoleküllerin endüstriyel üretimleri için substrat tüketim hızından başlayarak, çoğalma hızı, ürün ve yan-ürün dağılımlarını, hücre-içi tepkime hızlarını etkileyen oksijen aktarımı, pH-işletim koşulu gibi biyoreaktör işletim parametrelerinin gen ekspresyonuna etkileri önemlidir, ancak ilaç sanayi için önemli olan rekombinant proteinlerin üretimlerinde araştırılmamıştır. Oksijen aktarımıyla ilgili olarak Yu vd. (2011) adenozin üreten *B.subtilis*'te çözünmüş oksijen derişiminin

etkilerini iki oksijen aktarım koşulunu karşılaştırarak transkriptom analiziyle incelemiştir (EK 2 Çizelge 3) Analiz sonucunda adenzin üretiminin düşük oksijen derişiminde zantın degradasyonunun baskılanması nedeniyle arttığı sonucuna varılmıştır. Eklerde *B.subtilis*'le yapılan mikrodizin analizlerinin teması, çoğalma ortamı, biyoreaktör işletim koşulları, RNA izolasyon metodu, üstel veya durgunluk fazında analizlenen veri sayısı, karşılaştırılan genotipler, ekspresyon oranları, etkisi incelenen genler ve etkileri verilmiştir. *B.subtilis*'le yapılan mikrodizin çalışmaları temalarına göre yedi bölüme ayrılıp incelenmiştir: **1)** Gen silinmesi/eklenmesinin etkileri, **2)** Yabancı genlerin ekspresyonlarının etkileri, **3)** Oksijenli ve oksijensiz çoğalmanın karşılaştırılması, **4)** Sıcaklığın etkileri, **5)** Taşınan moleküllerin etkileri, **6)** Kısıtlılık ve stresin etkileri, **7)** Diğer çalışmalar (EK 2 Çizelge 1-7).

2.7.1 Gen silinmesi/eklenmesinin etkileri

Fawcett vd. (2000) doğal *B. subtilis* ile sporlanma transkripsiyon faktörü (*spo0A*, σ^F) mutantlarının transkripsiyon profillerini karşılaştırmıştır. Sporlanma sırasında *spo0A*'dan etkilenen genlerin genomun % 10'undan fazla olduğu saptanmıştır. *yabP*, *yabQ* genlerinin sporlanma için gerekli olduğu bulunmuştur. Molle vd. (2003) ise Spo0A'nın 121 geni doğrudan etkilediğini saptamıştır. *B.subtilis*'te sensör kinaz-cevap regülatöründen oluşan çift bileşenli sinyal iletim sistemleri altı çalışmada incelenmiştir: Ogura vd. (2001) DegS-DegU, ComP-ComA, ve PhoR-PhoP çift bileşenli sensör-regülatör sistemlerindeki DegU, ComA ve PhoP'nin etkiledikleri genleri araştırmıştır. Analizlenen her regülatör için, sensör kinaz geni bozulmuş *B.subtilis*'e IPTG'yle aktif hale gelen, regülatör geni taşıyan plasmid eklenmiştir. Böylece sinyal iletimi yok edilerek hedef genler belirlenmiştir (EK 2 Çizelge 1). Aynı stratejiyle Kobayashi vd. (2001) 24 çift bileşenli sistemi, Ogura vd. (2001)'ne göre düşük bir ekspresyon oranıyla incelemiştir (EK 2 Çizelge 1). Sonuçlar YdbG-YdbF'nin kemotaksisle, YufL-YufM'nin yabancı DNA'nın hücreiçine alımıyla ilgili, YvrG -YvrH'nin hücre zarıyla ilgili olabileceğini göstermektedir. Ardından, Ogura ve Tanaka (2002) DegS-DegU, ComP-ComA, PhoR-PhoP, ResE-ResD, YycF-YycG, DesK-DesR, DctS-DctR, CsxS-CsxR, CitS-CitT, YclJ-YclK, LytS-LytT'yi içeren *B. subtilis* çift bileşenli sistemlerini kapsamlı bir şekilde incelemiştir. Howell vd. (2003) YycF-YycG'nin kontrol ettiği

genlerden on tanesinin hücre zarı metabolizması ve protein senteziyle ilgili olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, *yocH* ekspresyonunun YycF ile arttığı, saflaştırılmış YycF'nin *yocH*'ye doğrudan bağlandığı belirlenmiştir. Son olarak Serizawa vd. (2005) Yvr-GHb sisteminin yedi transkripsiyonel birimin (*wprA*, *wapA-yxxG*, *dltABCDE*, *sunA*, *sunT-bdbA-yolJ-bdbB*, *yvrI-yvrHa*, *sigX-rsiX*) ekspresyonunu artırdığını ve *lytABC* operonunu baskıladığını bulmuştur. Ayrıca Yvr-GHb'nin görevinin hücre yüzeyini korumak ve *lytABC* operonunun negatif regülasyonu ile hücre parçalanmasını engellemek olduğu bulunmuştur. Comella ve Grossman (2005) ComP tarafından ekspresyonu doğrudan artan tek transkripsiyon faktörünün ComA olduğunu ve ComP kinazının ComX sinyal molekülü için tek reseptör olduğunu belirlemiştir.

Moreno vd. (2001) doğal ve *ccpA* mutantı mikroorganizmalarla mikrodizin analizi yaparak CcpA ve glukoz kontrolündeki genleri belirlemiştir. Glukozdan etkilenen genlerin % 80'inin CcpA ile kontrol edildiği belirlenmiştir. Aynı genlerin silindiği, benzer mikroorganizmalarla çalışan Yoshida vd. (2001) glukozun baskıladığı IolA, I, S, PckA'nın *ccpA* geninin kontrolü dışında olduğunu belirlemiştir (EK 2 Çizelge 1). Ayrıca glukozun baskıladığı, 22'si CcpA'den kısmi bağımsız olan toplam 66 gen saptanmıştır. Bu sonuçlar Moreno vd. (2001)'den farklıdır. Çünkü çoğalma ortamı, RNA izolasyon tekniği ve mikrodizin analiz tekniği farklıdır. Blencke vd. (2003) ise CcpA'nın ikincil karbon kaynaklarının tüketimiyle ilgili genleri doğrudan baskıladığını ve glukoz varlığında glikoliz yoliz enzimlerinin ekspresyonlarını artırdığını saptamıştır (EK 2 Çizelge 1). Lorca vd. (2005) CcpA'dan etkilenen genlerin tamamen HprK kontrolü ve kısmen HPr(Ser-P) kontrolü altında olduklarını belirlemiştir. Ayrıca azot, fosfor metabolizması, ve strese karşı cevapla ilgili genlerin CcpA'ya bağlı olarak glukoz kontrolü altında oldukları belirlenmiştir. Lulko vd. (2007) CcpA'nın esas olarak karbonhidrat ve enerji metabolizmasını etkilediğini, durgunluk fazına geçişte nükleotit metabolizması, hareketlilik, ve protein sentezini etkilediğini belirlemiştir. Detert vd.(2015) CcpA'nın üç amino asitin her birine mutasyon yapılmış üç *B. subtilis* mutantı, doğal, ve *ccpA* *B. subtilis* türlerinin karşılaştırmalı transkriptom analiziyle CcpA'nın bağlanma bölgelerini aydınlatmıştır. Mutasyona uğramış CcpA'lar incelendiğinde CcpA-M17R karbon baskılamasını azaltıp daha az geni kontrol ederken,

CcpA T62H daha güçlü bir baskılayıcıdır, CcpA-R304W HPr-Ser46-P'ye daha az bağımlıdır.

Caldwell vd. (2001) ScoC'nin amino asit, karbonhidrat, nükleotit metabolizmaları, hareket, sporlanma, taşınım ve adaptasyonla ilgili süreçleri etkilediğini belirlemiştir. Kompetans, mikroorganizmanın hücre dışından hücre içine DNA aktarım yeteneğidir. *B.subtilis*'te kompetansı kontrol eden temel proteinler ComK ve MecA'dır (Dubnau vd. 1990, Kong vd. 1993, van Sinderen vd. 1994). Berka vd. (2002) ComK tarafından kontrol edilen genleri, hem doğal mikroorganizma hem de *comK*, *comK mecA* mutantlarıyla araştırmıştır (EK 2 Çizelge 1). Ogura vd. (2002) üç tekrar deneyi sonucunda ortak 32 genin ComK'dan etkilendiğini saptamıştır. Bu genlerden 16'sının ComK'dan etkilenmesi, *lacZ*-gen birleştirme deneyleriyle doğrulanmıştır. ComK'dan etkilenen genlerden sadece *smf* silindiğinde transformasyon etkinliği düşmüştür. Berka vd.(2002)'nin çalışması, kullanılan mikroorganizma sayısı açısından Ogura vd. (2002)'den daha kapsamlıdır (EK 2 Çizelge 1). Hamoen vd. (2002) Berka vd. (2002) ve Ogura vd. (2002)'nin aksine farklı çoğalma koşulları, mikroorganizmalar ve analiz koşulları kullanarak ComK ile ekspresyonu artan genleri saptamıştır.

Gaballa vd. (2002) *zur* yokluğunda on genin ekspresyonunun değiştiğini saptamıştır. Genetik deneyler YciA, YciB, YciC'nin hücre içine metal iyonu aktarımıyla ilgili olabileceğini göstermiştir (EK 2 Çizelge 1). Eymann vd.(2002) ise norvalin stresi altında, *relA*'nın transkriptoma etkilerini incelemiştir (EK 2 Çizelge 1). *degU32(Hy)* mutasyonu DegU'nun fosforlanmış formunu (DegU-P) kararlı hale getirerek hücre dışına salgılanan parçalayıcı enzimlerin üretimini artırır. Bu durumda ayrıca doğal kompetans, bakteriyel kamçı sentezi kaybolur, hareket azalır ve glukozla sporlanma etkinliği artar (Kunst vd. 1974, Dahl vd. 1992). Mader vd. (2002) *degU32(Hy)* mutasyonu sonucunda üstel çoğalma fazında 32, durgunluk fazında ise 14 genin ekspresyonlarının değiştiğini saptamıştır. Transkriptom sonuçları proteom analiziyle desteklenerek bazı genlerin mRNA'larının kararsız olabileceği ve translasyon sonrası hücre içi kontrollerin varlığı sonucuna varılmıştır (EK 2 Çizelge 1). Kobayashi (2007) DegU'nun üstel ve durgunluk fazında kontrol ettiği genleri incelemiştir. DegU'nun üstel çoğalma fazında kamçı proteinleri, durgunluk fazında ise biyofilm oluşumuyla ilgili

genlerin ekspresyonlarını artırdığı bildirilmiştir (EK 2 Çizelge 1). Condon vd. (2002) RNaz M5'i kodlayan *rnmV*'nin *B.subtilis*'te az sayıda genin ekspresyonunu değiştirdiğini bildirmiştir. Mikrodizin sonuçları Northern Blot analiziyle doğrulanmıştır. Baichoo vd. (2002) Fur proteininin ribozomal proteinleri kodlayan genlerin ekspresyonlarını artırırken, likenan tüketimi için gerekli enzimleri kodlayan *lic* operonunu baskıladığını saptamıştır.

B.subtilis'te sigma faktörlerinin transkriptoma etkileriyle ilgili 11 çalışma gerçekleştirilmiştir: Cao vd. (2002) σ^w 'nin hücre duvarı sentezine zarar veren maddelere karşı hücreyi koruyan genleri etkilediğini göstermiştir. Britton vd. (2002) araştırma programının ilk aşamasında SigH yokluğunun, ikinci aşamasında *sigH* overekspresyonunun etkilerini incelemiştir. SigH yokluğunda genomun %10'unun, *sigH* overekspresyonunda ise 160 genin etkilendiği saptanmıştır. Asai vd. (2003) sigma faktörlerinin (SigM, SigV, SigW, SigX, SigY, SigZ ve YlaC) etkilediği 278 geni belirlemiştir. Eichenberger vd.(2003) sporlanmayla görevli σ^F kontrolundeki 253 geni mikrodizin analiziyle saptamıştır (EK 2 Çizelge 1). Mikrodizin sonuçlarını doğrulamak amacıyla σ^F kontrolundeki 253 genden 98'iyle ilgili genlerin olmadığı mutantlar oluşturulmuştur. 98 mutanttan 12 adetinde spor oluşumunda bozukluk saptanmıştır. Feucht vd. (2003) σ^F regülönunu incelemiştir. *yhaL*, *yhbH*, *yjaV*, *yqfD*'yi silmenin sporlanmada hasarlara yol açtığı saptanmıştır. σ^F 'nin açlığa karşı adaptasyon, spor ve korteks oluşumuyla ilgili genleri kontrol ettiği bildirilmiştir. Allenby vd.(2004) *pst* ekspresyonunun fosfat açlığında arttığını mikrodizin analiziyle doğrulamıştır. *phoR* ve *sigB* mutantlarında *pst* operonunun ekspresyonları doğal mikroorganizmaya göre artmamış ve değişmemiştir. Sonuçlar Northern Blot, *lacZ* haber verici gen deneyleriyle sınanmıştır. SigB ve PhoR proteinlerinden etkilenen genler arasında etkileşim olabileceğini vurgulanmıştır. Eichenberger vd.(2004) σ^E , σ^K , GerE, GerR, SpoIIID proteinleriyle hiyerarşik bir programla gerçekleştirilen asimetrik bölünme sürecini mikrodizin analiziyle incelemiştir. Bölünmede incelenen beş zaman noktasının her birinde o anda en yüksek aktivite gösteren proteine ait mutant mikroorganizmanın transkriptomu, hiyerarşik düzende bir sonraki andaki transkripsiyon faktörüne ait mutant mikroorganizmanın transkriptomuyla karşılaştırılmıştır. Serizawa vd. (2004) SigD tarafından kontrol edilen genleri incelemiştir. Sonuçlar Northern Blot analiziyle

desteklenmiştir. Steil vd. (2005) sporlanma esnasında, σ^F , σ^E , σ^G , ve σ^K aktivitelerinin farklı zaman ve bölgelerde gerçekleştiklerini tespit etmiştir (EK 2 Çizelge 1). Eiamphungporn ve Helmann (2008) antibiyotik, ısı, etanol gibi stress koşullarında kodladığı proteini aktif olan σ^M 'nin etkilediği genleri incelemiştir (EK 2 Çizelge 1). Nannapanenini vd. (2012) SigB'ye bağlı olarak etanol, butanol, ozmotik, oksidasyon, sıcaklık stresi ve oksijen, glukoz limitasyonlarında 166 genin, transkripsiyonel regülatörlerden 30 genin ekspresyonunun değiştiğini saptamıştır (EK 2 Çizelge 1). Helmann vd. (2003) PerR regülondaki üç genin ekspresyonunun (*katA*, *mrgA*, *zosA*) H₂O₂ ve tert-bütül peroksit tarafından güçlü ve zayıf bir şekilde arttığını belirlemiştir. PerR kontrolundeki genlerin peroksitler varlığında ekspresyonlarının artmasının, PerR'ın ilgili genleri baskılamasıyla bağlantılı olduğu vurgulanmıştır (EK 2 Çizelge 1). Hayashi vd. (2005) PerR'nin *B.subtilis*'te sürfaktin üretimi ve genetik kompetans gelişiminden sorumlu *srfA*'nın ekspresyonu için gerekli olduğunu saptamıştır. Molle vd. (2003) CodY'nin hedef aldığı genleri belirlemiştir. CodY'nin sporlanma, amino asit ve karbonhidrat taşınım genlerini ve amino asit sentez genlerini etkilediği saptanmıştır. Tojo vd. (2010) GMP sentazı inhibe eden dekoyinin transkriptoma etkilerini incelemiştir. *pycA*, *ilv-leu* ve *alsSD* operonlarının CodY'den bağımsız olarak dekoyin ile aktive olduklarını bildirmiştir (EK 2 Çizelge 1).

Nakano vd. (2003) oksidatif hasarı yok etmekle görevli Spx'in RNA polimerazla etkileşime girdiğinde transkriptomda gerçekleşen değişimi araştırmıştır. Sonuçlar Spx'in oksidatif zararın etkilerini tersine çevirdiğini, fakat hücrenin gelişimi ve çoğalma için enerji tüketimini içeren prosesleri ertelediğini gösterir. Zuber vd. (2011) *ytpQ* mutasyonunun Fur ve PerR kontrolundeki genlerin ekspresyonlarını artırdığını ve Spx'in *ytpPQR* operonunun transkripsiyonunu artırdığı göstermiştir. Çalışma *ytpQ*'nin demir dengesinden sorumlu olabileceğini, Spx ve demir dengesi arasında bir bağlantı olabileceğini gösterir (EK 2 Çizelge 1). Yoshida vd. (2003) azot kaynaklarından etkilenen TnrA'nın kontrol ettiği genleri araştırmıştır. TnrA'nın doğrudan etkilediği on transkripsiyon birimi belirlenmiştir.

Yoshida vd. (2004) LmrA'nın genlere bağlandığı bölgelerde 18 bazlı TAGACCRKTCWMTATAWT dizini olduğunu bildirmiştir. Hirooka vd. (2007)

LmrA/YxaF'nın *lmrAB*, *yxaGH* operonlarını ve *yxaF*'yi baskıladığını saptamıştır. Hamon vd. (2004) doğal mikroorganizma, *spo0A abrB* ve *sigH abrB* mutantlarını kullanarak AbrB ile kontrol edilen genleri araştırmıştır (EK 2 Çizelge 1). Araştırmacılar AbrB kontrolündeki iki genin (sinyal peptidaz ve salgılanan bir proteini kodlayan genler: *sipW* ve *yxaW*) biyofilm oluşumu için gerekli olduğunu göstermiştir. Dittmar vd.(2004) doğal mikroorganizma ve tRNA'ların olgunlaşması için gerekli RNaz P enziminin düşük seviyelerde olduğu mutant mikroorganizmaların transkriptomlarını karşılaştırarak tRNA dağılım regülasyonunu araştırmıştır (EK 2 Çizelge 1). Auchtung vd. (2005) RapI proteininin aşırı üretiminin (overexpression of *rapI*) etkilerini incelemiştir. Hareketli genetik element ICEBs1'i içermeyen yüksek hücre derişiminin ve konak hücre stresinin ICEBs1 kesimi ve aktarımını artırdığı bulunmuştur. Bu koşullar kaybolduğunda ICEBs1 yeni nesil hücrelere dikey gen transferiyle geçer. Auchtung vd. (2006) Phr peptitleri ve Rap proteinlerinin etkilediği genleri belirlemiştir. PhrC, PhrF, ve PhrF peptitleri, ComA tarafından ekspresyonları artırılan genler için gerekli bulunmuştur. Albanesi vd. (2005) Cys sentezinin son tepkimesini katalizleyen CysK'nın kükürt metabolizmasıyla ilgili genleri baskıladığını göstermiştir (EK 2 Çizelge 1).

Smits vd. (2005) *trxA*'dan etkilenen 636 geni üç sınıfa ayırmıştır: 435 gen (grup I) sadece 25µM IPTG varlığında; 63 gen (grup II) sadece 100 µM IPTG varlığında, 138 gen (grup III) koşulların en az birinde *trxA*'dan etkilenmiştir. *trxA* yokluğundaki metabolik faaliyetlerin oksidatif ve disülfid stres durumlarındakine benzediği sonucuna varılmıştır. *B.subtilis*'te TrxA yokluğunun transkriptoma etkilerini durgunluk fazında inceleyen Smits vd. (2005)'nin araştırması Mostertz vd. (2008) ile geliştirilmiştir (EK 2 Çizelge 1). TrxA yokluğunun sülfat tüketimini durdurduğu ve TrxA'nın sülfat tüketimi için gerekli olduğu vurgulanmıştır. Wei vd. (2006) TetL yokluğunda *citM* ve iyonlarla birlikte taşınan maddelerin taşıyıcılarını kodlayan genlerin ekspresyonlarındaki değişikliğin hücreyi bazik ortama ve Na varlığına adapte ettiğini belirlemiştir. Hayashi vd. (2006) *srfA* ekspresyonunu azaltan *rapG* ve *rapH*'nin YvaN ile baskılandıklarını saptamıştır (EK 2 Çizelge 1). Tang vd. (2006) pigment üreten ve üretmeyen *B.subtilis*'lerin transkriptomlarını karşılaştırmıştır. Transkriptom analizi sonucunda belirlenen *yvmC* ve *cypX* genlerinin silinmesiyle kırmızı pigment oluşumu yok

edilmiştir. Choi vd. (2006) doğal mikroorganizma ve *cymR* mutantının transkriptomlarını karşılaştırarak CymR regülönunu belirlemiştir. CymR Spx kontrolündeki organik kükürt tüketimiyle ilgili genleri (*ytmI*, *yxeI*, *ssu* ve *yrrT* operonları) baskılar. Bu genlerin Spx tarafından *cymR* ekspresyonunun artırılmasıyla bastırıldığı saptanmıştır (EK 2 Çizelge 1). Britton vd. (2007) *B.subtilis*'te *smc* geninin silinmesinin hücrede tehlike durumunda verilen tepkilere benzer cevaplara neden olduğunu saptamıştır. Ogura ve Fujita (2007) *rglR* geninin ComA kontrolündeki genleri etkilediğini saptamıştır.

Matsuoka vd. (2007) mikrodizin analiziyle YsiA'dan etkilendiği saptanan genlere uygulanan BLASTP analizinde YsiA'nın yağ asiti parçalanmasında görevli olabileceği sonucuna varmıştır. Leelakriangsak vd. (2008) *B.subtilis*'in tiyolle tepkimeye girmeye hazır bileşiklere maruz kalmasının ardından, YodB'nin *yocJ*'yi negatif yönde kontrol ettiğini bildirmiştir. MacLellan vd. (2008) hücre zarındaki stres varlığında ekspresyonu artan *yvrI*'nin işlevini incelemiştir. *oxdC-yvrL*, *yvrJ* ve *yvrI-yvrHa* operonlarının kendi transkripsiyonları için YvrI'ya ihtiyaç duyduklarını saptamıştır. Salzberg ve Helmann (2008) çeşitli mutant mikroorganizmaların (*ugtP*, *pssA mprF ywnE* üçlü mutanti ve *ugtP pssA mprF ywnE* dördümlü mutanti) transkriptomlarını karşılaştırarak hücre zarındaki yağ bileşimini değiştirmenin etkilerini incelemiştir. Bu mikroorganizmalarda SigD ve FapR regülönlarının ekspresyonları genel olarak azalırken, σ^M ve YvrGHb ile kolaylaştırılan hücre zarı stres cevabı tetiklenir (EK 2 Çizelge 1). Chillappagari vd. (2009) CsoR ile ekspresyonu kontrol edilen *ycnJ*'nin Cu^+ iyonunun hücreiçine alımıyla ilgili temel bir işlevi olabileceğini önermiştir. Luciano vd. (2009) YvcJ'nin kompetansla ilgili genlerin ekspresyonlarını artırdıklarını göstermiştir (EK 2 Çizelge 1). Gamba vd. (2009) hücre bölünmesinde kritik bir rolü olan FtsZ proteininin transkriptoma etkilerini incelemiştir. Sonuçlar *B.subtilis*'te hücre bölünmesinin transkripsiyon sonrasında kontrol edildiği hipotezini güçlendirmektedir (EK 2 Çizelge 1). Gimpel vd.(2010) protein kodlamayan küçük RNA'lardan (sRNAs) birini kodlayan SR1'in glikoliz yolizindeki *gapA* operonunun ekspresyonunu artırdığını saptamıştır (EK 2 Çizelge 1). Botella vd.(2011) *phoPR* geninin temel olarak kükürt metabolizmasındaki enzimleri kodlayan genlerin ekspresyonlarının değiştiğini saptamıştır (EK 2 Çizelge 1). Kusuya vd. (2011) yeni oluşan transkriptler ve RNA polimeraz arasındaki bağlantıyı parçalamakla sorumlu

GreA proteininin inaktivasyonunun gen ekspresyonlarını önemli ölçüde değiştirmediklerini saptamıştır (EK 2 Çizelge 1). Lee vd.(2012) glutamat dehidrojenazı kodlayan *rocG* ve *gudB* genlerinin σ^w kontrolündeki genlerin ekspresyonlarını artırarak *B.subtilis*'in sefuroksim antibiyotiğine direncini etkilediklerini saptamıştır (EK 2 Çizelge 1). Lehnik-Habrink vd. (2013) *B.subtilis*'te RNA helikazı kodlayan *cshA* geninin silinmesinden en çok etkilenen genlerin *ysbAB* and *frlBONMD* olduklarını saptamıştır (EK 2 Çizelge 1).

Laalami vd.(2013) *B.subtilis*'te mRNA kararlılığını etkileyen önemli bir endoribonükleaz olan RNaz Y'nin kısmi olarak silinmesinin etkilerini transkriptom analiziyle incelemiştir. RNaz Y'nin 958 mRNA'nın ve protein kodlamayan RNA'nın parçalanmasında rolü olduğu gösterilmiştir (EK 2 Çizelge 1). Iwanicki vd.(2013) mikrodizin analiziyle *prpE*'nin hücre hareketi, kemotaksi ve kompetans gelişimiyle dolaylı olarak ilgili olduğunu saptamıştır (EK 2 Çizelge 1). İrigül-Sönmez vd. (2014) *lutR* geninin yokluğunda 65 transkripsiyon birimi ve 42 operonun ekspresyonlarının değiştiğini belirlemiştir. Bu genlerin ürünleri parçalayıcı enzim ile antibiyotik üretimi, karbonhidrat tüketimi, taşınım ile azot metabolizması, fosfatın hücreiçine alımı, yağ asiti ile fosfolipit sentezi, protein üretimi, hücre duvarı, enerji üretimi, hareketli genetik birimlerin taşınması, fajla ilgili genler, sporlanma ve biyofilm oluşumuyla ilgili genlerdir.

2.7.2 Yabancı genlerin ekspresyonlarının etkileri

Serio ve Sonenshein (2006) *S.cerevisiae* Acol proteininin r-*B.subtilis*'te geç sporlanma genlerinin ekspresyonlarını etkilediğini saptamıştır. Lulko vd. (2007) *B.amyloliquefaciens* AmyQ proteininin r-*B.subtilis*'te sporlanma yolizi genlerini baskıladığı ve hareketlilikle ilgili (σ^D 'ye bağlı) genlerin ekspresyonlarını artırdığını belirlemiştir. Kouwen vd. (2009) *S.aureus* *dsbA* geninin *B.subtilis*'te etkilerini araştırmıştır. Simmons vd. (2009) mayaya ait I-SceI endonükleazının *B.subtilis*'te çift sarmal parçalanmasını katalizleyerek küçük bir hücre popülasyonunda hayatta kalma sistemine ait genlerin ekspresyonlarını artırdığını bulmuştur (EK 2 Çizelge 2).

2.7.3 Oksijenli ve oksijensiz çoğalmanın karşılaştırılması

Ye vd. (2000) sırasıyla KNO₂, KNO₃, glukoz, glukoz ve piruvat içeren dört farklı ortamda oksijenli ve oksijensiz koşullardaki *B.subtilis* transkriptom verilerini karşılaştırmıştır. Oksijensiz solunumun en çok işlevleri bilinmeyen genlerin, nitrat solunumu ve fermentasyonu için gerekli genlerin ekspresyonlarını artırdığı saptanmıştır. Oksijensiz solunum ve durgunluk fazı metabolizmaları arasında benzerlikler belirlenmiştir. Moore vd. (2004) hem oksijenli hem de oksijensiz koşullarda NO ile ekspresyonu en çok artan genin *hmp* olduğunu saptamıştır. *hmp* geni bakteriyi NO stresinden koruduğu bilinen flavohemoglobin proteinini kodlamaktadır. Oksijenli koşulda özellikle Fur ve PerR regulonlarının oksijensiz koşullarda ise σ^B regulonunun ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir (EK 2 Çizelge 3). Yu vd.(2011) adenzin üretiminde çözünmüş oksijen derişiminin etkisini transkriptom analiziyle incelemiştir. Düşük çözünmüş oksijen derişiminde zantın parçalanmasının inhibisyona uğraması nedeniyle adenzin üretiminin arttığı saptanmıştır (EK 2 Çizelge 3). Nicolas vd.(2012) 104 koşulda *B.subtilis* ekspresyonlarının yüksek olduğunu saptadıkları 144 genin glikoliz, demir-kükürt metabolizması, zehir giderme yolizleriyle ilgili ve yaşam için vazgeçilmez işlevlere sahip proteinleri kodladıklarını bulmuştur. Rex/Fnr regülönündaki ekspresyon artışının sadece oksijensiz koşula özgü olduğu belirlenmiştir (EK 2 Çizelge 3).

2.7.4 Sıcaklığın etkileri

Helmann vd. (2001) ısı şokunun etkilerini incelemiştir. Gen ekspresyonları değişen genlerin sigma faktörünü kodlayan σ^B ve HrcA veya CtsR ısı şoku regülör proteinleri ile kontrol edildikleri bildirilmiştir. Beckering vd. (2002) sıcaklığı düşürmenin etkilerini incelemiştir ve *desKR* operonunun transkripsiyonunun değişmediğini bulmuştur. Kaan vd. (2002) daha düşük sıcaklıkta düşük çoğalma hızına bağlı bir adaptasyon olarak amino asit, nükleotit, ve koenzim senteziyle ilgili gen ekspresyonlarının azaldığını; Kort vd. (2008) ısı stresinin etkilerini inceleyerek protein katlanma sistemindeki çaperonları kodlayan genlerin hücrenin canlılığı için gösterge olabileceğini saptamıştır (EK 2 Çizelge 4).

2.7.5 Taşınan moleküllerin etkileri

B.subtilis'te glukozun transkriptoma etkileri beş çalışmada incelenmiştir: Moreno vd. (2001) glukozun gen ekspresyonları üzerindeki etkilerini ve CcpA'nın glukoz regülasyonundaki işlevini araştırmıştır: i) glukoz tarafından baskılanan gen sayısı glukoz ile ekspresyonu artan gen sayısının üç katıdır, ii) glukozun etkilediği genlerin %80'i CcpA kontrolündedir, iii) *ccpA*'dan bağımsız olarak glukozla baskılanan genler sporlanmayla ilgilidir. Bununla birlikte Yoshida vd. (2001) Moreno vd.(2001)'nin aksine, glukozla ekspresyonu azalan 66 genden 22'sinin *ccpA* geninden kısmi bağımsız olduğunu göstermiştir. Bu sonuç kullanılan çoğalma ortamı, RNA izolasyon teknikleri, ve seçilen ekspresyon oranından kaynaklanabilir. Glikoneogenesis yolizindeki *acoA*, *acoC*, *gapB*, *pckA* gen ekspresyonlarının glukozla CcpA'dan bağımsız olarak azaldığı bulunmuştur. Blencke vd. (2003) CcpA'nın ikincil karbon kaynaklarının tüketimiyle ilgili genleri doğrudan baskıladığını ve glukoz varlığında glikoliz yolizi enzimlerinin gen ekspresyonlarını artırdığını bulmuştur. Moreno vd. (2001)'nin sonuçlarından farklı olarak pentoz fosfat yolizinin glukoz tarafından kontrol edilmediği saptanmıştır (EK 2 Çizelge 5). Lorca vd. (2005) CcpA, HprK, serini fosforlanabilen HPr mutantları ve doğal mikroorganizma kullanarak glukozun transkriptoma etkilerini incelemiştir. Glukoz tarafından ekspresyonları azalan genlerin temel olarak CcpA ve HprK tarafından kontrol edildiği bildirilmiştir. CcpA tarafından kontrol edilen genlerin tamamen HprK tarafından, kısmi olarak da serini fosforlanmış HPr [HPr(Ser-P)] tarafından kontrol edildiği saptanmıştır. Azot fosfor metabolizmasıyla ilgili genlerin ve strese karşı verilen cevapla ilgili genlerin CcpA'ya bağımlı olarak glukoz kontrolünde olduğu saptanmıştır (EK 2 Çizelge 5). Vazquez vd. (2009) *B. subtilis* ve *E.coli*'de glukozdan etkilenen ortak genlerin transkripsiyon, translasyon, ve merkezi karbon metabolizmasıyla ilgili olduğunu belirlemiştir (EK 2 Çizelge 5). *B. subtilis* çoğalma ortamına eklenen vitaminlerin transkriptoma etkileri iki çalışmada incelenmiştir: Lee vd. (2001) vitamin etkisiyle genler arası bölgede transkripsiyon değişimleri saptamıştır. Schyns vd. (2005) *yuaJ* ve *ykoD*'nin tiamin kontrolündeki genlerin ekspresyonlarını artırdıklarını belirlemiştir. Ayrıca mikrodizin sonuçlarından yararlanılarak $\Delta thiL$, *thiN*, *yuaJ* ve *ykoD* dördü mutasyonunun tiamin salgılanmasını artırdığı belirlenmiştir (EK 2 Çizelge 5). *B.subtilis*'e aktarılan kükürt kaynaklarının etkileri iki çalışmada

incelenmiştir (Sekowska vd. 2001, Auger vd. 2002). Sekowska vd.(2001) *yqiXYZ* tarafından kodlanan arjinin taşınım sistemi belirlerken aynı zamanda arjinin ve kükürt metabolizmaları arasında bağlantı olduğunu saptamıştır. Mikrodizin analiziyle tespit edilen metiyonin/metiyonin sülfoksit taşınım sisteminin kükürt geri dönüşümünü sağlamak amacıyla kullanılabileceği önerilmiştir. Auger vd. (2002) metiyonin sentez yolizinde girdi olarak kullanılan sülfatın transkriptom üzerindeki etkilerini inceleyerek kükürt regülasyonunu incelemiştir (EK 2 Çizelge 5).

Antibiyotiklerin *B.subtilis* transkriptomuna etkileriyle ilgili olarak dokuz çalışma vardır: Cao vd. (2002) ECF sigma faktörlerinin antibiyotiklere verilen tepkiyi ve hücre zarındaki dengeyi kontrol ettiklerini bildirmiştir. Mascher vd. (2003) *B.subtilis*'te basitrasin antibiyotiğine verilen transkripsiyonel cevabın σ faktörleri (σ^B ve σ^M) ile iki bileşenli sistemler (YvqEC, YvcPQ ve BceRS) ile organize edildiğini ve basitrasine direnç göstermekle görevli ABC taşıyıcı proteinini kodlayan *bceAB* genini saptamıştır (EK 2 Çizelge 5). Ren vd. (2004) furanonun, Lin vd. (2005) protein sentezini engelleyici antibiyotiklerin transkriptoma etkilerini incelemiştir. Kloramfenikol ve eritromisine maruz kalan hücrelerdeki gen ekspresyonu benzerliklerinin her iki antibiyotiğin 50S ribosomal alt birimi hedef almalarından kaynaklanabileceği vurgulanmıştır (EK 2 Çizelge 5). Freiberg vd. (2005, 2006) antibiyotiklerin çalışma prensiplerini açığa çıkartmak amacıyla 14 ve 36 antibiyotiğin transkriptom üzerindeki etkilerini incelemiştir. *ileS*, *pheST*, *fabF*, ve *accDA* genlerinin az ekspres edildiği mutant mikroorganizmalar kullanılmıştır. Her antibiyotik için mikroorganizmalar farklı kalma sürelerinde, düşük ve yüksek antibiyotik derişimlerine maruz bırakılmıştır. Sioud vd. (2009) novobiosinle ekspresyonu değişen 169 genin DNA bakımı ve küçük moleküllerin taşınımıyla ilgili olduklarını belirlemiştir. Rukmana vd. (2009) endurasidin nedeniyle hücrede tiyol-oksidadif stresin oluştuğunu bildirmiştir (EK 2 Çizelge 5). Zhou vd.(2011) xenocoumacin 1'in protein sentez inhibitörlerine benzer etkisi olduğunu saptamıştır (EK 2 Çizelge 5). Mader vd. (2002) çoğalma ortamına eklenen kazamino asitin Gly, Ser, Pro, Tyr ve Phe biyosentez genlerinin ekspresyonlarını etkilemediğini saptamıştır. Berka vd. (2003) L-Trp, L-Phe, L-Tripsin, indol akrilik asit ve kazeinin etkileri sonucu ekspresyonu değişen 100 genin *trp* operonuyla ilişkili olduğunu saptamıştır (EK 2 Çizelge 5). Ye vd. (2009) Glu ve Gln'nin benzer değişimleri yarattığı

sonucuna varmıştır. Valinin transkriptomu hızlı etkilediği bildirilmiştir (EK 2 Çizelge 5).

Guedon vd. (2003) Mn^{+2} etkisini açıklayabilecek üç mekanizma önermiştir: i) Mn^{+2} 'ın metaloregülatörlere doğrudan bağlanması, ii) Fur aktivitesinin artması, ve iii) Mn^{+2} 'a bağlı enzimlerin değişen aktivitesi. Oomes ve Brul (2004) SASP proteinini kodlayan gen ekspresyonunun ısı dayanıklılığının artışıyla ilişkili olduğu göstermiştir (EK 2 Çizelge 5). Oomes vd. (2009) kalsiyumdan etkilenen genlerin biyofilm oluşumuyla ilgili ve stresle ilişkilerinin az oldukları belirlemiştir. Doan vd. (2003) *ywkA*'nın sadece malat içeren ortamda ekspres edildiğini saptamıştır. Watanabe vd. (2003) GutR, GutB, GutP'nin yanı sıra mannitol-1-fosfat dehidrojenazın glusitolü tüketmek için gerekli olduğunu saptamıştır. Tam vd. (2006) *B.subtilis*'in katekol varlığında yaşaması için *yfiDE* operonunun gerekli olduğunu bildirmiştir. Beek vd.(2008) sorbik asitin besin limitasyonuna benzer bir transkripsiyonel cevap oluşturduğunu bulmuştur. Hirooka vd. (2009) *yetM* ekspresyonunun flavonoidlerle arttığını ve YetL tarafından baskılandığını açığa çıkarmıştır (EK 2 Çizelge 5). Tojo vd. (2010) *pycA*, *ilv-leu* ve *alsSD* operonlarının CodY'den bağımsız olarak dekoyin ile aktive olduklarını ortaya çıkarmıştır. Ayrıca *kinA* ve *kinB* başlatıcı (promoter) bölgelerinin ekspresyonlarının dekoyininle arttığı ve ilgili bölgelerin adenin içerdiği saptanmıştır.

2.7.6 Kısıtlılık ve stresin etkileri

Petersohn vd. (2001) sıcaklık, tuz ve etanolle ekspresyonu değişen genleri belirlemiştir. En çarpıcı sonuç tuz stresiyle σ^B 'den bağımsız olarak ekspresyonu artan sigma faktörü σ^W ve onun kontrolündeki genlerdir. Daha sonra, Steil vd. (2003) i) SigW regulonunun ekspresyonunun tuz şokunun ardından ani ve geçici olarak arttığını, ii) DegS/DegU sisteminin yüksek tuz derişimini algılamadaki görevini, iii) yüksek tuz derişimlerinde demir kısıtlılığını, ve iv) yüksek tuz derişimlerinde hareketlilikle ilgili genlerin baskılandığını saptamıştır. Tuz şokuyla ekspresyonu artan genlerle ilgili sonuçlar Petersohn vd.(2001)'nin sonuçlarıyla uyumludur. Hahne vd. (2010) hücre duvarı senteziyle ilgili tüm genlerin transkripsiyonlarının yüksek tuz derişimleriyle baskılandığını bildirmiştir (EK 2 Çizelge 6). Baichoo vd. (2002) demir yokluğunun

transkriptom üzerindeki etkilerini açığa çıkarmıştır. Miethke vd. (2006) ise demir yokluğunun basillibaktin üretiminde gerekli amino asitlerle ilgili genleri etkilediğini göstermiştir. Jarmer vd.(2002) azot kısıtlılığının yabancı DNA'ların hücreiçine alınma yeteneğini artırdığını saptayıp tek basamaklı transformasyon yöntemi oluşturmuştur. Tojo vd. (2003) azot açlığında *sigY* ekspresyonundaki artışın sporlanmayla ilgili olmadığını yayımlamıştır. Leichert vd.(2003) *B.subtilis*'te disülfid stresini tetikleyen diamidin transkriptom ve proteom üzerindeki etkilerini analizlemiştir. Helmann vd. (2003) H₂O₂ ile *katA*, *mrgA*, *ygbA* ve *zosA*, butil peroksitle *katA*, *mrgA* ve *zosA* gen ekspresyonlarının arttığını bulmuştur. Mostertz vd. (2004) H₂O₂ ve O₂⁻ üreten parakuatin transkriptom üzerindeki etkilerini incelemiştir. Moore vd. (2004) NO varlığında ekspresyonu en çok artan genin flavohemoglobin kodlayan *hmp* olduğunu yayımlamıştır. Allenby vd. (2005) PhoP kontrolündeki *yfkN*, *yurI*, *yjdB*, *vpr* genlerinin hücre dışı ortamdan inorganik fosfat elde etmek için önemli olabileceklerini vurgulamıştır (EK 2 Çizelge 6). Moore vd. (2005) katyon stresinin (Ag⁺¹, Cd⁺², Ni⁺², Zn⁺², As⁺⁵) metal dengesi, Cys, His, Arg metabolizmasıyla ilgili genleri etkilediğini saptamıştır. Rogstam vd. (2007) Hmp proteininin toksik maddeleri gidermede işlevi olabileceğini önermiştir. Ayrıca, SNP (sodium nitroprusside) ve NO varlığında birçok genin ekspresyonlarının benzer olduklarını göstermiştir.

Chillappagari vd. (2009) YcnJ'nin temel işlevinin bakır katyonunun hücreiçine taşınımı olduğunu ve CsoR'nin *ycnJ* ekspresyonunun kontrol ettiğini göstermiştir. Chillappagari vd. (2010) bakır katyonu stresinin *suf* genlerini, Cys senteziyle ilgili genleri ve demir-kükürt içeren proteinlerden sorumlu genleri etkilediğini mikrodizin verileriyle saptamıştır. Winter vd.(2013) argon ve hava plazması streslerini mikrodizin analiziyle karşılaştırmıştır. Argon plazma stresi fosfat açlığının yarattığı etkilere sebep olurken, hava plazma stresi triptofan operonunun ekspresyonunu artırmıştır. Her iki etki DNA hasarı, oksidatif stres ve çoğalma gecikmesine neden olmuştur. Ter Beek vd.(2015) potasyum asetat ve karbonil siyanat-klorofenilhidrazona (CCCP) maruz bırakılan *B.subtilis*'in transkriptomlarını karşılaştırmıştır. CCCP stresine maruz kalan hücrelerde asetatla tetiklenen, genel stres cevabıyla ilgili genlerin ve SigM regülönünün aktive olduğu bulunmuştur. Mikrodizin sonuçları her iki asitin besin kısıtlılığında görülen

transkripsiyonel programları aktive ettiğini ve bunların hücre zarfıyla ilgili bir adaptasyon olduğunu göstermiştir (EK 2 Çizelge 6).

2.7.7 Diğer çalışmalar

Westers vd. (2003) ekspresyonları diğer genlere göre daha düşük olduğu belirlenen profaj genlerini ve *pks* operonunu silerek genomun 7.7% azaltıldığı *B. subtilis* $\Delta 6$ 'yı oluşturmuştur. Ohashi vd. (2003) sporlanma nedeniyle ribozomal protein kodlayan üç gen (*rpmA*, *rpmGB* ve *ctc*), translasyon faktörü kodlayan iki gen (*efp*, ve *frr*) ve translasyon sistemiyle ilgili dokuz genin ekspresyonlarının arttığını saptamıştır (EK 2 Çizelge 7). Hambræus vd. (2003) yaklaşık 1500 genin mRNA'larının parçalanma hızlarını belirlemiştir. mRNA'ların % 80'inin yarılanma ömrünün 7 dk'dan kısa olduğu saptanmıştır. Kararlı mRNA'ların rekombinant protein üretimindeki endüstriyel önemi vurgulanmıştır (EK 2 Çizelge 7).

Stanley vd. (2003) plankton ve biyofilm halindeki *B.subtilis*'lerin gen ekspresyonlarını karşılaştırmıştır. Faj, hareket, kemotaksis, hücre zarı enerjisi, glikoliz, TCA döngüsüyle ilgili genlerin ekspresyonlarının anlamlı olarak değiştiği saptanmıştır. Ren vd. (2004) süspansiyon ve biyofilm halindeki hücrelerin transkriptomlarını karşılaştırmıştır. Süspansiyon durumundaki transkriptom verilerinin oksijensiz solunuma benzer olduğu bulunmuştur. Bunai vd. (2004) YcdH, YtmK ve YurO'nun Mn^{2+} , Glu ve glukozla bağlanma proteinleri; YqiX ve YxeM'nin amino asitlere bağlanma proteinleri olabileceği bildirmiştir. Au vd. (2005) *B.subtilis*'te DNA'ya yönelik hasarlar gerçekleştirmiştir. Ekspresyonu değişen 33 genden 22'sinde LexA bağlanma bölgesi vardır (EK 2 Çizelge 7). Jürgen vd. (2005) elektrikli DNA çipiyle biyoproses esnasında ekspresyonu değişen genleri saptayan bir yöntem geliştirmiştir. Kearns ve Losick (2005) üstel çoğalma fazındaki *B.subtilis*'te iki farklı hücre çeşidi saptamıştır: hareketlilikle görevli transkripsiyon faktörü σ^D 'nin aktif olduğu hücreler ve σ^D 'nin inaktif olduğu, uzun zincirler halindeki durağan hücreler. Veening vd. (2008) durgunluk fazındaki *B.subtilis*'teki popülasyon çeşitliliğini mikrodizin analiziyle incelemiştir. Araştırma sonucunda en az üç çeşit hücre çeşidi saptanmıştır: i) endospora sahip hücreler, ii) *aprE/bpr* ekspresyonları çok düşük veya olmayan hücreler, iii) *aprE/bpr*

ekspresyonları yüksek olan hücreler (EK 2 Çizelge 7). Silvaggi vd. (2006) *yndK* ve *yndL* arasındaki *surA* ekspresyonunun Spo0A'nın dolaylı kontrolünde olduğunu, *dnaJ* ve *dnaK* arasındaki *surC* ekspresyonunun sporlanmanın geç safhalarında σ^K tarafından aktif hale getirildiğini, *polC* ve *ylxS* arasındaki bölgedeki iki sRNA'nın sigma faktörü σ^G ve bir sRNA'nın σ^K kontrolünde ekspres edildiklerini belirtmiştir. Ochiai vd. (2007) *yes* grubu genlerinin bitki hücre duvarının parçalanmasında önemli olduğunu bildirmiştir.

Earl vd. (2007) *B.subtilis*'in 17 alt türündeki genetik çeşitliliğe neden olan gen bölgelerini belirlemiştir. *B. subtilis* 168 genlerinin yaklaşık üçte birinin alt türlerde farklılaştığı saptanmıştır. Bu genler antibiyotik üretimi, hücre duvarı sentezi, sporlanma ve filizlenmeyle (germination) ilgilidir. Kobayashi vd. (2007) 11 σ faktörü ve 17 transkripsiyon faktörünün her biri tarafından kontrol edilen genleri belirlemiştir. Morimoto vd. (2008) *B. subtilis* genomunun % 20'sini silerek, yüksek hücre dışı selüloz ve proteaz üretimine sahip yeni mutant *B. subtilis* oluşturmuştur, mutant hücrenin transkriptomunu doğal *B.subtilis* ile karşılaştırmıştır (EK 2 Çizelge 7).

Maughan vd. (2009) *B. subtilis* türünün gen silinmeleri sonucu 6000. nesilinde oluşan sporlanma kaybının genom esnekliğinin bozulması olabileceğini bildirmiştir (EK 2 Çizelge 7). Maughan ve Nicholson (2011) *B. subtilis* WN716'da *B. subtilis* WN715'e kıyasla gözlenen fizyolojik değişimlere neden olan genleri transkriptom analiziyle ortaya çıkarmıştır. *B. subtilis* WN716'da hareketlilikte gözlemlenen azalma kamçı, hareket, kemotaksi ile ilgili genlerin ekspresyonlarının azalmasıyla uyumludur (EK 2 Çizelge 7). Schmalisch vd. (2010) sporlanma sırasında genler arası bölgede ekspresyonu artan genetik bölgeleri belirlemiştir (EK 2 Çizelge 7). Blom vd. (2011) kesikli fermentörde, kompleks ortamda çoğalan *B.subtilis*'in transkriptomunun kalma süresiyle değişimini incelemiştir. Geçiş evresinde SigB, durgunluk fazının başlangıcında SigW kontrolündeki gen ekspresyonlarının arttığı saptanmıştır (EK 2 Çizelge 7). (*yrkD*, *ykyA*, *yacN*, *yqiG*, *ydhL*, *yvsG*, *yveK*, *yckA*, *yktD*) ve (*ybdO*, *ylqB*, *sdpC*, *rapH*, *smf*, *yqaP*, *ydcM*, *yydG*, *yokG*) genlerinin ekspresyon profilleriyle çözünmüş oksijen derişimi arasında pozitif ve negatif bir korelasyon olduğu saptanmıştır. Blom vd. (2011) Yu vd. (2011)'nin *yveK* ve *yckA*'nın düşük oksijen derişiminde baskılandığı sonucu ve Ye

vd.(2000)'nin *sdp* operonunun oksijensiz koşullarda ekspresyonlarının artması sonucuyla uyum içindedir. Yang vd. (2014) Blom vd. (2011)'den farklı bir ortam kullanarak, glukoz ve LB içeren ortamda çoğalan *B. subtilis*'in geç üstel çoğalma fazından durgunluk fazına geçişteki gen ekspresyon değişimlerini incelemiştir. SigA'ya bağlı birçok iç düzen geninin ekspresyonlarının azaldığı ve durgunluk fazında ekspresyonlarının düşük seviyelerde olduğu saptanmıştır. *sigB* ve SigB'nin stres koşullarına cevap olarak etkilediği genlerin ekspresyonları geçiş evresinde en yüksek seviyeye ulaşarak artmıştır. SigB'ye etkisinin ardından, ekspresyonu artan genlerin çoğunluğu oksidatif strese cevap olarak SigW, PerR ve Spx kontrolüne maruz kalmıştır. Spo0A ve SkfA regulonlarının durgunluk fazında ekspresyonlarının artması sonucu, glukozla desteklenen çoğalma ortamında sporlanmanın baskılanmasıyla uyum içinde değildir (EK 2 Çizelge 7).

Szkotak vd. (2011) mikrodizin analizi sonucunda elektrokimyasal akımlar nedeniyle oksidatif strese tepki veren genlerin, aç kalma ve hücre zarıyla ilgili genlerin ekspresyonlarının arttığını saptamıştır. Elektrokimyasal tepkimelerle oluşan oksidatif maddelerin hücre canlılığını öldürücü etkisi olabileceğini sonucuna varılmıştır (EK 2 Çizelge 7). Winter vd. (2011) *B.subtilis*'i argon plazmaya maruz bırakarak transkriptomdaki değişimleri incelemiştir. Plazma nedeniyle hücre duvarı stresi, oksidatif stres ve DNA onarımıyla ilgili genler etkilenmiştir (EK 2 Çizelge 7). Zhou vd. (2011) *B.subtilis*'te aynı koşula ait biyolojik tekrarlar için, gen ekspresyonlarındaki varyansı incelemiştir. 12 biyolojik tekrar için, varyans katsayıları (CV) 10%'dan büyük olan 451 genin hücre tipinin farklılaşması, hücre döngüsü, DNA'nın işlenmesi, sporla ilgili olduğu saptanmıştır. Kullanılması gereken en az sayıda biyolojik tekrar sayısının 6 olması gerektiği önerilmiştir. Nicholson vd. (2012) uzay koşullarında temsili Mars koşullarına göre stresle ilgili daha çok genin daha çok etkilendiğini saptamıştır. Ayrıca dünya koşullarına göre uzay veya temsili Mars koşullarında, ekspresyonu değişen genlerin yarıdan fazlasının işlevinin bilinmediği saptanmıştır (EK 2 Çizelge 7). Fajardo-Cavazos vd. (2012) 50 mbar'lık düşük basınca adapte olmuş *B. subtilis* WN1106'nın çoğalmasını sağlayan nedenleri açığa çıkartmak amacıyla, *B. subtilis* WN1106 ve onun atası olan *B. subtilis* WN624'ün transkriptomlarını karşılaştırmıştır. Düşük basınç koşulunda, hücre zarıyla ilgili *des*, *desK*, *desR* ekspresyonlarının *B. subtilis* WN1106

için daha yüksek olduğu saptanmıştır (EK 2 Çizelge 7). Waters vd.(2014) atmosfer basıncı (~101 kPa) ve çoğalmayı baskılayabilecek (5 kPa) düşük basınçta *B.subtilis*'in ekspresyon profillerini mikrodizin analiziyle incelemiştir. Mikrodizin analizi AbrB, CcpA, CodY, Fur, IolR, ResD, Rok, SigH, Spo0A regülonlarına ait 363 genin ekspresyonlarında değişim ortaya çıkartmıştır. Strese karşı cevap verme işlevinde olan, SigB regülonuna ait 86 genin ekspresyonları artmıştır; bu sonuç SigB'ye bağlı *ctc-lacZ* sisteminin analiziyle doğrulanmıştır.

Daszczuk vd. (2014), *B.subtilis*'te transkriptom analiziyle bozunmuş etten açığa çıkan uçucu maddeler nedeniyle ekspresyonları artan başlatıcıları (promoters) belirleyip, PsboA'nun en güçlü aktive olan başlatıcı olduğu saptanmıştır (EK 2 Çizelge 7). PsboA, kromoprotein amilGFP'yi kodlayan genin önüne klonlanarak yeni bir entegrasyon plazmiti oluşturulmuştur. Bozuk et varlığında, PsboA'nun *B.subtilis*'te florasan protein üretimini tetiklediği gösterilerek PsboA'nun *B.subtilis*'te et bozunmasını belirleyen bir biyosensör olarak kullanılabileceği belirtilmiştir. Xie vd. (2015) *B. subtilis* OKB105'nin pirinç fidesiyle 2 saatlik etkileşimi sonucu gen ekspresyonlarındaki değişimi mikrodizin analiziyle belirlemiştir. *B. subtilis* OKB105 genomunun % 3.8'ini içeren 178 genin ekspresyonu pirinç fidesi nedeniyle önemli ölçüde değişmiştir; *araA*, *ywkA*, *yfls*, *mtlA*, *ydgG* gibi ekspresyonu artan 52 gen besinlerin taşınımı, parçalanması, ve strese karşı cevapla ilgilidir. Ekspresyonu azalan 124 gen *cheV*, *fliL*, *spmA*, ve *tua*'yı içerir; ve bu genler hareket, sporlanma, teikuronik asit senteziyle ilgilidir (EK 2 Çizelge 7).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Mikroorganizma

3.1.1 Serin alkali proteaz üretimi

SAP enziminin üretiminde doğal *Bacillus licheniformis* (DSM 1969) kullanılmıştır (Çalık vd. 1998, Çalık 1998).

3.1.2 İnsan büyüme hormonu üretimi

Araştırmada kullanılan mikroorganizma *Bacillus subtilis* 1A751 (*apr*-, *npr*-) *Bacillus* Genetic Stock Center (BGSC, Ohio State University, ABD)'dan dondurularak-kurutulmuş olarak getirtilmiştir. Rekombinant plazmid pMK4::*pre(subC)::hGH* araştırma grubumuzda tasarlanmış ve oluşturulmuştur (Özdamar vd. 2009). pMK4::*pre(subC)::hGH* rekombinant plasmitini (Özdamar vd. 2009) taşıyan rekombinant *B.subtilis* BGSC-1A751 (*npr aprE*) % 0.5 pepton, % 1.5 soytripton, 0.001 kg m⁻³ MnSO₄.2H₂O bileşimindeki -su içinde hazırlanan ve 121°C ve 1.2 atm'de doymuş buharla 20 dk süreyle sterillen- 0.5 ml çözeltide 30°C'de 30 dk çalkalanarak canlandırılmış ve canlandırma ortamında 30 dk bekleyen hücreler, canlandırma ortam bileşimine ek 15 kg m⁻³ agar içeren petri kaplarına steril koşullarda aktarılmıştır. Katı agar ortamlar aşağıdaki yöntemle hazırlanmıştır:

1. Yukarıda bileşimi verilen çözelti, homojen hale gelinceye kadar manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak kaynatılmıştır;
2. Ortam berrak hale geldiğinde, daha önceden hazırlanmış mikrobiyolojik hava-filtreli tüplerin herbirine 6 ml konulmuş ve sterillenmiştir;
3. Tüpler sterilazasyon işleminden sonra eğik konumda, agarın donması beklenmiştir; eğik-agar tüpleri +4°C'da korunmuşlardır.

Yukarıdaki gibi hazırlanan katı ortamlara mikroorganizma öze ile steril koşullarda aktarıldıktan sonra 30°C'de 18 saat inkübatörde çoğaltılmıştır. Mikroorganizmaların

yaşlanmalarını ve zamanla aktivitelerini kaybetmelerini önlemek için katı ortamda çoğaltılmış aktif mikroorganizmalar mikrobanka aktarılarak -20°C’de saklanmıştır.

3.2 rhGH Üretiminde Hibrit-Genin Konak *Bacillus subtilis* Suşlarına Aktarılması

3.2.1 Elektroporasyonla plasmid DNA’nın *Bacillus subtilis*’e transferi

hGH genini taşıyan rekombinant *E.coli-Bacillus* shuttle vektörü (pMK4::*pre(subC)::hGH*), veya pMK4 plasmiti *Bacillus subtilis* 1A751 (*aprE*⁻, *nprE*⁻) suşuna (hücre-dışı alkali proteaz- ve nötral proteaz- kodlayan genleri sili

nmiş mikroorganizma) aşağıda açıklanan elektroporasyon ve doğal transformasyon yöntemleriyle aktarılmıştır. Doğal transformasyon yönteminin elektroporasyondan farkı elektrik şoku uygulanmamasıdır.

3.2.1.1 Eppendorf elektroporasyon yöntemi: *B.subtilis*’e transformasyon

Elektrokompetent hücrelerin hazırlanması aşağıdaki adımlarla gerçekleştirilmiştir:

1. Hücreler 5ml LB sıvıda 37°C ve 180 rpm koşullarında 1 gece çoğaltılırlar.
2. 5 ml LB sıvıda çoğaltılan mikroorganizmanın 250 µl’si 50 ml LB sıvı içeren yeni ortamlara aktarılır ve 1.basamaktaki ile aynı koşullarda 3 st çoğaltılır.
3. 4000 rpm ve +4°C’de 15 dk santrifüjlenerak ayrılan hücreler 1 mM HEPES (pH=7.0) tamponu ile iki kez yıkandıktan sonra soğuk elektroporasyon tamponu (% 25 PEG ve 0.1M mannitol) ile de iki kez yıkanır. Yöntemin uygulandığı süreçte hücrelerin soğuk olması gerekir.
4. Hücreler başlangıç çoğalma ortamı hacminin 1/200’ü kadar hacımlı soğuk elektroporasyon tamponu ile süspansiyon haline getirilir ve +4°C’de 10 dk bekletilir.

Elektroporasyonla DNA’nın hücrelere aktarılması beş adımda gerçekleştirilir:

1. Elektroporasyon cihazı (BioRad, ABD) belirlenen voltaj değerine ayarlanır. Başlangıç voltaj değeri 16 kV/cm olabilir (1mm'lik küvetler için 1600 V kullanılmıştır).
2. 40 µl elektrokompotent hücre içeren tüpe 5 µl'den daha az plasmid DNA (100 ile 500 ng arasında) eklenir ve karıştırılır.
3. Hücre/DNA karışımı önceden soğutulmuş küvet içerisine konur ve küvetin dışı kurulandıktan sonra elektroporasyon cihazının küvet tutucusuna (holder) yerleştirilir.
4. Elektrik-pulse uygulanır ve hücrelerin 2-3 dk dinlenmesi için beklendikten sonra üzerine 0.5 ml LB sıvı eklenir ve 37°C'de 3 st bekletilir.
5. Uygun seçici antibiyotiği içeren LB agar üzerine yayılır ve 37 °C'de inkübe edilir.

3.2.1.2 *Bacillus subtilis*'ten miniprep plasmid DNA izolasyonu: Alkali liziz yöntemi

Bacillus subtilis'ten plasmid DNA izolasyonu aşağıda verilen yöntem kullanılarak yapılmıştır (Harwood vd. 1990).

1. Deney tüpü veya 25ml erlenlerde bulunan, seçici antibiyotik içeren 2.5 ml LB sıvı-ortama plasmid DNA'nın izole edileceği mikroorganizmadan tek koloni aktarılır.
2. Mikroorganizma 37°C ve 200 rpm koşullarında bir gece çoğaltılır.
3. Çoğalan hücrelerden 1.2 ml 10 000 rpm ve oda sıcaklığında 1 dk santrifüjlenir. Sıvı kısım dökülür ve kalan sıvının tamamı bir mikropipet yardımıyla uzaklaştırılır.
4. Hücreler 1.2 ml TSE tamponu ile tekrar süspansiyon haline getirilerek yıkanır.
5. 3.basamak tekrarlanır.
6. Hücre pelleti 2 mg/ml "egg-white lizozim" içeren (kullanmadan hemen önce toz olarak eklenmiş) 500 µl Çözelti A ile süspansiyon haline getirilir.
7. 10 s vorteks işlemi ile homojenizasyondan sonra T=37°C'de hücreler parçalanıncaya kadar (10-20 dk) inkübe edilir. Bu basamak kritiktir ve süspansiyon viskoz olmalıdır.
8. Karışım buz üzerine konur ve oda sıcaklığında bekletilen Çözelti B'den 400 µl eklenir, 10 s vorteks işlemi ile homojenizasyondan sonra 4 dk buz üzerinde

bekletilir. Süspansiyon gerçekte berrak olmalıdır; eğer berrak değilse vorteks işlem basamağı tekrarlanır.

9. 300 µl Çözelti C eklenir ve 10 s vorteks işleminden sonra buz üzerinde 5 dk bekletilir.
10. 16 000 rpm ve +4°C koşullarında 6 dk santrifüjlenir. Çökeltinin büyük kısmı dibe çöker, bir kısmı çözeltide kalır.
11. Sıvı kısmın ~ 600 µl'si 1ml'lik mikropipetle yeni ependorf tüpüne alınır.
12. 600 µl fenol/kloroform/izoamilalkol (25/24/1) karışımı eklenir, 10 s vorteks işlemi uygulanır ve 1 dk sonra işlem tekrarlanır.
13. Fazları ayırmak için 16 000 rpm ve +4°C koşullarında 6 dk santrifüjlenir.
14. ~ 500 µl sulu (üst) faz 1 ml'lik mikropipetle yeni tüpe alınır. Ara-faz ve alt-fazdan çekilmemesine dikkat edilir.
15. 500 µl kloroform/izoamilalkol (24/1) eklenir, 5 s vorteks işleminden sonra 16 000 rpm ve +4°C koşullarında 2 dk santrifüjlenerek fazlar ayrılır.
16. 14. basamaktaki gibi yaklaşık 450 µl'lik üst-faz yeni tüpe alınır.
17. 1 ml % 96'lık etanol (oda sıcaklığında) eklenir, karıştırılır ve buz üzerinde 10 dk bekletilir.
18. 16 000 rpm ve +4°C koşullarında 10 dk santrifüjlenerek DNA pellet haline getirilir.
19. Sıvı kısım 4. basamaktaki gibi uzaklaştırılır; pellete dokunulmamalıdır.
20. 1 ml % 80'lik etanol eklenir. Genellikle DNA pelleti tüpün bir tarafında sabit kalır. Eğer kalmazsa, ya da herhangi bir şüphe olursa, 1dk tekrar santrifüjlenir. Sıvı kısım 19. basamaktaki gibi uzaklaştırılır.
21. 20.basamak tekrarlanır.
22. Pellet vakumda kurutulur ve 25µl TE tamponunda çözülür.
23. 1 µl RNaz eklenir ve 37°C'de 20 dk inkübe edilir. DNA -20°C'de saklanır.

3.3 Üretim Deneyleri

3.3.1 *Bacillus licheniformis* ile SAP üretim deneyleri

3.3.1.1 Katı ortam

Doğal *Bacillus licheniformis* ile yapılan SAP üretim deneylerinde 15 kg/m³ soytripton; 5 kg/m³ pepton; 0.010 kg/m³ MnSO₄. 2H₂O; 15 kg/m³ agar içeren katı ortamın pH'ı 4M KOH kullanılarak 7.0'ye getirilmiştir. Stok mikroorganizmalar mikrobanktan alınan boncuk ile steril koşullarda katı ortam içeren 30cm³'lük ortam petri kabına aktarılırlar. Mikroorganizmalar 37°C'de 24 st inkübatörde (Fischer) çoğaltılmıştır. Hücreler çoğaltıldıktan sonra 4°C'de saklanır (Çalık 1998, Çalık vd. 1998, Çalık vd.1999).

3.3.1.2 Ön-sıvı ortamı

Bacillus licheniformis ile yapılan SAP üretim deneylerinde kullanılan, pH'ı 4M KOH ile 7.5'a ayarlanan önsıvı ortam bileşimi 0.01 g/L MnSO₄.2H₂O, 5.0 g/L pepton, 15.0 g/L soytripton, 0.25 g/L Na₂HPO₄, 0.1 g/L CaCl₂'dir (Çalık vd. 1999).

3.3.1.3 Üretim ortamı

Üretim ortamı bileşimi 9.0 g/L sitrik asit, 4.7 g/L (NH₄)₂HPO₄, 2.0 g/L KH₂PO₄'dir. Üretim ortamının başlangıç pH'ı 10M KOH ile 7.6'ya ayarlanmıştır. Fermentasyon 40 st boyunca, 37°C'de, 1.0-2.5 dm³ çalışma hacminde olan, 3.5-dm³'lük sıcaklık, pH, karıştırma hızı ve çözünmüş oksijen derişimi kontrollu kesikli biyoreaktörlerde (Chemap, CF 3000, Switzerland) gerçekleştirilmiştir. Kesikli biyoreaktör deneyleri, (Q₀/V_R=1 vvm, N= 150 rpm), (Q₀/V_R=1 vvm, N= 500 rpm), (Q₀/V_R=1 vvm, N= 750 rpm) koşullarında yapılmıştır (Çalık vd. 1999).

3.3.2 Rekombinant *Bacillus subtilis* ile rhGH üretim deneyleri

pMK4::*pre(subC)::hGH* rekombinant plasmitini (Özdamar vd. 2009) taşıyan rekombinant *B.subtilis* BGSC-1A751 (*npr aprE*) ile rhGH üretiminde kullanılan çoğalma ve üretim ortamları ve sistemler aşağıda verilmiştir.

3.3.2.1 Mikrobank (mikroorganizma saklama sistemi)

Mikroorganizmaları canlı tutucu özellikte gözenekli seramik boncuk ile mikroorganizmaların kolayca ve homojen olarak boncuklara yapışmasını sağlayan kriyoprezervatif sıvı içeren tüplere (PRO-LAB, Microbank^{TS}), katı ortamda çoğaltılmış aktif mikroorganizma aktarılmıştır. Bir süre çalkalandıktan sonra şişedeki gliserol atılmış, mikroorganizmaların gözenekli boncuklara adsorpsiyonu sağlanmıştır. Tüpler derin dondurucuda, -20°C’de saklanmıştır.

3.3.2.2 Katı çoğalma ortamı

Rekombinant *Bacillus subtilis* ile rhGH üretim deneyleri için kullanılan katı çoğalma ortamı bileşimi çizelge 3.1’de verilmiştir (Çalık 1998). Ortamlara sterilizasyon işleminden sonra plasmitin korunması için ortamdaki derişimi 7 µg cm⁻³ olacak şekilde kloramfenikol eklenmiş; 30 cm³ ortam petri kabına boşaltılmıştır. Petrideki ortam donduktan sonra mikrobanktan alınan boncuk ile steril koşullarda mikroorganizma aktarılmış 37°C’de 24 st inkübatörde (Fischer) çoğaltılmıştır. Hücreler çoğaltıldıktan sonra +4 °C’de saklanmıştır.

Çizelge 3.1 Rekombinant *Bacillus subtilis* için katı-ortam bileşimi

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

3.3.2.3 Ön-sıvı çoğalma ortamı

Mikroorganizma çoğalması ve rhGH üretiminde kullanılan ön-sıvı ortamının bileşimi çizelge 3.2’de verilmiştir (Çalık 1998). Ön-sıvı ortamı $7 \mu\text{g cm}^{-3}$ kloramfenikol içermektedir. Katı ortamda çoğalmalarını tamamlayan hücreler $V = 150 \text{ cm}^3$ hacimli mikrobiyolojik hava filtreli kesikli biyoreaktörde bulunan bileşimi çizelge 3.2’de verilen $V_R = 30 \text{ cm}^3$ ön-sıvı ortamına öze ile steril koşullarda aktarılmış ve $T=37^\circ\text{C}$, karıştırma hızı $N = 200 \text{ dk}^{-1}$ olan orbital karıştırmalı inkübatörde (B.Braun, Certomat BS-1) çoğaltılmıştır.

Çizelge 3.2 Rekombinant *Bacillus subtilis* için ön-sıvı çoğalma ortamı bileşimi

Bileşen	Derişim, kg m^{-3}
Soyton	15.00
Pepton	5.00
CaCl_2	0.10
Na_2HPO_4	0.25
$\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.01

3.3.2.4 Sıvı çoğalma ortamı

Ön-sıvı ortamda çoğalan mikroorganizmalar pipet yardımıyla steril koşullarda bileşimi çizelge 3.3’te (Çalık 1998) verilen mikrobiyolojik hava filtreli biyoreaktörde bulunan $V_R=200 \text{ cm}^3$ hacimli ve $7 \mu\text{g/cm}^3$ kloramfenikol içeren sıvı ortamlara 1:10 ölçek büyütme oranında aktarılmıştır. Aktarma yapıldıktan sonra hücreler karıştırma hızı $N=200 \text{ dk}^{-1}$ olan orbital karışmalı inkübatörde 37°C sıcaklıkta çoğaltılmıştır.

Çizelge 3.3 Rekombinant *B. subtilis* için glukoz temelli tanımlı üretim ortamı bileşimi

Bileşen	Derişim, kg m^{-3}
Glukoz	8.000
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	4.710
KH_2PO_4	2.000
Na_2HPO_4	0.043
NaH_2PO_4	5.630

3.3.2.5 Ölçek büyültme adımları ve üretim ortamı

rhGH üretiminde kullanılan pilot ölçek biyoreaktör sistemi şekil 3.1’de verilmiştir. Birinci basamakta mikroorganizma mikrobanktan katı ortama aktarılmış, ikinci basamakta katı-ortamdan ön-sıvı çoğalma ortamına, üçüncü basamakta 1/10 aşılama oranı ile sıvı çoğalma ortamına; dördüncü basamakta ise 1/10 aşılama oranı ile üretim ortamının (Çizelge 3.3) konulduğu pilot-ölçek biyoreaktöre (Chemap, İsviçre) aktarılmıştır.



Şekil 3.1 Chemap AG- FZ 3000 pilot ölçek biyoreaktör sistemi

3.3.3 Biyoreaktör sistemi

Pilot-ölçekte yapılan rhGH üretim deneylerinde aşı, bileşimi çizelge 3.3’te verilen 2.0 dm³ biyoreaktör üretim ortamına 1:10 oranında aktarılmış ve toplam $V_R = 2.2 \text{ dm}^3$ olan tepkime karışımı içinde proses başlatılmıştır ($t=0$). Kesikli biyoreaktör olarak işletilen sistem (Chemap AG- FZ 3000) toplam $V=3.5 \text{ dm}^3$ hacimli, çözülmüş oksijen, pH, sıcaklık (T), karıştırma hızı (N) ve kimyasal köpük kontrollüdür (Şekil 3.1). Buhar jeneratöründe (Chemap, İsviçre) üretilen kızgın buhar ile yerinde(in-situ)-sterillenen biyoreaktörde karşılıklı dört engel, iki dört bıçaklı Rushton türbin-tipi karıştırıcı ve tek delikli hava-giriş borusu bulunmaktadır. Biyoreaktör, buhar ile 21 dakika sterillendir. Biyoreaktörde ısı aktarımı, ceket ve geri-soğutucudan buhar ve soğutma suyu kullanılarak yapılmaktadır. Soğutma suyu sisteme +15°C sıcaklıkta yüksek debide su sirkülatörü (Eyela, Japonya) ile pompalanmaktadır.

3.3.3.1 Pilot-ölçek biyoreaktör sisteminde farklı oksijen-aktarım koşullarında üretim

Karıştırma hızı-, pH-, sıcaklık-, ve köpük- kontrollü $V=3.5 \text{ dm}^3$ pilot-ölçek biyoreaktörlerde (Chemap, İsviçre), oksijen-aktarım koşullarının (farklı oksijen-aktarım baskısının) rekombinant insan büyüme hormonu (rhGH) üretimine etkisi, çizelge 3.4'te detayları görülen düşük- (LOT), orta- (MOT), ve yüksek- (HOT) oksijen-aktarım koşullarında araştırılmıştır. İsimlendirmeler hava giriş hızı temel alınarak yapılmıştır (Yılmaz, basılmamış). Biyoproses karakteristik değişkenleri, çözünmüş oksijen derişimleri ve pH değerleri hat-üstü (on-line) olarak ölçülmüş; kalma süresine (t) karşı alınan örneklerde hücre oluşumu ve substrat tüketimleri UV-spektrofotometre ile, amino asitler “amino-asit türevlendirme sisteminde” hazırlanan türevlerin ters-faz HPLC sisteminde geliştirilen Pico-Taq yöntemiyle (Çalık vd. 2000), rhGH kapiler elektroforez HPCE cihazı kullanarak, organik asitler ise HPLC cihazı ile (Çalık vd. 1999) analizlenmiştir. rhGH'nin varlığı ve molekül büyüklüğünün standart ile aynı olduğu Western-Blott analiz yöntemi ile kanıtlanmıştır. Deneyler süresince kalma süresi t'ye karşı tepkime-karışımından alınan örneklerden ayrılan *B. subtilis* hücreleri -80°C 'da korunmuştur. rhGH üretimi için kullanılan pilot ölçek kesikli biyoreaktör sistemi aşağıda anlatıldığı gibi hazırlandıktan sonra, ölçek büyütmenin ikinci basamağında $V_R = 200 \text{ cm}^3$ hacimli ön-sıvı ortamında çoğaltılmış mikroorganizma steril koşullarda biyoreaktöre aşılanmış; 10 M KOH çözeltisi ile başlangıç pH değerine (pH_0) ayarlanmıştır ($t=0$). Mekanik karıştırma ve hava giriş hızı kontrollü biyoreaktörde biyoproses süresince elektrotlar ve kontrol sistemi ile karıştırma hızı, çözünmüş oksijen derişimi, sıcaklık ve pH değerleri izlenmiş ve kaydedilmiştir. Köpük giderici olarak % 30 (h/h) Antifoam A (Sigma 5758) çözeltisi kullanılmıştır.

Çizelge 3.4 Pilot-ölçekte rhGH üretimi için uygulanan koşullar ve kısaltmaları

Kısaltma	Hava giriş hızı, Q_0/V_R ; vvm	Karıştırma hızı, N ; dk^{-1}
LOT	0.2	500
MOT	0.5	750
HOT	1.0	800

3.3.3.2 Biyoreaktör ön hazırlıkları

1. Oksijen elektrodunun polarize olması için sistem 6 saat önceden açılır.
2. Reaktör içindeki su boşaltılır.
3. pH elektrodu reaktör bağlantılarından sökölerek ayrı bir beher içinde pH = 4 ve pH = 7 olan Mettler Toledo'nun standart tamponları ile sırasıyla kalibrasyonları yapılır.

3.3.3.3 Biyoreaktör sterilizasyonu

4. pH kalibrasyonu yapıldıktan sonra, pH-elektrodu tekrar yerine takılır. Reaktöre yaklaşık 2 L saf su doldurulur. pH elektrodunun basıncının 2-2.5 bar olup olmadığı kontrol edilir.
5. Reaktör üzerindeki tüm bağlantı noktaları kontrol edilip sıkıca kapatılır; enjeksiyon yapılacak bölmelere gri renkli septumlar takılır.
6. Sterilasyon sürecinde kullanılan reaktör çelik koruyucu kalkanı takılır.
7. Reaktörde geri-soğutucu tepesindeki basınç tutma vanasına (pressure holding valve) takılı hortumlar su dolu derin bir kaba batırılır.
8. Örnek alma borusu ucuna, yeterli uzunlukta kesilmiş steril silikon-hortum veya sterillenebilir saydam-hortum, sterillenebilir bant ile yapıştırılarak bağlanır ve yoğunmuş-suyun akması için zemine konan su dolu kaba batırılır.
9. "Pressure holding valve" sonuna kadar açılır. Bu durumda reaktör-içi basınç göstergesi P=0 konumunda olmalıdır.
10. Ana hattan başlayıp reaktöre girene kadar hava hattına ait tüm vanalar açık konuma getirilir.
11. Su sirkülatörü açılır, su giriş- ve çıkış- vanaları açık konuma getirilir.
12. Isıtıcı (Heater) açılır.
13. Kompresör açılır, buhar jeneratörüne besleme yapan su tankının 4 bara kadar basınçlanması sağlanır. Daha sonra buhar jeneratörü açılır.
14. Kontrol ünitesinde, "autom. sterilisation" panelinde "heat by water/sterile by steam" konumu seçilir.

15. Karıştırma hızı, “speed kontroller” panelinde karıştırma hızı mandalın sola doğru açılıp düğmenin çevrilmesiyle $N=200$ rpm’e getirilir. Daha sonra mandal sağa doğru kilitlenir.
16. Sterilizasyon süresi “time-steril” panelinde düğmeye basılarak 21 dakikaya set edilir.
17. “Base unit” üzerindeki “out reflux-cooler (geri-soğutucu çıkış)” bağlantısı quick-coupling çıkartılır. Buhar jeneratöründe çıkış basıncı 1.5-2.5 bar arasına gelince, ana hattan başlayarak reaktör girişine kadar tüm buhar vanaları açılır.
18. “Sterilisation” panelindeki “start” düğmesine basılarak sterilizasyon başlatılır.
19. Sterilizasyon sıcaklığı “autom. sterilization” panelindeki potansiyometre ile yan ekranda 121°C gözlenecek şekilde ayarlanır.
20. Sıcaklık 121°C ’ye ulaştığında, örnek alma hattının da sterillenmesi için reaktörün alt yanındaki buhar giriş vanası (HOKE) açılır.
21. Sıcaklık 95°C ’ye ulaştığında, “pressure holding valve” kendiliğinden kapanarak iç basıncı 1.3 bara yükseltir. $T=121^{\circ}\text{C}$ ’ye yükseldiğinde vana kendiliğinden açılıp kapanarak basıncı 1.3 barda sabit tutar. Sterilizasyon bittikten sonra reaktörde sıcaklık düşmeye başlar. 95°C ’ye düştüğünde vana kendiliğinden açılır ve reaktör içi basınç düşer, reaktöre hava girişi olur. Reaktör içindeki sıcaklık fermentasyon sıcaklığına düştüğünde “autom. sterilization” panelinde “reset” yapılır.
22. Üzerinde reaktör monte edilmiş olan “base unit” üzerindeki “out reflux cooler” hattına ait quick-coupling tekrar takılır.
23. Reaktör boşaltılacağı ve boş reaktörde karıştırma yapmak sakıncalı olacağı için karıştırıcı hızı sıfır yapılır ve karıştırıcı kapatılır.

3.3.3.4 Biyoreaktörün steril üretim ortamı ile doldurulması

24. Reaktörün içindeki su, ısıtıcının kapatılması ve karıştırma hızının sıfıra getirilmesinden sonra, “örnek hattı” açılarak boşaltılır.
25. Buhar, “örnek alma hattından” 20 dk süreyle geçirilerek, örnek hattı temizlenir.
26. Önceden hazırlanmış olan sterillenmiş üretim ortamı ($V_R=1.5-2.5$ L arasında olmalıdır) peristaltik pompa ile reaktöre doldurulur. Bu işlem için kullanılacak olan

çelik enjektör (septuma saplanan çelik iğne), hortum, pamuk, mavi kapaklılar önceden sterillenmelidir.

27. Çelik enjektör, alkollü pamuğa sarılarak sterilliği muhafaza edilerek septuma saplanmalıdır; enjektörün hortum girişine bağlantısı önceden “steril UV kabin” içinde steril koşullarda yapılmış olmalıdır. İçinde steril ortam bulunan, mikrobiyolojik-hava filtreli mavi kapaklı sterilenmiş şişeye “steril hortumun” bağlantısı da UV kabin içinde steril koşullarda yapılmalıdır.
28. Bağlantı noktaları alkollü pamuk kullanılarak steril koşullarda tutulmalıdır.

3.3.3.5 Oksijen elektrodu kalibrasyonu

29. Sıcaklık, fermentasyon sıcaklığına set edilir.
30. “pO₂ apml” panelindeki anahtar aralığı “1.0/0.25/0.5” seçeneklerinden, 1.0’e getirilir.
31. Steril hava filtresinden biyoreaktöre N₂ gazı gönderilir, ölçülen DO değeri yatışkın koşula gelinceye kadar beklenir; ölçülen değer “pO₂ apml” panelindeki “zero potansiyometresi” ile pO₂ 0-100 % dijital penceresindeki değer 2’ye getirilir. N₂ gazı kesilir.
32. Steril hava filtresinden biyoreaktöre O₂ gazı gönderilir, ölçülen DO değeri yatışkın koşula gelinceye kadar beklenir, ölçülen değer “cal potansiyometresi” ile pO₂ 0-100 % penceresindeki değer % 95’e set getirilir. O₂ gazı kesilir.
33. Fiziksel sıvı-faz kütle aktarım katsayısı, (K_La)₀ hesaplamaları için t’ye karşı veri alınır, hava giriş hızı ve karıştırma hızı deneyde kullanılacak koşullara set edilmiş olmalıdır.

3.3.3.6 Fermentasyonun başlatılması

34. Hava giriş hızı (Q₀) istenilen değere reaktör üzerindeki rotametre kullanılarak set edilir. Bu işlem yapılırken; hava giriş hızı için daha önce yapılan kalibrasyonlar kullanılır.
35. Sisteme kompresör ile hava beslenir.
36. Ön-sıvı ortamda çoğaltılan mikroorganizma 1/10 oranında reaktöre beslenir.

37. Steril asit ve baz kullanılarak enjektör ile biyoreaktörde üretim-ortamı başlangıç pH değeri (pH_0) istenilen değere set edilir.
38. Örnek alma işleminden sonra örnek alma hattı buhar geçirilerek sterillenir.
39. Deney süresi tamamlandıktan sonra, karıştırma hızı sıfıra ayarlanır ve karıştırıcı “off” durumuna getirilir.
40. Sistem kapatılır, sterillenir ve yıkanır. pH elektrodunun cam ucuna 3M KCl çözeltisi içeren plastik kapsül takılır, tüm elektrotlar reaktöre geri takılır.
41. Reaktör temiz ve damıtık su ile dolu olarak bırakılır.

3.4 Analitik Yöntemler

Laboratuvar ve pilot ölçekli biyoreaktörlerde gerçekleştirilen deneyler süresince farklı kalma sürelerinde alınan örneklerin önce mikroorganizma derişimi ölçülmüş, daha sonra üretim ortamı 10 dk süreyle 12000g değerinde 4 °C sıcaklıkta santrifüjlenerek (Hermle Z 323 K, Almanya) hücreler ayrılmıştır. Sıvı faz 0.45 µm gözenekli filtreden süzildükten sonra sıvı ortamdaki rhGH, amino asit, organik asit ve glukoz derişimleri aşağıda açıklanan analitik yöntemlerle ölçülmüştür.

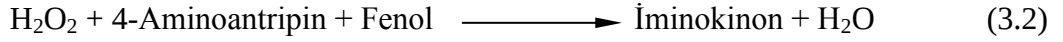
3.4.1 Mikroorganizma derişimi

Mikroorganizma derişimi UV-spektrofotometrede (Shimadzu UV 160A) absorbands ölçümüyle belirlenmiştir. Belirlenen derişimlerde mikroorganizma içeren ortamlar için 400-600 nm arasında dalga boyu taraması yapılmış ve bu dalga boyu aralığında mikroorganizma derişiminin belirlenmesi için kalibrasyon eğrileri hazırlanmıştır. 600 nm dalga boyu için oluşturulan kalibrasyon eğrisinin diğerlerine göre daha hassas olduğu bulunmuş ve hücre derişiminin 600 nm dalga boyunda ölçülmesine karar verilmiştir.

3.4.2 Glukoz derişimi

İndirgenmiş şeker -glukoz- derişimi UV spektrofotometrede ($\lambda=505$ nm) glukoz oksidasyon metoduyla ölçülmüştür (Boyacı 2005). Denklem 3.1'deki gibi, glukoz oksidaz enzimi katalizörlüğünde D-glukozun oksidasyonundan hidrojen peroksit

oluşmaktadır. Ardışık tepkimeyle peroksidaz enzimi katalizörlüğünde (denklem 3.2), 1. tepkimeyle oluşan hidrojen peroksit, 4-aminoantiripin ve fenol ile tepkimeye girmekte ve kırmızı renk oluşmaktadır:



Önce derişimi bilinen miktarlarda glukoz içeren çözeltiler kullanılarak kalibrasyon eğrisi hazırlanmıştır. Kalibrasyon eğrisinin oluşturulması ve örneklerin analizinde kullanılan yöntem aşağıda verilmiştir:

1° Örnek, derişimi en fazla 2 g L⁻¹ olacak şekilde seyreltilir.

2° 2.45 ml analiz çözeltisine 0.05 ml örnek çözeltisi eklenir.

3° 37 °C’de 20 dk inkübe edilerek tepkime gerçekleştirilir ve 505 nm dalga boyunda UV spektrometrede çözeltinin absorbansı ölçülür.

3.4.3 Amino asit derişimleri

Amino asitlerin analizi için kolon öncesi türevlendirme gerektiren PICO-TAG yöntemi (Cohen 1984) kullanılmıştır. Bunun için “Waters Pico-free Gradient Yöntemi” nin modifiye edilmesi ile geliştirilen “New-Pico Gradient Yöntemi” uygulanmıştır. Bu yöntemde serbest amino asitler birinci basamakta fenilizotiyosiyanat (PITC) ile tepkimeye sokularak feniltiyokarbomil amino asit (PTC-AA) türevleri elde edilir.

İkinci basamakta elde edilen türevler sisteme enjekte edilerek iki farklı çözücü içeren gradyen uygulanır. Çizelge 3.5’te çözücülerin oluşturduğu gradyen çizelgesi verilmiştir. Elde edilen kromatogramlardan amino asit derişimleri, derişimi bilinen amino asit standartlarıyla elde edilen alanlar yardımı ile bulunmuştur. Amino asitlerin analizlenmesi için uygulanan koşullar çizelge 3.6’da verilmiştir.

Çizelge 3.5 Amino asit analizi için New-Pico yöntemi gradyen koşulları

t, dk	Akış hızı, cm ³ dk ⁻¹	% A	%B
0.0	1.0	100.0	0.0
10.0	1.0	54.0	46.0
10.5	1.0	0.0	100.0
11.5	1.0	0.0	100.0
12.0	1.0	0.0	100.0
12.5	1.0	100.0	0.0
18.0	1.0	100.0	0.0

Çizelge 3.6 Amino asitlerin analizlenmesi için uygulanan koşullar

Kolon	: Amino asit analiz kolonu Nova-Pak C18, Millipore
Kolon boyutları	: 3.9 mm x 300 mm
Sistem	: Ters faz kromatografi
Hareketli faz akış hızı	: 1 mL dk ⁻¹
Kolon sıcaklığı	: 38 °C
Dedektör, dalga boyu ve duyarlılık	: UV/VIS, 254 nm, 0.05 AUFS
Enjeksiyon hacmi	: 4 µL
Analiz süresi	: 18 dk
Hareketli faz A bileşimi (h/h)	: % 6 Asetonitril, %94 Deiyonize su, %1.79 (a/h) Sodyum asetat trihidrat, %0.05 Trietil amin
Hareketli faz B bileşimi (h/h)	: % 66.6 Asetonitril, %33.3 Deiyonize su

3.4.4 Organik asit derişimleri

rhGH üretiminde üretim ortamına mikroorganizmadan biyoreaktör üretim ortamına aktarılan organik asitlerin derişimlerinin belirlenmesinde yüksek basınç sıvı kromatografi sistemi (Waters, Alliance 2695, HPLC) kullanılmıştır. Organik asit derişimleri, derişimleri bilinen standart organik asit analizleriyle elde edilen kromatogramlar yardımı ile oluşturulan kalibrasyon eğrileri kullanılarak hesaplanmıştır. Organik asitlerin analizinde uygulanan koşullar çizelge 3.7’dedir (İleri 2005):

Çizelge 3.7 Organik asitlerin analizlenmesi için uygulanan koşullar

Kolon	: Capital Optimal ODS, 5 µm
Kolon boyutları	: 4.6 mm x 250 mm
Sistem	: Ters faz kromatografi
Hareketli faz akış hızı	: 0.8 ml dk ⁻¹
Kolon sıcaklığı	: 30 °C
Dedektör, dalga boyu ve duyarlılık	: Waters 2487 Dual Absorbans dedektör 254 nm
Enjeksiyon hacmi	: 5 µL
Analiz süresi	: 15 dk
Hareketli faz bileşimi (h/h)	: % 3.6 (NH ₄) ₂ HPO ₄ (a/h), %96.4 Deiyonize su

3.4.5 SAP aktivitesi

Enzim aktivitesi kazeinin enzimatik hidrolizi sonunda açığa çıkan hidrolizatların absorbanslarının spektrofotometrik ölçümüyle belirlenmiştir. Enzim aktivitenin birimi U/cm³ olarak tanımlanmıştır. Moon ve Parulekar (1991) tarafından 1 U(=1 ünite) birim zamanda açığa çıkan 4 nmol tirozin miktarı olarak tanımlanmıştır. Enzim aktivitesini tanımlamak amacıyla, borat tamponunda (pH=10) hazırlanmış % 0.5 derişimindeki kazein çözeltisinden 1 cm³ alınarak, 1 cm³ mikroorganizması ayrılmış üretim ortamı 37°C’de 105 dk⁻¹ karıştırma hızında 20 dk süreyle tepkimeye sokulur. Tepkime 2 cm³ % 10 (a/h) TCA eklenmesiyle durdurulur. Çözelti 15 dk buz-tuz banyosunda bekletildikten sonra 4°C’de 28700 g’de 10 dk santrifüjlenir. Üstte kalan sıvının absorbansı 275 nm’de ölçülür. Çalık (1998) tarafından hazırlanmış aktivite absorbans eğrisi kullanılır.

3.4.6 rhGH derişimi

rhGH derişimi tanımlanan bir elektrik alan içinde iyon veya yüklenmiş kolloidlerin farklı göç hızlarına bağlı ayırma yapan kapiler elektroforez cihazıyla (HPCE; Quanta 4000E, Waters) belirlenmiştir (Çalık vd. 1995). rhGH derişiminin belirlenebilmesi için analizlerde 75 µ çapında, 72 cm uzunluğunda kapiler ayırma kolonu kullanılmıştır. Taşıyıcı faz, çift tuz “AccuPure Z1-Methyl Reagent (Waters, WAT054825)” içeren 100 mM’lık borat tamponudur; çift-tuz kapiler yüzeyine protein adsorpsiyonu azaltmak için

kullanılır. Analizlerde enjeksiyon sırasında örneklerin ve tampon çözeltinin bulunduğu karusel yukarı kalkmakta; yaratılan yükseklik farkıyla oluşan hidrostatik basınç etkisiyle enjeksiyon yapılmaktadır. 12 kV güç kullanarak 30 dakika süreyle analiz sürdürülmüş ve elektroferogramlar alınmıştır. HPCE’de analizlere başlamadan önce standart verilerek, derişimleri bulunacak proteinlerin kalma süresi ve cihazın performansı kontrol edilmiştir.

Protein derişim kalibrasyonu, derişimleri bilinen rhGH (Humatrope, Elli Lilly, Fransa) örnekleri standart olarak HPCE’de analiz edilip ve derişim-alan eğrisi oluşturulmak suretiyle hazırlanmıştır. Analiz detayları çizelge 3.8’dedir:

Çizelge 3.8 HPCE analiz koşulları

Kolon	: Silika (SiO ₂) kaplı kapiler kolon
Güç kaynağı	: Pozitif
Kolon boyutları	: 72 cm x 75 µm
Enjeksiyon hacmi	: 10 µL
Enjeksiyon türü	: Hidrostatik basınç
Enjeksiyon süresi	: 30 s
Proses sıcaklığı	: 15 °C
Kullanılan tampon	: Modifiye Borat tamponu (pH = 10)
UV-dedektör	: 214 nm
İşletme voltaj	: 12 kV
Analiz süresi	: 30 dk

3.4.7 rhGH tayini: SDS-PAGE ve WESTERN-BLOT yöntemleri

Metabolik mühendislik araştırma programı ile araştırma grubumuzda geliştirilmiş pMK4::*pre(subC)::hGH* rekombinant plasmitini (Özdamar vd. 2009) taşıyan rekombinant *B.subtilis* BGSC-1A751 (*npr aprE*) ile sentezlen, biyoreaktör üretim ortamına aktarılan rhGH’nin aktif yapıda olup-olmadığını belirlemek ve derişimini ölçmek için Western-blot yöntemi kullanılmıştır. Western-blot yönteminin uygulanabilmesi için ilk aşamada üretim ortamına salgılanan tüm proteinlerin ayrıldığı SDS-PAGE yönteminin uygulanması gerekir. Elektroforez, yüklü moleküllerin bir elektrik alanda farklı davranmalarından yararlanarak yapılan ayırma işlemidir. Matris

kağıt veya jeldir. Jel matrisi agaroz, nişasta ve poliakrilamid olabilir. Poliakrilamid jelin kullanıldığı yönteme Poliakrilamid Jel Elektroforez (PAGE) yöntemi denir (Laemmli 1970). Poliakrilamid jel elektroforezi SDS-PAGE (denatüre edici page) veya ND-PAGE(denatüre etmeyen page) olarak uygulanabilir.

3.4.7.1 SDS-PAGE yöntemi

Analizlenecek olan protein çözeltisi eşit hacimde örnek yükleme tamponu ile karıştırılarak kaynar-su banyosunda 2-3 dk inkübe edilir. Örnek yükleme tamponunda bulunan merkaptotanol protein moleküllerinin üç boyutlu yapısında bulunan disülfid bağlarını redükte edici etkisiyle koparır. Protein moleküllerinin üç boyutlu yapısındaki diğer kuvvetler ise ısıtılarak yok edilir ve böylece protein molekülleri düz zincir haline geçerler. Örnek yükleme tamponundaki gliserol, yüklenecek protein çözeltisinin yoğunluğunu artırarak jelin kuyucuklarının dibine çökmesini sağlar. Jelin yükleneceği SDS-PAGE jel yükleme tankı hazırlanır. Jel, "Slab" denilen iki cam tabaka arasında hazırlanır. Cam tabakaların iki yanına jelin arzu edilen kalınlığı (0.5-1 mm) ölçüsünde birer "spacer" yerleştirilir. Camlar kısaç yardımıyla sıkıca tutturulur. Jelin alt kısmının geleceği yere de yine aynı kalınlıkta dip "spacer"ı yerleştirilir ve kısaç yardımıyla sıkıştırılır. Herhangi bir sızıntı olup olmadığı su ile kontrol edilir. Sızıntı olmadığından emin olunduktan sonra hazırlanmış olan resolving jel bir enjektör yardımıyla dökülür. Jeli dökerken hava kabarcığı oluşturulmamasına dikkat edilmelidir. Polimerizasyon havadaki oksijenden etkileneceği için jel polimerleşmek üzere iki cam arasına doldurulduktan sonra üzerine pipet yardımıyla su ile doyurulmuş bütanol konur. Polimerleşmeden sonra jel üzerindeki bütanol saf su ile yıkanarak uzaklaştırılır. Polimerleşmiş olan resolving jelin üzerine stacking jel dökülüp üzerine tarak yerleştirilir. Polimerleşme tamamlandıktan sonra jelin üst kısmına yerleştirilmiş olan tarak çıkartılır ve iki cam arasında bulunan jel bu durumda tanka yerleştirilir. Sonra tanka koşturma tamponu eklenir ve 25 mA sabit akım (250 V) verilerek proteinlerin koşturulması sağlanır. Jelde yürütülen protein bantlarının moleküler ağırlıklarının belirlenebilmesi için jele moleküler ağırlığı bilinen standart protein bantları yüklenir.

3.5 RNA'dan Ters Transkripsiyon ile cDNA Sentezi ve Mikrodizin Analizleri

Mikrodizin analizleri için farklı koşullarda üretilen *r-B. subtilis* hücrelerinden RNA izolasyonu “QIAGEN RNeasy Kit” kullanılarak yapılmıştır. İzole edilen mRNA'dan cDNA üretimi ve mikrodizin analiz yöntemi, alt-basamaklarına göre sınıflanmış olarak aşağıdaki gibidir:

3.5.1 cDNA sentezi (QIAGEN kit ile)

Poly-A kontrol kiti (Poly-A RNA Control Kit (P/N 900433)) ile, seri seyretmeler yapılarak pozitif kontroller oluşturulur. cDNA sentezi için izole edilen RNA, rastgele primerlere bağlanarak cDNA sentezi gerçekleşir. Bu amaçla önce aşağıdaki cDNA sentez bileşenleri belirtilen derişimde hazırlanır (Çizelge 3.9):

Çizelge 3.9 cDNA sentez bileşenleri

Toplam RNA	10 µg
75ng/ µL primer karışımı	10 µl
Seyreltilmiş Poly-A RNA standartı	2 µl
Nükleaz içermeyen H ₂ O	30µl'ye tamamlanır

RNA/Primer karışımı 70°C'de 10 dakika ve 2°C'de 10 dakika inkübe edilecek ve 4°C'ye soğutma yapılacak şekilde “termal döngü cihazına” yerleştirilir. İçinde 30 µl reaksiyon solüsyonu olan PCR tüpünün üstüne aşağıda bileşen ve hacim değerleri verilen primer hibridizasyon çözeltisi (Çizelge 3.10) eklenir:

Çizelge 3.10 Primer hibridizasyon çözeltisi

RNA/Primer hibridizasyon karışımı	30 µl
5X 1 st Strand Tamponu	12 µl
100mM DTT	6 µl
10mM dNTP	3 µl
Suprase In (20U/ µL)	1.5 µl
SuperScript II (200U/ µL)	7.5 µl
Toplam hacim	60 µl

Reaksiyon karışımını içeren PCR tüpü, cDNA sentezi için; 25°C’de 10 dakika, 37 °C’de 60 dakika, 42°C’de 60 dakika, ve 70°C’de 10 dakika inkübasyon ve 4°C’ye soğutma olacak şekilde termal-döngü cihazına konur. Son aşamada dönüşmeyen RNA’nın uzaklaştırılması için, önce 20 µl, 1 N NaOH eklenir ve 65°C’de 30 dakika inkübe edilir. Daha sonra, nötralizasyon için 20 µl, 1 N HCl eklenir. Gerekirse örnek -20°C’de saklanabilir.

3.5.2 cDNA’nın saflaştırılması (QIAGEN MinElute Kit)

Hazırlanan cDNA sentez örneğinin 5- katı olacak şekilde PB tamponu eklenir. Tampon eklendikten sonra örneğin rengi sarı olmalı, mor olmamalıdır. Eğer mor ise, 3 M Na-asetat (pH = 5.0) eklenerek, rengin sarı hale gelmesi sağlanmalıdır. 600 µl örnek, saflaştırma kolonuna konur, toplama tüpüne yerleştirilir, 1 dakika maksimum hızda santrifüj edilir. Alttaki sıvı faz atılır, aynı toplama tüpü kullanılabilir. 750 µl PE tamponu eklenir, 1 dakika maksimum hızda santrifüj edilir. Alttaki sıvı faz atılır. Fazla etanolün uzaklaştırılması için ilavaten 1 dakika maksimum hızda bir kez daha santrifüj yapılır. Alttaki sıvı faz atılır. Saflaştırma kolonu, steril bir Eppendorf’a yerleştirilir. Üstüne 12 µl yıkama tamponu konur, oda sıcaklığında 1 dakika bekletilir. Daha sonra 1 dakika maksimum hızda santrifüjlenir. Eldeki DNA’nın miktarı Nanodrop’la ölçülür ve kaydedilir.

3.5.3 cDNA fragmentasyonu

Hazırlanan DNA’nın mikrodizin çipine bağlanabilecek uzunluğa getirilmesi için 50-200 bp olacak şekilde fragmente edilmemesi amacıyla önce cDNA’nın derişimi belirlenir (kullanılan enzimler bu derişime göre ayarlanır). Aşağıdaki fragmentasyon reaksiyonu bileşenleri (Çizelge 3.11) belirtilen hacimlerde hazırlanır:

Çizelge 3.11 Fragmentasyon Reaksiyonu Bileşenleri

10XOne-Phor-All-Tamponu	2 µl
cDNA	10 µl
DNase I	0.6 U/ µg cDNA olacak miktar
Nükleaz içermeyen H ₂ O	20 µl’ye tamamlanır

Hazırlanan çözelti 37°C’de 10 dakika ve 98°C’de 10 dakika olacak şekilde termal-döngü cihazına yerleştirilir. Elde edilen örnek -20°C’de saklanabilir. Fragmentasyonun olup olmadığını görmek için, 2.5 µl örnek % 4 agaroz jelde koşturulabilir.

3.5.4 Uç işaretleme

Fragmente olmuş cDNA örneklerinin mikrodizin analizi sırasında ışığa yapması için kullanılan işaretlenme reaksiyon karışımı bileşen ve hacimleri çizelge 3.12’deki gibidir. Karışım termal-döngü cihazına 37°C’de 1 saat yerleştirilir ve reaksiyon 2 µL 0.5 M EDTA ile durdurulur. Örnekler -20°C’de saklanabilir.

Çizelge 3.12 cDNA İşaretlenme Reaksiyon Karışımı

5X reaksiyon tampon	10 µL
GeneChip DNA etiketleme reaktifi	2 µL
Terminal deoksiniükleotit transferaz	2 µL
Fragmente edilmiş cDNA ürünü	20 µL örnekten kalan
Nükleaz içermeyen H ₂ O	16 µL
Toplam hacim	50µL

3.5.5 Hibridizasyon (49 Format-Standart Affymetrix Prosedürü)

Mikrodizin analizi için, elde edilen örneğin çipe yüklendiği bu aşama için hibridizasyon fırını 45°C’ye önceden ayarlanmalıdır. Çip mutlaka oda sıcaklığına getirilmiş olmalıdır. Tek prob dizini için hibridizasyon çözeltisinin bileşen ve hacimleri çizelge 3.13’te verilmiştir. Burada yer alan 2X tamponunun bileşenleri ve hacimleri çizelge 3.14’tedir. Hazırlanan tampon ışık görmemeli, 2-8°C’de saklanmalıdır.

Çizelge 3.13 Hibridizasyon Çözeltisinin Bileşimi

2X hibridizasyon tamponu	100 µl
Control oligo (Affymetrix, P/N 900301)	3.3 µl
10 mg/ml Herring sperm DNA (Promega Corporation, P/N D1811)	2.0 µl
50 mg/mL BSA	2.0 µl
Parçalanmış ve işaretlenmiş cDNA	50 µl
Nükleaz içermeyen H ₂ O	200 µl’ye tamamlanır

Çizelge 3.14 2X Tamponunun Bileşimi

12X MES stok tampon	8.3 ml 50 ml ⁻¹
5 M NaCl	17.7 ml 50 ml ⁻¹
0.5 M EDTA	4.0 ml 50 ml ⁻¹
Tween 20 (10%)	0.1 ml 50 ml ⁻¹
Moleküler biyolojik saflıkta H ₂ O	19.9 ml

12X MES tamponunun bileşenleri ve hacimleri çizelge 3.15'te verilmiştir. Hazırlanan tamponun pH'ı 6.5 - 6.7 arasında olmalı ve 0.22 µm filtre ile süzülerek kullanılmalıdır. Otoklavlanmamalı ve ışık görmemeli; 2-8°C'de saklanmalıdır. Örneğin çipe yüklenmesi için önce, oda sıcaklığına gelmiş olan çipin septalarından birine pipet ucu saplanır. Sivri ucu olan mikrodizin çip pipet ucu kullanılarak örnek alınır; pipette hava kabarcığı olmamalıdır. Örnek çipe yüklenir. Hava kabarcığı olmamasına dikkat edilmelidir. 200 µl örnek tüm çipi doldurmaz, boşluk kalır. Pipet uçları septalardan çekilir, septalar etiket yardımıyla kapatılır. Çip fırına, karşılığı olacak şekilde (dengeli) yerleştirilerek, 60 rpm ve 45°C'da 16-18 saat hibridizasyon işlemi gerçekleştirilir.

Çizelge 3.15 12X MES Tamponunun Bileşimi

MES hidrat	64.61 g
MES sodyum tuzu	193.3 g
Moleküler biyolojik saflıkta H ₂ O	800

3.5.6 Yıkama-Boyama-Tarama (Genechip Operating Software)

Çizelge 3.16'da verilen yıkama-A tamponu hazırlanır; 0.2 µm filtreden geçirilir ve oda sıcaklığında saklanır. Çizelge 3.17'de verilen yıkama-B tamponu 0.2 µm filtreden geçirilir. Işık görmemeli ve 2-8°C'de saklanmalıdır. Üç ayrı amber (koyu kahverengi) Eppendorf tüpünde çizelge 3.18-3.20'deki işaretleme reaktifleri hazırlanır.

Çizelge 3.16 Yıkama-A Tamponu Bileşimi

20X SSPE	300 ml L ⁻¹
Tween 20 (10%)	1 ml L ⁻¹
Moleküler biyolojik saflıkta H ₂ O	699

Çizelge 3.17 Yıkama-B Tamponu Bileşimi

12X MES stok tampon	83.3 ml L ⁻¹
5 M NaCl	5.2 ml L ⁻¹
Tween 20 (10%)	1 ml L ⁻¹
Moleküler biyolojik saflıkta H ₂ O	910.5 ml

Çizelge 3.18 Streptavidin çözeltisinin bileşen ve miktarları

2X Etiketleme tamponu	300 µl
50 mg/mL BSA	24 µl
1 mg/mL Streptavidin	6 µl
Nükleaz içermeyen H ₂ O	270 µl
Toplam hacim	300 µl

Çizelge 3.19 Antikor çözeltisi bileşen ve miktarları

2X MES Etiketleme Tamponu	300 µl
50 mg/ml BSA	24 µl
10 mg/ml Normal Goat IgG Stok	6 µl
0.5 mg/ml Biotinylated Ab	6 µl
Nükleaz içermeyen H ₂ O	264 µl
Toplam hacim	600 µl

Çizelge 3.20 SAPE çözeltisinin bileşen ve miktarları

2X MES Etiketleme Tamponu	300 µl
50 mg/ml BSA	24 µl
1 mg/ml SAPE	6 µl
Nükleaz içermeyen H ₂ O	270 µl
Toplam hacim	600 µl

Gerekli yıkama ve boyama çözeltileri, mikrodizin cihazının (Affymetrix Genechip Scanner 3000 7G) uygun bölmelerine (yıkama/boyama istasyonları) yerleştirilir. Hibridizasyon işleminden geçirilen çip fırından alınarak, her birine 4 çip konabilen

kartuşlar içerisinde mikrodizin cihazına yerleştirilir. Cihazda *Bacillus subtilis* için uygun dizi (array) ve yıkama/boyama koşulları (süre vb) seçilerek cihaz programlanır. Yıkama, boyama ve tarama işlemleri, oluşturulan programlara göre cihaz tarafından gerçekleştirilir. Analiz tamamlandıktan sonra, çip çıkarılır. Oluşan .dat ve .cel dosyaları üzerinden tarama sonucu görsel olarak elde edilir. .cel dosyası kullanılarak .chip dosyası elde edilir. .chip dosyası yardımıyla ekspresyon sonuçları elde edilir. Mikrodizin analizi ön-değerlendirme (*Robust Multi-array Average*: RMA) sonuçları; bir başka deyişle prob setlerinin ekspresyon seviyeleri, “Affymetrix Genotyping Console” yazılımı kullanılarak elde edilmiştir. RMA adı verilen bu değerler çip görüntüsünün arka-plan düzeltilmesi, normalizasyonu ve toparlanması adımları ile elde edilmektedir. Ekspresyon seviyeleri, problemlerle elde edilen ışıma değerlerinin 2 tabanına göre logaritmalarıdır. *hGH* geni taşıyan rekombinant *B. subtilis* 1A751’in (Özdamar vd. 2009) oksijen aktarımından etkilenen genleri, GeneSpring GX (Agilent Technologies) yazılımındaki %99.5’den yüksek ($p < 0.005$) güven aralığı ve üçten büyük ($ER > 3$) ekspresyon oranı kriterleriyle gerçekleştirilen “tek yönlü varyans analizi (ANOVA)” ile belirlenmiştir (<http://genespring-support.com> 1999).

3.6 Hücre içi tepkime hızlarının bulunması

Hücre yarı-kesikli bir mikrobiyoreaktör olarak ele alınarak hücre içindeki herbir *i*-metaboliti için, *i*-metabolitin tepkimelerle net oluşum hızı ile hücre içine net aktarım hızının toplamı *i*-metabolitin hücre içindeki birikim hızına eşitlenerek kütle-korunum temelli denklemler oluşturulur (Çalık vd. 1999, Çalık ve Özdamar 2002). Kütle korunum denklemleri lineer vektörel adi diferansiyel denklem yapısında aşağıdaki gibi gösterilir:

$$\mathbf{A} \cdot \mathbf{r}(t) = \mathbf{c}(t) \quad (3.3)$$

Burada $\mathbf{A}$ tepkime sisteminin stokiometrik katsayı matrisi, $\mathbf{r}(t)$ birim katalizör kütlesi olan hücre başına tanımlanmış tepkime hız vektörü, ve $\mathbf{c}(t)$ metabolit birikim vektörüdür.

$\mathbf{c}(t)$ iki alt-vektörden oluşur,

$$\mathbf{c}(t) = \mathbf{c}_1(t) + \mathbf{c}_2(t) \quad (3.4)$$

$\mathbf{c}_1(\mathbf{t})$ ve $\mathbf{c}_2(\mathbf{t})$ sırasıyla hücre dışı ve hücre içi metabolit birikim vektörleridir. Yaklaşık yataşkın koşul varsayımıyla hücre içi metabolit birikim vektörü $\mathbf{c}_2(\mathbf{t})$ sıfıra eşitlenir. Kütle korunum temelli stokiyometrik lineer diferansiyel denklem sistemi içinde değişken olarak tepkime hızlarını barındıran matematik modeli oluşturur. Denklem 3.3'deki vektörel diferansiyel denklem için m metabolit sayısına, n tepkime sayısına eşit olan stokiyometrik katsayı matrisi oluşturulur (Çalık vd. 1999, Çalık ve Özdamar 2002). Modelin bilinmeyenleri olan hücre-içi tepkime hızlarını (akıları) bulmak amacıyla amaç fonksiyonu Z tanımlanır:

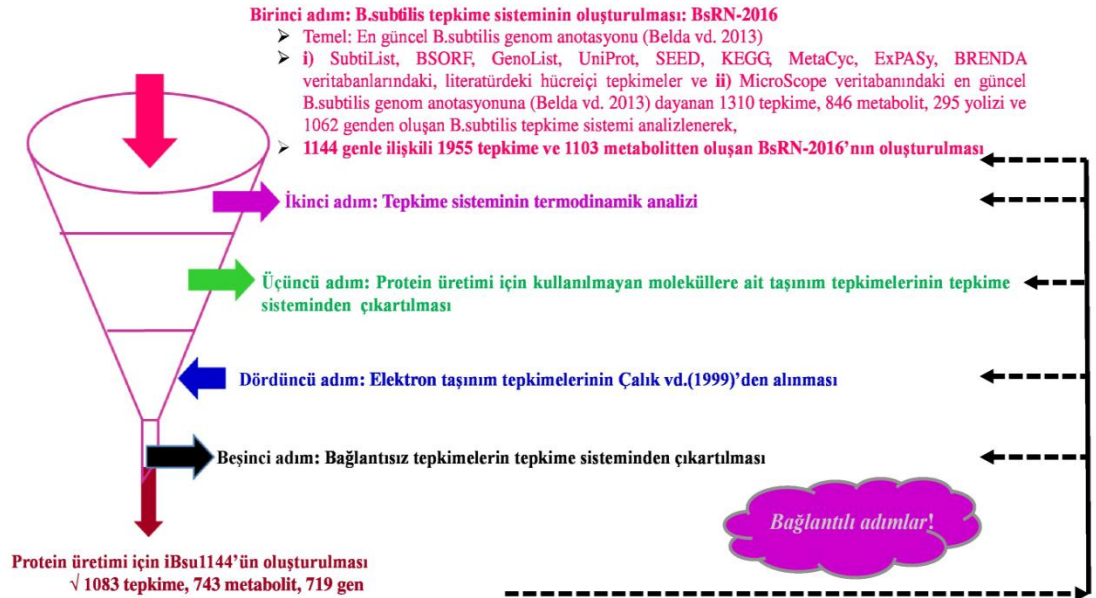
$$Z = \sum \alpha_i \cdot r_i \quad (3.5)$$

Burada α_i i- bileşenin r_i tepkimesindeki stokiyometrik katsayısıdır. Hücre içi tepkime hızları denklem 3.5'deki amaç fonksiyonu Z'nin minimizasyonu ile çözülür. Amaç fonksiyonu SAP sentez hızı ile hücre dışına SAP salgılanma hızı arasındaki fark olarak tanımlanır (Çalık vd. 1999). Deneysel veriler iBsu1144'e aktarıldıktan sonra modelin işletimi GAMS 2.5 (General Algebraic Modeling System, GAMS Development Corp, Washington, DC) programında Z'nin minimizasyonu ile gerçekleştirilerek akılar hesaplanmıştır. *B.subtilis*'in çoğalma açısından en yüksek verimle yaşamadığı deneysel olarak gösterildiği için (Fischer ve Sauer 2005), hücre sentezinin maksimizasyonu amaç fonksiyonu olarak kullanılmamıştır. Modelin değişkenleri olan tepkime hızlarının birimi mmol/(g_{KH} st), hücre sentezine yönelen akının birimi μ (st⁻¹)'dir (Çalık vd. 1999). Akı değişkenliği analiziyle aktif ve kapalı tepkimeler ile genleri belirlenir. iBsu1144 kullanılarak hücre içinde SAP birikim hızının minimize ve maksimize edilmesiyle akı değerleri hesaplanır. Her iki işletimde akı değeri sıfırdan farklı tepkimeler aktif, sıfır olan tepkimeler ise kapalı olarak değerlendirilir (Burgard vd. 2004, Chapman vd. 2015).

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 *B. subtilis* genom-seviye modelinin oluşturulması: iBsu1144

Doktora tez araştırması kapsamında *B. subtilis* için güncel gen dizini ve genom anotasyon bilgisine (Belda vd. 2013) dayanan gen-enzim-tepkime bilgisi kullanılarak 4,215,606 baz çifti (bp) ve 4463 gene sahip *B. subtilis* için genom seviye model (iBsu1144) şekil 4.1’de özetlenen, bağlantılı beş basamakta oluşturulmuştur:



Şekil 4.1 iBsu1144'in oluşturulması

1. **i)** KEGG, SEED, GenoList, MetaCyc, UniProt, SubtiList, ExPASy, BSORF, BRENDA veritabanları ve literatürdeki tepkimeler; ve, **ii)** MicroCyc veritabanındaki en güncel *B. subtilis* genom anotasyonuna (Belda vd.2013) dayanan 1310 tepkime, 846 metabolit, 295 yolizi ve 1062 genden oluşan *B. subtilis* tepkime sistemi analizlenerek, *B. subtilis* tepkime sistemi BsRN-2016 oluşturulmuştur. SAP sentez tepkimesini de içeren BsRN-2016 1144 genle bağlantılı 1955 tepkime ve 1103 metabolit içerir (EK 3 Çizelge 1-4).

2. Termodinamik analiz gerçekleştirilerek tepkimelerin tersinir olma durumları belirlenmiştir. Standart molar serbest Gibbs oluşum enerjileri ($\Delta G_{f_i}^o$) (Henry vd. 2009) kullanılarak, tepkimelerin standart molar serbest Gibbs enerji değişimleri (ΔG_R^o) denklem 4.1'e göre hesaplanmıştır:

$$\Delta G_R^o = \sum_i \alpha_i \Delta G_{f_i}^o \quad (4.1)$$

Burada α_i , i bileşeninin stokiyometrik katsayısıdır.

Her tepkimenin termodinamik denge sabiti (K) standart koşullardaki (25°C ve 1 bar)

ΔG_R^o değerleri kullanılarak denklem 4.2'ye göre hesaplanmıştır:

$$\Delta G_R^o = -RT \ln K \quad (4.2)$$

25°C için gerçekleştirilen termodinamik analizler sonucu, denge sabitleri kullanılarak denge dönüşümleri (X_{ie}) hesaplanmıştır. Denge dönüşümleri (X_{ie}) hesaplanırken, girdi moleküllerinin başlangıç derişimleri 1 mol/dm³ alınmıştır. Denge dönüşümleri 0.90 ve daha büyük olan tepkimeler ($X_{ie} \geq 0.90$) tersinmez olarak değerlendirilmiştir.

3. Protein sentezi için gerekli olan, hücre zarında gerçekleşen 30 taşıyım tepkimesi BsRN-2016'ye eklenmiştir. Hücre duvarında gerçekleşen tepkimeler Belda vd.(2013)'de olduğu gibi, BsRN-2016'ye eklenmemiştir.

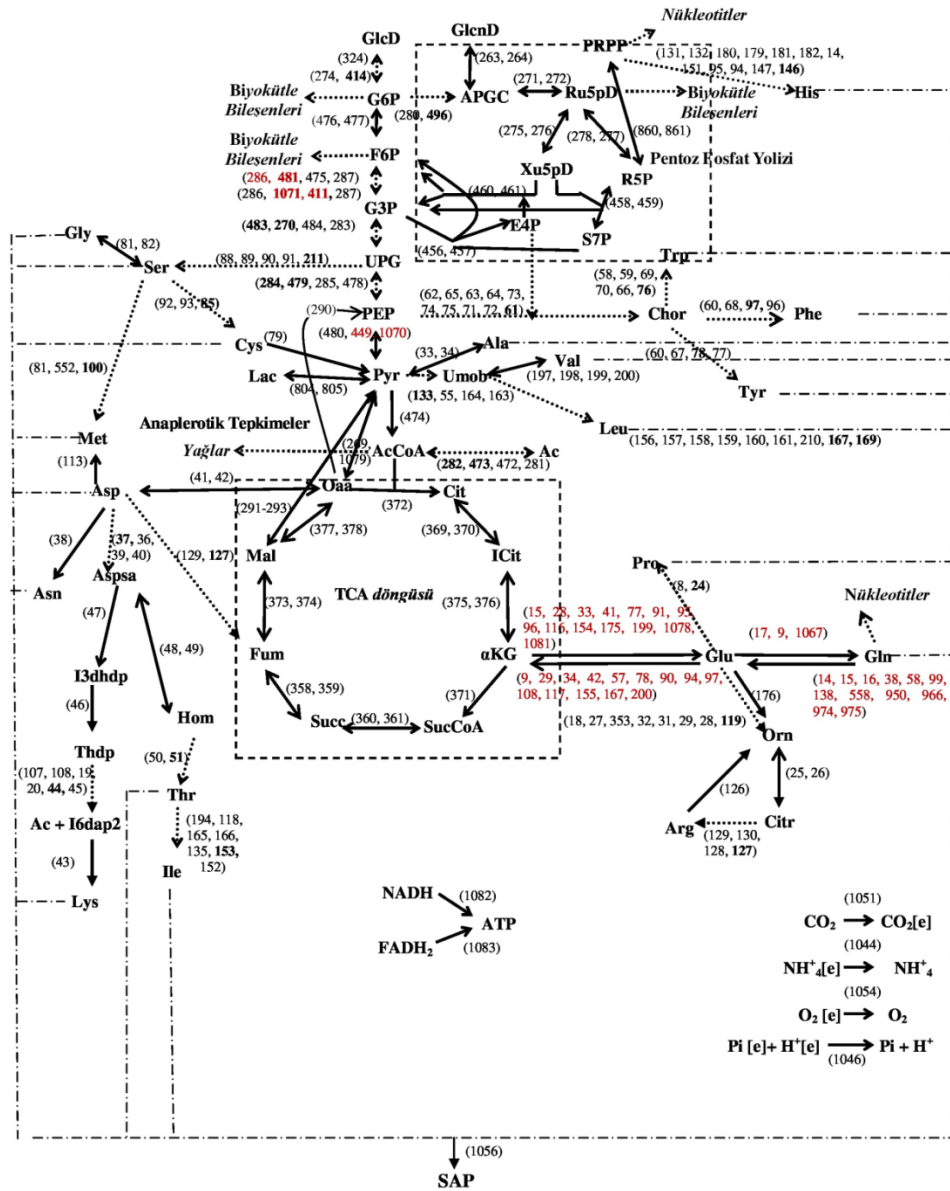
4. Doktora tez araştırmasında BsBRM-1999 olarak kısaltılan, biyokimyasal tepkime temelli matematik modeldeki (Çalık vd.1999) elektron taşıyım tepkimeleri BsRN-2016'ya eklenmiştir. Bu tepkimelerin BsRN-2016'deki numaraları R1045* ve R1046*'dır (EK 3 Çizelge 1-4).

5. Güncel gen dizin analizi ve gen-enzim-tepkime bilgisine (Belda vd.2013) dayanarak oluşturulan BsRN-2016 (EK 3 Çizelge 1-4) analizlenerek yolizlerindeki bağlantısız tepkimeler belirlenmiştir ve hücreiçi tepkime sisteminden bağlantısız tepkimeler çıkartılarak sitratın karbon kaynağı olarak kullanıldığı SAP üretimi için tasarlanan fermentasyon prosesi için iBsu1144 genom seviye modeli oluşturulmuştur. 719 genle bağlantılı 1083 tepkime ve 743 metabolit içeren iBsu1144 EK 4 Çizelge 1-5'te sunulmuştur. 719 iBsu1144 geninden 622'si yaşam için gereksiz, 95'i gereklidir, iki

genin gerekliliği bilinmemektedir (EK 4 Çizelge 1-5). *B. subtilis* hücre içi tepkime sistemindeki tepkime hızlarını/akıları hesaplamak için, 1083 tepkime ve 743 metabolit içeren *iBsu1144* tepkime sistemindeki 743 metabolitin herbiri için, denklem-4.3 yapısında birinci-mertebe adi diferansiyel denklemlerden:

$$r_{Ri} + r_{Ti} = d(C_i)/dt \quad (4.3)$$

oluşan kütle-korunum temelli genom seviye matematik model *iBsu1144* kurulmuştur (Bölüm 2.4). *iBsu1144* metabolik haritası şekil 4.2’de gösterilmiştir.



Şekil 4.2 *iBsu1144* metabolik haritası

Kesikli ok: bir metabolitin birden çok tepkimeyle olan dönüşümü; **Kalın R#**: ardışık tepkime sisteminin son tepkimesinin numarası; **R#**: paralel tepkimeler

iBsu1144'ün rankı, yani bağımsız lineer denklem sayısı ile serbestlik derecesi, sırasıyla, MATLAB 2015 kullanılarak 697 ve 386 olarak hesaplanmıştır. Dolayısıyla sistem az tanımlıdır ve optimizasyonla çözüm yapılmıştır. Çözüm vektörü, yani tepkime hızları hücre, hücre dışı SAP, amino asit ve sitrat gibi organik asit derişimlerinden oluşan fermentasyon verileriyle lineer programlamanın kullanıldığı akı analizi gerçekleştirilerek hesaplanmıştır. Akı değışkenliği analizi ile SAP üretiminin MOT koşulunda açık ve kapalı tepkimeler ile genleri belirlenmiştir (Burgard vd. 2004, Chapman vd. 2015).

Oluşturulan *B.subtilis* GEM iBsu1144 Kunst vd. (1997)'nin gen dizinlemesine dayalı birinci nesil genom seviye modeller (Oh vd. 2007, Henry vd. 2009) ve Barbe vd.(2009)'nin gen dizinlemesine dayalı ikinci nesil genom seviye modeller (Tanaka vd. 2013, Hao vd. 2013) ile Çizelge 4.1-4.4 ve EK 4 Çizelge 3'te karşılaştırılmıştır. Belda vd. (2013)'nin güncel gen dizinlemesi ve gen-enzim-tepkime bilgisi sonucu, iBsu1144'deki 200 tepkime yenidir ve ilk defa kullanılmaktadır (EK 4 Çizelge 3). *B.subtilis* hücre bileşenlerini oluşturan tepkimeler ve hücre sentez tepkimesi Oh vd. (2007) ile aynıdır (EK 4 Çizelge 3). iBsu1144'teki 1083 tepkimeden, 844'ü Oh vd. (2007), 660'ı Henry vd. (2009), 655'i Tanaka vd. (2013), ve 663'ü Hao vd. (2013)'de vardır (EK 4 Çizelge 3). iBsu1144'deki 616 tepkime Oh vd. (2007), Henry vd. (2009), Tanaka vd. (2013), ve Hao vd. (2013)'da vardır (EK 4 Çizelge 3).

4.1.1 iBsu1144'ün doğruluğu

iBsu1144'ün doğruluğu yaşam için gerekli genlerin (*essential genes*) tahmin edilmesine dayanılarak hesaplanmıştır. Yaşam için gerekli 95 genin herbiri için i) genle ilgili tepkimeler iBsu1144'ten silinmiştir; ii) glukoz tüketim hızı 5 mmol/(g_{KH} st) varsayılmıştır; iii) hücre sentez hızı maksimize edilmiştir; ve iv) iBsu1144 ile *B. subtilis*'in çoğalma hızı hesaplanmıştır. iBsu1144 ile çoğalma hızının sıfır olarak hesaplanması genin çoğalma için gerekli olduğunu ve iBsu1144'in doğru sonuç verdiğini gösterir. Çoğalma hızının sıfırdan farklı olması iBsu1144'in yanlış sonuç verdiğini gösterir. *mtbP*, *purB*, *kbl*, *ypjQ*, *yutG*, *yitA*, *ylnB*, *yqiD*, *ywlF*, ve *ndk* genleri yaşam için gerekli varsayılarak iBsu1144'nin doğruluğu %78 bulunmuştur.

Çizelge 4.1 *Bacillus subtilis* genom seviye modelleri (GEM)

Gen-enzim- tepkime bilgisinin bağlı olduğu genom dizinleme çalışması	Genom seviye model (GEM)	Gen #	Tepkime #	Metabolit #	GEM'in kullanımı:	
					GEM'in çözümü	Ürün
Kunst vd. (1997)	Oh vd. (2007)	844	1021	988	Hücre sentezinin maksimizasyonu	Hücre
	Goelzer vd. (2008)	534	563	456	Hücre bileşenlerinin sentezlenme durumlarının değerlendirilmesiyle çoğalmanın tahmin edilmesi	Hücre
	iBsu1103 (Henry vd. 2009)	1103	1437	1139	Hücre sentezinin maksimizasyonu	Hücre
Barbe vd. (2009)	iBsu1103V2 (Tanaka vd. 2013)	1103	1451	1156	Hücre sentezinin maksimizasyonu	Hücre
	iBsu1147 (Hao vd. 2013)	1147	1742	1456	Doğrulama: Hücre sentezinin maksimizasyonu, GEM'in düzeltilmesi: ATP sentezinin maksimizasyonu, Metabolik tasarım: Hücre ve ürün sentez hızlarının minimizasyon ve maksimizasyonları	Hücre, riboflavin, Egl-237, izobütanol, (R,R)-2,3-bütandiol
Belda vd. (2013)	iBsu1144	1144	1955	1103	*Hücre içi SAP birikiminin minimizasyonu	Serin alkali proteaz

*SAP: serin alkali proteaz

Çizelge 4.2 *Bacillus subtilis* GEM'lerinin oluşturulması ve doğrulanmasında kullanılan veri tipleri

Genom seviye model (GEM)	Veri Tipi						
	Substrat tüketim deneylerinin verileri (Oh vd. 2007)	LB ortamında yaşam için gerekli genler (Kobayashi vd. 2003)	Minimal ortamda yaşam için gerekli genler (Fischer ve Sauer 2005)	Genler arası bölgelerin silinmesi (Morimoto vd. 2008)	Kromozomlar arası bölgelerin silinmesi (Tanaka vd. 2013)	Karbon kaynaklarında çoğalma (Dauner ve Sauer 2001, Dauner vd. 2002)	** Yaşam için gerekli genler
Oh vd. (2007)	+	+	-	-	-	-	-
Goelzer vd. (2008)	+	+	+	-	-	-	-
iBsu1103 (Henry vd. 2009)	+	+	-	+	-	-	-
iBsu1103V2 (Tanaka vd. 2013)	+	+	-	+	+	-	-
iBsu1147 (Hao vd. 2013)	-	-	-	+	-	+	+
*iBsu1144	-	-	-	-	-	-	+

* Protein sentezi için gerekli olmayan, hücre zarı ve hücre duvarında gerçekleşen taşınım tepkimeleri iBsu1144'e alınmamıştır. Dolayısıyla, substrat tüketim deneylerinin verileri (Oh vd. 2007) iBsu1144'ün doğrulanmasında kullanılmamıştır. ** Yaşam için gerekli genler bilgisi iBsu1144 için *SubtiWiki* veritabanından (Michna vd. 2014, <http://subtiwiki.uni-goettingen.de> 2009), iBsu1147 (Hao vd. 2013) için DEG veritabanından (Zhang vd. 2004) alınmıştır.

Çizelge 4.3 *B.subtilis* GEM’lerinin oluşturulması ve doğrulanmasında en uygun akı dağılımlarının hesaplanması için kullanılan stratejiler

Genom seviye model (GEM)	Strateji										
	*Çoğalmanın maksimizasyonu	Hücre canlılığı için ölçüt seçimi	Substrat tüketim hızı seçimi	O ₂ taşınım hızı seçimi	LB ortamının bileşiminin seçimi	İşlevi bilinmeyen genlerin sürekli ekspres edildiği varsayımı	**Grup katkı yöntemi	Tepkimelerin tersinirliğiyle ilgili geliştirilen kurallar	Yaşam enerjisi	***Yaşam için gerekli genler	Hücre içinde protein birikiminin minimizasyonu
Oh vd. (2007)	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
Goelzer vd. (2008)	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-
iBsu1103 (Henry vd. 2009)	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-
iBsu1103V2 (Tanaka vd. 2013)	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-
iBsu1147 (Hao vd. 2013)	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-
iBsu1144	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+

* *B. subtilis*’in idealin altında hücre verimine sahip olduğu deneysel olarak gösterilmiştir (Fischer ve Sauer 2005).

** Grup katkı yönteminin özü varsayımlara dayalıdır.

***Yaşam için gerekli olduğu bildirilen genlerin bazılarının silindiği durumlarda *B.subtilis*’in yaşamaya devam ettiği gösterilmiştir (Michna vd. 2014).

Çizelge 4.4 *B. subtilis* GEM'lerinin oluşturulma ve doğrulanma süreçlerinde kullanılan veri tiplerine dayanan doğrulukları

Genom seviye model (GEM)	Veri Tipi						
	Substrat tüketim deney verileri (Oh vd. 2007)	LB ortamında yaşam için gerekli genler (Kobayashi vd. 2003)	Minimal ortamda yaşam için gerekli genler (Fischer ve Sauer 2005)	Genler arası bölgelerin silinmesi (Morimoto vd. 2008)	Kromozomlar arası bölgelerin silinmesi (Tanaka vd. 2013)	Karbon kaynaklarında çoğalma (Dauner ve Sauer 2001, Dauner vd. 2002)	* Yaşam için gerekli genler
Oh vd. (2007)	74 % (200/271)	94% (720/766)	-	-	-	-	-
Goelzer vd. (2008)	58% (7/12)	98% (597/612)	98% (127/130)	-	-	-	-
iBsu1103 (Henry vd. 2009)	80.4% (218/271)	96.5% (1064/1103)	-	88.9% (112/126)	-	-	-
iBsu1103V2 (Tanaka vd. 2013)	79.7% (216/271)	96.8% (1062/1097)	-	91.3% (115/126)	96% (563/587)	-	-
iBsu1147 (Hao vd. 2013)	-	-	-	91.3% (115/126)	-	100% (8/8)	96.1% (1102/1147)
iBsu1144	-	-	-	-	-	-	78% (76/95)

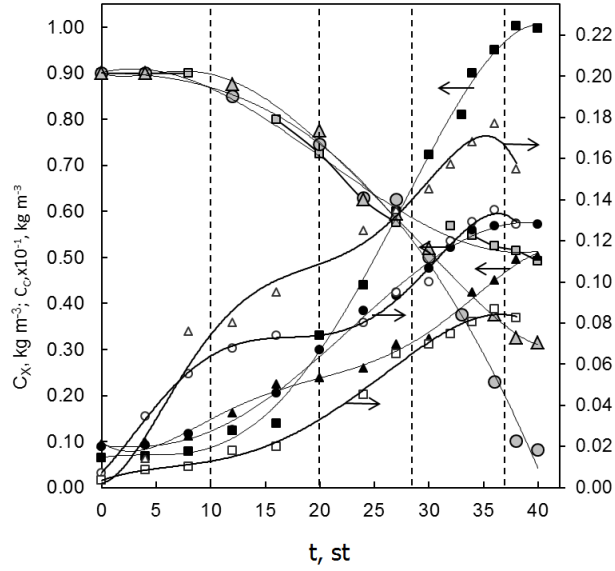
*** Yaşam için gerekli genler bilgisi iBsu1144 için SubtiWiki veritabanından (Michna vd. 2014, <http://subtiwiki.uni-goettingen.de> 2009), iBsu1147 (Hao vd. 2013) için DEG veritabanından (Zhang vd. 2004) alınmıştır.

B.subtilis GEM'lerinin oluşturulması ve doğrulanmasında en çok kullanılan veri tipleri substrat tüketim verileri (Oh vd. 2007) ile LB ortamında yaşam için gerekli gen verileri (Kobayashi vd. 2003)'dir (Çizelge 4.2). Protein üretimi için gerekli olmayan moleküllerin taşınım tepkimeleri *iBsu1144*'e eklenmediği için substrat tüketim verileri (Oh vd. 2007) *iBsu1144*'ün doğrulanmasında kullanılmamıştır (Çizelge 4.2). Bununla birlikte, *B.subtilis* GEM'lerinin oluşturulması ve doğrulanmasında en uygun akı dağılımlarının hesaplanması için en çok kullanılan stratejiler, sırasıyla, çoğalmanın maksimizasyonu, LB ortamı varsayımı ve grup katkı yöntemidir (Çizelge 4.3). *B.subtilis*'in çoğalmayı maksimize etmediği deneysel olarak gösterildiği için (Fischer ve Sauer 2005), *B.subtilis* GEM'lerinin çizelge 4.4'te özetlenen doğrulukları şüphelidir. Ayrıca, yaşam için gerekli genlerin bazılarının silindiği durumlarda *B.subtilis*'in yaşamaya devam ettiği gösterildiği için (Michna vd. 2014), tüm *B.subtilis* GEM'lerinin Çizelge 4.4'te gösterilen doğruluklarının hesaplanmasında kullanılan "gerekli gen" verilerinin güvenilirlikleri yeterli değildir. *B.subtilis* GEM'lerinin doğrulanma süreçleri fermentasyon verilerinin yanı sıra hücreiçi/hücre dışı proteom verileri, transkriptom verileri, ve deneysel olarak belirlenen hücreiçi (normalize) akıların kullanılmasıyla, deneysel ve tahmin edilen akı değerleri arasındaki farkların minimizasyonunun amaç fonksiyonu olarak kullanılmasına yönelik geliştirilmelidir.

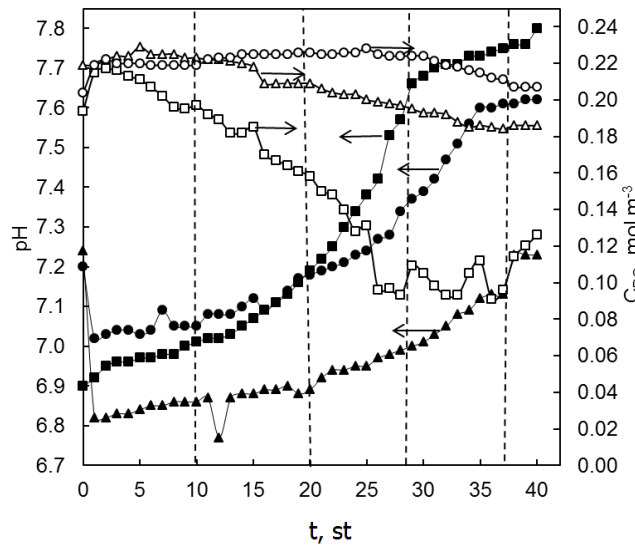
4.1.2 Serin alkali proteaz üretiminde oksijen aktarımının hücreiçi tepkime hızlarına etkilerinin *iBsu1144* ile belirlenmesi

SAP üretim prosesinde oksijen aktarım koşullarının düşük- (LOT), orta- (MOT), ve yüksek- (HOT) oksijen aktarım koşullarında hücreiçi akı dağılımlarına etkileri araştırılmıştır. SAP fermentasyonu dört periyoda ayrılmıştır (Şekil 4.3a, 4.3b) (Çalık vd. 1998). Periyot I ($0 < t < 10$ st) hücrelerin çoğalmadığı süreci, Periyot II ($10 < t < 20$ st) üstel çoğalma fazının başlangıcını, Periyot III ($20 < t < 28$ st) SAP sentezinin artmaya başlamasını, Periyot IV ($28 < t < 37$ st) üstel çoğalma fazının bitişiyle SAP sentezinin en yüksek değere ulaştığı süreci gösterir (Çalık vd. 1998, 1999). SAP üretiminde LOT, MOT, ve HOT koşullarında Periyot III için sitrat, hücre, SAP, aminoasit-, ve organik asit- değişimlerinin kalma süresi ile değişimleri kullanılarak *iBsu1144*'in çözümü

gerçekleştirilerek hücre içi tepkime hızları/akılar hesaplanmıştır, EK 5 Çizelge 1’de sunulmuştur.



(a)

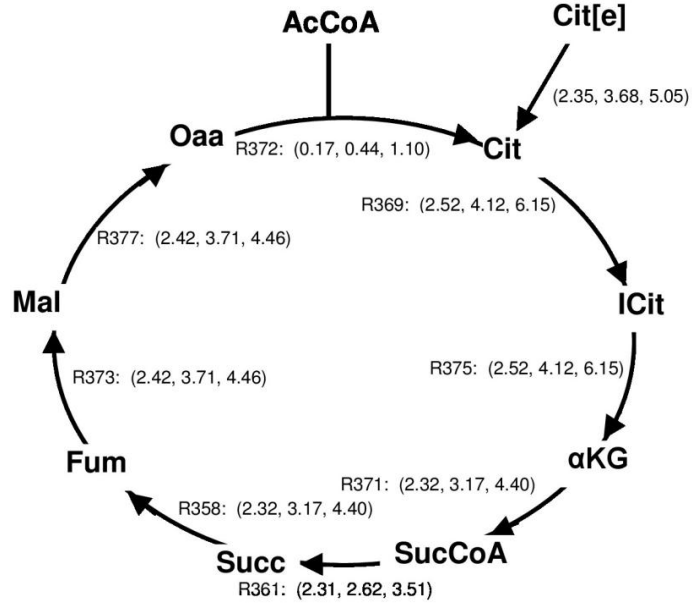


(b)

Şekil 4.3.a.Hücre, sitrat, ve serin alkali proteaz derişimlerinin kalma süresi ve oksijen aktarım koşullarıyla değişimi, b. pH ve çözünmüş oksijen derişiminin kalma süresi ve oksijen aktarım koşullarıyla değişimi ($C_C = 9.0 \text{ kg m}^{-3}$, $T=37^\circ\text{C}$, $Q_0/V=1 \text{ vvm}$, $V= 2.0 \times 10^{-3} \text{ m}^3$, N : ($\bullet, \circ, \square$) 750 dk^{-1} ; ($\blacktriangle, \triangle, \Delta$) 500 dk^{-1} ; ($\blacksquare, \square, \square$) 150 dk^{-1} , Çalık vd. 1998)

SAP sentezi (R1056) ve hücre çoğalma (R1057) hızları LOT, MOT, ve HOT’ta, sırasıyla, 0.50, 0.41, $0.10 \text{ } \mu\text{mol}/(\text{g}_{\text{KH}} \text{ st})$ ve 0.095, 0.068, 0.045 st^{-1} bulunmuştur (EK 5

Çizelge 1). TCA döngüsü akıları şekil 4.4'te gösterilmiştir. TCA döngüsü tepkimeleri tüm oksijen aktarım koşullarında karbon kaynağı sitratın merkezi karbon

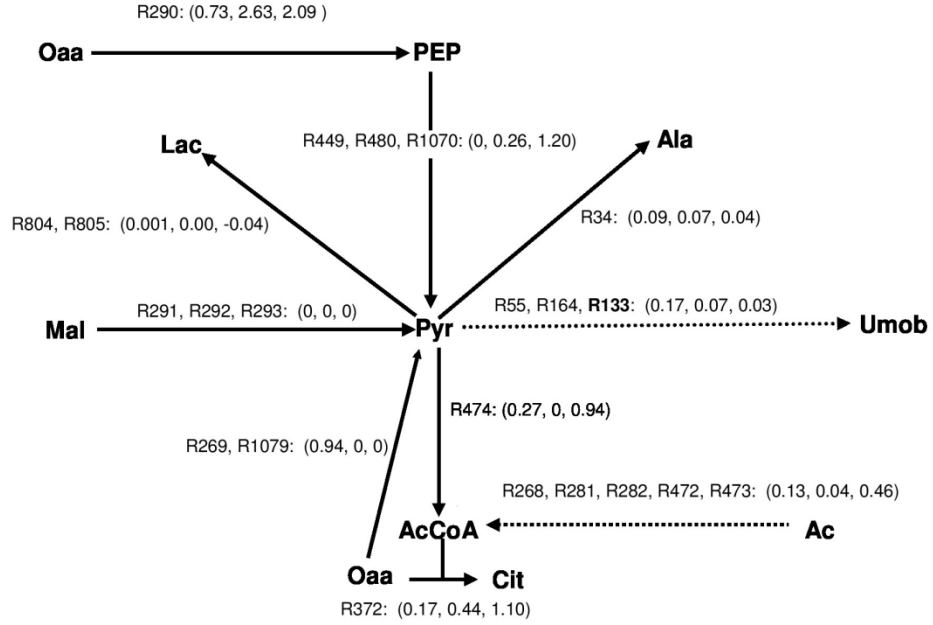


Şekil 4.4 SAP üretiminde *iBsu1144* ile hesaplanan TCA döngüsü akıları, mmol/(g_{KH} st)

metablizmasına TCA döngüsü tepkimeleri aracılığıyla aktarılmasıyla aktiftir. Sitrat tüketim hızı oksijen aktarımının sürükleyici gücüyle ATP ihtiyacına bağlı olarak çalışan TCA döngüsü akılarına dayandığı için (Çalık vd. 1998, Çalık ve Özdamar 1999), sitrat tüketim hızı ve TCA döngüsü tepkime hızları oksijen aktarım hızıyla artmıştır. LOT, MOT, ve HOT'taki sitrat tüketim hızları 2.35, 3.68, ve 5.05 mmol/(g_{KH} st) iken, TCA döngüsü tepkimelerinin akıları LOT'tan HOT'a 1.52-6.63- kat arası artmıştır (EK 5 Çizelge 3a-3b). *iBsu1144* ile oksijen tüketim hızı (R1054) ve CO₂ üretim hızı (R1051) LOT, MOT, ve HOT'ta sırasıyla, 6.51, 10.45, 10.87 ve 7.37, 11.03, 15.03 mmol/(g_{KH} st) olarak hesaplanmıştır (EK 5 Çizelge 1).

Piruvat dallanma noktasındaki tepkime hızları şekil 4.5'te gösterilmiştir. TCA döngüsünü glikoneogenesis yolizine bağlayan anaplerotik tepkimeler hücre bileşenlerinin, PEP, UPG, G3P, F6P, G6P, ve amino asitlerin sentezlenebilmesi için aktiftir. *iBsu1144*'te PEP, Pyr, ve Oaa dallanma noktalarında altı anaplerotik tepkime vardır. Oaa'dan piruvat (Pyr) ve Oaa'dan PEP sentezleyen R1079 ve R290 numaralı

anaplerotik tepkimeler LOT'ta aktiftir; akı değerleri $R_{1079}=0.94 \text{ mmol}/(\text{g}_{\text{KH}} \text{ st})$ ve $R_{290}=0.73 \text{ mmol}/(\text{g}_{\text{KH}} \text{ st})$ 'tir (Şekil 4.5). MOT'ta $R_{290}=2.63 \text{ mmol}/(\text{g}_{\text{KH}} \text{ st})$ 'tir; fakat,

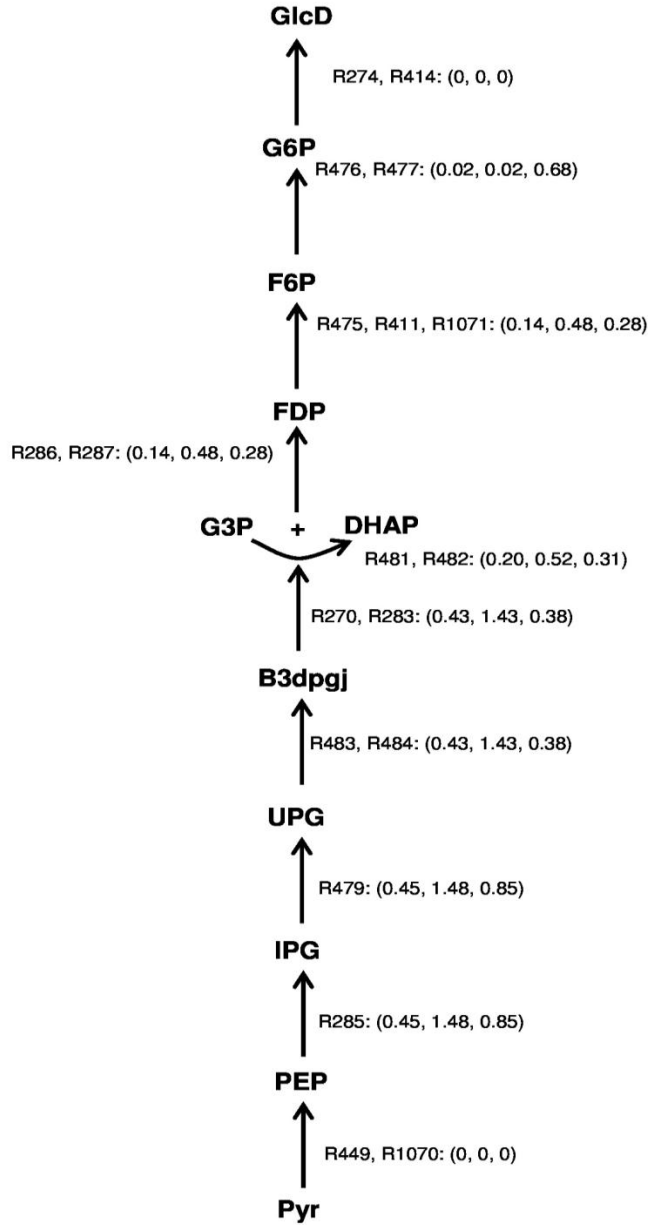


Şekil 4.5 SAP üretiminde iBsul144 ile hesaplanan piruvat dallanma noktasındaki tepkime hızları, $\text{mmol}/(\text{g}_{\text{KH}} \text{ st})$

MOT ve HOT'ta, R_{1079} inaktiftir; HOT'ta ise $R_{290}=2.09 \text{ mmol}/(\text{g}_{\text{KH}} \text{ st})$ 'tir. Oaa'dan PEP sentez tepkimesinin (R_{290}) akı değeri MOT'ta en yüksek değerini almıştır; LOT'tan 3.58-, HOT'tan 1.25- kat daha yüksektir (EK 5 Çizelge 4a, 4b). R_{290} 'ın MOT'taki normalize akı değeri (NA) LOT'un 2.29-, HOT'un 1.72- katıdır. R_{474} nolu tepkime ile Pyr'dan AcCoA sentez hızı LOT, MOT, ve HOT'ta 0.27, 0.00, ve 0.94 $\text{mmol}/(\text{g}_{\text{KH}} \text{ st})$ 'tir. Mal'dan Pyr sentezleyen R_{291} ve R_{293} nolu paralel tepkimeler, ve Pyr'dan Oaa ve Mal sentezleyen R_{269} ve R_{292} nolu tepkimeler tüm koşullarda inaktiftir (EK 5 Çizelge 4a). R_{474} 'ün normalize akısı da LOT'tan HOT'a 1.64- kat artarak oksijen aktarım koşullarından etkilenmiştir. Bununla birlikte HOT'ta R_{281} , R_{473} , ve R_{268} aracılığıyla Ac'dan AcCoA oluşumunun normalize akısı LOT ve MOT'un sırasıyla 1.65- ve 8.36- katıdır (EK 5 Çizelge 4b).

Glikoneogenesis yolizi akıları şekil 4.6'da gösterilmiştir. Pyr'dan PEP sentezi R_{449} ve R_{1070} nolu paralel tepkimelerle gerçekleşirken, Pyr'dan PEP sentez hızı tüm oksijen

aktarım koşullarında sıfırdır (Şekil 4.6). Glikoneogenesis yolizi akıları genel olarak en yüksek değerlerini MOT'ta almıştır: PEP'ten F6P'ı oluşturan ardışık tepkimelerin akıları LOT'tan MOT'a 2.61- 68.29- kat artarken, MOT'ta HOT'un en az 1.70- katıdır



Şekil 4.6 SAP üretiminde *iBsu1144* ile hesaplanan glikoneogenesis tepkime hızları, mmol/(g_{KH} st)

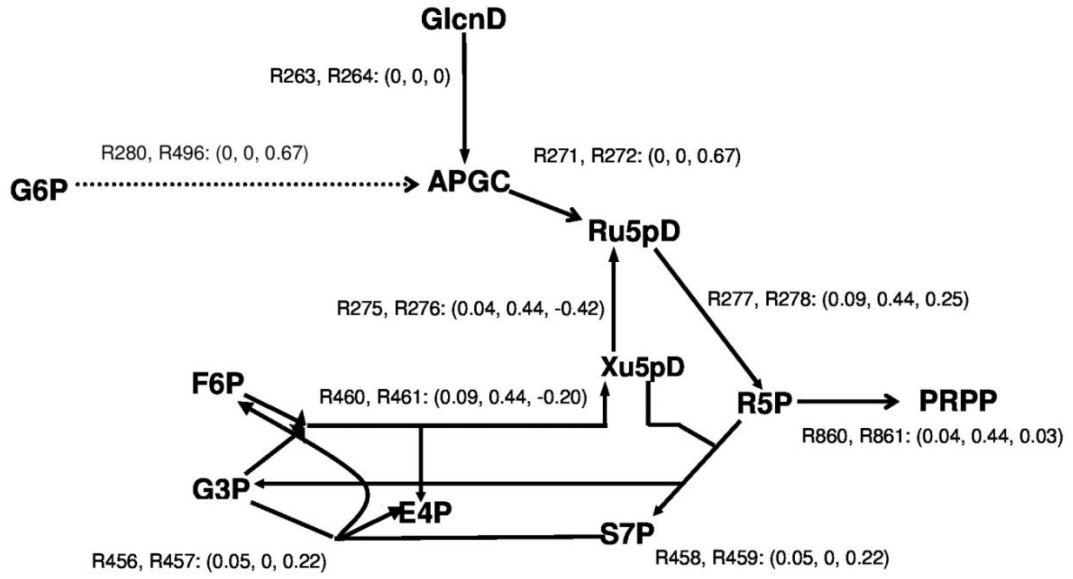
(Şekil 4.6, EK 5 Çizelge 5a, 5b). PEP'ten F6P oluşum tepkimelerinin LOT'taki normalize akı değerleri MOT'un 1.66-43.30- katı, MOT'taki normalize akılar HOT'un

en az 2.33- katıdır. R482, R287, R411, ve R1071 nolu tepkimeler aracılığıyla G3P'den F6P sentezinin akı değeri LOT, MOT, ve HOT'ta 0.14, 0.48, ve 0.28 mmol/(g_{KH} st)'tir. Pentoz fosfat yolizi (PFY) akıları şekil 4.7'de gösterilmiştir. Nükleotit ve hücre bileşenlerinin sentezinde kullanılan Ru5pD glikoneogenesis yolizindeki F6P dallanma noktasından R271, R276, R277 ya da G6P dallanma noktasından R280, R496, R271 tepkimeleriyle sentezlenir. PFY tüm koşullarda aktiftir. Ru5pD sentezi LOT ve MOT'ta F6P dallanma noktası üzerinden gerçekleşmiştir. PFY akılarının oksijen aktarımıyla değişiminde genel bir davranış yoktur (Şekil 4.7, EK 5 Çizelge 6a, 6b).

Farklı oksijen aktarım koşulları için amino asit yolizlerine yönelen metabolik akılar çizelge 4.5'te gösterilmiştir. Amino asitlerin sentez tepkimelerinin akıları oksijen aktarım koşullarından önemli ölçüde etkilenmiştir (EK 5 Çizelge 7-12). α KG dallanma noktasından R15, R28, R33, R41, R77, R91, R95, R96, R116, R154, R175, R199, R1078, ve R1081 tepkimeleri aracılığıyla glutamat sentez hızı LOT, MOT, ve HOT'ta 1.21, 2.24, and 4.19 mmol/(g_{KH} st)'tir. TCA döngüsündeki ikinci dallanma noktası Oaa'dan R42 ile aspartat sentezlenmesidir. R42 tepkimesinin akı değeri oksijen aktarımıyla artmıştır; LOT, MOT, ve HOT'ta 0.58, 0.65, ve 1.27 mmol/(g_{KH} st) değerlerini almıştır. Serin grubu amino asit yolizine yönelen akılar oksijen aktarımıyla artarken, alanin grubu amino asit yolizine yönelen akılar azalmıştır (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5 SAP üretiminde oksijen aktarımının amino asit yolizlerine yönelen akılara etkileri

Amino asit sentez yolizleri	LOT	MOT	HOT
	Amino asit yolizlerine yönelen akılar, mmol/(g _{KH} st)	Amino asit yolizlerine yönelen akılar, mmol/(g _{KH} st)	Amino asit yolizlerine yönelen akılar, mmol/(g _{KH} st)
Serin-grubu amino asitler	0.03	0.05	0.86
Alanin-grubu amino asitler	0.43	0.21	0.10
Histidin	0.01	0.00	0.02
Aspartik-asit grubu amino asitler	0.58	0.65	1.27
Aromatik grup-amino asitler	0.14	0.44	0.02
Glutamik asit-grubu amino asitler	0.19	0.95	1.76



Şekil 4.7 SAP üretiminde *i*Bsu1144 ile hesaplanan pentoz fosfat yolizi tepkime hızları, mmol/(g_{KH} st)

*i*Bsu1144 akılarıyla hesaplanan toplam ATP üretim hızı oksijen aktarımıyla artmıştır; LOT, MOT, ve HOT'taki toplam ATP üretim hızı 14.07, 19.73, ve 21.50 mmol/(g_{KH} st)'tir . LOT'ta ATP'nin %16.40, 0.03, 0.96, 6.69, ve 75.93'ü; MOT'ta %13.29, 0.02, 1.32, 0.00, ve 85.37'si; HOT'ta %16.31, 0.02, 6.85, 0.00, ve 76.82'si TCA döngüsü, nükleotit sentezi, glikoneogenesis, anaplerotik tepkimeler, ve oksidatif fosforilasyon tepkimeleriyle sentezlenmiştir (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6 SAP üretiminde oksijen aktarımının ATP üretimine etkileri

R #	LOT		MOT		HOT	
	ATP üretimi, mmol/(g _{KH} st)	ATP %	ATP üretimi, mmol/(g _{KH} st)	ATP %	ATP üretimi, mmol/(g _{KH} st)	ATP %
361	2.31	16.40	2.62	13.29	3.51	16.31
480	0	0	0.26	1.32	1.20	5.56
885	0.004	0.03	0.004	0.02	0.002	0.01
991	0	0	0	0	0.001	0.01
1071	0.14	0.96	0	0	0.28	1.29
1079	0.94	6.69	0	0	0	0
1082	8.36	59.41	13.67	69.31	12.12	56.38
1083	2.32	16.52	3.17	16.06	4.40	20.44
Toplam	14.07	100	19.73	100	21.50	100

4.1.3 iBsu1144 sonuçlarının biyokimyasal tepkime temelli modelle karşılaştırılması

Araştırma grubumuzdan Çalık vd. (1999) *B.subtilis* tepkimelerini kullanarak biyokimyasal tepkime temelli BsBRM-1999 modelini oluşturmuştur. SAP üretiminin üçüncü periyodunda LOT, MOT, ve HOT koşullarının fermentasyon verileri (Çalık vd. 1998, 1999) kullanılarak 1083 tepkime ve 743 metabolit içeren iBsu1144 ile 133 tepkime ve 102 metabolitten oluşan BsBRM-1999 (Çalık vd.1999)'un çözümleri gerçekleştirilerek hücreiçi tepkime hızları hesaplanmıştır. Dolayısıyla her iki modelin aynı fermentasyon verileri ve amaç fonksiyonuyla hesaplanan hücreiçi tepkime hızları karşılaştırılarak akı dağılımlarını tahmin edebilme güçleri kıyaslanmıştır.

BsBRM-1999 ile LOT, MOT, ve HOT'ta hesaplanan akı değeri pozitif olan tepkime sayıları 99 (%74), 102 (%77), ve 100 (%75)'dür; akı değeri pozitif olan tepkimelerin toplam tepkimelere oranı parantez içinde verilmiştir. iBsu1144 ile LOT, MOT, ve HOT'ta hesaplanan hücre ve SAP sentezi için akı değeri pozitif olan tepkime sayıları 321 (%30), 316 (%29), ve 324 (%30)'dür. Her iki model için akı değeri pozitif olan tepkime sayıları oksijen aktarım koşullarıyla az değişmektedir. iBsu1144'te hücre ve SAP sentezi 1083 tepkimenin yaklaşık % 30'u ile gerçekleşirken, bu sayı BsBRM-1999'un yaklaşık 3- katıdır.

Her iki modelin ortak 85 tepkimesi için iBsu1144 ve BsBRM-1999 (Çalık vd. 1999) ile hesaplanan akılar birbirleriyle EK6'da karşılaştırılmıştır. Bu amaçla, ortak her bir tepkime için BsBRM-1999 akısının iBsu1144 akısına oranı hesaplanmıştır. %20'ye kadar olan akı farkında ($r_{BRM}/r_{GSM} \leq 1.2$) akılar “aynı veya yakın” ($r_{BRM}/r_{GSM} \leq 1.2$) kabul edilirken, %20-100 arası akı farkında ($1.2 < r_{BRM}/r_{GSM} \leq 2.0$) akılar “daha az yakın” olarak değerlendirilmiş, %100'den büyük akı farkında ($r_{BRM}/r_{GSM} > 2.0$) akılar “ıraksak” kabul edilmiştir (EK6). iBsu1144 ve BsBRM-1999 (Çalık vd.1999)'un ortak 85 tepkimesinin akıları incelendiğinde LOT, MOT, ve HOT'ta “aynı veya yakın” ($r_{BRM}/r_{GSM} \leq 1.2$) akı değerine sahip olan tepkime sayısı, sırasıyla, 55, 30, ve 38'dir; akıları birbirine “daha az yakın” ($1.2 < r_{BRM}/r_{GSM} \leq 2.0$) olan tepkime sayısı 13, 16, ve 15'tir; akıları “ıraksak” ($r_{BRM}/r_{GSM} > 2.0$) olan tepkime sayısı 17, 39, ve 32'dir. BsBRM-1999 ile “ıraksak” akı değerlerine sahip tepkime sayısının en çok MOT, sonra HOT'ta

olduğu bulunmuştur. BsBRM-1999 (Çalık vd.1999)'de Cit'ten ICit sentezi iBsu1144'te R369'a karşılık gelirken, akı değerleri LOT, MOT, ve HOT'ta 2.48, 6.52, ve 7.23 mmol/(g_{KH} st)'tir. Cit'ten ICit sentezinin akı değerleri LOT ve HOT'ta her iki model için aynı iken, MOT'ta BsBRM-1999 (Çalık vd.1999) akısı iBsu1144'in 1.58- katıdır (EK6). BsBRM-1999 (Çalık vd.1999)'da Pyr'dan AcCoA sentez hızları LOT, MOT, ve HOT'ta 0.44, 3.00, ve 6.49 mmol/(g_{KH} st)'tir; bu değerler iBsu1144'ün akılarından MOT ve HOT'ta ıraksaktır. BsBRM-1999 (Çalık vd.1999)'de CO₂ oluşum akısı LOT, MOT, ve HOT'ta 7.32, 19.35, ve 16.39 mmol/(g_{KH} st)'tir; bu değerler iBsu1144 akılarıyla LOT ve HOT'ta aynı, fakat MOT'ta daha az yakındır (EK6).

BsBRM-1999 (Çalık vd.1999)'daki iki anaplerotik tepkimenin akıları, Mal'dan Pyr sentezi ve Oaa'dan Pyr sentezi, LOT, MOT, ve HOT'ta 1.82, 3.40, 0.00 ve 0.00, 0.00, 7.32 mmol/(g_{KH} st)'tir (EK6). Dolayısıyla BsBRM-1999 (Çalık vd.1999)'da iki anaplerotik tepkimenin toplam akısı LOT, MOT, ve HOT'ta 1.82, 3.40, ve 7.32 mmol/(g_{KH} st)'tir; bununla birlikte iBsu1144'de sadece R290 ve R1079'un aktif olduğu, altı anaplerotik tepkimenin toplam akısı LOT, MOT, ve HOT'ta 1.67, 2.63, ve 2.09 mmol/(g_{KH} st)'tir (EK6). Bu nedenle TCA döngüsü akılarına benzer bir şekilde toplam anaplerotik akı değeri her iki modelde LOT'ta aynı, MOT'ta daha az yakın, fakat HOT'ta ıraksaktır. BsBRM-1999 (Çalık vd.1999)'de, Pyr'dan PEP sentez hızı en yüksek değerini HOT'ta alırken, her iki modelde tepkimenin akı değerleri iBsu1144'de iyi tanımlanmış altı anaplerotik tepkimenin bulunması nedeniyle tüm koşullar için ıraksaktır (EK6). Benzer bir şekilde, TCA döngüsü ve BsBRM-1999'deki iki anaplerotik tepkimenin etkisiyle, her iki modeldeki G3P'den F6P sentez akıları MOT ve HOT'ta ıraksaktır, LOT'ta aynıdır.

Amino asit sentez yollarına yönelen tepkimeler için BsBRM-1999 akılarının iBsu1144 akılarına oranı çizelge 4.7'de verilmiştir. BsBRM-1999 (Çalık vd.1999)'da TCA döngüsündeki αKG dallanma noktasından glutamat sentez hızları LOT, MOT, ve HOT'ta 1.46, 0.56, ve 5.01 mmol/(g_{KH} st)'tir. BsBRM-1999 (Çalık vd.1999) akıları iBsu1144 akıları ile MOT'ta ıraksak, LOT'ta daha az yakın, HOT'ta aynıdır (EK6). BsBRM-1999 (Çalık vd.1999)'da TCA döngüsündeki Oaa dallanma noktasından aspartik asit grubu amino asit yolizine yönelen akılar LOT, MOT, ve HOT'ta 0.45, 0.17,

ve 1.36 mmol/(g_{KH} st)'tir. Bu tepkimenin akıları her iki modelde HOT'ta aynı, LOT'ta daha az yakın, MOT'ta ıraksaktır (EK 6, Çizelge 4.7). TCA döngüsündeki αKG ve Oaa dallanma noktalarından sentezlenen amino asit akıları doğrudan TCA döngüsü akılarından etkilenmiştir. Dokuz TCA tepkimesinden LOT'ta yedi tepkime akısı her iki modelde aynıdır; MOT'ta iki akı her iki modelde aynı, üç akı daha az yakın, dört akı ıraksaktır; HOT'ta üç akı her iki modelde aynı, iki akı daha az yakın, dört akı ıraksaktır. BsBRM-1999 (Çalık vd.1999) ve iBsu1144 modellerinin çözümleri aynı fermentasyon verileriyle gerçekleştirildiği için her iki modelde SAP sentez hızları LOT, MOT, ve HOT'ta 0.50, 0.41, ve 0.10 μmol/(g_{KH} st) ve hücre çoğalma hızları LOT, MOT, ve HOT'ta 0.095, 0.068, ve 0.045 st⁻¹'dir. BsBRM-1999 (Çalık vd.1999)'da, LOT, MOT, ve HOT'ta dört tepkimeyle toplam ATP üretim hızı 13.29, 55.32, ve 26.75 mmol/(g_{KH} st)'tir. Toplam ATP üretiminin oksijen aktarımıyla arttığı iBsu1144'de birincil olarak R1082, R1083, R361, ve R1079 ile oluşan toplam ATP üretimi BsBRM-1999 (Çalık vd.1999) ile LOT'ta aynı, HOT'ta daha az yakın, ve MOT'ta ıraksaktır (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.7 Amino asit sentez yollarına yönelik tepkimeler için akı oranlarının oksijen aktarımıyla değişimi

Amino asit sentez yolları	LOT	MOT	HOT
	Akı oranı	Akı oranı	Akı oranı
Aspartik-asit grubu amino asitler	0.78	0.26	1.07
Aromatik grup- grubu amino asitler	0.93	0.01	0.50
Alanin- grubu amino asitler	0.86	0.57	0.90
Serin- grubu amino asitler	6.67	1.80	1.64
Glutamik asit- grubu amino asitler	1.21	0.25	1.20
Histidin	1.00	-	1.00

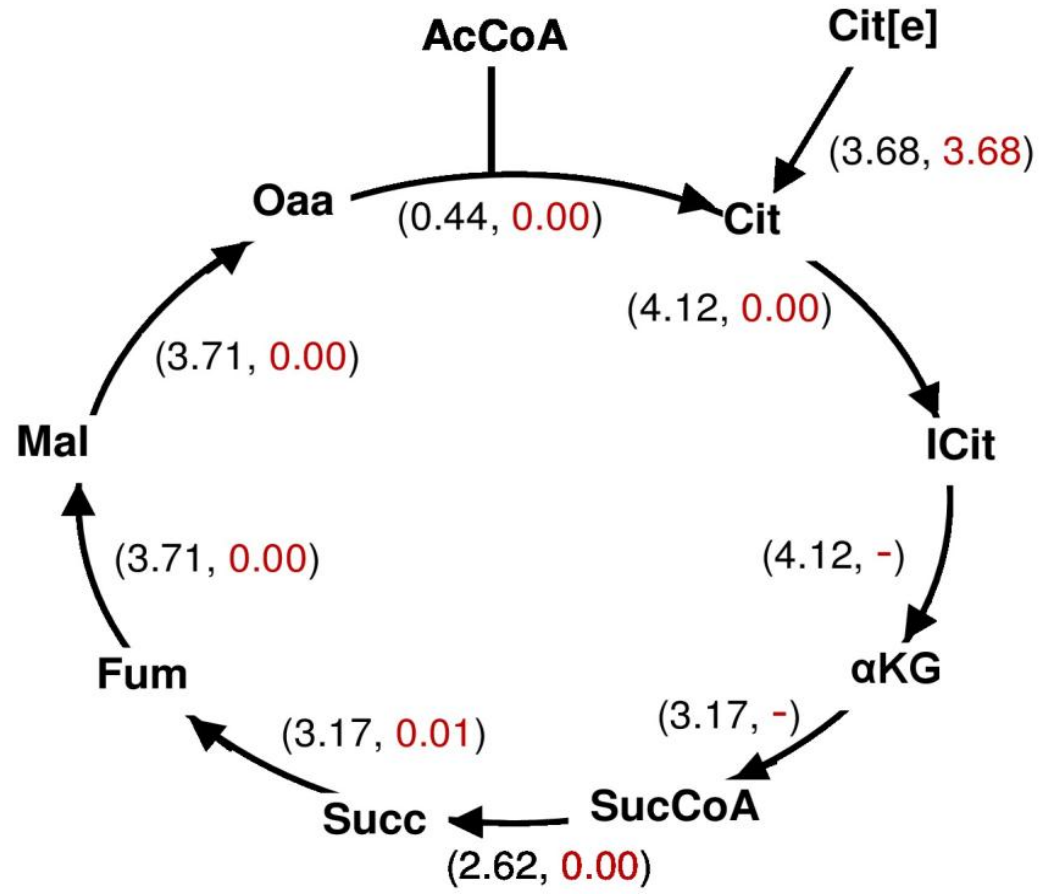
*Akı oranı(AO) = BsBRM-1999 akısı / iBsu1144 akısı.

** AO ≤1.2, 1.2 <AO ≤ 2.0, AO >2.0

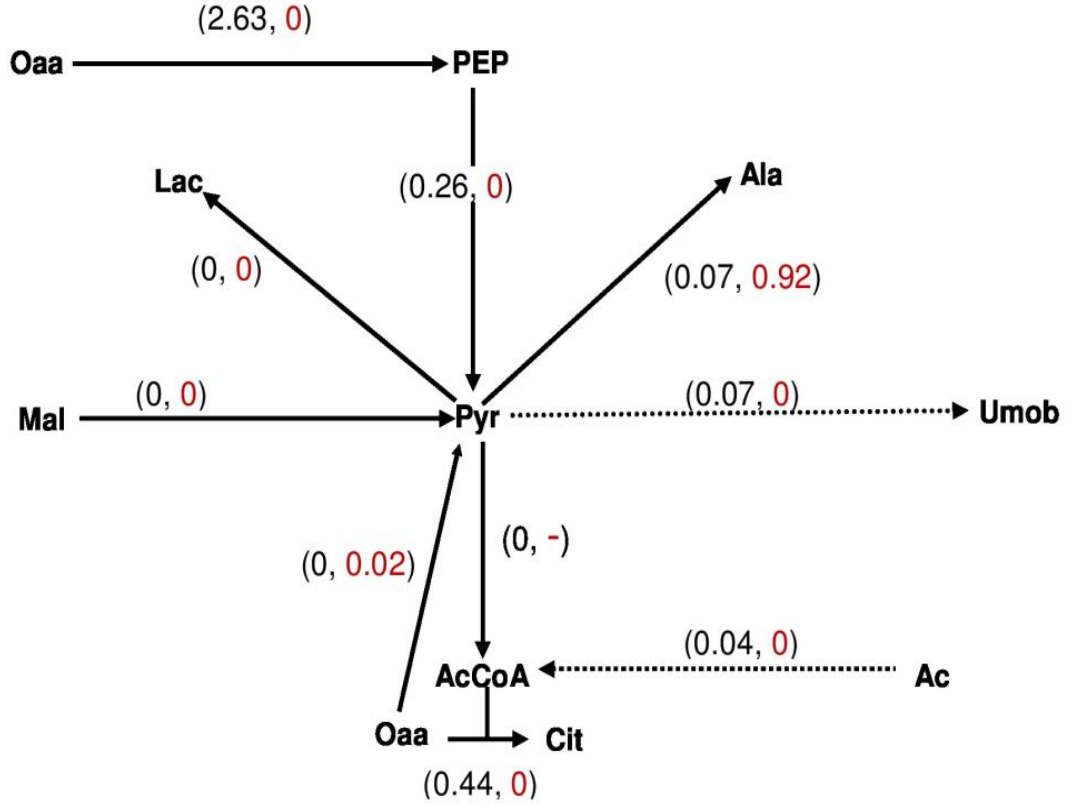
4.1.4 *iBsu1144* sonuçlarının ikinci nesil GEM ile karşılaştırılması

Akı analizi biyokimyasal reaksiyon mühendisliğinin, hücre içi tepkime hızlarının hesaplanması ve analizinde kullanılan, önemli araçtır. Akı analizi hücre içi tepkime hızlarının hesaplanmasını, hücrenin kuramsal metabolik kapasitesinin belirlenmesini, bunun yanında ortam bileşiminin değiştirilmesini, biyoreaktör işletim koşullarının geliştirilmesini, yeni yollarının keşfedilmesini, farklı yollarının etkilerinin incelenmesini, hücrenin fizyolojik durumunun aydınlatılmasını, rekombinant molekül üretimi için konak hücre seçimini sağlar (Çalık ve Özdamar 2002).

Metabolik mühendislik analizi ve tasarımı için güncel gen-enzim-tepkime verisinin gerekli olmadığı durumlarda birinci- ve ikinci- nesil genom seviye modeller (GEM) kullanılarak akı analizi gerçekleştirilebilir. Bu kapsamda, *iBsu1144* birinci- nesil *iBsu1103* (Henry vd. 2009) GEM'inin geliştirilmiş hali olan ikinci- nesil *iBsu1103V2* (Tanaka vd. 2013) GEM'iyle karşılaştırılmıştır. Dolayısıyla, SAP üretimi için *iBsu1103V2* modifiye edilerek *iBsu1103V2-SAP* kurulmuştur: (i) her bir tersinir tepkimenin ileri ve geri yöndeki tepkimeleri biyokimyasal reaksiyon ağına yerleştirilmiştir, ve (ii) SAP sentez tepkimesi (Çalık vd. 1999) hücre içi tepkime sistemine eklenmiştir; böylece 2302 tepkime ve 1138 metabolitten oluşan *iBsu1103V2-SAP* tepkime sistemi oluşturulmuştur. Ardından, *iBsu1103V2-SAP* için model kurulmuştur. SAP üretiminin MOT koşulu için *iBsu1144* ve *iBsu1103V2-SAP* ile hesaplanan merkezi karbon yolları karşılaştırılarak genom dizin analizi ve anotasyonu çalışmalarındaki gelişmelerin akı analizi sonuçlarına etkilerinin aydınlatılması hedeflenmiştir. *iBsu1144*'te TCA döngüsünün sekiz tepkimesi aktiftir; fakat izositrat (ICit) ve 2-okzoglutarattan (α KG) sırasıyla 2-okzoglutarat (α KG) ve süksinil-koenzim A (SucCoA) sentez tepkimeleri *iBsu1103V2-SAP*'ın TCA döngüsünde yoktur (Şekil 4.8). Dolayısıyla *iBsu1103V2-SAP*'ın TCA döngüsünde bir tepkime aktif ve beş tepkime inaktiftir. Fermentasyon prosesi MOT'ta yeterli oksijen aktarımıyla gerçekleştiği için (Çalık vd. 1998, Şekil 4.3.b), TCA döngüsünün aktif olması beklenir. *iBsu1103V2-SAP*'ın TCA döngüsü bağlantısız tepkimeler içerdiği için, *iBsu1103V2-SAP*'ın TCA döngüsü akı değerleri doğru olamaz. Bu nedenle, üçüncü nesil GEM *iBsu1144* TCA döngüsü akılarının doğru hesaplanmasını sağlamıştır.



Şekil 4.8 SAP üretiminin MOT koşulu için, sırasıyla, iBsu1144 (siyah) ve iBsu1103V2-SAP (kırmızı) ile hesaplanan TCA döngüsü akıları mmol/(g_{KH} st). iBsu1103V2-SAP’da olmayan tepkimeler (-) ile gösterilmiştir.

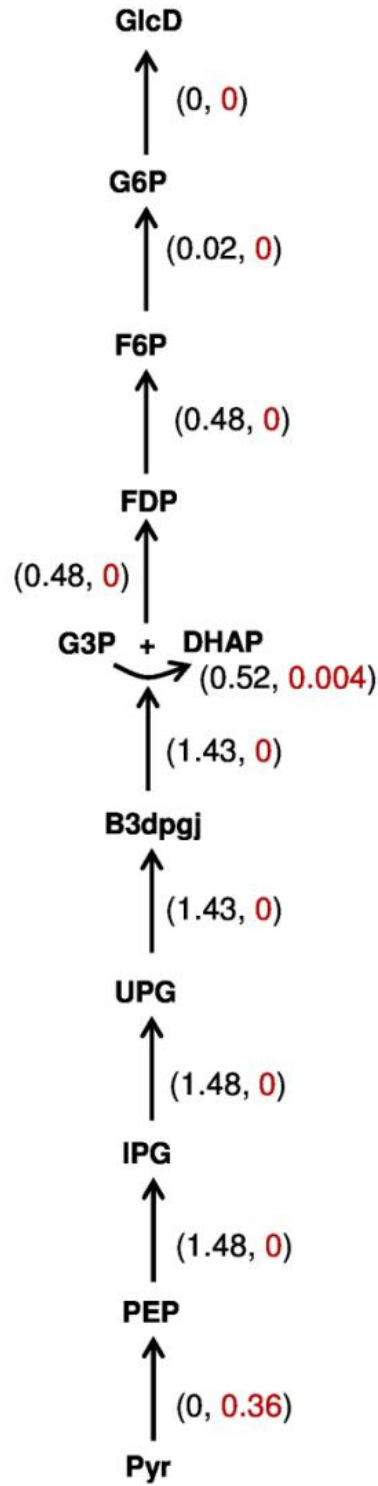


Şekil 4.9 SAP üretiminin MOT koşulu için, sırasıyla, *iBs1144* (siyah) ve *iBs1103V2-SAP* (kırmızı) ile hesaplanan piruvat nodu akıları.

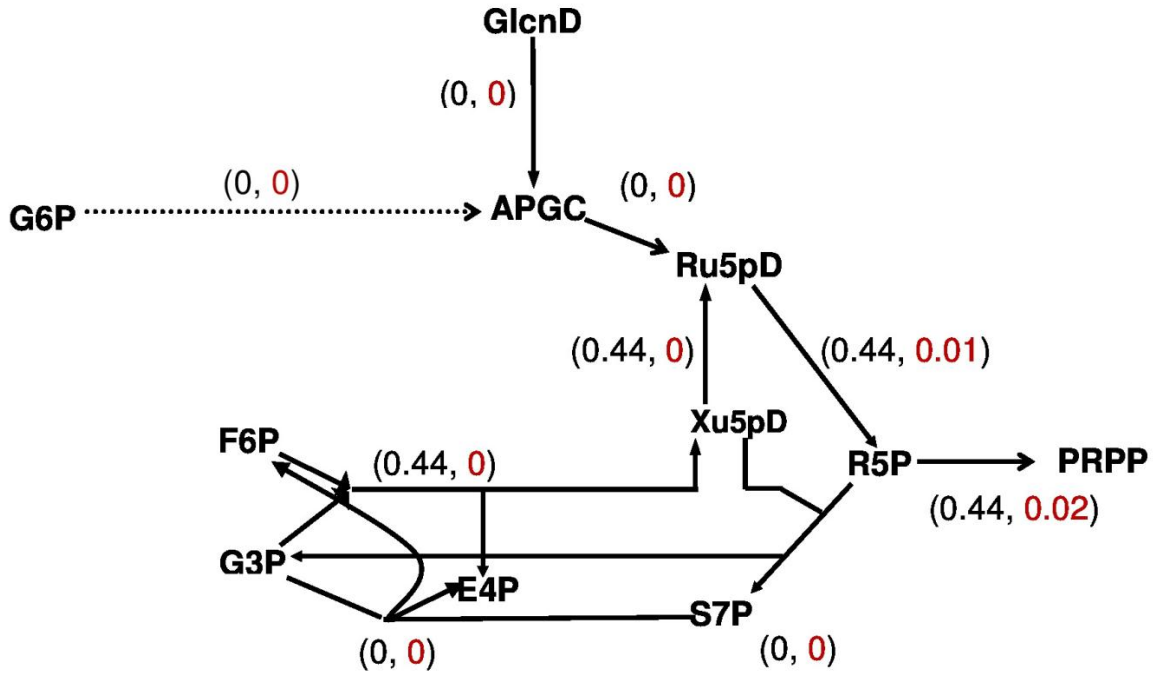
mmol/(g_{KH} st). *iBs1103V2-SAP*'da olmayan tepkimeler (-) ile gösterilmiştir.

iBs1144'de Pyr nodu 10 tepkime içerir (Şekil 4.9). *iBs1144* ile MOT'ta altı piruvat nodu tepkimesi aktiftir ve dört tepkime inaktiftir, fakat *iBs1103V2-SAP* ile Pyr'dan AcCoA oluşum tepkimesi yoktur. Dolayısıyla *iBs1103V2-SAP* ile iki tepkime aktif, yedi tepkime inaktiftir (Şekil 4.9).

iBs1103V2-SAP ve *iBs1144*'nin piruvat nodu akılarındaki farklılıklar glikoneogenesis yolizi akılarına da yansımıştır (Şekil 4.9, 4.10). 10 glikoneogenesis yolizi tepkimesinden *iBs1144* ile sekiz tepkime aktif ve iki tepkime inaktiftir. *iBs1103V2-SAP* ile iki tepkime aktif, sekiz tepkime inaktiftir. MOT koşulunda PEP, UPG, G3P, F6P, G6P, amino asitler, ve hücre bileşenlerinin üretimi için aktif bir glikoneogenesis yolizi beklendiği için *iBs1103V2-SAP* yerine *iBs1144* ile hesaplanan glikoneogenesis yolizi akıları doğrudur (Şekil 4.10).



Şekil 4.10 SAP üretiminin MOT koşulu için, sırasıyla, *iBsu1144* (siyah) ve *iBsu1103V2-SAP* (kırmızı) ile hesaplanan glikoneogenesis yolizi akıları. mmol/(g_{KH} st). *iBsu1103V2-SAP*'da olmayan tepkimeler (-) ile gösterilmiştir.



Şekil 4.11 SAP üretiminin MOT koşulu için, sırasıyla, *iBsu1144* (siyah) ve *iBsu1103V2-SAP* (kırmızı) ile hesaplanan pentoz fosfat yolizi akıları

mmol/(g_{KH} st). *iBsu1103V2-SAP*'da olmayan tepkimeler (-) ile gösterilmiştir.

Pentoz fosfat yolizi (PFY) akıları şekil 4.11'de karşılaştırılmıştır. *iBsu1144* ve *iBsu1103V2-SAP* sırasıyla 18 ve 16 PFY tepkimesine sahiptir. Xu5pD ve R5P'den G3P ve S7P oluşumu ile F6P ve E4P'dan G3P ve S7P sentez tepkimeleri *iBsu1144*'te tersinir, *iBsu1103V2-SAP*'ta tersinmezdir. *iBsu1144* ile dört, *iBsu1103V2-SAP* ile iki PFY tepkimesi aktiftir. Her iki GEM ile hesaplanan oksidatif PFY akı değerleri aynıdır. Nükleotit ve hücre bileşenlerinin sentezi için gerekli olan Ru5pD *iBsu1144* ile oksidatif olmayan tepkimeler aracılığıyla sentezlenirken, *iBsu1103V2-SAP* ile PFY'de sentezlenememektedir (Şekil 4.11).

İkinci- ve üçüncü- nesil GEM'lerin karşılaştırmalı analizi, *iBsu1144*'ün güncel genom dizinine (Belda vd. 2013) dayalı gen-enzim-tepkime verileriyle oluşturulmasına dayalı olarak bağlantısız tepkimeler içermemesi nedeniyle doğru sonuçlar ürettiğini gösterir.

4.1.5 SAP üretimi için metabolik mühendislik analizleri

4.1.5.1 *B.subtilis*'te SAP sentezini artırmaya yönelik metabolik mühendislik analizi

Oksijen aktarımı hücreiçi tepkime hızlarını etkileyerek amino asit gibi ara ürünlerin oluşumlarını ve dolayısıyla LOT, MOT, ve HOT koşullarındaki SAP üretimini etkilemiştir (EK 5 Çizelge 7-12). Merkezi karbon yolizlerindeki darboğaz tepkimeler incelenecek olursa, Pyr dallanma noktasında R282, R472, R449, R1070, R269, R291-R293 tepkimeleri inaktiftir (EK 5 Çizelge 4). Dolayısıyla anaplerotik tepkimelerden R269'u katalizleyen piruvat karboksilazı (EC. 6.4.1.1) kodlayan *pycA*; R291 ve R292'yi katalizleyen malat dehidrojenazı (EC. 1.1.1.39) kodlayan *ybcM*, *ydeA*, *yetaA*, *yjjA*, *yjpA*, *yfmJ*, *paiB*, *yvdD*, *ywrD* ile R293'ü katalizleyen malik enzimi (EC. 1.1.1.40) kodlayan *ytsJ* metabolik mühendislik hedef noktalarıdır.

Düşük sentez hızına sahip olan amino asitler SAP sentezi için darboğaz olabilirler (EK 5 Çizelge 7-12). TCA döngüsündeki α KG ve Oaa dallanma noktalarından glutamik asit- ve aspartik asit- grubu amino asit yolizlerine yönelen akıları artırmak SAP üretimini artırabilir; bu nedenle, R377'yi katalizleyen malat dehidrojenazı (EC.1.1.1.37) kodlayan *citH* ve R375'i katalizleyen okzalosuksinat dekarboksilazı (EC.1.1.1.42) kodlayan *citC* genleri metabolik mühendislik hedef konumları olarak belirlenmiştir. Aspartik asit grubu amino asitler içinde en düşük olan hıza sahip reaksiyon aspartik asitten SAP'ın %6.6'sını oluşturan asparajini (Jacobs 1995) sentezleyen R38'dir. Bunun nedeni R38'i katalizleyen asparajin sentetazın (EC 6.3.5.4) düşük aktivitesi ya da R39'u katalizleyen aspartokinazın (EC. 2.7.2.4) yüksek aktivitesi olabilir (Şekil 4.2, EK 5 Çizelge 11). Dolayısıyla R38 düşük asparajin sentetaz (EC.6.3.5.4) aktivitesi nedeniyle aspartik asit grubu amino asit yolizindeki birincil darboğaz tepkimedir (EK 5.11). *B.subtilis*'te SAP üretimini artırmak için asparajin sentetazı (EC.6.3.5.4) kodlayan *asnB*, *asnH*, *asnO* genleri ile aspartokinazı (EC. 2.7.2.4) kodlayan *dapG*, *yclM*, *lysC* genlerine odaklı metabolik mühendislik tasarımı gereklidir. Ayrıca R194 tüm oksijen aktarım koşullarında düşük akı değerine sahip olması ve Ile'nin MOT ile HOT'ta hücre dışında tespit edilmemesi nedenleriyle yolizindeki ikinci darboğaz nokta olarak belirlenmiştir (EK 5 Çizelge 11). R194'ü katalizleyen treonin dehidratazı (EC. 4.3.1.19) kodlayan *ilvA*

geniyle metabolik mühendislik tasarımı yapılmalıdır. SAP molekülünün yapısındaki herbir *i* amino asiti için, hız kısıtlayıcı amino asit fonksyonu (R_{LF-i}) tanımlanmıştır:

$$R_{LF-i} = \alpha_{ai-PSR} / \sum r_{ai}, \text{ g}_{KH} \text{ st/mmol} \quad (4.4)$$

Burada α_{ai-PSR} , hücre dışında tespit edilmeyen amino asit-*i*'nin SAP sentez tepkimesindeki stokiyometrik katsayısıdır. $\sum r_{ai}$ amino asit-*i*'nin hücre içinde tepkimelerle toplam sentez hızıdır. R_{LF-i} değerinin büyüklüğü SAP üretimi için amino asit-*i*'ye olan ihtiyacın büyüklüğünü gösterir. SAP üretiminde amino asitlerin EK 5 Çizelge 13-15'deki R_{LF-i} değerleri değerlendirilerek: : **i)** LOT'ta Asn; **ii)** MOT'ta Asn; ve, **iii)** HOT'ta Asn'nin birincil-darboğaz amino asit olduğu, üretim ortamına eklenmesi gerektiği tahmin edilmiştir.

4.1.5.2 *B.subtilis*'te SAP üretimini artırmak için konak hücre oluşturmaya yönelik metabolik mühendislik analizi

SAP üretiminde en uygun oksijen aktarım koşulu MOT için Periyod III'te aktif ve kapalı tepkimeler akı değişkenliği analizi ile belirlenmiştir (Burgard vd. 2004, Chapman vd. 2015). *iBsu1144* kullanılarak hücre içinde SAP birikim hızının minimize ve maksimize edilerek hesaplandığı 1083 tepkimeye ait akı değerleri EK 7 Çizelge 1'de sunulmuştur. Akı değişkenliği analiziyle her iki model işletiminde akı değeri sıfırdan farklı tepkimeler aktif, sıfır olan tepkimeler ise kapalı olarak değerlendirilmiştir (Burgard vd. 2004, Chapman vd. 2015). Akı değişkenliği analizi 317 genle bağlantılı 288 tepkimenin aktif ve 533 genle bağlantılı 735 tepkimenin kapalı olduğunu göstermiştir. Aktif ve kapalı tepkimeler enzimleri, genleri, ve akı değerleriyle birlikte EK 7 Çizelge 2-3'te gösterilmiştir. EK 7 Çizelge 1-5'te sunulan veriler rekombinant protein üretiminin geliştirilmesinde konak hücre oluşturmak amacıyla *B.subtilis*'te gen silme çalışmaları için bir rehberdir. *B. subtilis*'te rekombinant protein üretimini artırmak amacıyla Morimoto vd.(2008) çoğalmayı etkilemeden genomu adım adım silerek selüloz ve proteaz üretimini artıran *B. subtilis* MBG874'ü oluşturmuştur. Silinen 865 gen, güncel genom dizinine göre 661 gene (Belda vd. 2013, <https://www.genoscope.cns.fr/agc/microscope/metabolism/microcyc> 2009) karşılık gelir. SAP üretiminin MOT koşulunda akı değişkenliği analiziyle belirlenen aktif- ve

kapalı- tepkimeler ile genleri Morimoto vd.(2008)'nın *B. subtilis* MBG874 konak hücresini oluştururken sildikleri genlerle birlikte EK 8 Çizelge 1-4'te değerlendirilmiştir.

Aktif tepkimelerin genlerinin *B.subtilis*'te overekspresyon edilmesiyle protein üretimi artırılabilir (EK 7 Çizelge 4). Kapalı tepkimelerle ilişkili 482 gen *B.subtilis*'in yaşaması için gerekli olmadığı için, protein sentezini artırmak amacıyla silinmeye aday olarak değerlendirilmiştir (EK 7 Çizelge 5.1). Kapalı tepkimelerle ilişkili 54 gen (10%) Morimoto vd.(2008) tarafından silinmiştir ve *B.subtilis*'in yaşaması için gerekli değildir, bu genlerin 44'ü ise aktif tepkimelerle ilişkili değildir (EK 8 Çizelge 3). Ayrıca rekombinant protein üretiminde konak hücre oluşturma amacıyla izoenzime sahip olmayan aktif tepkimelerle ilgili 189 gen silinmemelidir (EK 8 Çizelge 4).

Morimoto vd.(2008) SAP üretiminin 288 aktif tepkimesiyle ilişkili 317 gen arasından R38 (*asnH*, *asnO*), R39 (*yclM*), R52 (*yitB*), R140 (*yrpC*), R208 (*mtbP*), R425 (*aldX*), R858 (*nrdEB*, *nrdEB*), R864 (*pdp*), R870 (*pdp*), R873 (*pdp*), R936 (*pdp*), R941 (*thyA*), R1017 (*phoB*), R1018 (*yybQ*), R1021 (*yitA*), R1035 (*trkA*), ve R1049 (*tetB*) nolu aktif tepkimelerin enzimlerini kodlayan, parantez içinde verilen 16 geni silmiştir. Morimoto vd.(2008) tarafından silinen 11 genin kodladıkları enzimlerin katalizledikleri R38 (*asnH*, *asnO*), R39 (*yclM*), R140 (*yrpC*), R425 (*aldX*), R864 (*pdp*), R941 (*thyA*), R1017 (*phoB*), R1018 (*yybQ*), R1021 (*yitA*), ve R1035 (*trkA*) nolu aktif tepkimeler genleri silinmemiş izoenzimleri tarafından katalizlenebilir: R38 (*asnB*), R39 (*dapG*, *lysC*), R140 (*racE*, *racX*), R425 (*aldY*, *dhaS*, *yfmT*, *ywdH*), R864 (*pnp*, *deoD*), R941 (*thyB*), R1017 (*phoA*, *phoD*), R1018 (*yvoE*), R1021 (*ylnB*), ve R1035 (*ykrM*, *ykqB*, *yuaA*, *yubG*).

R52 (*yitB*), R208 (*mtbP*), R858 (*nrdEB*, *nrdEB*), R870 (*pdp*), R873 (*pdp*), R936 (*pdp*), R1049 (*tetB*) aktif tepkimeleri amp (R52), so3 (R52), trdox (R52, R858), h (R936, R1049), h2o (R858), dcdp (R858), idr1p (R870), thym (R870), pi (R873, R936), uri (R873), cytd (R936), hücre dışı k (R1049), na1 (R1049), amet (R208), ve csu (R208) metabolitlerinin sentezlenmesini sağlar. Ancak, R52 (*yitB*), R208 (*mtbP*), R858 (*nrdEB*, *nrdEB*), R870 (*pdp*), R873 (*pdp*), R936 (*pdp*), R1049 (*tetB*) aktif tepkimelerinin

parantez içinde verilen altı geni: *yitB*, *mtbP*, *nrdEB*, *nrdEB*, *pdp*, *tetB* Morimoto vd.(2008) tarafından silinmiştir. Tepkimelerin ürünleri genleri Morimoto vd.(2008) tarafından silinmemiş, başka aktif *iBsu1144* tepkimeleriyle sentezlenebilir; yani amp ve h R38, h2o R970, idr1p R864, pi R918, uri R863 ile üretilir. *iBsu1144* dışında olan ve *R ile simgelenen BsRN-2016 tepkimelerinden genleri Morimoto vd.(2008) tarafından silinmemiş *R98 ile amet, *R203 ile csn, *R796 ile cytd, *R1002 ile hücre dışı k, *R80 ile so3 ve trdox, *R820 ile dcdp, *R951 ile thym, *R1008 ile na1 sentezlenebilir. Bu kapsamda *B. subtilis* genomunun genom seviye matematik modelin sunabileceği rehberlik yerine deneyim ve bilgi birikimine dayanarak dene-bul yöntemiyle adım adım silinmesi *B. subtilis* MBG874 ile selülaz ve proteaz üretimini artırmıştır (Morimoto vd. 2008). Dolayısıyla, rekombinant protein üretimini artırmak için gen silme çalışmaları BsRN-2016 verileriyle birlikte, *iBsu1144* ile hesaplanan akı değişkenliği analizi sonuçlarının kullanılmasıyla tasarlanabilir.

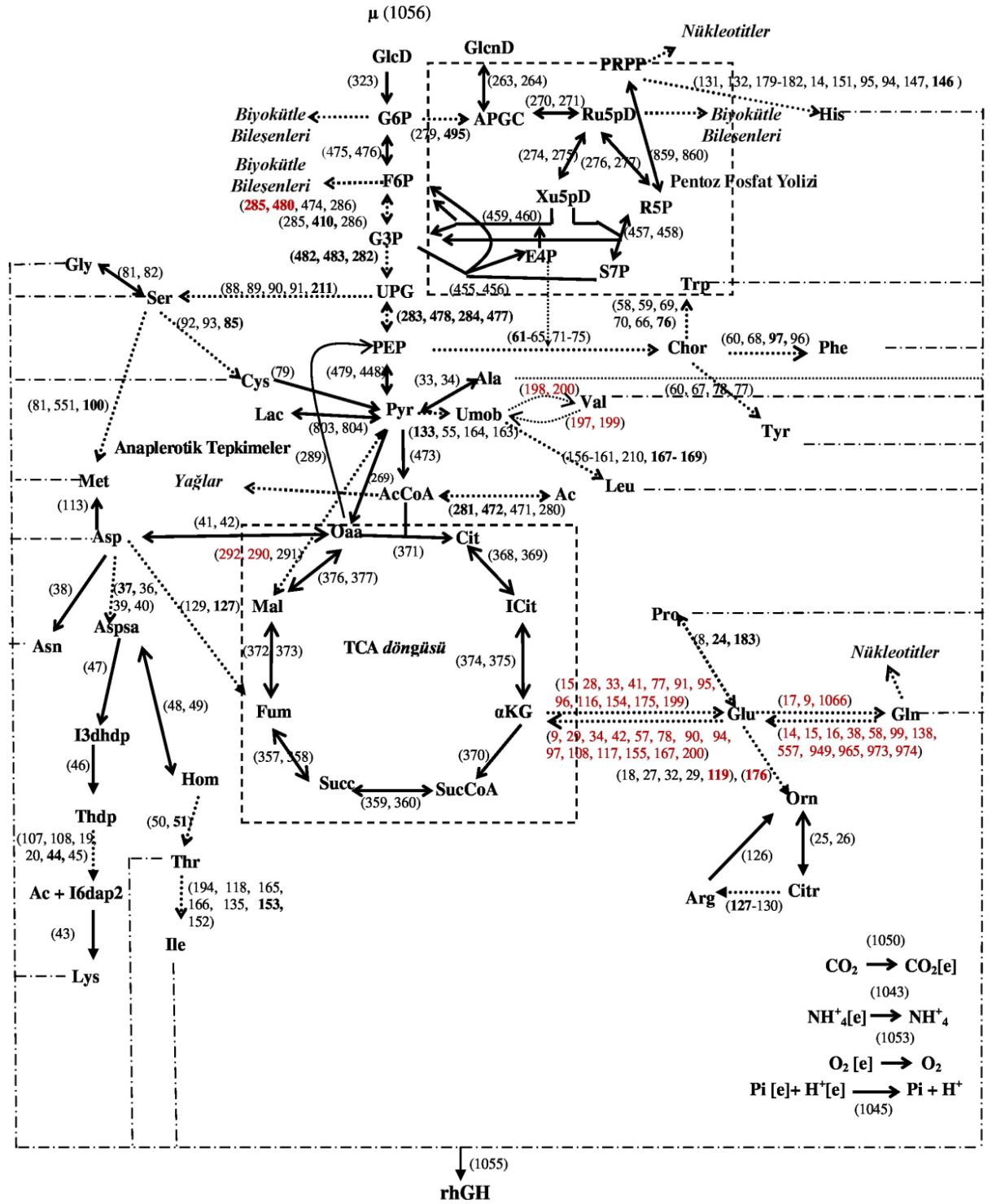
4.2 Oksijen Aktarımının Rekombinant İnsan Büyüme Hormonu Üreten *Bacillus subtilis* Tepkime Sistemine Etkilerinin Transkripsiyonel Düzeyde İncelenmesi

Literatürde oksijenin *B. subtilis* gen ekspresyonlarına etkilerini inceleyen altı çalışma (Ye vd. 2000, Moore vd.2004, Yu vd.2011, Blom vd.2011, Nannapaneni vd. 2012, Nicolas vd. 2012) vardır, fakat terapötik protein üretiminde *B. subtilis*'in iyi tanımlanmış oksijen aktarım koşullarına olan transkripsiyonel cevabını inceleyen bir çalışma yoktur. Dolayısıyla doktora tez araştırmasında ilk defa pMK4::pre(subC)::hGH içeren *B. subtilis* ile rekombinant insan büyüme hormonu (rhGH) üretimi için tasarlanan fermentasyon prosesinde (Özdamar vd.2009) oksijen aktarımının *B. subtilis*'e etkileri mikrodizin analiz sonuçlarıyla değerlendirilmiştir. rhGH üretiminde düşük- (LOT), orta- (MOT), ve yüksek- (HOT) oksijen aktarım koşullarında oksijen aktarımından etkilenen *B. subtilis* genlerini ve tepkimelerini belirlemek amacıyla gerçekleştirilen transkriptom analizinin yanısıra *B. subtilis* tepkime sistemi BsRN-2016'nın gen-enzim-tepkime verilerine dayanarak 719 genle bağlantılı 1067 tepkime ve 742 metabolit içeren kütle korunum temelli genom seviye model *iBsu1144*-rhGH ile *B. subtilis* tepkime hızları hesaplanmıştır. Transkriptom verileriyle değerlendirilen hücre içi akı dağılımları rhGH sentezindeki metabolik mühendislik hedef noktalarının bulunmasının yanında, rekombinant protein üretiminde konak hücre oluşturma çalışmaları için de rehber

niteliğindedir. EK 9’da tepkime, enzim, gen, ve tepkime-enzim-gen ilişkileri verilen *iBsu1144-rhGH*’nin metabolik haritası şekil 4.12’de gösterilmiştir. Glikoneogenesis yolizinin aktif olduğu SAP biyoprosesi için kurulan *iBsu1144*’den R270, R1056, R1069-R1083 nolu tepkimelerin çıkartılıp reaksiyon sistemine rhGH sentez tepkimesinin (Goeddel vd. 1979) eklenmesiyle, glukozun karbon kaynağı olarak kullanıldığı rhGH biyoprosesi için kurulan *iBsu1144-rhGH*’nin tepkimeleri literatürdeki GEM’ler ile EK 9 Çizelge 3’te karşılaştırılmıştır. 1067 *iBsu1144-rhGH* tepkimesinden, 844’ü Oh vd. (2007), 656’sı Henry vd. (2009), 651’i Tanaka vd. (2013), ve 658’i Hao vd. (2013) ile aynıdır (EK 9 Çizelge 3). 616 *iBsu1144-rhGH* tepkimesi Oh vd.(2007), Henry vd..(2009), Tanaka vd.(2013), ve Hao vd.(2013)’da vardır. Belda vd. (2013)’nin güncel gen dizinlemesiyle yenilenen gen-enzim-tepkime bilgileriyle *iBsu1144-2015-rhGH*’de diğer GEM’lere göre 189 yeni tepkime vardır (EK 9 Çizelge 3).

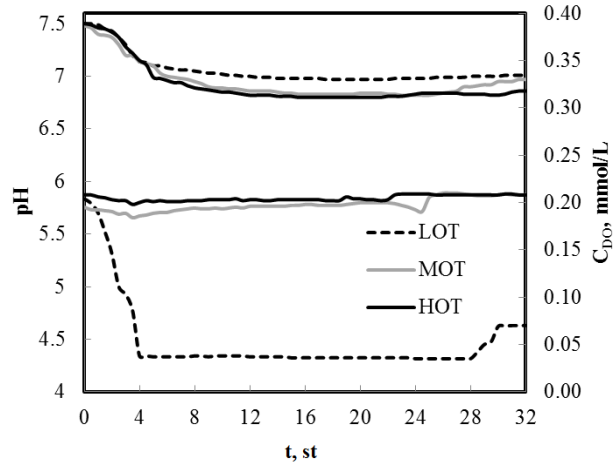
Oksijen aktarımının düşük- (LOT), orta- (MOT), ve yüksek- (HOT) oksijen aktarım koşullarında hücreiçi akı dağılımlarına etkileri kütle-korunum temelli genom seviye model *iBsu1144-rhGH* ile her koşul için hesaplanan 1067 tepkime hızı kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu amaçla ilk olarak rhGH fermentasyon prosesi çözünmüş oksijen derişimi, ortam pH’ı, glukoz, hücre, ve rhGH derişimlerinin kalma süresi (t) ile değişim profilleri göz önüne alınarak dört periyoda bölünmüştür (Şekil 4.13.a, b, c). Periyod I ($0 < t < 8$ st) üstel çoğalma evresi, Periyod II ($8 < t < 14$ st) proteaz inhibitörünün üretim ortamına eklenmesiyle çoğalmanın durduğu ve rhGH’nin üretim ortamına salgılanmaya başladığı fazdır, Periyod III ($14 < t < 20$ st) hücre dışı rhGH üretiminin en yüksek hızla arttığı erken durgunluk fazı, ve Periyod IV ($20 < t < 32$ st) hücre dışı rhGH üretiminin en yüksek olduğu geç durgunluk fazıdır.

rhGH üretiminin en yüksek hızla arttığı faz olan Periyod III ($14 < t < 20$ st) oksijen aktarımının rhGH üretimine etkilerini transkripsiyonel seviyede anlamak ve artmasına yönelik stratejiler geliştirmek amacıyla mikrodizin ve akı analizleri gerçekleştirilmek üzere seçilmiştir. rhGH fermentasyonunun üçüncü periyoduna ait glukoz, hücre, rhGH, aminoasit- ve organik asit- derişimlerinin kalma süresi ile değişimleri (Yılmaz, basılmamış) kullanılarak LOT, MOT, ve HOT’ta $t=16$ st için *iBsu1144-rhGH* ile hesaplanan tepkime hızları EK 10’da sunulmuştur (EK 10 Çizelge 1-11).

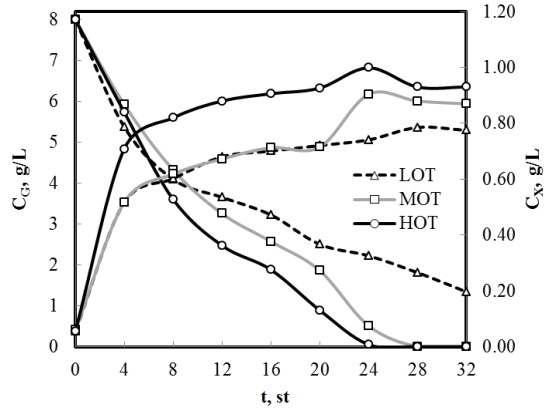


Şekil 4.12 rhGH üretiminin iBsu1144-rhGH tepkimeleriyle oluşum haritası.

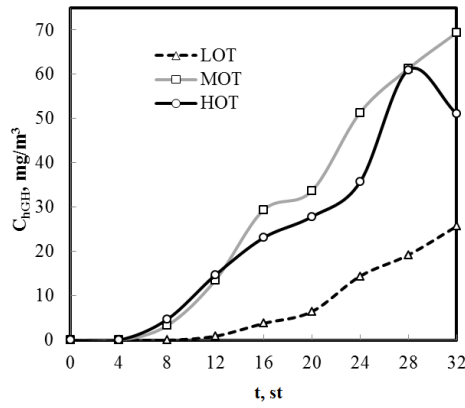
Kesiksiz ok: bir metabolitin tek tepkimeyle olan dönüşümü; kesikli ok: bir metabolitin birden çok tepkimeyle olan dönüşümü; **Kalın R#**: ardışık tepkime sisteminin son tepkimesinin numarası; **R#**: paralel tepkimeler



(a)



(b)



(c)

Şekil 4.13.a. rhGH üretiminde çözünmüş oksijen derişimi ve ortam pH'ının kalma süresi ve oksijen aktarım hızıyla değişimleri
b. rhGH üretiminde glukoz ve hücre derişimlerinin kalma süresi ve oksijen aktarım hızıyla değişimleri
c. rhGH derişiminin kalma süresi ve oksijen aktarım hızıyla değişimi
(Yılmaz Basılmamış Doktora Tezi)

4.2.1 RMA transkriptom verileri ve tepkime hızlarının analizleri

Affymetrix *B.subtilis* gen çipi üzerindeki 5039 prob setine ait ekspresyon seviyeleri rhGH biyoprosesinin t=16 st'i ve farklı oksijen aktarım koşulları için "Affymetrix Genotyping Console" yazılımıyla hesaplanarak EK 11 Çizelge 1'de sunulmuştur. Mikrodizin analizi ön-değerlendirme (*Robust Multi-array Average*: RMA) sonuçları yani RMA adı verilen bu değerler çip görüntüsünün arka-plan düzeltmesi, normalizasyonu ve toparlanması adımları ile elde edilmektedir. Çizelge değerleri problemlerle elde edilen ışıma değerlerinin 2 tabanına göre logaritmalarıdır (EK 11 Çizelge 1). Tüm koşullarda ekspresyon değişimi en düşük iç-düzen geninin kullanımı için (Eisenberg ve Levanon 2013) *B. subtilis* iç-düzen genlerinden (Charles vd.2005) ekspresyonunun standart sapması en düşük olan, tirozil-tRNA sentetazı kodlayan *tyrS* geni seçilmiştir (veriler gösterilmemiştir). Böylece RMA verileri kullanılarak rhGH biyoprosesinin üçüncü periyodu için LOT, MOT, ve HOT koşullarında merkezi karbon metabolizmasına ait glikoliz yolizi, TCA döngüsü, pentoz fosfat yolizi, piruvat dallanma noktası, ve amino asit sentez yolizi genlerinin *tyrS* ekspresyonuna göre ekspresyon oranları hesaplanmıştır ve EK 11 Çizelge 2-11'de verilmiştir. RMA verileriyle hesaplanan gen ekspresyon oranları iki biyolojik tekrara ait sonuçların ortalamasıdır (EK 11 Çizelge 1-11). Bu kapsamda rekombinant insan büyüme hormonu (rhGH) üreten, pMK4::pre(subC)::hGH plazmitini taşıyan *B. subtilis* (Özdamar vd. 2009) için merkezi karbon yolizlerine ait gen ekspresyonları ve hücre içi tepkime hızları birlikte değerlendirilerek rhGH üretimindeki metabolik mühendislik hedef konumlarının bulunması ve biyoprosesin geliştirilmesi hedeflenmiştir.

4.2.1.1 Glikoliz yolizi

Glikoliz yolizi tepkime hızları ve *tyrS*'e göre hesaplanan gen ekspresyon oranları Şekil 4.14'te verilmiştir. Yolizinde bir tepkimeyle ilişkili birden fazla gen izoenzim kodluyorsa genler arasındaki ilişki "VEYA", eğer bir tepkimeyle ilişkili birden fazla genin kodladıkları proteinler bir kompleks oluşturarak o tepkimeyi katalizliyorsa genler arası ilişki "VE" sözcüğüyle Şekil 4.14'te belirtilmiştir. Glikoliz yolizi tepkimeleri glukozun karbon kaynağı olarak kullanıldığı tüm koşullarda aktiftir (Şekil 4.14).

Glukoz tüketim hızı MOT'ta en yüksektir; yani glukoz tüketim hızı LOT, MOT, ve HOT'ta 1.14, 2.85, ve 1.98 mmol/(g_{KH} st)'tir. Glikoliz yolizi akıları MOT'ta en yüksek değerlerini almıştır; LOT'tan MOT'a 2.50-2.80- kat, LOT'tan HOT'a ise 1.74-2.18- kat artmıştır (Şekil 4.14, EK 10 Çizelge 2).

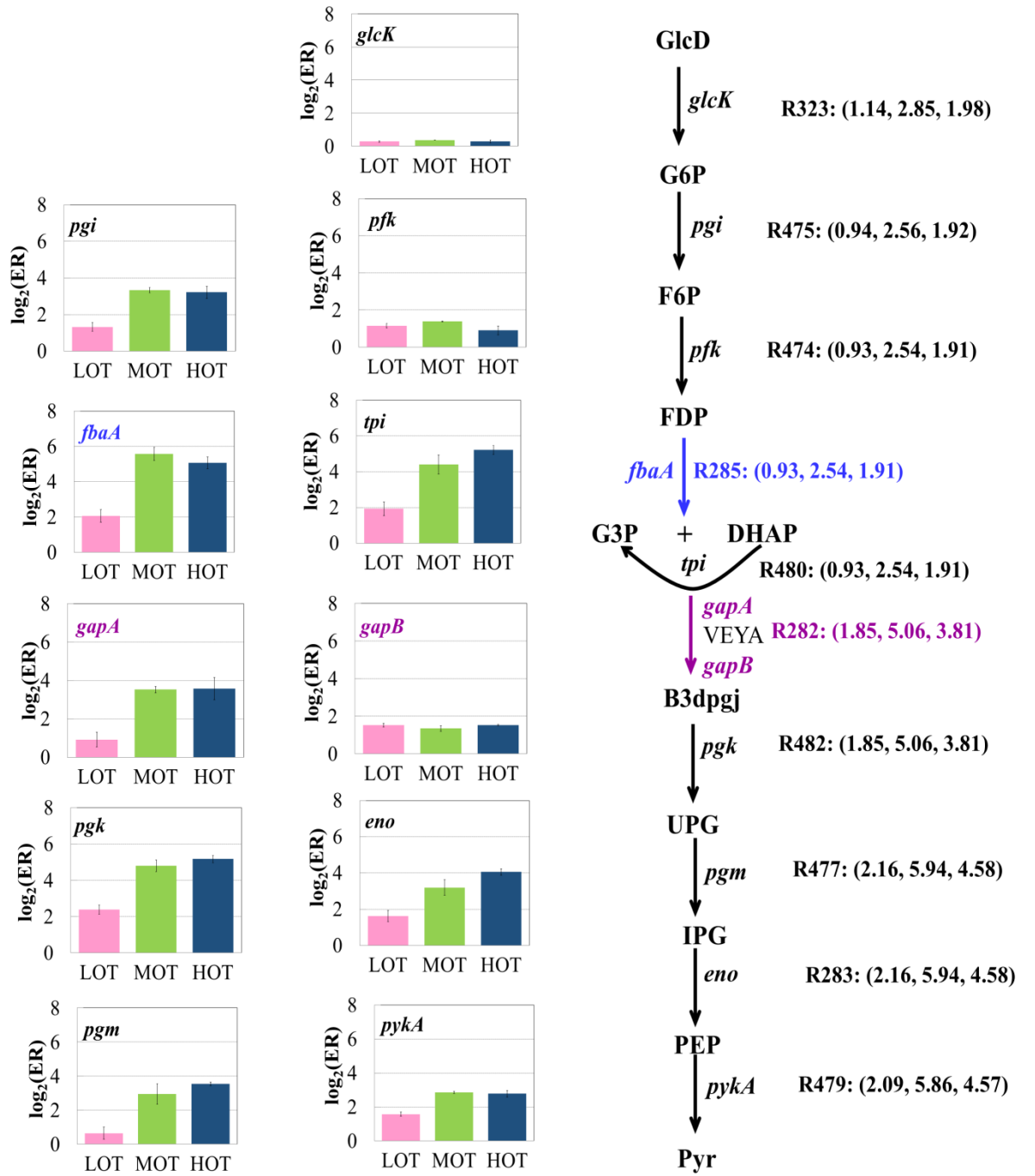
Glikoliz yolizi gen ekspresyonları ve tepkime hızlarının genel olarak LOT'ta minimum değere sahip olması yolizinde enzim üretiminin oksijen aktarımıyla arttığını gösterir (Şekil 4.14). Glikoliz yolizi genlerinden *fbaA* (R285) en yüksek, *glcK* (R323) en düşük ekspresyona sahiptir (EK 11 Çizelge 2, Şekil 4.14).

Sonuçlar 11 glikoliz yolizi geninin oksijen aktarımından dört farklı şekilde etkilendiğini gösterir (EK 11 Çizelge 2): **i)** *pgi* (R475), *gapA* (R282) ve *pykA* (R479) ekspresyonları LOT'tan MOT ve HOT'a en az 2.0- kat artmıştır; fakat MOT'tan HOT'a değişmemiştir; **ii)** *tpi* (R480), *eno* (R283), *fbaA* (R285), *gapA* (R282), *pgk* (R482), ve *pgm* (R477) ekspresyonları LOT'tan HOT'a en az 5.0- kat artmıştır; **iii)** *pfk* (R474) ve *fbaA* (R285) ekspresyonları MOT'ta en yüksektir; ve, **iv)** *glcK* (R323) ve *gapB* (R282) ekspresyonları oksijen aktarımıyla değişmemiştir.

Oksijen aktarımının glikoliz yolizi genlerine en büyük etkisi *fbaA* (R285) ekspresyonunun LOT'tan MOT'a 11.5- kat artmasıdır (Şekil 4.14, EK 11 Çizelge 2).

R282 nolu tepkimeyi katalizleyen iki izoenzimi kodlayan *gapA* (R282) ve CcpN regülönunun üyesi olan *gapB* (R282) (<http://subtiwiki.uni-goettingen.de> 2009) gen ekspresyonları oksijen aktarımından farklı şekilde etkilenmiştir (Şekil 4.14). R282 nolu tepkimenin akı değeri MOT'ta en yüksek olduğu için, oksijen aktarımıyla ekspresyonu artan *gapA* R282 için baskın gen olmalıdır (Şekil 4.14).

Glukoz tüketim hızı MOT'ta en yüksek olduğu için, glukozla ekspresyonlarının arttığı bildirilen *pfk* (R474), *tpi* (R480), *gapA* (R282), *pgk* (R482), *pgm* (R477), *eno* (R283), ve *pykA* (R479) ekspresyonları (<http://subtiwiki.uni-goettingen.de> 2009) oksijen aktarımıyla artmıştır.

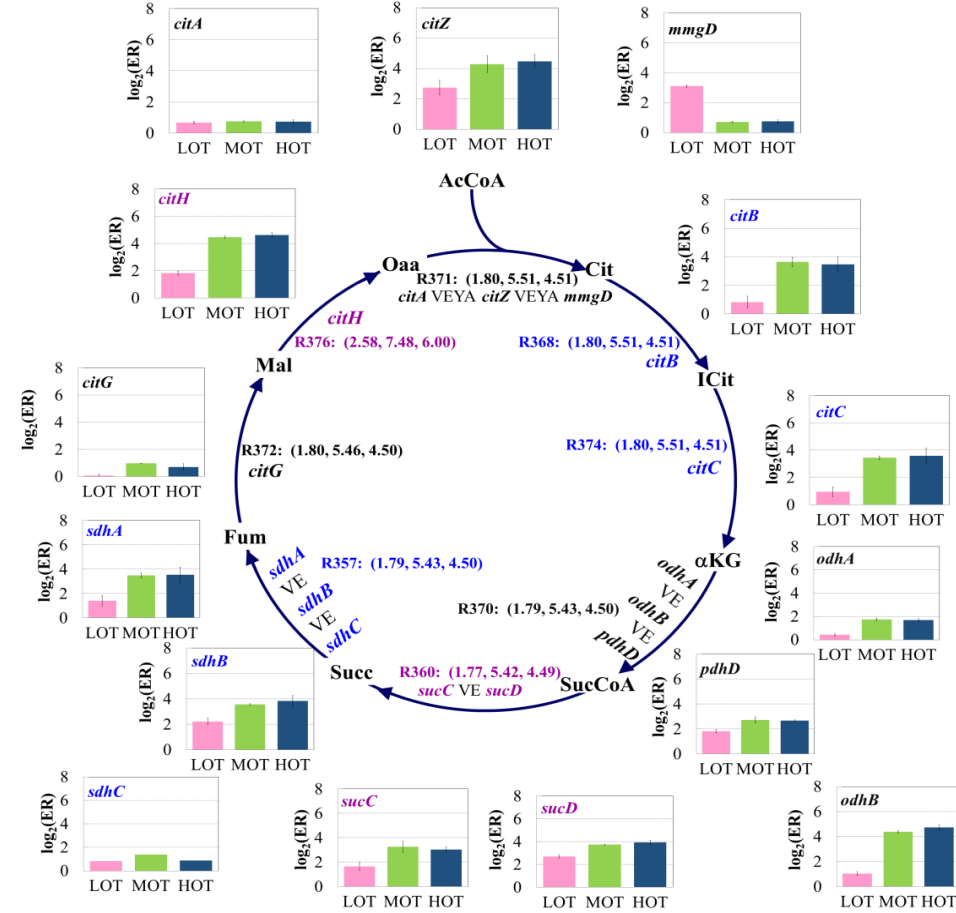


Şekil 4.14 rhGH biyoprosesinin üçüncü periyodunda LOT, MOT, HOT için iBsu1144-rhGH ile hesaplanan glikoliz yolizi tepkime hızları (mmol/(g_{KH} st)) ve RMA verileri kullanılarak iç-düzen geni *tyrS*'e dayanarak hesaplanan yolizi genlerinin ekspresyon oranları (ER)

4.2.1.2 TCA döngüsü

TCA döngüsü akıları ve *tyrS*'e dayanan gen ekspresyon oranları Şekil 4.15'te verilmiştir. TCA döngüsü tüm oksijen aktarım koşullarında aktiftir, tepkime hızları, rhGH sentezi ve glikoliz yolizi akılarıyla uyumlu olarak MOT'ta en yüksektir (EK 10 Çizelge 2-3). TCA döngüsü akıları LOT'tan MOT'a 2.90-3.07- kat, LOT'tan HOT'a 2.32-2.53- kat artmıştır (EK 10 Çizelge 3). Oksijenin hücreiçine (R1053) ve karbondioksitin hücre dışına (R1050) taşınım hızları LOT, MOT, ve HOT'ta, sırasıyla, 4.74, 13.78, 11.32 ve 4.61, 13.73, 11.35 mmol/(g_{KH} st)'tir (EK 10 Çizelge 1). *citA* (R371), *mmgD* (R371), ve *sdhC* (R357) dışındaki TCA döngüsü gen ekspresyonları LOT'tan MOT'a 1.5-10.1- kat, LOT'tan HOT'a 1.5-12.8- kat artmıştır (EK 11 Çizelge 3). TCA döngüsü gen ekspresyonlarının oksijen aktarım koşullarıyla artması oksijenli koşullarda gerçekleşen rhGH fermentasyon prosesi için beklenen bir sonuçtur. Bununla birlikte TCA döngüsü gen ekspresyonlarının MOT'tan HOT'a değişmemesi, MOT ve HOT koşullarının TCA döngüsü gen ekspresyonları üzerinde benzer etkileri oluşturduğunu gösterir (Şekil 4.15). *citZ* (R371), *odhB* (R370), ve *citH* (R376) en yüksek; fakat *citA* (R371) ve *citG* (R372) en düşük ekspresyona sahiptir (EK 11 Çizelge 3, Şekil 4.15).

TCA döngüsü genleri oksijen aktarımına 5 farklı yanıt sunmuştur: **i)** *citZ* (R371), *citB* (R368), *citC* (R374), *citH* (R376), *odhA* (R370), *pdhD* (R370), *sucD* (R360), *sdhA* (R357), ve *sdhB* (R357) ekspresyonları LOT'tan MOT ve HOT'a en az 1.6- kat artmıştır, fakat ekspresyonları MOT'tan HOT'a değişmemiştir; **ii)** *odhB* (R370) ekspresyonu oksijen aktarımıyla artmıştır; **iii)** *sucC* (R360), *sdhC* (R357), ve *citG* (R372) ekspresyonları MOT'ta en yüksektir; ve **iv)** *mmgD* (R371) ekspresyonu sırasıyla LOT'tan MOT'a ve LOT'tan HOT'a 5.3- ve 5.1- kat azalmıştır, MOT'tan HOT'a değişmemiştir; ve, **v)** *citA* (R371) ekspresyonu oksijen aktarımıyla değişmemiştir (EK 11 Çizelge 3). Oksijen aktarımının TCA döngüsü genlerine en güçlü etkisi *odhB* (R370) ekspresyonunun LOT'tan HOT'a 12.8- kat artmasıdır (EK 11 Çizelge 3). R371 nolu tepkimeyi katalizleyen üç izoenzimi (EC 2.3.3.1) kodlayan genlerden *citZ* ekspresyonu oksijen aktarımıyla artmıştır, *mmgD* ekspresyonu azalmıştır,



Şekil 4.15 rhGH biyoprosesinin üçüncü periyodunda LOT, MOT, HOT için iBsu1144-rhGH ile hesaplanan TCA döngüsü tepkime hızları (mmol/(g_{KH} st)) ve RMA verileri kullanılarak iç-düzen geni *tyrS*'e dayanarak hesaplanan yolizi genlerinin ekspresyon oranları (ER)

ve *citA* ekspresyonu değişmemiştir (şekil 4.15, EK 11 izelge 3). Sporlanma sırasında ekspres edilen edilen *mmgD* (Bryan vd. 1996) ekspresyonunun LOT'ta en yüksek olmasının nedeni, oksijen limitasyonunun sporlanmayı artırmasıdır (Yu vd. 2011). Ayrıca CcpA'nın *mmgD* ekspresyonunu baskılayıcı aktivitesi (Bryan vd. 1996) LOT'ta düşüktür. Ayrıca, *citA* (R371) ve *citZ* (R371)'yi kontrol eden proteinler farklıdır; yani, CitR *citA* geninin baskılayıcısıdır, fakat *citZ* geni CcpA ve CcpC proteinleri tarafından kontrol edilir (Jin vd.1994, <http://subtiwiki.uni-goettingen.de> 2009). *citZ* R371'in baskın genidir (şekil 4.15). *citB* (R368) ve *citZ* (R371) ekspresyonlarının (Jourlin-Castelli vd. 2000) oksijensiz koşullarda azalması rhGH fermentasyonunun LOT koşulundaki ekspresyonlarına yansımıştır (şekil 4.15).

Oksijen aktarımı R370 nolu tepkimeyi katalizleyen 2-okzoglutarat dehidrojenazı kodlayan *odhAB* ve *pdhD* ekspresyonlarını artırmıştır, en büyük artış *odhB* ekspresyonundadır (şekil 4.15). Blencke vd.(2003) *odhAB* operonunun CcpA kontrolunde glukozla baskılandığını, fakat *pdhD* ekspresyonunun glukoz ile arttığını açıklamıştır. Ayrıca *sucC* (R360) ve *sucD* (R360) ekspresyonları CcpA kontrolunde glukoz ile azalır (Blencke vd. 2003). R360 nolu tepkimeyi katalizleyen suksinil-CoA sentetazı kodlayan *sucC* (R360) ve *sucD* (R360) ekspresyonları oksijen aktarımıyla artmıştır (şekil 4.15). R357 nolu tepkimeyi katalizleyen süksinat dehidrojenazı kodlayan *sdhABC* gen ekspresyonlarının LOT'ta baskılanması, LOT'ta FsrA proteinin baskılayıcı aktivitesinin (<http://subtiwiki.uni-goettingen.de> 2009) arttığını gösterir.

Oksijenli koşullarda gerçekleşen rhGH fermentasyonu için, genom tarafından aktif olarak işletilen TCA döngüsünde sentezlenen NADH, FADH₂, ve NADPH elektron taşınım sistemiyle sürekli indirgenerek TCA döngüsünün sürekliğini sağlamalıdır. Bununla birlikte *B. subtilis* elektron taşınım tepkimeleri tam olarak karakterize edilmediği için (Belda vd. 2013, <https://www.genoscope.cns.fr/agc/microscope/metabolism/microcyc> 2009), aktif TCA döngüsünde R370, R357, R376, ve R374 ile oluşan NADH, FADH₂, ve NADPH'ın NAD, FAD, ve NADP'ye indirgenerek üretilmesi gereken ATP miktarı alık vd.(1999) elektron taşınım tepkimeleri ve TCA döngüsü tepkime hızları kullanılarak tahmin edilmiştir. Sonuç olarak ATP retimi MOT'ta en yüksektir; LOT, MOT, ve HOT'ta,

sırasıyla, 37.58, 112.06, ve 90.93 mmol/(g_{KH} st)'tir (Çizelge 4.8). LOT'ta ATP'nin %10.48, 0.04, 4.71, ve 84.75'i; MOT'ta %9.75, 0.25, 4.84, ve 85.16'sı; HOT'ta %9.22, 0.07, 4.94, ve 85.78'i, sırasıyla, glikoliz, oksidatif PFY, TCA döngüsü, ve elektron taşınım tepkimeleriyle sentezlenmiştir (Çizelge 4.8).

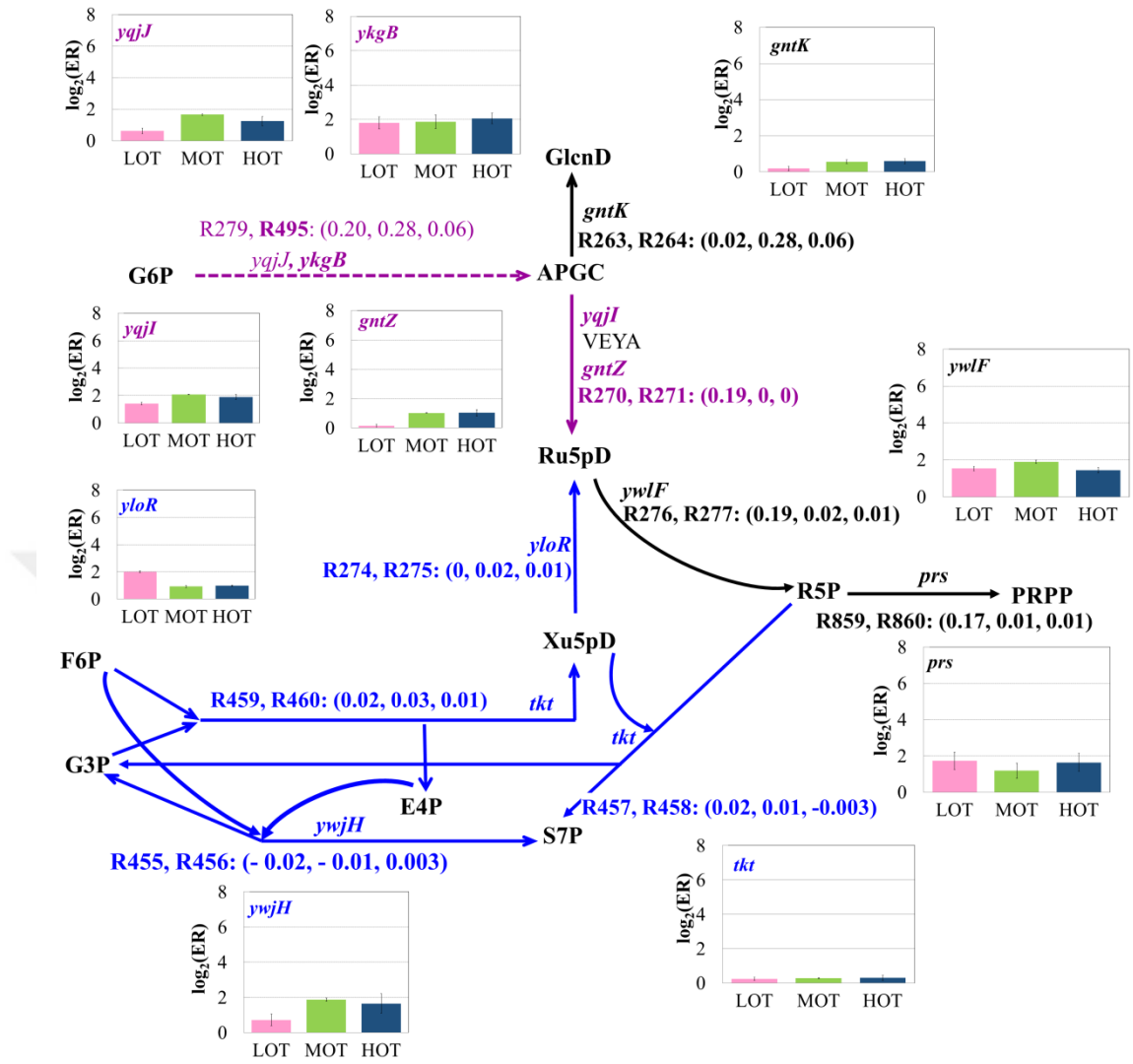
Çizelge 4.8 rhGH üretiminde oksijen aktarımının iBsu1144-rhGH ile hesaplanan ATP üretim hızına etkileri

R #	LOT		MOT		HOT	
	ATP üretimi, mmol/(g _{KH} st)	ATP %	ATP üretimi, mmol/(g _{KH} st)	ATP %	ATP üretimi, mmol/(g _{KH} st)	ATP %
264	0.02	0.04	0.28	0.25	0.06	0.07
360	1.77	4.71	5.42	4.84	4.49	4.94
479	2.09	5.56	5.86	5.23	4.57	5.03
482	1.85	4.92	5.06	4.52	3.81	4.19
990	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
*370	7.16	19.06	21.73	19.39	17.99	19.78
*357	7.16	19.06	21.73	19.39	17.99	19.78
*376	10.33	27.48	29.92	26.70	24.00	26.39
*374	7.20	19.15	22.06	19.68	18.03	19.83
Toplam	37.58	100.00	112.06	100.00	90.93	100.00

*TCA döngüsünde R370, R357, R376, ve R374 nolu tepkimelerle oluşan NADH, FADH₂, ve NADPH'ın P/O=2 oranıyla indirgenerek oluşturması gereken ATP miktarı TCA döngüsü akıları ve Çalık vd.(1999)'deki elektron taşınım tepkimesine dayanarak tahmin edilmiştir.

4.2.1.3 Pentoz fosfat yolizi

Pentoz fosfat yolizi (PFY) akıları ve *tyrS*'e dayanan gen ekspresyon oranları şekil 4.16'da gösterilmiştir. Nükleotit ve hücre bileşenlerinin sentezinde kullanılan Ru5pD glikoliz yolizindeki F6P dallanma noktasından R460, R456, R458, R275, ve R276 nolu tepkimeler ya da G6P'dan NADPH oluşturan R279, R495, ve R270 nolu oksidatif PFY tepkimeleriyle sentezlenir. Ru5pD MOT ve HOT'ta F6P dallanma noktasından gelen metabolik akıyla, LOT'ta oksidatif PFY tepkimeleriyle sentezlenir (Şekil 4.16). PFY



Şekil 4.16 rhGH biyoprosesinin üçüncü periyodunda LOT, MOT, HOT için iBsu1144-rhGH ile hesaplanan PFY tepkime hızları (mmol/(g_{KH} st)) ve RMA verileri kullanılarak iç-düzen geni *tyrS*'e dayanarak hesaplanan yolizi genlerinin ekspresyon oranları (ER)

gen ekspresyonlarının oksijen aktarımıyla değişimlerinde genel bir davranış yoktur. Bununla birlikte, yolizindeki 10 genin oksijen aktarımına transkripsiyonel cevabı beş farklı grupta sınıflandırılmıştır (EK 11 Çizelge 4): *i*) *gntK* (R263, R264), *yqjI* (R270, R271), *gntZ* (R270, R271), ve *ywjH* (R455, R456) ekspresyonları LOT'tan MOT ve HOT'a artmıştır, MOT'tan HOT'a değişmemiştir. Oksijen aktarımı *ywjH* (R455, R456) ekspresyonunu LOT'tan MOT'a 2.2- kat artırarak PFY'deki en güçlü etkiyi oluştursa da, R455 akı değeri 2- kat azalmıştır (EK 10 Çizelge 4, 11.4); *ii*) *ykgB* (R495) ve *tkf*

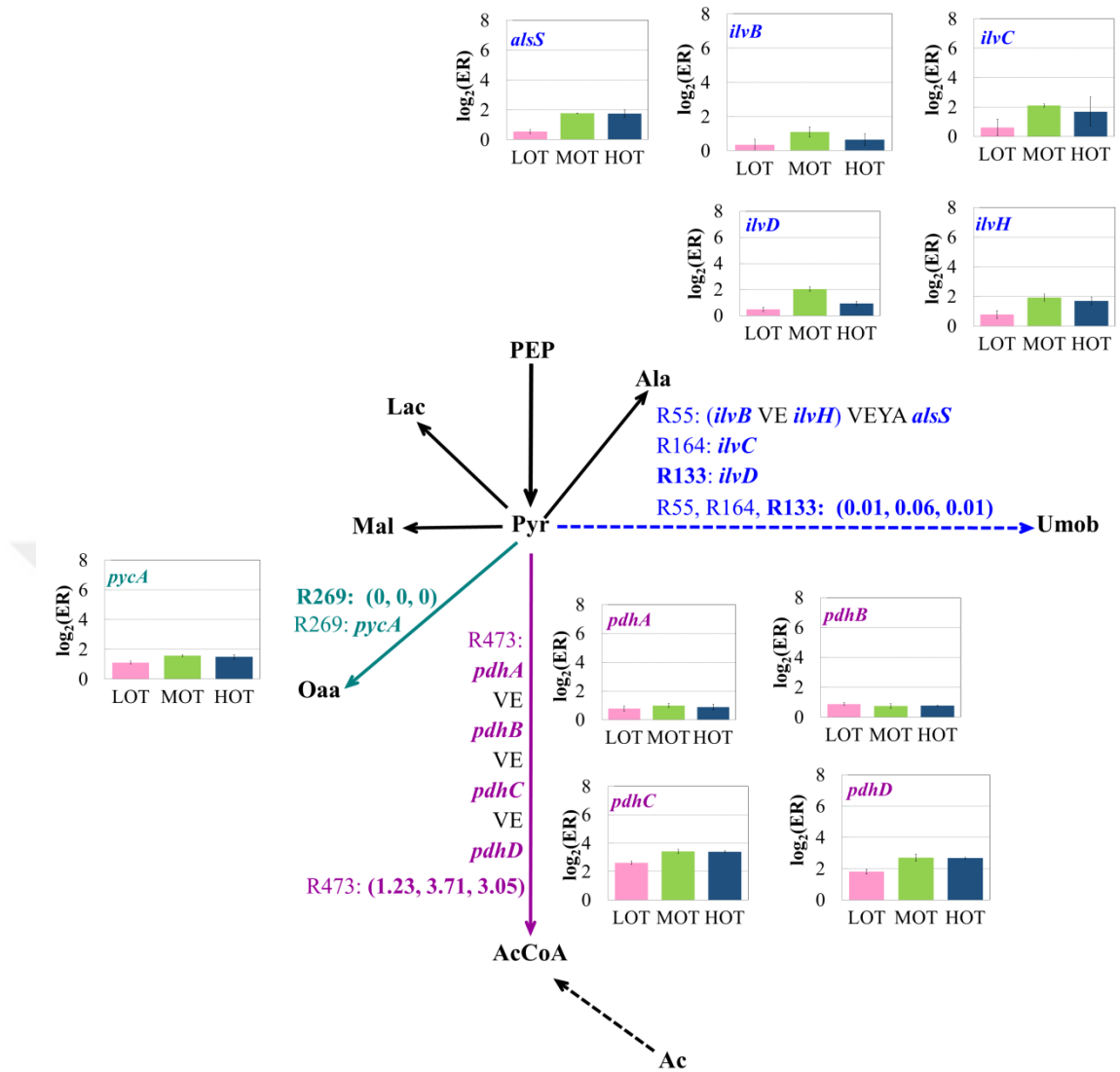
(R457, R458, R459, R460) ekspresyonları oksijen aktarımıyla değişmemiştir, *tkt* sporlanma sürecini denetleyen *Spo0A*'nın baskılayıcı aktivitesi nedeniyle (Molle vd. 2003) MOT ve HOT'ta en düşük ekspresyon değerini almıştır; **iii**) *yqjJ* (R279) ve *ywlF* (R276, R277) ekspresyonları MOT'ta en yüksektir; **iv**) *yloR* (R274, R275) ekspresyonu LOT'tan MOT ve HOT'a 2.0- kat azalmıştır, MOT'tan HOT'a değişmemiştir; ve **v**) *prs* (R859, R860) ekspresyonu MOT'ta en düşük değerini almıştır. PFY genlerinden R495'i katalizleyen 6-fosfoglukonolaktonazı (EC. 3.1.1.31) kodlayan *ykgB*, R270 ile R271'i katalizleyen fosfoglukonat dehidrojenazı (EC. 1.1.1.44) kodlayan *yqjI*, ve R274 ile R275'i katalizleyen ribüloz-5-fosfat 3-epimerazı (EC. 5.1.3. 1) kodlayan *yloR*, sırasıyla, HOT, MOT, ve LOT'ta en yüksek ekspresyona sahiptir (EK 11 Çizelge 4). *yqjI*'nin MOT ve HOT'taki yüksek ekspresyonu R270 ve R271 akıllarını hücre içi regülasyonlar nedeniyle etkilememiştir (Şekil 4.16).

Oksijen aktarımının PFY genlerine etkisi glikoliz yolizi ve TCA döngüsüne göre daha düşük olduğu için, hücre sentezi oksijen aktarımından etkilenmemiştir. LOT, MOT, ve HOT'taki hücre sentez hızı (R1056), sırasıyla, 0.006, 0.007, ve 0.006 st^{-1} 'dir. *gntR* ekspresyonu oksijen aktarımıyla değişmediği için (EK 11 Çizelge 1), *gntZ* (R270, R271) ve *gntK* (R263-R264) ekspresyonlarının LOT'ta düşük olması *gnt* operonunun transkripsiyonel baskılayıcısı olan *gntR*'den bağımsız olmalıdır (Fujita vd. 1986). *gnt* operonunun ekspresyonunu artıran AbrB (Chumsakul vd. 2011) MOT ve HOT'ta *gntK* (R263, R264) ile *gntZ* (R270, R271) ekspresyonlarını artırmıştır. *yqjI* (R270, R271) ve *gntZ* (R270, R271) ekspresyonları LOT'tan MOT ve HOT'a artmış, MOT'tan HOT'a değişmemiş; fakat *yqjI* ekspresyonu *gntZ*'nin LOT, MOT, ve HOT'ta 2.4-, 2.1-, ve 1.8-katıdır. *yqjI* (R270, R271) ve *gntZ* (R270, R271) ekspresyon seviyesindeki farklılıklar R270 ve R271 nolu tepkimeleri katalizleyen 6-fosfoglukonat dehidrojenaz izoenzimlerinin oksijen aktarımıyla farklı şekilde kontrol edildiğini gösterir (Şekil 4.16). Bu sonuç iki izoenzimi kodlayan genlerden sadece *gntZ* (R270, R271)'nin AbrB, CcpA, ve GntR proteinlerinin kontrolünde olmasıyla desteklenmektedir (<http://subtiwiki.uni-goettingen.de> 2009). TnrA azot kısıtlılığında *ywlF* ekspresyonunu baskıladığı için (Yoshida vd. 2003), *ywlF*'nin MOT'ta baskılanmaması hücrenin durgunluk fazının başlangıcında azot kısıtlılığının düşük olduğunu gösterir.

4.2.1.4 Piruvat nodu tepkimeleri

Pyr nodundaki 24 genin oksijen aktarımına cevapları beş farklı grupta sınıflandırılmıştır: **i)** *pykA* (R479), *ilvH* (R55), *alsS* (R55), *pdhC* (R473), *pdhD* (R473), *pycA* (R269), *ybcM* (R291), ve *ywrD* (R291) ekspresyonları LOT'tan MOT ve HOT'a artmıştır, MOT'tan HOT'a değişmemiştir; **ii)** *ilvB* (R55), *ilvC* (R164), *ilvD* (R133), ve *yvdD* (R291) ekspresyonları MOT'ta en yüksektir; **iii)** *yetA* (R291), *yjjA* (R291), ve *ymfJ* (R291) ekspresyonları LOT'tan MOT ve HOT'a azalmıştır, MOT'tan HOT'a değişmemiştir; **iv)** *lctE* (R803 and R804) ekspresyonu LOT'ta en yüksektir; ve, **v)** *purT* (R280), *ackA* (R280), *ydeA* (R291), *yjpA* (R291), *paiB* (R291), *pta* (R472), *pdhA* (R473), *pdhB* (R473) ekspresyonları oksijen aktarımıyla değişmemiştir.

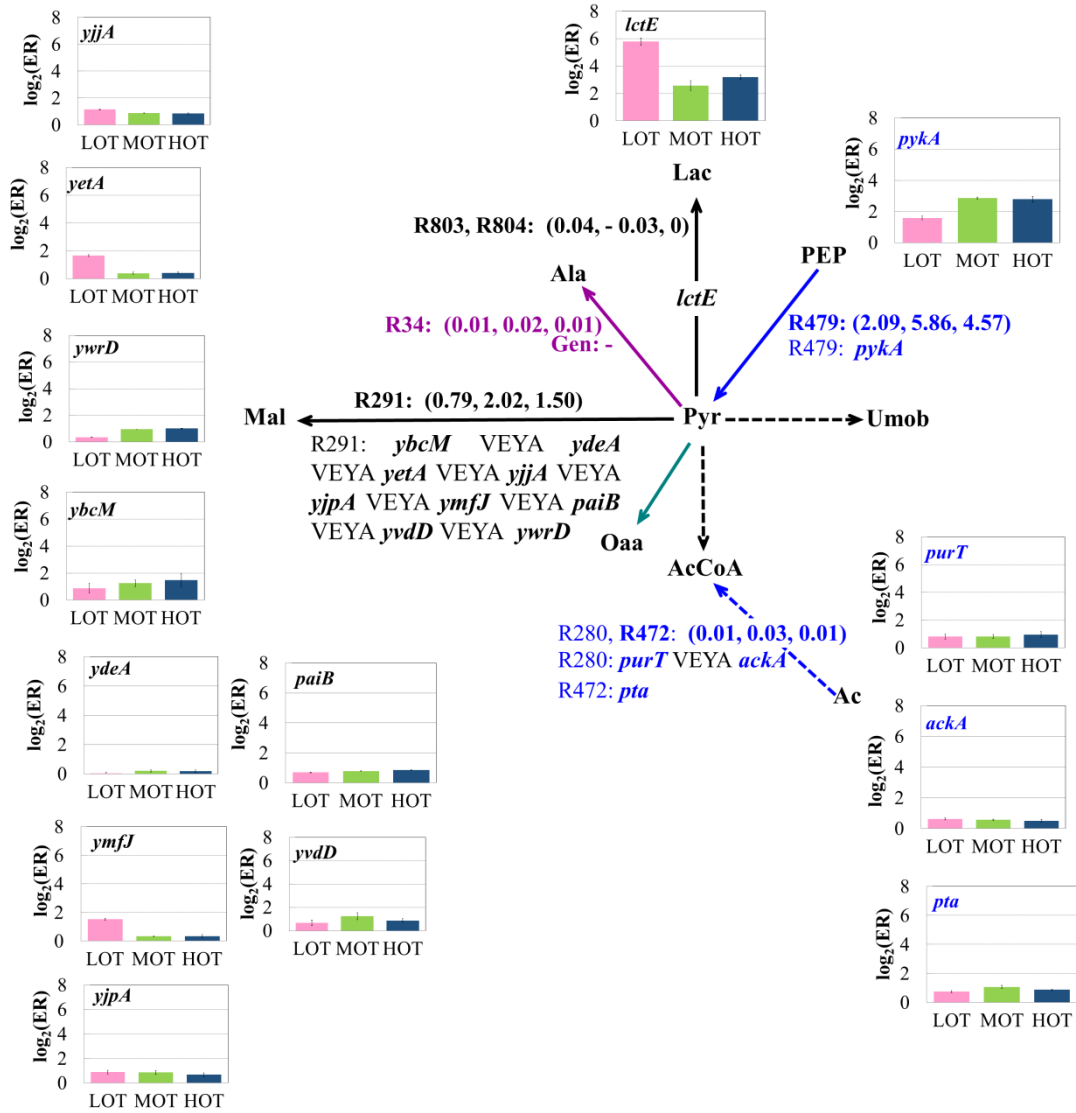
Oksijen aktarımının piruvat nodu genlerine en büyük etkisi *lctE* (R80 ve R804) ekspresyonunun LOT'tan MOT'a 9- kat azalmasıdır; böylece laktat akısı oksijen aktarımıyla azalmıştır. Pyr nodu genlerinden R473'ü katalizleyen piruvat dehidrojenazı (EC.1.2.4.1) kodlayan *pdhC* ve R803 ile R804'ü katalizleyen L-laktat dehidrojenazı (EC. 1.1.1.27) kodlayan *lctE* en yüksek ekspresyona sahiptir. R291'i katalizleyen malat dehidrojenazı (EC.1.1.1.39) kodlayan *ydeA* geni en düşük ekspresyona sahiptir (EK 10 Çizelge 5, 11.5). Pirüvattan valin ve lözin sentezine yönelen metabolik akı, piruvatu 3-metil-2-okzobütanoata (Umob) dönüştüren R55, R164, ve R133 ardışık tepimleri incelenecek olursa R55'i katalizleyen asetolaktat sentazı (EC. 2.2.1.6) kodlayan *ilvB* (R55), R164'ü katalizleyen ketol-asit redüktoizomerazı (EC.1.1.1.86) kodlayan *ilvC* (R164), ve R133'ü katalizleyen dihidroksi-asit dehidratazı (EC. 4.2.1.9) kodlayan *ilvD* (R133) ekspresyonları tepkime hızlarıyla benzer bir şekilde LOT'tan MOT'a artarak bir maksimum değere ulaşmıştır (Şekil 4.17a). R55 ile ilgili olarak, asetolaktat sentazı (EC.2.2.1.6) kodlayan *ilvH* ve *alsS* ekspresyonları LOT'tan MOT ve HOT'a artmıştır (Şekil 4.17a). Glukoz tüketim hızı MOT'ta en yüksek olduğu için, *ilvB* (R55) ve *ilvC* (R164) ekspresyonları MOT'ta yüksektir, çünkü *ilv-leu* operonunun glukoz varlığında ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir (Ludwig vd. 2002). *ilv-leu* operon genlerinin, yani *ilvB* (R55), *ilvH* (R55), ve *ilvC* (R164) ekspresyonlarının LOT'ta düşük olması azot kısıtlılığını gösterir (Tojo vd. 2004).



Şekil 4.17.a rhGH biyoprosesinin üçüncü periyodunda LOT, MOT, HOT için iBsu1144-rhGH ile hesaplanan Pyr nodu tepkime hızları (mmol/(g_{KH} st)) ve RMA verileri kullanılarak iç-düzen geni *tyrS*'e dayanarak hesaplanan yolizi genlerinin ekspresyon oranları (ER)

ilvD ekspresyonunun amino asitlerin varlığında azaldığı gösterildiğinden (Molle vd. 2003), *ilvD* (R133) ekspresyonunun MOT'ta en yüksek değeri alması hücrenin amino asit ihtiyacını gösterir. Ayrıca *alsS* (R55) ekspresyonunun LOT'ta en düşük olması, *alsS* geninin oksijensiz koşullarda baskılanmasıyla (Reents vd. 2006) uyumludur (Şekil 4.17a). Ayrıca *alsSD* operonunun ekspresyonunun lizin yokluğunda RelA'ya bağlı olarak artması (Tojo vd. 2010) lizin sentezinin MOT ve HOT koşullarında hız kısıtlayıcı basamak olduğunu gösterir (Şekil 4.17a). R473 nolu tepkimeyle Pyr'dan AcCoA sentezi oksijen aktarımından etkilenecek LOT, MOT, ve HOT'ta, sırasıyla, 1.23, 3.71, ve 3.05

mmol/(g_{KH} st) akı değerlerini almıştır (Şekil 4.17.a). R473 nolu tepkimenin hızı MOT ve HOT'ta LOT'un, sırasıyla, 3- ve 2.5- katıdır (EK 10 Çizelge 5). R473 nolu tepkimeyi katalizleyen piruvat dehidrojenazı (EC. 1.2.4.1) kodlayan *pdhABCD* operonunun ekspresyonları oksijen aktarımından iki farklı şekilde etkilenmiştir: **i)** *pdhC* ve *pdhD* ekspresyonları LOT'tan MOT ve HOT'a artmıştır, MOT'tan HOT'a değişmemiştir; **ii)** *pdhA* ve *pdhB* ekspresyonları oksijen aktarımından etkilenmemiştir (Şekil 4.17.a). *pdhABCD* operonu ekspresyonları glukozun varlığıyla arttığı için (Blencke vd. 2003), *pdhC* ve *pdhD* ekspresyonları glukoz tüketim hızının en yüksek olduğu MOT'ta ve HOT'ta en yüksektir (Şekil 4.17.a). R269'u katalizleyen piruvat karboksilazı (EC. 6.4.1.1) kodlayan *pycA* ekspresyonu iç-düzen geni *tyrS* ekspresyonuna göre yüksek olsa da, Pyr'dan Oaa'ı sentezleyen R269 nolu tepkime tüm oksijen aktarım koşullarında inaktiftir (Şekil 4.17.a). Bu durum hücreiçinde sentezlenen PycA proteininin glukoz-kısıtlılığında ve durgunluk fazında sentezlenen Clp proteazları tarafından parçalanmasından kaynaklanabilir (Gerth vd. 2008). *lctE* ekspresyonu oksijensiz koşullarda arttığı için (Larsson vd. 2005), R803 ve R804'ü katalizleyen L-laktat dehidrojenazı (EC. 1.1.1.27) kodlayan *lctE* ekspresyonu R804 akısına benzer şekilde LOT'ta en yüksek değeri almıştır (Şekil 4.17b). R479'u katalizleyen piruvat kinazı (EC. 2.7.1.40) kodlayan *pykA* ekspresyonu ve R479 tepkime hızı LOT'tan MOT ve HOT'a artmıştır. *pfk pyk* operonuna ait gen ekspresyonlarının glukoz varlığında artması (Ludwig vd. 2001) *pykA* (R479)'nın glukoz tüketim hızının en yüksek olduğu MOT'taki yüksek ekspresyonuna katkıda bulunmuştur (Şekil 4.17b). R280 ve R472 nolu ardışık tepkimelerle asetattan (Ac) AcCoA oluşum hızı MOT'ta en yüksektir, akı değerleri LOT ve HOT'un 3.0- katıdır (Şekil 4.17b). *ackA* (R280) ekspresyonu CcpA ve CodY proteinleri tarafından düzenlenmekle birlikte (<http://subtiwiki.uni-goettingen.de> 2009), R280'i katalizleyen asetat kinaz izoenzimlerini (EC. 2.7.2.1) kodlayan *ackA* (R280) ve *purT* (R280) ekspresyonları oksijen aktarımıyla değişmemiştir. R280 nolu tepkimenin hızının düşük olmasının nedeni *ackA* (R280) ile *purT* (R280) ekspresyonlarının düşük değerleri nedeniyle kodladıkları asetat kinaz (EC 2.7.2.1) enziminin aktivitesinin düşük olmasıdır. R472 akı değeri MOT'ta LOT ve HOT'un 3- katıdır (Şekil 4.17.b). Pyr'dan Mal sentezleyen R291 nolu tepkimenin hızları LOT, MOT, ve HOT'ta, sırasıyla, 0.79, 2.02, ve 1.50 mmol/(g_{KH} st)'tir. R291 nolu tepkimeyi katalizleyen malat dehidrojenaz



Şekil 4.17.b rhGH biyoprosesinin üçüncü periyodunda LOT, MOT, HOT için iBsu1144-rhGH ile hesaplanan Pyr nodu tepkime hızları (mmol/(g_{KH} st)) ve RMA verileri kullanılarak iç-düzen geni *tyrS*'e dayanarak hesaplanan yolizi genlerinin ekspresyon oranları (ER)

izoenzimlerini (EC. 1.1.1.39) kodlayan dokuz genin *ybcM*, *ydeA*, *yetA*, *yjiA*, *yjpA*, *ymfJ*, *paiB*, *yvdD*, ve *ywrD* oksijen aktarımına cevabı farklıdır: **i)** *ybcM* ve *ywrD* ekspresyonları LOT'tan MOT ve HOT'a artmıştır; **ii)** *yvdD* ekspresyonu MOT'ta en yüksektir; **iii)** *yetA*, *yjiA*, ve *ymfJ* ekspresyonları LOT'tan MOT ve HOT'a azalmıştır; ve **iv)** *ydeA*, *yjpA*, ve *paiB* ekspresyonları oksijen aktarımıyla değişmemiştir (Şekil 4.17.b). Dokuz gen arasından sadece *ywrD* TnrA operonunun üyesidir (<http://subtiwiki.uni-goettingen.de> 2009) ve *yvdD* R291 için baskın gendir (Şekil 4.17b). Amino asit

yolizlerine yönelen akılar çizelge 4.9’da gösterilmiştir. Amino asit yolizlerindeki tüm tepimeler ve amino asitlerin sentez hızları oksijen aktarımından etkilenmiştir (EK 10 Çizelge 6-12). TCA döngüsündeki alfa-ketoglutarat (α KG) dallanma noktasından R9, R15, R28, R29, R33, R34, R41, R42, R57, R77, R78, R90, R91, R94, R95, R96, R97, R108, R116, R117, R154, R155 R167, R175, R199, R200, ve R1067 tepkimeleri aracılığıyla glutamat sentez hızı MOT’ta 0.08 mmol/(g_{KH} st)’tır, bu değer LOT ve HOT’taki akıların 8- katıdır. Benzer şekilde, TCA döngüsünün ikinci dallanma noktası okzaloasetattan (Oaa) aspartik asit sentezlenmesini sağlayan R42 tepkimesinin akı değeri MOT’ta en yüksektir; LOT, MOT, ve HOT’ta, sırasıyla, 0.78, 1.97, ve 1.49 mmol/(g_{KH} st)’tır. Serin ve alanin grubu amino asit yolizlerine yönelen akılar da MOT’ta en yüksektir (Çizelge 4.9). Sonuç olarak, rhGH (R1055) sentezine yönelen akı MOT’ta en yüksek değerini almıştır; R1055 tepkime hızı LOT, MOT, ve HOT’ta, sırasıyla, 0.045, 2.00, and 0.08 μ mol/(g_{KH} st)’tır. Bununla birlikte hücre sentez hızı (R1056) LOT, MOT, ve HOT’ta, sırasıyla, 0.006, 0.007, ve 0.006 st⁻¹’tır (EK 10 Çizelge 1).

Çizelge 4.9 rhGH üretiminde oksijen aktarımının amino asit yolizlerine yönelen akılara etkileri

Amino asit sentez yolizleri	LOT	MOT	HOT
	Amino asit yolizlerine yönelen akılar, mmol/(g _{KH} st)	Amino asit yolizlerine yönelen akılar, mmol/(g _{KH} st)	Amino asit yolizlerine yönelen akılar, mmol/(g _{KH} st)
Serin-grubu amino asitler	0.026	0.048	0.008
Alanin-grubu amino asitler	0.027	0.134	0.017
Histidin	0.001	0.005	0.001
Aspartik-asit grubu amino asitler	0.783	1.966	1.492
Aromatik grup- amino asitler	0.033	0.038	0.003
Glutamik asit- grubu amino asitler	0.007	0.082	0.009

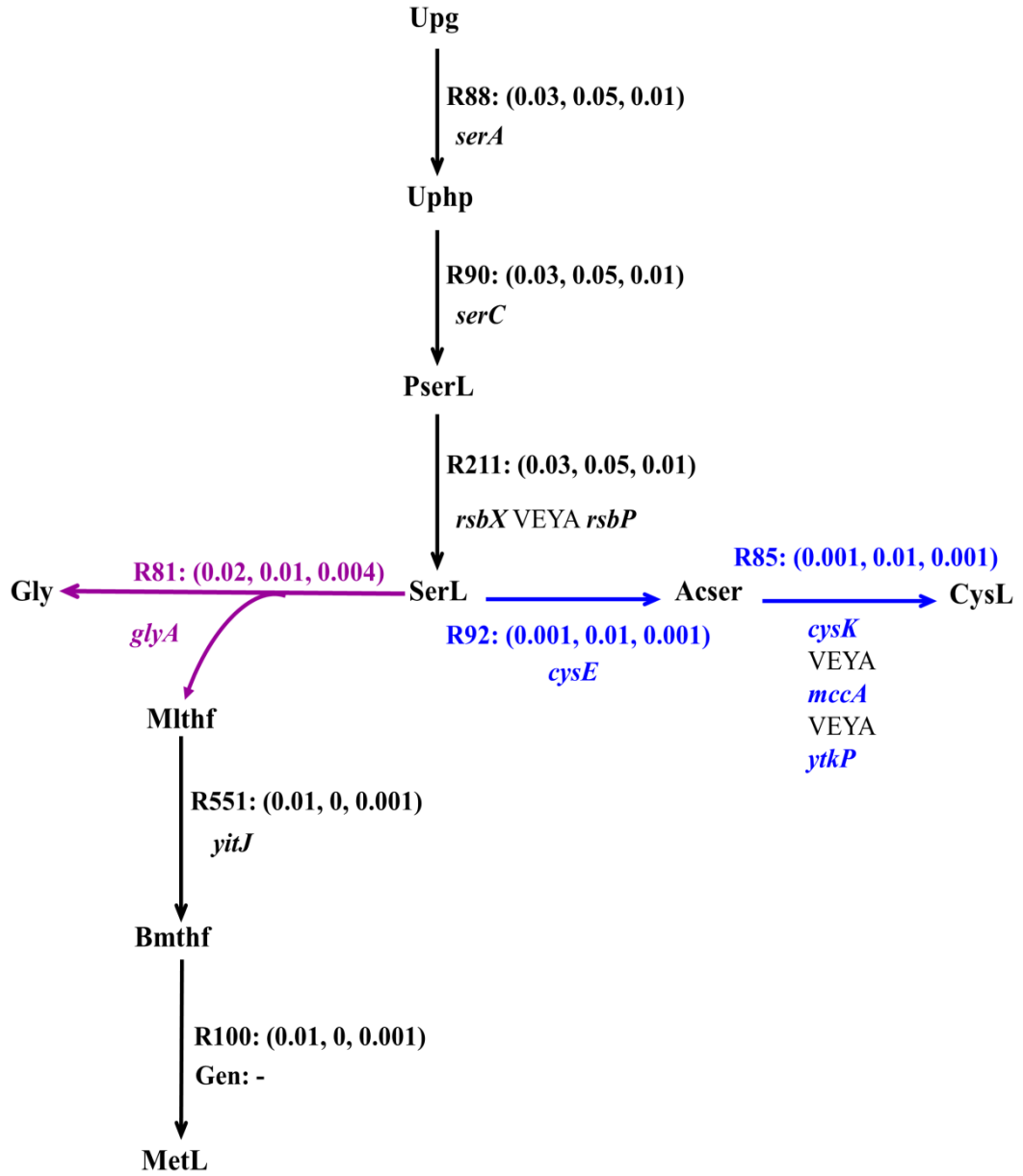
4.2.1.5 Serin-grubu amino asit yolizi

Serin grubu amino asit yolizi akıları ve genler şekil 4.18’de verilmiştir. Genler oksijen aktarımından beş farklı şekilde etkilenmiştir: **i)** *glyA* (R81) ekspresyonu LOT’tan MOT ve HOT’a artmıştır; **ii)** *serA* (R88) ve *serC* (R90) ekspresyonları MOT’ta en yüksek

değerlerini almıştır; **iii)** *rsbX* (R211) ekspresyonu oksijen aktarımıyla artmıştır; **iv)** *cysK* (R85), *mccA* (R85), ve *ytkP* (R85) ekspresyonları LOT'tan MOT ve HOT'a azalmıştır; **v)** *rsbP* (R211), *cysE* (R92), ve *yitJ* (R551) ekspresyonları oksijen aktarımıyla değişmemiştir (EK 11 Çizelge 6). Metiyoninin sentezlenmesini sağlayan R100 nolu tepkimenin gen(ler)i bilinmemektedir (Şekil 4.18). Serin grubu amino asit yolizindeki 10 genden R81'i katalizleyen serin hidroksimetiltransferazı (EC. 2.1.2.1) kodlayan *glyA* ve R85'i katalizleyen sistein sentazı (EC 2.5.1.47) kodlayan *cysK* en yüksek ekspresyona sahiptir; fakat R88'i katalizleyen fosfogliserat dehidrojenazı (EC.1.1.1.95) kodlayan *serA* ve R551'i katalizleyen 5,10-metilentetrahidrofolat redüktazı (EC.1.5.1.20) kodlayan *yitJ* ekspresyonu en düşüktür. Oksijen aktarımının en büyük etkisi *glyA* (R81) ekspresyonunun LOT'tan MOT ve HOT'a 8.6- kat artmasıdır (EK 11 Çizelge 6).

Serin ve sistein sentezine yönelen akılar MOT'ta en yüksek değerlerini alırken, glisine yönelen akı değeri oksijen aktarımıyla azalmıştır. Metiyoninin R100 nolu tepkimeyle sentez hızı LOT'ta en yüksektir (Şekil 4.18). Metiyonin LOT'ta hücre dışında aktarılmış, MOT'ta ise hücre içine alınmıştır. Ayrıca metiyonin LOT, MOT, ve HOT'ta sırasıyla 0.831, 1.867, ve 1.558 mmol/(g_{KH} st) akı değerlerine sahip R1010 nolu tepkimeyle sentezlenmiştir (EK 10 Çizelge 1). R1010'u katalizleyen L-metiyonin-S-oksitredüktazı (EC 1.8.4.11) kodlayan *yppP* (R1010) ekspresyonu, R1010 akı değeriyle uyumlu olarak MOT'ta en yüksektir (EK 11 Çizelge 1).

Sonuç olarak hücre yeterli serin, sistein, glisin, ve metiyonini biyoreaktör işletim koşulları ve fermentasyon koşullarına bağlı olarak sentezleyebilmektedir. Glisin çokluğunda ekspresyonu artan *gcvT* riboswitch'nin (Gutiérrez-Preciado vd. 2009) ekspresyonunun artmasından *glyA* (R81) ekspresyonu LOT'ta azalmıştır. R85'i katalizleyen sistein sentaz (EC. 2.5.1.47) izoenzimlerini kodlayan *ytkP* (R85), CymR ve Spx proteinleriyle ekspresyonları düzenlenen *cysK* (R85) ve *mccA* (R85) genlerinin (<http://subtiwiki.uni-goettingen.de> 2009) ekspresyonları oksijen aktarımıyla biraz azalmıştır (EK 11 Çizelge 6).



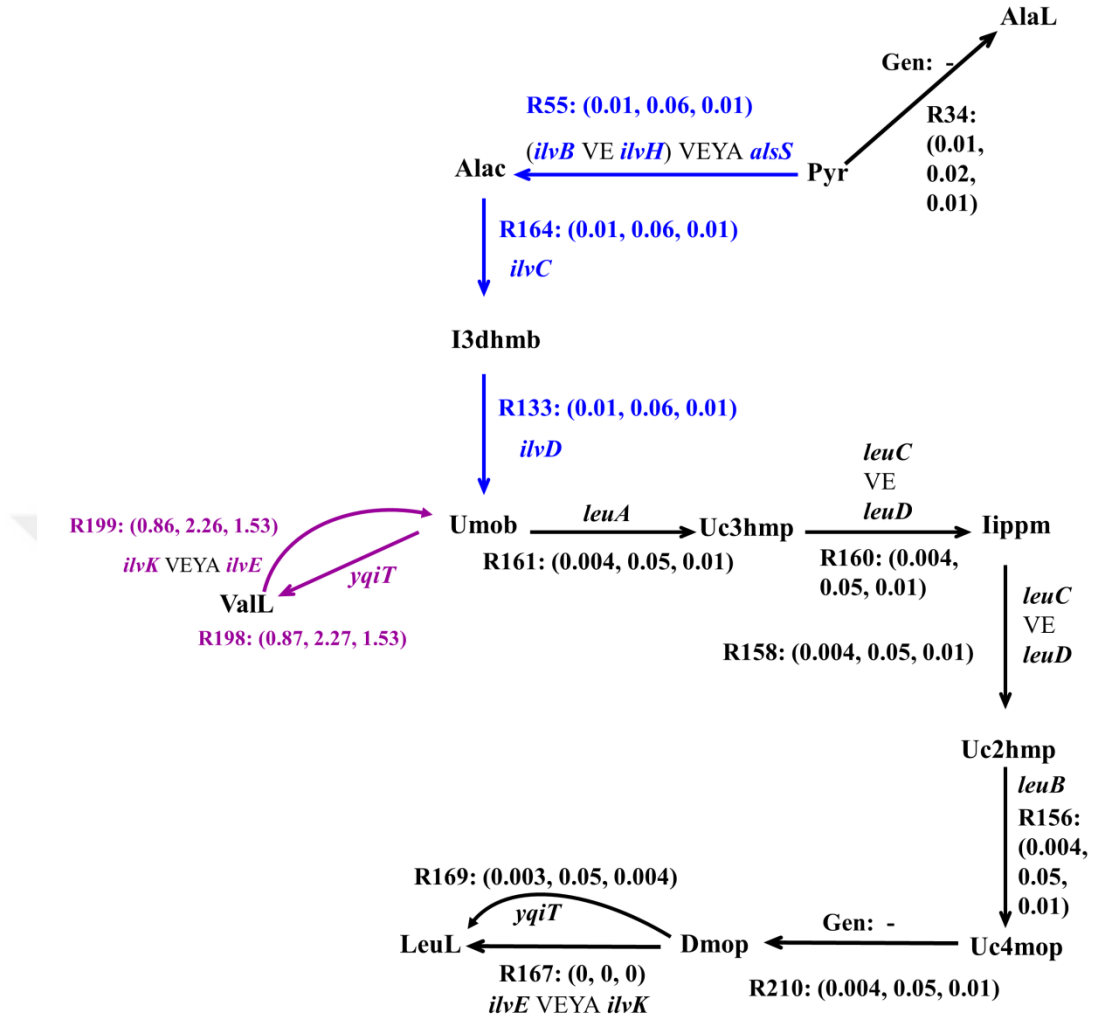
Şekil 4.18 rhGH biyoprosesinin üçüncü periyodunda LOT, MOT, HOT için iBsu1144-rhGH ile hesaplanan serin-grubu amino asit yolizi tepkime hızları (mmol/(g_{KH} st)) ve genleri (R100'ün geni bilinmiyor)

R211'i katalizleyen serin fosfataz izoenzimlerini (EC. 3.1.3.3) kodlayan *rsbX* (R211) ve *rsbP* (R211) genlerinden sadece *rsbX* (R211) ekspresyonu oksijen aktarımıyla artmıştır. CcpA ve SigB proteinleriyle ekspresyonu kontrol edilen *rsbX* geninin (<http://subtiwiki.uni-goettingen.de> 2009) ekspresyonunun stres koşullarıyla arttığı

belirlenmiştir (Petersohn vd. 2001). R211 için baskın gen *rsbX*’tir (Şekil 4.18, EK 11 Çizelge 6).

4.2.1.6 Alanin-grubu amino asit yolizi

Alanin-grubu amino asit yolizi akıları ve genlerinin %58’inin ekspresyonları rhGH üretiminin en fazla olduğu MOT koşulunda en yüksek değerlerini almıştır (Şekil 4.19, EK 10 Çizelge 7, 11.7). Alanin-grubu amino asit yolizi genleri oksijen aktarımından üç farklı şekilde etkilenmiştir: **i)** *ilvH* (R55) ve *alsS* (R55) ekspresyonları LOT’tan MOT ve HOT’a artmıştır; **ii)** *ilvB* (R55), *ilvC* (R164), *ilvD* (R133), *leuA* (R161), *leuC* (R160, R158), *leuB* (R156), ve *ilvK* (R167, R199) ekspresyonları MOT’ta en yüksektir; **iii)** *yqiT* (R169, R198), *leuD* (R160, R158), ve *ilvE* (R167, R199) ekspresyonları oksijen aktarımıyla değişmemiştir (EK 11 Çizelge 7). Alanin sentezleyen R34’ü katalizleyen L-alanin- 2-okzoglutarat aminotransferazı (EC 2.6.1.2) kodlayan gen bilinmemektedir (Şekil 4.19). Yolizinde R198’i katalizleyen valin dehidrojenazı (EC. 1.4.1.9) kodlayan *yqiT* ve R55’i katalizleyen asetolaktat sentazı (EC. 2.2.1.6) kodlayan *ilvB* en düşük, R160’ı katalizleyen 3-izopropilmalat dehidratazı (EC. 4.2.1.33) kodlayan *leuC* en yüksek ekspresyona sahiptir. Oksijen aktarımının en büyük etkisi *leuC* (R160, R158) ekspresyonunun LOT’tan MOT’a 4.6- kat artmasıdır (EK 11 Çizelge 7). *ilv-leu* operonu, yani, *ilvB-ilvH-ilvC-leuA-leuB-leuC-leuD* gen ekspresyonları glukozla arttığı için (Ludwig vd. 2002, <http://subtiwiki.uni-goettingen.de> 2009), *ilvB* (R55), *ilvC* (R164), *leuA* (R161), *leuB* (R156), ve *leuC* (R160, R158) ekspresyonları glukoz tüketim hızının en yüksek olduğu MOT koşulunda yüksektir (EK 11 Çizelge 7). *ilv-leu* operonuna ait *ilvB* (R55), *ilvH* (R55), *ilvC* (R164), *leuA* (R161), *leuB* (R156), ve *leuC* (R160, R158) gen ekspresyonlarının LOT’ta azalması azot kısıtlılığına ve TnrA’nın baskılayıcı aktivitesine işaret eder (Tojo vd. 2004). *leuC* ve *leuD*’nin kodladığı 3-izopropilmalat dehidratazın (EC 4.2.1.33) katalizlediği R158 ve R160 nolu tepkimeler en yüksek akı değerlerini MOT’ta almıştır (Şekil 4.19). 3-izopropilmalat dehidratazın (EC 4.2.1.33) büyük ve küçük alt birimlerini kodlayan *leuC* (R160, R158) ve *leuD* (R160, R158) ekspresyonları oksijen aktarımından farklı şekilde etkilenmiştir; *leuC* ekspresyonu MOT’ta en yüksek değerini alırken, *leuD* ekspresyonu oksijen aktarımıyla değişmemiştir (EK 11 Çizelge 7). R167 ve R199’u katalizleyen amino asit



Şekil 4.19 rhGH biyoprosesinin üçüncü periyodunda LOT, MOT, HOT için iBsu1144-rhGH ile hesaplanan alanin-grubu amino asit yolizi tepkime hızları (mmol/(g_{KH} st)) ve genleri (R34 ve R210'un genleri bilinmemektedir)

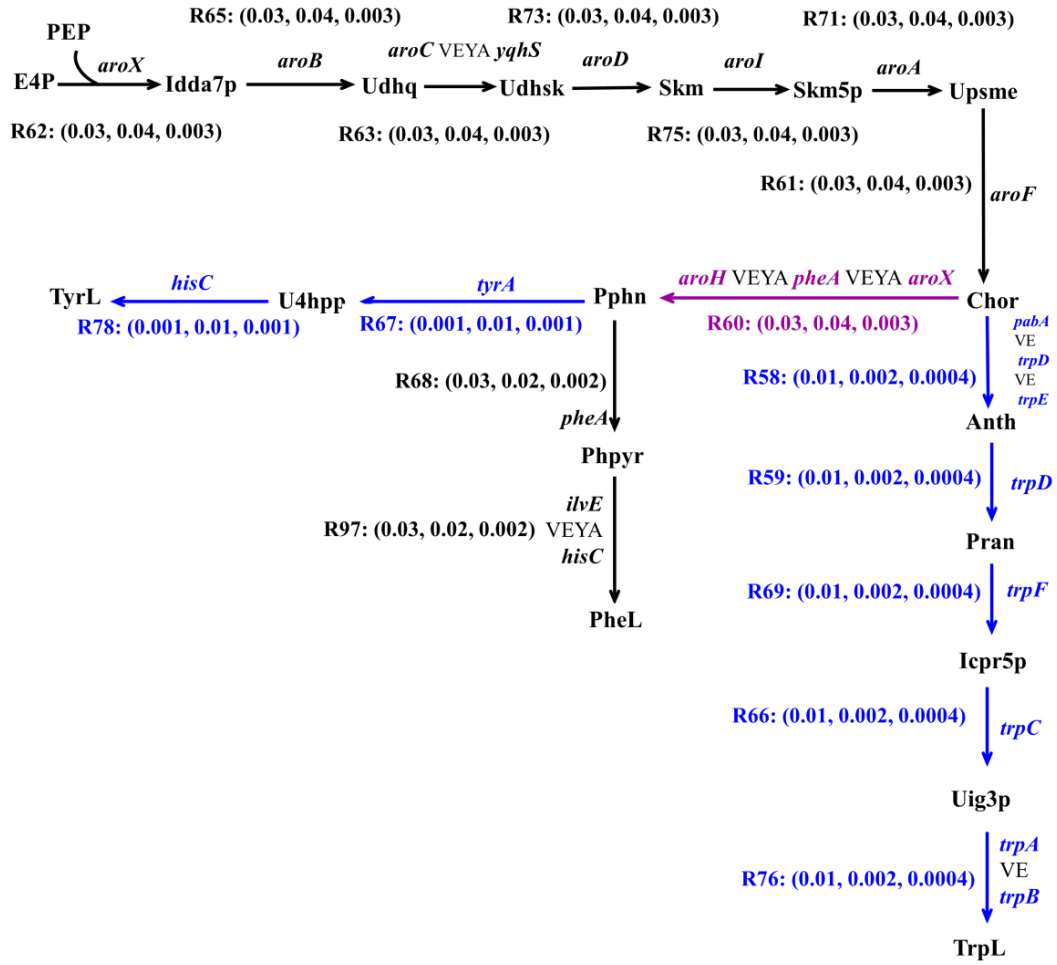
aminotransferaz izoenzimlerini (EC. 2.6.1.42) kodlayan, CodY kontrolündeki *ilvE* ve *ilvK*'dan (<http://subtiwiki.uni-goettingen.de> 2009) sadece *ilvK* ekspresyonu oksijen aktarımıyla artmıştır (EK 11 Çizelge 7). *ilvK* ekspresyonunun MOT'ta yüksek olması guanozin(penta)tetrafosfatın lözin ve valin kısıtlılığında amino asit sentezini artırmaya yönelik etkilerini gösterir (Kriel vd. 2014). *yqiT* (R169, R198) genini içeren *bkd* operonunun ekspresyonunun izolözin ya da valin varlığında arttığı ve sigma faktörü SigL'ye bağlı olduğu gösterilmiştir (Debarbouille vd. 1999). R169'u katalizleyen lözin dehidrojenazı (EC. 1.4.1.9) ve R198'i katalizleyen valin dehidrojenazı (EC. 1.4.1.9) kodlayan *yqiT* ekspresyonu oksijen aktarımıyla değişmemiştir; fakat yolizi tepkime

hızları MOT'ta en yüksek değeri alarak oksijen aktarımından etkilenmiştir. Dolayısıyla hücre kendisi için gerekli izolözin, valin, ve alanini sentezleyebilmektedir.

4.2.1.7 Aromatik asit grubu amino asit yolizi

Glikoliz yolizi metabolitlerinden PEP ve pentoz fosfat yolizindeki E4P'ın tepkimeye girmesiyle başlayan aromatik grup amino asit yolizi tepkimeleri R62, R65, R63, R73, R75, R71, ve R61 nolu ardışık yedi tepkimeyle öncelikle Chor sentezini sağlar; oksijen aktarımından etkilenen bu tepkimelerin hızları LOT, MOT, ve HOT'ta sırasıyla 0.03, 0.04, ve 0.003 mmol/(g_{KH} st)'tir, MOT'ta en yüksektir (Şekil 4.20, EK 10 Çizelge 8). Benzer şekilde, **i)** Chor'u TyrL'e dönüştüren R60, R67, ve R78 numaralı ardışık tepkimelerin akıları da MOT'ta en yüksektir; fakat **ii)** Chor'u TrpL'ye dönüştüren R58, R59, R69, R66, R76 ve **iii)** Pphn'yi PheL'ye dönüştüren R68 ve R97 numaralı iki ardışık tepkime sisteminin akı değerleri oksijen aktarımıyla azalmıştır (Şekil 4.20).

Aromatik asit grubu amino asit yolizinin 19 geninden 13'ü oksijen aktarımından üç farklı şekilde etkilenmiştir: **i)** *aroA* (R71) ve *aroH* (R60) ekspresyonları MOT'ta en yüksektir; **ii)** *aroI* (R75), *pheA* (R60, R68), ve *tyrA* (R67) ekspresyonları LOT'ta en yüksektir; fakat, **iii)** *trpE* (R58), *aroC* (R63), *yqhS* (R63), *aroD* (R73), *trpB* (R76), *hisC* (R97, R78), *trpC* (R66), ve *ilvE* (R97) ekspresyonları oksijen aktarımıyla değişmemiştir (EK 11 Çizelge 8). R75'i katalizleyen şikimat kinazı (EC 2.7.1.71) kodlayan *aroI*, R60'ı katalizleyen korizmat mutazı (EC 5.4.99.5) kodlayan *aroH*, ve R76'yı katalizleyen triptofan sentaz (alfa alt birimi) (EC. 4.2.1.20) kodlayan *trpA* LOT, MOT, ve HOT'ta en yüksek ekspresyona sahip genlerdir. Bununla birlikte, R69'ı katalizleyen N-(5'-fosforibozil)antranilat izomerazı (EC. 5.3.1.24) kodlayan *trpF* en düşük ekspresyona sahiptir (EK 11 Çizelge 8). Oksijen aktarımının en güçlü etkisi *pheA* ekspresyonunun LOT'tan HOT'a 3.7- kat azalmasıdır (EK 11 Çizelge 8). Antranilat sentaz (EC. 4.1.3.27) tarafından katalizlenen R58 nolu tepkimenin akısı oksijen aktarımıyla azalırken, antranilat sentazın ikinci alt-birimini kodlayan *pabA* (R58) ekspresyonu MOT'ta en yüksektir. Antranilat sentazın birinci alt-birimini (EC. 4.1.3.27) kodlayan *trpE* (R58) ekspresyonu osijen aktarımıyla değişmezken, antranilat fosforiboziltransferazı (EC. 2.4.2.18) kodlayan *trpD* (R58, R59) ekspresyonu LOT'tan



Şekil 4.20 rhGH biyoprosesinin üçüncü periyodunda LOT, MOT, HOT için iBsu1144-rhGH ile hesaplanan aromatik amino asit yolizi tepkime hızları (mmol/(g_{KH} st)) ve genleri

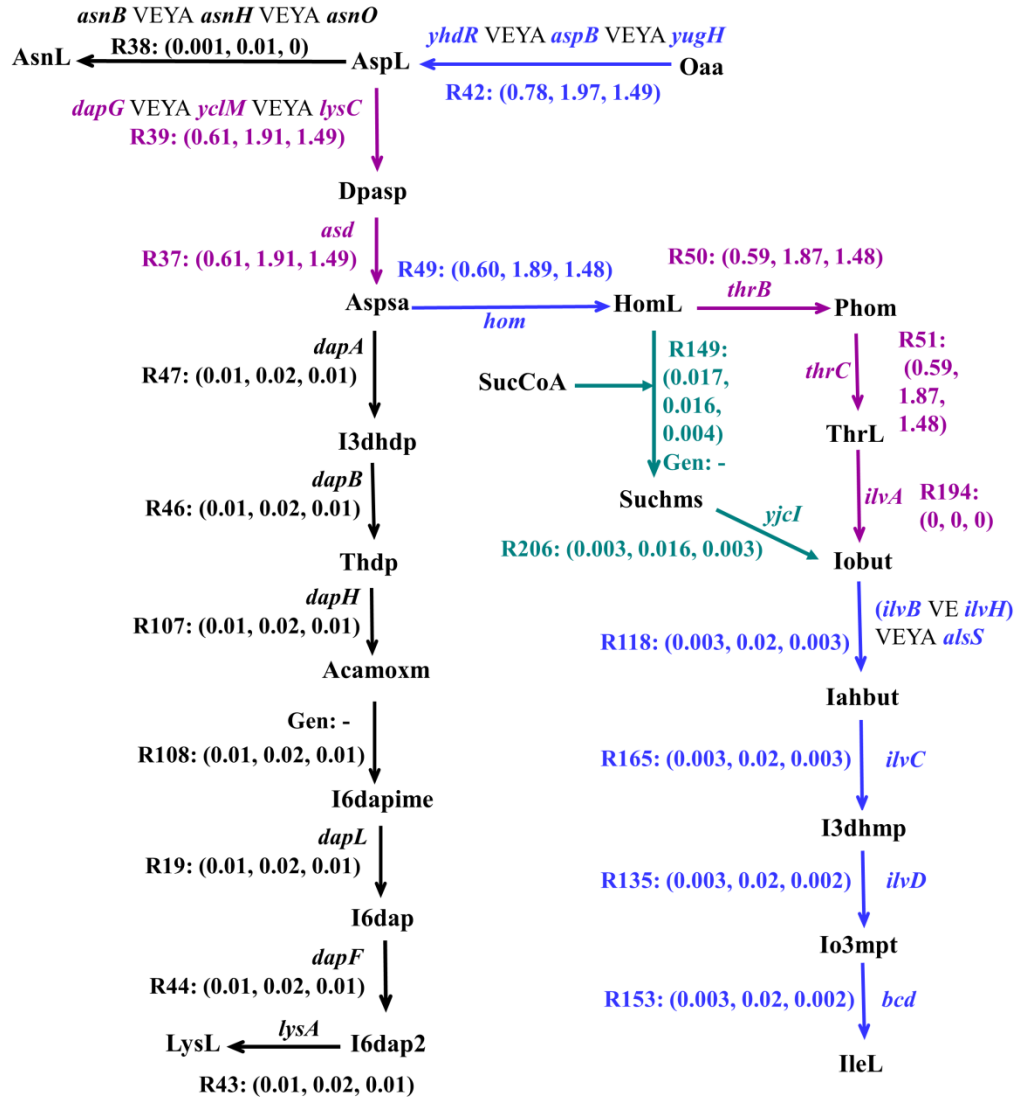
HOT'a biraz azalmıştır (EK 11 Çizelge 8). R58 akısının oksijen aktarımıyla azalmasının nedeni *pabA* translasyonunun, triptofanla aktif hale geçen TRAP yüzünden baskılanması olabilir (Yang vd. 1995). Chor'dan TrpL dönüşümünü sağlayan, akıları oksijen aktarımı ile azalan R58, R59, R69, R66, ve R76 nolu ardışık tepkimeleri katalizleyen enzimleri kodlayan *trp* operonu genleri oksijen aktarımından farklı şekilde etkilenmiştir: **i)** *trpF* (R69) ekspresyonu LOT'tan MOT'a biraz artmıştır, **ii)** *trpA* (R76) ve *trpD* (R58, R59) ekspresyonları LOT'tan HOT'a biraz azalmıştır; fakat, **iii)** *trpE* (R58), *trpC* (R66), ve *trpB* (R76) ekspresyonları oksijen aktarımından etkilenmemiştir (EK 11 Çizelge 8). MtrB triptofan varlığında *trp* operonunun transkripsiyonunu azaltır (Otridge ve Gollnick 1993). *trp* operonunun gen ekspresyonları oksijen aktarımıyla

azalmadığı için, hücre içi triptofan derişimi MtrB proteinini aktif hale getirecek düzeyde değildir.

Metabolik akının fenilalanin ve tirozine yönlendiği prefenat (Pphn) dallanma noktasında: **i)** R60 ve R68'i katalizleyen prefenat dehidratazı (EC. 4.2.1.51) kodlayan *pheA* ekspresyonu LOT'ta en yüksektir (EK 11 Çizelge 8). Dolayısıyla fenilalaninin inhibisyon etkisiyle (<http://subtiwiki.uni-goettingen.de> 2009) R68 akı değeri LOT'tan MOT ve HOT'a azalmıştır (Şekil 4.20); **ii)** R67'yi katalizleyen prefenat dehidrojenazı (EC. 1.3.1.12) kodlayan *tyrA* ekspresyonu en yüksek LOT'tadır, fakat tirozinin inhibisyon etkisiyle (<http://subtiwiki.uni-goettingen.de> 2009) akı değeri MOT'ta en yüksektir (Şekil 4.20). Tyr sentezi düşük akı değerlerinden dolayı protein sentezi için bir darboğaz olabilir. Metabolik akı fenilalanin sentezine yöneldiğinde *ilvE* ve *hisC* tarafından kodlanan fenilalanin transaminazın (EC. 2.6.1.57) katalizlediği R97 nolu tepkimenin akısı LOT'tan MOT ve HOT'a azalmıştır (Şekil 4.20). *hisC* (R78, R97) ve kazamino asitlerle baskılanan *ilvE* ekspresyonu (Mäder vd. 2002) oksijen aktarımıyla değişmemiştir. *pheA* (R60, R68) yerine *aroH* (R60) ekspresyonu MOT'ta en yüksek olduğu için, akı değeri MOT'ta en yüksek olan R60 nolu tepkime için baskın gen *aroH* olmalıdır.

4.2.1.8 Aspartik asit grubu amino asit yolizi

Aspartik asit grubu amino asit yolizi akıları TCA döngüsündeki Oaa dallanma noktasından başlayarak oksijen aktarımından etkilenmiş, çoğunlukla MOT'ta en yüksektir (Şekil 4.21, EK 10 Çizelge 9). Aspartik asit yolizi genleri oksijen aktarımına yedi farklı cevap vermiştir: **i)** *asnH* (R38), *dapL* (R19), *ilvH* (R118), ve *alsS* (R118) ekspresyonları LOT'tan MOT ve HOT'a artmıştır, MOT'tan HOT'a değişmemiştir; **ii)** *asd* (R37), *ilvA* (R194), *ilvC* (R165), *ilvB* (R118), ve *ilvD* (R135) ekspresyonları MOT'ta en yüksektir; **iii)** *asnO* (R38) ve *dapG* (R39) ekspresyonları LOT'tan MOT'a azalmıştır, MOT'tan HOT'a değişmemiştir; **iv)** *dapA* (R47), *lysA* (R43), *thrB* (R50), ve *thrC* (R51) ekspresyonları LOT'tan MOT ve HOT'a azalmıştır; **v)** *yhdR* (R42), *aspB* (R42), *yugH* (R42), ve *hom* (R49) ekspresyonları HOT'ta en düşüktür; fakat, **vi)** *dapB* (R46) ekspresyonu MOT'ta en düşüktür; ve **vii)** *asnB* (R38), *yclM* (R39), *lysC* (R39),



Şekil 4.21 rhGH biyoprosesinin üçüncü periyodunda LOT, MOT, HOT için iBsu1144-rhGH ile hesaplanan aspartik asit grubu amino asit yolizi tepkime hızları (mmol/(g_{KH} st)) ve genleri (R108 ve R149'un genleri bilinmemektedir)

dapH (R107), *dapF* (R44), ve *bcd* (R153) ekspresyonları oksijen aktarımıyla değişmemiştir (EK 11 Çizelge 9). R42'yi katalizleyen aspartat aminotransferaz izoenzimlerini (EC. 2.6.1.1) kodlayan *aspB*, *yugH* ve *yhdR* genlerinden, *yugH* en yüksek ekspresyona sahiptir. R38'i katalizleyen asparajin sentazı (EC 6.3.5.4) kodlayan *asnH* ve *asnO* LOT ve MOT'ta en düşük ekspresyona, R39'u katalizleyen aspartokinazı (EC. 2.7.2.4) kodlayan *lysC* HOT'ta en düşük ekspresyona sahiptir. R46'yı katalizleyen dihidrodipikolinat redüktazı (EC 1.3.1.26) kodlayan *dapB* ekspresyonu en yüksek ekspresyona sahiptir. Oksijen aktarımının en büyük etkisi *dapB* (R46) ekspresyonunun

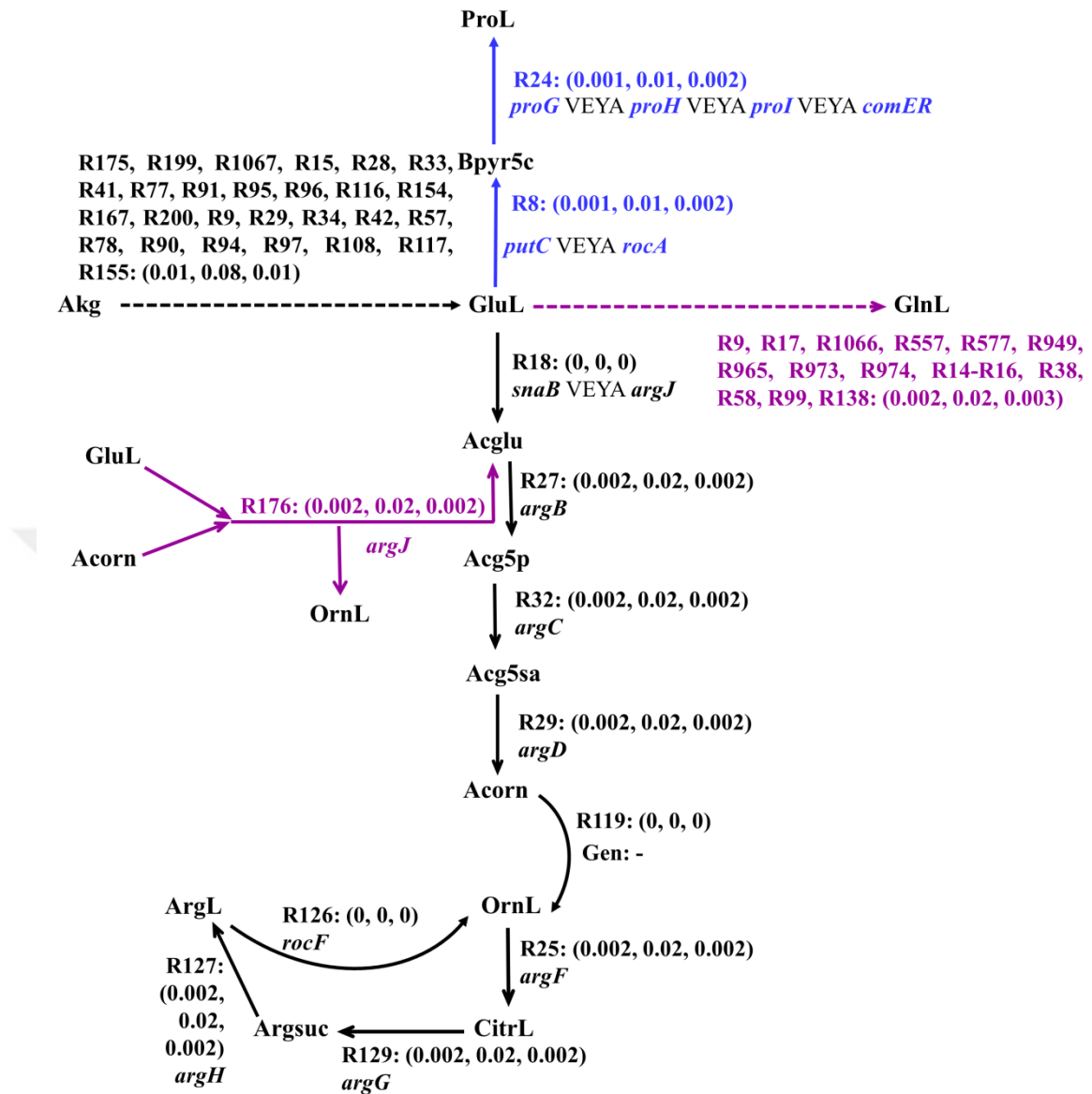
LOT'tan MOT'a 7.34- kat azalmasıdır (EK 11 Çizelge 9); fakat dihidrodipiolinat redüktaz (EC. 1.3.1.26) tarafından katalizlenen R46 nolu tepkimenin akı değeri MOT'ta en yüksektir; bu durum NADP kofaktörünün LOT'taki yetersizliğinden kaynaklanabilir. Aspartik asitten asparajine (AsnL) yönelen akı incelendiğinde, R38'i katalizleyen izoenzimleri (EC. 6.3.5.4) kodlayan *asnB* (R38), *AbrB* ve *CodY* kontrolündeki *asnH* (R38), ve *SigE* kontrolündeki *asnO* (R38) genlerinden (<http://subtiwiki.uni-goettingen.de> 2009) *asnH* ekspresyonu oksijen aktarımıyla artmıştır. AsnL'nin R38 nolu tepkimeyle HOT'ta oluşumu inaktiftir, çünkü hücreiçine MOT'takinin 3.7- katı büyüklükteki hız ile AsnL aktarılmaktadır (Şekil 4.21). *asnO* (R38) ekspresyonu σ^E , σ^K , SpoIIID transkripsiyon faktörleriyle artıp GerE ile azalarak spor oluşumunun geç periyotlarına kadar sağlanır (Eichenberger vd. 2004). *asnH* (R38) ekspresyonu CodY ve amino asitlerle baskılanır (Molle vd. 2003), dolayısıyla oksijen aktarımı hücrenin amino asit ihtiyacını MOT ve HOT'ta artırır. R38 akı değeri MOT'ta en yüksek olduğu için *asnH* baskın gendir (Şekil 4.21, EK 11 Çizelge 9).

Oksijen aktarımı R39'u katalizleyen aspartokinaz izoenzimlerini (EC.2.7.2.4) kodlayan *lysC* (R39) ve *SigK*, *CodY* proteinleri kontrolündeki *dapG* (R39) ve *yclM* (R39) (<http://subtiwiki.uni-goettingen.de> 2009) genlerinden *dapG* ekspresyonunu azaltmıştır (EK 11 Çizelge 9). DapG ve YclM aktiviteleri sırasıyla diaminopimelik asit ve treonin ile lizin varlığında baskılanır (<http://subtiwiki.uni-goettingen.de> 2009). Kazamino asitlerce baskılanan *lysC* ekspresyonu (Mäder vd.2002) lizin derişimi düşük olduğunda artar (Phan vd.2009). Ayrıca lizin sentezine yönelen tepkimeler incelendiğinde, *dapL* (R19) ekspresyonu LOT'tan MOT ve HOT'a artar, ve R19 akı değeri MOT'ta en yüksektir. Bununla birlikte *lysA* (R43), *dapA* (R47), *thrB* (R50), ve *thrC* (R51) ekspresyonları oksijen aktarımıyla azalırken ve *dapB* (R46) ekspresyonu MOT'ta en düşük değeri alırken, R43, R46, R47, R50, R51 akıları MOT'ta en yüksektir (Şekil 4.21, EK 11 Çizelge 9). Sporlanmanın sonuna kadar sürdürülen *lysA* ekspresyonu (<http://subtiwiki.uni-goettingen.de> 2009) LOT'ta en yüksektir; fakat diaminopimelat dekarboksilazın (EC. 4.1.1.20) katalizlediği R43 tepkimesinin hızı MOT'ta en yüksektir.

Aspsa dallanma noktasından izolözine yönelen R49 ve R153 tepkimelerinin hızları MOT'ta en yüksektir; fakat yolizinde R194'ün akısı tüm koşullarda sıfırdır ve Iobut HomL'den Suchms aracılığıyla R149 ve R206 nolu tepkimelerle oluşur (Şekil 4.21). *hom* (R49) ekspresyonu HOT'ta en düşüktür. R194'ü katalizleyen treonin dehidratazi (EC. 4.3.1.19) kodlayan *ilvA* (R194) ekspresyonu MOT'ta en yüksektir; fakat R194 tüm oksijen aktarım koşullarında inaktiftir. Bunun sebebi, *IlvA*'nın Clp proteazlarınca parçalanmasıdır (Gerth vd. 2008). *ilvB*, *ilvH*, ve *alsS* tarafından kodlanan alfa-asetolaktat sentazın (EC. 2.2.1.6) katalizlediği R118 nolu tepkimenin akı değeri en yüksek MOT'tadır (Şekil 4.21). *ilvH* ve *alsS* ekspresyonları LOT'tan MOT ve HOT'a artarken, *ilvB* ekspresyonu MOT'ta en yüksektir (EK 11 Çizelge 9). R118 için baskın gen *ilvB*'dir. (EK 11 Çizelge 9, Şekil 4.21). *ilvB* ve *ilvH*'ın glukoz tüketiminin en çok olduğu MOT'ta en yüksek ekspresyon değerlerine ulaşması *ilv-leu* operonunun glukoz varlığında ekspresyonunun artmasından (Ludwig vd. 2002) kaynaklanır. *ilvB* ve *ilvH*'ın LOT'ta baskılanması azot kısıtlılığını gösterir (Tojo vd. 2004). *alsS* ekspresyonu oksijensiz koşullarda baskılandığı için (Reents vd. 2006) LOT'ta en düşüktür. *alsSD* operonunun ekspresyonu lizin yokluğunda RelA proteinine bağlı olarak artar (Tojo vd. 2010). Yolizinin son basamağında BkdR, CodY, ve SigL proteinlerinin kontrolündeki *bcd* ekspresyonu (<http://subtiwiki.uni-goettingen.de> 2009) oksijen aktarımıyla değişmese de, *bcd*'nin kodladığı izolözün dehidrojenazın (EC. 1.4.1.9) katalizlediği R153 akısı MOT'ta en yüksektir (Şekil 4.21, EK 11 Çizelge 9).

4.2.1.9 Glutamik asit grubu amino asit yolizi

Glutamik asit grubu amino asit yolizi akıları R18, R119, ve R126 dışında MOT'ta en yüksektir (Şekil 4.22). Yolizi genleri oksijen aktarımına beş farklı cevap vermiştir: **i)** *rocF* (R126) ekspresyonu LOT'tan MOT ve HOT'a artmıştır; **ii)** *proH* (R24) ekspresyonu LOT'tan MOT'a artmıştır; **iii)** *argG* (R129) ekspresyonu LOT'tan MOT ve HOT'a biraz azalmıştır; **iv)** *ycgN* (R8), *rocA* (R8), *proI* (R24), ve *comER* (R24) ekspresyonları LOT'ta en yüksektir; ve, **v)** *proG* (R24), *argB* (R27), *argD* (R29), *argC* (R32), *argF* (R25), *argH* (R127), ve *argJ* (R176, R18) ekspresyonları oksijen aktarımıyla değişmemiştir (EK 11 Çizelge 10). Pirolin-5-karboksilat redüktazı (EC. 1.5.1.2) kodlayan *proH* (R24) en düşük, 1-pirolin-5-karboksilat dehidrojenazı (EC.



Şekil 4.22 rhGH biyoprosesinin üçüncü periyodunda LOT, MOT, HOT için iBsu1144-rhGH ile hesaplanan glutamik asit grubu amino asit yolizi tepkime hızları (mmol/(g_{KH} st)) ve genleri. (R1067, R33, R34, R108, ve R119 için genler bilinmemektedir.)

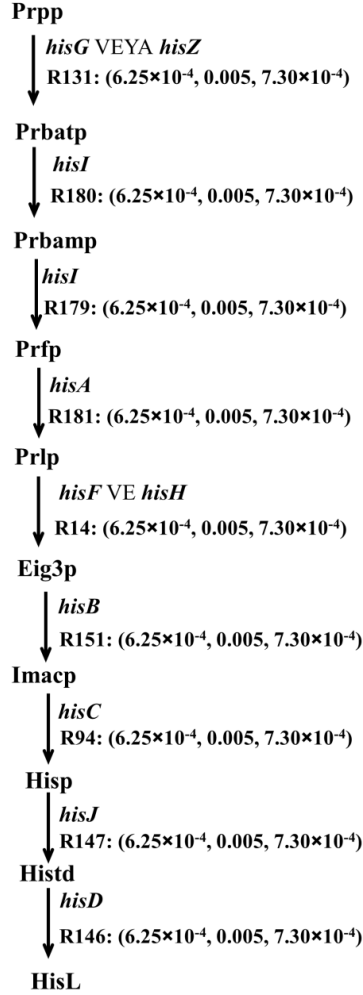
1.2.1.88) kodlayan *ycgN* (R8) en yüksek ekspresyona sahiptir. Oksijen aktarımının en büyük etkisi *proI* (R24) ekspresyonunun LOT'tan MOT'a 2.70- kat azalmasıdır (EK 11 Çizelge 10). *argJ* (R176, R18), *argB* (R27), *argC* (R32), *argD* (R29), *argF* (R25), *argG* (R129), ve *argH* (R127) genleri oksijen aktarımından düşük miktarda etkilenmiştir, bununla birlikte R18 dışında tepkime hızları MOT'ta en yüksektir (Şekil 4.22, EK 11

Çizelge 10). R18 nolu tepkimenin hızı tüm koşullarda sıfırdır; dolayısıyla GluL dallanma noktasından R176 nolu tepkime aracılığıyla Acglu sentezlenir (Şekil 4.22). *argB* (R27), *argC* (R32), *argD* (R29), *argF* (R25), *argG* (R129), *argH* (R127), ve *argJ* (R176, R18) genlerinin ekspresyonlarının kazamino asitlerce baskılandığı transkriptom ve proteom analizleriyle gösterilmiştir (Mäder vd.2002). R24'ü katalizleyen pirolin-5-karboksilat redüktaz izoenzimlerini (EC. 1.5.1.2) kodlayan dört genden *proI* (R24) ve *comER* (R24) ekspresyonları oksijen aktarımıyla azalmıştır (EK 11 Çizelge 10). *proH* (R24) ekspresyonu LOT'ta en düşüktür, hücre dışındaki NaCl derişimi ve soğuk şokuyla artar (Brill vd. 2011, Hoffmann vd. 2011). Ayrıca *proI* (R24) ekspresyonu LOT'ta en yüksektir, prolin kısıtlılığıyla kontrol edilir (Brill vd. 2011). Dolayısıyla prolin sentezi LOT'ta darboğaz olabilir. *comER* (R24) ekspresyonu LOT'ta en yüksektir, kazamino asitler varlığında azalır (Mäder vd.2002). R24 tepkimesinin akı değeri MOT'ta en yüksek olduğu için, *proH* baskın gen olmalıdır (Şekil 4.22, EK 10 Çizelge 10, EK 11 Çizelge 10). R8 nolu tepkimeyi katalizleyen 1-pirolin-5-karboksilat dehidrojenaz izoenzimlerini (EC. 1.2.1.88) kodlayan *putC* (*ycgN*) ve *rocA* gen ekspresyonları oksijen aktarımıyla azalırken, R8 nolu tepkimenin akı değeri MOT'ta en yüksektir (Şekil 4.22, EK 11 Çizelge 10). *putC* ekspresyonu glukoz yokluğunda artar (de Jong vd. 2012). Belitsky vd. (2011) *putBCP* operonun ekspresyonlarının prolin varlığında PutR proteini ile arttığını göstermiştir. Ayrıca, Huang vd. (2011) PrcR'nin prolin varlığında *B. subtilis* *putBCP* operonunun ekspresyonunu artırdığını bildirmiştir. Dolayısıyla, *putC* (R8) ekspresyonunun LOT'ta en yüksek olmasının nedeni glukoz derişiminin düşük olması ya da prolin sentezinin MOT ve HOT'ta darboğaz olmasıdır. Ekspresyonu arjinin (Calogero vd. 1994) ve amino asitlerle (Molle vd. 2003) artan *rocA* (R8) CodY tarafından baskılanır (Molle vd. 2003). *rocA* (R8) ekspresyonu oksijen aktarımıyla azaldığı için, amino asit sentez tepkimeleri MOT ve HOT'ta darboğazdır.

4.2.1.10 Histidin sentez yolizi

Histidin sentez yolizi tepkime hızları ve yolizi genlerinin % 60'ının ekspresyonları MOT'ta en yüksektir (Şekil 4.23, EK 10 Çizelge 11, EK 11 Çizelge 11). Histidin sentez yolizinin 10 geni oksijen aktarımından üç farklı şekilde etkilenmiştir: **i**) *hisI* (R179,

R180) ve *hisF* (R14) ekspresyonları LOT'tan MOT ve HOT'a artmıştır; **ii**) *hisG* (R131), *hisZ* (R131), *hisA* (R181), *hisB* (R151), *hisD* (R146), ve *hisH* (R14) ekspresyonları



Şekil 4.23 rhGH biyoprosesinin üçüncü periyodunda LOT, MOT, HOT için *iBsu1144*-rhGH ile hesaplanan histidin sentezi tepkime hızları (mmol/(g_{KH} st)) ve genleri

MOT'ta en yüksektir, fakat **iii**) *hisJ* (R147) ve *hisC* (R94) ekspresyonları oksijen aktarımıyla değişmemiştir. R94'ü katalizleyen histidinol-fosfat aminotransferazı (EC. 2.6.1.9) kodlayan *hisC* en düşük, R181'i katalizleyen 1-(5-fosforibozil)-5-[(5-fosforibozilamino) metilideneamino] imidazol - 4 - karboksiamid izomerazı (EC. 5.3.1.16) kodlayan *hisA* en büyük ekspresyona sahip genlerdir. Yedi genin ekspresyonu LOT'tan MOT ve HOT'a en az 10- kat artmıştır; bu genler *hisG* (R131), *hisI* (R179 ve R180), *hisA* (R181), *hisB* (R151), *hisD* (R146), *hisF* (R14), ve *hisH* (R14)'dir. En

çarpıcı sonuç *hisH* (R14) ekspresyonunun LOT'tan MOT'a 49.60- kat artmasıdır (EK 11 Çizelge 11). *hisI* (R179 ve R180), *hisF* (R14), *hisA* (R181), *hisH* (R14), *hisB* (R151), ve *hisD* (R146) ekspresyonları *B. subtilis*'in üstel çoğalma evresinde kazamino asitlerle azaldığı için (Mäder vd. 2002), histidin sentez yolizi gen ekspresyonlarının MOT ve HOT'ta artması hücrenin amino asit ihtiyacını gösterir.

4.2.2 Transkriptom verilerinin BsRN-2016 ve iBsu1144-rhGH sonuçlarına dayalı ANOVA analizi

B.subtilis gen-çipindeki 5039 prob setinden veya “biriminden” (gen veya kontrol oligonükleotiti) Periyot III'te oksijen aktarım koşullarından önemli ölçüde etkilenen 50 prob seti EK 12 Çizelge 1'de verilmiştir. Glikoliz yolizi genleri oksijen aktarımından önemli ölçüde etkilenmemiştir. ANOVA analizi ve RMA sonuçları TCA döngüsü genleri *odhB* (R370), *mmgD* (R371), ve *citH* (R376) ile histidin sentezi genleri *hisA* (R181), *hisB* (R151), *hisD* (R146), ve *hisH* (R14) için uyumludur (EK 11 Çizelge 3, Çizelge 11, EK 12 Çizelge 1). *B. subtilis*'ten rhGH üretiminin (Özdamar vd. 2009) üçüncü periyodunda 50 prob setinin oksijen aktarımına verdiği cevap literatür ile EK 12 Çizelge 2'de karşılaştırılmıştır. Sonuçlar: **i)** *ydjL* ve *wapA* gen ekspresyonlarının oksijensiz koşuldan oksijenli koşula geçişteki değişimleriyle (Ye vd. 2000); **ii)** çözülmüş oksijen derişiminden etkilenen ortak 14 genin % 57'siyle (Yu vd. 2011); ve **iii)** oksijensiz koşuldan oksijenli koşula geçişte ekspresyonu değişen 42 ortak genin %26'sıyla (Nicolas vd. 2012) uyumludur (EK 12 Çizelge 2).

rhGH biyoprosesinin üçüncü periyodunda oksijen aktarımından etkilenen 50 gen birimi, işlevleri, yolizleri, kodladıkları protein ve enzimler, enzimlerin katalizlediği tepkimeler, tepkimelerin iBsu1144-rhGH numaraları EK 12 Çizelge 3'dedir. 50 gen birimi 69 BsRN-2016 tepkimesiyle ilişkilidir (EK 12 Çizelge 3). Gen ekspresyonları ve akıların oksijen aktarımıyla değişimlerindeki uyum EK 12 Çizelge 4'de karşılaştırılmıştır. 14 BsRN-2016 tepkimesiyle ilişkili 7 gen birimi iBsu1144-rhGH tepkime sistemiyle ilişkili değildir (EK 12 Çizelge 5). BsRN-2016 tepkimeleriyle ilişkili olmayan 31 gen biriminin tepkimeleri henüz keşfedilmemiştir (EK 12 Çizelge 6). 55 iBsu1144-rhGH tepkimesiyle ilişkili 19 gen birimi EK 12 Çizelge 7'dedir.

Biyokimyasal bir tepkimenin hızı enzim derişimi, aktivitesi, sıcaklık ve metabolit derişimlerine bağlı olduğu için, gen ekspresyonundaki bir artış tepkimenin hızını tek başına artırmayabilir; çünkü enzim inaktif formda olabilir ve/veya substrat derişimi düşük olabilir. Hackett vd. (2016) maya hücrelerinde tepkime hızlarının enzim derişiminden çok girdi derişimlerine bağlı olduğunu göstermiştir. Ayrıca gen ekspresyonu ve translasyon işlemi azaltılmış veya durdurulmuş olabilir. Dolayısıyla bir gen ve tepkimesi için transkripsiyon ve akı değişimlerinin farklı olduğu durumlar ilgili gen, kodladığı enzim, ve enzimin katalizlediği tepkime için hücreii regölasyonların olduğuna işaret eder. Bu kapsamda istenen biyomolekln üretimi özgün metabolik mühendislik tasarımlarıyla iyileştirilmelidir (Oh ve Liao 2000). Bu nedenlerle transkripsiyonları ve akılarının oksijen aktarımıyla değişimleri farklı olan *yaaE* (R138, R577), *gdh* (R412, R506-R509), *ydjL* (R258 ve R259), *yisZ* (R83 ve R84), *kbl* (R141 and R142), *yloI* (R644 ve R645), *pksK* (R689-R714, R776, R777), *mmgD* (R371) metabolik mühendislik hedef konumları olarak belirlenmiştir (EK 12 izelge 4). Mikrodizin ve akı analizi sonuçları TCA döngüsü, histidin sentezi, arjinin sentezi, ve sülfatın indirgenmesi için uyumludur (EK 12 izelge 4).

4.2.3 rhGH üretimi için metabolik mühendislik analizleri

4.2.3.1 *B.subtilis*'te rhGH üretimini artırmaya yönelik metabolik mühendislik analizi

Oksijen aktarımı yolizlerindeki tepkime hızlarını etkileyerek LOT, MOT, ve HOT koşullarında amino asitler gibi ara-ürünleri, ve sonuç olarak rhGH'nin üretimini etkilemiştir (EK 10 izelge 1-11). Amino asitlerden sentez hızı düşük olanlar rhGH üretimi için darboğaz olabilir (EK 10 izelge 6-11). TCA döngüsündeki α KG ve Oaa dallanma noktalarından sırasıyla glutamik asit- ve aspartik asit- grubu amino asit yolizlerine aktarılan akıyı artırmak rhGH üretimini artırabilir. Bu nedenle, R376'yı katalizleyen malat dehidrojenazı (EC.1.1.1.37) kodlayan *citH* ve R374' katalizleyen okzalosuksinat dekarboksilazı (EC.1.1.1.42) kodlayan *citC* genleri metabolik mühendislik hedef konumları olarak belirlenmiştir. Aspartik asit grubu amino asit yolizinde *ilvA* geninin kodladığı treonin dehidrataz (EC. 4.3.1.19) enzimiyle katalizlenen R194 Aspsa'dan Ile'i oluşturan ardışık tepkimelerden en düşük akı

değerine sahiptir (EK 10 Çizelge 9). Treonin (ThrL) tüm oksijen aktarım koşullarında hücreiçine aktarılmadığı için, ThrL'nini Iobut'a dönüştüren R194 nolu tepkime rhGH üretiminde darboğaz olarak belirlenmiştir. *ilvA* geni rhGH üretiminin ekspresyon sistemi nedeniyle (Özdamar vd. 2009) taklit ettiği SAP üretimi için de metabolik mühendislik hedef konumu olarak belirlenmiştir. Dolayısıyla *B.subtilis*'te rhGH üretimini artırmak için *ilvA* genine odaklı metabolik mühendislik tasarımı gereklidir. *asnB*, *asnH*, ve *asnO* genleri tarafından kodlanan asparajin sentaz (EC. 6.3.5.4) tarafından katalizlenen R38 aspartik asit grubu amino asit yolizinde en düşük akı değerine sahip ikinci tepkimedir. Bu durum asparajin sentazın (EC. 6.3.5.4) düşük aktivitesi ya da aspartat kinazın (EC 2.7.2.4) yüksek aktivitesinden kaynaklanabilir (Şekil 4.12); çünkü R39'u katalizleyen aspartat kinazı kodlayan genlerin ekspresyonları R38'i katalizleyen asparajin sentazı kodlayan genlerin ekspresyonlarının LOT, MOT, ve HOT koşullarında en çok 2.32-, 1.47-, ve 1.77- katlarıdır (EK 10 Çizelge 9, EK 11 Çizelge 9). Dolayısıyla L-asparajin (AsnL) LOT koşulunda hücre dışı ortama salgılanmadığı için, aspartik asiti asparajine dönüştüren R38'in rhGH üretimindeki ikinci darboğaz tepkime olduğu düşünülmüştür. Asparajin sentazı (EC. 6.3.5.4) kodlayan *asnB*, *asnH*, *asnO* genleri ile aspartokinazı (EC 2.7.2.4) kodlayan *dapG*, *yclM*, *lysC* genleri ekspresyon sistemi nedeniyle rhGH üretimiyle (Özdamar vd. 2009) ilişkili olan SAP üretimi için de metabolik mühendislik konumu olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak *asnB*, *asnH*, *asnO* ile *dapG*, *yclM*, *lysC* genleriyle rhGH üretimini artırıcı metabolik mühendislik tasarımları yapılmalıdır. Glutamik asit grubu amino asitlerin yolizinde, GluL'i ArgL'e dönüştüren ardışık tepkimelerden en düşük hıza sahip olan R18 nolu tepkime darboğaz olarak belirlenmiştir (EK 10 Çizelge 10). Dolayısıyla R18'i katalizleyen amino-asit asetiltransferazı (EC. 2.3.1.1) kodlayan *snaB* ve *argJ* de metabolik mühendislik hedef noktası olarak saptanmıştır. *B.subtilis*'te rhGH üretimini artırmak için *snaB* ve *argJ* genlerine odaklı metabolik mühendislik tasarımı yapılmalıdır. rhGH molekülünün yapısındaki herbir *i* amino asiti için, bir hız kısıtlayıcı amino asit fonksyonu (R_{LF-i}) tanımlanmıştır:

$$R_{LF-i} = \alpha_{ai-PSR} / \sum r_{ai}, \text{ g}_{KH} \text{ st/ mmol} \quad (4.5)$$

Burada α_{ai-PSR} , hücre dışında tespit edilmeyen amino asit-*i*'nin rhGH sentez tepkimesindeki stokiyometrik katsayısıdır. $\sum r_{ai}$ amino asit-*i*'nin hücre içinde tepkimelerle toplam sentez hızıdır (EK 10 Çizelge 12). R_{LF-i} değerinin büyüklüğü rhGH üretimi için amino asit-*i*'ye olan ihtiyacın büyüklüğünü gösterir. rhGH üretiminde amino asitlerin EK 10 Çizelge 13-15'deki R_{LF-i} değerlerine göre: **i)** LOT'ta cysL, asnL, tyrL, proL, ve leuL; **ii)** MOT'ta hisL, cysL, tyrL, ve proL; ve, **iii)** HOT'ta tyrL, cysL, argL, hisL, ve proL'nin birincil-darboğaz amino asitler olduğu belirlenmiştir. cysL, tyrL, ve proL'nin tüm koşullardaki birincil-darboğaz amino asit oldukları bulunmuştur. Dolayısıyla L-sistein, L-tirozin, ve L-prolin rhGH üretim ortamına eklenmelidir.

4.2.3.2 *B.subtilis*'te rhGH üretimini artırmak için konak hücre oluşturmaya yönelik metabolik mühendislik analizi

B. subtilis'te hücre dışı rhGH üretimi *B.licheniformis* alkali proteaz geninin (*subC*) (Jacobs 1995) başlatıcısı (promoter) ve sinyal peptit dizinine sahip olan pMK4::*pre(subC)::hGH* ekspresyon sistemi (Özdamar vd., 2009) ile gerçekleştiği için, hücre dışı rhGH üretimi proteaz sentezini taklit eder. *B.subtilis*'te alkali proteazı kodlayan *aprE* geninin ekspresyonunu düzenleyen sekiz regülasyon proteininin (AbrB, DegQ, DegS, DegU, ScoC, SinI, SinR, ve Spo0A) pMK4::*pre(subC)::hGH* ekspresyon sistemi (Özdamar vd. 2009) ile moleküler düzeyde etkileşerek farklı oksijen aktarım koşullarında rhGH üretimini değiştirmesi beklenir. Dolayısıyla *B.subtilis*'te *aprE* geninin ekspresyonunu düzenleyen sekiz regülasyon geninin transkriptom (RMA) verileriyle *tyrS*'e göre ekspresyonları hesaplanmıştır (veriler gösterilmemiştir). Proteaz sentezini azaltan *scoC* (Perego vd. 1988) ve üzerinde yapılan mutasyonlarla parçalayıcı enzim üretiminin artırıldığı *degU* (Msadek vd. 1990) genlerinin tüm oksijen aktarım koşullarında en yüksek ekspresyona sahip olduğu saptanmıştır. Dolayısıyla *scoC* ve *degU* genleri rhGH üretimini artırmak için metabolik mühendislik hedef konumları olarak belirlenmiştir. rhGH üretiminde en uygun oksijen aktarım koşulu MOT için aktif ve kapalı tepkimeler akı değişkenliği analizi ile belirlenmiştir (Burgard vd. 2004, Chapman vd. 2015). *iBsu1144*- rhGH ile hücre içinde rhGH birikim hızının minimize ve maksimize edilerek hesaplandığı 1067 tepkimeye ait akı değerleri EK 13 Çizelge 1'de sunulmuştur. Akı değişkenliği analizi 346 genle bağlantılı 305 tepkimenin aktif ve 536 genle bağlantılı 730 tepkimenin kapalı olduğunu göstermiştir. Aktif ve kapalı

tepkimler, genleri, ve akı değerleriyle birlikte EK 13 Çizelge 2-3'te gösterilmiştir. Aktif ve kapalı tepkimelerin, sırasıyla, 346 ve 536 geni EK 13 Çizelge 4-5'te sunulmuştur EK 13 Çizelge 1-5'te sunulan veriler rekombinant protein üretiminin geliştirilmesinde konak hücre oluşturmak amacıyla *B.subtilis*'te gen silme çalışmaları için rehberdir. rhGH üretiminin MOT koşulunda akı değişkenliği analiziyle belirlenen aktif- ve kapalı- tepkimeler ile genleri Morimoto vd. (2008)'nin *B. subtilis* MBG874 konak hücrelerini oluştururken sildikleri genlerle birlikte EK 14 Çizelge 1-3'te değerlendirilmiştir. Kapalı tepkimelerle ilişkili 485 gen *B.subtilis*'in yaşaması için gerekli olmadığı için, protein sentezini artırmak amacıyla silinmeye aday olarak değerlendirilmiştir (EK 13 Çizelge 5.1). Kapalı tepkimelerle ilişkili 55 gen (10%) Morimoto vd. (2008) tarafından silinmiştir ve *B.subtilis*'in yaşaması için gerekli değildir, bu genlerin 47'si ise aktif tepkimelerle ilişkili değildir (EK 14 Çizelge 2). Ayrıca rekombinant protein üretiminde konak hücre oluşturma amacıyla izoenzime sahip olmayan aktif tepkimelerle ilgili 205 gen silinmemelidir (EK 14 Çizelge 3). Morimoto vd. (2008) rhGH üretiminin 305 aktif tepkimesiyle ilişkili 346 gen arasından R1017 (*yybQ*), R38 (*asnH*, *asnO*), R52 (*yitB*), R39 (*yclM*), R140 (*yrpC*), R208 (*mtbP*), R857-R858 (*nrdEB*, *nrdEB*), R863 (*pdp*), R869 (*pdp*), R872 (*pdp*), R936 (*pdp*), R940 (*thyA*), R1016 (*phoB*), R1020 (*yitA*), R1034 (*trkA*), ve R264 (*gntK*) nolu aktif tepkimelerin enzimlerini kodlayan, parantez içinde verilen 15 geni silmiştir. Morimoto vd. (2008) tarafından silinen 11 genin kodladıkları enzimlerin katalizledikleri R1017 (*yybQ*), R38 (*asnH*, *asnO*), R39 (*yclM*), R140 (*yrpC*), R208 (*mtbP*), R863 (*pdp*), R940 (*thyA*), R1016 (*phoB*), R1020 (*yitA*), ve R1034 (*trkA*) nolu aktif tepkimeler genleri silinmemiş izoenzimleri tarafından katalizlenebilir: R1017 (*yvoE*), R38 (*asnB*), R39 (*dapG*), R140 (*racE*), R208 (*ydiO*), R863 (*pnp*), R940 (*thyB*), R1016 (*phoA*), R1020 (*ylnB*), ve R1034 (*yuaA*, *yubG*). Morimoto vd. (2008) tarafından silinen *yitB*, *nrdEB*, *nrdEB*, *pdp* ve *gntK* genleri amp (R52), so3 (R52), trdox (R52, R857-R858), h2o (R857-R858), atp (R264), dcdp (R857), dudp (R858), idr1p (R869), thym (R869), r1p (R936), csn (R936), pi (R872), uri (R872), ve glcnD (R264) metabolitlerinin sentezlenmesini sağlayan R52 (*yitB*), R857-R858 (*nrdEB*, *nrdEB*), R869 (*pdp*), R872 (*pdp*), R936 (*pdp*), ve R264 (*gntK*) nolu aktif tepkimelerle ilişkilidir. Yukarıda belirtilen amp, so3, trdox, h2o, atp, dcdp, dudp, idr1p, thym, r1p, csn, pi, uri, ve glcnD metabolitleri Morimoto vd.(2008)'nin silmediği genlerle kodlanan enzimlerin

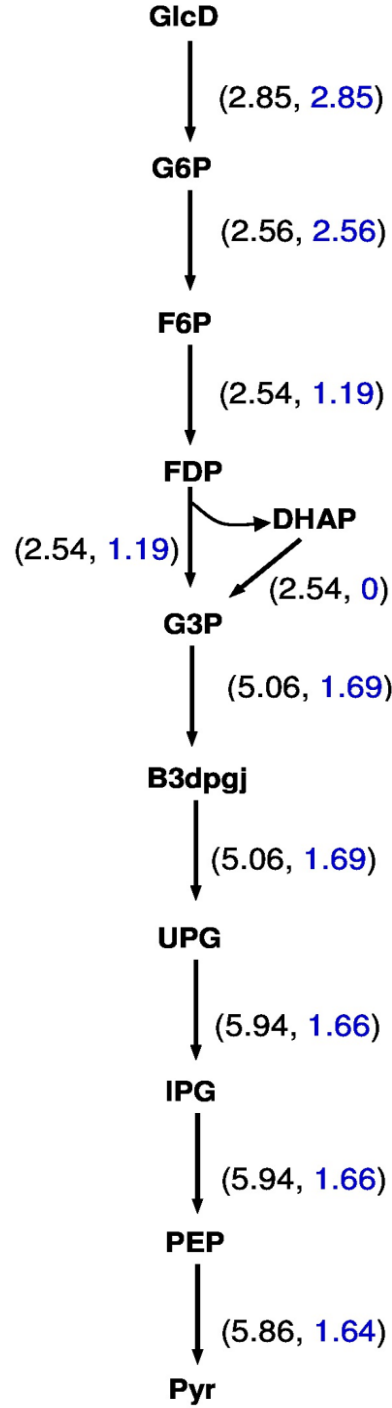
katalizlediği *iBsu1144-rhGH* aktif tepkimeleriyle sentezlenebilir; yani amp R575, h₂O R969, atp R482, idr1p R863, r1p R919, csn R208, pi R657, ve uri R862 nolu tepkimelerle üretilir. *iBsu1144-rhGH* dışında olan ve *R ile simgelenen BsRN-2016 tepkimelerden *R80 ile so₃ ve trdox, *R820 ile dcdp, *R880 ile dudp, *R489 ile glcnD, *R951 ile thym sentezlenebilir. Bu tepkimelerin genleri Morimoto vd.(2008) tarafından silinmemiştir.

4.2.4 *iBsu1144* sonuçlarının literatürdeki GEM'lerle karşılaştırılması

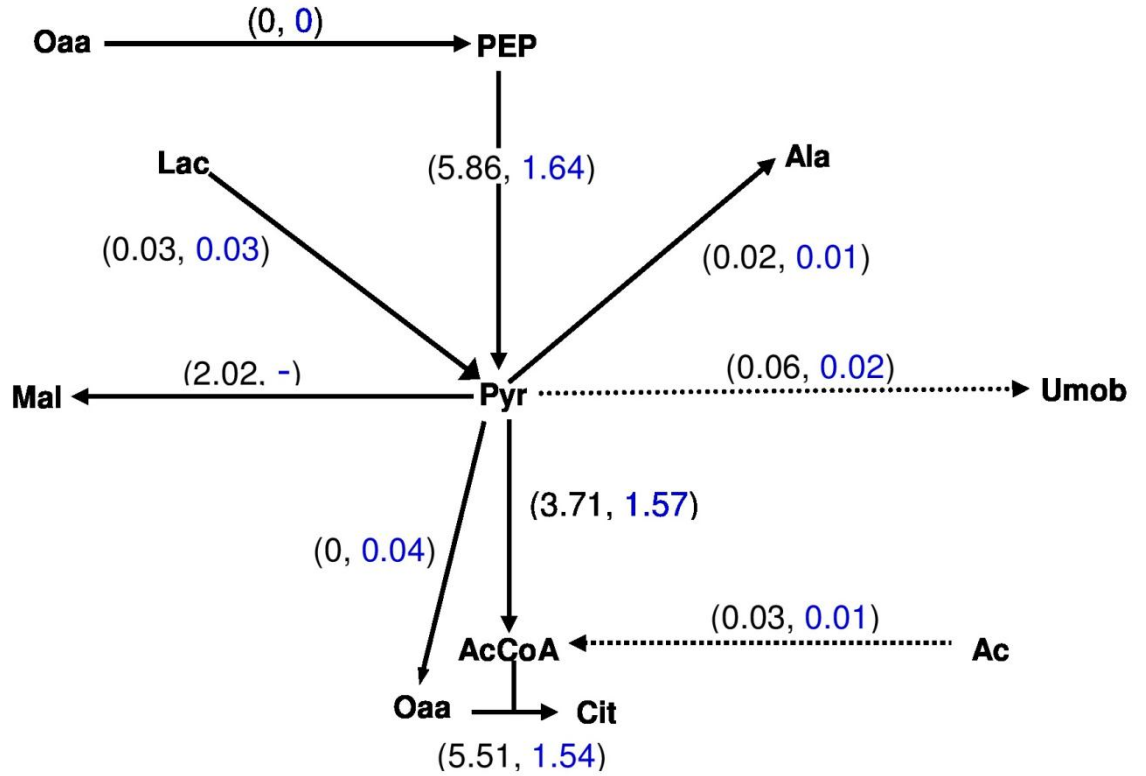
4.2.4.1 *iBsu1144* sonuçlarının birinci nesil GEM ile karşılaştırılması

iBsu1144-rhGH Oh vd. (2007) tarafından oluşturulup rhGH fermentasyonu için değiştirilen (Özdamar vd. 2010) birinci- nesil GEM ile karşılaştırılmıştır. Özdamar vd. (2010) GEM'i kurarken: **i)** Oh vd. (2007)'deki tersinir tepkimelerin ileri ve geri yöndeki tepkimeleri ayrı iki tepkime olarak almıştır; **ii)** hücre sentez tepkimesi değiştirilmiştir; **iii)** rhGH sentez tepkimesi (Goeddel vd. 1979) tepkime sistemine eklenmiştir; ve **iv)** tepkime sistemi analizlenerek yolizlerindeki bağlantısız tepkimeler belirlenmiştir ve tepkime sisteminden çıkartılarak 844 genle bağlantılı 1099 tepkime ve 733 metabolit içeren, *iBsu844-rhGH* kurulmuştur. rhGH üretiminin MOT koşulu için *iBsu1144-rhGH* ve *iBsu844-rhGH* ile glikoliz yolizi, piruvat nodu, TCA döngüsü, pentoz fosfat yolizinden oluşan merkezi karbon yolizi akıları hesaplanarak karşılaştırılmıştır. Glikoliz yolizinin 10 tepkimesi *iBsu1144-rhGH*'de aktiftir. Fakat *iBsu844-rhGH* ile glikoliz yolizi akıları farklı hesaplanmıştır (Şekil 4.24). Glikoliz yolizinde oksijenli koşullarda bir mol glukoz iki mol piruvata parçalandığı için, PEP'ten piruvat (Pyr) oluşum hızı MOT'ta 2.85 mmol/(g_{KH} st) değerindeki glukoz tüketim hızının yaklaşık 2.0- katı olmalıdır. Fakat PEP'ten piruvat (Pyr) oluşum hızının *iBsu844-rhGH* ile hesaplanan değeri glukoz tüketim hızından düşüktür. Ayrıca PEP, UPG, G3P, F6P, G6P, amino asitler, ve hücre bileşenlerinin oluşumu ile TCA döngüsünün işleyişi için aktif bir glikoliz yolizi beklenmektedir. Dolayısıyla iki GEM ile hesaplanan akılar karşılaştırıldığında, glikoliz yolizi tepkime hızlarının *iBsu1144-rhGH* ile doğru hesaplandığı belirlenmiştir (Şekil 4.24).

iBsu844-rhGH ve *iBsu1144*-rhGH'nin glikoliz yolizi akılarındaki farklılıklar 17 tersinmez tepkimeden oluşan Pyr nodunun akılarını etkilemiştir (Şekil 4.24-4.25).

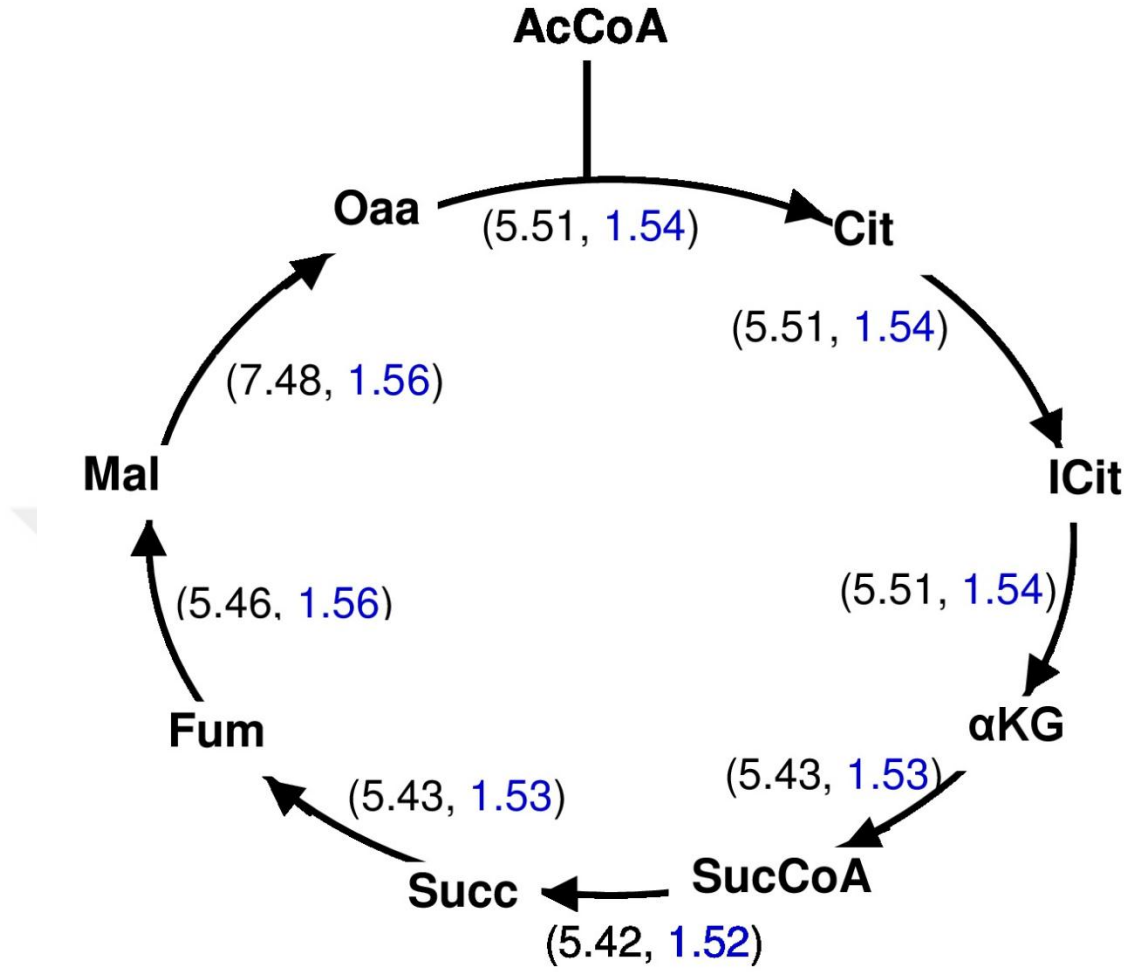


Şekil 4.24 rhGH üretiminin MOT koşulu için, sırasıyla, *iBsu1144*-rhGH (siyah) ve *iBsu844*-rhGH (mavi) ile hesaplanan glikoliz yolizi akıları, mmol/(g_{KH} st) (Oh vd. (2007)'de olmayan tepkimeler (-) ile gösterilmiştir)



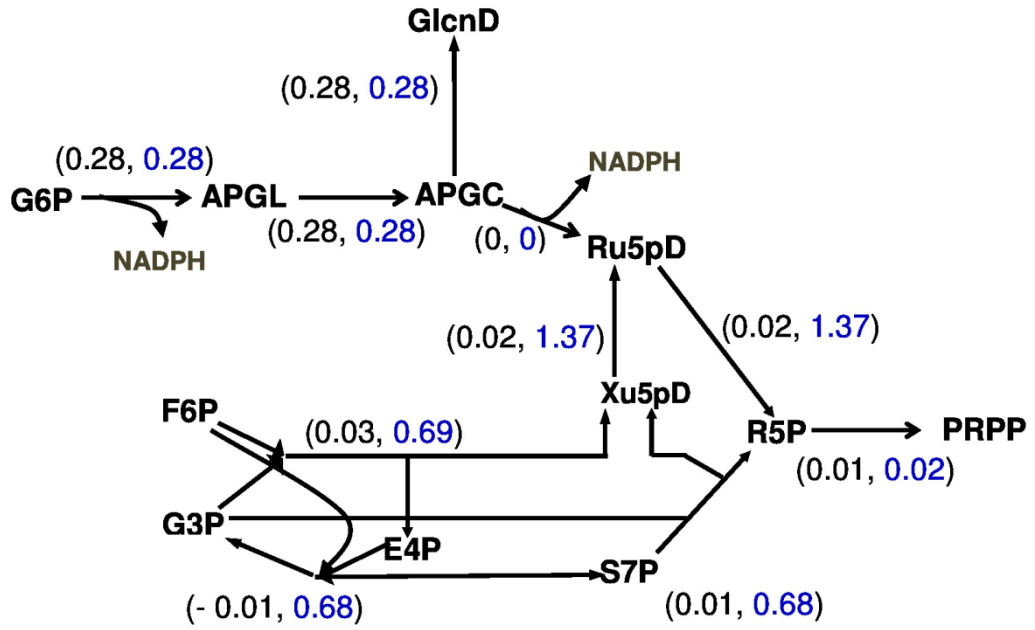
Şekil 4.25 rhGH üretiminin MOT koşulu için, sırasıyla, iBsu1144-rhGH (siyah) ve iBsu844-rhGH (mavi) ile hesaplanan piruvat nodu akıları, mmol/(g_{KH} st) (Oh vd. (2007)'de olmayan tepkimeler (-) ile gösterilmiştir)

iBsu844-rhGH'de piruvattan (Pyr) malat (Mal); malat (Mal) ve NADP'den piruvat (Pyr) oluşum tepkimeleri yoktur (Şekil 4.25). Dolayısıyla rhGH üretiminin MOT koşulunda, Pyr nodunun sekiz tepkimesi farklı akı değerleriyle her iki GEM'de aktiftir. iBsu1144-rhGH ve iBsu844-rhGH ile TCA döngüsü tepkimeleri aktiftir, fakat farklı akı değerlerine sahiptir (Şekil 4.26). Bir mol glukoz iki mol piruvata parçalanarak TCA döngüsüne aktarıldığından, TCA döngüsü her bir piruvat molekülü için işletilerek glikoliz yolizi akılarının yaklaşık 2.0- katı hızla çalıştırılır. Dolayısıyla TCA döngüsü tepkime hızlarının MOT'ta 2.85 mmol/(g_{KH} st) değerindeki glukoz tüketim hızının yaklaşık 2.0- katı olmalıdır. iBsu844-rhGH ile hesaplanan TCA döngüsü akıları glukoz tüketim hızından daha düşüktür. Birinci- nesil GEM iBsu844-rhGH ve üçüncü- nesil GEM iBsu1144-rhGH karşılaştırıldığında TCA döngüsü hızlarının iBsu1144-rhGH ile doğru hesaplandığı görülmektedir (Şekil 4.26).



Şekil 4.26 rhGH üretiminin MOT koşulu için, sırasıyla, *iBsu1144*-rhGH (siyah: mmol/(g_{KH} st)) ve *iBsu844*-rhGH (mavi: mmol/(g_{KH} st)) ile hesaplanan TCA döngüsü akıları, mmol/(g_{KH} st) (Oh vd. (2007)'de olmayan tepkimeler (-) ile gösterilmiştir)

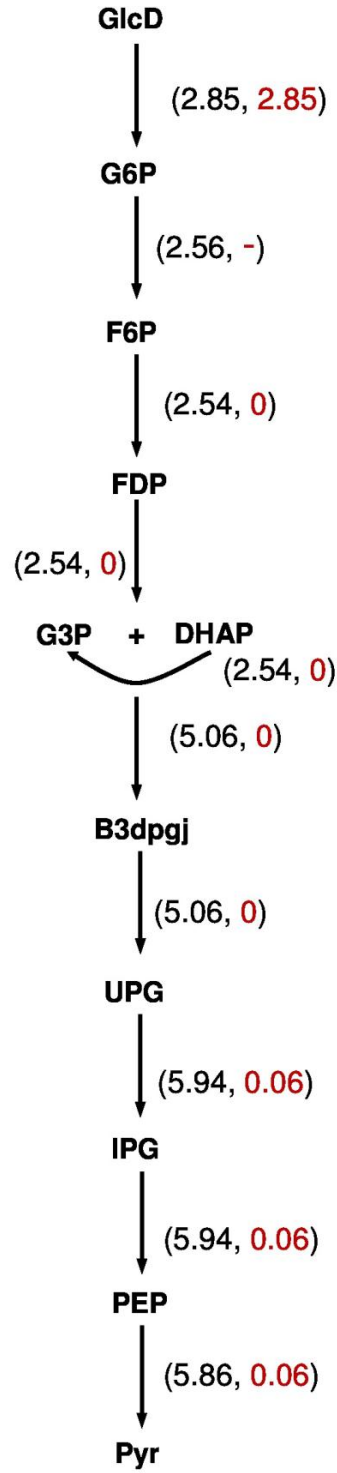
iBsu1144-rhGH ve *iBsu844*-rhGH'de 18 pentoz fosfat yolizi (PFY) tepkimesi vardır (Şekil 4.27). Her iki GEM ile hesaplanan aktif PFY tepkimesi sayısı sekizdir (Şekil 4.27). G6P'ı APGL ve NADPH'a dönüştüren oksidatif PFY tepkimesi her iki GEM'de aktif ve hızı 0.28 mmol/(g_{KH} st)'dir (Şekil 4.27). Fakat APGC'yi Ru5pD ve NADPH'a dönüştüren tepkime her iki GEM'de inaktiftir. *iBsu1144*-rhGH ve *iBsu844*-rhGH karşılaştırıldığında nükleotit, nükleik asit, ve hücre bileşenlerinin sentezi için gerekli Ru5pD F6P ve G3P dallanma noktalarından farklı tepkime hızlarıyla sentezlenmektedir (Şekil 4.27).



Şekil 4.27 rhGH üretiminin MOT koşulu için, sırasıyla, *iBsu1144-rhGH* (siyah) ve *iBsu844-rhGH* (mavi) ile hesaplanan pentoz fosfat yolizi akıları, mmol/(g_{KH} st). Oh vd. (2007)'de olmayan tepkimeler (-) ile gösterilmiştir.

4.2.4.2 *iBsu1144* sonuçlarının ikinci nesil GEM ile karşılaştırılması

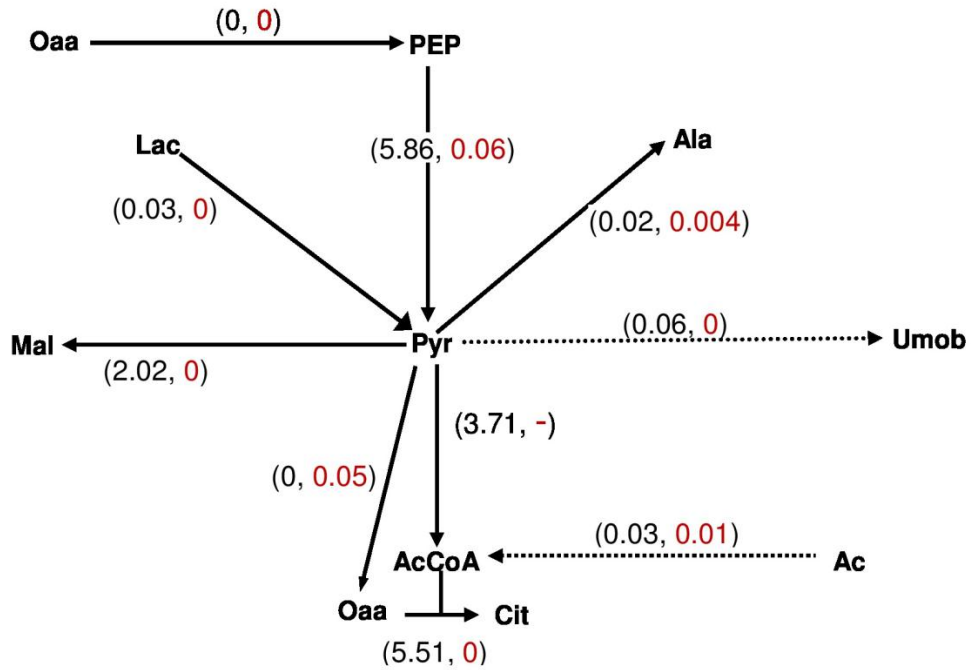
iBsu1144-rhGH birinci- nesil GEM *iBsu1103* (Henry vd. 2009)'den düzeltilerek oluşturulan ikinci-nesil GEM *iBsu1103V2* (Tanaka vd. 2013) ile karşılaştırılmıştır. *iBsu1103V2-rhGH* kurulurken: **i)** *iBsu1103V2* (Tanaka vd. 2013)'deki tersinir tepkimelerin ileri ve geri yöndeki tepkimeleri ayrı iki tepkime olarak yazılmıştır; **ii)** rhGH sentez tepkimesi (Goeddel vd. 1979) tepkime sistemine eklenmiştir ve 1103 genle bağlantılı 2302 tepkime ve 1138 metabolit içeren reaksiyon ağı oluşturulmuştur. Ardından, *iBsu1103V2-rhGH* modeli kurulmuştur. rhGH üretiminin MOT koşulu için *iBsu1144-rhGH* ve *iBsu1103V2-rhGH* ile merkezi karbon yolizi akıları hesaplanarak karşılaştırılmıştır. *iBsu1144-rhGH*'de glikoliz yolizinin 10 tepkimesi aktiftir. *iBsu1103V2-rhGH*'de ise glikoliz yolizinin dört tepkimesi aktiftir, beş tepkimesi inaktiftir, ve G6P'dan F6P sentez tepkimesi *iBsu1103V2-rhGH*'de yoktur (Şekil 4.28). Her iki GEM ile hesaplanan yolizi akıları farklıdır. Glikoliz yolizi gen ekspresyonları iç



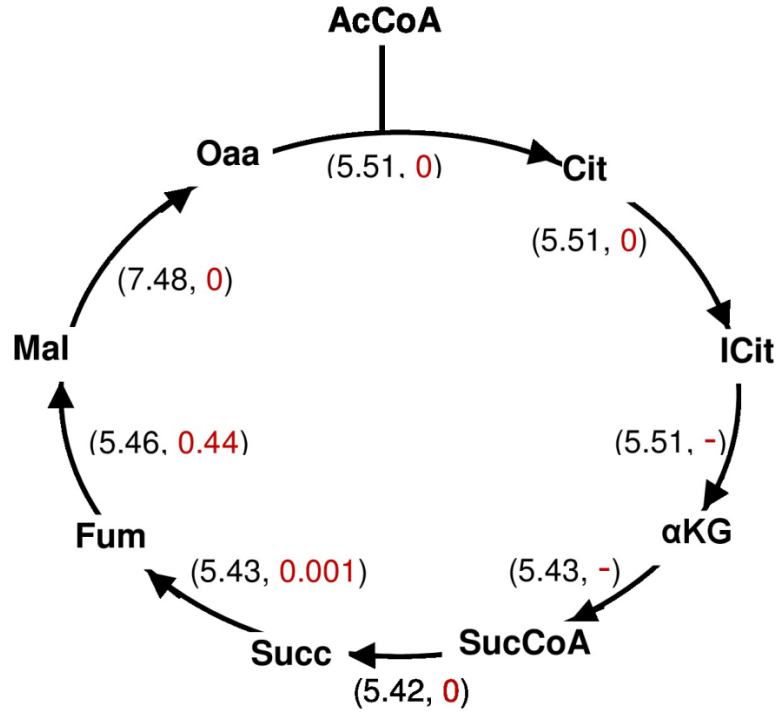
Şekil 4.28 rhGH üretiminin MOT koşulu için, sırasıyla, *i*Bsu1144-rhGH (siyah) ve *i*Bsu1103V2-rhGH (kırmızı) ile hesaplanan glikoliz yolizi akıları, mmol/(g_{KH} st) *i*Bsu1103V2-rhGH’de olmayan tepkimeler (-) ile gösterilmiştir

düzen geni *tyrS* ekspresyonunun 1.3- ile 47.7- katı olduğu için (EK 11 Çizelge 2), PEP, UPG, G3P, F6P, G6P, amino asitler, ve hücre bileşenlerinin oluşumu ile TCA döngüsünün işleyişi için aktif glikoliz yolizi beklenmektedir. Dolayısıyla glikoliz yolizi akıları *iBsu1144-rhGH* ile doğru hesaplanmıştır (Şekil 4.28). *iBsu1103V2-rhGH* ve *iBsu1144-rhGH*'nin glikoliz yolizi akılarındaki farklılıklar Pyr nodu akılarını etkilemiştir (Şekil 4.28-4.29).

iBsu1144-rhGH'de 10, *iBsu1103V2-rhGH*'de dokuz Pyr nodu tepkimesi vardır. *iBsu1144-rhGH* ile sekiz tepkime aktif ve bir tepkime inaktiftir. Fakat *iBsu1103V2-rhGH*'de piruvattan (Pyr) asetil-koenzim A (AcCoA) oluşum tepkimesi olmadığı için *iBsu1103V2-rhGH* ile dört tepkime aktiftir ve beş tepkime inaktiftir (Şekil 4.29). *iBsu1144-rhGH* ile TCA döngüsünün tüm tepkimeleri aktiftir ve yolizi tepkime akıları doğrudur (Şekil 4.30).



Şekil 4.29 rhGH üretiminin MOT koşulu için, sırasıyla, *iBsu1144-rhGH* (siyah) ve *iBsu1103V2-rhGH* (kırmızı) ile hesaplanan piruvat nodu akıları, mmol/(g_{KH} st) *iBsu1103V2-rhGH*'de olmayan tepkimeler (-) ile gösterilmiştir

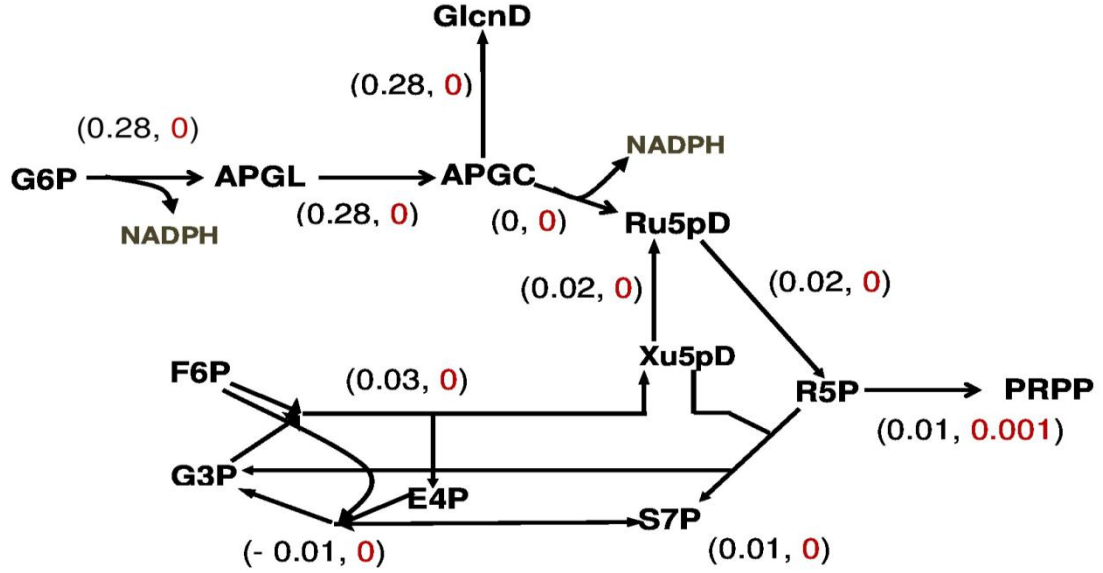


Şekil 4.30 rhGH üretiminin MOT koşulu için, sırasıyla, *iBsu1144-rhGH* (siyah) ve *iBsu1103V2-rhGH* (kırmızı) ile hesaplanan TCA döngüsü akıları, mmol/(g_{KH} st) *iBsu1103V2-rhGH*'de olmayan tepkimeler (-) ile gösterilmiştir

iBsu1103V2-rhGH'de ICit'dan αKG ve αKG'dan SucCoA oluşum tepkimeleri olmadığı için, *iBsu1103V2-rhGH* ile TCA döngüsünün altıncı ve yedinci tepkimeleri aktiftir, diğer dört tepkime inaktiftir (Şekil 4.30). TCA döngüsü gen ekspresyonları iç düzen geni *tyrS* ekspresyonunun 1.7- ile 22.2- katı olduğu için (EK 11 Çizelge 3) ve fermentasyon en uygun oksijen aktarım koşulu olan MOT'ta gerçekleştirildiğinden, TCA döngüsünün *iBsu1144-rhGH* ile tahmin edildiği gibi aktif olması beklenir (Şekil 4.30).

iBsu1144-rhGH ve *iBsu1103V2-rhGH*'de sırasıyla 18 ve 16 pentoz fosfat yolizi tepkimesi vardır (Şekil 4.31). G3P ve S7P'den Xu5pD ve R5P sentezi ile F6P ve E4P'dan G3P ve S7P oluşum tepkimeleri *iBsu1144-rhGH*'de tersinir, *iBsu1103V2-*

rhGH'de tersinmezdir. *i*Bsu1144-rhGH ile sekiz, *i*Bsu1103V2-rhGH ile bir tepkime aktiftir (Şekil 4.31). PFY'deki NADPH oluşumu sadece *i*Bsu1144-rhGH'de gerçekleşir.



Şekil 4.31 rhGH üretiminin MOT koşulu için, sırasıyla, *i*Bsu1144-rhGH (siyah) ve *i*Bsu1103V2-rhGH (kırmızı) ile hesaplanan pentoz fosfat yolizi akıları, mmol/(g_{KH} st) *i*Bsu1103V2-rhGH'de olmayan tepkimeler (-) ile gösterilmiştir

Dolayısıyla, biyosentetik tepkimeler için indirgeyici olarak kullanılan NADPH ile nükleotit, nükleik asit, ve hücre bileşenlerinin sentezi için gerekli Ru5pD *i*Bsu1103V2-rhGH'nin PFY'de sentezlenememektedir. *i*Bsu1103V2-rhGH'de Ru5pD F6P ve G3P dallanma noktalarından gelen metabolik akıyla sentezlenir (Şekil 4.31). Üçüncü- nesil GEM *i*Bsu1144-rhGH'nin birinci- ve ikinci- nesil GEM'lerle karşılaştırmalı analizleri *i*Bsu1144-rhGH'nin doğru sonuçlar ürettiğini transkriptom verileriyle destekleyerek göstermiştir.

4.2.5 Rekombinant İnsan Büyüme Hormonu Üretiminin MOT koşulunda Periyod II'den Periyod III'e geçişin *Bacillus subtilis* Tepkime Sistemine Etkilerinin Transkripsiyonel Düzeyde İncelenmesi

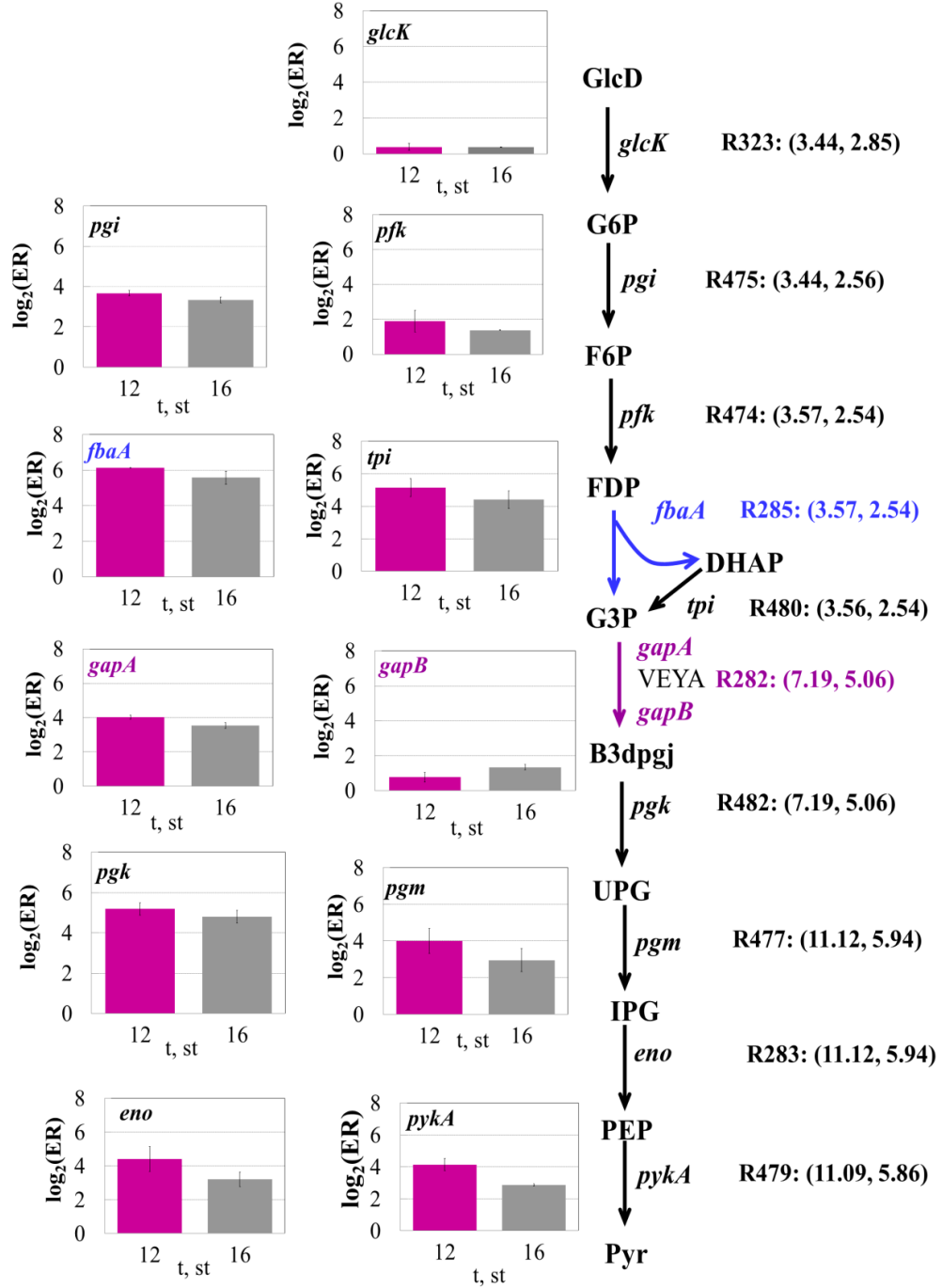
rhGH fermentasyon prosesi çözünmüş oksijen derişimi, ortam pH'ı, glukoz, hücre, ve rhGH derişim profilleri göz önüne alınarak dört periyoda bölünmüştür (Şekil 4.13a-

4.13c). Periyod I ($0 < t < 8$ st) üstel çoğalma evresi, Periyod II ($8 < t < 14$ st) proteaz inhibitörünün üretim ortamına eklenmesiyle çoğalmanın durduğu ve rhGH'nin üretim ortamına salgılanmaya başladığı fazdır, Periyod III ($14 < t < 20$ st) hücre dışı rhGH üretiminin en yüksek hızla arttığı erken durgunluk fazı, ve Periyod IV ($20 < t < 32$ st) hücre dışı rhGH üretiminin en yüksek olduğu geç durgunluk fazıdır. rhGH üretiminde oksijen aktarımı için en uygun koşul olan MOT'ta Periyod II'den Periyod III'e geçişin etkilerini transkripsiyonel seviyede değerlendirilmesi amaçlanmıştır. rhGH fermentasyon prosesinin ikinci ve üçüncü periyoduna ait glukoz, hücre, rhGH, aminoasit- ve organik asit- derişimlerinin kalma süresi ile değışimleri (Yılmaz, basılmamış) kullanılarak MOT'ta $t=12$ st ve $t=16$ st için iBsu1144-rhGH ile tepkime hızları ve akı oranları hesaplanarak EK 15'te sunulmuştur (EK 15 Çizelge 1-11). rhGH üretiminin MOT koşulu için $t=12$ st ve $t=16$ st'a ait RMA verileri EK16'da verilmiştir. Affymetrix *B.subtilis* gen çipindeki prob setleri incelendiğinde MOT koşulunda PII'den PIII'e geçişteki en büyük etki *pdhB* (R473), *pdhC* (R473), *hom* (R48, R49) ekspresyonlarının 10.0- kat azalırken, *yrkS* ekspresyonunun 8.3- kat artmasıdır (EK 16 Çizelge 1). rhGH üretiminin MOT koşulunda PII'den PIII'e geçişin gen ekspresyonları ve tepkime hızlarına etkileri birlikte incelenerek merkezi karbon yolizleri analizlenmiştir.

4.2.5.1 Glikoliz yolizi

rhGH üretiminin MOT koşulunda, sırasıyla, PII ve PIII'teki glikoliz yolizi gen ekspresyonları ve akıları şekil 4.32'de verilmiştir. Glukoz tüketim hızları PII ve PIII'te, sırasıyla, 3.44 ve 2.85 mmol/(g_{KH} st)'dir. Akıları PII'den PIII'e 1.2-1.9- kat azalmıştır (EK 15 Çizelge 2). *fbaA* (R285) en yüksek, *glcK* (R323) en düşük ekspresyona sahiptir (EK 16 Çizelge 2). *gapB* (R282) ve *glcK* (R323) dışındaki genlerin ekspresyonları PII'den PIII'e geçişte 1.3-2.4- kat azalmıştır, *gapB* (R282) ekspresyonu 1.5- kat artarken, *glcK* (R323) ekspresyonu değışmemiştir. PII'den PIII'e geçişin en büyük etkisi *pykA* (R479) ekspresyonunun 2.4- kat azalarak R479 akı değeri 1.9- kat azalmasıdır. *gapA* (R282) ekspresyonu ile *gapA* (R282) ve *gapB* (R282) tarafından kodlanan gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz izoenzimleri (EC 1.2.1.12) tarafından katalizlenen R282'nin akı değeri 1.4- kat azalırken, *gapB* (R282) ekspresyonu PII'den PIII'e 1.5- kat

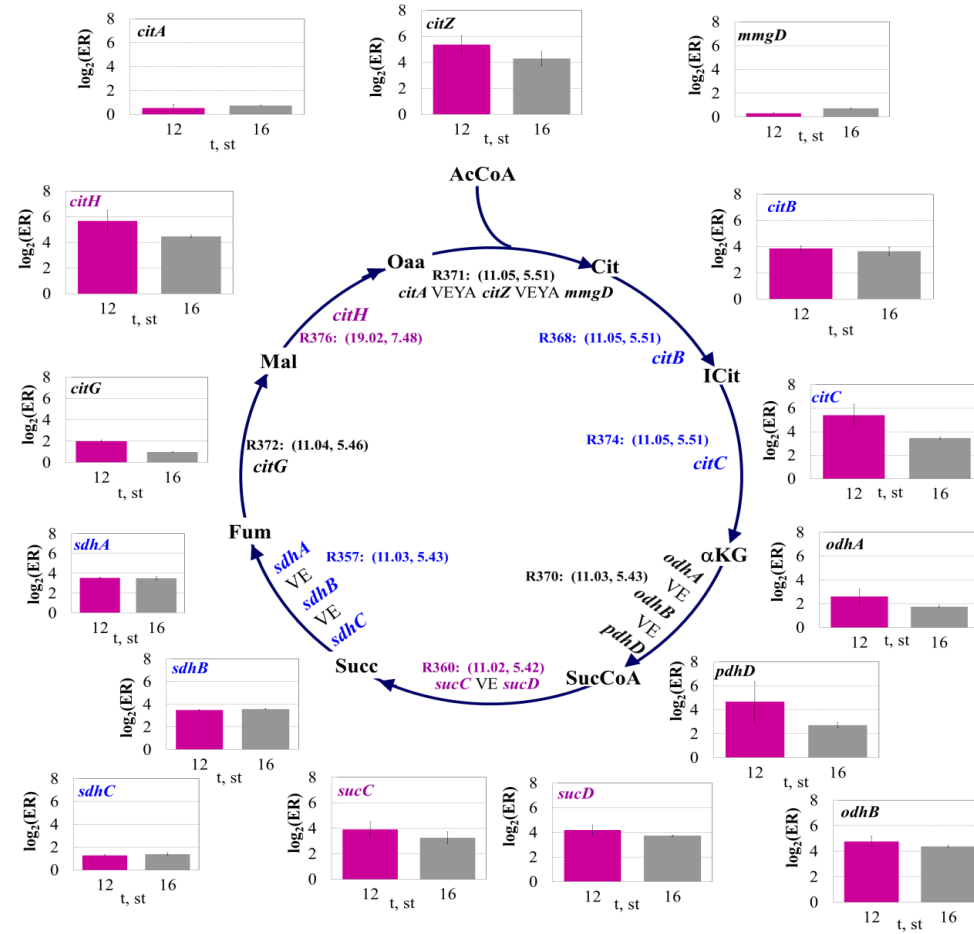
artmıştır (EK 15 Çizelge 2, EK 16 Çizelge 2, Şekil 4.32). Dolayısıyla R282 için baskın gen gapA (R282) olmalıdır.



Şekil 4.32 rhGH üretiminin MOT koşulunda, sırasıyla, Periyod II ve Periyod III'te iBsu1144-rhGH ile hesaplanan glikoliz yolizi tepkime hızları (mmol/(g_{KH} st)) ve RMA verileri kullanılarak iç-düzen geni *tyrS*'e dayanarak hesaplanan yolizi genlerinin ekspresyon oranları (ER)

4.2.5.2 TCA döngüsü

TCA döngüsü gen ekspresyonları ve akıları Şekil 4.33'de verilmiştir. TCA döngüsü akıları PII'den PIII'e 2.0-2.5- kat azalmıştır (EK 15 Çizelge 3). *citZ* (R371), *citC* (R374), *odhA* (R370), *odhB* (R370), *pdhD* (R370), *sucC* (R360), *sucD* (R360), *citG* (R372), ve *citH* (R376) ekspresyonları 1.3 - 3.9- kat azalırken, *mmgD* (R371) ekspresyonu PII'den PIII'e 1.3- kat artmıştır (EK 16 Çizelge 3). *citA* (R371), *citB* (R368), *sdhA* (R357), *sdhB* (R357), ve *sdhC* (R357) ekspresyonları her iki periyotta yaklaşık aynıdır (EK 16 Çizelge 3). PII ve PIII'te oksijen tüketim (R1053) ve karbondioksit oluşum (R1050) hızları, sırasıyla, 21.34 ve 13.78 ile 21.51 ve 13.73 mmol/(g_{KH} st)'dir (EK 15 Çizelge 1). TCA döngüsü genlerinden *citH* (R376) ve *mmgD* (R371) sırasıyla en yüksek ve düşük ekspresyona sahiptirler (EK 16 Çizelge 3). PII'den PIII'e geçişin en büyük etkisi *citC* (R374) ve *pdhD* (R370) ekspresyonlarının 3.9- kat azalarak R370 ve R374 akı değerlerinin 2.0- kat azalmasıdır (EK 15 Çizelge 3, 16.3, Şekil 4.33). *citZ* (R371), *citA* (R371), ve *mmgD* (R371) genleri tarafından kodlanan sitrat sentaz izoenzimleri (EC 2.3.3.1) tarafından katalizlenen R371 nolu tepkimenin akı değeri PII'den PIII'e 2.0- kat azalırken, *mmgD* (R371) ekspresyonu 1.3- kat artmıştır ve *citA* (R371) ekspresyonu değişmemiştir. *citZ* (R371) ekspresyonu PII'den PIII'e 2.1- kat azaldığı için, *citZ* (R371) R371 için baskın gen olmalıdır (EK 15 Çizelge 3, 16.3, Şekil 4.33). *odhA* (370), *pdhD* (370), ve *odhB* (370) ekspresyonları PII'den PIII'e 1.8-, 3.9-, ve 1.3- kat azaldığı için *odhA* (370), *pdhD* (370), ve *odhB* (370) tarafından kodlanan 2-okzaglutarat dehidrojenaz kompleksi tarafından katalizlenen R370'in akı değeri 2.0- kat azalmıştır. R360'ı katalizleyen suksinil-CoA sentetazı (EC.6.2.1.5) kodlayan *sucC* (R360) ve *sucD* (R360) ekspresyonları sırasıyla 1.6- ve 1.4- kat azaldığı için, R360 akı değeri PII'den PIII'e 2.0- kat azalmıştır. R357'yi katalizleyen suksinat dehidrojenazı (EC. 1.3.99.1) kodlayan *sdhA* (R357), *sdhB* (R357), ve *sdhC* (R357) ekspresyonları PII'den PIII'e değişmezken, R357 akı değeri 2.0- kat azalmıştır (EK 15 Çizelge 3, 16.3, Şekil 4.33). ATP üretimi PII ve PIII'te, sırasıyla, 237.8 ve 112.1 mmol/(g_{KH} st)'dir, ATP üretiminin PII ve PIII'te, sırasıyla, % 7.7, 0.0, 4.6, 87.7 ve % 9.7, 0.3, 4.8, 85.2'si glikoliz, PFY, TCA döngüsü, elektron taşınım tepkimeleri ile gerçekleşmiştir (Çizelge 4.10).



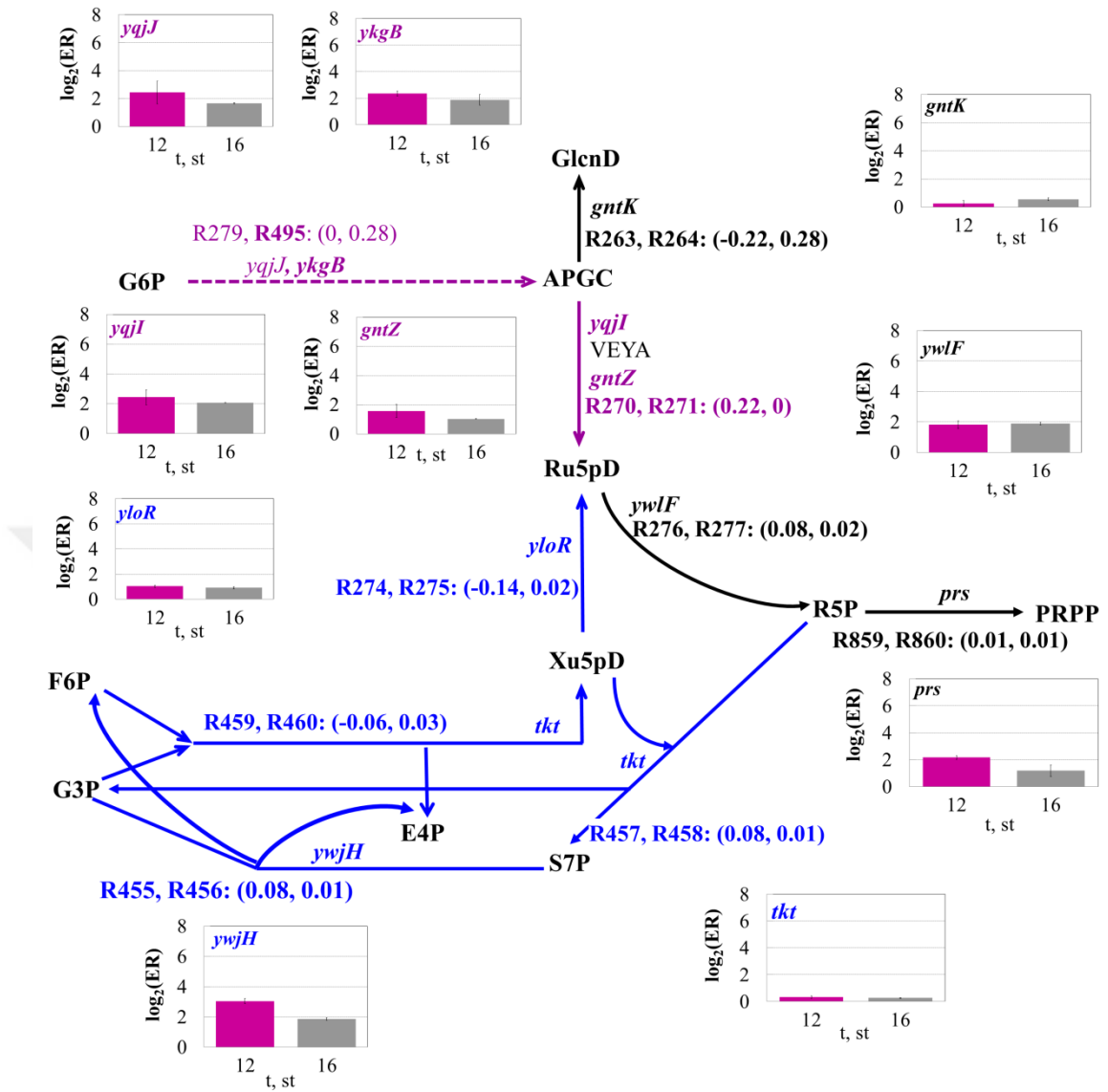
Şekil 4.33 rhGH üretiminin MOT koşulunda, sırasıyla, Periyod II ve Periyod III'te iBsu1144-rhGH ile hesaplanan TCA döngüsü tepkime hızları (mmol/(g_{KH} st)) ve RMA verileri kullanılarak iç-düzen geni *tyrS*'e dayanarak hesaplanan yolizi genlerinin ekspresyon oranları (ER)

Çizelge 4.10 rhGH üretiminin MOT koşulunda Periyod II ve Periyod III için iBsu1144-rhGH ile hesaplanan ATP üretim hızları.

R # veya *R #	PII		PIII	
	ATP üretimi, mmol/(g _{KH} st)	ATP	ATP üretimi, mmol/(g _{KH} st)	ATP
479	11.09	4.66	5.86	5.23
482	7.19	3.02	5.06	4.52
264	0	0	0.28	0.25
360	11.02	4.63	5.42	4.84
990	0.001	0.0004	0.00	0.00
*370	44.12	18.55	21.73	19.39
*357	44.12	18.55	21.73	19.39
*376	76.08	31.99	29.92	26.70
*374	44.20	18.59	22.06	19.68
Total	237.82	100.00	112.06	100.00

4.2.5.3 Pentoz fosfat yolizi

Pentoz fosfat yolizi (PFY) gen ekspresyonları ve akıları Şekil 4.34'te verilmiştir. *gntK* (R263-R264), *yloR* (R274-R275), *ywlF* (R276-R277), ve *tkl* (R457-R460) dışında PFY gen ekspresyonları PII'den PIII'e geçişte 1.3-2.3- kat azalmıştır (EK 16 Çizelge 4). *yloR* (R274-R275), *ywlF* (R276-R277), *tkl* (R457-R460), ve *gntK* (R263-R264) ekspresyonları PII ve PIII için aynıdır (EK 16 Çizelge 4). Ru5pD PII'de oksidatif PFY tepkimesiyle, PIII'te ise F6P dallanma noktası üzerinden sentezlenmiştir (Şekil 4.34). PII'den PIII'e geçişte PFY'deki Ru5pD sentez hızı 11- kat azalarak hücre sentez hızını (R1056) 2.6- kat azaltmıştır. R455 ve R456 nolu tepkimeleri katalizleyen transaldolazı (EC. 2.2.1.2) kodlayan *ywjH* ile R270 ve R271 nolu tepkimeleri katalizleyen fosfoglukonat dehidrojenazı (EC 1.1.1.44) kodlayan *yqiI* en yüksek ekspresyona sahip genlerdir. R263 ve R264 nolu tepkimeleri katalizleyen glukonat kinazı (EC 2.7.1.12) kodlayan *gntK* ile R457-R460 nolu tepkimeleri katalizleyen transketolazı (EC 2.2.1.1) kodlayan *tkl* en düşük ekspresyona sahip genlerdir (EK 16 Çizelge 4). PII'den PIII'e geçişin en büyük etkisi *ywjH* (R455, R456) ekspresyonunun 2.3- kat azalarak, R455 nolu tepkimenin akı değerinin 7.5- kat azalmasıdır (EK 15 Çizelge 4, 16.4, Şekil 4.34).

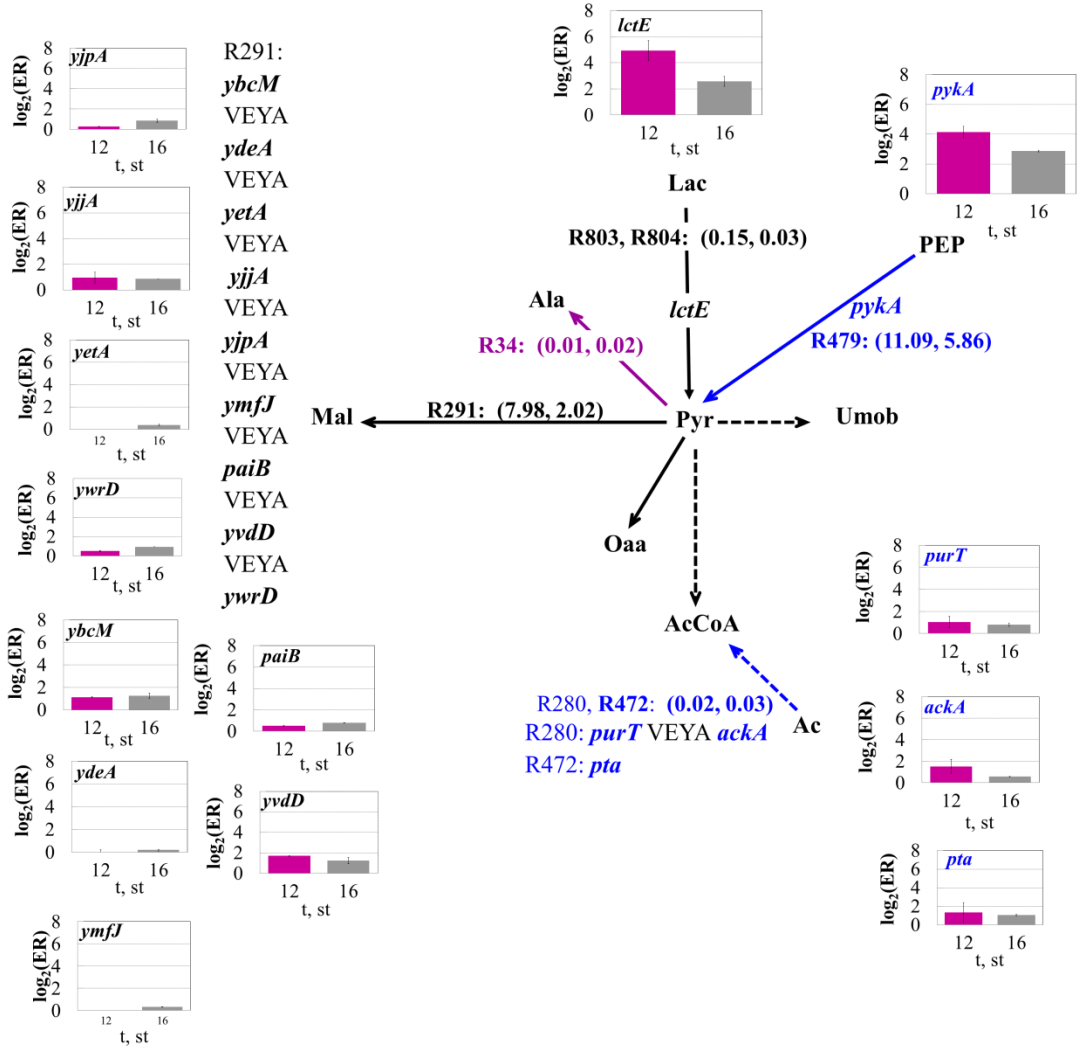


Şekil 4.34 rhGH üretiminin MOT koşulunda, sırasıyla, Periyod II ve Periyod III'te iBsu1144-rhGH ile hesaplanan PFY tepkime hızları (mmol/(g_{KH} st)) ve RMA verileri kullanılarak iç-düzen geni *tyrS*'e dayanarak hesaplanan yolizi genlerinin ekspresyon oranları (ER)

4.2.5.4 Piruvat nodu

Piruvat nodu gen ekspresyonları ve tepkime hızları Şekil 4.35a ve 4.35b'de gösterilmiştir. *alsS* (R55), *yetA* (R291), *yjpA* (R291), *ymfJ* (R291), ve *ywrD* (R291) ekspresyonları PII'den PIII'e 1.3-2.0- kat artmıştır (EK 16 Çizelge 5). Pyr nodundaki 24 genden 13'ünün ekspresyonları PII'den PIII'e 1.4-6.4- kat azalmıştır: *pykA* (R479), *ilvB*

(R55), *ilvH* (R55), *ilvC* (R164), *ilvD* (R133), *pdhA* (R473), *pdhB* (R473), *pdhC* (R473), *pdhD* (R473), *ackA* (R280), *pycA* (R269), *lctE* (R803, R804), *yvdD* (R291) (EK 16 Çizelge 5). *purT* (R280), *pta* (R472), *ybcM* (R291), *ydeA* (R291), *yjjA* (R291), ve *paiB* (R291) ekspresyonları değişmemiştir (EK 16 Çizelge 5). R473 nolu tepkimeyi katalizleyen piruvat dehidrojenazı (EC. 1.2.4.1) kodlayan *pdhC* ekspresyonu en yüksektir, R291'i katalizleyen malat dehidrojenaz izoenzimlerini (EC 1.1.1.39) kodlayan *ymfJ* ve *ydeA* sırasıyla en düşük ekspresyona sahip genlerdir. PII'den PIII'e geçişin en büyük etkisi *pdhC* (R473) ekspresyonunun 6.4- kat azalmasıdır; fakat *pdhA*, *pdhB*, *pdhC*, ve *pdhD* genleriyle kodlanan piruvat dehidrojenaz (EC. 1.2.4.1) tarafından katalizlenen R473 nolu tepkimenin akı değeri önemli ölçüde değişmemiştir (EK 15 Çizelge 5, 16.5, Şekil 4.35a). R269'u katalizleyen piruvat karboksilazı (EC. 6.4.1.1) kodlayan *pycA* geninin ekspresyonu iç düzen geni *tyrS*'in ekspresyonundan yüksek olmasına rağmen, Pyr'dan Oaa sentezini sağlayan R269 PII ve PIII'te inaktiftir (Şekil 4.35a). Bunun sebebi PycA'nın Clp proteazlarınca parçalanması olabilir (Gerth vd. 2008). Piruvatı 3-metil-2-okzobutanoata (Umob) dönüştüren R55, R164, ve R133 nolu ardışık tepkimeler incelendiğinde *ilvB* (R55) ve *ilvH* (R55) ekspresyonları PII'den PIII'e geçişte sırasıyla 3.4- ve 3.7- kat azalırken, *alsS* (R55) ekspresyonu 2.0- kat artmıştır (EK 16 Çizelge 5). *ilvB*, *ilvH*, ve *alsS* tarafından kodlanan asetolaktat sentaz (EC. 2.2.1.6) ile katalizlenen R55 nolu tepkimenin akı değeri PII'den PIII'e 3.0- kat arttığı için, *alsS* (R55) R55 için baskın gen olmalıdır (EK 15 Çizelge 5, 16.5, Şekil 4.35a). Ayrıca *ilvC* (R164) ve *ilvD* (R133) ekspresyonları PII'den PIII'e sırasıyla 4.8- ve 3.2- kat azalmıştır, fakat R164 ve R133'ün akı değerleri 3.0- kat artmıştır. Laktattan piruvat oluşturan R803 nolu tepkimenin akı değeri PII'den PIII'e 4.8- kat azalmıştır, çünkü R803 ve R804'ü katalizleyen L-laktat dehidrojenazı (EC. 1.1.1.27) kodlayan *lctE* geninin ekspresyonu PII'den PIII'e 5.1- kat azalmıştır (EK 15 Çizelge 5, 16.5, Şekil 4.35b). Benzer bir şekilde PEP'den Pyr oluşturan R479 nolu tepkimenin hızı PII'den PIII'e 1.9- kat azalmıştır, çünkü R479'u katalizleyen piruvat kinazı (EC. 2.7.1.40) kodlayan *pykA* geninin ekspresyonu PII'den PIII'e 2.4- kat azalmıştır (EK 15 Çizelge 5, 16.5, Şekil 4.35b). Ac'ı AcCoA'ya dönüştüren R280 ve R472 nolu ardışık tepkimelerin akı değerleri PII'den PIII'e 1.5- kat artmıştır; fakat *purT* (R280), *pta* (R472) ekspresyonları değişmemiştir. *ackA* (R280) ekspresyonu PII'den PIII'e 1.9- kat azalmıştır.



Şekil 4.35.b rhGH üretiminin MOT koşulunda, sırasıyla, Periyod II ve Periyod III'te iBsu1144-rhGH ile hesaplanan Pyr nodu tepkime hızları (mmol/(g_{KH} st)) ve RMA verileri kullanılarak iç-düzen geni *tyrS*'e dayanarak hesaplanan yolizi genlerinin ekspresyon oranları (ER)

Amino asit sentez yolizlerine yönelen akıllar çizelge 4.11'de gösterilmiştir. Amino asit sentez yolizi tepkimelerinin hızları PII'den PIII'e geçişte değişmiştir (EK 15 Çizelge 6-11). TCA döngüsündeki ilk dallanma noktası olan α KG'dan R175, R199, R1067, R15, R28, R33, R41, R77, R91, R95, R96, R116, R154, R167, R200, R9, R29, R34, R42, R57, R78, R90, R94, R97, R108, R117, ve R155 nolu tepkimelerle glutamat sentez hızı Periyod II ve III'te sırasıyla 0.03 ve 0.08 mmol/(g_{KH} st)'tir. TCA döngüsündeki ikinci dallanma noktası olan Oaa'dan R42 ile aspartat sentez hızı PII ve PIII'te sırasıyla 7.97 ve 1.97 mmol/(g_{KH} st)'tir (Çizelge 4.11). Sonuç olarak aspartik asit yolizi dışındaki

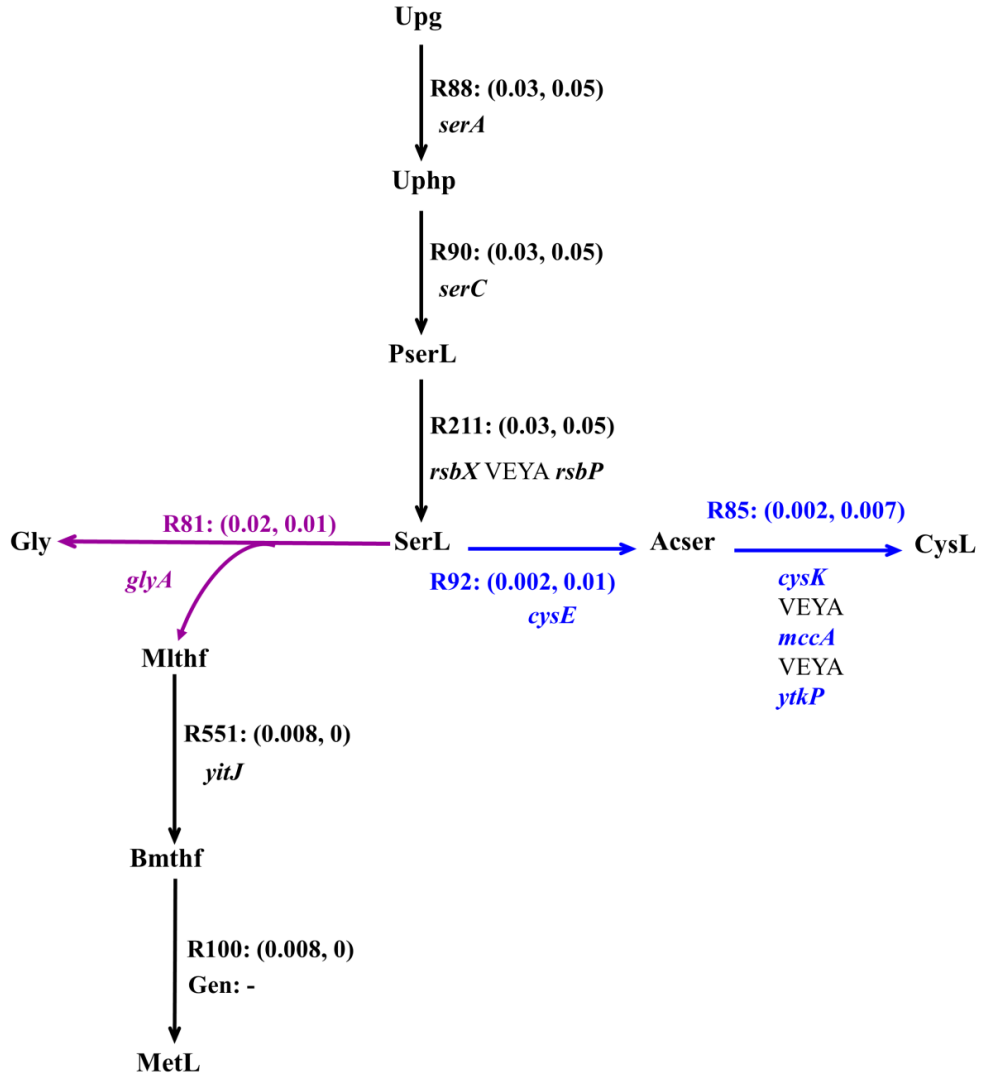
diğer tüm amino asit yolizlerine yönelik akılar PII'den PIII'e 1.7-3.2- kat artarak rhGH sentez akısını 9.1- kat artırmıştır (Çizelge 4.11).

Çizelge 4.11 rhGH üretiminin MOT koşulunda amino asit yolizlerine yönelik akıların kalma süresiyle değişimleri

Amino asit sentez yolizleri	Periyod II	Periyod III
	Amino asit yolizine yönelik akı, mmol/(g _{KH} st)	Amino asit yolizine yönelik akı, mmol/(g _{KH} st)
Serin-grubu amino asitler	0.03	0.05
Alanin-grubu amino asitler	0.05	0.13
Histidin	0.002	0.005
Aspartik-asit grubu amino asitler	7.97	1.97
Aromatik grup- amino asitler	0.01	0.04
Glutamik asit- grubu amino asitler	0.03	0.08

4.2.5.5 Serin grubu amino asitlerin yolizi

Serin ve sistein sentezine yönelik akılar PII'den PIII'e sırasıyla 1.7- ve 3.5- kat artmıştır, fakat glisin sentezine yönelik akı 2.1- kat azalmıştır (Şekil 4.36, EK 15 Çizelge 6). Serin grubu amino asit yolizinde PII'de aktif olan metiyonin sentezi PIII'te inaktiftir (Şekil 4.36). MOT'ta PII'den PIII'e *glyA* (R81) ekspresyonu 1.4- kat artmıştır; fakat *serA* (R88), *serC* (R90), ve *cysK* (R85) ekspresyonları sırasıyla 2.1, 1.5, ve 2.2- kat azalmıştır. *rsbX* (R211), *rsbP* (R211), *cysE* (R92), *mccA* (R85), *ytkP* (R85), ve *yitJ* (R551) ekspresyonları değişmemiştir. R90'ı katalizleyen fosfoserin aminotransferazı (EC. 2.6.1.52) kodlayan *serC* (R90) ve R81'i katalizleyen serin hidroksimetiltransferazı (EC. 2.1.2.1) kodlayan *glyA* (R81), sırasıyla, PII ve PIII'te en yüksek ekspresyona sahiptir. Bununla birlikte R551'i katalizleyen 5,10-metilentetrahidrofolat redüktazı (EC. 1.5.1.20) kodlayan *yitJ* (R551) en düşük ekspresyona sahiptir (EK 16 Çizelge 6). PII'den PIII'e geçişin en büyük etkisi *cysK* (R85) ekspresyonunun 2.2- kat azalmasıdır; fakat *cysK* (R85), *mccA* (R85), ve *ytkP* (R85) tarafından kodlanan sistein sentaz izoenzimleri (EC. 2.5.1.47) tarafından katalizlenen R85'in akı değeri PII'den PIII'e



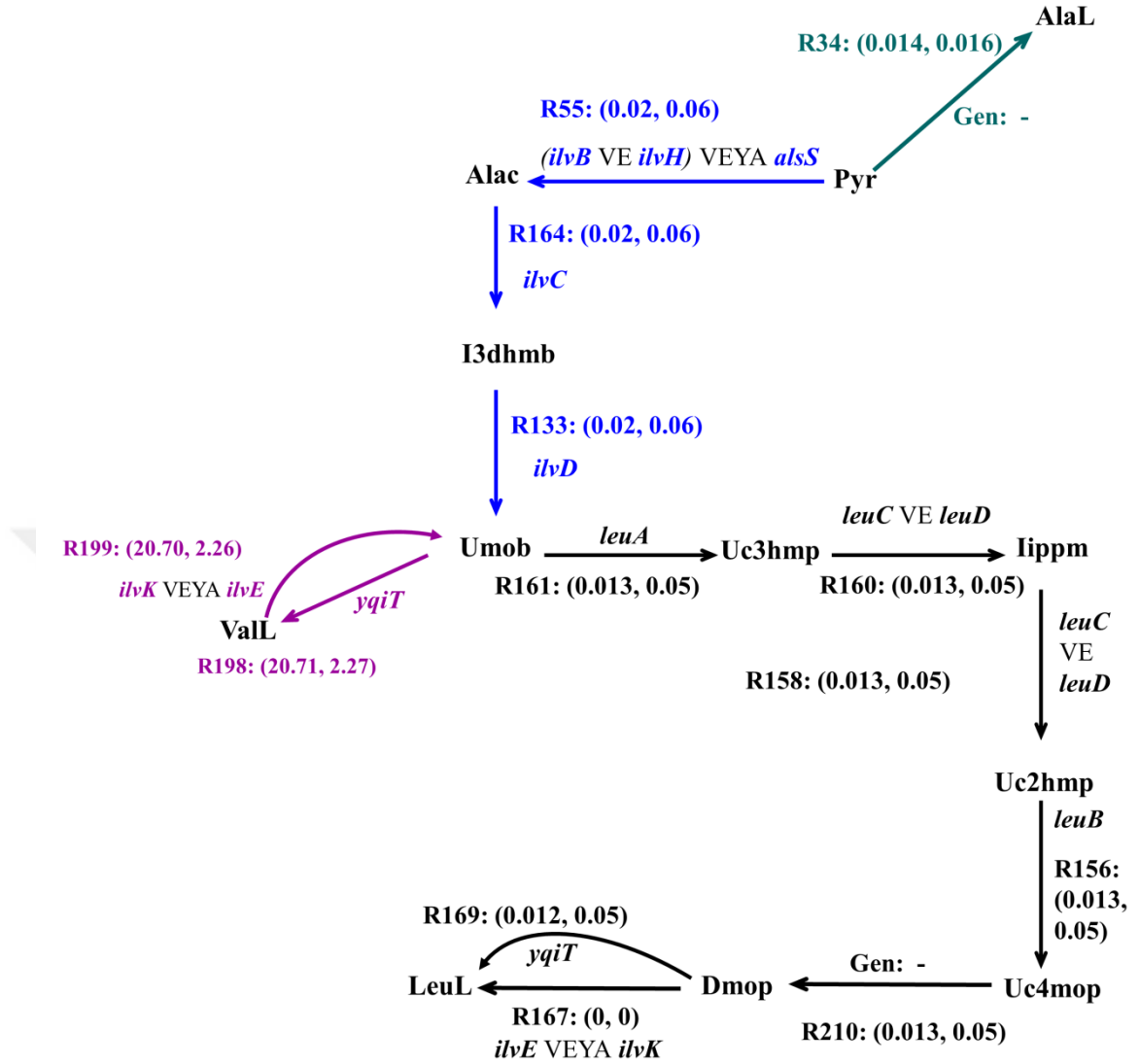
Şekil 4.36 rhGH üretiminin MOT koşulunda, sırasıyla, Periyod II ve Periyod III'te iBsu1144-rhGH ile hesaplanan serin-grubu amino asit yolizi tepkime hızları (mmol/(g_{KH} st)) ve genleri. (R100'ün geni bilinmiyor.)

3.5- kat artmıştır. *mccA* (R85) ve *ytkP* (R85) ekspresyonları Periyod II ve III'te aynı olduğundan, R85 için baskın gen yoktur (EK 15 Çizelge 6, 16.6). *rsbX* (R211) ve *rsbP* (R211) ekspresyonları değişmediği halde, tarafından kodlanan serin fosfataz izoenzimleri (EC 3.1.3.3) tarafından katalizlenen R211 nolu tepkimenin akı değeri PII'den PIII'e 1.7- kat artmıştır. *glyA* (R81) ekspresyonu glisin kısıtlılığında artar (<http://subtiwiki.uni-goettingen.de> 2009), PII'den PIII'e 1.4- kat artmasına rağmen *glyA* (R81) tarafından kodlanan serin hidroksimetiltransferazın (EC 2.1.2.1) katalizlediği R81'in akı değeri 2.0- kat azalmıştır (EK 15 Çizelge 6, 16.6).

4.2.5.6 Alanin grubu amino asitlerin yolizi

Alanin grubu amino asit yolzinin 12 geni içinden *alsS* (R55) ekspresyonu PII'den PIII'e 2.0- kat artarken, dokuz genin ekspresyonu 2.1-4.8- kat azalmıştır: *ilvB* (R55), *ilvH* (R55), *ilvC* (R164), *ilvD* (R133), *leuA* (R161), *leuC* (R160, R158), *leuD* (R160, R158), *leuB* (R156), ve *ilvK* (R167, R199) (EK 16 Çizelge 7). *yqiT* (R169, R198) ve *ilvE* (R167, R199) ekspresyonları değişmemiştir (EK 16 Çizelge 7). R158 ve R160'ı katalizleyen 3-izopropilmalat dehidratazı (EC.4.2.1.33) kodlayan *leuC* (R160, R158) en yüksek ekspresyona sahiptir (EK 16 Çizelge 7). Asetolaktat sentazı (EC.2.2.1.6) kodlayan *alsS* (R55) ve R169'u katalizleyen lözin dehidrojenaz (EC.1.4.1.9) ile R198'i katalizleyen valin dehidrojenazı (EC.1.4.1.9) kodlayan *yqiT* (R169, R198) sırasıyla PII ve PIII'te en düşük ekspresyona sahip genlerdir (EK 16 Çizelge 7). PII'den PIII'e geçişin en büyük etkisi *ilvC* (R164) ekspresyonunun 4.8- kat azalmasıdır. Bununla birlikte *ilvC* (R164) tarafından kodlanan ketol-asit redüktoizomeraz (EC. 1.1.1.86) tarafından katalizlenen R164'ün akı değeri PII'den PIII'e 3.0- kat artmıştır (EK 15 Çizelge 7, 16.7).

Piruvattan L-alanin sentezleyen R34'ün akı değeri PII'den PIII'e önemli ölçüde değişmemiştir. Piruvattan R55, R164, R133, R161, R160, R158, R156, R210, ve R169 nolu tepkimelerle L-lözin oluşumuna yönelen akılar PII'den PIII'e 3.0-3.8- kat artmıştır. *ilvB*(R55)-*ilvH*(R55)-*ilvC*(R164)-*leuA*(R161)-*leuB*(R156)-*leuC*(R160, R158) - *leuD* (R160, R158) operonu gen ekspresyonları PII'den PIII'e 2.2-4.8- kat azalda da, bu genlerle ilişkili tepkime hızları 3.0-3.5- kat artmıştır. *yqiT* (R198) ekspresyonu önemli ölçüde değişmese de, 3-metil-2-okzobutanoattan (Umob) L-valin oluşturan R198 nolu tepkimenin hızı 9.1- kat azalmıştır (Şekil 4.37, EK 15 Çizelge 7). *ilvK* (R199) ekspresyonu PII'den PIII'e 2.1- kat azalırken, *lvE* (R199) ekspresyonu değişmemiştir (EK 16 Çizelge 7). *iilvE* ve *ilvK* tarafından kodlanan amino asit aminotransferazın (EC 2.6.1.42) katalizlediği R199'un akı değeri PII'den PIII'e 9.2- kat azaldığı için, *ilvK* (R199) R199 için baskın gen olmalıdır. R167 nolu tepkimeyi katalizleyen amino asit aminotransferaz izoenzimlerini (EC. 2.6.1.42) kodlayan *ilvE* (R167, R199) ve *ilvK* (R167, R199) ekspresyonları *tyrS* ekspresyonundan yüksek olduğu halde, R167 nolu tepkime hücre içi regülasyonlar nedeniyle inaktiftir (Şekil 4.37, EK 16 Çizelge 7).



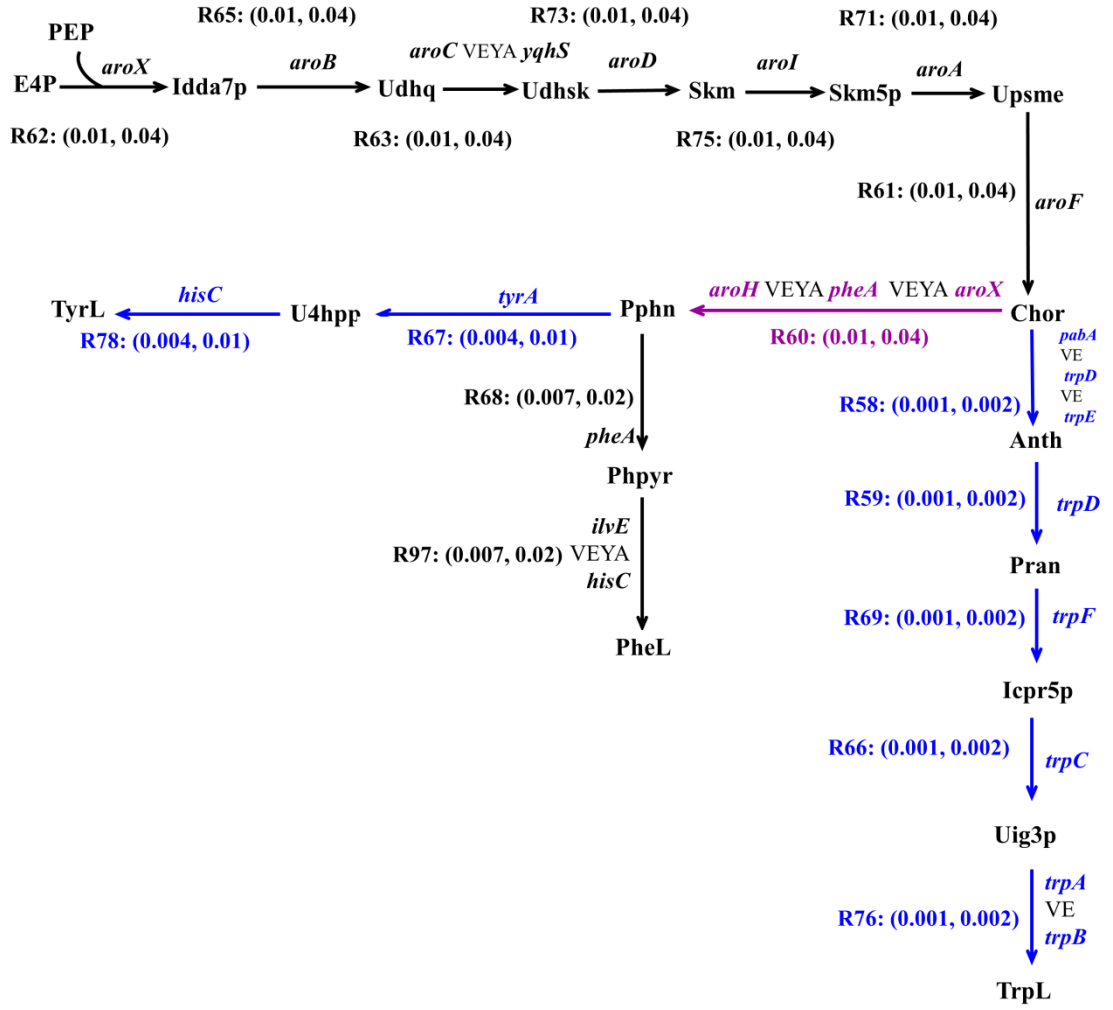
Şekil 4.37 rhGH üretiminin MOT koşulunda, sırasıyla, Periyod II ve Periyod III'te iBsu1144-rhGH ile hesaplanan alanin-grubu amino asit yolizi tepkime hızları (mmol/(g_{KH} st)) ve genleri (R34 ve R210'un genleri bilinmemektedir)

4.2.5.7 Aromatik asit grubu amino asitlerin yolizi

PEP ve E4P'yi Chor'a dönüştüren R62, R65, R63, R73, R75, R71, ve R61 nolu ardışık tepkimelerin hızları PII'den PIII'e 3.2- kat artmıştır (Şekil 4.38, EK 15 Çizelge 8). Ayrıca Chor'u TrpL'ye dönüştüren R58, R59, R69, R66, ve R76 nolu ardışık tepkimeler ile Pphn'yi PheL'e dönüştüren R68 ve R97 nolu ardışık tepkimeler PII'den PIII'e sırasıyla 2.0- ile 3.1- kat artmıştır. Pphn'yi TyrL'e dönüştüren R67 ve R78 nolu ardışık tepkimelerin hızları PII'den PIII'e 3.5- kat artmıştır. *aroC* (R63) ve *aroI* (R75)

ekspresyonları Periyod II'den Periyod III'e 1.3- kat artarken, *aroF* (R61), *aroB* (R65), *aroA* (R71), *aroD* (R73), *pabA* (R58), *aroH* (R60), *hisC* (R97, R78) ekspresyonları 1.3- 2.9- kat azalmıştır (EK 16 Çizelge 8). *trpD* (R58, R59), *trpE* (R58), *trpF* (R69), *trpC* (R66), *trpA* (R76), *trpB* (R76), *pheA* (R60, R68), *ilvE* (R97), *tyrA* (R67), ve *yqhS* (R63) ekspresyonlarının değişmediği kabul edilmiştir. R69'u katalizleyen N-(5'-fosforibozil)antranilat izomerazı (EC. 5.3.1.24) kodlayan *trpF* ve R66'yı katalizleyen indol-3-gliserol fosfat sentazı (EC. 4.1.1.48) kodlayan *trpC* en düşük ekspresyona, R60'ı katalizleyen korizmat mutazı (EC. 5.4.99.5) kodlayan *aroH* PII ve PIII'te en yüksek ekspresyona sahip genlerdir. PII'den PIII'e geçişin en büyük etkisi *aroF* (R61) ekspresyonunun 2.9- kat azalmasıdır, bununla birlikte R61'in akı değeri 3.2- kat azalmıştır (EK 15 Çizelge 8, 16.8).

aroC ve *yqhS* genleri tarafından kodlanan 3-dehidrokinat dehidrataz izoenzimleri (EC. 4.2.1.10) tarafından katalizlenen R63'ün akı değeri PII'den PIII'e 3.2- kat artmıştır, *aroC* (R63) ekspresyonu 1.3- kat artarken, *yqhS* (R63) ekspresyonunun değişmediği kabul edilmiştir (EK 16 Çizelge 8). Dolayısıyla R63 için baskın gen *aroC* (R63) olmalıdır. Antranilat sentaz (EC. 4.1.3.27) tarafından katalizlenen R58'in akı değeri PII'den PIII'e 2.0- kat artarken, antranilat sentaz alt birim II'yi kodlayan *pabA* (R58) ekspresyonu 1.4- kat azalmıştır. Antranilat fosforiboziltransferazı kodlayan *trpD* (R58, R59) ve antranilat sentaz alt birim I'i kodlayan *trpE* (R58) ekspresyonları değişmemiştir. TRAP regulonunun üyesi olan *trp* operonu *trpEDCFBA* (<http://subtiwiki.uni-goettingen.de> 2009) Chor'u TrpL'ye dönüştüren ardışık tepkimelerin enzimlerini kodlar. Bununla birlikte, *trp* operonunun gen ekspresyonları değişmemiştir (EK 16 Çizelge 8). *aroH* (R60) ekspresyonu PII'den PIII'e 2.3- kat azalıp *pheA* (R60, R68) ekspresyonu değişmezken, R60'ın akı değeri 3.3- kat artmıştır. R68'in akı değeri 3.1- kat artmıştır. *ilvE* (R97) ekspresyonu kazamino asitlerle baskılanmıştır (Mäder vd. 2002), değişmediği halde *hisC* (R97, R78) ekspresyonu 2.0- kat azalmıştır. *ilvE* ve *hisC* tarafından kodlanan fenilalanin transaminaz izoenzimlerinin (EC.2.6.1.57) katalizlediği R97'nin akısı PII'den PIII'e 3.1- kat artmıştır. Prefenat dehidrojenazı (EC. 1.3.1.12) kodlayan *tyrA* (R67) ekspresyonu Periyod II'den III'e değişmese de, R67 akı değeri 3.5- kat artmıştır (EK 15 Çizelge 8, 16.8).

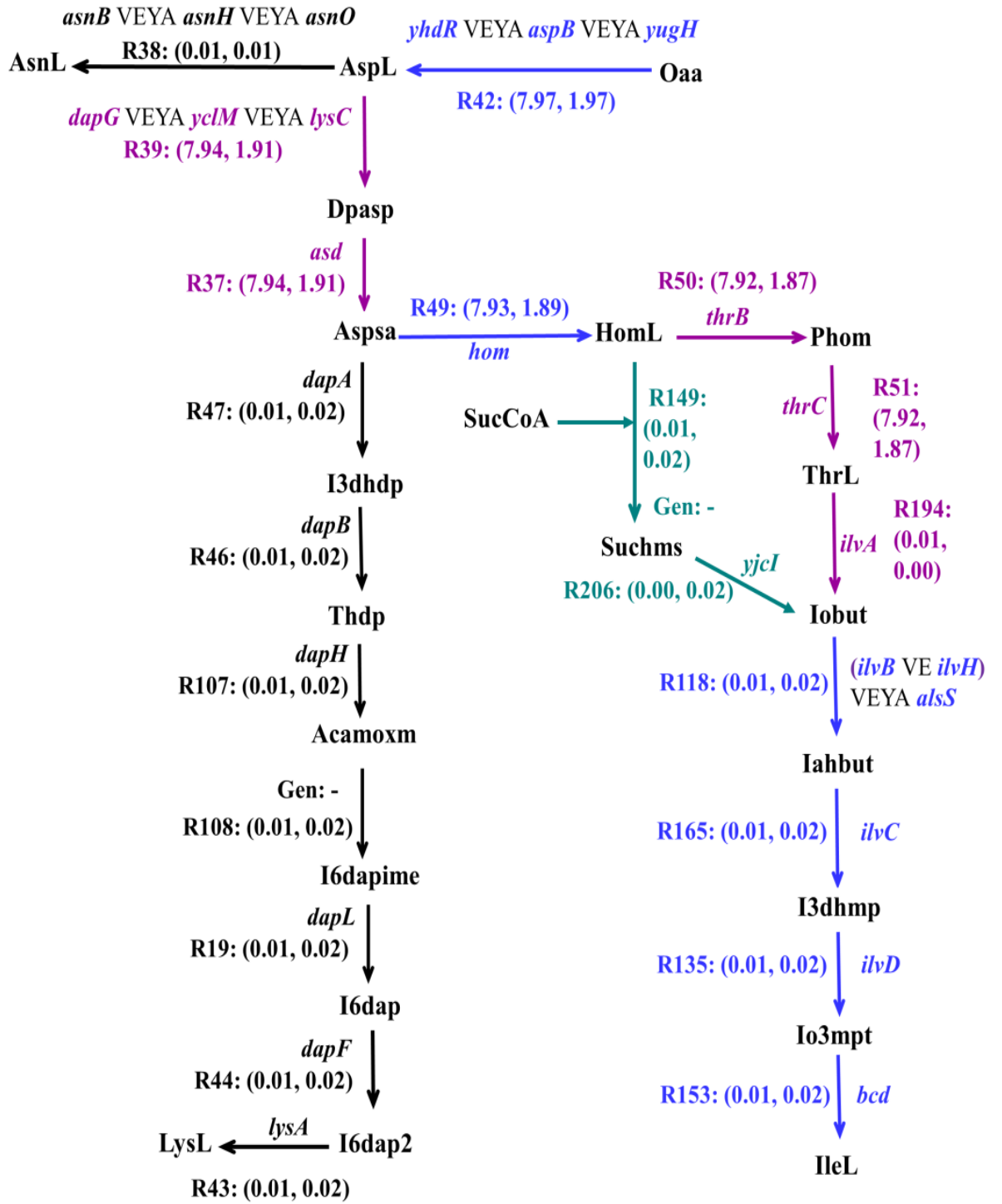


Şekil 4.38 rhGH üretiminin MOT koşulunda, sırasıyla, Periyod II ve Periyod III'te iBsu1144-rhGH ile hesaplanan aromatik amino asit yolizi tepkime hızları (mmol/(g_{KH} st)) ve genleri

4.2.5.8 Aspartik asit grubu amino asitlerin yolizi

Aspartik asit yolizi gen ekspresyonlarının PII'den PIII'e geçişe olan cevapları üç farklı grupta değerlendirilebilir: **i)** *alsS* (R118) ekspresyonu 2.0- kat artmıştır; **ii)** *dapG* (R39), *yclM* (R39), *lysC* (R39), *yhdR* (R42), *yugH* (R42), *asd* (R37), *dapA* (R47), *dapB* (R46), *dapH* (R107), *thrB* (R50), *thrC* (R51), *ilvA* (R194), *ilvC* (R165), *ilvB* (R118), *ilvH* (R118), *ilvD* (R135), ve *hom* (R49) ekspresyonları 1.4-6.3- kat azalmıştır; **iii)** *asnB* (R38), *asnH* (R38), *asnO* (R38), *aspB* (R42), *lysA* (R43), *dapL* (R19), *dapF* (R44), ve *bcd* (R153) ekspresyonları değişmemiştir (EK 16 Çizelge 9). R38'i katalizleyen

asparajin sentazı (EC. 6.3.5.4) kodlayan *asnO* PII ve PIII'te en düşük ekspresyona sahiptir. Bununla birlikte, R50'yi katalizleyen homoserin kinazı (EC. 2.7.1.39) kodlayan *thrB* ve R46'yı katalizleyen dihidrodipikolinat redüktazı (EC. 1.3.1.26) kodlayan *dapB* sırasıyla PII ve PIII'te en yüksek ekspresyona sahip genlerdir. PII'den PIII'e geçişin en büyük etkisi *hom* (R49) ekspresyonunun 6.3- kat azalmasıdır, bu nedenle R49'un akı değeri 4.2- kat azalmıştır (EK 15 Çizelge 9, 16.9). R42'yi katalizleyen aspartat aminotransferaz izoenzimlerini (EC. 2.6.1.1) kodlayan *aspB* (R42), *yhdR* (R42), ve *yugH* (R42) genlerinden sadece *yhdR* (R42) ve *yugH* (R42) genlerinin ekspresyonları Periyod II'den III'e sırasıyla 1.4- ve 1.5- kat azalmıştır. R42'nin akı değeri PII'den PIII'e 4.1- kat azaldığı için, *yhdR* (R42) ve *yugH* (R42) R42 için baskın gen olmalıdırlar. R38'i katalizleyen asparajin sentaz izoenzimlerini (EC. 6.3.5.4) kodlayan *asnB* (R38), *asnH* (R38), ve *asnO* (R38) ekspresyonları değişmediği için, R38'in akı değeri değişmemiştir. R39'u katalizleyen aspartokinaz izoenzimlerini (EC.2.7.2.4) kodlayan *dapG* (R39), *yclM* (R39), ve *lysC* (R39) gen ekspresyonları PII'den PIII'e sırasıyla 1.7-, 1.4-, ve 1.9- kat azalmıştır; dolayısıyla R39 akı değeri 4.2- kat azalmıştır. Aspsa'yı Lys'e dönüştüren tepkimeler incelendiğinde *dapA* (R47), *dapB* (R46), *dapH* (R107), *dapL* (R19), *dapF* (R44), ve *lysA* (R43) gen ekspresyonları değişmediği halde, tepkime hızları PII'den PIII'e 1.8-2.1- kat artmıştır. HomL dallanma noktasından R149, R206, R118, R165, R135, ve R153 nolu tepkimelerle izolözin oluşumuna yönelik akılar PII'den PIII'e en az 2.0- kat artarken; R194'ün Periyod III'teki akı değeri sıfırdır ve Iobut HomL'den R149 ile R206 nolu tepkimeler aracılığıyla oluşmuştur (EK 15 Çizelge 9, Şekil 4.39). *ilvB* (R118), *ilvH* (R118), ve *alsS* (R118) tarafından kodlanan alfa-asetolaktat sentazın (EC. 2.2.1.6) katalizlediği R118'in akı değeri PII'den PIII'e 2.0- kat artmıştır. *ilvB* (R118) ve *ilvH* (R118) ekspresyonları PII'den PIII'e sırasıyla 3.4- ve 3.7- kat azalırken, *alsS* (R118) ekspresyonu 2.0- kat artmıştır. Dolayısıyla R118 için baskın gen *alsS* (R118) olmalıdır. *ilv-leu* operon genlerinin (*ilvB-ilvH-ilvC-leuA-leuB-leuC-leuD*) ekspresyonları glukozla arttığından (Ludwig vd. 2002), *ilvB* ve *ilvH* ekspresyonları glukoz tüketim hızının büyük olduğu PII'de daha yüksektir (EK 16 Çizelge 9). Iahbut'dan IleL oluşumunu sağlayan tepkimeler ve genleri *ilvC* (R165), *ilvD* (R135), ve *bcd* (R153) için gen ekspresyonları ve akıların değişimleri benzer değildir: Gen ekspresyonları artmadığı halde, tepkime hızları PII'den PIII'e 2.0- kat artmıştır (EK 15 Çizelge 9, EK 16 Çizelge 9, Şekil 4.39).

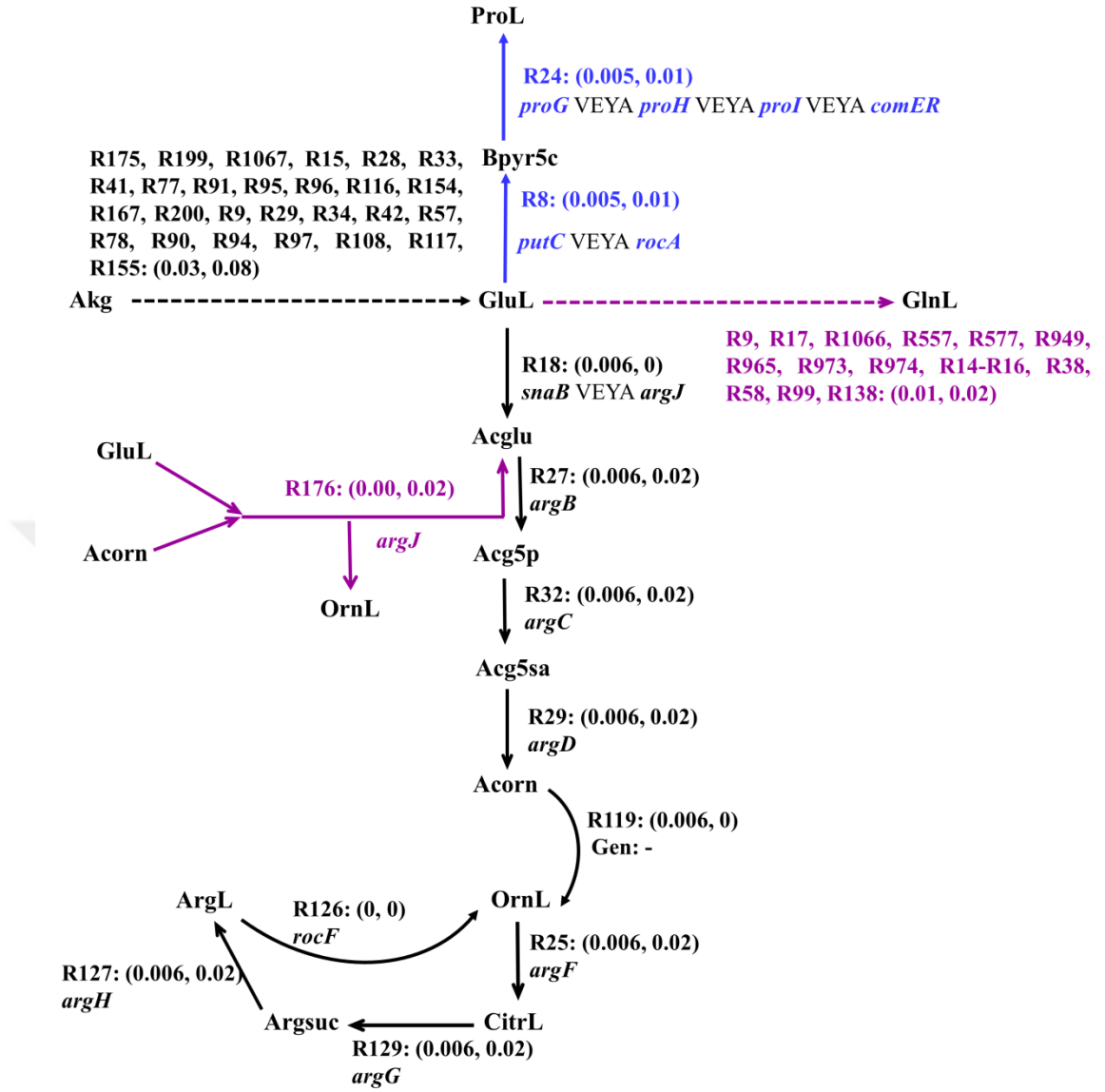


Şekil 4.39 rhGH üretiminin MOT koşulunda, sırasıyla, Periyod II ve Periyod III'te iBsu1144-rhGH ile hesaplanan aspartik asit grubu amino asit yolizi tepkime hızları (mmol/(g_{KH} st)) ve genleri (R108 ve R149'un genleri bilinmemektedir)

4.2.5.9 Glutamik asit grubu amino asitlerin yolizi

Glutamik asit grubu amino asitlerin yolizi akıları R18, R19, ve R126 nolu tepkimelerin hızları dışında PII'den PIII'e 2.8- kat artmıştır (EK 15 Çizelge 10, Şekil 4.40). *comER* (R24) ekspresyonu PII'den PIII'e 1.4- kat artmıştır; *ycgN* (R8), *argD* (R29), *argF* (R25), *argB* (R27), *argG* (R129), *argH* (R127), ve *argJ* (R176, R18) ekspresyonları 2.4-4.8- kat azalmıştır; *rocA* (R8), *proG* (R24), *proH* (R24), *proI* (R24), *argC* (R32), ve *rocF* (R126) ekspresyonları değişmemiştir. Pirolin-5-karboksilat redüktazı (EC. 1.5.1.2) kodlayan *proH* (R24) PII ve PIII'te en düşük ekspresyona sahiptir; fakat arjininosuksinat sentazı (EC.6.3.4.5) kodlayan *argG* (R129) ve ornitin karbamoyltransferazı (EC.2.1.3.3) kodlayan *argF* (R25) sırasıyla PII ve PIII'te en yüksek ekspresyona sahip genlerdir. PII'den PIII'e geçişin en büyük etkisi *argG* (R129) ekspresyonunun 4.8- kat azalmasıdır; fakat *argG* tarafından kodlanan arjininosüksinat sentazın (EC. 6.3.4.5) katalizlediği R129'un akı değeri 3.2- kat artmıştır (EK 15 Çizelge 10, EK 16 Çizelge 10, Şekil 4.40).

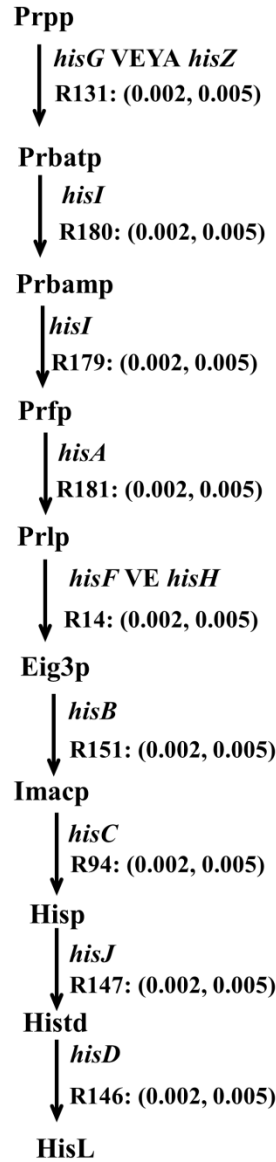
1-pirolin-5-karboksilat dehidrojenaz izoenzimlerini (EC.1.2.1.88) kodlayan *putC* (R8) ve *rocA* (R8) genlerinden sadece *putC* (R8) geninin ekspresyonu PII'den PIII'e azalmıştır. R8 akı değeri PII'den PIII'e 2.8- kat arttığından, R8 için baskın gen yoktur. *rocA* (R8) ekspresyonu arjinin (Calogero vd. 1994) ve amino asitler (Molle vd. 2003) varlığında artıp CodY (Molle vd. 2003) varlığında azaldığı için, PII'den PIII'e geçişte amino asit sentez tepkimelerinde darboğaz olabilir. Ayrıca R24'ü katalizleyen pirolin-5-karboksilat redüktaz izoenzimlerini (EC.1.5.1.2) kodlayan *comER* (R24), *proI* (R24), *proG* (R24), ve *proH* (R24) genlerinden sadece *comER* (R24) gen ekspresyonu PII'den PIII'e geçişte artmıştır. R24 akı değeri PII'den PIII'e geçişte 2.8- kat arttığı için, R24 için baskın gen *comER* (R24) olmalıdır. *argJ* (R176, R18), *argB* (R27), *argD* (R29), *argF* (R25), *argG* (R129), *argH* (R127) ekspresyonları PII'den PIII'e geçişte 2.8-4.8- kat azalmıştır ve *argC* (R32) ekspresyonu değişmemiştir. Bu genlerle ilgili tepkimelerin hızları ise R18 dışında 3.2- kat artmıştır. L-arjinin PIII'te hücre dışına salgılandığı için, L-arjinin üretimi darboğaz olamaz. Bununla birlikte *argD* (R29), *argC* (R32), *argF* (R25), *argB* (R27), *argG* (R129), *argH* (R127), ve *argJ* (R176, R18) genlerinin ekspresyonları kazamino asitler varlığında azalmıştır (Mäder vd. 2002).



Şekil 4.40 rhGH üretiminin MOT koşulunda, sırasıyla, Periyod II ve Periyod III'te *iBsu1144-rhGH* ile hesaplanan glutamik asit grubu amino asit yolizi tepkime hızları (mmol/(g_{KH} st)) ve genleri. R1067, R33, R34, R108, ve R119 için genler bilinmemektedir

4.2.5.10 Histidin sentezi yolizi

Histidin sentezi yolizi gen ekspresyonlarının %80'i PII'den PIII'e 1.7-3.0- kat arttırdığı için, akıları 2.5- kat artmıştır (Şekil 4.41, EK 15 Çizelge 11, EK 16 Çizelge 11). *hisC* (R94) ekspresyonu PII'den PIII'e yüksek RNaz Y derişimi nedeniyle



Şekil 4.41 rhGH üretiminin MOT koşulunda, sırasıyla, Periyod II ve Periyod III'te iBsu1144-rhGH ile hesaplanan histidin sentezi tepkime hızları (mmol/(g_{KH} st)) ve genleri

(<http://subtiwiki.uni-goettingen.de> 2009) 2.0- kat azalsa da, R94'ün akı değeri 2.5- kat artmıştır. Ayrıca, *hisJ* (R147) ekspresyonu değişmemiştir. 1-(5-fosforibozil)-5-[(5-fosforibozilamino) metilideneamino] imidazol - 4 - karboksamid izomerazı (EC. 5.3.1.16) kodlayan *hisA* (R181) en yüksek; histidinol fosfat fosfatazı (EC. 3.1.3.15) kodlayan *hisJ* (R147) ve histidinol-fosfat aminotransferazı (EC. 2.6.1.9) kodlayan *hisC* (R94) en düşük ekspresyona sahip genlerdir (EK 16 Çizelge 11). PII'den PIII'e geçişin en büyük etkisi *hisH* (R14) gen ekspresyonunun 3.0- kat artmasıdır. Gen

ekspresyonlarının zamanla artmaları hücrenin amino asit ihtiyacını gösterir; çünkü *hisI* (R179 and R180), *hisF* (R14), *hisA* (R181), *hisH* (R14), *hisB* (R151), ve *hisD* (R146) gen ekspresyonları kazamino asitler varlığında azalmıştır (Mader vd. 2002).

4.2.6 Transkriptom verilerinin BsRN-2016 ve iBsu1144-rhGH sonuçlarına dayalı ANOVA analizleri

İnsan büyüme hormonu geni taşıyan rekombinant *B.subtilis* 1A751'in (Özdamar vd. 2009) MOT koşulundaki gen ekspresyonlarının kalma süresiyle değişimleri %99.5'den yüksek ($p<0.005$) ve %95.0'den yüksek ($p<0.05$) güvenilirlik kriterlerinin kullanıldığı tek yönlü varyans analiziyle (ANOVA) GeneSpring GX yazılımında incelenmiştir (<http://genespring-support.com> 1999). Hiçbir gen ekspresyonu kalma süresiyle %99.5'den yüksek ($p<0.005$) güvenilirlik kriteriyle değişmemiştir. 37 prob seti ya da gen birimi ise kalma süresinden %95.0'den yüksek ($p<0.05$) güvenilirlik kriteriyle etkilenebilir, EK 17 Çizelge 1'de sunulmuştur. *lctE* (R803, R804, R817, R818), *lctP*, *ytsJ* (R292), *gap* (R282), *cydD*, *cydB*, ve *cydA* ekspresyonları kalma süresiyle, yani $t=0$ st'den $t=16$ st'e azalmıştır (EK 17 Çizelge 1). *wprA*, *appA*, *ykrY* (R7), *ykrZ* (R1, R2), *ylqB*, *citB* (R364, R365, R368, R369), *leuC* (R157-R160), *ilvB* (R55, R118), *bioF* (R579), *yvaY*, *yxjG*, *wapA*, *yxbB*, *yxbA*, *yxaM*, ve *ydyF* ekspresyonları $t=12$ st için en yüksektir (EK 17 Çizelge 1). *narI* (R806), *narJ*, ve *narG* (R806) ekspresyonları kalma süresiyle azalmıştır, fakat en küçük değerleri $t=12$ st'dedir (EK 17 Çizelge 1). 37 prob setiyle ilişkili proteinler, enzimler, ve tepkimeler EK 17 Çizelge 2'de verilmiştir; 29 BsRN-2016 tepkimesiyle ilişkilidir (EK 17 Çizelge 2). 10 prob seti 8 BsRN-2016 tepkimesiyle bağlantılı, fakat iBsu1144-rhGH'de yoktur (EK 17 Çizelge 3). 20 prob seti tepkimeleri keşfedilmediği için BsRN-2016 ile bağlantısızdır (EK 17 Çizelge 4). 15 prob seti 21 iBsu1144-rhGH tepkimesiyle ilişkilidir (EK 17 Çizelge 5).

5. SONUÇLAR

5.1 *B. subtilis* Genom-Seviye Model iBsu1144

Kunst vd.(1997)'nin genom analizine dayanan birinci-nesil *B.subtilis* genom seviye modelleri (GEM) (Oh vd. 2007, Goelzer vd. 2008, Henry vd. 2009) ile Barbe vd. (2009)'nin genom analizine dayalı ikinci-nesil *B.subtilis* GEM'lerinin (Tanaka vd. 2013, Hao vd. 2013) ardından, doktora çalışmasında *B. subtilis*'in yenilenmiş genom dizinine (Belda vd. 2013) dayanan gen-enzim-tepkime bilgileriyle 1144 genle bağlantılı 1955 tepkime ve 1103 metabolit içeren *B.subtilis* tepkime sistemi BsRN-2016 ve üçüncü-nesil ilk *B.subtilis* genom seviye modeli (GEM) iBsu1144 kurulmuştur. 719 genle bağlantılı 1083 tepkime ve 743 metabolit içeren iBsu1144 tepkime sistemi literatürdeki *B.subtilis* GEM'lerinin tepkimeleriyle karşılaştırılmıştır. Belda vd. (2013)'nin güncel gen dizinlemesi ve oluşan gen-enzim-tepkime bilgisi sonucu, iBsu1144'teki 200 tepkime yenidir ve ilk kez kullanılmıştır. *B.subtilis* hücre bileşenlerini oluşturan tepkimeler ve hücre sentez tepkimesi Oh vd. (2007) ile aynıdır. iBsu1144'teki 1083 tepkimeden, 844'ü Oh vd. (2007), 660'ı Henry vd. (2009), 655'i Tanaka vd. (2013), ve 663'ü Hao vd. (2013)'de de vardır. iBsu1144'teki 616 tepkime Oh vd. (2007), Henry vd. (2009), Tanaka vd. (2013), ve Hao vd. (2013)'de vardır. iBsu1144'ün doğruluğu yaşam için gerekli genlerin (*essential genes*) tahmin edilmesine dayanılarak hesaplanmıştır: Glukoz tüketim hızının 5 mmol/(g_{KH} st) varsayılması ve hücre sentez hızının maksimize edilmesiyle iBsu1144'ün doğruluğu %78 bulunmuştur. Literatürdeki *B.subtilis* GEM'lerinin (Oh vd. 2007, Henry vd. 2009, Tanaka vd. 2013, Hao vd. 2013) oluşturulması ve doğrulanmasında en çok kullanılan strateji çoğalmanın maksimizasyonudur, ancak *B.subtilis*'in çoğalmayı maksimize etmediği deneysel olarak gösterilmiştir (Fischer ve Sauer 2005). Ayrıca, yaşam için gerekli genlerin bazılarının silindiği durumlarda *B.subtilis*'in yaşamaya devam ettiği gösterildiği için (Michna vd. 2014), önceki *B.subtilis* GEM'lerinin doğruluklarının hesaplanmasında kullanılan "gerekli gen" verilerinin güvenilirlikleri ve kullanılan amaç fonksyonu şüphelidir. Dolayısıyla *B.subtilis* GEM'lerinin doğrulanma süreçleri fermentasyon verilerinin yanı sıra hücreiçi/hücre dışı proteom verileri, transkriptom verileri, ve deneysel olarak belirlenen hücreiçi (normalize) akıların kullanılmasıyla, deneysel ve tahmin edilen akı

değerleri arasındaki farkın minimizasyonunun amaç fonksiyonu olarak kullanılmasına yönelik olmalıdır.

iBsu1144, önce, oksijen aktarımının serin alkali proteaz (SAP) fermentasyonuna etkilerini araştırmak, hücreiçi tepkime akılarının değişimini analiz etmek için kullanılmıştır. Hücreiçi reaksiyon ağında iyi tanımlanmış perturbasyonlar oluşturmak için düşük- (LOT), orta- (MOT), ve yüksek- (HOT) oksijen-aktarım koşullarında (Çalık vd. 2000) SAP fermentasyonunun üçüncü periyodu ($20 < t < 28$ st) için sitrat, hücre, SAP, aminoasit-, ve organik asit- derişimlerinin kalma süresi ile değişimleri kullanılarak (Çalık vd. 1998, Çalık vd. 1999) *iBsu1144*'ün çözümü yapılmış, hücreiçi tepkime hızları/akılar hesaplanmıştır. Sitrat tüketim hızı ve TCA döngüsü tepkime hızları oksijen aktarım hızıyla artmıştır. Toplam ATP üretim hızı da oksijen aktarımıyla artmıştır. Altı anaplerotik tepkime içeren piruvat nodu tepkime akıları ve bağlantılı olarak amino asit yolizlerine yönelen metabolik akılar oksijen aktarımından etkilenmiştir. Glikoneogenesis yolizi akıları genel olarak en yüksek değerlerini MOT'ta almıştır. Ru5pD sentezi LOT ve MOT'ta F6P dallanma noktası üzerinden gerçekleşmiştir. PFY akılarının oksijen aktarımıyla değişiminde genel bir davranış yoktur. SAP sentezi (R1056) ve hücre çoğalma (R1057) hızları LOT, MOT, ve HOT'ta, sırasıyla, 0.50, 0.41, 0.10 $\mu\text{mol}/(\text{g}_{\text{KH}} \text{ st})$ ve 0.095, 0.068, 0.045 st^{-1} bulunmuştur.

Metabolik akı analizi biyokimyasal reaksiyon mühendisliğinin hücreiçi tepkime hızlarının hesaplanması ve analizinde kullanılan özgün aracı olduğu için (Çalık ve Özdamar 2002, Özdamar vd. 2010), sonuçların güvenilirliği hücreiçi tepkime ağındaki reaksiyonların doğruluğuna, bağlantılı olarak yolizlerinin ve döngülerin doğru oluşturulmasına, ve bütünlüğüne bağlıdır. Bu düşüncenin doğruluğunu sınamak amacıyla SAP üretimi için *iBsu1144* ile hesaplanan tepkime hızları aynı biyoreaktör verileri ve amaç fonksiyonu kullanılarak **i)** LOT, MOT, ve HOT koşulları için 133 tepkime ve 102 metabolitten oluşan BsBRM-1999 (Çalık vd.1999), **ii)** MOT için ikinci- nesil *iBsu1103V2* (Tanaka vd. 2013)'nin 2302 tepkime ve 1138 metabolitten oluşan modifiye edilmiş GEM'i *iBsu1103V2-SAP* ile hesaplanan tepkime hızlarıyla karşılaştırılmıştır. İlk aşamada, SAP üretiminin üçüncü periyodunda LOT, MOT, ve HOT koşullarının fermentasyon verileri (Çalık vd. 1998, Çalık vd. 1999) kullanılarak

1083 tepkime ve 743 metabolit içeren *iBsu1144* ile 133 tepkime ve 102 metabolitten oluşan *BsBRM-1999* (Çalık vd.1999)'un çözümleriyle hesaplanan hücreiçi tepkime hızları, her iki modelin akı dağılımlarını tahmin edebilme güçleri kıyaslanmıştır. *BsBRM-1999* ile LOT, MOT, ve HOT'ta hesaplanan, akı değeri pozitif olan tepkime sayıları 99 (%74), 102 (%77), ve 100 (%75)'dür; akı değeri pozitif olan tepkimelerin toplam tepkimelere oranı parantez içinde verilmiştir. *iBsu1144* ile LOT, MOT, ve HOT'ta hesaplanan hücre ve SAP sentezi için akı değeri pozitif olan tepkime sayıları 321 (%30), 316 (%29), ve 324 (%30)'tür. *iBsu1144* ve *BsBRM-1999* (Çalık vd.1999)'un ortak 85 tepkimesinin akıları incelendiğinde LOT, MOT, ve HOT'ta “aynı veya yakın” ($r_{BRM}/r_{GSM} \leq 1.2$) akı değerine sahip olan tepkime sayısı, sırasıyla, 55, 30, ve 38'dir; akıları birbirine “daha az yakın” ($1.2 < r_{BRM}/r_{GSM} \leq 2.0$) olan tepkime sayısı 13, 16, ve 15'tir; akıları “ıraksak” ($r_{BRM}/r_{GSM} > 2.0$) olan tepkime sayısı 17, 39, ve 32'dir. *BsBRM-1999* ile “ıraksak” akı değerlerine sahip tepkime sayısının en çok MOT, sonra HOT'ta olduğu bulunmuştur. Her iki model için aktif tepkime sayıları oksijen aktarım koşullarıyla değişmektedir; TCA döngüsü, glikoneogenesis, pentoz fosfat yolizi, ve amino asit sentez yolizleri aktiftir; ayrıca, aspartik asitten asparajini sentezleyen asparajin sentetaz (EC.6.3.5.4) ve aspartokinaz (EC. 2.7.2.4) enzimleri (Çalık vd. 1999) metabolik mühendislik hedef noktası olarak saptanmıştır. Sonuçlar *iBsu1144* ve *BsBRM-1999* (Çalık vd. 1999)'daki aktif ana yolizlerinin ve belirlenen hız kısıtlayıcı tepkimelerin aynı olduğunu, *BsBRM-1999* (Çalık vd.1999)'da bağlantısızlıklarının olmadığını, gen-enzim-tepkime ilişkileri ve gen işlevlerinin önemli ölçüde belirlenmediği durumda oluşturulan *BsBRM-1999* (Çalık vd.1999)'un doğru tepkimelerle oluşturulduğunu, reaksiyon mühendisliği açısından bütünlüğünün gelişmiş olduğu, akı analizi için güvenilir bilgi verdiğini; fakat *iBsu1144*'ün gen-enzim-tepkime bilgisiyle, daha çok tepkimeyle doğruya daha yakın ve çok sayıda tepkime için sonuç vermektedir. İkinci aşamada, üçüncü- nesil *iBsu1144* ikinci- nesil GEM *iBsu1103V2* (Tanaka vd. 2013) ile karşılaştırılmıştır: *iBsu1103V2* SAP üretimi için modifiye edilerek *iBsu1103V2-SAP* oluşturulmuştur: (i) her bir tersinir tepkimenin ileri ve geri yöndeki tepkimeleri biyokimyasal reaksiyon ağına yerleştirilmiştir, ve (ii) SAP sentez tepkimesi (Çalık vd. 1999) hücreiçi tepkime sistemine eklenmiştir; böylece 2302 tepkime ve 1138 metabolitten oluşan *iBsu1103V2-SAP* tepkime sistemi oluşturulmuştur. Ardından, *iBsu1103V2-SAP* için matematik model oluşturulmuştur.

SAP üretiminin MOT koşulu için üçüncü- nesil iBsu1144 ve ikinci- nesil iBsu1103V2-SAP ile hesaplanan merkezi karbon yolizi akılarının karşılaştırmalı analizi, iBsu1144'ün güncel genom dizinine (Belda vd. 2013) dayalı gen-enzim-tepkime verileriyle oluşturulmasına dayalı olarak bağlantısız tepkimeler içermemesi nedeniyle doğru sonuçlar ürettiğini göstermiştir.

Akı analizlerinde gen-enzim-tepkime bilgisi içeren genom seviye modellerin kullanılmasıyla, rekombinant protein üretimlerinin artırılmasına yönelik metabolik mühendislik tasarımları, gen silme ve konak hücre oluşturma çalışmaları artmıştır. Bu kapsamda iBsu1144 ve güncel gen-enzim-tepkime bilgisiyle, oksijen aktarım koşullarının *B.subtilis* tepkime hızlarına perturbatif etkisiyle elde edilen akı analizi sonuçları değerlendirilerek, enzim üretimini artırma hedefine yönelik alternatif metabolik mühendislik konumları belirlenmiştir, akı değişkenliği analiziyle hücreden silinmesi ya da hücrede kalması gereken genlerin saptanmasıyla konak hücre oluşturma çalışmalarına temel oluşturulmuştur. Akı analizi L-asparajinin tüm oksijen aktarım koşullarındaki birincil-darboğaz amino asit olduğunu ve L-asparajinle zenginleştirilmiş üretim ortamı tasarımının gerekliliğini göstermiştir. Aspartik asit grubu amino asitler içinde en düşük hıza sahip olan reaksiyon aspartik asitten asparajini sentezleyen R38'dir. Dolayısıyla R38 düşük asparajin sentetaz (EC.6.3.5.4) aktivitesi nedeniyle aspartik asit grubu amino asit yolizindeki birincil darboğaz tepkime olarak bulunmuştur. *B.subtilis*'te SAP üretimini artırmak için asparajin sentetazı (EC.6.3.5.4) kodlayan *asnB*, *asnH*, *asnO* genleri ile aspartokinazı (EC. 2.7.2.4) kodlayan *dapG*, *yclM*, *lysC* genlerine odaklı metabolik mühendislik tasarımının gerekli olduğu saptanmıştır. Ayrıca R194 yolizindeki ikinci darboğaz nokta olarak belirlenmiştir. R194'ü katalizleyen treonin dehidratazı (EC. 4.3.1.19) kodlayan *ilvA* geniyle metabolik mühendislik tasarımı yapılması gerektiği bulunmuştur. SAP üretiminde en uygun oksijen aktarım koşulu MOT için Periyod III'te aktif ve kapalı tepkimeler akı değişkenliği analizi ile belirlenmiştir. Akı değişkenliği analizi 317 genle bağlantılı 288 tepkimenin aktif ve 533 genle bağlantılı 735 tepkimenin kapalı olduğunu göstermiştir. Protein sentezini artırmak amacıyla akı değişkenliği analiziyle MOT'ta kapalı tepkimelerle ilişkili 482 gen silinmeye adaydır, aktif tepkimelerle ilişkili 317 gen overekspresyon edilebilir.

Reaksiyon mühendisliği prensiplerine dayanarak hücre içi tepkime hızlarının doğru hesaplanabilmesi için hücreye ait tüm genetik bilgiye yani gen-enzim-tepkime verisine sahip, güvenilir bir reaksiyon ağı için kurulan kütle-korunum denklemleri ile oluşturulan matematik modelin kullanılması gereklidir. Güncel gen-enzim-tepkime verisine dayanan, üçüncü nesil ilk *B.subtilis* GEM'i iBsu1144 ile doğru ve ayrıntılı sonuçlar elde edilmiştir, bu sonuçlar enzim üretimini artırmak hedefiyle metabolik mühendislik tasarımları ve gen silme ile konak hücre oluşturma çalışmalarında kullanılabilir. iBsu1144'ün gen-enzim-tepkime verileriyle *B.subtilis* biyokimyasal reaksiyon ağının genom, transkriptom, hücre içi ve hücre dışı proteom ve metabolom ölçümleri ile deneysel akı analizi ile birleştirilmesi bilimde yeni ufuklar açacaktır.

5.2 *B.subtilis* Tepkime Sisteminin Oksijen Aktarımına Cevabının Transkripsiyonel Seviyede Analizi

Oksijen aktarımının rekombinant insan büyüme hormonu (rhGH) üretiminde hücrenin temel yapı taşlarına, yani DNA, RNA, protein, ve metabolitler üzerine etkilerini kapsamlı bir şekilde incelemek amacıyla, *B.subtilis* reaksiyon ağının oksijen aktarımına cevabı transkripsiyonel seviyede transkriptom analizleri ve güncel gen-enzim-tepkime verilerine dayanan üçüncü nesil genom seviye model iBsu1144-rhGH ile hesaplanan hücre içi tepkime hızları ile ilk kez analiz edilmiştir. Oksijen aktarımının rhGH üreten rekombinant *B. subtilis* (Özdamar vd. 2009) genomu üzerindeki perturbatif etkilerini aydınlatma amacı fermentasyon verilerinin analizleri, tepkime sisteminin gen-enzim-tepkime boyutunda bütünsel incelenmesi, ve rhGH üretimini artırmaya yönelik metabolik mühendislik tasarımlarına temel olan bilgilerin oluşturulması için akı ve transkriptom analizleri birlikte yapılmıştır. Oluşturulan *B.subtilis* GEM'i iBsu1144-rhGH kullanılarak rhGH üretiminin yüksek hızla arttığı faz olan üçüncü periyot ($14 < t < 20$ st) için farklı oksijen aktarım koşullarında, düşük- (LOT), orta- (MOT), ve yüksek- (HOT) oksijen-aktarım koşullarında glukoz, hücre, rhGH, aminoasit- ve organik asit- derişimlerinin kalma süresi ile değişimleri kullanılarak LOT, MOT, ve HOT'ta $t=16$ st için oksijen aktarımının hücre içi reaksiyon ağına perturbatif etkisi incelenmiştir. Dolayısıyla literatürde *B.subtilis*'ten terapötik protein üretimi için ilk transkriptom analizi ve ilk transkriptom sonuçlarıyla kıyaslamalı akı analizi yapılmıştır.

rhGH üretiminde glikoliz yolizi gen ekspresyonlarının LOT'ta en düşük olması, glikoliz yolizi akıllarının oksijen aktarımına cevabıyla uyumludur, bu durum oksijen aktarımıyla enzim üretiminin ve akılların arttığını gösterir. *fbaA* ile *glcK*, sırasıyla, en yüksek ve en düşük ekspresyona sahip glikoliz yolizi genleridir. Oksijen aktarımının glikoliz yolizi genlerine en büyük etkisi *fbaA* gen ekspresyonunun LOT'tan MOT'a 11.5- kat artmasıdır. TCA döngüsü akıları glikoliz yolizi ve rhGH sentez akılarıyla uyumlu bir şekilde MOT'ta en yüksektir. TCA döngüsü gen ekspresyonları genel olarak LOT'tan MOT'a 1.5-10.1- kat, LOT'tan HOT'a 1.5-12.8- kat artmıştır. *citZ*, *odhB*, ve *citH* en yüksek; *citA* ve *citG* en düşük ekspresyona sahip TCA döngüsü genleridir. Oksijen aktarımının TCA döngüsü genlerine etkisi önemlidir, *odhB* ekspresyonu LOT'tan HOT'a 12.8- kat artmıştır. ATP üretimi LOT, MOT, ve HOT'ta, sırasıyla, 37.58, 112.06, ve 90.93 mmol/(g_{KH} st)'tir; MOT'ta en yüksektir. Pentoz fosfat yolizi (PFY) tepkime hızlarının oksijen aktarımıyla değişiminde belirli bir davranış yoktur. Hücre sentezi oksijen aktarımından önemli ölçüde etkilenmemiştir: hücre sentez hızı (R1056), PFY gen ekspresyonlarının oksijen aktarımından glikoliz yolizi ve TCA döngüsü kadar etkilenmemesi sonucunda, LOT, MOT, ve HOT için, sırasıyla, 0.006, 0.007, ve 0.006 st⁻¹ olarak hesaplanmıştır. Oksijen aktarımının PFY gen ekspresyonlarına en büyük etkisi *ywjH* ekspresyonunun LOT'tan MOT'a 2.2- kat artmasıdır. Alanin, aspartik, ve glutamik amino asit yolizi akıları genel olarak MOT'ta en yüksek değerlerini alarak rhGH sentez akısının MOT'ta en yüksek olmasını sağlamıştır. rhGH sentez hızı (R1055) LOT, MOT, ve HOT için, sırasıyla, 0.045, 2.00, ve 0.08 µmol/(g_{KH} st) olarak hesaplanmıştır. Oksijen aktarımının amino asit yolizlerindeki gen ekspresyonlarına en büyük etkileri serin grubu amino asit yolizinde *glyA* gen ekspresyonunun LOT'tan MOT'a 8.6- kat artması, alanin grubu amino asit yolizinde *leuC* gen ekspresyonunun LOT'tan MOT'a 4.6- kat artması, aromatik amino asit yolizinde *pheA* gen ekspresyonunun LOT'tan HOT'a 3.7- kat azalması, aspartik asit grubu amino asit yolizinde *dapB* gen ekspresyonunun LOT'tan MOT'a 7.3- kat azalması, glutamik asit grubu amino asit yolizinde *proI* gen ekspresyonunun LOT'tan MOT'a 2.7- kat azalması, ve histidin sentezinde *hisH* gen ekspresyonunun LOT'tan MOT'a 49.6- kat artmasıdır. rhGH bileşimindeki 20 amino asitten LOT'dan MOT'a geçişte 15 amino asitin sentez hızı en az 2.0- kat artarak rhGH üretimini 44.4- kat artırmıştır, LOT'dan HOT'a geçişte üç amino asitin sentez hızı en az 2.0- kat artarak (ProL, ThrL, ve Gly) rhGH üretimini

1.8- kat artırmıştır. 17 amino asitin toplam sentez hızı MOT'ta en yüksektir (EK 10 Çizelge 12); rhGH üretiminin oksijen aktarımıyla değişmesinin temel nedeni amino asit sentez tepkimelerinin enzimlerini kodlayan genlerin ekspresyonlarının ve amino asit yolizi tepkime hızlarının oksijen aktarımından etkilenmesidir. Birlikte akı ve transkriptom analizleri ile izoenzimler tarafından kodlanan tepkimeler için baskın genler bulunmuştur.

B.subtilis Affymetrix gen çipinde bulunan 5039 gen biriminden 50 birimin rhGH üretiminin üçüncü periyodunda oksijen aktarımından önemli ölçüde etkilendiği % 99.5'tan yüksek güvenilirlikle ($p<0.005$) gerçekleştirilen tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve ekspresyon oranının üçten büyük seçilmesiyle belirlenmiştir. Transkripsiyonları ve kodladıkları enzimlerin katalizledikleri tepkimelerin hızları oksijen aktarımından farklı şekilde etkilenen *yaaE*, *gdh*, *ydjL*, *yisZ*, *kbl*, *yloI*, *pksK*, ve *mmgD* genleri metabolik mühendislik konumları olarak belirlenmiştir.

Güncel gen-enzim-tepkime bilgisiyle oluşturulan *B.subtilis* GEM'i iBsu1144-rhGH kullanılarak hesaplanan hücreiçi akı dağılımları ile rhGH üretimini artırmaya ve konak hücre oluşturmaya yönelik metabolik mühendislik hedef konumları belirlenmiştir. Akı analizi L-sistein, L-tirozin, ve L-pirolinin tüm oksijen aktarım koşullarındaki birincil darboğaz amino asitler olduğunu göstermiştir. Bu sonuç darboğaz amino asitler, yani L-sistein, L-tirozin, ve L-pirolin, ile zenginleştirilmiş üretim ortamı tasarımı gerekliliğini gösterir. Ayrıca *ilvA* geni tarafından kodlanan treonin dehidrataz (EC. 4.3.1.19) ile katalizlenen R194 aspartik asit amino asit yolizinde Aspsa'yı Ile'e dönüştüren ardışık tepkime sistemindeki en düşük akıya sahip tepkimedir. *B.subtilis*'te rhGH üretimini artırmak için *ilvA* genine odaklı metabolik tasarım yapılmalıdır. Bununla birlikte, *snaB* ve *argJ* tarafından kodlanan amino-asit asetiltransferaz (EC.2.3.1.1) ile katalizlenen R18 glutamik amino asit yolizinde GluL'ı ArgL'e dönüştüren ardışık tepkime sistemindeki en düşük akıya sahip tepkimedir. Glutamik amino asit yolizindeki R18 nolu tepkime ikinci hız kısıtlayıcı reaksiyon olarak belirlenmiştir. Dolayısıyla, *B.subtilis*'te rhGH üretimini artırmak için *snaB* ve *argJ* genlerine odaklı metabolik tasarımlar yapılmalıdır. rhGH üretimi için tasarlanan ve oluşturulan pMK4::pre(subC)::hGH ekspresyon sistemi (Özdamar vd. 2009) *B.licheniformis*'in alkali proteazına ait başlatıcı ve sinyal peptit dizinleri aracılığıyla SAP sentezini taklit

etmektedir. Dolayısıyla *B.subtilis*'te serin alkali proteazı kodlayan *aprE* genini kontrol eden genler analizlenmiştir. *scoC* ve *degU* MOT'ta en yüksek ekspresyona sahip regülasyon genleri olduğu için, *scoC* ve *degU* genleri rhGH sentezi için metabolik mühendislik konumları olarak seçilmiştir.

rhGH üretiminde en uygun oksijen aktarım koşulu MOT için aktif ve kapalı tepkimeler akı değişkenliği analizi ile belirlenmiştir. Akı değişkenliği analizi 346 genle bağlantılı 305 tepkimenin aktif ve 536 genle bağlantılı 730 tepkimenin kapalı olduğunu göstermiştir. MOT'ta rhGH sentezini artırmak amacıyla, akı değişkenliği analiziyle bulunan, kapalı tepkimelerle ilişkili 485 gen silinmeye aday olarak değerlendirilirken, aktif tepkimelerle ilişkili 346 gen overekspresyon edilmelidir. MOT koşulunda rhGH üretimi için üçüncü- nesil GEM *iBsu1144-rhGH*'nin, Oh vd. (2007)'nin birinci- nesil GEM'inden modifiye edilmiş *iBsu844-rhGH* ve daha sonra, Tanaka vd. (2013)'nin ikinci- nesil GEM'inden modifiye edilmiş *iBsu1103V2-rhGH* ile karşılaştırmalı analizleri, oluşturulan gen-enzim-tepkime verileriyle birlikte *iBsu1144-rhGH*'nin, bağlantısız tepkimeler içermemesi ve doğru tepkimelerle doğru sonuçlar ürettiği transkriptom verileriyle desteklenerek gösterilmiştir.

Son olarak, rhGH üretiminin MOT koşulunda proteaz inhibitörünün üretim ortamına eklenmesiyle çoğalmanın durduğu ve rhGH'nin üretim ortamına salgılanmaya başladığı faz olan Periyod II'den ($8 < t < 14$ st), rhGH üretiminin yüksek hızla arttığı erken durgunluk fazı olan Periyod III'e ($14 < t < 20$ st) geçiş sürecinin gen ekspresyonları ve tepkime hızlarına etkileri de birlikte incelenerek merkezi karbon yolları analizlenmiştir. Bu çerçevede, *hGH* geni taşıyan rekombinant *B.subtilis*'in (Özdamar vd. 2009) MOT'taki gen ekspresyonlarının kalma süresiyle değişimleri %99.5'ten yüksek ($p < 0.005$) güvenilirlik kriterlerinin kullanıldığı tek yönlü varyans analiziyle incelenmiştir. Hiçbir gen ekspresyonu kalma süresiyle %99.5'ten yüksek ($p < 0.005$) güvenilirlik kriteriyle değişmemiştir. Bu önemli bulgudur; yani, kalma süresi etkisiyle ekspresyonu önemli ölçüde değişen gen olmadığı için bulunmuş olan metabolik mühendislik hedef konumlarında değişim yoktur; yani Periyot III için bulunan metabolik mühendislik hedef konumları geneldir ve doğrudur. Ancak güvenilirlik kriterini %99.5'ten %95.0'e indirerek, %95.0'ten yüksek ($p < 0.05$) güvenilirlik kriteriyle

analiz yapılmış ve bulunan 37 prob seti ya da gen birimi kalma süresinden etkilenmiştir. *lctE* (R803, R804, R817, R818), *lctP*, *ytsJ* (R292), *gap* (R282), *cydD*, *cydB*, ve *cydA* ekspresyonları kalma süresiyle, yani t=0 st'den t=16 st'e azalmıştır. *wprA*, *appA*, *ykrY* (R7), *ykrZ* (R1, R2), *ylqB*, *citB* (R364, R365, R368, R369), *leuC* (R157-R160), *ilvB* (R55, R118), *bioF* (R579), *yvaY*, *yxjG*, *wapA*, *yxbB*, *yxbA*, *yxaM*, ve *yvdF* ekspresyonları t=12 st için en yüksektir. *narI* (R806), *narJ*, ve *narG* (R806) ekspresyonları kalma süresiyle azalmıştır, fakat en küçük değerleri t=12 st'tedir.

KAYNAKLAR

- Anonymous. 1999. GeneSpring GX- Agilent Technologies, Inc. Web Sitesi: <http://genespring-support.com/get-gs>. Erişim Tarihi: 15.08.2013.
- Anonymous. 2009. <http://genocyc.pasteur.fr>- Erişim Tarihi: Aralık 2013.
- Anonymous. 2009. MicroScope-Microbial Genome Annotation & Analysis Platform, <https://www.genoscope.cns.fr/agc/microscope/metabolism/microcyc-> Erişim Tarihi: 14 Aralık 2014.
- Anonymous. 2009. SubtiWiki-a database for the model organism *Bacillus subtilis* that links pathway, interaction and expression information. <http://subtiwiki.uni-goettingen.de/>-Erişim Tarihi: Haziran 2015.
- Aiba, S. and Matsuoka, M. 1979. Identification of metabolic model: Citrate production from glucose by *Candida lipolytica*. *Biotechnol. Bioeng.*, 21, 1373-1386.
- Albanesi, D., Mansilla, M.C., Schujman, G.E. and Mendoza, D. 2005. *Bacillus subtilis* cysteine synthetase is a global regulator of the expression of genes involved in sulfur assimilation. *J. Bacteriol.*, 187, 7631-7638.
- Auger, S., Danchin, A. and Martin-Verstraete, I. 2002. Global expression profile of *Bacillus subtilis* grown in the presence of sulfate or methionine. *J. Bacteriol.*, 184, 5179-5186.
- Allenby, N.E.E., O'Connor, N., Pragai, Z., Ward, A.C., Wipat, A. and Harwood, C.R. 2005. Genome-wide transcriptional analysis of the phosphate starvation stimulon of *B.subtilis*. *J. Bacteriol.*, 187, 8063-8080.
- Au, N., Kuester-Schoeck, E., Mandava, V., Bothwell, L.E., Canny, S.P., Chachu, K., Colavito, S.A., Fuller, S.N., Groban, E.S., Hensley, L.A., O'Brien, T.C., Shah, A., Tierney, J.T., Tamm, L.L., O'Gara, T.M., Goranov, A.I., Grossman, A.D. and Lovett, C.M. 2005. Genetic composition of the *B. subtilis* SOS system. *J. Bacteriol.*, 187, 7655-7666.
- Allenby, N.E.E., O'Connor, N., Pragai, Z., Carter, N.M., Miethke, M., Engelmann, S., Hecker, M., Wipat, A., Ward, A.C. and Harwood, C.R. 2004. Post-transcriptional regulation of the *Bacillus subtilis* *pst* operon encoding a phosphate specific ABC transporter. *Microbiology*, 150, 2619-2628.
- Auchtung, J.M., Lee, C.A., Monson, R.E., Lehman, A.P. and Grossman, A.D. 2005. Regulation of a *Bacillus subtilis* mobile genetic element by intercellular signaling and the global DNA damage response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 102, 12554-12559.

- Auchtung, J.M., Lee, C.A. and Grossman, A.D. 2006. Modulation of the ComA-dependent quorum response in *B. subtilis* by multiple rap proteins and phr peptides. *J. Bacteriol.*, 188, 5273-5285.
- Asai, K., Yamaguchi, H., Kang, C.M., Yoshida, K., Fujita, Y. and Sadaie, Y. 2003. DNA microarray analysis of *B. subtilis* sigma factors of extracytoplasmic function family. *FEMS Microbiol. Lett.*, 220, 155-160.
- Arbige, M.V., Bulthuis, B.A., Schultz, J. and Crabb, D. 1993. Fermentation of *Bacillus*. In: Sonenshein A L, Hoch JA, Losick R. *Bacillus subtilis* and Other Gram-positive Bacteria: Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics. Washington DC: American Society for Microbiology, 871-891.
- Barbe, V., Cruveiller, S., Kunst, F., Lenoble, P., Meurice, G., Sekowska, A., Vallenet, D., Wang, T., Moszer, I., Medigue, C. and Danchin, A. 2009. From a consortium sequence to a unified sequence: the *Bacillus subtilis* 168 reference genome a decade later. *Microbiology* 155, 1758-1775.
- Belda, E., Sekowska, A., Le Fevre, F., Morgat, A., Mornico, D., Ouzounis, C., Vallenet, D., Medigue, C. and Danchin, A. 2013. An updated metabolic view of the *Bacillus subtilis* 168 genome. *Microbiology* 159, 757-770.
- Bai, U., Mandic-Mulec, I. and Smith, I. 1993. SinI modulates the activity of SinR, a developmental switch protein of *Bacillus subtilis*, by protein-protein interaction. *Genes and Development*, 7, 139-148.
- Barbero, A.J., Manzanares, J.A. and Mafe, S. 1995. A Computational Study of Facilitated Diffusion Using The Boundary Element Method. *J. Non-Equilib. Thermodyn.*, 20, 332-341.
- Bailey, J.E. and Ollis, D.F. 1986. *Biochemical Engineering Fundamentals*, 2nd Ed., McGraw Hill. New York.
- Blazeck, J. and Alper, H. 2010. Systems metabolic engineering: Genome-scale models and beyond. *Biotechnology Journal*, 5, 647-659.
- Boghigian, B.A., Lee, K. and Pfeifer, B.A. 2010. Computational analysis of phenotypic space in heterologous polyketide biosynthesis - Applications to *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Theoretical Biology*, 262, 197-207.
- Basler, G., Grimbs, S. and Nikoloski, Z. 2012. Optimizing metabolic pathways by screening for feasible synthetic reactions. *BioSystems*, 109, 186-191.
- Berka, R.M., Hahn, J., Albano, M., Draskovic, I., Persuh, M., Cui, X., Sloma, A., Widner, W. and Dubnau, D. 2002. Microarray analysis of the *B. subtilis* K-state: Genome-wide expression changes dependent on ComK. *Mol. Microbiol.*, 43, 1331-1345.

- Blencke, H.M., Homuth, G., Ludwig, H., Mader, U., Hecker, M. and Stülke, J. 2003. Transcriptional profiling of gene expression in response to glucose in *B.subtilis*: Regulation of the central metabolic pathways. *Metab. Eng.*, 5, 133-149.
- Britton, R.A., Eichenberger, P., Gonzalez-Pastor, J.E., Fawcett, P., Monson, R., Losick, R. and Grossman, A.D. 2002. Genome-wide analysis of the stationary-phase sigma factor (Sigma H) regulon of *B.subtilis*. *J. Bacteriol.*, 184, 4881-4890.
- Baichoo, N., Wang, T., Ye, R. and Helmann, J.D. 2002. Global analysis of the *B. subtilis* Fur regulon and the iron starvation stimulon. *Mol. Microbiol.*, 45, 1613-1629.
- Britton, R.A., Küster-Schöck, E., Auchtung, T.A. and Grossman, A.D. 2007. SOS induction in a subpopulation of structural maintenance of chromosome (*smc*) mutant cells in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 189, 4359-4366.
- Beckering, C.L., Steil, L., Weber, M.H.W., Völker, U. Völker, U. and Marahiel, M.A. 2002. Genome-wide transcriptional analysis of the cold shock response in *B.subtilis*. *J. Bacteriol.*, 184, 6395-6402.
- Berka, R.M., Cui, X. and Yanofsky, C. 2003. Genomewide transcriptional changes associated with genetic alterations and nutritional supplementation affecting tryptophan metabolism in *B.subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100, 5682-5687.
- Beek, A.T., Keijser, B.J.F., Boorsma, A., Zakrzewska, A., Orij, R., Smits, G.J. and Brul, S. 2008. Transcriptome analysis of sorbic acid-stressed *B. subtilis* reveals a nutrient limitation response and indicates plasma membrane remodeling. *J. Bacteriol.*, 190, 1751-1761.
- Bunai, K., Ariga, M., Inoue, T., Nozaki, M., Ogane, S., Kakeshita, H., Nemoto, T., Nakanishi, H. and Yamane, K. 2004. Profiling and comprehensive expression analysis of ABC transporter solute-binding proteins of *B. subtilis* membrane based on proteomic approach. *Electrophoresis*, 25, 141-155.
- Burnette, W.N. 1981. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecylsulfate- polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry*, 112, 195-203.
- Blom, E.J., Ridder, A., Lulko, A.T., Roerdink, J.B.T.M. and Kuipers, O.P. 2011. Time-Resolved Transcriptomics and Bioinformatic Analyses Reveal Intrinsic Stress Responses during Batch Culture of *Bacillus subtilis*. *PLoS ONE*, 6(11): e27160.

- Botella, E., Hubner, S., Hokamp, K., Hansen, A., Bisicchia, P., Noone, D., Powell, L., Salzberg, L.I. and Devine, K.M. 2011. Cell envelope gene expression in phosphate-limited *Bacillus subtilis* cells. *Microbiology*, 157, 2470-2484.
- Boyacı, I.H. 2005. A new approach for determination of enzyme kinetic constants using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*, 25, 55-62.
- Bryan, E.M., Beall, B.W. and Moran, C.P. Jr. 1996. A sigma E dependent operon subject to catabolite repression during sporulation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.*, 178, 4778-4786.
- Brill, J., Hoffmann, T., Bleisteiner, M. and Bremer, E. 2011. Osmotically controlled synthesis of the compatible solute proline is critical for cellular defense of *Bacillus subtilis* against high osmolarity. *J Bacteriol.*, 193, 5335-5346.
- Brill, J., Hoffmann, T., Putzer, H. and Bremer, E. T-box-mediated control of the anabolic proline biosynthetic genes of *Bacillus subtilis*. 2011. *Microbiol.*, 157, 977-987.
- Belitsky, B.R. Indirect repression by *Bacillus subtilis* CodY via displacement of the activator of the proline utilization operon. 2011. *J Mol Biol.*, 413, 321-336.
- Ball, P. 2007. Synthetic biology: Designs for life. *Nature*, 448, 32-33.
- Burgard, A.P., Nikolaev, E.V., Schilling, C.H. and Maranas, C.D. 2004. Flux coupling analysis of genome-scale metabolic network reconstructions. *Genome Research* 14, 301-312.
- Bull, A., Holt, G. and Lilly, M. 1982. *Biotechnology: International Trends and Perspectives*. OECD Report.
- Chen, X., Zhang, C., Cheng, J., Shi, X., Li, L., Zhang, Z., Bai, J., Chen, Y., Li, S. and Ying, H. 2013. Enhancement of adenosine production by *Bacillus subtilis* CGMCC 4484 through metabolic flux analysis and simplified feeding strategies. *Bioprocess Biosyst Eng* DOI 10.1007/s00449-013-0959-6.
- Choon, Y.W., Mohamad, M.S., Deris, S., Illias, R.M., Chong, C.K. and Chai, L.E. 2013. A hybrid of bees algorithm and flux balance analysis with OptKnock as a platform for in silico optimization of microbial strains. *Bioprocess Biosyst Eng* DOI 10.1007/s00449-013-1019-y.
- Cohen, A. 1984. The PICO TAG System: a New Method to Analyze Primary and Secondary Amino Acids with One Picomole Sensitivity. *Biotechniques*, 2, 273-275.
- Covert, M.W., Schilling, C.H., Famili, I., Edwards, J.S., Goryanin, I.I., Selkov, E. and Palsson, B.O. 2001. Metabolic modelling of microbial strains in silico. *Trends in Biochemical Sciences*, 26, 179-183.

- Covert, M.W., Schilling, C.H. and Palsson, B.O. 2001. Regulation of Gene Expression in Flux Balance Models of Metabolism. *Journal of Theoretical Biology*, 213, 73-88.
- Covert, M.W. and Palsson, B.O. 2002. Transcriptional regulation in constraints-based metabolic models of *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 28058-28064.
- Covert, M.W. and Palsson, B.O. 2003. Constraints-based models: Regulation of Gene Expression Reduces the Steady-state Solution Space. *Journal of Theoretical Biology*, 221, 309-325.
- Covert, M.W., Knight, E.M., Reed, J.L., Herrgard, M.J. and Palsson, B.O. 2004. Integrating high-throughput and computational data elucidates bacterial networks. *Nature*, 429, 92-96.
- Christiansen, T., Christensen, B. and Nielsen, J. 2002. Metabolic Network Analysis of *Bacillus clausii* on Minimal and Semirich Medium Using ¹³C-Labeled Glucose. *Metabolic Engineering*, 4, 159-169.
- Conway, T. and Schoolnik, G.K. 2003. Microarray expression profiling: capturing a genome-wide portrait of the transcriptome. *Molecular Microbiology*, 47, 879-889.
- Chillappagari, S., Miethke, M., Trip, H., Kuipers, O.P. and Marahiel, M.A. 2009. Copper acquisition is mediated by YcnJ and regulated by YcnK and CsoR in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 191, 2362-2370.
- Chillappagari, S., Seubert, A., Trip, H., Kuipers, O.P., Marahiel, M.A. and Miethke, M. 2010. Copper Stress Affects Iron Homeostasis by Destabilizing Iron-Sulfur Cluster Formation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 192, 2512-2524.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, 162, 156-159.
- Caldwell, R., Sapolsky, R., Weyler, W., Maile, R.R. , Causey, S.C. and Ferrari, E. 2001. Correlation between *Bacillus subtilis* *scoC* phenotype and gene expression determined using microarrays for transcriptome analysis. *J. Bacteriol.*, 183, 7329-7340.
- Cao, M., Kobel, A., Morshedi, M.M., Wu, M.F.W., Paddon, C. and Helmann, J.D. 2002. Defining the *B. subtilis* σ^w regulon: A comparative analysis of promoter consensus search, run-off transcription/microarray analysis (ROMA) and transcriptional profiling approaches. *J. Mol. Biol.*, 316, 443-457.

- Choi, S.Y., Reyes, D., Leelakriangsak, M. and Zuber, P. 2006. The global regulator Spx functions in the control of organosulfur metabolism in *B.subtilis*. J. Bacteriol., 188, 5741-5751.
- Comella, N. and Grossman, A.D. 2005. Conservation of genes and processes controlled by the quorum response in bacteria: Characterization of genes controlled by the quorum-sensing transcription factor ComA in *Bacillus subtilis*. Mol. Microbiol., 57, 1159-1174.
- Cao, M., Wang, T., Ye, R. and Helmann, J.D. 2002. Antibiotics that inhibit cell wall biosynthesis induce expression of the *Bacillus subtilis* σ^W and σ^M regulons. Mol. Microbiol., 45, 1267-1276.
- Condon, C., Rourera, J., Brechemier-Baey, D. and Putzer, H. 2002. Ribonuclease M5 Has Few, If Any, mRNA Substrates in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol., 184, 2845-2849.
- Charles, L., Carbone, I., Davies, K.G., Bird, D., Burke, M., Kerry, B.R. and Opperman, C.H. 2005. Phylogenetic analysis of *Pasteuria penetrans* by use of multiple genetic loci. J Bacteriol., 187, 5700-5708.
- Chumsakul, O., Takahashi, H., Oshima, T., Hishimoto, T., Kanaya, S., Ogasawara, N. and Ishikawa, S. 2011. Genome-wide binding profiles of the *Bacillus subtilis* transition state regulator AbrB and its homolog Abh reveals their interactive role in transcriptional regulation. Nucleic Acids Res. 39, 414-428.
- Calogero, S., Gardan, R., Glaser, P., Schweizer, J., Rapoport, G. and Debarbouille, M. 1994. RocR, a novel regulatory protein controlling arginine utilization in *Bacillus subtilis*, belongs to the NtrC/NifA family of transcriptional activators. J Bacteriol., 176, 1234-1241.
- Choon, Y.W., Mohamad, M.S., Deris, S., Illias, R.M., Chong, C.K., Chai, L.E., Omatu, S. and Corchado, J.M. 2014. Differential Bees Flux Balance Analysis with OptKnock for In Silico Microbial Strains Optimization. PLoS ONE 9(7): e102744. doi:10.1371/journal.pone.0102744.
- Chapman, S.P., Paget, C.M., Johnson, G.N. and Schwartz, J.M. 2015. Flux balance analysis reveals acetate metabolism modulates cyclic electron flow and alternative glycolytic pathways in *Chlamydomonas reinhardtii*. Frontiers in Plant Science 6, 474.
- Çalık, P., Çalık, G. and Özdamar, T.H. 1995. Capillary electrophoretic analysis of protease enzymes by minimizing protein adsorption Proceedings 35th IUPAC Congress, Vol. 2, Turkish Chemical Society, Istanbul 1063.
- Çalık, P. 1998. Bioprocess development for serine alkaline protease production. Ph.D thesis, Ankara University, Turkey.

- Çalık, P., Çalık, G. and Özdamar, T.H. 1998. Oxygen transfer effects in serine alkaline protease fermentation by *Bacillus licheniformis*: Use of citric acid as the carbon source. *Enzyme and Microbial Technology*, 23, 451-461.
- Çalık, P. and Özdamar, T.H. 1999. Mass flux balance based model and metabolic pathway engineering analysis for serine alkaline synthesis by *Bacillus licheniformis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 24, 621-635.
- Çalık, P., Çalık, G., Takaç, S. and Özdamar, T.H. 1999. Metabolic flux analysis for serine alkaline protease fermentation by *Bacillus licheniformis* in a defined medium: Effects of oxygen transfer rate. *Biotechnology and Bioengineering*, 64, 151-167.
- Çalık, P., Çalık, G. and Özdamar, T.H. 2000. Oxygen transfer strategy and its regulation effects in serine alkaline protease production by *Bacillus licheniformis*. *Biotechnology and Bioengineering*, 69, 301-322.
- Çalık, P., Takaç, S., Çalık, G. and Özdamar, T.H. 2000. Serine alkaline protease overproduction capacity of *B.licheniformis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 64, 45-60.
- Çalık, P., Çalık, G., Takaç, S. and Özdamar, T.H. 2000. Metabolic flux analysis for serine alkaline protease production. *Enzyme and Microbial Technology*, 27, 793-805.
- Çalık, P. and Özdamar, T.H. 2001. Carbon sources affect metabolic capacities of *Bacillus* species for the production of industrial enzymes: theoretical analyses for serine and neutral proteases and α -amylase. *Biochemical Engineering Journal*, 8, 61-81.
- Çalık, P., Çalık, G. and Özdamar, T.H. 2001. Bioprocess Development For Serine Alkaline Protease Production: A Review. *Reviews in Chemical Engineering*, 17, 1-62.
- Çalık, P. and Özdamar T.H. 2002. Bioreaction Network Flux Analysis For Industrial Microorganisms: A Review. *Reviews in Chemical Engineering*, 18, 553-596.
- Çalık, P., Bilir, E., Çalık, G. and Özdamar, T.H. 2002. Influence of pH conditions on metabolic regulations in serine alkaline protease production by *Bacillus licheniformis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 31, 685-697.
- Çalık, P., Kalender, N. and Özdamar, T.H. 2003a. Overexpression of serine alkaline protease encoding gene in *Bacillus* species: performance analyses. *Enzyme and Microbial Technology*, 33, 967-974.
- Çalık, P., Tomlin, G., Oliver, S.G. and Özdamar, T.H. 2003b. Overexpression of serine alkaline protease in *Bacillus licheniformis* and its impact on the metabolic reaction network. *Enzyme and Microbial Technology*, 32, 706-720.

- Çalık, P., Bilir, E., Çalık, G. and Özdamar, T.H. 2003c. Bioreactor operation parameters as tools for metabolic regulations in fermentation processes: influence of pH conditions. *Chemical Engineering Science*, 58, 759-766.
- Çalık, G., Pehlivan, N., Kalender, N., Özdamar, T.H. and Çalık, P. 2003d. Utilization of pretreated molasses for serine alkaline protease production with recombinant *Bacillus* species. *Chemical Engineering Communications*, 190, 630-644.
- Çalık, P., Çelik, E., Telli, İ.E., Oktar, C. and Özdemir, E. 2003e. Protein-based complex medium design for recombinant serine alkaline protease production. *Enzyme and Microbial Technology*, 33, 975-986.
- Çalık, P., Bilir, E., Özçelik, İ.Ş., Çalık, G. and Özdamar, T.H. 2004. Inorganic compounds have dual effect on recombinant protein production: influence of anions and cations on serine alkaline protease production. *Journal of Applied Microbiology*, 96, 194-200.
- Çalık, G., Pehlivan, N., Özçelik, İ.Ş., Çalık, P. and Özdamar, T.H. 2004. Fermentation and oxygen transfer characteristics in serine alkaline protease production by recombinant *Bacillus subtilis* in molasses-based complex medium. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 79, 1243-1250.
- Çalık, P. and İleri, N. 2007. pH influences intracellular reaction network of β -lactamase producing *Bacillus licheniformis*. *Chemical Engineering Science*, 62, 5206-5211.
- Çalık, G., Kocabaş, P., Afşar, H., Çalık, P. and Özdamar, T.H. 2016. Parametric continuous feed stream design to fine-tune fed-batch bioreactor performance: Recombinant human growth hormone production in *Bacillus subtilis*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 91, 2740-2750.
- Durot, M., Bourguignon, P.Y. and Schachter, V. 2009. Genome-scale models of bacterial metabolism: reconstruction and applications. *FEMS Microbiology Reviews*, 33, 164-190.
- Detert Oude Weme, R., Seidel, G. and Kuipers, O.P. 2015. Probing the regulatory effects of specific mutations in three major binding domains of the pleiotropic regulator CcpA of *Bacillus subtilis*. *Front. Microbiol.* 6:1051. doi: 10.3389/fmicb.2015.01051
- Dauner, M. and Sauer, U. 2001. Stoichiometric growth model for riboflavin producing *Bacillus subtilis*. *Biotechnol Bioeng*, 76, 132-143.
- Dauner, M., Sonderegger, M., Hochuli, M., Szyperski, T., Wuthrich, K., Hohmann, H.P., Sauer, U. and Bailey, J.E. 2002. Intracellular Carbon Fluxes in Riboflavin-Producing *Bacillus subtilis* during Growth on Two-Carbon Substrate Mixtures. *Appl Environ Microbiol*, 68, 1760-1771.

- Duan, Y.X., Chen, T., Chen, X. and Zhao, X.M. 2010. Overexpression of glucose-6-phosphate dehydrogenase enhances riboflavin production in *Bacillus subtilis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 85, 1907-1914.
- Dalma-Weiszhausz, D.D., Warrington, J., Tanimoto, E.Y. and Miyada, C.G. 2006. The Affymetrix GeneChip Platform: An Overview. *Methods in Enzymology*, 410, 3-28.
- Dharmadi, Y. and Gonzalez, R. 2004. DNA Microarrays: Experimental Issues, Data Analysis and application to bacterial systems. *Biotechnology Progress*, 20, 1309-1324.
- de Saizieu, A., Certa, U., Warrington, J., Gray, C., Keck, W. and Mous, J. 1998. Bacterial transcript imaging by hybridization of total RNA to oligonucleotide arrays. *Nat. Biotechnol.*, 16, 45-48.
- Deikus, G., Babitzke, P. and Bechhofer, D.H. 2004. Recycling of a regulatory protein by degradation of the RNA to which it binds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 2747-2751.
- Dubnau, D. and Roggiani, M. 1990. Growth medium-independent genetic competence mutants of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 172, 4048-4055.
- Dahl, M.K., Msadek, T., Kunst, F. and Rapoport, G. 1992. The phosphorylation state of DegU response regulator acts as molecular switch allowing either degradative enzyme synthesis or expression of genetic competence in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.*, 267, 14509-14514.
- Doan, T., Servant, P., Tojo, S., Yamaguchi, H., Lerondel, G., Yoshida, K., Fujita, Y. and Aymerich, S. 2003. The *B. subtilis ywkJ* gene encodes a malic enzyme and its transcription is activated by the YufL/YufM two-component system in response to malate. *Microbiology-SGM*, 149, 2331-2343.
- Dittmar, K.A., Mobley, E.M., Radek, A.J. and Pan, T. 2004. Exploring the Regulation of tRNA Distribution on the Genomic Scale. *Journal of Molecular Biology*, 337, 31-47.
- Daszczuk, A., Dessalegne, Y., Drenth, I., Hendriks, E., Jo, E., van Lente, T., Oldebesten, A., Parrish, J., Poljakova, W., Purwanto, A.A., van Raaphorst, R., Boonstra, M., van Heel, A., Herber, M., van der Meulen, S., Siebring, J., Sorg, R.A., Heinemann, M., Kuipers, O.P. and Veening, J.W. 2014. *Bacillus subtilis* Biosensor Engineered To Assess Meat Spoilage. *ACS Synth. Biol.*, 3, 999-1002.
- Debarbouille, M., Gardan, R., Arnaud, M. and Rapoport, G. 1999. Role of *bkdR*, a transcriptional activator of the sigL-dependent isoleucine and valine degradation pathway in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.*, 181, 2059-2066.

- de Jong, I.G., Veening, J.W. and Kuipers, O.P. 2012. Single cell analysis of gene expression patterns during carbon starvation in *Bacillus subtilis* reveals large phenotypic variation. *Environ Microbiol.*, 14, 3110-3121.
- Drubin, D.A., Way, J.C. and Silver, P.A. 2007. Designing biological systems. *Genes Dev.*, 21, 242-254.
- Eymann, C., Homuth, G., Scharf, C. and Hecker, M. 2002. *B. subtilis* functional genomics: Global characterization of the stringent response by proteome and transcriptome analysis. *J. Bacteriol.*, 184, 2500-2520.
- Eiamphungporn, W. and Helmann, J.D. 2008. The *B. subtilis* σ^M regulon and its contribution to cell envelope stress responses. *Mol. Microbiol.*, 67, 830-848.
- Earl, A.M., Losick, R. and Kolter, R. 2007. *B. subtilis* genome diversity. *J. Bacteriol.*, 189, 1163-1170.
- Eichenberger, P., Fujita, M., Jensen, S.T., Conlon, E.M., Rudner, D.Z., Wang, S.T., Ferguson, C., Haga, K., Sato, T., Liu, J.S. and Losick, R. 2004. The program of gene transcription for a single differentiating cell type during sporulation in *Bacillus subtilis*. *PLoS Biology*, 2(10): e328.
- Eichenberger P., Jensen, S.T., Conlon, E.M., van Ooij, C., Silvaggi, J., González-Pastor, J.E., Fujita, M., Ben-Yehuda, S., Stragier, P., Liu, J.S. and Losick, R. 2003. The sigmaE regulon and the identification of additional sporulation genes in *Bacillus subtilis*. *Journal of Molecular Biology*, 327, 945-972.
- Eisenberg, E. and Levanon, E.Y. 2013. Human housekeeping genes, revisited. *Trends Genet.*, 29, 569-574.
- Fischer, E. and Sauer, U. 2005. Large-scale *in vivo* flux analysis shows rigidity and suboptimal performance of *Bacillus subtilis* metabolism. *Nature Genetics*, 37, 636-640.
- Ferrari, E., Henner, D.J., Perego, M. and Hoch, J.A. 1988. Transcription of *Bacillus subtilis* subtilisin and expression of subtilisin in sporulation mutants. *Journal of Bacteriology*, 170, 289-295.
- Ferrari, E., Howard, S.M. and Hoch, J.A. 1986. Effect of stage 0 sporulation mutations on subtilisin expression. *Journal of Bacteriology*, 166, 173-179.
- Franchi, E., Maisano, F., Testori, S.A., Galli, G., Toma, S., Parente, L., Ferra, F. and Grandi, G. 1991. A new human growth hormone production process using a recombinant *Bacillus subtilis* strain. *Jornal of Biotechnology*, 18, 41-54.
- Feist, A.M., Thiele, I. and Palsson, B.O. 2009. Genome-Scale Reconstruction, Modeling, and Simulation of *E.coli*'s Metabolic Network. S.Y. Lee (ed.),

Systems Biology and Biotechnology of Escherichia coli 149–176, DOI: 10.1007/978-1-4020-9394-4_9, Springer Science + Business Media B.V.

- Fischer, E. and Sauer, U. 2003. Metabolic flux profiling of *Escherichia coli* mutants in central carbon metabolism using GC-MS. *Eur. J. Biochem.*, 270, 880-891.
- Fuhrer, T., Fischer, E. and Sauer, U. 2005. Experimental Identification and Quantification of Glucose Metabolism in Seven Bacterial Species. *Journal of Bacteriology*, 187, 1581-1590.
- Fürch, T., Wittmann, C., Wang, W., Franco-Lara, E., Jahn, D. and Deckwera, W.D. 2007. Effect of different carbon sources on central metabolic fluxes and the recombinant production of a hydrolase from *Thermobifida fusca* in *Bacillus megaterium*. *Journal of Biotechnology*, 132, 385-394.
- Fürch, T., Hollmann, R., Wittmann, C., Wang, W. and Deckwer, W.D. 2007. Comparative study on central metabolic fluxes of *Bacillus megaterium* strains in continuous culture using ¹³C labelled substrates. *Bioprocess Biosyst Eng*, 30, 47-59.
- Fajardo-Cavazos, P., Waters, S.M., Schuerger, A.C., George, S., Marois, J.J. and Nicholson, W.L. 2012. Evolution of *Bacillus subtilis* to Enhanced Growth at Low Pressure: Up-Regulated Transcription of des-desKR, Encoding the Fatty Acid Desaturase System. *Astrobiology*, 12, 258-270.
- Fawcett, P., Eichenberger, P., Losick, R. and Youngman, P. 2000. The transcriptional profile of early to middle sporulation in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97, 8063-8086.
- Feucht, A., Evans, L. and Errington, J. 2003. Identification of sporulation genes by genome-wide analysis of the σ^E regulon of *B.subtilis*. *Microbiology-SGM*, 149, 3023-3034.
- Fischer, H.P., Brunner, N.A., Wieland, B., Paquette, J., Macko, L., Ziegelbauer, K. and Freiberg, C. 2004. Identification of antibiotic stress-inducible promoters: A systematic approach to novel pathway-specific reporter assays for antibacterial drug discovery. *Genome Res.*, 14, 90-98.
- Freiberg, C., Fischer, H.P. and Brunner, N.A. 2005. Discovering the mechanism of action of novel antibacterial agents through transcriptional profiling of conditional mutants. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 49, 749-759.
- Freiberg, C., Brunner, N., Macko, L. and Fischer, H.P. 2006. Discovering antibiotic efficacy biomarkers- Toward mechanism-specific high content compound screening. *Mol. Cell Proteomics*, 5, 2326-2335.

- Fujita, Y., Fujita, T., Miwa, Y., Nihashi and J., Aratani, Y. 1986. Organization and transcription of the gluconate operon, *gnt*, of *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem.*, 261, 13744-13753.
- Forster, A.C. and Church, G.M. 2007. Synthetic biology projects in vitro. *Genome Research*, 17, 1-6.
- Gaur, N.K., Cabane, K. and Smith, I. 1988. Structure and expression of the *Bacillus subtilis sin* operon. *Journal of Bacteriology*, 170, 1046-1053.
- Gilks, W.R., Audit, B., De Angelis, D., Tsoka, S. and Ouzounis, C.A. 2002. Modeling the percolation of annotation errors in a database of protein sequences. *Bioinform.* 18, 1641-1649.
- Gaur, N.K., Oppenheim J. and Smith, I. 1991. The *Bacillus subtilis sin* gene, a regulator of alternate developmental processes, codes for a DNA-binding protein. *Journal of Bacteriology*, 173, 678-686.
- Glick, B.R. and Pasternak, J.J. 2003. *Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA*. American Society for Microbiology Press, Third Edition.
- Goelzer, A., Briki, F.B., Martin-Verstraete, I., Noirot, P., Bessi eres, P., Aymerich, S. and Fromion, V. 2008. Reconstruction and analysis of the genetic and metabolic regulatory networks of the central metabolism of *Bacillus subtilis*. *BMC Syst Biol*, 2:20.
- Guedon, E., Moore, C.M., Que, Q., Wang, T., Ye, R.W. and Helmann, J.D. 2003. The global transcriptional response of *B. subtilis* to manganese involves the MntR, Fur, TnrA and σ^B regulons. *Mol. Microbiol.*, 49, 1477-1491.
- Gaballa, A., Wang, T., Ye, R.W. and Helmann, J.D. 2002. Functional analysis of the *B. subtilis* Zur regulon. *J. Bacteriol.*, 184, 6508-6514.
- Gaballa, A., Antelmann, H., Hamilton, C.J. and Helmann, J.D. 2013. Regulation of *Bacillus subtilis* bacillithiol biosynthesis operons by Spx. *Microbiol.*, 159, 2025-2035.
- Gamba, P., Veening, J.W., Saunders, N.J., Hamoen, L.W. and Daniel, R.A. 2009. Two-Step Assembly Dynamics of the *Bacillus subtilis* Divisome. *Journal of Bacteriology*, 191, 4186-4194.
- Gimpel, M., Heidrich, N., M ader, U., Kr ugel, H. and Brantl, S. 2010. A dual-function sRNA from *B.subtilis*: SR1 acts as a peptide encoding mRNA on the gapA operon. *Molecular Microbiology*, 76, 990-1009.
- Goeddel, D.V., Hetneker, H.L., Hozumi, T., Arentzen, R., Itakura, K., Yansura, D.G., Ross, M.J., Miozzari, G., Crea, R. and Seeburg, P.H. 1979. Direct expression

- in *Escherichia coli* of a DNA sequence coding for human growth hormone. *Nature*, 281, 544-548.
- Gerth, U., Kock, H., Kusters, I., Michalik, S., Switzer, R.L. and Hecker, M. 2008. Clp-dependent proteolysis down-regulates central metabolic pathways in glucose-starved *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.*, 190, 321-331.
- Gutiérrez-Preciado, A., Henkin, T.M., Grundy, F.J., Yanofsky, C. and Merino, E. 2009. Biochemical features and functional implications of the RNA-based T-box regulatory mechanism. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 73, 36-61.
- Gündüz, T. 2010. Kimyacılar için İstatistik. Gazi Kitapevi. Ankara.
- Hermann, T. 2004. Using functional genomics to improve productivity in the manufacture of industrial biochemicals. *Curr Opin Biotechnol.*, 15, 444-448.
- Harwood, C.R. 1992. *Bacillus subtilis* and its relatives: molecular biological and industrial workhorses. *Trends Biotechnol.*, 10, 247-256.
- Harwood, C.R. and Cranenburgh, R. 2008. *Bacillus* protein secretion: an unfolding story. *Trends in Microbiology*, 16, 73-79.
- Honjo, M., Nakayama, A., Fukazawa, K., Kawamura, K., Ando, K., Hori, M. and Furutani, Y. 1990. A novel *Bacillus subtilis* gene involved in negative control of sporulation and degradative-enzyme production. *Journal of Bacteriology*, 172, 1783-1790.
- Hackett, S.R., Zanolli, V.R.T, Xu, W., Goya, J., Park, J.O., Perlman, D.H., Gibney, P.A., Botstein, D., Storey, J.D. and Rabinowitz, J.D. 2016. Systems-level analysis of mechanisms regulating yeast metabolic flux. 354, doi: 10.1126/science.aaf2786.
- Hao, T., Han, B., Ma, H., Fu, J., Wang, H., Wang, Z., Tang, B., Chen, T. and Zhao, X. 2013. *In silico* metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for improved production of riboflavin, Egl-237, (R,R)-2,3-butanediol and isobutanol. *Molecular BioSystems*, 9, 2034-2044.
- Henry, C.S., Zinner, J.F., Cohoon, M.P. and Stevens, R.L. 2009. iBsull03: A new genome-scale metabolic model of *Bacillus subtilis* based on SEED annotations. *Genome Biol*, 10:R69.
- Hambraeus, G., von Wachenfeldt, C. and Hederstedt, L. 2003. Genome-wide survey of mRNA half-lives in *B. subtilis* identifies extremely stable mRNAs. *Mol. Genet. Genomics*, 269, 706-714.
- Helmann, J.D., Wu, M.F.W., Kobel, P.A., Gamo, F.J., Wilson, M., Morshedi, M.M., Navre, M. and Paddon, C. 2001. Global transcriptional response of *Bacillus subtilis* to heat shock. *J. Bacteriol.*, 183, 7318-7328.

- Hamoen, L.W., Smits, W.K., Jong, A., Holsappel, S. and Kuipers, O.P. 2002. Improving the predictive value of the competence transcription factor (ComK) binding site in *Bacillus subtilis* using a genomic approach. *Nucleic Acids Res.*, 30, 5517-5528.
- Helmann, J.D., Wu, M.F.W., Gaballa, A., Kobel, P.A., Morshedi, M.M., Fawcett, P. and Paddon, C. 2003. The global transcriptional response of *Bacillus subtilis* to peroxide stress is coordinated by three transcription factors. *J. Bacteriol.*, 185, 243-253.
- Hamon, M.A., Stanley, N.R., Britton, R.A., Grossman, A.D. and Lazazzera, B.A. 2004. Identification of AbrB-regulated genes involved in biofilm formation by *B.subtilis*. *Mol. Microbiol.*, 52, 847-860.
- Hayashi, K., Kensuke, T., Kobayashi, K., Ogasawara, N. and Ogura, M. 2006. *B. subtilis* RghR (YvaN) represses *rapG* and *rapH*, which encode inhibitors of expression of the *srfA* operon. *Mol. Microbiol.*, 59, 1714-1729.
- Hayashi, K., Ohsawa, T., Kobayashi, K., Ogasawara, N. and Ogura, M. 2005. The H₂O₂ stress-responsive regulator PerR positively regulates *srfA* expression in *B.subtilis*. *J. Bacteriol.*, 187, 6659-6667.
- Hirooka, K., Kunikane, S., Matsuoka, H., Yoshida, K., Kumamoto, K., Tojo, S. and Fujita, Y. 2007. Dual regulation of the *Bacillus subtilis* regulon comprising the *lmrAB* and *yxaGH* operons and *yxaF* gene by two transcriptional repressors, LmrA and YxaF, in response to flavonoids. *J. Bacteriol.*, 189, 5170-5182.
- Hamoen, L.W. and Errington, J. 2003. Polar targeting of DivIVA in *Bacillus subtilis* is not directly dependent on FtsZ or PBP 2B. *J. Bacteriol.*, 185, 693-697.
- Hirooka, K., Danjo, Y., Hanano, Y., Kunikane, S., Matsuoka, H., Tojo, S. and Fujita, Y. 2009. Regulation of the *Bacillus subtilis* Divergent *yetL* and *yetM* Genes by a Transcriptional Repressor, YetL, in Response to Flavonoids. *J. Bacteriol.*, 191, 3685-3697.
- Hahne, H., Mader, U., Otto, A., Bonn, F., Steil, L., Bremer, E., Hecker, M. and Becher D. 2010. A Comprehensive Proteomics and Transcriptomics Analysis of *Bacillus subtilis* Salt Stress Adaptation. *J. Bacteriol.*, 192, 870-882.
- Homuth, G., Masuda, S., Mogk, A., Kobayashi, Y. and Schumann, W. 1997. The *dnaK* operon of *Bacillus subtilis* is heptacistronic. *J. Bacteriol.*, 179, 1153-1164.
- Heidrich, N., Chinali, A., Gerth, U. and Brantl, S. 2006. The small untranslated RNA SR1 from the *B. subtilis* genome is involved in the regulation of arginine catabolism. *Mol Microbiol*, 62, 520-536.

- Hörl, M., Schnidder, J., Sauer, U. and Zamboni, N. 2013. Non-Stationary ¹³C-Metabolic Flux Ratio Analysis. *Biotechnology and Bioengineering*, 110, 3164-3176.
- Harwood, C.R., Cutting, S.M. and Chambert, R. 1990. *Molecular biological methods for Bacillus*. Published by Wiley in Chichester, New York.
- Hoffmann, T. and Bremer, E. 2011. Protection of *Bacillus subtilis* against cold stress via compatible-solute acquisition. *J Bacteriol.*, 193, 1552-1562.
- Huang, S.C., Lin, T.H. and Shaw, G.C. 2011. PrcR, a PucR-type transcriptional activator, is essential for proline utilization and mediates proline-responsive expression of the proline utilization operon *putBCP* in *Bacillus subtilis*. *Microbiol.*, 157, 3370-3377.
- Hucka M., Finney A., Bornstein B.J., Keating S.M., Shapiro B.E., Matthews J., Kovitz B.L., Schilstra M.J., Funahashi A., Doyle J.C. and Kitano H. 2004. Evolving a lingua franca and associated software infrastructure for computational systems biology: the Systems Biology Markup Language (SBML) project. *Syst Biol (Stevenage)*, 1, 41-53.
- Igo, M.M. and Losick, R. 1986. Regulation of a promoter that is utilized by minor forms of RNA polymerase holoenzyme in *Bacillus subtilis*. *J.Mol. Biol.*, 191, 615-624.
- Ishikawa, S., Ogura, Y., Yoshimura, M., Okumura, H., Cho, E., Kawai, Y., Kurokawa, K., Oshima, T. and Ogasawara, N. 2007. Distribution of stable DnaA-binding sites on the *Bacillus subtilis* genome detected using a modified ChIP-chip method. *DNA Research*, 14, 155-168.
- Iwanicki, A., Hinc, K., Ronowicz, A., Piotrowski, A., Wołoszyk, A. and Obuchowski, M. 2013. A genome-wide transcriptional profiling of sporulating *Bacillus subtilis* strain lacking PrpE protein phosphatase. *Mol Genet Genomics* 1007/s00438-013-0763-7.
- Irizarry, R.A., Hobbs, B., Collin, F., Beazer-Barclay, Y.D., Antonellis, K.J., Scherf, U. and Speed, T.P. 2003. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics*. 4, 249-264.
- İleri, N. 2005. Effects of pH and substrate feeding strategy on metabolite profiling of beta-lactamase producing *Bacillus licheniformis*. METU, Msc Thesis.
- İrigül-Sönmez, Ö., Köroğlu, T.E., Öztürk, B., Kovács, Á.T., Kuipers, O.P. and Yazgan-Karataş, A. 2014. In *Bacillus subtilis* LutR is part of the global complex regulatory network governing the adaptation to the transition from exponential growth to stationary phase. *Microbiology*, 160, 243-260.
- Jürgen, B., Barken, K.B., Tobisch, S., Pioch, D., Wümpelmann, M., Hecker, M. and Schweder, T. 2005. Application of an electric DNA-chip for the expression

- analysis of bioprocess-relevant marker genes of *Bacillus subtilis*. *Biotechnol. Bioeng.*, 92, 299-307.
- Jarmer, H., Berka, R., Knudsen, S. and Saxild, H.H. 2002. Transcriptome analysis documents induced competence of *B. subtilis* during nitrogen limiting conditions. *FEMS Microbiol. Lett.*, 206, 197-200.
- Jin, S. and Sonenshein, A.L. 1994. Transcriptional regulation of *Bacillus subtilis* citrate synthase genes. *J Bacteriol.*, 176, 4680-4690.
- Jourlin-Castelli, C., Mani, N., Nakano, M.M. and Sonenshein, A.L. 2000. CcpC, a novel regulator of the LysR family required for glucose repression of the *citB* gene in *Bacillus subtilis*. *J Mol Biol.*, 295, 865-878.
- Jacobs, M. 1995. Expression of the subtilisin Carlsberg-encoding gene in *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis*. *Gene*, 152, 69-74.
- Kobayashi, K., Ehrlich, S.D., Albertini, A., Amati, G., Andersen, K.K., Arnaud, M., Asai, K., Ashikaga, S., Aymerich, S., Bessieres, P., Boland, F., Brignell, S.C., Bron, S., Bunai, K., Chapuis, J., Christiansen, L.C., Danchin, A., Debarbouille, M., Dervyn, E., Deuerling, E., Devine, K., Devine, S.K., Dreesen, O., Errington, J., Fillinger, S., Foster, S.J., Fujita, Y., Galizzi, A., Gardan, R., Eschevins, C., Fukushima, T., Haga, K., Harwood, C.R., Hecker, M., Hosoya, D., Hullo, M.F., Kakeshita, H., Karamata, D., Kasahara, Y., Kawamura, F., Koga, K., Koski, P., Kuwana, R., Imamura, D., Ishimaru, M., Ishikawa, S., Ishio, I., Le Coq, D., Masson, A., Mauel, C., Meima, R., Mellado, R.P., Moir, A., Moriya, S., Nagakawa, E., Nanamiya, H., Nakai, S., Nygaard, P., Ogura, M., Ohanan, T., O'Reilly, M., O'Rourke, M., Pragai, Z., Pooley, H.M., Rapoport, G., Rawlins, J.P., Rivas, L.A., Rivolta, C., Sadaie, A., Sadaie, Y., Sarvas, M., Sato, T., Saxild, H.H., Scanlan, E., Schumann, W., Seegers, J.F., Sekiguchi, J., Sekowska, A., Seror, S.J., Simon, M., Stragier, P., Studer, R., Takamatsu, H., Tanaka, T., Takeuchi, M., Thomaidis, H.B., Vagner, V., van Dijl, J.M., Watabe, K., Wipat, A., Yamamoto, H., Yamamoto, M., Yamamoto, Y., Yamane, K., Yata, K., Yoshida, K., Yoshikawa, H., Zuber, U. and Ogasawara, N. 2003. Essential *Bacillus subtilis* genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100, 4678-4683.
- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A.M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M.G., Bessières, P., Bolotin, A., Borchert, S., Borriss, R., Boursier, L., Brans, A., Braun, M., Brignell, S.C., Bron, S., Brouillet, S., Bruschi, C.V., Caldwell, B., Capuano, V., Carter, N.M., Choi, S.K., Codani, J.J., Connerton, I. F., Cummings, N.J., Daniel R.A., Denizot, F., Devine, K.M., Dusterhöft, A., Ehrlich, S.D., Emmerson, P.T., Entian, K.D., Errington, J., Fabret, C., Ferrari, E., Foulger, D., Fritz, C., Fujita, M., Fujita, Y., Fuma, S., Galizzi, A., Galleron, N., Ghim, S.Y., Glaser, P., Goffeau, A., Golightly, E.J., Grandi, G., Guiseppe, G., Guy, B.J., Haga, K., Haiech, J., Harwood, C.R., Hénaut, A., Hilbert, H., Holsappel, S., Hosono, S., Hullo, M.F., Itaya, M., Jones, L., Joris, B., Karamata, D., Kasahara, Y., Klaerr-Blanchard, M., Klein, C., Kobayashi, Y.,

- Koetter, P., Koningstein, G., Krogh, S., Kumano, M., Kurita, K., Lapidus, A., Lardinois, S., Lauber, J., Lazarevic, V., Lee, S.M., Levine, A., Liu, H., Masuda, S., Mauël, C., Médigue, C., Medina, N., Mellado, R.P., Mizuno, M., Moestl, D., Nakai, S., Noback, M., Noone, D., O'Reilly, M., Ogawa, K., Ogiwara, A., Oudega, B., Park, S.H., Parro, V., Pohl, T.M., Portetelle, D., Porwollik, S., Prescott, A.M., Presecan, E., Pujic, P., Purnelle, B., Rapoport, G., Rey, M., Reynolds, S., Rieger, M., Rivolta, C., Rocha, E., Roche, B., Rose, M., Sadaie, Y., Sato, T., Scanlan, E., Schleich, S., Schroeter, R., Scoffone, F., Sekiguchi, J., Sekowska, A., Seror, S.J., Serror, P., Shin, B.S., Soldo, B., Sorokin, A., Tacconi, E., Takagi, T., Takahashi, H., Takemaru, K., Takeuchi, M., Tamakoshi, A., Tanaka, T., Terpstra, P., Tognoni, A., Tosato, V., Uchiyama, S., Vandenbol, M., Vannier, F., Vassarotti, A., Viari, A., Wambutt, R., Wedler, E., Wedler, H., Weitzenegger, T., Winters, P., Wipat, A., Yamamoto, H., Yamane, K., Yasumoto, K., Yata, K., Yoshida, K., Yoshikawa, H.F., Zumstein, E., Yoshikawa, H. and Danchin, A. 1997. The complete genome sequence of the grampositive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, 390, 249-256.
- Kunst, F., Msadek, T. and Rapoport, G. 1994. Signal transduction network controlling degradative enzyme synthesis and competence in *Bacillus subtilis*, p. 1-20. In P. J. Piggot, C. P. Moran, Jr., and P. Youngman (ed.), *Regulation of bacterial differentiation*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Kajino, T., Saito, Y., Asami, O., Yamada, Y., Hirai, M. and Udet, S. 1997. Extracellular production of an intact and biologically active human growth hormone by the *Bacillus Brevis* system. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 19, 227-231.
- Kleijn, R.J., Buescher, J.M., Le Chat, L., Jules, M., Aymerich, S. and Sauer, U. 2010. Metabolic Fluxes during Strong Carbon Catabolite Repression by Malate in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.*, 285, 1587-1596.
- Kuipers, O.P. 1999. Genomics for food biotechnology: prospects of the use of high-throughput technologies for the improvement of food microorganisms. *Current Opinion in Biotechnology*, 10, 511-516.
- Kumar, A., Goel, G., Fehrenbach, E., Puniya, A.K. and Singh, K. 2005. Microarrays: The technology, analysis and application. *Engineering and Life Sciences*, 5, 215-222.
- Keijser, B.J.F., Beek, A.T., Rauwerda, H., Schuren, F., Montijn, R., van der Spek, H. and Brul, S. 2007. Analysis of temporal gene expression during *Bacillus subtilis* spore germination and outgrowth. *J. Bacteriol.*, 189, 3624-3634.
- Kort, R., Keijser, B.J., Caspers, M.P.M., Schuren, F.H. and Montijn, R. 2008. Transcriptional activity around bacterial cell death reveals molecular biomarkers for cell viability. *BMC Genomics*, 9:590.

- Kobayashi, K., Ogura, M., Yamaguchi, H., Yoshida, K., Ogasawara, N., Tanaka, T. and Fujita, Y. 2001. Comprehensive DNA microarray analysis of *Bacillus subtilis* two-component regulatory systems. *J. Bacteriol.*, 183, 7365-7370.
- Kong, L., Siranosian, K.J., Grossman, A.D. and Dubnau, D. 1993. Sequence and properties of *meckA*, a negative regulator of genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.*, 9, 365-373.
- Kuipers, O.P., Beerthuyzen, M.M., Siezen, R.J. and de Vos W.M. 1993. Characterization of the nisin gene cluster *nisABTCIPR* of *Lactococcus lactis*, requirement of expression of the *nisA* and *nisI* genes for development of immunity. *Eur. J. Biochem.*, 216, 281-291.
- Kunst, F., Pascal, M., Lepesant-Kejzlarova, J., Lepesant, J.A., Billault, A. and Dedonder, R. 1974. Pleiotropic mutations affecting sporulation conditions and the synthesis of extracellular enzymes in *Bacillus subtilis* 168. *Biochimie*, 56, 1481-1489.
- Kobayashi, K. 2007. Gradual activation of the response regulator DegU controls serial expression of genes for flagellum formation and biofilm formation in *B.subtilis*. *Mol. Microbiol.*, 66, 395-409.
- Kouwen, T.R.H.M., van der Ploeg, R., Antelmann, H., Hecker, M., Homuth, G., Mäder, U. and van Dijl, J.M. 2009. Overflow of a hyper-produced secretory protein from the *Bacillus* Sec pathway into the Tat pathway for protein secretion as revealed by proteogenomics. *Proteomics*, 9, 1018-1032.
- Kaan, T., Homuth, G., Mader, U., Bandow, J. and Schweder, T. 2002. Genome-wide transcriptional profiling of the *Bacillus subtilis* cold-shock response. *Microbiology-SGM*, 148, 3441-3455.
- Kearns, D.B. and Losick, R. 2005. Cell population heterogeneity during growth of *B.subtilis*. *Genes Dev.*, 19, 3083-3094.
- Kobayashi, H., Akitomi, J., Fujii, N., Kobayashi, K., Altaf-Ul-Amin, M., Kurokawa, K., Ogasawara, N. and Kanaya, S. 2007. The entire organization of transcription units on the *B. subtilis* genome. *BMC Genomics*, 8: 197.
- Kusuya, Y., Kurokawa, K., Ishikawa, S., Ogasawara, N. and Oshima, T. 2011. Transcription Factor GreA Contributes to Resolving Promoter-Proximal Pausing of RNA Polymerase in *Bacillus subtilis* Cells. *Journal of Bacteriology*, 193, 3090-3099.
- Kwon, D.H. and Lu, C.D. 2006. Polyamines induce resistance to cationic peptide, aminoglycoside, and quinolone antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Antimicrob Agents Chemother*, 50, 1615-1622.

- Kriel, A., Brinsmade, S.R., Tse, J.L., Tehranchi, A.K., Bittner, A.N., Sonenshein, A.L. and Wang, J.D. 2014. GTP dysregulation in *Bacillus subtilis* cells lacking (p)ppGpp results in phenotypic amino acid auxotrophy and failure to adapt to nutrient downshift and regulate biosynthesis genes. *J Bacteriol.*, 196, 189-201.
- Lakshmanan, M., Yu, K., Koduru, L. and Lee, D.-Y. 2015. In silico model-driven cofactor engineering strategies for improving the overall NADP(H) turnover in microbial cell factories. *J Ind Microbiol Biotechnol* 42, 1401-1414 DOI 10.1007/s10295-015-1663-0.
- Larsson, J.T., Rogstam, A. and von Wachenfeldt, C. 2005. Coordinated patterns of cytochrome bd and lactate dehydrogenase expression in *Bacillus subtilis*. *Microbiol.*, 151, 3323-3335.
- Lee, J.M., Gianchandani, E.P., Eddy, J.A. and Papin, J.A. 2008. Dynamic Analysis of Integrated Signaling, Metabolic, and Regulatory Networks. *PLoS Comput Biol*, 4(5): e1000086.
- Lerondel, G., Doan, T., Zamboni, N., Sauer, U. and Aymerich, S. 2006. YtsJ Has the Major Physiological Role of the Four Paralogous Malic Enzyme Isoforms in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 188, 4727-4736.
- Leyn, S.A., Kazanov, M.D., Sernova, N.V., Ermakova, E.O., Novichkov, P.S. and Rodionov, D.A. 2013. Genomic Reconstruction of Transcriptional Regulatory Network in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 195, 2463-2473.
- Li, H., Zhang, G., Deng, A., Chen, N. and Wen, T. 2011. De novo engineering and metabolic flux analysis of inosine biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *Biotechnol Lett*, 33, 1575-1580.
- Li, S., Huang, D., Li, Y., Wen, J. and Jia, X. 2012. Rational improvement of the engineered isobutanol-producing *Bacillus subtilis* by elementary mode analysis. *Microbial Cell Factories*, 11:101.
- Lee, J., Yun, H., Feist, A.M., Palsson, B.Ø. and Lee, S.Y. 2008. Genome-scale reconstruction and in silico analysis of the *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 metabolic network. *Appl Microbiol Biotechnol*, 80, 849-862.
- Laemmli, U.K. 1970. SDS-page Laemmli method. *Nature*, 227, 680-685.
- Laalami, S., Bessieres, P., Rocca, A., Zig, L., Nicolas, P. and Putzer, H. 2013. *Bacillus subtilis* RNase Y Activity In Vivo Analysed by Tiling Microarrays. *PLoS ONE*, 8(1): e54062.
- Lee, J.M., Zhang, S., Saha, S., Anna, S.S., Jiang, C. and Perkins, J. 2001. RNA expression analysis using antisense *Bacillus subtilis* genome array. *J. Bacteriol.*, 183, 7371-7380.

- Lee, Y.H., Kingston, A.W. and Helmann, J.D. 2012. Glutamate Dehydrogenase Affects Resistance to Cell Wall Antibiotics in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 194, 993-1001.
- Lehnik-Habrink, M., Rempeters, L., Kovács, A.T., Wrede, C, Baierlein, C, Krebber, H., Kuipers, O.P. and Stülke, J. 2013. DEAD-Box RNA Helicases in *Bacillus subtilis* Have Multiple Functions and Act Independently from Each Other. *Journal of Bacteriology*, 195, 534-544.
- Lorca, G.L., Chung, Y.J., Barabote, R.D., Weyler, W., Schilling, C.H. and Saier, M.H. Jr. 2005. Catabolite repression and activation in *Bacillus subtilis*: Dependency on CcpA, HPr and HprK. *J. Bacteriol.*, 187, 7826-7839.
- Lulko, A.T., Buist, G., Kok, J. and Kuipers, O.P. 2007. Transcriptome analysis of temporal regulation of carbon metabolism by CcpA in *Bacillus subtilis* reveals additional target genes. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 12, 82-95.
- Leelakriangsak, M., Huyen, N.T.T., Töwe, S., van Duy, N., Becher, D., Hecker, M., Antelmann, H. and Zuber, P. 2008. Regulation of quinone detoxification by the thiol stress sensing DUF24/MarR-like repressor, YodB in *B.subtilis*. *Mol. Microbiol.*, 67, 1108-1124.
- Luciano, J., Foulquier, E., Fantino, J.R., Galinier, A. and Pompeo, F. 2009. Characterization of YvcJ, a conserved P-loop-containing protein, and its implication in competence in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 191, 1556-1564.
- Lulko, A.T., Veening, J.W., Buist, G., Smits, W.K. , Blom, E.J., Beekman, A.C., Bron, S. and Kuipers, O.P. 2007. Production and secretion stress caused by overexpression of heterologous α -amylase leads to inhibition of sporulation and a prolonged motile phase in *B.subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73, 5354-5362.
- Lin, J.T., Connelly, M.B., Amolo, C., Otani, S. and Yaver, D.S. 2005. Global transcriptional response of *B. subtilis* to treatment with subinhibitory concentrations of antibiotics that inhibit protein synthesis. *Antimicrob. Agents Chemother*, 49, 1915-1926.
- Liu, D., Ai, G., Zheng, Q., Liu, C., Jiang, C., Liu, L., Zhang, B., Liu, Y., Yang, C. and Liu, S. 2014. Metabolic flux responses to genetic modification for shikimic acid production by *Bacillus subtilis* strains. *Microbial Cell Factories*, 13:40.
- Leichert, L.I.O., Scharf, C. and Hecker, M. 2003. Global Characterization of Disulfide Stress in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 185, 1967-1975.
- Ludwig, H., Meinken, C., Matin, A. and Stülke, J. 2002. Insufficient expression of the *ilv-leu* operon encoding enzymes of branched-chain amino acid biosynthesis limits growth of a *Bacillus subtilis ccpA* mutant. *J Bacteriol.*, 184, 5174-5178.

- Ludwig, H., Homuth, G., Schmalisch, M., Dyka, F.M., Hecker, M. and Stülke, J. 2001. Transcription of glycolytic genes and operons in *Bacillus subtilis*: evidence for the presence of multiple levels of control of the *gapA* operon. *Mol Microbiol.*, 41, 409-422.
- Msadek, T., Kunst, F., Klier, A. and Rapoport, G. 1991. DegS-DegU and ComP-ComA modulator-effector pairs control expression of the *Bacillus subtilis* pleiotropic regulatory gene *degQ*. *Journal of Bacteriology*, 173, 2366-2377.
- Ma, H., Zhao, X. and Guo, X. 2002. Calculation of Empirical and True Maintenance Coefficients by Flux Balance Analysis. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 10, 89-92.
- Mahadevan, R. and Lovley, D.R. 2008. The Degree of redundancy in metabolic genes is linked to mode of metabolism. *Biophysical Journal*, 94, 1216-1220.
- Motamedian, E. and Naeimpoor, F. 2011. Flux distribution in *Bacillus subtilis*: inspection on plurality of optimal solutions. *Iranian Journal of Biotechnology*, 19, 260-266.
- Motamedian, E. and Naeimpoor, F. 2011. Prediction of Proton Exchange and Bacterial Growth on Various Substrates Using Constraint-based Modeling Approach. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 16, 875-884.
- Morimoto, T., Kadoya, R., Endo, K., Tohata, M., Sawada, K., Liu, S., Ozawa, T., Kodama, T., Kakeshita, H., Kageyama, Y., Manabe, K., Kanaya, S., Ara, K., Ozaki, K. and Ogasawara, N. 2008. Enhanced recombinant protein productivity by genome reduction in *Bacillus subtilis*. *DNA Res*, 15, 73-81.
- Murphy, D. 2002. Gene expression studies using microarrays: principles, problems and prospects. *Advances in Physiology Education*, 26, 256-270.
- Majumdar, D., Avissar, Y.J. and Wyche, J.H. 1991. Simultaneous and rapid isolation of bacterial and eukaryotic DNA and RNA: A new approach for isolating DNA. *Biotechniques*, 11, 94-101.
- Moreno, M.S., Schneider, B.L., Maile, R.R., Weyler, W. and Saier, M.H. Jr. 2001. Catabolite repression mediated by the CcpA protein in *Bacillus subtilis*: Novel modes of regulation revealed by whole-genome analysis. *Mol. Microbiol.*, 39, 1366-1381.
- Molle, V., Fujita, M., Jensen, S.T., Eichenberger, P., González-Pastor, J.E., Liu, J.S. and Losick, R. 2003. The Spo0A regulon of *B. subtilis*. *Mol. Microbiol.*, 50, 1683-1701.
- Mader, U., Antelmann, H., Buder, T., Dahl, M.K., Hecker, M. and Homuth, G. 2002. *B. subtilis* functional genomics: Genome-wide analysis of the DegS-DegU regulon by transcriptomics and proteomics. *Mol. Genet. Genomics*, 268, 455-467.

- Molle, V., Nakaura, Y., Shivers, R.P., Yamaguchi, H., Losick, R., Fujita, Y. and Sonenshein, A.L. 2003. Additional targets of the *B. subtilis* global regulator CodY identified by chromatin immunoprecipitation and genome-wide transcript analysis. *J. Bacteriol.*, 185, 1911-1922.
- Mostertz, J., Hochgrafe, F., Jürgen, B., Schweder, T. and Hecker, M. 2008. The role of thioredoxin TrxA in *Bacillus subtilis*: A proteomics and transcriptomics approach. *Proteomics*, 8, 2676-2690.
- Matsuoka, H., Hirooka, K. and Fujita, Y. 2007. Organization and function of the YsiA regulon of *Bacillus subtilis* involved in fatty acid degradation. *J. Biol. Chem.*, 282, 5180-5194.
- MacLellan, S.R., Wecke, T. and Helmann, J.D. 2008. A previously unidentified σ factor and two accessory proteins regulate oxalate decarboxylase expression in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.*, 69, 954-967.
- Moore, C.M., Nakano, M.M., Wang, T., Ye, R.W. and Helmann, J.D. 2004. Response of *B. subtilis* to nitric oxide and the nitrosating agent sodium nitroprusside. *J. Bacteriol.*, 186, 4655-4664.
- Mäder, U., Homuth, G., Scharf, C., Büttner, K., Bode, R. and Hecker, M. 2002. Transcriptome and proteome analysis of *Bacillus subtilis* gene expression modulated by amino acid availability. *J. Bacteriol.*, 184, 4288-4295.
- Mascher, T., Margulis, N.G., Wang, T., Ye, R.W. and Helmann, J.D. 2003. Cell wall stress responses in *B.subtilis*. The regulatory network of bacitracin stimulon. *Mol. Microbiol.*, 50, 1591-1604.
- Miethke, M., Westers, H., Blom, E.J., Kuipers, O.P. and Marahiel, M.A. 2006. Iron starvation triggers the stringent response and induces amino acid biosynthesis for bacillobactin production in *B.subtilis*. *J. Bacteriol.*, 188, 8655-8657.
- Mostertz, J., Scharf, C., Hecker, M. and Homut, G. 2004. Transcriptome and proteome analysis of *Bacillus subtilis* gene expression in response to superoxide and peroxide stress. *Microbiology-SGM*, 150, 497-512.
- Moore, C.M., Gaballa, A., Hui, M., Ye, R.W. and Helmann, J.D. 2005. Genetic and physiological responses of *B. subtilis* to metal ion stress. *Mol. Microbiol.*, 57, 27-40.
- Maughan, H., Birky, Jr. C.W. and Nicholson, W.L. 2009. Transcriptome divergence and the loss of plasticity in *Bacillus subtilis* after 6,000 generations of evolution under relaxed selection for sporulation. *J.Bacteriol.*, 191, 428-433.
- Maughan, H. and Nicholson, W.L. 2011. Increased Fitness and Alteration of Metabolic Pathways during *Bacillus subtilis* Evolution in the Laboratory. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 4105-4118.

- Moses, S., Sinner, T., Zapras, A., Stöveken, N., Hoffmann, T., Belitsky, B.R., Sonenshein, A.L. and Bremer, E. 2012. Proline utilization by *Bacillus subtilis*: uptake and catabolism. *J Bacteriol.*, 194, 745-758.
- Michna, R.H., Commichau, F.M., Tödter, D., Zschiedrich, C.P. and Stülke, J. 2014. *SubtiWiki*-a database for the model organism *Bacillus subtilis* that links pathway, interaction and expression information, *Nucleic Acids Res.*, 42, D692-D698.
- Montgomery, D.C., Runger, G.C. and Hubele, N.F. 2012. *Engineering Statistics*. Fifth Edition. John Wiley and Sons, Inc.
- Msadek, T., Kunst, F., Henner, D., Klier, A., Rapoport, G. and Dedonder, R. 1990. Signal Transduction Pathway Controlling Synthesis of a Class of Degradative Enzymes in *Bacillus subtilis*: Expression of the Regulatory Genes and Analysis of Mutations in *degS* and *degU*. *Journal of Bacteriology*, 172, 824-834.
- Nakayama, A., Ando, K., Kawamura, K., Mita, I., Fukazawa, K., Hori, M., Honjo, M. and Furutani, Y. 1988. Efficient secretion of the authentic mature human growth hormone by *Bacillus subtilis*. *Journal of Biotechnology*, 8, 123-134.
- Nielsen, J. and Villadsen, J. 1994. *Bioreaction Engineering Principles*. Plenum Press. New York.
- Nannapaneni, P., Hertwig, F., Depke, M., Hecker, M., Mader, U., Volker, U., Steil, L. and van Hijum, S.A.F.T. 2012. Defining the structure of the general stress regulon of *Bacillus subtilis* using targeted microarray analysis and random forest classification. *Microbiology*, 158, 696-707.
- Nakano, S., Küster-Schöck, E., Grossman, A.D. and Zuber, P. 2003. Spx-dependent global transcriptional control is induced by thiol-specific oxidative stress in *B. subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100, 13603-13608.
- Nicolas, P., Mäder, U., Dervyn, E., Rochat, T., Leduc, A., Pigeonneau, N., Bidnenko, E., Marchadier, E., Hoebeke, M., Aymerich, S., Becher, D., Bisicchia, P., Botella, E., Delumeau, O., Doherty, G., Denham, E.L., Fogg, M.J., Fromion, V., Goelzer, A., Hansen, A., Härtig, E., Harwood, C.R., Homuth, G., Jarmer, H., Jules, M., Klipp, E., Le Chat, L., Lecoq, F., Lewis, P., Liebermeister, W., March, A., Mars, R.A., Nannapaneni, P., Noone, D., Pohl, S., Rinn, B., Rügheimer, F., Sappa, P.K., Samson, F., Schaffer, M., Schwikowski, B., Steil, L., Stülke, J., Wiegert, T., Devine, K.M., Wilkinson, A.J., van Dijk, J.M., Hecker, M., Völker, U., Bessi res, P. and Noirot P. 2012. Condition dependent transcriptome reveals high-level regulatory architecture in *Bacillus subtilis*. *Science*, 335, 1103-1106.
- Nicholson, W.L., Moeller, R., the PROTECT Team and Horneck, G. 2012. Transcriptomic Responses of Germinating *Bacillus subtilis* Spores Exposed to 1.5 Years of Space and Simulated Martian Conditions on the EXPOSE-E Experiment PROTECT. *Astrobiology*, 12, 469-486.

- Nelson, D.L. and Cox, M.M. 2008. *Lehninger Principles of Biochemistry*. Fifth Edition. W.H. Freeman and Company. New York.
- Ogura, M., Shimane, K., Asai, K., Ogasawara, N. and Tanaka, T. 2003. Binding of response regulator DegU to the *apr* promoter is inhibited by RapG, which is counteracted by extracellular PhrG in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 49, 1685-1697.
- Olmedo, G., Ninfa, E.G., Stock, J. and Youngman, P. 1990. Novel mutations that alter the regulation of sporulation in *Bacillus subtilis*. Evidence that phosphorylation of regulatory protein Spo0A controls the initiation of sporulation. *Journal of Molecular Biology*, 215, 359-372.
- Oberhardt, M.A., Palsson, B.O. and Papin, J.A. 2009. Applications of genome-scale metabolic reconstructions. *Molecular Systems Biology*, 5:320.
- Oh, Y.K., Palsson, B.O., Park, S.M., Schilling, C.H. and Mahadevan, R. 2007. Genome-scale Reconstruction of Metabolic Network in *Bacillus subtilis* Based on High-throughput Phenotyping and Gene Essentiality Data. *J Biol Chem*, 282, 28791-28799.
- Oh, M.K. and Liao, J.C. 2000. Gene expression profiling by DNA microarrays and metabolic fluxes in *Escherchia coli*. *Biotechnology Progress*, 16, 278-286.
- Ogura, M., Yamaguchi, H., Yoshida, K., Fujita, Y. and Tanaka, T. 2001. DNA microarray analysis of *Bacillus subtilis* DegU, ComA and PhoP regulons: An approach to comprehensive analysis of *Bacillus subtilis* two-component regulatory systems. *Nucleic Acids Res.*, 29, 3804-3813.
- Ogura, M. and Tanaka, T. 2002. Recent progress in *B. subtilis* two-component regulation. *Front. Biosci.*, 7, 1815-1824.
- Ogura, M., Yamaguchi, H., Kobayashi, K., Ogasawara, N. , Fujita, Y. and Tanaka, T. 2002. Whole-genome analysis of genes regulated by the *B. subtilis* competence transcription factor ComK. *J. Bacteriol.*, 184, 2344-2351.
- Ogura, M. and Fujita, Y. 2007. *B. subtilis rapD*, a direct target of transcription repression by RghR, negatively regulates *srfA* expression. *FEMS Microbiol. Lett.*, 268, 73-80.
- Oomes, S.J.C.M. and Brul, S. 2004. The effect of metal ions commonly present in food on gene expression of sporulating *Bacillus subtilis* cells in relation to spore wet heat resistance. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 5, 307-316.
- Ohashi, Y., Inaoka, T., Kasai, K., Ito, Y., Okamoto, S., Satsu, H., Tozawa, Y., Kawamura, F. and Ochi, K. 2003. Expression profiling of translation-

associated genes in sporulating *B. subtilis* and consequence of sporulation by gene inactivation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67, 2245-2253.

- Ochiai, A., Itoh, T., Kawamata, A., Hashimoto, W. and Murata, K. 2007. Plant cell wall degradation by saprophytic *B. subtilis* strains: Gene clusters responsible for rhamnogalacturonan depolymerization. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73, 3803-3813.
- Oomes S.J.C.M., Jonker, M.J., Wittink, F.R.A., Hehenkamp, J.O., Breit, T.M. and Brul, S. 2009. The effect of calcium on the transcriptome of sporulating *B. subtilis* cells. *International Journal of Food Microbiology*, 133, 234-242.
- Otridge, J. and Gollnick, P. 1993. MtrB from *Bacillus subtilis* binds specifically to trp leader RNA in a tryptophan-dependent manner (RNA-binding protein/transcription regulator/RNA mobility-shift assay). *Proc Natl Acad Sci USA*, 90, 128-132.
- Özdamar, T.H., Şentürk, B., Yılmaz, Ö.D., Çalık, G., Çelik, E. and Çalık, P. 2009. Expression system for recombinant human growth hormone production from *Bacillus subtilis*. *Biotechnol Prog*, 25, 75-84.
- Özdamar, T.H., Şentürk, B., Yılmaz, Ö.D., Kocabaş, P., Çalık, G. and Çalık, P. 2010. Bioreaction network flux analysis for human protein producing *Bacillus subtilis* based on genome-scale model. *Chemical Engineering Science*, 65, 574-580.
- Özdamar, T.H. and Çalık, G. 2013. Rekombinant Terapötik Protein Üretim Verimini Artırmak İçin Biyokimyasal Reaksiyon Mühendisliği Prensipleriyle Strateji Geliştirilmesi. TÜBİTAK Proje No: 109R025; Ankara.
- Papoutsakis, E.T. 1984. Equations and calculations for fermentations of butyric acid bacteria. *Biotechnol. Bioeng.*, 26, 174-187.
- Papoutsakis, E.T. and Meyer, C.L. 1985. Equations and calculations of product yields and preferred pathways for butanediol and mixed-acid fermentations. *Biotechnol. Bioeng.*, 27, 50-66.
- Palsson, B. 2006. *Systems biology: properties of reconstructed networks*. Cambridge University Press, 40 West 20th Street, New York, NY 10011-4211, USA
- Perego, M., Spiegelman, G.B. and Hoch, J.A. 1988. Structure of the gene for the transition state regulator, *abrB*: regulator synthesis is controlled by the *spo0A* sporulation gene in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 2, 689-699.
- Perego, M., and Hoch, J.A. 1988. Sequence analysis and regulation of the *hpr* locus, a regulatory gene for protease production and sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 170, 2560-2567.

- Price, N.D., Reed, J.L. and Palsson, B.O. 2004. Genome-scale models of microbial cells: Evaluating the consequences of constraints. *Nature Reviews in Microbiology*, 2, 886-897.
- Pan, Z., Cunningham, D.S., Zhu, T., Ye, K., Koepsel, R.R., Domach, M.M. and Ataai, M.M. 2010. Enhanced recombinant protein production in pyruvate kinase mutant of *Bacillus subtilis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 85, 1769-1778.
- Petersohn, A., Brigulla, M., Haas, S., Hoheisel, J.D. , Völker, U. and Hecker, M. 2001. Global analysis of general stress response of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 183, 5617-5631.
- Phan, T.T. and Schumann, W. 2009. Transcriptional analysis of the lysine-responsive and riboswitch-regulated *lysC* gene of *Bacillus subtilis*. *Curr Microbiol.*, 59, 463-468.
- Perego, M., and Hoch, J.A. 1988. Sequence analysis and regulation of the *hpr* locus, a regulatory gene for protease production and sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 170, 2560-2567.
- Rühl, M., Zamboni, N. and Sauer, U. 2010. Dynamic Flux Responses in Riboflavin Overproducing *Bacillus subtilis* to Increasing Glucose Limitation in Fed-Batch Culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 105, 795-804.
- Rühl, M., Le Coq, D., Aymerich, S. and Sauer, U. 2012. ¹³C-flux Analysis Reveals NADPH-balancing Transhydrogenation Cycles in Stationary Phase of Nitrogen-starving *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.*, 287, 27959-27970.
- Rühl, M., Rupp, B., Nöh, K., Wiechert, W., Sauer, U. and Zamboni, N. 2012. Collisional Fragmentation of Central Carbon Metabolites in LC-MS/MS Increases Precision of ¹³C Metabolic Flux Analysis. *Biotechnology and Bioengineering*, 109, 763-771.
- Rantanen, A., Rousu, J., Jouhten, P., Zamboni, N., Maaheimo, H. and Ukkonen, E. 2008. An analytic and systematic framework for estimating metabolic flux ratios from ¹³C tracer experiments. *BMC Bioinformatics*, 9:266.
- Ren, D., Bedzyk, L.A., Setlow, P., Thomas, S.M. , Ye, R.W. and Wood, T.K. 2004. Gene expression in *B. subtilis* surface biofilms with and without sporulation and the importance of *yveR* for biofilm and maintenance. *Biotechnol. Bioeng.*, 86, 344-364.
- Ren, D., Bedzyk, L.A., Setlow, P., England, D.F., Kjelleberg, S., Thomas, S.M., Ye, R.W. and Wood, T.K. 2004. Differential gene expression to investigate the effect of (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone on *B.subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 4941-4949.

- Rogstam, A., Larsson, J.T., Kjelgaard, P. and von Wachenfeldt, C. 2007. Mechanisms of adaptation to nitrosative stress in *B.subtilis*. J. Bacteriol., 189, 3063-3071.
- Rukmana, A., Morimoto, T., Takahashi, H., Giyanto, and Ogasawara N. 2009. Assesment of transcriptional responses of *Bacillus subtilis* cells to the antibiotic enduracidin, which interferes with cell wall synthesis, using a high-density tiling chip. Genes and Genetic Systems, 84, 253-267.
- Reents, H., Münch, R., Dammeyer, T., Jahn, D. and Härtig, E. 2006. The Fnr regulon of *Bacillus subtilis*. J Bacteriol., 188, 1103-1112.
- Simonen, M. and Palva, I., 1993. Protein secretion in *Bacillus* species. Microbiol. Rev., 57, 109-137.
- Shafikhani, S.H., Mandic-Mulec, I., Strauch, M.A., Smith, I. and Leighton, T. 2002. Postexponential regulation of *sin* operon expression in *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology, 184, 564-571.
- Stephanopoulos, G. and Vallino, J.J. 1991. Network rigidity and metabolic engineering in metabolite overproduction. Science 252, 1675-1681.
- Strauch, M.A., Spiegelman, G., Perego, M., Johnson, W., Burbulys, D. and Hoch, J. 1989. The transition state transcription regulator *abrB* of *Bacillus subtilis* is a DNA binding protein. EMBO Journal, 8, 1615-1621.
- Shimotsu, H. and Henner, D.J. 1986. Modulation of *Bacillus subtilis* levansucrase gene expression by sucrose and regulation of the steady-state mRNA level by *sacU* and *sacQ* genes. Journal of Bacteriology, 168, 380-388.
- Smith, I. 1993. Regulatory proteins that control late-growth development, In A. L. Sonenshein, J. A. Hoch, and R. Losick (ed.), *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria: biochemistry, physiology, and molecular genetics. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 785-800.
- Schilling, C.H. and Palsson, B.O. 1998. The underlying pathway structure of biochemical reaction networks. Proceedings of National Academy of Sciences, 95, 4193-4198.
- Savageau, M.A. 2001. Design principles for elementary gene circuits: Elements, methods, and examples. Chaos, 11, 142-159.
- Schmidt, K. and Isaacs, S. H. 1995. An evolutionary algorithm for initial state and parameter estimation in complex biochemical models. Proc.6th Int. Conf. on Computer Application in Biotechnology, 239-242.
- Sauer, U., Hatzimanikatis, V., Hohmann, H.P., Manneberg, M., van Loon A.P.G.M. and Bailey, J.E. 1996. Physiology and Metabolic Fluxes of Wild-Type and

Riboflavin-Producing *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 3687-3696.

Schilling, O., Frick, O., Herzberg, C., Ehrenreich, A., Heinzle, E., Wittmann, C. and Stülke, J. 2007. Metabolic Adaptation Important but Not Sufficient To Account for Organic Acids: Transcription Regulation Is to the Availability of *Bacillus subtilis* of Transcriptional and Metabolic Responses. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73, 499-506.

Skolpap, W., Nuchprayoon, S., Scharer, J.M. and Moo-Young, M. 2007. Parametric analysis of metabolic fluxes of α -amylase and protease-producing *Bacillus subtilis*. *Bioprocess Biosyst Eng*, 30, 337-348.

Shuler, M.L. and Kargi, F. 1992. *Bioprocess Engineering Basic Concepts*. Prentice-Hall, Inc., New Jersey.

Stephanopoulos, G.N., Aristidou, A.A. and Nielsen, J. 1998. *Metabolic Engineering. Principles and Methodologies*. Academic Press. Elsevier Science, USA.

Supudomchok, S., Chaiyaratana, N. and Phalakornkule, C. 2008. Co-operative Co-evolutionary Approach for Flux Balance in *Bacillus subtilis*. *IEEE Congress on Evolutionary Computation (CEC 2008)*.

Song, P., Chen, C., Tian, Q., Lin, M., Huang, H. and Li, S. 2013. Two-stage oxygen supply strategy for enhanced lipase production by *Bacillus subtilis* based on metabolic flux analysis. *Biochemical Engineering Journal*, 71, 1-10.

Srivastava, R.K., Maiti, S.K., Das, D. and Bapat, P.M. 2012. Metabolic flexibility of D-ribose producer strain of *Bacillus pumilus* under environmental perturbations. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 39, 1227-1243.

Sambrook, J. and Russell, D.W. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sekowska, A., Robin, S., Daudin, J.J., Henaut, A. and Danchin, A. 2001. Extracting biological information from DNA arrays: An unexpected link between arginine and methionine metabolism in *Bacillus subtilis*. *Genome Biol.*, 2:research0019-research0019.12

Serio, A.W., Pechter, K.B. and Sonenshein, A.L. 2006. *Bacillus subtilis* aconitase is required for efficient late-sporulation gene expression. *J.Bacteriol.*, 188, 6396-6405.

Serizawa, M., Kodama, K., Yamamoto, H., Kobayashi, K., Ogasawara, N. and Sekiguchi, J. 2005. Functional analysis of the YvrGHb two-component system of *B.subtilis*: Identification of the regulated genes by DNA microarray and northern blot analyses. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 69, 2155-2169.

- Silvaggi, J.M., Perkins, J.B. and Losick, R. 2005. Small untranslated RNA antitoxin in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 187, 6641-6650.
- Serizawa, M., Yamamoto, H., Yamaguchi, H., Fujita, Y., Kobayashi, K., Ogasawara, N. and Sekiguchi, J. 2004. Systematic analysis of SigD-regulated genes in *B. subtilis* by DNA microarray and northern blotting analysis. *Gene*, 329, 125-136.
- Steil, L., Serrano, M., Henriques, A.O. and Völker, U. 2005. Genome-wide analysis of temporally regulated and compartment-specific gene expression in sporulating cells of *Bacillus subtilis*. *Microbiology-SGM*, 151, 399-420.
- Smits, W.K., Dubois, J. Y. F., Bron, S., van Dijl, J.M. and Kuipers, O.P. 2005. Tricksy business: Transcriptome analysis reveals the involvement of thioredoxin A in redox homeostasis, oxidative stress, sulfur metabolism and cellular differentiation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 187, 3921-3930.
- Salzberg, L.I. and Helmann, J.D. 2008. Phenotypic and transcriptomic characterization of *Bacillus subtilis* mutants with grossly altered membrane composition. *J. Bacteriol.*, 190, 7797-7807.
- Serio, A.W. and Sonenshein, A.L. 2006. Expression of yeast mitochondrial aconitase in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 188, 6406-6410.
- Schyns, G., Potot, S., Geng, Y., Barbosa, T.M. , Henriques, A. and Perkins, J.B. 2005. Isolation and characterization of new thiamine-deregulated mutants of *B.subtilis*. *J. Bacteriol.*, 187, 8127-8136.
- Sioud, M., Boudabous, A. and Cekaite, L. 2009. Transcriptional responses of *Bacillus subtilis* and *thuringiensis* to antibiotics and anti-tumour drugs. *Int. J. Mol. Med.*, 23, 33-39.
- Steil, L., Hoffmann, T., Budde, I., Völker, U. and Bremer, E. 2003. Genome-wide transcriptional profiling analysis of adaptation of *B. subtilis* to high salinity. *J. Bacteriol.*, 185, 6358-6370.
- Silvaggi, J.M., Perkins, J.B. and Losick, R. 2006. Genes for small, noncoding RNAs under sporulation control in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 188, 532-541.
- Simmons, L.A., Goranov, A.I., Kobayashi, H., Davies, B.W., Yuan, D.S, Grossman, A.D. and Walker, G.C. 2009. Comparison of Responses to Double-Strand Breaks between *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* Reveals Different Requirements for SOS Induction. *Journal of Bacteriology*, 191, 1152-1161.
- Stanley, N.R., Britton, R.A., Grossman, A.D. and Lazazzera, B.A. 2003. Identification of Catabolite Repression as a Physiological Regulator of Biofilm Formation by *Bacillus subtilis* by Use of DNA Microarrays. *Journal of Bacteriology*, 185, 1951-1957.

- Szkotak, R., Niepa, T.H.R., Jawrani, N., Gilbert, J.L., Jones, M.B. and Ren, D. 2011. Differential Gene Expression to Investigate the Effects of Low-level Electrochemical Currents on *Bacillus subtilis*. *AMB Express* 1:39.
- Schmalisch, M., Maiques, E., Nikolov, L., Camp, A.H., Chevreux, B., Muffler, A., Rodriguez, S., Perkins, J. and Losick, R. 2010. Small Genes under Sporulation Control in the *Bacillus subtilis* genome. *Journal of Bacteriology*, 192, 5402-5412.
- Sonenshein, A.L., Hoch, J.A. and Losick, R., 2002. *Bacillus subtilis* and Its Closest Relatives. From Genes to Cells, American Society of Microbiology, Washington, D. C.
- Smallbone, K., Simeonidis, E., Swainston, N., and Mendes, P. 2010. Towards a genome-scale kinetic model of cellular metabolism. *BMC Systems Biology*, 4:6.
- Şenver Özçelik, İ. 2003. Genetik Mühendisliği ve Metabolik Yolizi Mühendisliği Teknikleriyle L-Fenilalanin Üretimi İçin Biyoteknolojik Proses Geliştirilmesi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Ankara.
- Şahin, M. 2010. Effects of Regulatory Genes on Recombinant Human Growth Hormone Production by *Bacillus subtilis*. Middle East Technical University, M. Sc. Thesis.
- Tjalsma, H., Bolhuis, A., Jongbloed, J. D. H., Bron, S. and Van Dijl, J. M. 2000. Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64, 515-547.
- Teusink, B. and Smid, E.J. 2005. Modelling strategies for the industrial exploitation of lactic acid bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 4, 46-56.
- Tanaka, K., Henry, C.S., Zinner, J.F., Jolivet, E., Cohoon, M.P., Xia, F., Bidnenko, V., Ehrlich, S.D., Stevens, R.L. and Noirot, P. 2013. Building the repertoire of dispensable chromosome regions in *Bacillus subtilis* entails major refinement of cognate large-scale metabolic model. *Nucleic Acids Res*, 41, 687-699.
- Tam, L.T., Eymann, C., Albrecht, D., Sietmann, R., Schauer, F., Hecker, M. and Antelmann, H. 2006. Differential gene expression in response to phenol and catechol reveals different metabolic activities for the degradation of aromatic compounds in *B.subtilis*. *Environ. Microbiol.*, 8, 1408-1427.
- Tang, M.R., Sternberg, D., Behr, R.K., Sloma, A. and Berka, R.M. 2006. Use of transcriptional profiling and bioinformatics to solve production problems: Eliminating red pigment production in a *Bacillus subtilis* strain producing hyaluronic acid. *Industrial Biotechnology*, 2, 66-74.

- Tojo, S., Matsunaga, M., Matsumoto, T., Kang, C.M., Yamaguchi, H., Asai, K., Sadaie, Y., Yoshida, K. and Fujita, Y. 2003. Organization and expression of the *Bacillus subtilis sigY* operon. *J. Biochem.*, 134, 935-946.
- Tojo, S., Satomura, T., Morisaki, K., Yoshida, K., Hirooka, K. and Fujita, Y. 2004. Negative transcriptional regulation of the *ilv-leu* operon for biosynthesis of branched-chain amino acids through the *Bacillus subtilis* global regulator TnrA. *J Bacteriol.*, 186, 7971-7979.
- Tojo, S., Kumamoto, K., Hirooka, K. and Fujita, Y. 2010. Heavy Involvement of Stringent Transcription Control Depending on the Adenine or Guanine Species of the Transcription Initiation Site in Glucose and Pyruvate Metabolism in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 192, 1573-1585.
- Tepper, N. and Shlomi, T. 2013. An integrated computational approach for metabolic flux analysis coupled with inference of tandem-MS collisional fragments. *Bioinformatics*, 29, 3045-3052.
- Toya, Y., Hirasawa, T., Morimoto, T., Masuda, K., Kageyama, Y., Ozaki, K., Ogasawara, N. and Shimizu, H. 2014. ¹³C-metabolic flux analysis in heterologous cellulase production by *Bacillus subtilis* genome-reduced strain. *Journal of Biotechnology*, 179, 42-49.
- Towbin, H., Staehelin J. and Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *The Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 76, 4350-4354.
- Ter Beek, A., Wijman, J.G.E., Zakrzewska, A., Orij, R., Smits, G.J. and Brul, S. 2015. Comparative physiological and transcriptional analysis of weak organic acid stress in *Bacillus subtilis*. *Food Microbiology*, 45, 71-82.
- Vallino, J.J. and Stephanopoulos, G. 1993. Metabolic flux distributions in *Corynebacterium glutamicum* during growth and lysine overproduction. *Biotechnology and Bioengineering* 41, 633-646.
- Varma, A. and Palsson, B.O. 1995. Parametric sensitivity of stoichiometric flux balance models applied to wild-type *Escherchia coli* metabolism. *Biotechnology and Bioengineering* 45, 69-79.
- Vary, P.S., Biedendieck, R., Fuerch, T., Meinhardt, F., Rohde, M., Deckwer, W.D. and Jahn, D. 2007. *Bacillus megaterium*-from simple soil bacterium to industrial protein production host. *Appl Microbiol Biotechnol*, 76, 957-967.
- Veith, B., Herzberg, C., Steckel, S., Feesche, J., Maurer, K.H., Ehrenreich, P., Bäumer, S., Henne, A., Liesegang, H., Merkl, R., Ehrenreich, A. and Gottschalk, G. 2004. The complete genome sequence of *Bacillus licheniformis* DSM13, an organism with great industrial potential. *J Mol Microbiol Biotechnol.*, 7, 204-211.

- van Sinderen, D. and Venema, G. 1994. *comK* acts as an autoregulatory control switch in signal transduction route to competence in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol., 176, 5762-5770.
- Völker, U., Engelmann, S., Maul, B., Riethdorf, S., Völker, A., Schmid, R., Mach, H. and Hecker, M. 1994. Analysis of the induction of general stress proteins of *Bacillus subtilis*. Microbiology-SGM, 140, 741-752.
- Veening, J.W., Igoshin, O.A., Eijlander, R.T., Nijland, R., Hamoen, L.W. and Kuipers, O.P. 2008. Transient heterogeneity in extracellular protease production by *Bacillus subtilis*. Mol. Syst. Biol., 4, 1-15.
- Vázquez, C.D., Freyre-González, J.A., Gosset, G., Loza, J.A. and Gutiérrez-Ríos, R.M. 2009. Identification of network topological units coordinating the global expression response to glucose in *Bacillus subtilis* and its comparison to *Escherichia coli*. BMC Microbiology, 9:176.
- Voet, D., Voet, J.G. and Pratt, C.W. 2002. Fundamentals of Biochemistry Upgrade Edition. John Wiley & Sons, Inc.
- Westers, L., Westers, H. and Quax, J.W. 2004. *Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism, Biochimica Et Biophysica Acta, 1694, 299-310.
- Westers, H., Dorenbos, R., van Dijl, J.M., Kabel, J., Flanagan, T., Devine, K.M., Jude, F., Séror, S.J., Beekman, A.C., Darmon, E., Eschevins, C., de Jong, A., Bron, S., Kuipers, P., Albertini, A.M., Antelmann, H., Hecker, M., Zamboni, N., Sauer, U., Bruand, C., Ehrlich, D.S., Alonso, J.C., Salas, M. and Quax, W.J. 2003. Genome engineering reveals large dispensable regions in *Bacillus subtilis*. Mol. Biol. Evol., 20, 2076-2090.
- Winzeler, E.A., Schena, M. and Davis, R.W. 1999. Fluorescence-based expression monitoring using microarrays. Methods in Enzymology, 306, 3-18.
- Wei, Y., Deikus, G., Powers, B., Shelden, V., Krulwich, T.A. and Bechhofer, D.H. 2006. Adaptive gene expression in *B. subtilis* strains deleted for *tetL*. J. Bacteriol., 188, 7090-7100.
- Watanabe, S., Hamano, M., Kakeshita, H., Bunai, K., Tojo, S., Yamaguchi, H., Fujita, Y., Wong, S.L. and Yamane, K. 2003. Mannitol-1-phosphate dehydrogenase (Mt1D) is required for mannitol and glucitol assimilation in *B.subtilis*. J. Bacteriol., 185, 4816-4824.
- Winter, T., Winter, J., Polak, M., Kusch, K., Mader, U., Sietmann, R., Ehlbeck, J., van Hijum, S., Weltmann, K.D., Hecker, M. and Kusch, H. 2011. Characterization of the global impact of low temperature gas plasma on vegetative microorganisms. Proteomics, 11, 3518-3530.

- Winter, T., Bernhardt, J., Winter, J., Mader, U., Schlüter, R., Weltmann, K., Hecker, M. and Kusch, H. 2013. Common versus noble *Bacillus subtilis* differentially responds to air and argon gas plasma. *Proteomics*, 13, 2608-2621.
- Waters, S.M., Robles-Martínez, J.A. and Nicholson, W.L. 2014. Exposure of *Bacillus subtilis* to low pressure (5 kilopascals) induces several global regulons, including those involved in the SigB-mediated general stress response. *Applied and Environmental Microbiology*, 80, 4788-4794.
- Xie, S., Wu, H., Chen, L., Zang, H., Xie, Y. and Gao, X. 2015. Transcriptome profiling of *Bacillus subtilis* OKB105 in response to rice seedlings. *BMC Microbiology* 15:21.
- Yang, M., Ferrari, E., Chen, E. and Henner, D.J. 1986. Identification of the pleiotropic *sacQ* gene of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 166, 113-119.
- Yang, M., de Saizieu, A., van Loon, A.P.G.M. and Gollnick, P. 1995. Translation of *trpG* in *Bacillus subtilis* is regulated by the *trp* RNA-binding attenuation protein (TRAP). *J Bacteriol.*, 177, 4272-4278.
- Yang, T.H., Frick, O. and Heinzle, E. 2008. Hybrid optimization for ¹³C metabolic flux analysis using systems parametrized by compactification. *BMC Systems Biology*, 2:29.
- Ye, R.W., Wang, T., Bedzyk, L. and Croker, K.M. 2001. Applications of DNA microarrays in microbial systems. *Journal of Microbiological Methods*, 47, 257-272.
- Ye, R.W., Tao, W., Bedzyk, L., Young, T., Chen, M. and Li, L. 2000. Global gene expression profiles of *Bacillus subtilis* grown under anaerobic conditions. *J. Bacteriol.*, 182, 4458-4465.
- Ye, B.C., Zhang, Y., Yu, H., Yu, W.B., Liu, B.H., Yin, B.C., Yin, C.Y., Li, Y.Y., Chu, J. and Zhang, S.L. 2009. Time-Resolved Transcriptome Analysis of *Bacillus subtilis* Responding to Valine, Glutamate, and Glutamine. *PLoS ONE*, 4(9): e7073.
- Yoshida, K., Kobayashi, K., Miwa, Y., Kang, C.M., Matsunaga, M., Yamaguchi, H., Tojo, S., Yamamoto, M., Nishi, R., Ogasawara, N., Nakayama, T. and Fujita, Y. 2001. Combined transcriptome and proteome analysis as a powerful approach to study genes under glucose repression in *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res.*, 29, 683-692.
- Yoshida, K., Yamaguchi, H., Kinehara, M., Ohki, Y., Nakaura, Y. and Fujita, Y. 2003. Identification of additional TnrA-regulated genes of *B. subtilis* associated with a TnrA box. *Mol. Microbiol.*, 49, 157-165.
- Yoshida, K., Ohki, Y.K., Murata, M., Kinehara, M., Matsuoka, H., Satomura, T., Ohki, R., Kumano, M., Yamane, K. and Fujita, Y. 2004. *Bacillus subtilis* LmrA is a

- repressor of the *lmrAB* and *yxaGH* operons: Identification of its binding site and functional analysis of *lmrB* and *yxaGH*. *J. Bacteriol.*, 186, 5640-5648.
- Yu, W.B., Gao, S.H., Yin, C.Y., Zhou, Y. and Ye, B.C. 2011. Comparative Transcriptome Analysis of *Bacillus subtilis* Responding to Dissolved Oxygen in Adenosine Fermentation. *PLoS ONE*, 6(5): e20092.
- Yılmaz, Ö.D. Rekombinant İnsan Büyüme Hormonu Üretimi. Doktora Tezi (basılmamış). Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Ankara.
- Yang, C., Tai, P.C. and Lu, C. 2014. Time-Related Transcriptome Analysis of *B. subtilis* 168 During Growth with Glucose. *Curr Microbiol*, 68, 12-20.
- Zamboni, N. and Sauer, U. 2003. Knockout of the high-coupling cytochrome aa3 oxidase reduces TCA cycle fluxes in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Letters*, 226, 121-126.
- Zamboni, N., Fischer, E., Muffler, A., Wyss, M., Hohmann, H.P. and Sauer, U. 2004. Transient Expression and Flux Changes during a Shift from High to Low Riboflavin Production in Continuous Cultures of *Bacillus subtilis*. *Biotechnology and Bioengineering*, 89, 219-232.
- Zhu, Y., Chen, X., Chen, T. and Zhao, X. 2006. Enhancement of riboflavin production by overexpression of acetolactate synthase in a *pta* mutant of *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Lett*, 266, 224-230.
- Zhang, D., Feng, X., Li, S., Chen, F. and Xu, H. 2012. Effects of oxygen vectors on the synthesis and molecular weight of poly (γ -glutamic acid) and the metabolic characterization of *Bacillus subtilis* NX-2. *Process Biochemistry*, 47, 2103-2109.
- Zhang, R., Ou, H.Y. and Zhang, C.T. 2004. DEG: a database of essential genes. *Nucleic Acids Research* 32, D271-D272.
- Zou, W., Zhou, M., Liu, L. and Chen, J. 2013. Reconstruction and analysis of the industrial strain *Bacillus megaterium* WSH002 genome-scale in silico metabolic model. *Journal of Biotechnology*, 164, 503-509.
- Zhou, Y., Yu, W.B. and Ye, B.C. 2011. Variation of gene expression in *Bacillus subtilis* samples of fermentation replicates. *Bioprocess Biosyst Eng*, 34, 569-579.
- Zhou, T., Zeng, H., Qiu, D., Yang, X., Wang, B., Chen, M., Guo, L. and Wang, S. 2011. Global transcriptional responses of *Bacillus subtilis* to xenocoumacin. *Journal of Applied Microbiology*, 111, 652-662.
- Zhou, J., Thompson, D.K., Xu, Y. and Tiedje, J.M. 2004. *Microbial Functional Genomics*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.

- Zuber, P., Chauhan, S., Pilaka, P., Nakano, M.M., Gurumoorthy, S., Lin, A.A., Barendt, S.M., Chi, B.K., Antelmann, H. and Mader, U. 2011. Phenotype Enhancement Screen of a Regulatory *spx* Mutant Unveils a Role for the *ytpQ* Gene in the Control of Iron Homeostasis. PLoS ONE, 6(9): e25066.
- Zeng, W., Chen, G., Wang, Q., Zheng, S., Shu, L. and Liang, Z. 2014. Metabolic studies of temperature control strategy on poly(c-glutamic acid) production in a thermophilic strain *Bacillus subtilis* GXA-28. Bioresource Technology, 155, 104-110.

EKLER

EK 1 *Bacillus* Türlerinde Metabolik Akı Analizi (MAA) Çalışmaları

EK 2 *Bacillus subtilis*'le Gerçekleştirilen Mikrodizin Çalışmaları

EK 3 *B. subtilis* Tepkime Sistemi BsRN-2016

EK 4 *B. subtilis* Genom-Seviye Model iBsu1144

EK 5 SAP üretiminde Periyot III'te LOT, MOT, ve HOT koşullarında iBsu1144 ile hesaplanan tepkime hızları ve analizleri

EK 6. BsBRM-1999 (Çalık vd. 1999) ve iBsu1144 akılarının karşılaştırılması

EK 7 SAP üretiminin MOT koşulu için iBsu1144 kullanılarak gerçekleştirilen akı değişkenliği analizi

EK 8 SAP üretiminin MOT koşulu için iBsu1144 kullanılarak gerçekleştirilen akı değişkenliği analiz sonuçlarının Morimoto vd. (2008) ile karşılaştırılması

EK 9 *B. subtilis* Genom-Seviye Model iBsu1144-rhGH

EK 10 rhGH biyoprosesinde LOT, MOT, ve HOT'ta Periyod III için iBsu1144-rhGH ile hesaplanan tepkime hızları ve analizleri

EK 11 *B. subtilis*'ten rhGH üretim biyoprosesinde PIII (t=16 st) için LOT, MOT, ve HOT koşullarına ait RMA değerleri ve iç-düzen geni *tyrS*'in ekspresyonuna dayanarak hesaplanan yolizi gen ekspresyon oranları (ER)

EK 12 *B.subtilis*'ten rhGH üretiminde (Özdamar vd. 2009) oksijen aktarım koşullarından önemli ölçüde etkilenen prob setleri veya birimleri; t=16 st, ER>3, p<0.005

EK 13 rhGH üretimi için MOT koşulunda Periyod III için gerçekleştirilen akı değişkenliği analizi sonuçları

EK 14 rhGH üretimi için MOT koşulunda Periyod III için gerçekleştirilen akı değişkenliği analizi sonuçlarının Morimoto vd. (2008) ile karşılaştırılması

EK 15 rhGH üretiminin MOT koşulunda Periyod II ve III için hesaplanan iBsu1144-rhGH tepkime hızları ve analizleri

EK 16 *B.subtilis*'ten rhGH üretiminin MOT koşulunda PII ve PIII'e ait RMA değerleri ve iç düzen geni *tyrS*'e dayanan ekspresyon oranları (ER)

EK 17 *B.subtilis*'ten rhGH üretiminin (Özdamar vd. 2009) MOT koşulunda kalma süresinden etkilenen mikrodizin prob setleri

EK 1 *Bacillus* Türlerinde Metabolik Akı Analizi (MAA) Çalışmaları

Çizelge 1 *Bacillus* Türlerinde Az Tanımlı Matematik Modellerle Gerçekleştirilen Metabolik Akı Analizi (MAA) Çalışmaları

#	Mikroorganizma	Ürün	Modelin Özellikleri		MAA'nin Amacı	Kaynak
			Metabolit #	Tepkime #		
1	<i>Bacillus clausii</i>	Savinaz	33	40	1, 2, 3	Christiansen vd.(2002)
2	<i>Bacillus licheniformis</i>	Serin alkali proteaz	105	148	1, 2	Çalık vd.(2002)
3	<i>Bacillus licheniformis</i>	Serin alkali proteaz	105	148	1, 2	Çalık vd.(2003)
3	<i>Bacillus licheniformis</i>	Serin alkali proteaz	105	148	1, 2	Çalık vd.(2003)
4	<i>Bacillus subtilis</i>	Riboflavin	21	23	1, 2, 4	Zamboni ve Sauer (2003)
5	<i>Bacillus subtilis</i>	Riboflavin	21	25	1, 2	Zamboni vd.(2004)
6	<i>Bacillus subtilis</i>	-	33	45	1, 2, 6	Fuhrer vd.(2005)
7	<i>Bacillus subtilis</i>	Riboflavin	24	32	1, 2, 6	Zhu vd.(2006)
8	<i>Bacillus licheniformis</i>	β -lactamase	105	147	1, 7, 2, 8, 9	Çalık ve İleri (2007)
9	<i>Bacillus megaterium</i>	hidrolaz	16	23	1, 2, 8, 10	Fürch vd.(2007)
10	<i>Bacillus megaterium</i>	-	14	23	1, 2, 6	Fürch vd.(2007)
11	<i>B.subtilis</i>	-	989	1021	1, 4, 6	Mahadevan ve Lovley (2008)
12	<i>B.subtilis</i>	-	-	-	1, 5	Rantanen vd.(2008)
13	<i>B.subtilis</i>	6-deoksieritronolid B	990	1023	1, 12, 2, 6	Boghigian vd. (2010)

Açıklamalar: 1: Hücre içi tepkime hızlarının bulunması; 2: Hücrelerin fizyolojik durumlarını açığa çıkartmak; 3: modelin geliştirilmesi; 4: Genomun incelenmesi; 5: Akı oranlarının hesaplanması; 6: Farklı mikroorganizmaları karşılaştırmak; 7: Biyoreaktör işletim koşullarının geliştirilmesi; 8: Hücre ve biyoreaktör arası etkileşimleri tanımlayarak biyoreaktör performansını artırmak, darboğaz tepkimeleri tahmin edip biyomolekül verim ve seçiciliğini artırmak; 9: Biyoreaktör işletim koşullarının karşılaştırılması; 10: Farklı çoğalma ortam koşullarının karşılaştırılması; 11: Amaç fonksiyonlarının karşılaştırılması; 12: Gen silinmelerinin etkilerinin incelenmesi; 13: Gen eklenmesinin etkilerini incelemek; 14: Aynı fermentasyonun farklı sürelerinin karşılaştırılması; 15: En uygun akı dağılımını saptamak; 16: Mikroorganizmanın teorik metabolik/ürün sentez kapasitesinin hesaplanması; 17: ^{13}C 'le etiketlemeye ilişkili iki yöntemin karşılaştırılması.

EK 1 *Bacillus* Türlerinde Metabolik Akı Analizi (MAA) Çalışmaları

Çizelge 2 *Bacillus* Türlerinde Tam Tanımlı Matematik Modellerle Gerçekleştirilen Metabolik Akı Analizi (MAA) Çalışmaları

Çalışma #		1	2
Mikroorganizma		<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i> GXA-28
Ürün		poli(γ -glutamik asit)	poli(γ -glutamik asit)
Modelin Özellikleri	Metabolit #	28	28
	Tepkime #	28	28
Modelin Çözümü	Yöntem	-	En küçük kareler yöntemi
	Algoritma	-	-
	Amaç fonksyonu	-	-
	Program	MATLAB 7.0	Matlab 7.1
Analiz Tipi		Veriye Dayalı	Veriye Dayalı
MAA'nin Amacı		10	1, 9: Sıcaklık
Kaynak		Zhang vd.(2012)	Zeng vd.(2014)

Açıklamalar: 1: Hücre içi tepkime hızlarının bulunması; 9: Biyoreaktör işletim koşullarının karşılaştırılması (T, pH, oksijen aktarımı); 10: Farklı çoğalma koşullarının karşılaştırılması.

EK 1 *Bacillus* Türlerinde Metabolik Akı Analizi (MAA) Çalışmaları

Çizelge 3 *Bacillus* Türlerinde Çok Tanımlı Matematik Modellerle Gerçekleştirilen Metabolik Akı Analizi (MAA) Çalışmaları

#	Mikroorganizma	Ürün	Modelin Özellikleri		MAA'nin Amacı	Kaynak
			Metabolit #	Tepkime #		
1	<i>Bacillus subtilis</i>	-	18	20	Yaşam katsayısının hesaplanması	Ma vd. (2002)
2	<i>Bacillus subtilis</i>	-	23	21	2, 4, 5	Westers vd.(2003)
3	<i>Bacillus subtilis</i>	α -amilaz, proteaz	50	49	Parametre analizi	Skolpap vd.(2007)
4	<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	1, 2, 10	Schilling vd.(2007)
5	<i>Bacillus subtilis</i>	-	45	38	10, 11	Supudomchok vd. (2008)
6	<i>Bacillus subtilis</i>	-	25	13	1, 12, 2	Tannler vd.(2008)
7	<i>Bacillus subtilis</i>	-	15	32	1	Yang vd.(2008)
8	<i>Bacillus subtilis</i>	Riboflavin	43	36	1, 2, 12	Duan vd.(2010)
9	<i>Bacillus subtilis</i>	İzobütanol	132	131	12, 1, 8	Li vd.(2012)
10	<i>Bacillus subtilis</i>	Adenozin	28	33	1, 2, 10	Chen vd.(2013)

Açıklamalar: 1: Hücre içi tepkime hızlarının bulunması; 2: Hücrelerin fizyolojik durumlarını açığa çıkartmak; 4: Genomun incelenmesi; 5: Akı oranlarının hesaplanması; 8: Hücre ve biyoreaktör arası etkileşimleri tanımlayarak biyoreaktör performansını artırmak, darboğaz tepkimeleri tahmin edip biyomolekül verim ve seçiciliğini artırmak; 10: Farklı çoğalma ortam koşullarının karşılaştırılması; 11: Amaç fonksiyonlarının karşılaştırılması; 12: Gen silinmelerinin etkilerinin incelenmesi.

EK 2 *Bacillus subtilis*'le Gerçekleştirilen Mikrodizin Çalışmaları

Çizelge 1 *Bacillus subtilis*'le Gerçekleştirilen Mikrodizin Çalışmaları – Gen silinmesi veya ekspresyonunun etkileri

Tema	Çoğalma Ortamı ve Bileşenleri C, N, P	Biyoreaktör İşletim Parametreleri O, pH, T, N, Qo/V	RNA İzolasyon Metodu	Analizlenen Veri Sayısı (E, S)	Karşılaştırılan Mikroorganizmalar		i, r = mRNA ₁ /mRNA _{II}	Araştırılan Gen; Etkilenen Gen Sayısı	Araştırılan Genin Aktive Ettiği Genler	Araştırılan Genin Baskıladığı Genler	Kaynak
					I	II					
spo0A	Difco sporlanma ortamı (DSM)	O: B pH= - T=37°C N= - Qo/V= -	L1	E=1 S=2	wt	spo0A ⁺	≥3	spo0A ; 586	Sporlanma genleri; proteaz, pektat liyaz, kitosanaz, ribosomal olmayan peptid sentaz, bir peptid antibiyotigi, poliketayd sentetaz, terminal saytokrom c oksidazı kodlayan genler; oligopeptid taşınımı, peptid fermonları, Gln'nin hücre içine alımı, His tüketimiyle ilgili genler; UGs.	Riboz taşınım operonu (rbsR, K, D, A, C, B), kemotaksis, hareket ve hücrenin kendi kendini parçalamasıyla ilgili genler.	Fawcett vd.(2000)
					wt	(σ ^F) ⁻	≥3	σ ^F ; 66	Uzun-zincirli yağ asitleri metabolizmasıyla ilgili bir operon (ynjJ, I, H, G, F, E) , murA.	-	Molle vd.(2003)
	LB ortamı	O: B pH= - T=37°C N= - Qo/V= -	RNeasy (Qiagen)/ L1	E=2 S= -	+IPTG	-IPTG	-	121	DNA replikasyonu, kamçı sentezi, kemotaksis ile ilgili genler.	Metabolik enzimler ve hücre dışına moleküllerin pompalanmasıyla ilgili genler.	
DegS-DegU, ComP-ComA, PhoR-PhoP	LB ve Schaeffer sporlanma ortamları	O: B pH= - T=37°C N= - Qo/V= -	Igo ve Losick (1986)	E=- S=1	+IPTG	-IPTG	i>4.5 r≤0.25	1: degU; 116 2: comA; 33 3: phoP; 23	1: aprE, nprE, ispA; enerji, hücre duvarı, poliketayd, piruvat dehidrojenaz sentezi ve translaşyonla ilgili genler; 39 UGs; 2: srfA operonu, rapA, pel, sacV, sunA ve deri elemanı, profaj2, faj SPB ile ilgili genler; 3: phoA, phoB, ydhF, phoD, tuaB- G, H, ptsS, A, C, B1, B2, glpQ, phoR, 2UGs.	1: epr, acoC, B, A, His tüketimi, likenan için PTS sistemi, yağ asiti metabolizması, kemotaksis-hareket, Asp fosfotaz senteziyle ilgili genler ve fla-che operonunun 5''lık kısmı; 20 UGs; 2: -; 3: -.	Ogura vd. (2001)
24 çift bileşenli sensör kinaz-regülatör sistemi	LB ve Schaeffer ortamları	O: B pH= - T=37°C N= - Qo/V= -	Igo ve Losick (1986)	E=1 S=-	+IPTG	-IPTG	i>4	1: citT; 5 2: desR; 26 3: lytJ; 6 4: ybdJ; 9 5: ycbB; 19 6: ycbL; 4 7: yccH; 5 8: yclJ; 30 9: ydbG; 76 10: ydfJ; 29	Aktive edilen genler 1: cevap regülatörlerini ve Mg-sitrat kompleksinin taşıyıcılarını kodlayan genler; 2: hücre zarı fosfolipitlerini doymamış yapan bir enzim, histidil-tRNA sentetazı kodlayan genler, UGs; 3: hücrenin kendi kendine parçalanma hızını regüle eden genler; 4: Pürin biyosenteziyle ilgili genler, alanin dehidrojenazı kodlayan genler, UGs; 5: Sublansin 168 lantibiyotigini (antimikrobiyal öncül peptid) kodlayan genler; 6: UGs; 7: taşıyıcıları kodlayan genler, UGs; 8: Germinasyon, pirimidin sentezi, saydırfor sentezi, izokorizmataz, ferikrom ABC taşıyıcısını kodlayan genler, UGs; 9: Metil kabul eden kemotaksis proteinini ve kamçı proteinini kodlayan genler, UGs; 10: Pirimidin sentezi, prolin sentezi, riboz metabolizması, riboz taşınımı, likenanın parçalanma ürünlerini tüketmeyle ilgili genler ve UGs; Baskılanan genler 1: -; 6: -; 7: -; 2: Riboz metabolizması, taşınım, likenan parçalanmasıyla ilgili genler, UGs; 3, 4: UGs; 5: NADH dehidrojenaz, riboz ABC taşıyıcısı kodlayan genler; 11e, His, Val tüketimiyle ilgili genler; 8: Asetoin dehidrojenaz, ATP sentaz, saytokrom aa3 kinol oksidaz kodlayan genler, UGs; 9: PBSX profajı; Hücre içine demir alımıyla ilgili sistem, DNA alkilenmesine adaptasyon gösteren bir cevap vermede sorumlu proteinler, adaAB operonunun pozitif regülasyonu, NADH dehidrojenaz, spor kot proteinleri, RNA polimeraz, PBSX sigma faktörüne benzeyen yapı, saytokrom P450'ye benzeyen enzim, SigZ, glikojen fosforilaz, Glisin betain/ karnitin/ kolin ABC taşıyıcısı, L-arabinoz taşıyıcısını kodlayan genler; poliketayd sentezi, sporlanma, septasyonla ilgili genler ve parçalayıcı enzim genleri (aprE, nprE, phoA, sacB), UGs; 10: L-Lac permeazı kodlayan gen, saytokrom bd' nin ekspresyonu için gerekli ABC taşıyıcısını kodlayan genler, UGs;	Kobayashi vd.(2001)	

EK 2 *Bacillus subtilis*'le Gerçekleştirilen Mikrodizin Çalışmaları

Çizelge 2 *B. subtilis*'le Gerçekleştirilen Mikrodizin Çalışmaları - Yabancı genlerin *Bacillus subtilis*'te ekspresyonlarının etkileri

Tema	Çoğalma Ortamı ve Bileşenleri C, N, P	Biyoreaktör İşletim Parametreleri O, pH, T, N, Qo/V	RNA İzolasyon Metodu	Analizlenen Veri Sayısı (E, S)	Karşılaştırılan Mikroorganizmalar		$i, r = \frac{mRNA_i}{mRNA_{ref}}$	Araştırılan Gen; Etkilenen Gen Sayısı	Araştırılan Genin Aktive Ettiği Genler	Araştırılan Genin Baskıladığı Genler	Kaynak
					I	II					
<i>S.cerevisiae</i> <i>aco1</i>	Minimal ortam	O: B pH = - T = 30°C N = - Qo/V = -	TRIzol metodu (Invitrogen), Serio vd. (2006)	E=1 S=2	wt @ S <i>aco1</i> ⁺ @ S	wt @ E wt @ E	-	<i>aco1</i> ; 40	Erken sporlanma transkripsiyon faktörü, Spo0A ve σ^E kontrolü altındaki sporlanma genleri (örneğin <i>spoIIIG</i> , <i>spoIIIB</i> , <i>spoIIA</i>)	σ^K , σ^K kontrolü altındaki geç sporlanma genleri	Serio ve Sonenshein (2006)
<i>B.amyloliquefaciens</i> <i>amyQ</i>	C: YE, N: YE, Trypton P: YE	O: B pH = - T = 30°C N = 250 Qo/V = -	RNA İzolasyonKiti (Roche)	E=1 S=1	<i>amyQ</i> ⁺	<i>amyQ</i>	≥ 1.50 $-1.96 \leq r$	<i>amyQ</i> ; 157	HtrB ve HtrA'yı kodlayan genler, hücrezarına bağlı olan ve yanlış katlanmış proteinlerin parçalanmasından sorumlu serin proteazları, hareket ve σ^D 'yle ilgili genler, yolizleriyle ilgili genler (adaptasyon, protein sentezi, ribosomal proteinler, zararlı moleküllerden arınma, karbohidrat metabolizması, TCA döngüsü, protein katlanması, yağ metabolizması, hücre bölünmesi, sensörler, hücrezari enerjisi, taşınım/bağlanma, hareket/kemotaksis, protein modifikasyonu, sporlanma, RNA sentezi, protein salgılaması, DNA rekombinasyonu, RNA regülasyonu), UGs.	Sporlanma, fosfat metabolizması, RNA sentezi, amino asit metabolizması, nükleotit metabolizması, taşınım/bağlanma, koenzim metabolizması, karbohidrat metabolizması, germinasyon, hücre duvarı, fajla ilgi fonksiyonlar, hücrezarienerjisiyle ilgili genler ve UGs.	Lulko vd.(2007)
<i>S.aureus</i> <i>dsbA</i>	LB, S7 or PM ortamı C: zayıloz N: - P: -	O: B pH = - T = 37°C N = - Qo/V = -	Eymann vd.(2002)		<i>dsbA</i> ⁺	<i>dsbA</i> ⁻	≥ 2	mutasyon; 15	<i>lipA</i> , <i>manP</i> , <i>manA</i> , <i>manR</i> , <i>xyiE</i> , <i>bgIH</i> .	<i>ycdO</i> , <i>yonC</i> , <i>yonB</i> , <i>rapI</i> , <i>phrI</i> , <i>yddM</i> , <i>yddJ</i> , <i>ycdM</i> , <i>ycdN</i> .	Kouwen vd.(2009)
<i>i-sceI</i> (maya)	LB ve S750 minimal ortamları, zayıloz C: G N: Phe, Trp P: -	O: B pH = - T = 30°C N = - Qo/V = -	-	E=1 S = -	<i>i-sceI</i> ⁺ <i>i-sceI</i> ⁺ + zayıloz	<i>i-sceI</i> ⁻ <i>i-sceI</i> ⁺	≥ 1.5	<i>i-sceI</i> ; >24	LexA tarafından kontrol edilen genler <i>yhaZ</i> , <i>yneB</i> , <i>yneA</i> , <i>dinB</i> ; SOS sistemi genleri, <i>lexA</i> , <i>recA</i> , <i>msmE</i> , <i>i_aprX_ymaC</i> , profaj PBSX'le ilgili 10 gen, <i>i_xylB_yncB</i> , <i>ptsG</i> , <i>xybB</i> , <i>xylA</i> .	-	Simmons vd.(2009)

Kısaltmalar: O: işletim; T:sıcaklık; N: karıştırma hızı (rpm); Qo/V: havalandırma hızı (vvm); E: üstel çoğalma fazı; S: çoğalmanın durgunluk fazı; V: vejetatif faz; B: kesikli işletim; C, N, P: karbon, azot, fosfat kaynakları; i: aktivasyon oranı (referans bir gen ekspresyonuna göre belirlenen gen ekspresyon miktarı); r: baskılanma oranı (referans bir gen ekspresyonuna göre belirlenen gen ekspresyon miktarı)

EK 2 *Bacillus subtilis*'le Gerçekleştirilen Mikrodizin Çalışmaları

Çizelge 3 *B.subtilis*'le Gerçekleştirilen Mikrodizin Çalışmaları – Oksijenli ve oksijensiz solunuma ait transkriptomların karşılaştırılması

Tema	Çoğalma Ortamı ve Bileşenleri C, N, P	Biyoreaktör İşletim Parametreleri O, pH, T, N, Qo/V	RNA İzolasyon Metodu	Analizlen Veri Sayısı (E, S)	Karşılaştırılan Mikroorganizmalar		i, r = mRNA _I /mRNA _{II}	Araştırılan Koşuldan Etkilenen Gen Sayısı	Araştırılan Koşulun Aktive Ettiği Genler ↑	Araştırılan Koşulun Baskıladığı Genler ↓	Kaynak
					I	II					
O ₂ 'siz çoğalma	2xYT ortamı C: G, Pyr, KNO ₃ , KNO ₂ N: - P: K ₃ PO ₄	O: B pH= - T=37°C N= 250 Qo/V= -	RNeasy Mini Kit (Qiagen) ve Ye vd. (2000)	E=1 S= -	+ O ₂	- O ₂	i>2	>120	<i>narGHII</i> , <i>nasDEF</i> , antibiyotik sentezi, sensör sistemi, elektron taşınımı veya saytokrom metabolizması, demir alımı/taşınımıyla ilgili genler, nitriti hücre dışına atan proteini, flavohemoglobini, laktat permeaz ve dehidrojenazı kodlayan genler, UGs.	Piruvat dehidrojenaz, gliserolün hücre içine alımını sağlayan protein, gliserol kinaz ve gliserol-3-fosfat permeazı kodlayan genler, protein sentezinde görevli ribosomal genler, <i>glpQ</i> , UGs.	Ye vd. (2000)
± O ₂ 'li koşullarda NO (g)'nin etkileri	C: - N: NO P: -	O: B pH= - T= 37°C N= 200 Qo/V= -	RNeasy Mini Kit (Qiagen)	1	+O ₂ NO ⁻ wt -O ₂ NO ⁻ wt	+O ₂ wt - O ₂ wt	i>5	>6; >7	+O ₂ : Bakteriye NO stresinden koruyan bir flavohemoglobini kodlayan <i>hmp</i> ; PerR, Fur, σ ^B regülönları, UGs ↑; -O ₂ : Bakteriye NO stresinden koruyan bir flavohemoglobini kodlayan <i>hmp</i> , PerR ve Fur tarafından baskılanan genler, UGs ↑.		Moore vd.(2004)
Adenozin üretiminde O ₂ etkisi	C: Glukoz, maya özütü, mısır şurubu, N: NH ₄ Cl P: KH ₂ PO ₄	O: B pH= - T= 32°C N= 450, 700 Qo/V= -	QIGEN RNeasy Mini kit	2	450 rpm	700 rpm	i>2 E değeri < 0.05 T- profiller yazılımı	434 (12 st) 854 (18 st)	Enerji, hücre tipinin başkalaşması, hücre bileşenlerinin senteziyle ilgili genler	Protein senteziyle ilgili genler Taşınım ile ilgili genler	Yu vd.(2011)
± O ₂ 'li koşullarda çoğalma	+ O ₂ : Sentetik ortam - O ₂ : KNO ₃	O: B pH=- T= 37°C N = 250,100 Qo/V= -	Eymann vd.(2002): asit-fenol özütlemesi	E=1 S= -	- O ₂	+ O ₂	Sinyal/ arkaplan ≥5	144*	- O ₂ : ResDE, Rex/Fnr regülönları ↑ *Tüm koşullar: Ribozomal proteinleri; glikoliz, demir küktür metabolizması, zehirden arınma yolizleriyle ilgili proteinleri kodlayan genler ve yaşam için gerekli genlerin 37%'si ↑		Nicolas vd.(2012)

Kısaltmalar: O: işletim; T:sıcaklık; N: karıştırma hızı (rpm); Qo/V: havalandırma hızı (vvm); E: üstel çoğalma fazı; S: çoğalmanın durgunluk fazı; B: kesikli işletim; C, N, P: karbon, azot, fosfat kaynakları; i: aktivasyon oranı (referans bir gen ekspresyonuna göre belirlenen gen ekspresyon miktarı); r: baskılanma oranı (referans bir gen ekspresyonuna göre belirlenen gen ekspresyon miktarı); B.s.: *B.subtilis*; wt: doğal mikroorganizma; I: RNA'sı izole edilen, etkisi araştırılan gen ; II: RNA'sı izole edilen referans mikroorganizma; UG: bilinmeyen gen; Pyr: piruvat; G: glukoz, Trp: triptofan; G: glukoz

EK 2 *Bacillus subtilis*'le Gerçekleştirilen Mikrodizin Çalışmaları

Çizelge 4 *Bacillus subtilis*'le Gerçekleştirilen Mikrodizin Çalışmaları – Sıcaklık değişiminin transkriptoma etkileri

Tema	Çoğalma Ortamı ve Bileşenleri C, N, P	Biyoreaktör İşletim Parametreleri O, pH, T, N, Qo/V	RNA İzolasyon Metodu	Analizlen Veri Sayısı (E, S)	Karşılaştırılan Mikroorganizmalar		i, r = mRNA _U /mRNA _L	Araştırılan Koşuldan Etkilenen Gen Sayısı	Araştırılan Genin Aktive Ettiği Genler	Araştırılan Genin Baskılandığı Genler	Kaynak
					I	II					
Isı şoku 37°C → 48°C	Bakto Müller Hinton Ortamı	O: B, pH = - T = 37, 48°C N = 250 Qo/V = -	Fenol Guanidiniyotiyosiyanat (TRIZOL), Helmann vd. (2001)	E = 3 S = -	1: <i>B.s</i> @ 48°C t=3. dk 2: <i>B.s</i> @ 48°C t=10. dk 3: <i>B.s</i> @ 48°C t=20. dk	<i>B.s</i> @ 37°C	-	>400	Arg biyosenteziyle ilgili genler, taşıyım operonları, yüksek ekspresyon kinetiğine sahip σ^B 'ye bağlı genler, HrcA ve CtsR regulonları.	<i>rocA</i> , <i>rocG</i> ve <i>rocD</i> operonları.	Helmann vd. (2001)
Soğuk şoku 37°C → 15°C	SMM ^{TrypHole}	O: B, pH = - T = 37, 15°C N = -, Qo/V = -	Majumdar vd. (1991)	1	wt ve <i>desK</i> mutanları @ 15°C	wt ve <i>desK</i> mutanları @ 37°C	i>2	360	Soğuğa adapte olma işlemleri, transkripsiyon mekanizmasıyla ilgili proteinler ve hücre zarı adaptasyon süreçleriyle ilgili genler, UGs.	Merkezi metabolizmayla ilgili genler- amino asit sentezi, pürin/pirimidin sentezi, glikoliz, TCA döngüsü, ATP sentezi.	Beck vd. (2002)
Soğuk şoku 37°C → 18°C	G ve Trp'nin ilave edildiği sentetik minimal ortam	O: B pH = - T = 37, 18°C N = - Qo/V = -	Chomczynski ve Sacchi (1987)	3	<i>B.s</i> @ 18°C	<i>B.s</i> @ 37°C	i≥2	100	Hücrezari akışkanlığını artırmada görevli olup yağ asitlerini doymamış yapan bir enzimi, ribosomal proteinleri, amino asitleri parçalayıcı enzimleri kodlayan genler, klasik soğuk şoku genleri <i>cspB</i> , <i>cspC</i> ve <i>cspD</i> , <i>pth-bcd-buk-lpd-bkdA1-bkdA2-bkdB</i> operonu, UGs.	Amino asitler, nükleotitler ve koenzimlerin senteziyle ilgili enzimlerin genleri	Kaan vd. (2002)
Soğuk şoku 30°C → 40 °C, 50°C, 57°C, 58°C, 59°C, 60°C, 62 °C	Triptik Soy Ortamı (TSB)	O: B pH = - T = 30, 40, 50, 57, 58, 59, 60, 62 °C N = 100 Qo/V = -	Kort vd.(2008)	E = 1 S = -	1: <i>B.s</i> @ 40°C 2: <i>B.s</i> @ 50°C 3: <i>B.s</i> @ 57°C 4: <i>B.s</i> @ 58°C 5: <i>B.s</i> @ 59°C 6: <i>B.s</i> @ 60°C 7: <i>B.s</i> @ 62°C	<i>B.s</i> @ 30°C	-	3562	Araştırılan Etkinin Aktive Ettiği Genler: 1: σ^B regulonu, ısı stresiyle ilgili genler (HrcA, σ^B regulonları, hareketle ilgili genler (σ^D regulonu); 2: σ^A regulonu, ısı stresiyle ilgili genler (HrcA, CtsR, σ^B regulonları), sporlanmayla ilgili genler (σ^F regulonu), motility related genes (σ^B regulonu); 3: σ^H regulonu, ısı stresiyle ilgili genler (HrcA, CtsR, σ^B regulonları), karbon metabolizmasıyla ilgili genler (CcpA regulonu); 4: σ^A regulonu, ısı stresiyle ilgili genler (HrcA, CtsR, σ^B regulonları), karbon metabolizmasıyla ilgili genler (CcpA regulonu); 5: σ^B regulonu, ısı stresiyle ilgili genler (HrcA, CtsR, σ^B regulons), sporlanmayla ilgili genler (CodY, σ^E , σ^K regulonları), kompetansla ilgili genler (ComA regulonu), karbon metabolizmasıyla ilgili genler (CcpA regulonu); 6: σ^A regulonu, ısı stresiyle ilgili genler (HrcA, CtsR, σ^B regulonları), sporlanmayla ilgili genler (CodY, σ^E , σ^K regulonları), kompetansla ilgili genler (ComA regulonu), karbon metabolizmasıyla ilgili genler (CcpA regulonu); 7: σ^A regulonu, ısı stresiyle ilgili genler (HrcA, CtsR, σ^B regulonları), sporlanmayla ilgili genler (CodY, σ^E , σ^K regulonları), kompetansla ilgili genler (ComA and Com K regulonları), karbon metabolizmasıyla ilgili genler (CcpA regulonu). Baskılandığı Genler: 1: sporlanmayla ilgili genler (CodY, σ^E regulonları); 2: sporlanmayla ilgili genler (CodY, σ^E , σ^K regulonları); 3: sporlanmayla ilgili genler (σ^E , σ^F regulonları), hareketle ilgili genler (σ^D regulonu), kompetansla ilgili genler (Com K regulonu); 4: sporlanmayla ilgili genler (σ^E , σ^F , σ^K regulonları), kompetansla ilgili genler (Com K regulonu); 5: sporlanmayla ilgili genler (σ^E , σ^F , regulonları); 6: sporlanmayla ilgili genler (σ^E regulonu); 7: hareketle ilgili genler (σ^D regulonu).		Kort vd.(2008)

EK 2 *Bacillus subtilis*'le Gerçekleştirilen Mikrodizin Çalışmaları

Çizelge 5 *Bacillus subtilis*'le Gerçekleştirilen Mikrodizin Çalışmaları – Hücreiçine taşınan moleküllerin transkriptoma etkileri

Tema	Çoğalma Ortamı ve Bileşenleri C, N, P	Biyoreaktör İşletim Parametreleri O, pH, T, N, Qo/V	RNA İzolasyon Metodu	Analizlenen Veri Sayısı (E, S)	Karşılaştırılan Mikroorganizmalar		i, r = mRN A _I /mRN A _{II}	Araştırılan Koşuldan Etkilenen Gen Sayısı	Araştırılan Etkinin Aktive Ettiği Genler	Araştırılan Etkinin Baskılandığı Genler	Kaynak
					I	II					
Glukoz	LB ortamı ± G	O: B pH= - T=37°C N= 250 Qo/V= -	RNeasy Kiti (Qiagen) ve Moreno vd. (2001)	E= 1 S= -	<i>ccpA</i> ⁺ + G	<i>ccpA</i> ⁻ - G	i>3	ca. 380	Karbon metabolizması, karbon tüketimi, pirimidin senteziyle ilgili genler; karbon metabolizmasıyla ilgili enzimleri ve taşıyıcıları kodlayan genler; glukoz permeaz ve glukozun hücreiçine alımıyla sorumlu bir enzimi kodlayan genler, UGs.	Sporlanma; karbon tüketimi/taşınmı, hücre zarı enerjisi, sensör ve fosfotransferaz sistemi, transkripsiyonel regülatörlerle ilgili genler.	Moreno vd. (2001)
	±G, Difco sporlanma ortamı	O: B, pH= - T=37°C, N= - Qo/V= -	Igo ve Losick (1986)	E= 1 S= -	wt ve <i>ccpA</i> ⁺ + G	wt ve <i>ccpA</i> ⁻ - G	i>5	66	Baskılanan genler: Karbonhidratların parçalanmasıyla ilgili genler, <i>iol</i> genleri.		Yoshi da vd.
	CSE minimal ortamı C: Suc, ±G N: Glu, P: -	O: B, pH= - T=37°C, N= - Qo/V= -	Eymann vd.(2001)	E= 1 S= -	(wt, <i>ccpA</i> ⁺ , <i>ccpA</i> ⁺ <i>ptsH1</i> ⁻) + G	(wt, <i>ccpA</i> ⁻ , <i>ccpA</i> ⁻ <i>ptsH1</i> ⁻) - G	i≥3	77	Genel karbon metabolizması ve glikoliz yolizi enzimleriyle ilgili genler; asetat sentezi, amino asit sentezi/taşınmı, nükleotit senteziyle ilgili genler.	TCA döngüsü ve solunum zinciriyle ilgili genler.	Blenck e
	LB C: ±G N: - P:-	O: B, pH= - T=37°C, N= 250, Qo/V= -	RNeasy Kiti (Qiagen) ve Moreno vd. (2001)	E= 1 S= -	(wt, <i>ccpA</i> ⁺ , <i>ptsH1</i> ⁻ , <i>hprK</i> ⁻) + G	(wt, <i>ccpA</i> ⁻ , <i>ptsH1</i> ⁻ , <i>hprK</i> ⁻) - G	i>3	274	Solunum, karbon, enerji, fosfor metabolizması ve pürin/ pirimidin senteziyle ilgili genler; ribozomal genler; glikoliz yolizi enzimlerini, RNA polimerazları kodlayan genler.	karbon, enerji metabolizmasıyla ilgili genler; krebs döngüsü genleri, <i>dhbABCEf</i> , kemotaxis ve kamçı genleri, stress genleri.	Lorca vd.(2005)
	LB± G	O: -, pH= -, T= -, N= -, Qo/V= -	-	1	B.s. + G	B.s.-G	i>3	503	Aktive olan genler: Nükleotit, amino asit ve proteinlerle ilgili genler. Baskılanan genler: Taşınmı ve metabolik dönüşümlerle ilgili genler		Va zqu
Vitamin	LB/Spizizen minimal ortamı (G)	O: B pH= -, T= - N= -, Qo/V= -	Lee vd. (2001)	E= 1 S= -	B.s. + vitamin	B.s. - vitamin	i>3	R: 4 Bi: 9 T: 6	Araştırılan Etkinin Baskılandığı Genler: R: Riboflavin operonu (<i>ribGBAH</i>), UG; Bi: Biotin sentez genleri <i>bioWAFDBlorf</i> , UGs; T: Tiyamin sentez operonları <i>thi</i> ve <i>tenAI-goxB-yjbSTUV</i> , UGs.		Lee vd.
	Spizizen MM	O: B pH= - T= - N= - Qo/V= -	de Saizieu vd. (1998)	E= 1 S= -	wt + T	wt - T	-	14	Araştırılan Etkinin Baskılandığı Genler: Hidroksimetilpirimidin fosfat, tiaminaz, glisin oksidaz, kükürt taşıyıcı protein, tiazol sentaz, ThiS adeniltransferaz, fosfometilpirimidin kinaz sentezinden sorumlu genler, UGs.		Schyns vd.

EK 2 *Bacillus subtilis*'le Gerçekleştirilen Mikrodizin Çalışmaları

Çizelge 6 *Bacillus subtilis*'le Gerçekleştirilen Mikrodizin Çalışmaları – Kısıtlamalar ve stres koşulları

Çalışmanın Teması	Çoğalma Ortamı ve Bileşenleri C, N, P	Biyoreaktör İşletim Parametreleri O, pH, T, N, Qo/V	RNA İzolasyon Metodu	Analizlenen Veri Sayısı (E, S)	Karşılaştırılan Mikroorganizmalar		i, r = mRN A _I /mRN A _{II}	Araştırılan Etkiden Etkilenen Gen Sayısı	Araştırılan Etkinin Aktive Ettiği Genler	Araştırılan Etkinin Baskıladığı Genler	Kaynak
					I	II					
Tuz stresi (NaCl)	G / LB Etanol: 4 % h/h NaCl: 4 % a/h	O: B pH= - T= 37, 48°C N= - Qo/V= -	Petersohn vd. (2001)	E= 1 S= -	Stres altındaki wt ve σ^B mutantı.	Stres altında olmayan wt ve σ^B mutantı.	$i \geq 2$	Etanol: > 40 NaCl: >71 Isı: >31 σ^B : 125	Etanol: σ^B regülону, peptidoglikan sentezi, levanaz, ısı şoku proteinleri, moleküler çaperonlarla ilgili genler, UGs; NaCl: σ^B regülону, σ^W ve regülону, peptidoglikan sentezi, levanaz, sporlanma kontrolü, ABC taşıyıcılarıyla ilgili genler. UGs; Isı: Isıya özgün stress proteinlerini kodlayan genler; peptidoglikan, levanaz, moleküler çaperon senteziyle ilgili genler, UGs; σ^B : <i>spoVC</i> , <i>nadE</i> , <i>rsbV</i> , <i>rsbW</i> , <i>rsbX</i> , <i>sigB</i> , <i>bmrU</i> , <i>bmr</i> , <i>bmrR</i> , <i>bofC</i> , <i>csbX</i> , <i>dps</i> , <i>gtab</i> , <i>katX</i> , <i>csbC</i> , UGs. Araştırılan Etkinin Baskıladığı Genler: Etanol: ABC taşıyıcılarını kodlayan genler, UGs; NaCl: - ; Isı: ABC taşıyıcılarını kodlayan genler, UGs; σ^B : UGs.		Petersohn vd. (2001)
	Spizizen ortamı, MM C: G N: L-Trp, L-Phe P: -	İ: B, pH= - T= 37°C, N= 220 Qo/V= -	Petersohn vd.(2001)	1: E= 1 S=- 2: E= 5 S= -	1: Yüksek tuzluluk ortamında çoğalan <i>B.s</i> (1.2 M NaCl) 2: Tuz şoku yaşayan <i>B.s</i> (0.4 M NaCl)	1: Düşük tuzluluk ortamında çoğalan <i>B.s</i> 2: Tuz şoku yaşamayan <i>B.s</i>	$i \geq 3$	1: 203; 2: 126	1: <i>opuBC</i> , <i>feuA</i> , <i>yocC</i> , <i>degSU</i> , <i>lspA</i> ; peptidoglikan sentezi, taşıyım, Mn alımının regülatörleriyle ilgili genler, UGs; 2: SigW regülону, ozmokoruyucular için taşıyıcı proteinleri kodlayan genler, sentetik enzimleri kodlayan genler, kompetans gelişimiyle ilgili genler. Araştırılan Etkinin Baskıladığı Genler: 1: Hareket ve kemotaksisle ilgili genler; 2: Amino asit veya vitamin senteziyle, ATP üretimiyle ilgili genler.		Steil vd.(2003)
	Belitsky minimal ortamı ± NaCl (6% (g/h)	O: B, pH= - T=37 °C, N= 180 Qo/V= -	Rneasy minikit	E = 4 S = -	wt + NaCl	wt	$i > 3$	$i > 500$	SigB, SigW, SigM, SigX regülонları, <i>pbpE</i> ; serbest yağ asitlerinin bozunmasıyla ilgili genler	Yağ asiti ve yağ sentezleriyle ilgili genler; hücre duvarı senteziyle ilgili genler;	Hahne vd. (2010)
Demir eksikliği	LB ortamı	O: B, pH= - T= 37°C, N= 250 Qo/V= -	RNeasy Mini kit (Qiagen)	1	wt + demir şelatörü-DP	wt + Fe	2 (Fe)	≥ 39	PerR regülонunun üyeleri. Araştırılan Etkinin Baskıladığı Genler: Saytokromla ilgili genler, <i>citB</i> .		Baichon vd. (2006)
	Minimal ortam	O: B, pH= - T= -, N= - Qo/V= -	-	E= 1 S= -	demirsiz ortamda çoğalan <i>B.s</i>	demirli ortamda çoğalan <i>B.s</i>	-	47	Basillobaktin sentezi için önemli olan Thr ve Gly gibi amino asitlerin sentezlerinden sorumlu genler; RelA tarafından regüle edilen genler; amino asitler, purin ve pirimidin senteziyle ilgili genler. Etkinin Baskıladığı Genler: RelA tarafından regüle edilen genler; purin ve pirimidin senteziyle ilgili genler, <i>gltA</i> , <i>gltB</i> .		Miethe vd. (2006)

Kısaltmalar: G: glukoz; Glu: glutamate; BCS: batoküpriyon disülfonat; SNP: sodyum nitroprusit; ps: plazma stresi; CCCP: karbonil siyanat-klorofenilhidrazon.

EK 2 *Bacillus subtilis*'le Gerçekleştirilen Mikrodizin Çalışmaları

Çizelge 7 *Bacillus subtilis*'le Gerçekleştirilen Mikrodizin Çalışmaları - *B.subtilis*'le yapılan diğer mikrodizin çalışmaları

Tema	Çoğalma Ortamı ve Bileşenleri C, N, P	Biyoreaktör İşletim Parametreleri O, pH, T, N, Qo/V	RNA İzolasyon Metodu	Analizlen Veri Sayısı (E, S)	Karşılaştırılan Mikroorganizmalar		i, r = mRN A _I /mRN A _{II}	Etkilenen Gen Sayısı	Araştırılan Etkinin Aktive Ettiği Genler	Araştırılan Etkinin Baskıladığı Genler	Kaynak
					I	II					
Sporlanma	2x SG ortamı C: G, N: -, P: -	İ: B, pH= -, T= 37°C N= -, Qo/V= -	Isogen kimyasal (Nippon Gene, Japan)	E=1, S=3	Sporlanma fazındaki <i>B.s.</i>	Vejetasyon fazındaki <i>B.s</i>	-	>10	Erken sporlanma basamakları sırasında ribozomal genler, translasyonla ilgili genler↑ Ribozomal genlerin birçoğu ↓.		Orasim vd.(2003)
mRNA kararlılığı	NSMP	O: B, pH= -, T= 37°C N= 200, Qo/V= -	Hambraeus vd.(2003)	E= - S=6	Çoğalma esnasında, farklı kalma sürelerinde rifampisine maruz kalmış <i>B.s</i>	Çoğalma ortamına rifampisin eklendikten bir dakika sonraki <i>B.s.</i>	-	-	-		raeus vd.(2003)
Biyofilm oluşumu	Hamon ve Lazazzera (2001)	O: B, pH= -, T= 37°C N= 0, 200 rpm, Qo/V= -	RNeasy Midi Prep Kit (Qiagen)	E= 3 S= -	Biyofilm durumundaki <i>B.subtilis</i>	Planktonik durumundaki <i>B.subtilis</i>	1	519	Faj, hareket, kemotaksis, hücre zarı enerjisi, glikoliz, TCA döngüsüyle ilgili genler ve transkripsiyon faktörlerini kodlayan genler		Stanley vd.(2000)
	LB ortamı	O: Sürekli, pH= - T= 34°C, N= - Qo/V= 1.33	RNeasy Mini Kiti (Qiagen)	E= - S= 1	Biyofilm olarak çoğalan <i>spoIIIGB</i> mutanları Biyofilm olarak çoğalan wt	Süspansiyon halinde çoğalan <i>spoIIIGB</i> mutanları Süspansiyon halinde çoğalan wt	i>2.4	499	Sporlanma, taşınım, antibiyotik üretimiyle ilgili genler, UGs. Kompetans, taşınım, antibiyotik üretimiyle ilgili genler, UGs.	Oksijensiz solunumla ilgili genler.	Ren vd.(2004)
ABC taşıyıcıları	LB/ S7 ortamı	O: B, pH= -, T= 37°C N= -, Qo/V= -	Igo ve Losick (1986)	E= 1 S= -	<i>B.s</i> + LB	<i>B.s</i> + S7 ortamı	i>6	336	Hücre içine riboz, maltodekstrin alımıyla ilgili genler.	Hücre içine glukoz, amino asit, glisin, betain, kolin, Mn ⁺² oligopeptit, Fe ⁺³ , Zn ⁺² alımıyla ilgili genler, ferrikromla ilgili <i>fhuD</i>	Dunbar vd.(2004)
İmdat (SOS) sinyal sistemi	Tanımlı ve SMS minimal ortamı	O: B, pH= -, T= 37°C, N= -, Qo/V= -	RNeasy Mini Kiti (Qiagen)	1	1: MC'ye maruz <i>recA</i> ; 2: UV'ye 30 dk maruz <i>recA</i> ; 3: UV'ye bir saat maruz <i>recA</i> ; 4: MC'ye maruz wt; 5: UV'ye 30 dk maruz wt; 6: UV'ye bir saat maruz wt	1: <i>recA</i> *, 2: <i>recA</i> * 3: <i>recA</i> *, 4: wt 5-6: wt	-	MC: >33 UV: >33	MC: <i>aprX</i> , germinasyon, DNA restriksiyonu / modifikasyonu / tamiri / replikasyonu, PBSX profajı, Holliday molekülüyle ilgili genler, DNA helikazı kodlayan gen, UGs; UV: DNA restriksiyonu / modifikasyonu / tamiri, PBSX profajıyla ilgili genler, UGs. Araştırılan Etkinin Baskıladığı Genler: MC: -; UV : -		Au vd.(2005)

EK 3 *B. subtilis* Tepkime Sistemi BsRN-2016

Çizelge 1 BsRN-2016 tepkime, enzim, ve genleri

T#	Tepkime	Enzim	EC #	Gen(ler)	Genin kromozomdaki yerinin adı	Veritabanı ve Kaynak
1	b2d3k5m + o2 => ikmb + for + h	acireductone dioxygenase [iron(II)-requiring]	1.13.11.54	<i>mtnD</i>	BSU13620	MicroCyc
2	b2d3k5m + o2 => umtp + co + for + h	acireductone dioxygenase (Ni2+-requiring)	1.13.11.53	<i>mtnD</i>	BSU13620	MicroCyc
3	dkmpp => ih3k5m + h	2,3-diketo-5-methylthiopentyl-1-phosphate enolase	5.3.2.-	<i>mtnW</i>	BSU13590	MicroCyc
4	ih3k5m + h => dkmpp	2,3-diketo-5-methylthiopentyl-1-phosphate enolase	5.3.2.-	<i>mtnW</i>	BSU13590	MicroCyc
5	ih3k5m + h2o => b2d3k5m + pi	2-hydroxy-3-keto-5-methylthiopentenyl-1-phosphate phosphatase	3.1.3.-	<i>mtnX</i>	BSU13600	MicroCyc
6	bmdru1p => dkmpp + h2o	methylthioribulose-1-phosphate dehydratase	4.2.1.109	<i>mtnB</i>	BSU13610	GenoList, UniProt, SEED, MicroCyc
7	gluL + h + nadh => bpyr5c + (2) h2o + nad	1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	1.2.1.88	<i>ycgN</i> OR <i>rocA</i>	BSU03210 OR BSU37780	UniProt, KEGG, Expasy, SEED, MicroCyc
8	(2) gluL + nadp => glnL + akgl + nadph + h	glutamate synthase	1.4.1.13	<i>gltA</i> AND <i>gltB</i>	BSU18450 AND BSU18440	GenoList, UniProt, SEED, MicroCyc
9	(3) malcoa + coucoa => (4) coa + nncl + (3) co2	naringenin-chalcone synthase	2.3.1.74	<i>bcsA</i>	BSU22050	SubtiList, BSORF, UniProt, KEGG
10	(4) coa + nncl + (3) co2 => (3) malcoa + coucoa	naringenin-chalcone synthase	2.3.1.74	<i>bcsA</i>	BSU22050	SubtiList, BSORF, UniProt, KEGG
11	bmdr1p => bmdru1p	methylthioribose-1-phosphate isomerase	5.3.1.23	<i>mtnA</i>	BSU13550	GenoList, UniProt, SEED, MicroCyc
12	bmdru1p => bmdr1p	methylthioribose-1-phosphate isomerase	5.3.1.23	<i>mtnA</i>	BSU13550	GenoList, UniProt, SEED, MicroCyc
13	glnL + prlp => aicar + eig3p + gluL + h	imidazole-glycerol-3-phosphate synthase	2.4.2.-	<i>hisF</i> AND <i>hisH</i>	BSU34870 AND BSU34890	MicroCyc

EK 3 *B. subtilis* Tepkime Sistemi BsRN-2016

Çizelge 2 BsRN-2016 yolizleri

Tepkime #	Yolizi (MicroCyc veritabanı)
1	S-methyl-5-thio- α -D-ribose 1-phosphate degradation
2	methylthiopropionate biosynthesis
3	S-methyl-5-thio- α -D-ribose 1-phosphate degradation
4	S-methyl-5-thio- α -D-ribose 1-phosphate degradation
5	S-methyl-5-thio- α -D-ribose 1-phosphate degradation
6	S-methyl-5-thio- α -D-ribose 1-phosphate degradation
7	proline degradation, arginine degradation I (arginase pathway)
8	glutamine degradation II , glutamate biosynthesis I
9	-
10	-
11	S-methyl-5-thio- α -D-ribose 1-phosphate degradation
12	S-methyl-5-thio- α -D-ribose 1-phosphate degradation
13	histidine biosynthesis
14	glutamine degradation II , glutamate biosynthesis I
15	arginine biosynthesis II (acetyl cycle) , arginine biosynthesis I , uridine-5'-phosphate biosynthesis

EK 3 *B. subtilis* Tepkime Sistemi BsRN-2016

Çizelge 3 BsRN-2016 genleri (MicroCyc)

Gen ismi	Genin kromozomdaki yerinin ismi
<i>mtnD, ykrZ</i>	BSU13620
<i>mtnW, ykrW</i>	BSU13590
<i>mtnX, ykrX</i>	BSU13600
<i>slpH, yitC, comB</i>	BSU10940
<i>mtnB, ykrY</i>	BSU13610
<i>putC, ycgN</i>	BSU03210
<i>rocA, ipa-76d</i>	BSU37780
<i>gltA</i>	BSU18450
<i>gltB</i>	BSU18440
<i>bpsA, bcsA</i>	BSU22050
<i>mtnA, ykrS</i>	BSU13550
<i>hisF</i>	BSU34870
<i>hisH</i>	BSU34890
<i>carA, cpa</i>	BSU11230
<i>carB, cpa</i>	BSU11240
<i>pyrAA</i>	BSU15510
<i>pyrAB</i>	BSU15520
<i>glnA</i>	BSU17460
<i>argJ, argA, argE</i>	BSU11200
<i>dapL, ykuR, dapE</i>	BSU14190
<i>ald, spoVN</i>	BSU31930
<i>proI, yqjO</i>	BSU23800
<i>proG, ykeA, yzcA</i>	BSU12910
<i>proH, yoxE</i>	BSU18480
<i>argF, argC</i>	BSU11250
<i>argB</i>	BSU11210
<i>argD</i>	BSU11220
<i>speB, ywhG</i>	BSU37490
<i>argC</i>	BSU11190
<i>speA, cad</i>	BSU14630
<i>asd</i>	BSU16750
<i>asnB, asn</i>	BSU30540
<i>asnH, yxaN</i>	BSU39920
<i>asnO, yisO, yucB</i>	BSU10790
<i>dapG, lssD</i>	BSU16760

EK 3 *B. subtilis* Tepkime Sistemi BsRN-2016

Çizelge 4 BsRN-2016 metabolitleri

Kısaltma	Metabolit
b0fthf	10-Formyltetrahydrofolate
b2d3k5m	1,2-dihydroxy-3-keto-5-methylthiopentene
b2dag3p	1,2-diacyl-sn-glycerol 3-phosphate
b2dgr	1,2-diacylglycerol
b3dpgj	3-Phospho-D-glyceroyl phosphate
b4bxyl	1,4-beta-D-Xylan
b4glun	1,4-alpha-D-Glucan
b5dap	1,5-Diaminopentane
bag3p	1-Acyl-sn-glycerol 3-phosphate
bp3h5c	L-1-Pyrroline-3-hydroxy-5-carboxylate
bpyr5c	1-Pyrroline-5-carboxylate
i3camp	2',3'-Cyclic AMP
i3ccmp	2',3'-Cyclic CMP
i3cgmp	2',3'-Cyclic GMP
i3cump	2',3'-Cyclic UMP
i3ddhb	2,3-Dihydro-2,3-dihydroxybenzoate
i3dhb	2,3-Dihydroxybenzoate
i3dhba	(2,3-Dihydroxybenzoyl)adenylate
i3dhdp	2,3-Dihydrodipicolinate
i3dhmb	(R)-2,3-Dihydroxy-3-methylbutanoate

EK 4 *B. subtilis* Genom-Seviye Model iBsu1144

Çizelge 1 iBsu1144 tepkime, enzim, ve genleri

T #	Tepkime	Enzim	EC #	Gen(ler)	Veritabanı veya Kaynak
1	$b2d3k5m + o_2 \Rightarrow ikmb + for + h$	acireductone dioxygenase [iron(II)-requiring]	1.13.11.54	<i>mtnD</i>	MicroCyc
2	$b2d3k5m + o_2 \Rightarrow umtp + co + for + h$	acireductone dioxygenase (Ni ²⁺ -requiring)	1.13.11.53	<i>mtnD</i>	MicroCyc
3	$dkmpp \Rightarrow ih3k5m + h$	2,3-diketo-5-methylthiopentyl-1-phosphate enolase	5.3.2.-	<i>mtnW</i>	MicroCyc
4	$ih3k5m + h \Rightarrow dkmpp$	2,3-diketo-5-methylthiopentyl-1-phosphate enolase	5.3.2.-	<i>mtnW</i>	MicroCyc
5	$ih3k5m + h_2o \Rightarrow b2d3k5m + pi$	2-hydroxy-3-keto-5-methylthiopentenyl-1-phosphate phosphatase	3.1.3.-	<i>mtnX</i>	MicroCyc
6	$pslac + h_2o \Rightarrow slac + pi$	2-phosphosulfolactate phosphatase	3.1.3.71	<i>yitC</i>	SubtiList, BSORF, GenoList, UniProt, KEGG, SEED, MicroCyc
7	$bmdru1p \Rightarrow dkmpp + h_2o$	methylthioribulose-1-phosphate dehydratase	4.2.1.109	<i>mtnB</i>	GenoList, UniProt, SEED, MicroCyc
8	$gluL + h + nadh \Rightarrow bpyr5c + (2) h_2o + nad$	1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	1.2.1.88	<i>ycgN</i> OR <i>rocA</i>	UniProt, KEGG, Expasy, SEED, MicroCyc
9	$(2) gluL + nadp \Rightarrow glnL + akg + nadph + h$	glutamate synthase	1.4.1.13	<i>gltA</i> AND <i>gltB</i>	GenoList, UniProt, SEED, MicroCyc
10	$(3) malcoa + coucoa \Rightarrow (4) coa + nncl + (3) co_2$	naringenin-chalcone synthase	2.3.1.74	<i>bcsA</i>	SubtiList, BSORF, UniProt, KEGG

EK 4 *B. subtilis* Genom-Seviye Model iBsu1144

Çizelge 2 iBsu1144 yolizleri

Tepkime #	Yolizi (MicroCyc veritabanı)
1	S-methyl-5-thio- α -D-ribose 1-phosphate degradation
2	methylthiopropionate biosynthesis
3	S-methyl-5-thio- α -D-ribose 1-phosphate degradation
4	S-methyl-5-thio- α -D-ribose 1-phosphate degradation
5	S-methyl-5-thio- α -D-ribose 1-phosphate degradation
6	-
7	S-methyl-5-thio- α -D-ribose 1-phosphate degradation
8	proline degradation, arginine degradation I (arginase pathway)
9	glutamine degradation II , glutamate biosynthesis I

EK 4 *B. subtilis* Genom-Seviye Model *iBsu1144*

Çizelge 3 *iBsu1144*'ün yayımlanmış genom seviye modeller (GEMs) ile karşılaştırılması

+/-: *iBsu1144* tepkimesi yayımlanmış GEM'de var mı?

T#	<i>iBsu1144</i> tepkimesi	Gen-enzim-tepkime bilgisinin bağlı olduğu genom dizinleme çalışması:				
		Kunst vd. (1997)		Barbe vd. (2009)		Belda vd. (2013)
		Oh <i>et al.</i> (2007)	<i>iBsu1103</i> (Henry vd. 2009)	<i>iBsu1103V2</i> (Tanaka vd. 2013)	<i>iBsu1147</i> (Hao vd. 2013)	<i>iBsu1144</i>
1	b2d3k5m + o2 => ikmb + for + h	-	-	-	-	+
2	b2d3k5m + o2 => umtp + co + for + h	-	-	-	-	+
3	dkmpp => ih3k5m + h	+	-	-	-	+
4	ih3k5m + h => dkmpp	+	+	+	+	+
5	ih3k5m + h2o => b2d3k5m + pi	-	-	-	-	+
6	pslac + h2o => slac + pi	-	-	-	-	+
7	bmdru1p => dkmpp + h2o	+	+	+	+	+
8	gluL + h + nadh => bpyr5c + (2) h2o + nad	-	-	-	-	+
9	(2) gluL + nadp => glnL + akg + nadph + h	-	+	+	+	+
10	(3) malcoa + coucoa => (4) coa + nncl + (3) co2	-	-	-	-	+
11	(4) coa + nncl + (3) co2 => (3) malcoa + coucoa	-	-	-	-	+
12	bmdr1p => bmdru1p	+	+	+	+	+
13	bmdru1p => bmdr1p	+	+	+	+	+
14	glnL + prlp => aicar + eig3p + gluL + h	-	-	-	-	+
15	akg + glnL + h + nadph => (2) gluL + nadp	+	+	+	+	+

EK 4 *B. subtilis* Genom-Seviye Model iBsu1144

Çizelge 4 iBsu1144 genleri

*mavi: yaşam için gerekli, siyah: yaşam için gereksiz, mor: yaşam için gerekliliği bilinmiyor (Kaynak: *SubtiWiki*, Erişim: 7-15 Mayıs 2015).

Gen	Genin kromozomdaki yerinin ismi
<i>dapL, ykuR, dapE</i>	BSU14190
<i>groES</i>	BSU06020
<i>groEL</i>	BSU06030
<i>accB</i>	BSU24350
<i>mrpB, yufU</i>	BSU31610
<i>asd</i>	BSU16750
<i>dapF, yutL</i>	BSU32170
<i>dapB</i>	BSU22490
<i>dapA</i>	BSU16770
<i>glyA, glyC, ipc-34d</i>	BSU36900
<i>metK, metE</i>	BSU30550
<i>glmS, gcaA, ybxD</i>	BSU01780
<i>alrA, dal, alr</i>	BSU04640
<i>dapH, ykuQ</i>	BSU14180
<i>racE</i>	BSU28390
<i>bsuMA, ydiO</i>	BSU06060
<i>bsuMB, ydiP</i>	BSU06070
<i>gpsA</i>	BSU22830
<i>glmM, ybbT</i>	BSU01770
<i>gapA, gap</i>	BSU33940
<i>eno</i>	BSU33900
<i>mnaA, yvyH</i>	BSU35660
<i>ispE, yabH</i>	BSU00460
<i>dxr, yluB</i>	BSU16550
<i>dxs, yqiE</i>	BSU24270
<i>pdhA, aceA</i>	BSU14580
<i>pgm</i>	BSU33910
<i>guaB, guaA</i>	BSU00090
<i>mraY</i>	BSU15190
<i>tagA</i>	BSU35750
<i>tagB</i>	BSU35760
<i>tagO, yvhI</i>	BSU35530
<i>tagG</i>	BSU35710
<i>tagH</i>	BSU35700

EK 4 *B. subtilis* Genom-Seviye Model iBsu1144

Çizelge 5 iBsu1144 metabolitleri

Kısaltma	Metabolit
b0fthf	10-Formyltetrahydrofolate
b2d3k5m	1,2-dihydroxy-3-keto-5-methylthiopentene
b2dag3p	1,2-diacyl-sn-glycerol 3-phosphate
b2dgr	1,2-diacylglycerol
b3dpgj	3-Phospho-D-glyceroyl phosphate
b4bxyl	1,4-beta-D-Xylan
b4glun	1,4-alpha-D-Glucan
b5dap	1,5-Diaminopentane
bag3p	1-Acyl-sn-glycerol 3-phosphate
bp3h5c	L-1-Pyrroline-3-hydroxy-5-carboxylate
bpyr5c	1-Pyrroline-5-carboxylate
i3camp	2',3'-Cyclic AMP
i3ccmp	2',3'-Cyclic CMP
i3cgmp	2',3'-Cyclic GMP
i3cump	2',3'-Cyclic UMP
i3ddhb	2,3-Dihydro-2,3-dihydroxybenzoate
i3dhb	2,3-Dihydroxybenzoate
i3dhba	(2,3-Dihydroxybenzoyl)adenylate
i3dhdp	2,3-Dihydrodipicolinate
i3dhmb	(R)-2,3-Dihydroxy-3-methylbutanoate

EK 5 SAP üretiminde Periyot III'te LOT, MOT, ve HOT koşullarında iBsul 144 ile hesaplanan tepkime hızları ve analizleri

Çizelge 1 SAP üretiminde Periyot III'de LOT, MOT, ve HOT koşullarında iBsul 144 ile hesaplanan tepkime hızları

* Akılar 100 ile çarpılıp sitrat tüketim hızına bölünerek normalize akılar hesaplanmıştır.

R#	Tepkime	Tepkime hızı/akı değeri, mmol/(g _{KH} st			*Normalize akılar		
		LOT	MOT	HOT	LOT	MOT	HOT
1	b2d3k5m + o2 => ikmb + for + h	0	0	0	0	0	0
2	b2d3k5m + o2 => umtp + co + for + h	0	0	0	0	0	0
3	dkmpp => ih3k5m + h	0	0	0	0	0	0
4	ih3k5m + h => dkmpp	0	0	0	0	0	0
5	ih3k5m + h2o => b2d3k5m + pi	0	0	0	0	0	0
6	pslac + h2o => slac + pi	0	0	0	0	0	0
7	bmdru1p => dkmpp + h2o	0	0	0	0	0	0
8	gluL + h + nadh => bpyr5c + (2) h2o + nad	0.02	0.015	0.012	0.85	0.41	0.24
9	(2) gluL + nadp => glnL + akg + nadph + h	0	0	0	0	0	0
10	(3) malcoa + coucoa => (4) coa + nncl + (3) co2	0	0	0	0	0	0
11	(4) coa + nncl + (3) co2 => (3) malcoa + coucoa	0	0	0	0	0	0
12	bmdr1p => bmdru1p	0	0	0	0	0	0
13	bmdru1p => bmdr1p	0	0	0	0	0	0
14	glnL + prlp => aicar + eig3p + gluL + h	0.01	0	0.018	0.43	0	0.36
15	akg + glnL + h + nadph => (2) gluL + nadp	0	0	0	0	0	0
16	(2) atp + glnL + h2o + hco3 => (2) adp + cbp + gluL + (2) h + pi	0.063	0.436	0.037	2.68	11.85	0.73
17	atp + gluL + nh4 => adp + glnL + h + pi	0.204	0.986	0.156	8.68	26.79	3.09

EK 5 SAP üretiminde Periyot III'te LOT, MOT, ve HOT koşullarında iBsul144 ile hesaplanan tepkime hızları ve analizleri

Çizelge 2 SAP üretiminde Periyot III'de LOT, MOT, ve HOT koşullarında iBsul144 ile hesaplanan akı oranları

R#	Tepkime	Akı oranları			Normalize akı oranları		
		MOT/LOT	HOT/MOT	HOT/LOT	MOT/LOT	HOT/MOT	HOT/LOT
1	b2d3k5m + o2 => ikmb + for + h	-	-	-	-	-	-
2	b2d3k5m + o2 => umtp + co + for + h	-	-	-	-	-	-
3	dkmpp => ih3k5m + h	-	-	-	-	-	-
4	ih3k5m + h => dkmpp	-	-	-	-	-	-
5	ih3k5m + h2o => b2d3k5m + pi	-	-	-	-	-	-
6	pslac + h2o => slac + pi	-	-	-	-	-	-
7	bmdru1p => dkmpp + h2o	-	-	-	-	-	-
8	gluL + h + nadh => bpyr5c + (2) h2o + nad	0.75	0.8	0.6	0.48	0.59	0.28
9	(2) gluL + nadp => glnL + akg + nadph + h	-	-	-	-	-	-
10	(3) malcoa + coucoa => (4) coa + nncl + (3) co2	-	-	-	-	-	-
11	(4) coa + nncl + (3) co2 => (3) malcoa + coucoa	-	-	-	-	-	-
12	bmdr1p => bmdru1p	-	-	-	-	-	-
13	bmdru1p => bmdr1p	-	-	-	-	-	-
14	glnL + prlp => aicar + eig3p + gluL + h	0		1.8	0		0.84
15	akg + glnL + h + nadph => (2) gluL + nadp	-	-	-	-	-	-
16	(2) atp + glnL + h2o + hco3 => (2) adp + cbp + gluL + (2) h + pi	6.92	0.08	0.59	4.42	0.06	0.27
17	atp + gluL + nh4 => adp + glnL + h + pi	4.83	0.16	0.76	3.09	0.12	0.36
18	accoa + gluL => acglu + coa + h	-	-	-	-	-	-

EK 5 SAP üretiminde Periyot III'te LOT, MOT, ve HOT koşullarında iBsu1144 ile hesaplanan tepkime hızları ve analizleri

Çizelge 3a SAP üretiminde iBsu1144 ile hesaplanan TCA döngüsü akıları

R#	Tepkime	Akılar, mmol/(g _{KH} st			Normalize akılar		
		LOT	MOT	HOT	LOT	MOT	HOT
369	cit => icit	2.516	4.117	6.151	107.06	111.88	121.78
375	icit + nadp => akg + co2 + nadph	2.516	4.117	6.151	107.06	111.88	121.78
371	akg + coa + nad => co2 + nadh + succoa	2.324	3.169	4.396	98.89	86.11	87.03
361	adp + pi + succoa => atp + coa + succ	2.308	2.621	3.508	98.21	71.22	69.45
358	fad + succ => fadh2 + fum	2.324	3.169	4.396	98.89	86.11	87.03
373	fum + h2o => malL	2.42	3.713	4.462	102.98	100.9	88.34
377	malL + nad => h + nadh + oaa	2.42	3.713	4.462	102.98	100.9	88.34
372	accoa + h2o + oaa => cit + coa + h	0.166	0.437	1.1	7.06	11.88	21.78

Çizelge 3b SAP üretiminde iBsu1144 ile hesaplanan TCA döngüsü akı oranları

R#	Tepkime	Akı oranları			Normalize akı oranları		
		MOT/LOT	HOT/MOT	HOT/LOT	MOT/LOT	HOT/MOT	HOT/LOT
369	cit => icit	1.64	1.49	2.44	1.05	1.09	1.14
375	icit + nadp => akg + co2 + nadph	1.64	1.49	2.44	1.05	1.09	1.14
371	akg + coa + nad => co2 + nadh + succoa	1.36	1.39	1.89	0.87	1.01	0.88

EK 5 SAP üretiminde Periyot III'te LOT, MOT, ve HOT koşullarında iBsu1144 ile hesaplanan tepkime hızları ve analizleri

Çizelge 4a SAP üretiminde iBsu1144 ile hesaplanan Pyr nodu akıları

R#	Tepkime	Akılar, mmol/(g _{KH} st			Normalize akılar		
		LOT	MOT	HOT	LOT	MOT	HOT
290	atp + oaa + h => adp + co2 + pep	0.734	2.627	2.089	31.23	71.39	41.36
449	atp + h2o + pyr => amp + (2) h + pep + pi	0	0	0	0	0	0
480	adp + pep + h => atp + pyr	0	0.261	1.195	0	7.09	23.66
1070	pyr + atp => pep + adp + h	0	0	0	0	0	0
34	gluL + pyr => akg + alaL	0.089	0.065	0.04	3.79	1.77	0.79
55	h + (2) pyr => alac + co2	0.17	0.068	0.034	7.23	1.85	0.67
164	alac + h + nadph => i3dhmb + nadp	0.17	0.068	0.034	7.23	1.85	0.67
133	i3dhmb => umob + h2o	0.17	0.068	0.034	7.23	1.85	0.67
474	coa + nad + pyr => accoa + co2 + nadh	0.268	0	0.942	11.4	0	18.65
281	ac + atp => actp + adp	0.127	0	0.461	5.4	0	9.13
282	actp + adp => ac + atp	0	0	0	0	0	0
472	accoa + pi => actp + coa	0	0	0	0	0	0
473	actp + coa => accoa + pi	0.127	0	0.461	5.4	0	9.13
268	ac + atp + coa => accoa + amp + ppi	0	0.036	0	0	0.98	0
372	accoa + h2o + oaa => cit + coa + h	0.166	0.437	1.1	7.06	11.88	21.78
269	atp + hco3 + pyr => adp + h + oaa + pi	0	0	0	0	0	0
1079	adp + h + oaa + pi => atp + hco3 + pyr	0.941	0	0	40.04	0	0
291	malL + nad => pyr + co2 + nadh	0	0	0	0	0	0

EK 5 SAP üretiminde Periyot III'te LOT, MOT, ve HOT koşullarında iBsu1144 ile hesaplanan tepkime hızları ve analizleri

Çizelge 4b SAP üretiminde iBsu1144 ile hesaplanan Pyr nodu akı oranları

R#	Tepkime	Akı oranları			Normalize akı oranları		
		MOT/LOT	HOT/MOT	HOT/LOT	MOT/LOT	HOT/MOT	HOT/LOT
290	atp + oaa + h => adp + co2 + pep	3.58	0.8	2.85	2.29	0.58	1.32
449	atp + h2o + pyr => amp + (2) h + pep + pi	-	-	-	-	-	-
480	adp + pep + h => atp + pyr	-	4.58	-	-	3.34	-
1070	pyr + atp => pep + adp + h	-	-	-	-	-	-
34	gluL + pyr => akgl + alaL	0.73	0.62	0.45	0.47	0.45	0.21
55	h + (2) pyr => alac + co2	0.4	0.5	0.2	0.26	0.36	0.09
164	alac + h + nadph => i3dhmb + nadp	0.4	0.5	0.2	0.26	0.36	0.09
133	i3dhmb => umob + h2o	0.4	0.5	0.2	0.26	0.36	0.09
474	coa + nad + pyr => accoa + co2 + nadh	0	-	3.51	0	-	1.64
281	ac + atp => actp + adp	0	-	3.63	0	-	1.69
282	actp + adp => ac + atp	-	-	-	-	-	-
472	accoa + pi => actp + coa	-	-	-	-	-	-
473	actp + coa => accoa + pi	0	-	3.63	0	-	1.69
268	ac + atp + coa => accoa + amp + ppi	-	0	-	-	0	-
372	accoa + h2o + oaa => cit + coa + h	2.63	2.52	6.63	1.68	1.83	3.08
269	atp + hco3 + pyr => adp + h + oaa + pi	-	-	-	-	-	-
1079	adp + h + oaa + pi => atp + hco3 + pyr	0	-	0	0	-	0
291	malL + nad => pyr + co2 + nadh	-	-	-	-	-	-

EK 5 SAP üretiminde Periyot III'te LOT, MOT, ve HOT koşullarında *i*Bsu1144 ile hesaplanan tepkime hızları ve analizleri

Çizelge 5a SAP üretiminde *i*Bsu1144 ile hesaplanan glikoneogenesis yolizi akıları

R#	Tepkime	Akılar, mmol/(g _{KH} st			Normalize akılar		
		LOT	MOT	HOT	LOT	MOT	HOT
1070	pyr + atp => pep + adp + h	0	0	0	0	0	0
449	atp + h ₂ o + pyr => amp + (2) h + pep + pi	0	0	0	0	0	0
285	h ₂ o + pep => ipg	0.451	1.482	0.849	19.19	40.27	16.81
479	ipg => upg	0.451	1.482	0.849	19.19	40.27	16.81
484	upg + atp => b3dpgj + adp	0.425	1.432	0.381	18.09	38.91	7.54
270	b3dpgj + nadph => g3p + nadp + pi	0.818	2.565	0.381	34.81	69.7	7.54
283	g3p + nad + pi => b3dpgj + nadh	0.393	1.134	0	16.72	30.82	0
482	g3p => dhap	0.199	0.519	0.306	8.47	14.1	6.06
287	dhap + g3p => fdp	0.142	0.478	0.278	6.04	12.99	5.5
411	fdp + h ₂ o => f6p + pi	0.007	0.478	0	0.3	12.99	0
1071	fdp + adp + h => f6p + atp	0.135	0	0.278	5.74	0	5.5
477	f6p => g6p	0.024	0.017	0.684	1.02	0.46	13.54
274	g6p => g1p	0.024	0.017	0.011	1.02	0.46	0.22

EK 5 SAP üretiminde Periyot III'te LOT, MOT, ve HOT koşullarında iBsu1144 ile hesaplanan tepkime hızları ve analizleri

Çizelge 5b SAP üretiminde iBsu1144 ile hesaplanan glikoneogenesis yolizi akı oranları

R#	Tepkime	Akı oranı			Normalize akı oranı		
		MOT/LOT	HOT/MOT	HOT/LOT	MOT/LOT	HOT/MOT	HOT/LOT
1070	pyr + atp => pep + adp + h	-	-	-	-	-	-
449	atp + h2o + pyr => amp + (2) h + pep + pi	-	-	-	-	-	-
285	h2o + pep => ipg	3.29	0.57	1.88	2.1	0.42	0.88
479	ipg => upg	3.29	0.57	1.88	2.1	0.42	0.88
484	upg + atp => b3dpgj + adp	3.37	0.27	0.9	2.15	0.19	0.42
270	b3dpgj + nadph => g3p + nadp + pi	3.14	0.15	0.47	2	0.11	0.22
283	g3p + nad + pi => b3dpgj + nadh	2.89	0	0	1.84	0	0
482	g3p => dhap	2.61	0.59	1.54	1.66	0.43	0.72
287	dhap + g3p => fdp	3.37	0.58	1.96	2.15	0.42	0.91
411	fdp + h2o => f6p + pi	68.29	0	0	43.3	0	0
1071	fdp + adp + h => f6p + atp	0	-	2.06	0	-	0.96
477	f6p => g6p	0.71	40.24	28.5	0.45	29.43	13.27
274	g6p => g1p	0.71	0.65	0.46	0.45	0.48	0.22

EK 5 SAP üretiminde Periyot III'te LOT, MOT, ve HOT koşullarında iBsu1144 ile hesaplanan tepkime hızları ve analizleri

Çizelge 6a SAP üretiminde iBsu1144 ile hesaplanan PPP akıları

R#	Tepkime	Akılar, mmol/(g _{KH} st)			Normalize akılar		
		LOT	MOT	HOT	LOT	MOT	HOT
280	g6p + nadp => apgl + h + nadph	0	0	0.673	0	0	13.32
496	apgl + h2o => apgc + h	0	0	0.673	0	0	13.32
263	atp + glcnD => apgc + adp + h	0	0	0	0	0	0
264	apgc + adp + h => atp + glcnD	0	0	0	0	0	0
271	apgc + nadp => co2 + nadph + ru5pD	0	0	0.673	0	0	13.32
272	co2 + nadph + ru5pD => apgc + nadp	0	0	0	0	0	0
275	ru5pD => xu5pD	0	0	0.421	0	0	8.33
276	xu5pD => ru5pD	0.04	0.439	0	1.79	11.93	0
277	r5p => ru5pD	0	0	0	0	0	0
278	ru5pD => r5p	0.09	0.439	0.252	3.7	11.93	4.99
456	g3p + s7p => e4p + f6p	0.05	0	0.22	2	0	4.36
457	e4p + f6p => g3p + s7p	0	0	0	0	0	0
458	r5p + xu5pD => g3p + s7p	0.05	0	0.22	2	0	4.36
459	g3p + s7p => r5p + xu5pD	0	0	0	0	0	0
460	e4p + xu5pD => f6p + g3p	0	0	0.2	0	0	3.96
461	f6p + g3p => e4p + xu5pD	0.09	0.439	0	3.79	11.93	0
860	atp + r5p => amp + prpp + h	0.04	0.439	0.032	1.7	11.93	0.63
861	amp + prpp + h => atp + r5p	0	0	0	0	0	0

EK 5 SAP üretiminde Periyot III'te LOT, MOT, ve HOT koşullarında iBsu1144 ile hesaplanan tepkime hızları ve analizleri

Çizelge 6b SAP üretiminde iBsu1144 ile hesaplanan PPP akı oranları

R#	Tepkime	Akı oranları			Normalize akı oranları		
		MOT/LOT	HOT/MOT	HOT/LOT	MOT/LOT	HOT/MOT	HOT/LOT
280	g6p + nadp => apgl + h + nadph	-	-	-	-	-	-
496	apgl + h2o => apgc + h	-	-	-	-	-	-
263	atp + glcnD => apgc + adp + h	-	-	-	-	-	-
264	apgc + adp + h => atp + glcnD	-	-	-	-	-	-
271	apgc + nadp => co2 + nadph + ru5pD	-	-	-	-	-	-
272	co2 + nadph + ru5pD => apgc + nadp	-	-	-	-	-	-
275	ru5pD => xu5pD	-	-	-	-	-	-
276	xu5pD => ru5pD	10.45	0	0	6.66	0	0
277	r5p => ru5pD	-	-	-	-	-	-
278	ru5pD => r5p	5.05	0.57	2.9	3.22	0.42	1.35
456	g3p + s7p => e4p + f6p	0	-	4.68	0	-	2.18
457	e4p + f6p => g3p + s7p	-	-	-	-	-	-
458	r5p + xu5pD => g3p + s7p	0	-	4.68	0	-	2.18
459	g3p + s7p => r5p + xu5pD	-	-	-	-	-	-
460	e4p + xu5pD => f6p + g3p	-	-	-	-	-	-
461	f6p + g3p => e4p + xu5pD	4.93	0	0	3.15	0	0
860	atp + r5p => amp + prpp + h	10.98	0.07	0.8	7.02	0.05	0.37
861	amp + prpp + h => atp + r5p	-	-	-	-	-	-

EK 5 SAP üretiminde Periyot III'te LOT, MOT, ve HOT koşullarında iBsu1144 ile hesaplanan tepkime hızları ve analizleri

Çizelge 7 SAP üretiminde iBsu1144 ile hesaplanan histidin sentez yolizi tepkime hızları

R#	Tepkime	Akılar, mmol/(g _{KH} st)		
		LOT	MOT	HOT
131	atp + prpp => ppi + prbatp	0.01	0	0.018
180	h2o + prbatp => ppi + prbamp + h	0.01	0	0.018
179	h2o + prbamp => prfp	0.01	0	0.018
181	prfp => prlp	0.01	0	0.018
14	glnL + prlp => aicar + eig3p + gluL + h	0.01	0	0.018
151	eig3p => h2o + imacp	0.01	0	0.018
94	gluL + imacp => akg + hisp	0.01	0	0.018
147	h2o + hisp => histd + pi	0.01	0	0.018
146	h2o + histd + (2) nad => (3) h + hisL + (2) nadh	0.01	0	0.018

EK 5 SAP üretiminde Periyot III'te LOT, MOT, ve HOT koşullarında iBsu1144 ile hesaplanan tepkime hızları ve analizleri

Çizelge 8 SAP üretiminde iBsu1144 ile hesaplanan aromatik asit grubu amino asit yolizi akıları

R#	Tepkime	Akılar, mmol/(g _{KH} st)		
		LOT	MOT	HOT
62	e4p + h2o + pep => idda7p + pi	0.136	0.439	0.02
65	idda7p => udhq + pi + h	0.136	0.439	0.02
63	udhq => udhsk + h2o	0.136	0.439	0.02
73	udhsk + h + nadph => nadp + skm	0.136	0.439	0.02
75	atp + skm => adp + skm5p + h	0.136	0.439	0.02
71	pep + skm5p => upsme + pi	0.136	0.439	0.02
61	upsme => chor + pi + h	0.136	0.439	0.02
58	chor + glnL => anth + gluL + h + pyr	0.006	0.004	0.003
59	anth + prpp => ppi + pran	0.006	0.004	0.003
69	pran => icpr5p	0.006	0.004	0.003
66	icpr5p + h => uig3p + co2 + h2o	0.006	0.004	0.003
76	uig3p + serL => g3p + h2o + trpL	0.006	0.004	0.003
60	chor => pphn	0.131	0.435	0.018
68	h + pphn => co2 + h2o + phpyr	0.106	0	0.018
97	gluL + phpyr => akg + pheL	0.106	0	0.018
60	chor => pphn	0.131	0.435	0.018
67	nad + pphn => u4hpp + co2 + nadh	0.025	0.477	0
78	u4hpp + gluL => akg + tyrL	0.025	0.477	0

*Ardışık tepkimeler aynı renkle gösterilmiştir.

EK 5 SAP üretiminde Periyot III'te LOT, MOT, ve HOT koşullarında iBsu1144 ile hesaplanan tepkime hızları ve analizleri

Çizelge 9 SAP üretiminde iBsu1144 ile hesaplanan serin grubu amino asit yolizi akıları

R#	Tepkime	Akılar, mmol/(g _{KH} st)		
		LOT	MOT	HOT
88	upg + nad => uphp + h + nadh	0.03	0.051	0.864
90	uphp + gluL => akg + pserL	0.03	0.051	0.864
211	h2o + pserL => pi + serL	0.03	0.051	0.864
81	serL + thf => gly + h2o + mlthf	0.02	0.011	0.889
92	accoa + serL => acser + coa	0.01	0.004	0.003
85	acser + h2s => ac + cysL + h	0.01	0.004	0.003
86	cysthL + h2o => iobut + cysL + nh4	0	0	0
81	serL + thf => gly + h2o + mlthf	0.02	0.011	0.889
552	h + mlthf + nadph => bmthf + nadp	0.02	0.01	0.888
100	bmthf + hcysL => metL + thf	0.02	0.01	0.888

*Ardışık tepkimeler aynı renkle gösterilmiştir.

EK 5 SAP üretiminde Periyot III'te LOT, MOT, ve HOT koşullarında iBsu1144 ile hesaplanan tepkime hızları ve analizleri

Çizelge 10 SAP üretiminde iBsu1144 ile hesaplanan alanin grubu amino asit yolizi akıları

R#	Tepkime	Akılar, mmol/(g _{KH} st)		
		LOT	MOT	HOT
34	gluL + pyr => akg + alaL	0.089	0.065	0.04
55	h + (2) pyr => alac + co2	0.17	0.068	0.034
164	alac + h + nadph => i3dhmb + nadp	0.17	0.068	0.034
133	i3dhmb => umob + h2o	0.17	0.068	0.034
198	umob + h + nadh + nh4 => h2o + nad + valL	0.077	0.034	0
200	umob + gluL => akg + valL	0	0	0
161	umob + accoa + h2o => uc3hmp + coa + h	0.092	0.034	0.043
160	uc3hmp => iippm + h2o	0.092	0.034	0.043
158	iippm + h2o => uc2hmp	0.092	0.034	0.043
156	uc2hmp + nad => uc4mop + h + nadh	0.092	0.034	0.043
210	uc4mop + h => dmop + co2	0.092	0.034	0.043
167	dmop + gluL => akg + leuL	0	0	0
169	dmop + h + nadh + nh4 => h2o + leuL + nad	0.087	0.03	0.04

*Ardışık tepkimeler aynı renkle gösterilmiştir.

EK 5 SAP üretiminde Periyot III'te LOT, MOT, ve HOT koşullarında iBsu1144 ile hesaplanan tepkime hızları ve analizleri

Çizelge 11 SAP üretiminde iBsu1144 ile hesaplanan aspartik asit grubu amino asit yolizi akıları

R#	Tepkime	Akılar, mmol/(g _{KH} st)		
		LOT	MOT	HOT
42	gluL + oaa => akg + aspL	0.579	0.649	1.272
113	ikmb + aspL => metL + oaa	0	0	0
**38	aspL + atp + glnL + h2o => amp + asnL + gluL + ppi + h	0.023	0.017	0.008
39	aspL + atp => dpasp + adp	0.436	0.161	1.187
37	dpasp + nadph + h => aspsa + nadp + pi	0.436	0.161	1.187
47	aspsa + pyr => i3dhdp + h + (2) h2o	0.125	0.033	0.187
46	i3dhdp + h + nadph => nadp + thdp	0.125	0.033	0.187
107	accoa + h2o + thdp => acamoxm + coa	0.125	0.033	0.187
108	acamoxm + gluL => i6dapime + akg	0.125	0.033	0.187
19	i6dapime + h2o => i6dap + ac	0.125	0.033	0.187
44	i6dap => i6dap2	0.125	0.033	0.187
43	i6dap2 + h => co2 + lysL	0.115	0.026	0.183
49	aspsa + h + nadph => homL + nadp	0.31	0.128	1
50	atp + homL => adp + phom + h	0.294	0.089	0.112
51	h2o + phom => pi + thrL	0.294	0.089	0.112
**194	thrL => iobut + nh4	0.125	0	0.102
118	iobut + h + pyr => iahbut + co2	0.125	0.03	0.102

Ardışık tepkimeler aynı renkle gösterilmiştir. ** Hız kısıtlayıcı basamak olarak tahmin edilmiştir.**

EK 5 SAP üretiminde Periyot III'te LOT, MOT, ve HOT koşullarında iBsu1144 ile hesaplanan tepkime hızları ve analizleri

Çizelge 12 SAP üretiminde iBsu1144 ile hesaplanan glutamik asit grubu amino asit yolizi akıları

R#	Tepkime	Akılar, mmol/(g _{KH} st)		
		LOT	MOT	HOT
{96, 1078, 1081}, {29, 34, 42, 78, 90, 94, 97, 108}	akg => gluL	0.192	0.946	1.757
{17}, {14, 16, 38, 58, 99, 558, 950, 966, 974, 975}	gluL => glnL	0.027	0.019	0.055
8	gluL + h + nadh => bpyr5c + (2) h2o + nad	0.02	0.015	0.012
24	bpyr5c + (2) h + nadph => nadp + proL	0.02	0.015	0.012
176	acorn + gluL => acglu + ornL	0.058	0.015	0.035
18	accoa + gluL => acglu + coa + h	0	0	0
27	acglu + atp => acg5p + adp	0.058	0.015	0.035
32	acg5p + nadph + h => acg5sa + nadp + pi	0.058	0.015	0.035
29	acg5sa + gluL => acorn + akg	0.058	0.015	0.035
119	acorn + h2o => ac + ornL	0	0	0
25	cbp + ornL => citrL + h + pi	0.058	0.015	0.035
129	aspL + atp + citrL => amp + argsuc + ppi + h	0.058	0.015	0.035
127	argsuc => argL + fum	0.058	0.015	0.035
126	argL + h2o => ornL + urea	0	0	0

* Ardışık tepkimeler aynı renkle gösterilmiştir.

EK 5 SAP üretiminde Periyot III'te LOT, MOT, ve HOT koşullarında iBsu1144 ile hesaplanan tepkime hızları ve analizleri

Çizelge 13 SAP üretiminde LOT koşulunda darboğaz basamakların analizi

Amino asitler	Amino asitlerin SAP'daki molar yüzdesi	*Amino asitlerin LOT'daki toplam sentez akışı, mmol/(g _{KH} st)	Amino asit hücre dışı ortamda HPLC ile belirlendi mi? (+/-)	
Cys	0	0.005	+	
Trp	0.36	0.006	+	
His	1.82	0.01	+	
Met	1.82	0.016	+	
Pro	3.65	0.02	+	
*Asn	6.57	0.023	-	*Olası darboğaz amino asit
Tyr	4.74	0.025	+	
Ser	11.6	0.026	+	
Arg	1.46	0.058	+	
Orn	0	0.058	+	
Citr	0	0.058	+	
Val	11.3	0.077	+	
Leu	5.84	0.087	+	
Ala	14.5	0.089	+	
Phe	1.46	0.106	+	
Lys	3.28	0.115	+	
Ile	3.65	0.115	+	
Gly	12.7	0.159	+	
Gln	2.55	0.204	+	
Thr	7.29	0.294	+	
Hom	0	0.31	+	

EK 5 SAP üretiminde Periyot III'te LOT, MOT, ve HOT koşullarında iBsu1144 ile hesaplanan tepkime hızları ve analizleri

Çizelge 14a SAP üretiminde MOT koşulunda darboğaz basamakların analizi

Amino asitler	Amino asitlerin SAP'daki molar yüzdesi	*Amino asitlerin MOT'daki toplam sentez akışı, mmol/(g _{KH} st)	Amino asit hücre dışı ortamda HPLC ile belirlendi mi? (+/-)	
His	1.82	0	+	
Phe	1.46	0	+	
Trp	0.36	0.004	+	
Cys	0	0.004	+	
Arg	1.46	0.015	+	
Pro	3.65	0.015	+	
Orn	0	0.015	+	
Citr	0	0.015	+	
*Asn	6.57	0.017	-	*Olası darboğaz amino asit
Ile	3.65	0.022	-	
Lys	3.28	0.026	+	
Leu	5.84	0.03	+	
Val	11.3	0.034	+	
Ser	11.6	0.051	+	
Ala	14.5	0.065	+	
Gly	12.7	0.079	+	
Thr	7.29	0.089	-	
Hom	0	0.128	+	
Met	1.82	0.457	+	
Tyr	4.74	0.477	+	
Asp	3.28	0.649	-	

EK 5 SAP üretiminde Periyot III'te LOT, MOT, ve HOT koşullarında iBsu1 144 ile hesaplanan tepkime hızları ve analizleri

Çizelge 14b SAP üretiminde MOT koşulunda darboğaz basamakların analizi (devam)

	*Asn	Ile	Thr	Asp
$\sum r_{ai}$: Hücre dışında tespit edilmeyen <i>i</i> amino asitinin toplam sentez hızı, mmol/(g _{KH} st)	0.017	0.022	0.089	0.65
α_{ai-PSR} : SAP sentez tepkimesinde <i>i</i> amino asitinin stokiyometrik katsayısı	6.57	3.65	7.29	3.28
R_{LF-i} : Hız-kısıtlayıcı basamak tahmin fonksyonu, $R_{LF-i} = \alpha_{ai-PSR} / \sum r_{ai}$, g _{KH} st/mmol	386.5	165.91	81.91	5.05

***Asn sentezi SAP fermentasyonunun MOT koşulunda darboğaz olarak tahmin edilmiştir.**

EK 5 SAP üretiminde Periyot III'te LOT, MOT, ve HOT koşullarında iBsu1144 ile hesaplanan tepkime hızları ve analizleri

Çizelge 15a SAP üretiminde HOT koşulunda darboğaz basamakların analizi

Amino asitler	Amino asitlerin SAP'daki molar yüzdesi	*Amino asitlerin HOT'daki toplam sentez akışı, mmol/(g _{KH} st)	Amino asit hücre dışı ortamda HPLC ile belirlendi mi? (+/-)	
Val	11.3	0	+	
Trp	0.36	0.003	+	
Cys	0	0.003	+	
*Asn	6.57	0.008	-	*Olası darboğaz amino asit
Tyr	4.74	0.011	+	
Pro	3.65	0.012	+	
His	1.82	0.018	+	
Phe	1.46	0.018	+	
Arg	1.46	0.035	+	
Orn	0	0.035	+	
Citr	0	0.035	+	
Leu	5.84	0.04	+	
Ala	14.5	0.04	+	
Ile	3.65	0.097	-	
Thr	7.29	0.112	+	
Gln	2.55	0.156	+	
Lys	3.28	0.183	+	
Ser	11.6	0.864	-	
Met	1.82	0.888	+	

EK 5 SAP üretiminde Periyot III'te LOT, MOT, ve HOT koşullarında iBsu1 144 ile hesaplanan tepkime hızları ve analizleri

Çizelge 15b SAP üretiminde HOT koşulunda darboğaz basamakların analizi (devam)

	*Asn	Ile	Ser
$\sum r_{ai}$: Hücre dışında tespit edilmeyen <i>i</i> amino asitinin toplam sentez hızı, mmol/(g _{KH} st)	0.008	0.097	0.864
α_{ai-PSR} : SAP sentez tepkimesinde <i>i</i> amino asitinin stokiyometrik katsayısı	6.57	3.65	11.6
R_{LF-i} : Hız-kısıtlayıcı basamak tahmin fonksyonu, $R_{LF-i} = \alpha_{ai-PSR} / \sum r_{ai}$, g _{KH} st/mmol	821.25	37.63	13.43

***Asn sentezi SAP fermentasyonunun HOT koşulunda darboğaz olarak tahmin edilmiştir.**

EK6. BsBRM-1999 (Çalık vd. 1999) ve iBsu1144 akılarının karşılaştırılması

BsBRM-1999 R # (Çalık vd. 1999)	iBsu1144 R #	Oksijen Aktarım Koşulları								
		LOT			MOT			HOT		
		iBsu1144 akısı, r_{GSM}	BsBRM-1999 akısı, r_{BRM}	Akıların oranı: $\frac{r_{BRM}}{r_{GSM}}$	iBsu1144 akısı, r_{GSM}	BsBRM-1999 akısı, r_{BRM}	Akıların oranı: $\frac{r_{BRM}}{r_{GSM}}$	iBsu1144 akısı, r_{GSM}	BsBRM-1999 akısı, r_{BRM}	Akıların oranı: $\frac{r_{BRM}}{r_{GSM}}$
TCA döngüsü										
1. Cit => ICit	R369	2.52	2.48	0.98	4.12	6.52	1.58	6.15	7.23	1.18
2. ICit => αKG + CO ₂ + NADPH	R375	2.52	2.48	0.98	4.12	6.52	1.58	6.15	1.91	0.31
3. αKG => SucCoA + CO ₂ + NADH	R371	2.32	2.30	0.99	3.17	6.36	2.01	4.40	0	0
4. SucCoA + Pi + ADP => Suc + ATP	R361	2.31	2.30	1.00	2.62	6.36	2.43	3.51	0	0
5. Suc + ATP => SucCoA + ADP + Pi	R360	0	0	-	0	0	-	0	0	-
6. Suc => Fum + FADH ₂	R358	2.32	2.30	0.99	3.17	6.36	2.01	4.40	5.32	1.21
7. Fum => Mal	R373	2.42	2.40	0.99	3.71	6.40	1.73	4.46	5.54	1.24

EK 7 SAP üretiminin MOT koşulu için *iBsu1144* kullanılarak gerçekleştirilen akı değişkenliği analizi

Çizelge 1 SAP üretiminin MOT koşulu için *iBsu1144* kullanılarak gerçekleştirilen akı değişkenliği analizi sonuçları

R#	Tepkime	Enzim	EC #	*Gen	Amaç fonksiyonları aşağıda verilen <i>iBsu1144</i> işletimleriyle elde edilen akı değerleri (mmol/(g _{KH} st)):	
					Hücre içinde SAP birikiminin minimizasyonu	Hücre içinde SAP birikiminin maksimizasyonu
1	b2d3k5m + o2 => ikmb + for + h	acireductone dioxygenase [iron(II)-requiring]	1.13.11.54	<i>mtnD</i>	0	0
2	b2d3k5m + o2 => umtp + co + for + h	acireductone dioxygenase (Ni2+-requiring)	1.13.11.53	<i>mtnD</i>	0	0
3	dkmpp => ih3k5m + h	2,3-diketo-5-methylthiopentyl-1-phosphate enolase	5.3.2.-	<i>mtnW</i>	0	0
4	ih3k5m + h => dkmpp	2,3-diketo-5-methylthiopentyl-1-phosphate enolase	5.3.2.-	<i>mtnW</i>	0	0
5	ih3k5m + h2o => b2d3k5m + pi	2-hydroxy-3-keto-5-methylthiopentenyl-1-phosphate phosphatase	3.1.3.-	<i>mtnX</i>	0	0
6	pslac + h2o => slac + pi	2-phosphosulfolactate phosphatase	3.1.3.71	<i>yitC</i>	0	0
7	bmdru1p => dkmpp + h2o	methylthioribulose-1-phosphate dehydratase	4.2.1.109	<i>mtnB</i>	0	0
8	gluL + h + nadh => bpyr5c + (2) h2o + nad	1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	1.2.1.88	<i>ycgN</i> OR <i>rocA</i>	0.015	0.075
9	(2) gluL + nadp => glnL + akg + nadph + h	glutamate synthase	1.4.1.13	<i>gltA</i> AND <i>gltB</i>	0	0.321

EK 7 SAP üretiminin MOT koşulu için *iBsu1144* kullanılarak gerçekleştirilen akı değişkenliği analizi

Çizelge 2 SAP üretimi için MOT’da *iBsu1144* kullanılarak belirlenen aktif tepkimeler

Tepkime sayısı	R#	Aktif tepkime	Gen	Akı (mmol/(g _{KH} st)): Hücre içinde SAP birikiminin minimizasyonu	Akı (mmol/(g _{KH} st)): Hücre içinde SAP birikiminin maksimizasyonu
1	8	gluL + h + nadh => bpyr5c + (2) h2o + nad	<i>ycgN</i> OR <i>rocA</i>	0.015	0.075
2	16	(2) atp + glnL + h2o + hco3 => (2) adp + cbp + gluL + (2) h + pi	(<i>carA</i> AND <i>carB</i>) OR (<i>pyrAA</i> AND <i>pyrAB</i>)	0.436	0.042
3	19	i6dapime + h2o => i6dap + ac	<i>dapL</i>	0.033	0.086
4	24	bpyr5c + (2) h + nadph => nadp + proL	<i>proG</i> OR <i>proH</i> OR <i>proI</i> OR <i>comER</i>	0.015	0.075
5	25	cbp + ornL => citrL + h + pi	<i>argF</i>	0.015	0.039
6	27	acglu + atp => acg5p + adp	<i>argB</i>	0.015	0.039
7	29	acg5sa + gluL => acorn + akg	<i>argD</i>	0.015	0.039
8	32	acg5p + nadph + h => acg5sa + nadp + pi	<i>argC</i>	0.015	0.039
9	34	gluL + pyr => akg + alaL		0.065	0.304
10	37	dpasp + nadph + h => aspsa + nadp + pi	<i>asd</i>	0.161	0.591
11	38	aspL + atp + glnL + h2o => amp + asnL + gluL + ppi + h	<i>asnB</i> OR <i>asnH</i> OR <i>asnO</i>	0.017	0.125
12	39	aspL + atp => dpasp + adp	<i>dapG</i> OR <i>yclM</i> OR <i>lysC</i>	0.161	0.591
13	42	gluL + oaa => akg + aspL	<i>yhdR</i> OR <i>aspB</i> OR <i>yugH</i>	0.649	0.876
14	43	i6dap2 + h => co2 + lysL	<i>lysA</i>	0.026	0.079
15	44	i6dap => i6dap2	<i>dapF</i>	0.033	0.086

EK 7 SAP üretiminin MOT koşulu için iBsu1144 kullanılarak gerçekleştirilen akı değişkenliği analizi

Çizelge 3 SAP üretimi için MOT’da iBsu1144 kullanılarak belirlenen kapalı tepkimeler

Tepkime sayısı	R#	Kapalı tepkime	Gen	Akı (mmol/(g _{KH} st)): Hücre içinde SAP birikiminin minimizasyonu	Akı (mmol/(g _{KH} st)): Hücre içinde SAP birikiminin maksimizasyonu
1	1	b2d3k5m + o2 => ikmb + for + h	<i>mtnD</i>	0	0
2	2	b2d3k5m + o2 => umtp + co + for + h	<i>mtnD</i>	0	0
3	3	dkmpp => ih3k5m + h	<i>mtnW</i>	0	0
4	4	ih3k5m + h => dkmpp	<i>mtnW</i>	0	0
5	5	ih3k5m + h2o => b2d3k5m + pi	<i>mtnX</i>	0	0
6	6	pslac + h2o => slac + pi	<i>yitC</i>	0	0
7	7	bmdru1p => dkmpp + h2o	<i>mtnB</i>	0	0
8	10	(3) malcoa + coucoa => (4) coa + nncl + (3) co2	<i>bcsA</i>	0	0
9	11	(4) coa + nncl + (3) co2 => (3) malcoa + coucoa	<i>bcsA</i>	0	0
10	12	bmdr1p => bmdru1p	<i>mtnA</i>	0	0
11	13	bmdru1p => bmdr1p	<i>mtnA</i>	0	0
12	15	akg + glnL + h + nadph => (2) gluL + nadp	<i>gltA</i> AND <i>gltB</i>	0	0
13	18	accoa + gluL => acglu + coa + h	<i>snaB</i> OR <i>argJ</i>	0	0
14	20	i6dap + ac => i6dapime + h2o	<i>dapL</i>	0	0
15	21	alaL + h2o + nad => h + nadh + nh4 + pyr	<i>ald</i>	0	0
16	22	glu5sa => bpyr5c + h + h2o		0	0
17	23	bpyr5c + h + h2o => glu5sa		0	0
18	26	citrL + h + pi => cbp + ornL	<i>argF</i>	0	0
19	28	acorn + akg => acg5sa + gluL	<i>argD</i>	0	0

EK 7 SAP üretiminin MOT koşulu için iBsu1144 kullanılarak gerçekleştirilen akı değişkenliği analizi

Çizelge 4 SAP üretimi için MOT’da iBsu1144 kullanılarak belirlenen aktif tepkimelerin genleri

* mavi: yaşam için gerekli gen, mor: yaşam için gerekliliği bilinmeyen gen, siyah: yaşam için gerekli olmayan gen (<http://subtiwiki.uni-goettingen.de/>, erişim tarihi: Mayıs 2015).

<i>dapL</i>	<i>murB</i>	<i>adk</i>	<i>trpD</i>	<i>yhdR</i>	<i>aldX</i>	<i>menF</i>	<i>yhfS</i>	<i>pyrD</i>	<i>ykoK</i>
<i>asd</i>	<i>murF</i>	<i>tmk</i>	<i>trpE</i>	<i>kbl</i>	<i>dhaS</i>	<i>yciA</i>	<i>yusK</i>	<i>pyrDII</i>	<i>tyrA</i>
<i>dapF</i>	<i>murAA</i>	<i>guaB</i>	<i>aroH</i>	<i>bcd</i>	<i>yfmT</i>	<i>mtrA</i>	<i>ydbM</i>	<i>pyrC</i>	
<i>dapB</i>	<i>gerCB</i>	<i>yybQ</i>	<i>pheA</i>	<i>leuB</i>	<i>pdhD</i>	<i>ytxM</i>	<i>yusJ</i>	<i>purF</i>	
<i>dapA</i>	<i>ywaB</i>	<i>yufT</i>	<i>aroX</i>	<i>ilvD</i>	<i>odhB</i>	<i>nadB</i>	<i>acdA</i>	<i>guaA</i>	
<i>glyA</i>	<i>yqeJ</i>	<i>mrpB</i>	<i>aroC</i>	<i>yrpC</i>	<i>odhA</i>	<i>nadC</i>	<i>pksI</i>	<i>pyrE</i>	
<i>glmS</i>	<i>menB</i>	<i>yufV</i>	<i>yqhS</i>	<i>leuC</i>	<i>dltA</i>	<i>nadA</i>	<i>yusL</i>	<i>pyrF</i>	
<i>dapH</i>	<i>menE</i>	<i>mrpD</i>	<i>asnO</i>	<i>leuD</i>	<i>dltB</i>	<i>ypjQ</i>	<i>ysiB</i>	<i>nrgA</i>	
<i>alrA</i>	<i>ytfD</i>	<i>mrpF</i>	<i>hom</i>	<i>leuA</i>	<i>dltD</i>	<i>yutG</i>	<i>yjfR</i>	<i>ykaB</i>	
<i>racE</i>	<i>fold</i>	<i>yvzE_pseudo</i>	<i>thrB</i>	<i>ilvC</i>	<i>dltC</i>	<i>psd</i>	<i>ycgT</i>	<i>tetB</i>	
<i>ydiP</i>	<i>gerCC</i>	<i>alrB</i>	<i>thrC</i>	<i>yjcI</i>	<i>ggaA</i>	<i>yngHA</i>	<i>yfnB</i>	<i>defB</i>	
<i>ydiO</i>	<i>gerCA</i>	<i>racX</i>	<i>yitB</i>	<i>tdh</i>	<i>tagE</i>	<i>bkdB</i>	<i>yqfW</i>	<i>defA</i>	
<i>gpsA</i>	<i>menD</i>	<i>argF</i>	<i>dapG</i>	<i>mtbP</i>	<i>glpK</i>	<i>bkdAB</i>	<i>ytdI</i>	<i>rocG</i>	
<i>gapA</i>	<i>dfrA</i>	<i>argB</i>	<i>yclM</i>	<i>gapB</i>	<i>ggaB</i>	<i>bkdAA</i>	<i>nrdEB</i>	<i>gudB</i>	
<i>eno</i>	<i>nadE</i>	<i>argD</i>	<i>lysC</i>	<i>pgcA</i>	<i>tkt</i>	<i>lpdV</i>	<i>nrdEB</i>	<i>mrpE</i>	
<i>yvyH</i>	<i>pgsA</i>	<i>argC</i>	<i>aroB</i>	<i>yloR</i>	<i>yveT</i>	<i>yqiD</i>	<i>pdp</i>	<i>mrpG</i>	
<i>ybbT</i>	<i>accC</i>	<i>ycgN</i>	<i>trpC</i>	<i>ywlF</i>	<i>yveR</i>	<i>yfhR</i>	<i>cdd</i>	<i>phoA</i>	
<i>yabH</i>	<i>accB</i>	<i>rocA</i>	<i>trpF</i>	<i>fbaA</i>	<i>gtaB</i>	<i>yhfb</i>	<i>yaaF</i>	<i>phoB</i>	
<i>yluB</i>	<i>accA</i>	<i>carA</i>	<i>aroA</i>	<i>citG</i>	<i>ytdA</i>	<i>yjbW</i>	<i>ndk</i>	<i>phoD</i>	
<i>yqiE</i>	<i>accD</i>	<i>carB</i>	<i>aroD</i>	<i>citC</i>	<i>yngB</i>	<i>ycsD</i>	<i>deoD</i>	<i>yvoE</i>	
<i>pgm</i>	<i>yqfP</i>	<i>pyrAB</i>	<i>aroI</i>	<i>citH</i>	<i>pgi</i>	<i>yjaX</i>	<i>pnp</i>	<i>ylnB</i>	
<i>mraY</i>	<i>yqfY</i>	<i>pyrAA</i>	<i>lysA</i>	<i>rsbX</i>	<i>murAB</i>	<i>pksF</i>	<i>purL</i>	<i>yitA</i>	
<i>tagA</i>	<i>yacN</i>	<i>argJ</i>	<i>aroF</i>	<i>rsbP</i>	<i>tpi</i>	<i>yhfl</i>	<i>purD</i>	<i>yvgR</i>	
<i>tagB</i>	<i>yacM</i>	<i>proG</i>	<i>serA</i>	<i>purT</i>	<i>pgk</i>	<i>lcfA</i>	<i>purM</i>	<i>yvgQ</i>	
<i>tagO</i>	<i>ywpB</i>	<i>proH</i>	<i>serC</i>	<i>ysfC</i>	<i>galE</i>	<i>yngI</i>	<i>purC</i>	<i>yubG</i>	
<i>tagG</i>	<i>yjaY</i>	<i>proI</i>	<i>cysE</i>	<i>ysfD</i>	<i>yubB</i>	<i>yhft</i>	<i>thyB</i>	<i>yuaA</i>	
<i>tagH</i>	<i>fabG</i>	<i>comER</i>	<i>hisC</i>	<i>ykwC</i>	<i>yitJ</i>	<i>pksJ</i>	<i>thyA</i>	<i>trkA</i>	
<i>tagF</i>	<i>fabD</i>	<i>asnB</i>	<i>trpA</i>	<i>sdhA</i>	<i>pabC</i>	<i>ydaB</i>	<i>purE</i>	<i>ykqB</i>	
<i>gcaD</i>	<i>yhdO</i>	<i>asnH</i>	<i>trpB</i>	<i>sdhB</i>	<i>folC</i>	<i>pssA</i>	<i>purQ</i>	<i>ykrM</i>	
<i>ddlA</i>	<i>trxB</i>	<i>aspB</i>	<i>cysK</i>	<i>sdhC</i>	<i>sul</i>	<i>ypfP</i>	<i>pyrH</i>	<i>yvdB</i>	

EK 7 SAP üretiminin MOT koşulu için iBsu1144 kullanılarak gerçekleştirilen akı değişkenliği analizi

Çizelge 5 SAP üretimi için MOT'ta iBsu1144 kullanılarak belirlenen kapalı tepkimelerin genleri

* mavi: yaşam için gerekli gen, mor: yaşam için gerekliliği bilinmeyen gen, siyah: yaşam için gerekli olmayan gen (<http://subtiwiki.uni-goettingen.de/>, erişim tarihi: Mayıs 2015).

dapL	adk	yclM	mtnE	ansA	kdgA	yyaI	xynB	ribR	yhdW	purB
asd	tmk	yugH	speE	ansB	yugT	manA	yfnG	tenA	fadN	purH
dapF	hprT	aspB	gabT	bltD	yvdL	ypjF	ynbB	efeN	ynbG	pyrDII
glyA	fnt	proJ	ytkP	paiA	sacA	yqiS	tuaH	hemL	yjID	pyrC
metK	metS	yhdR	cysK	mtbP	ykwC	pfk	ytcA	gsaB	narI	purN
alrA	gltX	hom	alrB	ywfE	ycsA	bglA	cwlD	hemH	ctaC	pyrE
racE	mrpF	proA	rocF	yxaG	argB	yhcW	ybbD	hemC	qcrC	pyrR
gpsA	mrpD	proB	argH	bdhA	aldX	yodV	ylbI	ylbF	qoxD	gbsA
eno	yufV	iolA	argG	gntK	galE	yqjD	ylbQ	sirB	yjdK	gbsB
yvyH	mrpB	rocG	hisZ	rbsK	sdhA	araB	menF	nasF	ctaA	penP
ybbT	yufT	yqhS	hisG	gutB	sucC	araD	panB	hemB	nfrAA	spoVFA
ydiP	pdhA	gudB	hutG	pycA	mmgE	yulC	pncA	hemD	lctE	spsK
ydiO	yluB	aroC	defA	gndA	prpB	tkl	panC	hemE	yfnB	spsJ
prs	groES	trpF	pdxT	pgcA	citB	treA	yaaD	ylbD	ytdI	yjbO
pgm	groEL	aroA	yrcP	ywlF	citG	yckG	dhbE	ylbI	yknA	yxeI
guaB	pcrA	aroD	kbl	glpD	citC	yckF	bioF	hemA	pdp	sodA
gcaD	yvzE_pseudo	hisC	ycgN	purT	citH	xylA	thiA	yhfJ	drm	cah
ddlA	msrB	patB	hutH	fbaA	bglC	xylB	ribG	bkdAA	yaaF	yqcM
fold	mtnD	mccB	rocA	mtlD	yqkG	pta	ribH	lpdV	yerA	phoA
yqeJ	mtnW	yxeP	defB	ybcM	araA	pgi	hemZ	pdhD	yunH	yitA
ytaG	mtnX	metC	bcd	ytsJ	yqiU	tpi	bioB	yisP	udk	yvgQ
yueK	yitC	cysH	ilvK	iolS	ycbC	pgk	bioW	bkdAB	yaaG	ygcA
dfrA	mtnB	yisZ	leuC	lacA	fruB	yulE	ribA	bkdB	dra	yqgK
ribC	bcsA	ylbC	ilvC	ycbH	gmuE	iolB	bioD	ypgA	yosS	ytgD
fabD	mtnA	serA	kamA	ycbF	gdh	yisS	thiK	yjbW	yumD	ykuT
fabG	gltA	serC	rocD	nagA	mdxM	iolG	yjbV	yfhR	relP	yqeW
yjaY	gltB	cysE	argJ	yjmJ	galK	yuxG	thiL	yhfL	ndk	mrpE
ywpB	ald	hipO	hisA	yjmA	melA	yktC	thiE	yhfS	purC	mrpG
acpS	speB	nasD	proG	yjmF	galT	yvdK	panD	yusK	pnp	tetB
yhdO	argF	ytjP	rsbU	yjmE	glgB	ackA	dhbA	ydbM	deoD	trpD
yluA	argD	nasE	bsaA	yjmI	glgP	ytjB	ykkE	mmgC	tdk	trpA
yfkN	speA	mtnN	yqjR	glcK	glgA	iolI	dhbB	acdA	yunL	trpC

EK 7 SAP üretiminin MOT koşulu için iBsu1144 kullanılarak gerçekleştirilen akı değişkenliği analizi

Çizelge 5.1 SAP üretimi için MOT’da iBsu1144 kullanılarak belirlenen, silinmeye aday genler

yvzE_pseudo	pdhC	yclM	mtnE	ansA	kdgA	yyaI	xynB	ribR	yhdW	purB	tuaB
msrB	ykgB	yugH	speE	ansB	yugT	manA	yfnG	tenA	fadN	purH	tuaC
nrdEB	sdhB	aspB	gabT	bltD	yvdL	ypjF	yngB	efeN	yngG	pyrDII	tuaE
nrdEB	sucD	proJ	ytkP	paiA	sacA	yqiS	tuaH	hemL	yjlD	pyrC	tuaF
ydcI	bglH	yhdR	cysK	mtbP	ykwC	pfk	ytCA	gsaB	narI	purN	tuaG
rppG	gmuD	hom	alrB	ywfE	ycsA	bglA	cwlD	hemH	ctaC	pyrE	tuaD
yhaU	yjhB	proA	rocF	yxAG	argB	yhcW	ybbD	hemC	qcrC	pyrR	ywqF
yhaT	glgD	proB	argH	bdhA	aldX	yodV	ylbI	ylfN	qoxD	gbsA	ykpB
ilvE	gmuF	iolA	argG	gntK	galE	yqjD	ylbQ	sirB	yjdK	gbsB	dhbC
leuD	yvyI	rocG	hisZ	rbsK	sdhA	araB	menF	nasF	ctaA	penP	ribB
comER	licH	yqhS	hisG	gutB	sucC	araD	panB	hemB	nfrAA	spoVFA	yacB
proI	iolE	gudB	hutG	pycA	mmgE	yulC	pncA	hemD	lctE	spsK	lcfA
proH	iolC	aroC	defA	gndA	prpB	tkT	panC	hemE	yfnB	spsJ	yngI
ureC	iolD	trpF	pdxT	pgcA	citB	treA	yaaD	ylfN	ytdI	yjbO	yhfT
ureB	iolJ	aroA	yrcP	ywlF	citG	yckG	dhbE	yloI	yknA	yxeI	pksJ
yccC	gtaB	aroD	kbl	glpD	citC	yckF	bioF	hemA	pdp	sodA	ydaB
ymfJ	ytdA	hisC	ycgN	purT	citH	xylA	thiA	yhfJ	drm	cah	yhfB
paiB	tuaA	patB	hutH	fbaA	bglC	xylB	ribG	bkdAA	yaaF	yqcM	pksF
yvdD	mtnD	mccB	rocA	mtlD	yqkG	pta	ribH	lpdV	yerA	phoA	yjaX
ywrD	mtnW	yxeP	defB	ybcM	araA	pgi	hemZ	pdhD	yunH	yitA	ycsD
gntZ	mtnX	metC	bcd	ysJ	yqiU	tpi	bioB	ysP	udk	yvgQ	mmgA
yjpA	yitC	cysH	ilvK	iolS	ycbC	pgk	bioW	bkdAB	yaaG	ygcA	yusJ
yjjA	mtnB	ysZ	leuC	lacA	fruB	yulE	ribA	bkdB	dra	yqgK	yqiK
yetA	bcsA	ylfN	ilvC	ycbH	gmuE	iolB	bioD	ypgA	yosS	ytgD	glpQA
ydeA	mtnA	serA	kamA	ycbF	gdh	ysS	thiK	yjbW	yumD	ykuT	yffR
yhdN	gltA	serC	rocD	nagA	mdxM	iolG	yjbV	yfhR	relP	yqeW	yutJ
yesZ	gltB	cysE	argJ	yjmJ	galK	yuxG	thiL	yhfL	ndk	mrpE	yumB
ycdG	ald	hipO	hisA	yjmA	melA	yktC	thiE	yhfS	purC	mrpG	narG
ycbD	speB	nasD	proG	yjmF	galT	yvdK	panD	yusK	pnP	tetB	narH
ywdH	argF	ytjP	rsbU	yjmE	glgB	ackA	dhbA	ydbM	deoD	trpD	ctaF
yfmT	argD	nasE	bsaA	yjmI	glgP	ytjB	ykkE	mmgC	tdk	trpA	ctaE
aldY	speA	mtnN	yqjR	glcK	glgA	iolI	dhbB	acdA	yunL	trpC	ctaD
dhaS	argC	speD	yjcI	kduI	glgC	yvcT	yqjS	dqkA	yurB	pabA	qcrA
ytCB	lysC	racX	ycnH	kduD	pksG	ycdF	hemY	ysiB	xpt	glsB	qcrB
sdhC	dapG	mtnK	ureA	kdgK	glvA	yxfF	ykvK	pksI	apt	glsA	qoxA

EK 8 SAP üretiminin MOT koşulu için iBsu1144 kullanılarak gerçekleştirilen akı değişkenliği analiz sonuçlarının Morimoto vd. (2008) ile karşılaştırılması

Çizelge 1 Morimoto vd.(2008)'nin *B.subtilis* MBG874'i oluşturmak için sildikleri genler

* Bu çalışmada Morimoto vd.(2008)'nin yayımladıkları gen aralıkları MicroScope veritabanından araştırılarak silinen genler belirlenmiştir (<https://www.genoscope.cns.fr/agc/microscope/metabolism/microcyc> 2009).

Morimoto vd.(2008)'nin sildikleri genler

SPb
PBSX
pro1
pro2
pro3
pro4
pro5
pro6
skin
pks
pps
BSU05220_ydeJ
BSU05230_ydeK
BSU05240_ydeL
BSU05250_ydeM
BSU05260_ydeN

***ydeK-ydhU*(başlangıç konumu: 569556-son konum: 633930)**

EK 8 SAP üretiminin MOT koşulu için iBsu1144 kullanılarak gerçekleştirilen akı değişkenliği analiz sonuçlarının Morimoto vd. (2008) ile karşılaştırılması

Çizelge 2 SAP üretimi için MOT koşulunda aktif tepkimelerin genleri ve Morimoto vd. (2008)'nin *B.subtilis* MBG874'yi oluşturmak için sildiği genler

*mavi: yaşam için gerekli gen, siyah: yaşam için gereksiz gen, mor: yaşam için gerekliliği bilinmeyen genler.

* SAP üretimi için MOT koşulunda aktif tepkimelerin genleri	Gen Morimoto vd. (2008) tarafından silindi mi? (+/-)	Aktif tepkime için iBsu1144 R#	Tepkimeyi katalizleyen izoenzimler var mı? (+/-)
<i>dapL</i>	-	R19	-
<i>asd</i>	-	R37	-
<i>dapF</i>	-	R44	-
<i>dapB</i>	-	R46	-
<i>dapA</i>	-	R47	-
<i>glyA</i>	-	R81	-
<i>glmS</i>	-	R99	-
<i>dapH</i>	-	R107	-
<i>alrA</i>	-	R124	+
<i>racE</i>	-	R140	+
<i>ydiP</i>	-	R208	+
<i>ydiO</i>	-	R208	+

EK 8 SAP üretiminin MOT koşulu için iBsu1144 kullanılarak gerçekleştirilen akı değişkenliği analiz sonuçlarının Morimoto vd. (2008) ile karşılaştırılması

Çizelge 3 SAP üretimi için MOT koşulunda kapalı tepkimelerin genleri ve Morimoto vd. (2008)'nin *B.subtilis* MBG874'yi oluşturmak için sildiği genler

*mavi: yaşam için gerekli gen, siyah: yaşam için gereksiz gen, mor: yaşam için gerekliliği bilinmeyen genler.

* SAP üretimi için MOT koşulunda kapalı tepkimelerin genleri	Gen Morimoto vd. (2008) tarafından silindi mi? (+/-)	Gen SAP üretiminin MOT koşulunda aktif tepkime geni mi? (+/-)	Kapalı tepkime için iBsu1144 R#
<i>dapL</i>	-	+	R20
<i>asd</i>	-	+	R36
<i>dapF</i>	-	+	R45
<i>glyA</i>	-	+	R82
<i>metK</i>	-	+	R98
<i>alrA</i>	-	+	R125
<i>racE</i>	-	+	R139
<i>gpsA</i>	-	+	R261
<i>eno</i>	-	+	R284
<i>yvyH</i>	-	+	R300, R467-R468
<i>ybbT</i>	-	+	R305
<i>ydiP</i>	-	+	R207
<i>ydiO</i>	-	+	R207
<i>pgm</i>	-	+	R478
<i>guaB</i>	-	+	R504

EK 8 SAP üretiminin MOT koşulu için iBsu1144 kullanılarak gerçekleştirilen akı değişkenliği analiz sonuçlarının Morimoto vd. (2008) ile karşılaştırılması

Çizelge 4 SAP üretimi için MOT koşulunda izoenzimleri olmayan aktif tepkimelerin genleri

*mavi: yaşam için gerekli gen, siyah: yaşam için gereksiz gen, mor: yaşam için gerekliliği bilinmeyen genler.

dapL	menB	aroX	ywlF	folK	pyrC
asd	menE	hom	fbaA	pabB	purF
dapF	ytfD	thrB	citG	ytzM	guaA
dapB	folD	thrC	citC	nadB	pyrE
dapA	gerCC	yitB	citH	nadC	pyrF
glyA	gerCA	aroB	purT	nadA	nrgA
glmS	menD	trpC	ysfC	psd	ykaB
dapH	dfrA	trpF	ysfD	bkdB	tetB
gpsA	nadE	aroA	sdhA	bkdAB	mrpE
eno	pgsA	aroD	sdhB	bkdAA	mrpG
yvyH	yqfP	aroI	sdhC	lpdV	yvgR
ybbT	yqfY	lysA	citB	yqiD	yvgQ
yabH	yacN	aroF	sucC	pssA	yfkE
yluB	yacM	serA	sucD	ypfP	tyrA
yqiE	yhdO	serC	pdhD	yfiX	
pgm	yloD	cysE	odhB	yusL	
mraY	prs	hisC	odhA	nrdEB	
tagA	cmk	trpA	dltA	nrdEB	
tagB	adk	trpB	dltB	pdp	
tagO	tmk	argH	dltD	cdd	
tagG	guaB	argG	dltC	yaaF	
tagH	yufT	kbl	tagE	ndk	
tagF	mrpB	bcd	glpK	deoD	
gcaD	yufV	leuB	tkl	purD	
ddlA	mrpD	ilvD	pgi	purM	
murE	mrpF	leuC	tpi	purC	
tagD	argF	leuD	pgk	purE	
murG	argB	leuA	galE	pyrH	
murD	argD	ilvC	yubB	purK	
murC	argC	yjcI	yitJ	purB	

EK 9 *B. subtilis* Genom-Seviye Model *iBsu1144-rhGH*

Çizelge 1 *iBsu1144-rhGH* tepkime, enzim, ve genleri

R#	Tepkime	Enzim	EC #	Gen(ler)	Genin kromozomdaki yerinin ismi	Veritabanı veya Kaynak
1	$b2d3k5m + o_2 \Rightarrow ikmb + for + h$	acireductone dioxygenase [iron(II)-requiring]	1.13.11.54	<i>mtnD</i>	BSU13620	MicroCyc
2	$b2d3k5m + o_2 \Rightarrow umtp + co + for + h$	acireductone dioxygenase (Ni ²⁺ -requiring)	1.13.11.53	<i>mtnD</i>	BSU13620	MicroCyc
3	$dkmpp \Rightarrow ih3k5m + h$	2,3-diketo-5-methylthiopentyl-1-phosphate enolase	5.3.2.-	<i>mtnW</i>	BSU13590	MicroCyc
4	$ih3k5m + h \Rightarrow dkmpp$	2,3-diketo-5-methylthiopentyl-1-phosphate enolase	5.3.2.-	<i>mtnW</i>	BSU13590	MicroCyc
5	$ih3k5m + h_2o \Rightarrow b2d3k5m + pi$	2-hydroxy-3-keto-5-methylthiopentenyl-1-phosphate phosphatase	3.1.3.-	<i>mtnX</i>	BSU13600	MicroCyc
6	$pslac + h_2o \Rightarrow slac + pi$	2-phosphosulfolactate phosphatase	3.1.3.71	<i>yitC</i>	BSU10940	SubtiList, BSORF, GenoList, UniProt, KEGG, SEED, MicroCyc
7	$bmdru1p \Rightarrow dkmpp + h_2o$	methylthioribulose-1-phosphate dehydratase	4.2.1.109	<i>mtnB</i>	BSU13610	GenoList, UniProt, SEED, MicroCyc

EK 9 *B. subtilis* Genom-Seviye Model iBsu1144-rhGH

Çizelge 2 iBsu1144-rhGH tepkime-yolizi ilişkisi

R#	Yolizi (Kaynak: MicroCyc veritabanı)
1	S-methyl-5-thio- α -D-ribose 1-phosphate degradation
2	methylthiopropionate biosynthesis
3	S-methyl-5-thio- α -D-ribose 1-phosphate degradation
4	S-methyl-5-thio- α -D-ribose 1-phosphate degradation
5	S-methyl-5-thio- α -D-ribose 1-phosphate degradation
6	-
7	S-methyl-5-thio- α -D-ribose 1-phosphate degradation
8	proline degradation, arginine degradation I (arginase pathway)
9	glutamine degradation II , glutamate biosynthesis I
10	-
11	-
12	S-methyl-5-thio- α -D-ribose 1-phosphate degradation
13	S-methyl-5-thio- α -D-ribose 1-phosphate degradation
14	histidine biosynthesis
15	glutamine degradation II , glutamate biosynthesis I
16	arginine biosynthesis II (acetyl cycle) , arginine biosynthesis I , uridine-5'-phosphate biosynthesis
17	nitrate reduction V (assimilatory)
18	arginine biosynthesis II (acetyl cycle) , ornithine biosynthesis
19	lysine biosynthesis II
20	lysine biosynthesis II
21	alanine degradation IV
22	citrulline biosynthesis , proline biosynthesis III , proline biosynthesis I , ornithine degradation II (Stickland reaction) , arginine degradation VI (arginase 2 pathway) , arginine degradation I (arginase pathway)

EK 9 *B. subtilis* Genom-Seviye Model *i*Bsu1144-rhGH

Çizelge 3 *i*Bsu1144-rhGH'nin yayımlanmış genom seviye modeller (GEM) ile karşılaştırılması

+/-: *i*Bsu1144-rhGH tepkimesi yayımlanmış GEM'de var mı?

R#	<i>i</i> Bsu1144-rhGH tepkimeleri	Gen-enzim-tepkime bilgisinin bağlı olduğu genom dizinleme çalışması:				
		Kunst vd. (1997)		Barbe vd. (2009)		Belda vd. (2013)
		Oh vd. (2007)	<i>i</i> Bsu1103 (Henry vd. 2009)	<i>i</i> Bsu1103V2 (Tanaka vd. 2013)	<i>i</i> Bsu1147 (Hao vd. 2013)	<i>i</i> Bsu1144-rhGH
1	b2d3k5m + o2 => ikmb + for + h	-	-	-	-	+
2	b2d3k5m + o2 => umtp + co + for + h	-	-	-	-	+
3	dkmpp => ih3k5m + h	+	-	-	-	+
4	ih3k5m + h => dkmpp	+	+	+	+	+
5	ih3k5m + h2o => b2d3k5m + pi	-	-	-	-	+
6	pslac + h2o => slac + pi	-	-	-	-	+
7	bmdru1p => dkmpp + h2o	+	+	+	+	+
8	gluL + h + nadh => bpyr5c + (2) h2o + nad	-	-	-	-	+
9	(2) gluL + nadp => glnL + akg + nadph + h	-	+	+	+	+
10	(3) malcoa + coucoa => (4) coa + nncl + (3) co2	-	-	-	-	+
11	(4) coa + nncl + (3) co2 => (3) malcoa + coucoa	-	-	-	-	+
12	bmdr1p => bmdru1p	+	+	+	+	+
13	bmdru1p => bmdr1p	+	+	+	+	+
14	glnL + prlp => aicar + eig3p + gluL + h	-	-	-	-	+
15	akg + glnL + h + nadph => (2) gluL + nadp	+	+	+	+	+
16	(2) atp + glnL + h2o + hco3 => (2) adp + cbp + gluL + (2) h + pi	+	+	+	+	+
17	atp + gluL + nh4 => adp + glnL + h + pi	+	+	+	+	+

EK 9 *B. subtilis* Genom-Seviye Model iBsu1144-rhGH

Çizelge 4 iBsu1144-rhGH genleri

*mavi: yaşam için gerekli gen, kırmızı: yaşam için gereksiz gen, mor: yaşam için gerekliliği bilinmeyen gen (Kaynak: SubtiWiki, Erişim tarihi: 7-15 Mayıs 2015)

*Gen	Genin kromozomdaki yerinin adı
<i>dapL, ykuR, dapE</i>	BSU14190
<i>groES</i>	BSU06020
<i>groEL</i>	BSU06030
<i>accB</i>	BSU24350
<i>mrpB, yufU</i>	BSU31610
<i>asd</i>	BSU16750
<i>dapF, yutL</i>	BSU32170
<i>dapB</i>	BSU22490
<i>dapA</i>	BSU16770
<i>glyA, glyC, ipc-34d</i>	BSU36900
<i>metK, metE</i>	BSU30550
<i>glmS, gcaA, ybxD</i>	BSU01780
<i>alrA, dal, alr</i>	BSU04640
<i>dapH, ykuQ</i>	BSU14180
<i>racE</i>	BSU28390
<i>bsuMA, ydiO</i>	BSU06060
<i>bsuMB, ydiP</i>	BSU06070
<i>gpsA</i>	BSU22830
<i>glmM, ybbT</i>	BSU01770
<i>gapA, gap</i>	BSU33940
<i>eno</i>	BSU33900
<i>mnaA, yvyH</i>	BSU35660
<i>ispE, yabH</i>	BSU00460
<i>dxr, yluB</i>	BSU16550
<i>dxs, yqiE</i>	BSU24270
<i>pdhA, aceA</i>	BSU14580
<i>pgm</i>	BSU33910
<i>guaB, guaA</i>	BSU00090
<i>mraY</i>	BSU15190
<i>tagA</i>	BSU35750
<i>tagB</i>	BSU35760
<i>tagO, yvhI</i>	BSU35530
<i>tagG</i>	BSU35710

EK 9 *B. subtilis* Genom-Seviye Model *iBsu1144-rhGH*

Çizelge 5 *iBsu1144-rhGH* metabolitleri

Kısaltma	Metabolit
b0fthf	10-Formyltetrahydrofolate
b2d3k5m	1,2-dihydroxy-3-keto-5-methylthiopentene
b2dag3p	1,2-diacyl-sn-glycerol 3-phosphate
b2dgr	1,2-diacylglycerol
b3dpgj	3-Phospho-D-glyceroyl phosphate
b4bxyl	1,4-beta-D-Xylan
b4glun	1,4-alpha-D-Glucan
b5dap	1,5-Diaminopentane
bag3p	1-Acyl-sn-glycerol 3-phosphate
bp3h5c	L-1-Pyrroline-3-hydroxy-5-carboxylate
bpyr5c	1-Pyrroline-5-carboxylate
i3camp	2',3'-Cyclic AMP
i3ccmp	2',3'-Cyclic CMP
i3cgm	2',3'-Cyclic GMP
i3cump	2',3'-Cyclic UMP
i3ddhb	2,3-Dihydro-2,3-dihydroxybenzoate
i3dhb	2,3-Dihydroxybenzoate
i3dhba	(2,3-Dihydroxybenzoyl)adenylate
i3dhdp	2,3-Dihydrodipicolinate
i3dhmb	(R)-2,3-Dihydroxy-3-methylbutanoate

EK 10 rhGH biyoprosesinde LOT, MOT, ve HOT'ta Periyod III için iBsu1144-rhGH ile hesaplanan tepkime hızları ve analizleri

Çizelge 1 rhGH biyoprosesinde LOT, MOT, ve HOT'da Periyod III için iBsu1144-rhGH ile hesaplanan tepkime hızları

R#	Tepkime	Akı, mmol/(g _{KH} st)			Akı oranı		
		LOT	MOT	HOT	MOT/LOT	HOT/MOT	HOT/LOT
1	b2d3k5m + o2 => ikmb + for + h	0	0	0	-	-	-
2	b2d3k5m + o2 => umtp + co + for + h	0	0	0	-	-	-
3	dkmpp => ih3k5m + h	0	0	0	-	-	-
4	ih3k5m + h => dkmpp	0	0	0	-	-	-
5	ih3k5m + h2o => b2d3k5m + pi	0	0	0	-	-	-
6	pslac + h2o => slac + pi	0	0	0	-	-	-
7	bmdru1p => dkmpp + h2o	0	0	0	-	-	-
8	gluL + h + nadh => bpyr5c + (2) h2o + nad	0.001	0.014	0.002	14	0.14	2
9	(2) gluL + nadp => glnL + akg + nadph + h	0	0.068	0	-	0	-
10	(3) malcoa + coucoa => (4) coa + nncl + (3) co2	0	0	0	-	-	-
11	(4) coa + nncl + (3) co2 => (3) malcoa + coucoa	0	0	0	-	-	-
12	bmdr1p => bmdru1p	0	0	0	-	-	-
13	bmdru1p => bmdr1p	0	0	0	-	-	-
14	glnL + prlp => aicar + eig3p + gluL + h	6.25E-04	0.005	7.30E-04	8	0.15	1.17
15	akg + glnL + h + nadph => (2) gluL + nadp	0	0	0	-	-	-
16	(2) atp + glnL + h2o + hco3 => (2) adp + cbp + gluL + (2) h + pi	0.166	0.02	0.011	0.12	0.55	0.07
17	atp + gluL + nh4 => adp + glnL + h + pi	0.18	0	0.02	0	-	0.11
18	accoa + gluL => acglu + coa + h	0	0	0	-	-	-

EK 10 rhGH biyoprosesinde LOT, MOT, ve HOT'ta Periyod III için iBsu1144-rhGH ile hesaplanan tepkime hızları ve analizleri

Çizelge 2 rhGH biyoprosesinde iBsu1144-rhGH ile hesaplanan glikoliz yolizi akıları

R#	Tepkime	Akı, mmol/(g _{KH} st)			Akı oranı		
		LOT	MOT	HOT	MOT/LOT	HOT/MOT	HOT/LOT
323	atp + glcD => adp + g6p	1.14	2.846	1.98	2.5	0.7	1.74
475	g6p => f6p	0.936	2.564	1.92	2.74	0.75	2.05
474	atp + f6p => adp + fdp + h	0.934	2.543	1.909	2.72	0.75	2.04
285	fdp => dhap + g3p	0.934	2.543	1.909	2.72	0.75	2.04
480	dhap => g3p	0.93	2.539	1.906	2.73	0.75	2.05
282	g3p + nad + pi => b3dpgj + nadh	1.853	5.055	3.809	2.73	0.75	2.06
482	b3dpgj + adp => upg + atp	1.853	5.055	3.809	2.73	0.75	2.06
477	upg => ipg	2.161	5.94	4.576	2.75	0.77	2.12
283	ipg => h2o + pep	2.161	5.94	4.576	2.75	0.77	2.12
479	adp + pep + h => atp + pyr	2.093	5.862	4.568	2.8	0.78	2.18
1055	rhGH sentez tepkimesi	4.50E-05	0.002	8.00E-05	44.44	0.04	1.78

EK 10 rhGH biyoprosesinde LOT, MOT, ve HOT'ta Periyod III için iBsu1144-rhGH ile hesaplanan tepkime hızları ve analizleri

Çizelge 3 rhGH biyoprosesinde iBsu1144-rhGH ile hesaplanan TCA döngüsü akıları

R#	Tepkime	Akı, mmol/(g _{KH} st)			Akı oranı		
		LOT	MOT	HOT	MOT/LOT	HOT/MOT	HOT/LOT
371	accoa + h ₂ o + oaa => cit + coa + h	1.799	5.514	4.507	3.07	0.82	2.51
368	cit => icit	1.799	5.514	4.507	3.07	0.82	2.51
374	icit + nadp => akg + co ₂ + nadph	1.799	5.514	4.507	3.07	0.82	2.51
370	akg + coa + nad => co ₂ + nadh + succoa	1.791	5.433	4.497	3.03	0.83	2.51
360	adp + pi + succoa => atp + coa + succ	1.774	5.417	4.493	3.05	0.83	2.53
357	fad + succ => fadh ₂ + fum	1.791	5.433	4.497	3.03	0.83	2.51
372	fum + h ₂ o => malL	1.795	5.464	4.501	3.04	0.82	2.51
376	malL + nad => h + nadh + oaa	2.582	7.479	5.999	2.9	0.8	2.32
1055	rhGH sentez tepkimesi	4.50E-05	0.002	8.00E-05	44.44	0.04	1.78

EK 10 rhGH biyoprosesinde LOT, MOT, ve HOT'ta Periyod III için iBsu1144-rhGH ile hesaplanan tepkime hızları ve analizleri

Çizelge 4 rhGH biyoprosesinde iBsu1144-rhGH ile hesaplanan PFY akıları

R#	Tepkime	Akı, mmol/(g _{KH} st)			Akı oranı		
		LOT	MOT	HOT	MOT/LOT	HOT/MOT	HOT/LOT
279	g6p + nadp => apgl + h + nadph	0.203	0.28	0.058	1.38	0.21	0.29
495	apgl + h2o => apgc + h	0.203	0.28	0.058	1.38	0.21	0.29
263	atp + glcnD => apgc + adp + h	0	0	0	-	-	-
264	apgc + adp + h => atp + glcnD	0.015	0.28	0.058	18.67	0.21	3.87
270	apgc + nadp => co2 + nadph + ru5pD	0.188	0	0	0	-	0
271	co2 + nadph + ru5pD => apgc + nadp	0	0	0	-	-	-
274	ru5pD => xu5pD	0	0	0	-	-	-
275	xu5pD => ru5pD	0	0.019	0.009	-	0.47	-
276	r5p => ru5pD	0	0	0	-	-	-
277	ru5pD => r5p	0.188	0.019	0.009	0.1	0.47	0.05
455	g3p + s7p => e4p + f6p	0.017	0.01	0	0.59	0	0
456	e4p + f6p => g3p + s7p	0	0	0.003	-	-	-
457	r5p + xu5pD => g3p + s7p	0.017	0.01	0	0.59	0	0
458	g3p + s7p => r5p + xu5pD	0	0	0.003	-	-	-
459	e4p + xu5pD => f6p + g3p	0	0	0	-	-	-
460	f6p + g3p => e4p + xu5pD	0.017	0.029	0.006	1.71	0.21	0.35
859	atp + r5p => amp + prpp + h	0.171	0.009	0.011	0.05	1.22	0.06
860	amp + prpp + h => atp + r5p	0	0	0			

EK 10 rhGH biyoprosesinde LOT, MOT, ve HOT'ta Periyod III için iBsu1144-rhGH ile hesaplanan tepkime hızları ve analizleri

Çizelge 5 rhGH biyoprosesinde iBsu1144-rhGH ile hesaplanan Pyr nodu akıları

R #	Tepkime	Akı, mmol/(g _{KH} st)			Akı oranı		
		LOT	MOT	HOT	MOT/LOT	HOT/MOT	HOT/LOT
803	lacL + nad => h + nadh + pyr	0	0.031	0	-	0	-
804	h + nadh + pyr => lacL + nad	0.043	0	0	0	-	0
479	adp + pep + h => atp + pyr	2.093	5.862	4.568	2.80	0.78	2.18
34	gluL + pyr => akG + alaL	0.005	0.016	0.005	3.20	0.31	1.00
55	h + (2) pyr => alac + co2	0.011	0.059	0.006	5.36	0.10	0.55
164	alac + h + nadph => i3dhmb + nadp	0.011	0.059	0.006	5.36	0.10	0.55
133	i3dhmb => umob + h2o	0.011	0.059	0.006	5.36	0.10	0.55
473	coa + nad + pyr => accoa + co2 + nadh	1.229	3.714	3.046	3.02	0.82	2.48
280	ac + atp => actp + adp	0.011	0.025	0.006	2.27	0.24	0.55
472	actp + coa => accoa + pi	0.011	0.025	0.006	2.27	0.24	0.55
371	accoa + h2o + oaa => cit + coa + h	1.799	5.514	4.507	3.07	0.82	2.51
269	atp + hco3 + pyr => adp + h + oaa + pi	0	0	0	-	-	-
291	pyr + co2 + nadh => malL + nad	0.787	2.015	1.498	2.56	0.74	1.90
1055	rhGH sentez tepkimesi	4.50E-05	0.002	8.00E-05	44.44	0.04	1.78

*Yolizindeki ardışık tepkimeler aynı renkle gösterilmiştir.

EK 10 rhGH biyoprosesinde LOT, MOT, ve HOT'ta Periyod III için iBsu1144-rhGH ile hesaplanan tepkime hızları ve analizleri

Çizelge 6 rhGH biyoprosesinde iBsu1144-rhGH ile hesaplanan serin grubu amino asit yolizi akıları

R#	Tepkime	Akı, mmol/(g _{KH} st)			Akı oranı		
		LOT	MOT	HOT	MOT/LOT	HOT/MOT	HOT/LOT
88	upg + nad => uphp + h + nadh	0.026	0.048	0.008	1.85	0.17	0.31
90	uphp + gluL => akg + pserL	0.026	0.048	0.008	1.85	0.17	0.31
211	h2o + pserL => pi + serL	0.026	0.048	0.008	1.85	0.17	0.31
92	accoa + serL => acser + coa	5.20E-04	0.007	6.60E-04	13.46	0.09	1.27
85	acser + h2s => ac + cysL + h	5.20E-04	0.007	6.60E-04	13.46	0.09	1.27
81	serL + thf => gly + h2o + mlthf	0.017	0.008	0.004	0.47	0.50	0.24
551	h + mlthf + nadph => bmthf + nadp	0.014	0	9.20E-04	0	-	0.07
100	bmthf + hcysL => metL + thf	0.014	0	9.20E-04	0	-	0.07
1055	rhGH sentez tepkimesi	4.50E-05	0.002	8.00E-05	44.44	0.04	1.78

* Yolizindeki ardışık tepkimeler aynı renkle gösterilmiştir.

EK 10 rhGH biyoprosesinde LOT, MOT, ve HOT'ta Periyod III için iBsu1144-rhGH ile hesaplanan tepkime hızları ve analizleri

Çizelge 7 rhGH biyoprosesinde iBsu1144-rhGH ile hesaplanan alanin grubu amino asit yolizi akıları

R #	Tepkime	Akı, mmol/(g _{KH} st)			Akı oranı		
		LOT	MOT	HOT	MOT/LOT	HOT/MOT	HOT/LOT
34	gluL + pyr => akg + alaL	0.005	0.016	0.005	3.20	0.31	1.00
55	h + (2) pyr => alac + co2	0.011	0.059	0.006	5.36	0.10	0.55
164	alac + h + nadph => i3dhmb + nadp	0.011	0.059	0.006	5.36	0.10	0.55
133	i3dhmb => umob + h2o	0.011	0.059	0.006	5.36	0.10	0.55
161	umob + accoa + h2o => uc3hmp + coa + h	0.004	0.045	0.005	11.25	0.11	1.25
160	uc3hmp => iippm + h2o	0.004	0.045	0.005	11.25	0.11	1.25
158	iippm + h2o => uc2hmp	0.004	0.045	0.005	11.25	0.11	1.25
156	uc2hmp + nad => uc4mop + h + nadh	0.004	0.045	0.005	11.25	0.11	1.25
210	uc4mop + h => dmop + co2	0.004	0.045	0.005	11.25	0.11	1.25
167	dmop + gluL => akg + leuL	0	0	0	-	-	-
169	dmop + h + nadh + nh4 => h2o + leuL + nad	0.003	0.045	0.004	15	0.09	1.33
198	umob + h + nadh + nh4 => h2o + nad + valL	0.869	2.272	1.527	2.61	0.67	1.76
199	akg + valL => umob + gluL	0.861	2.258	1.526	2.62	0.68	1.77
1055	rhGH sentez tepkimesi	4.50E-05	0.002	8.00E-05	44.44	0.04	1.78

* Yolizindeki ardışık tepkimeler aynı renkle gösterilmiştir.

EK 10 rhGH biyoprosesinde LOT, MOT, ve HOT'ta Periyod III için iBsu1144-rhGH ile hesaplanan tepkime hızları ve analizleri

Çizelge 8 rhGH biyoprosesinde iBsu1144-rhGH ile hesaplanan aromatik asit grubu amino asit yolizi akıları

R #	Tepkime	Akı, mmol/(g _{KH} st)			Akı oranı		
		LOT	MOT	HOT	MOT/LOT	HOT/MOT	HOT/LOT
62	e4p + h2o + pep => idda7p + pi	0.033	0.038	0.003	1.15	0.08	0.09
65	idda7p => udhq + pi + h	0.033	0.038	0.003	1.15	0.08	0.09
63	udhq => udhsk + h2o	0.033	0.038	0.003	1.15	0.08	0.09
73	udhsk + h + nadph => nadp + skm	0.033	0.038	0.003	1.15	0.08	0.09
75	atp + skm => adp + skm5p + h	0.033	0.038	0.003	1.15	0.08	0.09
71	pep + skm5p => upsme + pi	0.033	0.038	0.003	1.15	0.08	0.09
61	upsme => chor + pi + h	0.033	0.038	0.003	1.15	0.08	0.09
60	chor => pphn	0.028	0.036	0.003	1.29	0.08	0.11
67	nad + pphn => u4hpp + co2 + nadh	0.001	0.014	0.001	14	0.07	1
78	u4hpp + gluL => akg + tyrL	0.001	0.014	0.001	14	0.07	1
68	h + pphn => co2 + h2o + phpyr	0.027	0.022	0.002	0.81	0.09	0.07
97	gluL + phpyr => akg + pheL	0.027	0.022	0.002	0.81	0.09	0.07
58	chor + glnL => anth + gluL + h + pyr	0.006	0.002	4.06E-04	0.33	0.2	0.07
59	anth + prpp => ppi + pran	0.006	0.002	4.06E-04	0.33	0.2	0.07
69	pran => icpr5p	0.006	0.002	4.06E-04	0.33	0.2	0.07
66	icpr5p + h => uig3p + co2 + h2o	0.006	0.002	4.06E-04	0.33	0.2	0.07
76	uig3p + serL => g3p + h2o + trpL	0.006	0.002	4.06E-04	0.33	0.2	0.07
1055	rhGH sentez tepkimesi	4.50E-05	0.002	8.00E-05	44.44	0.04	1.78

EK 10 rhGH biyoprosesinde LOT, MOT, ve HOT'ta Periyod III için iBsu1144-rhGH ile hesaplanan tepkime hızları ve analizleri

Çizelge 9 rhGH biyoprosesinde iBsu1144-rhGH ile hesaplanan aspartik asit grubu amino asit yolizi akıları

R #	Tepkime	Akı, mmol/(g _{KH} st)			Akı oranı		
		LOT	MOT	HOT	MOT/LOT	HOT/MOT	HOT/LOT
42	gluL + oaa => akg + aspL	0.783	1.966	1.492	2.51	0.76	1.91
38	aspL + atp + glnL + h2o => amp + asnL + gluL + ppi + h	0.001	0.012	0	12	0	0
39	aspL + atp => dpasp + adp	0.612	1.907	1.487	3.12	0.78	2.43
37	dpasp + nadph + h => aspsa + nadp + pi	0.612	1.907	1.487	3.12	0.78	2.43
47	aspsa + pyr => i3dhdp + h + (2) h2o	0.01	0.018	0.006	1.80	0.33	0.60
46	i3dhdp + h + nadph => nadp + thdp	0.01	0.018	0.006	1.80	0.33	0.60
107	accoa + h2o + thdp => acamoxm + coa	0.01	0.018	0.006	1.80	0.33	0.60
108	acamoxm + gluL => i6dapime + akg	0.01	0.018	0.006	1.80	0.33	0.60
19	i6dapime + h2o => i6dap + ac	0.01	0.018	0.006	1.80	0.33	0.60
44	i6dap => i6dap2	0.01	0.018	0.006	1.80	0.33	0.60
43	i6dap2 + h => co2 + lysL	0.01	0.017	0.005	1.70	0.29	0.50
49	aspsa + h + nadph => homL + nadp	0.602	1.889	1.481	3.14	0.78	2.46
50	atp + homL => adp + phom + h	0.585	1.874	1.477	3.20	0.79	2.52
51	h2o + phom => pi + thrL	0.585	1.874	1.477	3.20	0.79	2.52
**194	thrL => iobut + nh4	0	0	0	-	-	-
118	iobut + h + pyr => iahbut + co2	0.003	0.016	0.003	5.33	0.19	1.00
165	iahbut + h + nadph => i3dhmp + nadp	0.003	0.016	0.003	5.33	0.19	1.00
135	i3dhmp => io3mpt + h2o	0.003	0.015	0.002	5.00	0.13	0.67
153	io3mpt + h + nadh + nh4 => h2o + ileL + nad	0.003	0.015	0.002	5.00	0.13	0.67
1055	rhGH sentez tepkimesi	4.50E-05	0.002	8.00E-05	44.44	0.04	1.78

EK 10 rhGH biyoprosesinde LOT, MOT, ve HOT'ta Periyod III için iBsu1144-rhGH ile hesaplanan tepkime hızları ve analizleri

Çizelge 10 rhGH biyoprosesinde iBsu1144-rhGH ile hesaplanan glutamik asit grubu amino asit yolizi akıları

Tepkime	Akı, mmol/(g _{KH} st)			Akı oranı		
	LOT	MOT	HOT	MOT/LOT	HOT/MOT	HOT/LOT
akg => gluL	0.007	0.082	0.009	11.71	0.11	1.29
gluL => glnL	0.002	0.024	0.003	12	0.13	1.50
gluL + h + nadh => bpyr5c + (2) h2o + nad	0.001	0.014	0.002	14	0.14	2
bpyr5c + (2) h + nadph => nadp + proL	0.001	0.014	0.002	14	0.14	2
accoa + gluL => acglu + coa + h	0	0	0	-	-	-
acglu + atp => acg5p + adp	0.002	0.019	0.002	9.50	0.11	1
acg5p + nadph + h => acg5sa + nadp + pi	0.002	0.019	0.002	9.50	0.11	1
acg5sa + gluL => acorn + akg	0.002	0.019	0.002	9.50	0.11	1
acorn + h2o => ac + ornL	0	0	0	-	-	-
acorn + gluL => acglu + ornL	0.002	0.019	0.002	9.50	0.11	1
cbp + ornL => citrL + h + pi	0.002	0.019	0.002	9.50	0.11	1
aspL + atp + citrL => amp + argsuc + ppi + h	0.002	0.019	0.002	9.50	0.11	1
argsuc => argL + fum	0.002	0.019	0.002	9.50	0.11	1
argL + h2o => ornL + urea	0	0	0	-	-	-
rhGH sentez tepkimesi	4.50E-05	0.002	8.00E-05	44.44	0.04	1.78

EK 10 rhGH biyoprosesinde LOT, MOT, ve HOT'ta Periyod III için iBsu1144-rhGH ile hesaplanan tepkime hızları ve analizleri

Çizelge 11 rhGH biyoprosesinde iBsu1144-rhGH ile hesaplanan histidin sentez yolizi akıları

R#	Tepkime	Akı, mmol/(g _{KH} st)			Akı oranı		
		LOT	MOT	HOT	MOT/LOT	HOT/MOT	HOT/LOT
131	atp + prpp => ppi + prbatp	6.25E-04	0.005	7.30E-04	8	0.15	1.17
180	h2o + prbatp => ppi + prbamp + h	6.25E-04	0.005	7.30E-04	8	0.15	1.17
179	h2o + prbamp => prfp	6.25E-04	0.005	7.30E-04	8	0.15	1.17
181	prfp => prlp	6.25E-04	0.005	7.30E-04	8	0.15	1.17
14	glnL + prlp => aicar + eig3p + gluL + h	6.25E-04	0.005	7.30E-04	8	0.15	1.17
151	eig3p => h2o + imacp	6.25E-04	0.005	7.30E-04	8	0.15	1.17
94	gluL + imacp => akg + hisp	6.25E-04	0.005	7.30E-04	8	0.15	1.17
147	h2o + hisp => histd + pi	6.25E-04	0.005	7.30E-04	8	0.15	1.17
146	h2o + histd + (2) nad => (3) h + hisL + (2) nadh	6.25E-04	0.005	7.30E-04	8	0.15	1.17
1055	rhGH sentez tepkimesi	4.50E-05	0.002	8.00E-05	44.44	0.04	1.78

EK 10 rhGH biyoprosesinde LOT, MOT, ve HOT'ta Periyod III için iBsu1144-rhGH ile hesaplanan tepkime hızları ve analizleri
Çizelge 12 rhGH üretiminde amino asitlerin sentez hızlarının oksijen aktarımıyla değişimleri

Amino asit	Kısaltma	Amino asit HPLC kullanılarak hücre dışında tespit edildi mi? (+/-)			Amino asitin toplam sentez hızı, mmol/(g _{KH} st)			*Akı oranı		
		LOT	MOT	HOT	LOT	MOT	HOT	MOT/LOT	HOT/LOT	HOT/MOT
L-Cysteine	CysL	-	-	-	0.00052	0.007	0.00066	13.5	1.3	0.1
L-Histidine	HisL	-	-	-	0.00063	0.005	0.00073	7.9	1.2	0.1
L-Asparagine	AsnL	-	+	+	0.001	0.012	0	12	0	0
L-Tyrosine	TyrL	-	-	-	0.001	0.014	0.001	14	1	0.1
L-Proline	ProL	-	-	-	0.001	0.014	0.002	14	2	0.1
L-Arginine	ArgL	-	+	-	0.002	0.019	0.002	9.5	1	0.1
L-Leucine	LeuL	-	+	+	0.003	0.045	0.004	15	1.3	0.1
L-Isoleucine	Ile	-	+	+	0.003	0.015	0.002	5	0.7	0.1
L-Alanine	AlaL	-	-	-	0.005	0.016	0.005	3.2	1	0.3
L-Tryptophan	TrpL	+	+	+	0.006	0.002	0.000406	0.3	0.1	0.2
L-Lysine	LysL	+	+	+	0.01	0.017	0.005	1.7	0.5	0.3
L-Serine	SerL	-	-	-	0.026	0.048	0.008	1.8	0.3	0.2
L-Phenylalanine	PheL	+	+	+	0.027	0.022	0.002	0.8	0.1	0.1
L-Glutamine	GlnL	-	-	-	0.18	0.068	0.02	0.4	0.1	0.3
L-Threonine	ThrL	-	-	-	0.585	1.874	1.477	3.2	2.5	0.8
L-Glycine	Gly	+	+	+	0.601	1.864	1.479	3.1	2.5	0.8
L-Aspartic acid	AspL	-	-	-	0.783	1.966	1.502	2.5	1.9	0.8
L-Methionine	MetL	+	+	+	0.845	1.867	1.559	2.2	1.8	0.8
L-Valine	ValL	+	+	+	0.869	2.272	1.527	2.6	1.8	0.7
L-Glutamik asit	GluL	-	-	-	1.0397	2.302	1.543	2.2	1.5	0.7

*Amino asitin toplam sentez hızı oksijen aktarımıyla azalır, 3> akı oranı ≥ 1.5, 3.0 ≤ akı oranı

EK 10 rhGH biyoprosesinde LOT, MOT, ve HOT'ta Periyod III için iBsu1144-rhGH ile hesaplanan tepkime hızları ve analizleri

Çizelge 13 rhGH biyoprosesinin LOT koşulunda hız kısıtlayıcı basamakların analizi

Hücre dışında tespit edilmeyen amino asit	Kısaltma	$\sum r_{ai}$, mmol/(g _{KH} st)	α_{ai-PSR}	R_{LF-i}	R_{LF-i} değerine göre darboğaz amino asit olma derecesi
L-Asparajin	asnL	0.001	9	9000	Birincil
L-Lözin	leuL	0.003	26	8667	Birincil
L-Tirozin	tyrL	0.001	8	8000	Birincil
L-Prolin	proL	0.001	8	8000	Birincil
L-Sisteyn	cysL	0.00052	4	7692	Birincil
L-Arjinin	argL	0.002	11	5500	İkincil
L-Histidin	hisL	0.000625	3	4800	İkincil
L-Izolözin	ileL	0.003	8	2667	İkincil
L-Alanin	alaL	0.005	7	1400	İkincil
L-Serin	serL	0.026	18	692	İkincil
L-Glutamin	glnL	0.18	13	72	Üçüncül
L-Treonin	thrL	0.585	10	17	Üçüncül
L-Aspartat	aspL	0.783	11	14	Üçüncül
L-Glutamat	gluL	1.0397	14	13	Üçüncül

$\sum r_{ai}$: Hücre dışında tespit edilmeyen amino asit-*i*'nin hücre içinde tepkimelerle toplam sentez hızı, mmol/(g_{KH} st)

α_{ai-PSR} : Hücre dışında tespit edilmeyen amino asit-*i*'nin rhGH sentez tepkimesindeki stokiyometrik katsayısı

R_{LF-i} : Hız kısıtlayıcı basamak fonksyonu, $R_{LF-i} = \alpha_{ai-PSR}/M_i$, g_{KH} st/mmol

EK 10 rhGH biyoprosesinde LOT, MOT, ve HOT'ta Periyod III için iBsu1144-rhGH ile hesaplanan tepkime hızları ve analizleri

Çizelge 14 rhGH biyoprosesinin MOT koşulunda hız kısıtlayıcı basamakların analizi

Hücre dışında tespit edilmeyen amino asit	Kısaltma	$\sum r_{ai}$, mmol/(g _{KH} st)	α_{ai-PSR}	R_{LF-i}	R_{LF-i} değerine göre darboğaz amino asit olma derecesi
L-Histidin	hisL	0.005	3	600	Birincil
L-Sisteyn	cysL	0.007	4	571	Birincil
L-Tirozin	tyrL	0.014	8	571	Birincil
L-Prolin	proL	0.014	8	571	Birincil
L-Alanin	alaL	0.016	7	438	İkincil
L-Serin	serL	0.048	18	375	İkincil
L-Glutamin	glnL	0.068	13	191	İkincil
L-Treonin	thrL	1.874	10	5	Üçüncül
L-Aspartat	aspL	1.966	11	6	Üçüncül
L-Glutamat	gluL	2.30157	14	6	Üçüncül

$\sum r_{ai}$: Hücre dışında tespit edilmeyen amino asit-*i*'nin hücre içinde tepkimelerle toplam sentez hızı, mmol/(g_{KH} st)

α_{ai-PSR} : Hücre dışında tespit edilmeyen amino asit-*i*'nin rhGH sentez tepkimesindeki stokiyometrik katsayısı

R_{LF-i} : Hız kısıtlayıcı basamak fonksyonu, $R_{LF-i} = \alpha_{ai-PSR}/M_i$, g_{KH} st/mmol

EK 10 rhGH biyoprosesinde LOT, MOT, ve HOT'ta Periyod III için iBsu1144-rhGH ile hesaplanan tepkime hızları ve analizleri

Çizelge 15 rhGH biyoprosesinin HOT koşulunda hız kısıtlayıcı basamakların analizi

Hücre dışında tespit edilmeyen amino asit	Kısaltma	$\sum r_{ai}$, mmol/(g _{KH} st)	α_{ai-PSR}	R_{LF-i}	R_{LF-i} değerine göre darboğaz amino asit olma derecesi
L-Tirozin	tyrL	0.001	8	8000	Birincil
L-Sisteyn	cysL	0.00066	4	6061	Birincil
L-Arjinin	argL	0.002	11	5500	Birincil
L-Histidin	hisL	0.00073	3	4110	Birincil
L-Prolin	proL	0.002	8	4000	Birincil
L-Serin	serL	0.008	18	2250	İkincil
L-Alanin	alaL	0.005	7	1400	İkincil
L-Glutamin	glnL	0.02	13	650	İkincil
L-Treonin	thrL	1.477	10	7	Üçüncül
L-Aspartat	aspL	1.502	11	7	Üçüncül
L-Glutamat	gluL	1.54263	14	9	Üçüncül

$\sum r_{ai}$: Hücre dışında tespit edilmeyen amino asit-*i*'nin hücre içinde tepkimelerle toplam sentez hızı, mmol/(g_{KH} st)

α_{ai-PSR} : Hücre dışında tespit edilmeyen amino asit-*i*'nin rhGH sentez tepkimesindeki stokiyometrik katsayısı

R_{LF-i} : Hız kısıtlayıcı basamak fonksyonu, $R_{LF-i} = \alpha_{ai-PSR}/M_i$, g_{KH} st/mmol

EK 11 *B. subtilis*'ten rhGH üretim biyoprosesinde PIII (t=16 st) için LOT, MOT, ve HOT koşullarına ait RMA değerleri ve iç-düzen geni *tyrS*'in ekspresyonuna dayanarak hesaplanan yolizi gen ekspresyon oranları (ER)

Çizelge 1 *B. subtilis*'ten rhGH üretim biyoprosesinde PIII (t=16 st) için LOT, MOT, ve HOT koşullarına ait RMA değerleri

#	Probe Set ID	BsRN-2016 R#	iBsu1144-rhGH R#	LOT	MOT	HOT
1	AFFX-BioB-5_at	-	-	5.206396	4.936562	5.235026
2	AFFX-BioB-M_at	-	-	4.888252	4.744689	5.371583
3	AFFX-BioB-3_at	-	-	4.835897	4.792319	5.181009
4	AFFX-BioC-5_at	-	-	5.029846	4.838144	5.107649
5	AFFX-BioC-3_at	-	-	5.002471	4.77644	5.190388
6	AFFX-BioDn-5_at	-	-	4.712461	4.517106	4.830498
7	AFFX-BioDn-3_at	-	-	5.248213	4.929034	5.397096
8	AFFX-CreX-5_at	-	-	4.859509	4.637178	5.137792
9	AFFX-CreX-3_at	-	-	5.080531	4.8648	5.405427
10	AFFX-BioB-5_st	-	-	5.067578	4.804832	5.296399
11	AFFX-BioB-M_st	-	-	5.23987	4.995697	5.53986

EK 11 *B. subtilis*'ten rhGH üretim biyoprosesinde PIII (t=16 st) için LOT, MOT, ve HOT koşullarına ait RMA değerleri ve iç-düzen geni *tyrS*'in ekspresyonuna dayanarak hesaplanan yolizi gen ekspresyon oranları (ER)

Çizelge 2 *B. subtilis*'ten rhGH üretiminde t=16 st için iç-düzen geni *tyrS*'in ekspresyonuna dayanarak hesaplanan glikoliz yolizi gen ekspresyon oranları (ER)

Gen	<i>i</i> Bsu1144-rhGH R#	log ₂ (ER)			ER		
		LOT	MOT	HOT	MOT/LOT	HOT/LOT	HOT/MOT
<i>glcK</i>	R323	0.289	0.376	0.296	1.1	1	0.9
<i>pgi</i>	R475	1.332	3.331	3.224	4	3.7	0.9
<i>pfk</i>	R474	1.141	1.379	0.893	1.2	0.8	0.7
<i>fbaA</i>	R285	2.057	5.575	5.065	11.5	8	0.7
<i>tpi</i>	R480	1.923	4.406	5.217	5.6	9.8	1.8
<i>gapA</i>	R282	0.927	3.53	3.581	6.1	6.3	1
<i>gapB</i>	R282	1.518	1.346	1.528	0.9	1	1.1

EK 11 *B. subtilis*'ten rhGH üretim biyoprosesinde PIII (t=16 st) için LOT, MOT, ve HOT koşullarına ait RMA değerleri ve iç-düzen geni *tyrS*'in ekspresyonuna dayanarak hesaplanan yolizi gen ekspresyon oranları (ER)

Çizelge 3 *B. subtilis*'ten rhGH üretiminde t=16 st için iç-düzen geni *tyrS*'in ekspresyonuna dayanarak hesaplanan TCA döngüsü gen ekspresyon oranları (ER)

Gen	<i>iBsu1144-rhGH</i> R#	$\log_2(\text{ER})$			ER		
		LOT	MOT	HOT	MOT/LOT	HOT/LOT	HOT/MOT
<i>citZ</i>	R371	2.7575	4.2983	4.4764	2.9	3.3	1.1
<i>citA</i>	R371	0.6634	0.735	0.7169	1.1	1	0.9
<i>mmgD</i>	R371	3.1156	0.72	0.7527	0.2	0.2	1
<i>citB</i>	R368	0.82094	3.6372	3.47172	7	6.3	0.9
<i>citC</i>	R374	0.93881	3.44565	3.5841	5.7	6.3	1.1
<i>odhA</i>	R370	0.42832	1.74942	1.68171	2.5	2.4	1
<i>odhB</i>	R370	1.04284	4.38178	4.72219	10.1	12.8	1.3
<i>pdhD</i>	R370	1.80958	2.69973	2.67408	1.9	1.8	0.9
<i>sucC</i>	R360	1.64508	3.2596	3.02688	3.1	2.6	0.8
<i>sucD</i>	R360	2.69361	3.72916	3.9363	2	2.4	1.2

EK 11 *B. subtilis*'ten rhGH üretim biyoprosesinde PIII (t=16 st) için LOT, MOT, ve HOT koşullarına ait RMA değerleri ve iç-düzen geni *tyrS*'in ekspresyonuna dayanarak hesaplanan yolizi gen ekspresyon oranları (ER)

Çizelge 4 *B. subtilis*'ten rhGH üretiminde t=16 st için iç-düzen geni *tyrS*'in ekspresyonuna dayanarak hesaplanan PFY döngüsü gen ekspresyon oranları (ER)

Gen	iBsu1144-rhGH R#	log ₂ (ER)			ER		
		LOT	MOT	HOT	MOT/LOT	HOT/LOT	HOT/MOT
<i>yqjJ</i>	R279	0.63032	1.66548	1.24626	2	1.5	0.8
<i>ykgB</i>	R495	1.80811	1.87482	2.05884	1	1.2	1.2
<i>gntK</i>	R263-R264	0.19534	0.56599	0.59922	1.3	1.3	1
<i>yqjI</i>	R270-R271	1.4089	2.07037	1.8995	1.6	1.4	0.9
<i>gntZ</i>	R270-R271	0.13886	1.02664	1.03662	1.9	1.9	1
<i>yloR</i>	R274-R275	2.00164	0.91591	0.9716	0.5	0.5	1
<i>ywlF</i>	R276-R277	1.53659	1.90236	1.45475	1.3	0.9	0.7

EK 11 *B. subtilis*'ten rhGH üretim biyoprosesinde PIII (t=16 st) için LOT, MOT, ve HOT koşullarına ait RMA değerleri ve iç-düzen geni *tyrS*'in ekspresyonuna dayanarak hesaplanan yolizi gen ekspresyon oranları (ER)

Çizelge 5 *B. subtilis*'ten rhGH üretiminde t=16 st için iç-düzen geni *tyrS*'in ekspresyonuna dayanarak hesaplanan Pyr nodu gen ekspresyon oranları (ER)

Gen	iBsu1144-rhGH R#	log ₂ (ER)			ER		
		LOT	MOT	HOT	MOT/LOT	HOT/LOT	HOT/MOT
<i>pykA</i>	R479	1.58163	2.86406	2.78468	2.4	2.3	1
<i>ilvB</i>	R55	0.34102	1.08991	0.64297	1.7	1.2	0.7
<i>ilvH</i>	R55	0.78855	1.91503	1.6851	2.2	1.9	0.9
<i>alsS</i>	R55	0.53362	1.76142	1.75266	2.3	2.3	1
<i>ilvC</i>	R164	0.6137	2.1053	1.68284	2.8	2.1	0.8
<i>ilvD</i>	R133	0.47656	2.03436	0.94251	2.9	1.4	0.5
<i>pdhA</i>	R473	0.78963	0.99748	0.88906	1.2	1.1	0.9
<i>pdhB</i>	R473	0.8814	0.74767	0.77682	0.9	0.9	1
<i>pdhC</i>	R473	2.61929	3.40784	3.39803	1.7	1.7	1
<i>pdhD</i>	R473	1.80958	2.69973	2.67409	1.9	1.8	0.9
<i>purT</i>	R280	0.79659	0.80431	0.95286	1	1.1	1.1

EK 11 *B. subtilis*'ten rhGH üretim biyoprosesinde PIII (t=16 st) için LOT, MOT, ve HOT koşullarına ait RMA değerleri ve iç-düzen geni *tyrS*'in ekspresyonuna dayanarak hesaplanan yolizi gen ekspresyon oranları (ER)

Çizelge 6 *B. subtilis*'ten rhGH üretiminde t=16 st için iç-düzen geni *tyrS*'in ekspresyonuna dayanarak hesaplanan serin grubu amino asit yolizi gen ekspresyon oranları (ER)

Gen	iBsu1144-rhGH R#	log ₂ (ER)			ER		
		LOT	MOT	HOT	MOT/LOT	HOT/LOT	HOT/MOT
<i>serA</i>	R88	0.13	0.88	0.41	1.7	1.2	0.7
<i>serC</i>	R90	2.21	3.88	3.15	3.2	1.9	0.6
<i>rsbX</i>	R211	1.86	3.09	3.64	2.3	3.4	1.5
<i>rsbP</i>	R211	0.72	0.77	0.68	1	1	1
<i>glyA</i>	R81	1.63	4.74	4.74	8.6	8.6	1
<i>cysE</i>	R92	2.3	2.38	2.36	1.1	1	0.9
<i>cysK</i>	R85	3.78	3.32	3.46	0.7	0.8	1.1

EK 11 *B. subtilis*'ten rhGH üretim biyoprosesinde PIII (t=16 st) için LOT, MOT, ve HOT koşullarına ait RMA değerleri ve iç-düzen geni *tyrS*'in ekspresyonuna dayanarak hesaplanan yolizi gen ekspresyon oranları (ER)

Çizelge 7 *B. subtilis*'ten rhGH üretiminde t=16 st için iç-düzen geni *tyrS*'in ekspresyonuna dayanarak hesaplanan alanin grubu amino asit yolizi gen ekspresyon oranları (ER)

Gen	iBsu1144-rhGH R#	log ₂ (ER)			ER		
		LOT	MOT	HOT	MOT/LOT	HOT/LOT	HOT/MOT
<i>ilvB</i>	R55	0.34	1.09	0.64	1.7	1.2	0.7
<i>ilvH</i>	R55	0.79	1.92	1.69	2.2	1.9	0.9
<i>alsS</i>	R55	0.53	1.76	1.75	2.3	2.3	1
<i>ilvC</i>	R164	0.61	2.11	1.68	2.8	2.1	0.8
<i>ilvD</i>	R133	0.48	2.03	0.94	2.9	1.4	0.5
<i>yqiT</i>	R169, R198	0.73	0.67	0.59	1	0.9	0.9
<i>leuA</i>	R161	1	2.6	2.24	3	2.4	0.8
<i>leuC</i>	R160, R158	1.52	3.71	2.9	4.6	2.6	0.6
<i>leuD</i>	R160, R158	0.83	1.02	0.83	1.1	1	0.9
<i>leuB</i>	R156	1.1	1.82	1.24	1.6	1.1	0.7

EK 11 *B. subtilis*'ten rhGH üretim biyoprosesinde PIII (t=16 st) için LOT, MOT, ve HOT koşullarına ait RMA değerleri ve iç-düzen geni *tyrS*'in ekspresyonuna dayanarak hesaplanan yolizi gen ekspresyon oranları (ER)

Çizelge 8 *B. subtilis*'ten rhGH üretiminde t=16 st için iç-düzen geni *tyrS*'in ekspresyonuna dayanarak hesaplanan aromatik asit grubu amino asit yolizi gen ekspresyon oranları (ER)

Gen	<i>iBsu1144</i> -rhGH R#	$\log_2(\text{ER})$			ER		
		LOT	MOT	HOT	MOT/LOT	HOT/LOT	HOT/MOT
<i>aroF</i>	R61	1.02045	1.33347	0.98878	1.2	1	0.8
<i>aroC</i>	R63	0.35622	0.53215	0.44001	1.1	1.1	1
<i>yqhS</i>	R63	1.57276	1.63405	1.38765	1	0.9	0.9
<i>aroB</i>	R65	0.82845	0.68567	0.56326	0.9	0.8	0.9
<i>aroA</i>	R71	0.38703	1.66665	0.98848	2.4	1.5	0.6
<i>aroD</i>	R73	0.55623	0.70004	0.53406	1.1	1	0.9
<i>aroI</i>	R75	2.59506	1.31304	1.50467	0.4	0.5	1.3

EK 11 *B. subtilis*'ten rhGH üretim biyoprosesinde PIII (t=16 st) için LOT, MOT, ve HOT koşullarına ait RMA değerleri ve iç-düzen geni *tyrS*'in ekspresyonuna dayanarak hesaplanan yolizi gen ekspresyon oranları (ER)

Çizelge 9 *B. subtilis*'ten rhGH üretiminde t=16 st için iç-düzen geni *tyrS*'in ekspresyonuna dayanarak hesaplanan aspartik asit grubu amino asit yolizi gen ekspresyon oranları (ER)

Gen	iBsu1144-rhGH R#	log ₂ (ER)			ER		
		LOT	MOT	HOT	MOT/LOT	HOT/LOT	HOT/MOT
<i>asnB</i>	R38	0.41195	0.68135	0.44212	1.2	1	0.8
<i>asnH</i>	R38	0.22936	0.68626	0.55878	1.4	1.3	0.9
<i>asnO</i>	R38	0.68016	0.37969	0.41109	0.8	0.8	1
<i>dapG</i>	R39	1.44109	0.92254	0.75848	0.7	0.6	0.9
<i>yclM</i>	R39	1.10915	0.93896	1.23465	0.9	1.1	1.2
<i>lysC</i>	R39	0.58379	0.47391	0.39381	0.9	0.9	1
<i>yhdR</i>	R42	1.00454	0.89315	0.68697	0.9	0.8	0.9
<i>aspB</i>	R42	1.30531	1.08125	0.7236	0.9	0.7	0.8

EK 11 *B. subtilis*'ten rhGH üretim biyoprosesinde PIII (t=16 st) için LOT, MOT, ve HOT koşullarına ait RMA değerleri ve iç-düzen geni *tyrS*'in ekspresyonuna dayanarak hesaplanan yolizi gen ekspresyon oranları (ER)

Çizelge 10 *B. subtilis*'ten rhGH üretiminde t=16 st için iç-düzen geni *tyrS*'in ekspresyonuna dayanarak hesaplanan glutamik asit grubu amino asit yolizi gen ekspresyon oranları (ER)

Gen	iBsu1144-rhGH R#	log ₂ (ER)			ER		
		LOT	MOT	HOT	MOT/LOT	HOT/LOT	HOT/MOT
<i>ycgN</i>	R8	2.0325	0.8174	0.7605	0.4	0.4	1
<i>rocA</i>	R8	1.2356	0.7316	0.6648	0.7	0.7	1
<i>proG</i>	R24	0.3026	0.1974	0.2686	0.9	1	1.1
<i>proH</i>	R24	-0.301	0.0386	0.02	1.3	1.2	0.9
<i>proI</i>	R24	1.7691	0.3469	0.3572	0.4	0.4	1
<i>comER</i>	R24	1.3782	0.7651	0.7563	0.7	0.6	0.9

EK 11 *B. subtilis*'ten rhGH üretim biyoprosesinde PIII (t=16 st) için LOT, MOT, ve HOT koşullarına ait RMA değerleri ve iç-düzen geni *tyrS*'in ekspresyonuna dayanarak hesaplanan yolizi gen ekspresyon oranları (ER)

Çizelge 11 *B. subtilis*'ten rhGH üretiminde t=16 st için iç-düzen geni *tyrS*'in ekspresyonuna dayanarak hesaplanan histidin sentez yolizi gen ekspresyon oranları (ER)

Gen	iBsu1144-rhGH R#	log ₂ (ER)			ER		
		LOT	MOT	HOT	MOT/LOT	HOT/LOT	HOT/MOT
<i>hisG</i>	R131	1.94275	6.11548	5.48992	18	11.7	0.7
<i>hisZ</i>	R131	1.13172	3.83775	2.45486	6.5	2.5	0.4
<i>hisI</i>	R179, R180	1.2057	5.25617	5.14463	16.6	15.3	0.9
<i>hisA</i>	R181	2.72902	7.90423	7.5491	36.1	28.2	0.8
<i>hisB</i>	R151	1.56786	5.48973	4.96123	15.2	10.5	0.7
<i>hisJ</i>	R147	0.53314	0.76507	0.63916	1.2	1.1	0.9
<i>hisD</i>	R146	1.32084	5.22751	4.61691	15	9.8	0.7

EK 12 *B.subtilis*'ten rhGH üretiminde (Özdamar vd. 2009) oksijen aktarım koşullarından önemli ölçüde etkilenen prob setleri veya birimleri; t=16 st, ER>3, p<0.005

Çizelge 1 *B.subtilis*'ten rhGH üretiminde (Özdamar vd. 2009) oksijen aktarım koşullarından önemli ölçüde etkilenen prob setleri veya birimleri; t=16 st, ER>3, p<0.005

#	Prob seti	HOT-LOT			HOT-MOT			LOT-MOT		
		ER	log ER	Etki	ER	log ER	Etki	ER	log ER	Etki
1	AFFX-PheX-5_at	-3.67655	-1.87835	azalma	-1.06745	-0.09417	azalma	3.444224	1.784179	artma
2	AFFX-PheX-3_at	-4.82973	-2.27194	azalma	-1.07709	-0.10713	azalma	4.484078	2.164811	artma
3	59trnO-Ile:_f_at	-14.9972	-3.90662	azalma	1.218802	0.285464	artma	18.27864	4.192087	artma
4	82trnSL-Val1:_f_at	-8.29691	-3.05257	azalma	2.137714	1.096069	artma	17.73643	4.148644	artma
5	BG10076/yaaE_at	3.827989	1.936587	artma	-1.22016	-0.28707	azalma	-4.67075	-2.22365	azalma
6	BG10761/rpsN_at	3.13741	1.649574	artma	1.406342	0.491948	artma	-2.2309	-1.15763	azalma
7	BG11042/rpmJ_at	6.567422	2.715327	artma	1.187908	0.248423	artma	-5.52856	-2.4669	azalma
8	BG12720/ybdD_at	6.291763	2.653464	artma	1.211048	0.276256	artma	-5.19531	-2.37721	azalma
9	BG11180/yckD_at	-2.91818	-1.54507	azalma	1.147805	0.198877	artma	3.349506	1.743948	artma
10	BG10168/srfAA_4_at	3.236518	1.694443	artma	1.065346	0.091322	artma	-3.038	-1.60312	azalma
11	BG10169/srfAB_1_at	4.075504	2.026979	artma	1.254629	0.327261	artma	-3.24837	-1.69972	azalma
12	BG10169/srfAB_2_at	4.041577	2.014918	artma	1.203102	0.266759	artma	-3.3593	-1.74816	azalma
13	BG10169/srfAB_3_at	3.345762	1.742335	artma	1.278755	0.35474	artma	-2.61642	-1.3876	azalma
14	BG10170/srfAC_3_at	4.280145	2.09766	artma	1.319964	0.400499	artma	-3.24262	-1.69716	azalma
15	BG12039/ycnC_at	-3.11819	-1.64071	azalma	1.072455	0.100916	artma	3.344118	1.741626	artma
16	BG10545/gdh_at	-3.93579	-1.97665	azalma	1.132029	0.178911	artma	4.455427	2.155564	artma
17	BG12803/ydjL_at	4.668458	2.222946	artma	-1.00764	-0.01098	azalma	-4.70414	-2.23393	azalma

EK 12 *B.subtilis*'ten rhGH üretiminde (Özdamar vd. 2009) oksijen aktarım koşullarından önemli ölçüde etkilenen prob setleri veya birimleri; t=16 st, ER>3, p<0.005

Çizelge 2a *B.subtilis*'ten rhGH üretiminde (Özdamar vd. 2009) oksijen aktarım koşullarından önemli ölçüde etkilenen prob setleri veya birimleriyle ilgili literatürdeki sonuçlar; t=16 st, ER>3, p<0.005

#	Prob seti	Ye vd.(2000)	Moore vd.(2004)	Yu vd. (2011)	Blom vd. (2011)	Nannapaneni vd.(2012)	*Nicolas vd. (2012)	
							ER: aero/nit	ER: aero/ferm
1	AFFX-PheX-5_at	-	-	-	-	-	-	-
2	AFFX-PheX-3_at	-	-	-	-	-	-	-
3	59trnO-Ile:_f_at	-	-	-	-	-	-	-
4	82trnSL-Val1:_f_at	-	-	-	-	-	-	-
5	BG10076/yaaE_at	-	-	-	-	-	1.38	1.37
6	BG10761/rpsN_at	-	-	-	-	-	1.56	1.63
7	BG11042/rpmJ_at	-	-	Oxygen limitation induced <i>rpmJ</i> at t=18h of the fermentation more than two fold with E-value of 3.20×10^{-7} . Fold change (log) was 1.07.	-	-	1.34	1.33
8	BG12720/ybdD_at	-	-	-	-	-	0.2	0.26
9	BG11180/yckD_at	-	-	-	-	-	0.13	0.1

EK 12 *B.subtilis*'ten rhGH üretiminde (Özdamar vd. 2009) oksijen aktarım koşullarından önemli ölçüde etkilenen prob setleri veya birimleri; t=16 st, ER>3, p<0.005

Çizelge 2b Mikrodizin sonuçlarının literatür sonuçlarıyla uyumu

#	Prob seti	Ye et vd.(2000)	Yu vd.(2011)		Nicolas vd.(2012)	
			t=12st	t=18st	aero/nit	aero/ferm
1	AFFX-PheX-5_at	-	-	-	-	-
2	AFFX-PheX-3_at	-	-	-	-	-
3	59trnO-Ile:_f_at	-	-	-	-	-
4	82trnSL-Val1:_f_at	-	-	-	-	-
5	BG10076/yaaE_at	-	-	-	-	-
6	BG10761/rpsN_at	-	-	-	-	-
7	BG11042/rpmJ_at	-	-	-	-	-
8	BG12720/ybdD_at	-	-	-	-	-
9	BG11180/yckD_at	-	-	-	++	++
10	BG10168/srfAA_4_at	-	-	-	-	-
11	BG10169/srfAB_1_at	-	-	-	-	-
12	BG10169/srfAB_2_at	-	-	-	-	-
13	BG10169/srfAB_3_at	-	-	-	-	-
14	BG10170/srfAC_3_at	-	-	-	-	-
15	BG12039/ycnC_at	-	-	-	-	-
16	BG10545/gdh_at	-	-	-	++	++
17	BG12803/ydjL_at	+	-	-	-	-
18	BG12874/yezC_at	-	-	-	-	-
19	BG13094/yisG_at	-	++	+	++	++
20	BG13097/yisJ_at	-	-	-	-	-
21	BG13105/yisZ_at	-	-	+	-	-

EK 12 *B.subtilis*'ten rhGH üretiminde (Özdamar vd. 2009) oksijen aktarım koşullarından önemli ölçüde etkilenen prob setleri veya birimleri; t=16 st, ER>3, p<0.005

Çizelge 3 *B.subtilis*'ten rhGH üretiminde (Özdamar vd. 2009) oksijen aktarım koşullarından önemli ölçüde etkilenen prob setleri veya birimlerinin yolizleri, ürünleri, tepkimeleri; t=16 st, ER>3, p<0.005

#	Prob seti	Yolizi ya da işlev	Protein veya enzim	Tepkime #	iBsu1144-rhGH R#	Tepkime(ler)	Kaynak
1	AFFX-PheX-5_at	(control unit)	-	-	-	-	-
2	AFFX-PheX-3_at	(control unit)	-	-	-	-	-
3	59tmO-Ile:_f_at	(control unit)	-	-	-	-	-
4	82tmSL-Val1:_f_at	(control unit)	-	-	-	-	-
5	BG10076/yaaE_at	citrulline biosynthesis , glutamine degradation I	Glutamine amidotransferase subunit PdxT	1	138	glnL + h2o => gluL + nh4	Genoscope
		pyridoxal 5'-phosphate biosynthesis II		2	577	g3p + glnL + r5p => pydx5p + gluL + (3) h2o + pi + h	Genoscope
6	BG10761/rpsN_at	Ribosomal protein	Alternate 30S ribosomal protein S14	-	-	-	KEGG
7	BG11042/rpmJ_at	Ribosomal protein	Ribosomal protein L36 (ribosomal protein B)	-	-	-	Genoscope
8	BG12720/ybdD_at	Unknown; catabolism	Uncharacterized protein SkfG; sporulation killing factor biosynthesis and export	-	-	-	UniProt; Genoscope
9	BG11180/yckD_at	Unknown	Uncharacterized protein YckD; putative exported protein	-	-	-	UniProt; Genoscope
10	BG10168/srfAA_4_at	Antibiotic biosynthesis; surfactin biosynthesis.	Surfactin synthase	-	-	-	UniProt; Genoscope
11	BG10169/srfAB_1_at	Antibiotic production	Inner membrane-associated surfactin synthetase	-	-	-	Genoscope

EK 12 *B.subtilis*'ten rhGH üretiminde (Özdamar vd. 2009) oksijen aktarım koşullarından önemli ölçüde etkilenen prob setleri veya birimleri; t=16 st, ER>3, p<0.005

Çizelge 4 *B.subtilis*'ten rhGH üretiminde (Özdamar vd. 2009) oksijen aktarım koşullarından önemli ölçüde etkilenen prob setlerinin gen ekspresyonları ve iBsu1144-rhGH tepkime hızlarının karşılaştırılması; t=16 st, ER>3, p<0.005

#	Prob seti	HOT-LOT	HOT-MOT	LOT-MOT	iBsu114-rhGH R#	Akı, mmol/(g _{KH} st)			Gen ekspresyonları ve tepkime hızlarının oksijen aktarımıyla değişimindeki uyum*
		Etki	Etki	Etki		LOT	MOT	HOT	
1	AFFX-PheX-5_at	azalma	azalma	artma					
2	AFFX-PheX-3_at	azalma	azalma	artma					
3	59trnO-Ile:_f_at	azalma	artma	artma					
4	82trnSL-Val1:_f_at	azalma	artma	artma					
5	BG10076/yaaE_at	artma	azalma	azalma	138	0	0	0	-
					577	0	0	0	-
6	BG10761/rpsN_at	artma	artma	azalma					
7	BG11042/rpmJ_at	artma	artma	azalma					
8	BG12720/ybdD_at	artma	artma	azalma					
9	BG11180/yckD_at	azalma	artma	artma					
10	BG10168/srfAA_4_at	artma	artma	azalma					
11	BG10169/srfAB_1_at	artma	artma	azalma					
12	BG10169/srfAB_2_at	artma	artma	azalma					
13	BG10169/srfAB_3_at	artma	artma	azalma					
14	BG10170/srfAC_3_at	artma	artma	azalma					
15	BG12039/ycnC_at	azalma	artma	artma					

*+++: çok uyumlu; ++: uyumlu; +: az uyumlu; -: uyumsuz

EK 12 *B.subtilis*'ten rhGH üretiminde (Özdamar vd. 2009) oksijen aktarım koşullarından önemli ölçüde etkilenen prob setleri veya birimleri; t=16 st, ER>3, p<0.005

Çizelge 5 *B.subtilis*'ten rhGH üretiminde (Özdamar vd. 2009) oksijen aktarım koşullarından önemli ölçüde etkilenen prob setleriyle (t=16 st, ER>3, p<0.005) bağlantılı ve BsRN-2016'de var olan, fakat iBsu1144-rhGH'de olmayan tepkimeler

Tepkime #	Tepkime(ler)	Yolizi veya işlev	prob seti	Kaynak
1	orotidine-5'-phosphate + H ⁺ → CO ₂ + uridine-5'-phosphate	uridine-5'-phosphate biosynthesis	BG10719/ <i>pyrF</i> _at	MicroCyc
2	2-oxoglutarate + a [2-oxoglutarate dehydrogenase E2 protein] N6-(lipoyl)lysine + 2 H ⁺ → a [2-oxoglutarate dehydrogenase E2 protein] N6-(S-succinyldihydrolipoyl)lysine + CO ₂	2-ketoglutarate dehydrogenase complex	BG13388/ <i>yloI</i> _at	MicroCyc
3	a 2-oxo carboxylate + H ⁺ <=> CO ₂ + an aldehyde	-		MicroCyc
4	pyruvate + H ⁺ → acetaldehyde + CO ₂	acetaldehyde biosynthesis II , acetoin biosynthesis III		MicroCyc
5	thiamin + ATP → thiamin diphosphate + AMP + H ⁺	thiamin diphosphate biosynthesis III (Staphylococcus) , thiamin salvage III	BG13394/ <i>yloS</i> _at	MicroCyc
2	2-oxoglutarate + a [2-oxoglutarate dehydrogenase E2 protein] N6-(lipoyl)lysine + 2 H ⁺ → a [2-oxoglutarate dehydrogenase E2 protein] N6-(S-succinyldihydrolipoyl)lysine + CO ₂	2-ketoglutarate dehydrogenase complex	BG10273/ <i>odhB</i> _at	MicroCyc
6	a [2-oxoglutarate dehydrogenase E2 protein] N6-(dihydrolipoyl)lysine + NAD ⁺ → a [2-oxoglutarate dehydrogenase E2 protein] N6-(lipoyl)lysine + NADH + H ⁺	2-ketoglutarate dehydrogenase complex		MicroCyc
7	succinyl-CoA + a [2-oxoglutarate dehydrogenase E2 protein] N6-(dihydrolipoyl)lysine + H ⁺ ↔ a [2-oxoglutarate dehydrogenase E2 protein] N6-(S-succinyldihydrolipoyl)lysine + coenzyme A	2-ketoglutarate dehydrogenase complex		MicroCyc
8	oxaloacetate + propanoyl-CoA + H ₂ O → (2S,3S)-2-methylcitrate + coenzyme A + H ⁺	2-methylcitrate cycle I	BG11322/ <i>mmgD</i> _at	MicroCyc
9	a [glycine-cleavage complex H protein] N6-(aminomethyldihydrolipoyl)lysine + tetrahydrofolate → a [glycine-cleavage complex H protein] N6-(dihydrolipoyl)lysine + ammonia + 5,10-methylenetetrahydrofolate	glycine cleavage complex	BG11510/ <i>yqhJ</i> _at	MicroCyc
10	a [glycine-cleavage complex H protein] N6-(dihydrolipoyl)lysine + NAD ⁺ → a [glycine-cleavage complex H protein] N6-(lipoyl)lysine + NADH + H ⁺	glycine cleavage complex		MicroCyc

EK 12 *B.subtilis*'ten rhGH üretiminde (Özdamar vd. 2009) oksijen aktarım koşullarından önemli ölçüde etkilenen prob setleri veya birimleri; t=16 st, ER>3, p<0.005

Çizelge 6 *B.subtilis*'ten rhGH üretiminde (Özdamar vd. 2009) oksijen aktarım koşullarından önemli ölçüde etkilenen, fakat tepkimeleri henüz keşfedilmediği için BsRN-2016 ile bağlantılı olmayan prob setleri (t=16 st, ER>3, p<0.005)

#	Probe seti	Yolizi veya işlev	Protein veya enzim	Kaynak
1	AFFX-PheX-5_at	(control unit)	-	-
2	AFFX-PheX-3_at	(control unit)	-	-
3	59trnO-Ile:_f_at	(control unit)	-	-
4	82trnSL-Val1:_f_at	(control unit)	-	-
5	BG10761/rpsN_at	Ribosomal protein	Alternate 30S ribosomal protein S14	KEGG
6	BG11042/rpmJ_at	Ribosomal protein	Ribosomal protein L36 (ribosomal protein B)	Genoscope
7	BG12720/ybdD_at	Unknown, catabolism	Uncharacterized protein SkfG, sporulation killing factor biosynthesis and export	UniProt, Genoscope
8	BG11180/yckD_at	Unknown	Uncharacterized protein YckD, putative exported protein	UniProt, Genoscope
9	BG10168/srfAA_4_at	Antibiotic biosynthesis, surfactin biosynthesis	Surfactin synthase	UniProt, Genoscope
10	BG10169/srfAB_1_at	Antibiotic production	Inner membrane-associated surfactin synthetase	Genoscope
11	BG10169/srfAB_2_at	Antibiotic production	Inner membrane-associated surfactin synthetase	Genoscope
12	BG10169/srfAB_3_at	Antibiotic production	Inner membrane-associated surfactin synthetase	Genoscope

EK 12 *B.subtilis*'ten rhGH üretiminde (Özdamar vd. 2009) oksijen aktarım koşullarından önemli ölçüde etkilenen prob setleri veya birimleri; t=16 st, ER>3, p<0.005

Çizelge 7 *B.subtilis*'ten rhGH üretiminde (Özdamar vd. 2009) oksijen aktarım koşullarından önemli ölçüde etkilenen ve *iBsu1144*-rhGH tepkimeleriyle bağlantılı prob setleri (t=16 st, ER>3, p<0.005)

#	Prob seti	Yolizi veya işlev	Protein veya enzim	Tepkime no	<i>iBsu1144</i> -rhGH R#	Tepkime(ler)	Kaynak
1	BG10076/ <i>yaaE_at</i>	citrulline biosynthesis , glutamine degradation I	Glutamine amidotransferase subunit PdxT	1	138	glnL + h2o => gluL + nh4	Genoscope
		pyridoxal 5'-phosphate biosynthesis II		2	577	g3p + glnL + r5p => pydx5p + gluL + (3) h2o + pi + h	Genoscope
2	BG10545/ <i>gdh_at</i>	Scavenge (Catabolism)	glucose dehydrogenase 1-	3	412	glcD + nad => g15lac + h + nadh	GenoList, UniProt, SEED, Genoscope
		Scavenge (Catabolism)	glucose dehydrogenase 1-	4	506	bdgl + nad => g15lac + nadh + h	GenoList, UniProt, SEED, KEGG, MicroCyc, Genoscope
		Scavenge (Catabolism)	glucose dehydrogenase 1-	5	507	g15lac + nadh + h => bdgl + nad	GenoList, UniProt, SEED, KEGG, MicroCyc, Genoscope
		Scavenge (Catabolism)	glucose dehydrogenase 1-	6	508	bdgl + nadp => g15lac + nadph + h	GenoList, UniProt, SEED, KEGG, MicroCyc, Genoscope
		Scavenge (Catabolism)	glucose dehydrogenase 1-	7	509	g15lac + nadph + h => bdgl + nadp	GenoList, UniProt, SEED, KEGG, MicroCyc, Genoscope
3	BG12803/ <i>ydjL_at</i>	(R,R)-butanediol degradation , (R,R)-butanediol biosynthesis	(R,R)-butanediol dehydrogenase	8	258	btdRR + nad => actn + h + nadh	GenoList, UniProt, SEED, KEGG, MicroCyc

EK 13 rhGH üretimi için MOT koşulunda Periyod III için gerçekleştirilen akı değişkenliği analizi sonuçları

Çizelge 1 rhGH üretimi için MOT koşulunda Periyod III için akı değişkenliği analizi sonuçları

R#	iBsu1144-rhGH tepkimesi	Gen	Genin kromozomdaki konumunun yeri	Akılar (mmol/(g _{KH} st)): Hücre içinde rhGH birikiminin minimizasyonu	Akılar (mmol/(g _{KH} st)): Hücre içinde rhGH birikiminin maksimizasyonu
1	b2d3k5m + o2 => ikmb + for + h	<i>mtnD</i>	BSU13620	0	0
2	b2d3k5m + o2 => umtp + co + for + h	<i>mtnD</i>	BSU13620	0	0
3	dkmpp => ih3k5m + h	<i>mtnW</i>	BSU13590	0	0
4	ih3k5m + h => dkmpp	<i>mtnW</i>	BSU13590	0	0
5	ih3k5m + h2o => b2d3k5m + pi	<i>mtnX</i>	BSU13600	0	0
6	pslac + h2o => slac + pi	<i>yitC</i>	BSU10940	0	0
7	bmdru1p => dkmpp + h2o	<i>mtnB</i>	BSU13610	0	0
8	gluL + h + nadh => bpyr5c + (2) h2o + nad	<i>ycgN</i> OR <i>rocA</i>	BSU03210 OR BSU37780	0.014	0.054
9	(2) gluL + nadp => glnL + akg + nadph + h	<i>gltA</i> AND <i>gltB</i>	BSU18450 AND BSU18440	0.068	0.252
10	(3) malcoa + coucoa => (4) coa + nncl + (3) co2	<i>bcsA</i>	BSU22050	0	0
11	(4) coa + nncl + (3) co2 => (3) malcoa + coucoa	<i>bcsA</i>	BSU22050	0	0
12	bmdr1p => bmdru1p	<i>mtnA</i>	BSU13550	0	0
13	bmdru1p => bmdr1p	<i>mtnA</i>	BSU13550	0	0
14	glnL + prlp => aicar + eig3p + gluL + h	<i>hisF</i> AND <i>hisH</i>	BSU34870 AND BSU34890	0.005	0.02
15	akg + glnL + h + nadph => (2) gluL + nadp	<i>gltA</i> AND <i>gltB</i>	BSU18450 AND BSU18440	0	0

EK 13 rhGH üretimi için MOT koşulunda Periyod III için gerçekleştirilen akı değişkenliği analizi sonuçları

Çizelge 2 rhGH üretimi için MOT koşulunda Periyod III için aktif tepkimeler

R#	iBsu1144-rhGH tepkimesi	Gen	Genin kromozomdaki konumunun yeri	Akılar (mmol/(g _{KH} st)): Hücre içinde rhGH birikiminin minimizasyonu	Akılar (mmol/(g _{KH} st)): Hücre içinde rhGH birikiminin maksimizasyonu
8	gluL + h + nadh => bpyr5c + (2) h2o + nad	<i>ycgN</i> OR <i>rocA</i>	BSU03210 OR BSU37780	0.014	0.054
9	(2) gluL + nadp => glnL + akg + nadph + h	<i>gltA</i> AND <i>gltB</i>	BSU18450 AND BSU18440	0.068	0.252
14	glnL + prlp => aicar + eig3p + gluL + h	<i>hisF</i> AND <i>hisH</i>	BSU34870 AND BSU34890	0.005	0.02
16	(2) atp + glnL + h2o + hco3 => (2) adp + cbp + gluL + (2) h + pi	(<i>carA</i> AND <i>carB</i>) OR (<i>pyrAA</i> AND <i>pyrAB</i>)	(BSU11230 AND BSU11240) OR (BSU15510 AND BSU15520)	0.02	0.074
19	i6dapime + h2o => i6dap + ac	<i>dapL</i>	BSU14190	0.018	0.062
24	bpyr5c + (2) h + nadph => nadp + proL	<i>proG</i> OR <i>proH</i> OR <i>proI</i> OR <i>comER</i>	BSU12910 OR BSU18480 OR BSU23800 OR BSU25600	0.014	0.054
25	cbp + ornL => citrL + h + pi	<i>argF</i>	BSU11250	0.019	0.074
27	acglu + atp => acg5p + adp	<i>argB</i>	BSU11210	0.019	0.074
29	acg5sa + gluL => acorn + akg	<i>argD</i>	BSU11220	0.019	0.074
32	acg5p + nadph + h => acg5sa + nadp + pi	<i>argC</i>	BSU11190	0.019	0.074
34	gluL + pyr => akg + alaL			0.016	0.051

EK 13 rhGH üretimi için MOT koşulunda Periyod III için gerçekleştirilen akı değişkenliği analizi sonuçları

Çizelge 3 rhGH üretimi için MOT koşulunda Periyod III için kapalı tepkimeler

R#	iBsu1144-rhGH tepkimesi	Gen	Genin kromozomdaki konumunun yeri	Akılar (mmol/(g _{KH} st)): Hücre içinde rhGH birikiminin minimizasyonu	Akılar (mmol/(g _{KH} st)): Hücre içinde rhGH birikiminin maksimizasyonu
1	b2d3k5m + o2 => ikmb + for + h	<i>mtnD</i>	BSU13620	0	0
2	b2d3k5m + o2 => umtp + co + for + h	<i>mtnD</i>	BSU13620	0	0
3	dkmpp => ih3k5m + h	<i>mtnW</i>	BSU13590	0	0
4	ih3k5m + h => dkmpp	<i>mtnW</i>	BSU13590	0	0
5	ih3k5m + h2o => b2d3k5m + pi	<i>mtnX</i>	BSU13600	0	0
6	pslac + h2o => slac + pi	<i>yitC</i>	BSU10940	0	0
7	bmdru1p => dkmpp + h2o	<i>mtnB</i>	BSU13610	0	0
10	(3) malcoa + coucoa => (4) coa + nncl + (3) co2	<i>bcsA</i>	BSU22050	0	0
11	(4) coa + nncl + (3) co2 => (3) malcoa + coucoa	<i>bcsA</i>	BSU22050	0	0
12	bmdr1p => bmdru1p	<i>mtnA</i>	BSU13550	0	0
13	bmdru1p => bmdr1p	<i>mtnA</i>	BSU13550	0	0
15	akg + glnL + h + nadph => (2) gluL + nadp	<i>gltA AND gltB</i>	BSU18450 AND BSU18440	0	0
17	atp + gluL + nh4 => adp + glnL + h + pi	<i>glnA</i>	BSU17460	0	0
18	accoa + gluL => acglu + coa + h	<i>snaB OR argJ</i>	BSU39510 OR BSU11200	0	0
20	i6dap + ac => i6dapime + h2o	<i>dapL</i>	BSU14190	0	0
21	alaL + h2o + nad => h + nadh + nh4 + pyr	<i>ald</i>	BSU31930	0	0
22	glu5sa => bpyr5c + h + h2o			0	0

EK 13 rhGH üretimi için MOT koşulunda Periyod III için gerçekleştirilen akı değişkenliği analizi sonuçları

Çizelge 4 rhGH üretiminin MOT koşulunda Periyod III için aktif tepkimelerin genleri

339

<i>dapL</i>	<i>tagH</i>	<i>accB</i>	<i>argF</i>	<i>pheA</i>	<i>cysK</i>	<i>citH</i>	<i>tagE</i>	<i>ctaF</i>	<i>pssA</i>	<i>deoD</i>	<i>yumB</i>	<i>tyrA</i>	<i>hisJ</i>
<i>asd</i>	<i>tagF</i>	<i>accA</i>	<i>argB</i>	<i>aroX</i>	<i>mccA</i>	<i>rsbX</i>	<i>glpK</i>	<i>ytxM</i>	<i>ypfP</i>	<i>pnp</i>	<i>yutJ</i>	<i>pdhB</i>	<i>hisD</i>
<i>dapF</i>	<i>gcaD</i>	<i>accD</i>	<i>argD</i>	<i>aroC</i>	<i>ytKp</i>	<i>rsbP</i>	<i>ggaB</i>	<i>nadB</i>	<i>yfiX</i>	<i>purL</i>	<i>lctE</i>	<i>pdhC</i>	<i>hisG</i>
<i>dapB</i>	<i>ddlA</i>	<i>yqfP</i>	<i>argC</i>	<i>yqhS</i>	<i>argH</i>	<i>purT</i>	<i>tkT</i>	<i>nadC</i>	<i>ywiE</i>	<i>purD</i>	<i>thiD</i>	<i>pta</i>	<i>hisZ</i>
<i>dapA</i>	<i>murE</i>	<i>yqfY</i>	<i>ycgN</i>	<i>asnO</i>	<i>argG</i>	<i>yhaU</i>	<i>yveT</i>	<i>nadA</i>	<i>ywjE</i>	<i>purM</i>	<i>thiC</i>	<i>citA</i>	<i>hisF</i>
<i>glyA</i>	<i>tagD</i>	<i>yacN</i>	<i>rocA</i>	<i>hom</i>	<i>ilvE</i>	<i>yhaT</i>	<i>yveR</i>	<i>ypjQ</i>	<i>ywnE</i>	<i>purC</i>	<i>pyk</i>	<i>citZ</i>	<i>hisH</i>
<i>glmS</i>	<i>murG</i>	<i>yacM</i>	<i>carA</i>	<i>thrB</i>	<i>yhdR</i>	<i>ykwC</i>	<i>gtaB</i>	<i>yutG</i>	<i>mmgA</i>	<i>thyB</i>	<i>phoA</i>	<i>mmgD</i>	<i>gltA</i>
<i>dapH</i>	<i>murD</i>	<i>ywpB</i>	<i>carB</i>	<i>thrC</i>	<i>kbl</i>	<i>sdhA</i>	<i>ytdA</i>	<i>psd</i>	<i>yhfS</i>	<i>thyA</i>	<i>phoB</i>	<i>gltK</i>	<i>gltB</i>
<i>alrA</i>	<i>murC</i>	<i>yjaY</i>	<i>pyrAB</i>	<i>yitB</i>	<i>bcd</i>	<i>sdhB</i>	<i>yngB</i>	<i>yngHA</i>	<i>yusK</i>	<i>purE</i>	<i>phoD</i>	<i>ybcM</i>	
<i>racE</i>	<i>murB</i>	<i>fabG</i>	<i>pyrAA</i>	<i>dapG</i>	<i>leuB</i>	<i>sdhC</i>	<i>pgi</i>	<i>bkdB</i>	<i>ydbM</i>	<i>purQ</i>	<i>yvoE</i>	<i>ydeA</i>	
<i>ydiP</i>	<i>murF</i>	<i>fabD</i>	<i>argJ</i>	<i>yclM</i>	<i>ilvD</i>	<i>citB</i>	<i>murAB</i>	<i>bkdAB</i>	<i>yusJ</i>	<i>pyrH</i>	<i>ylbN</i>	<i>yetA</i>	
<i>ydiO</i>	<i>murAA</i>	<i>yhdO</i>	<i>proG</i>	<i>lysC</i>	<i>yrpC</i>	<i>sucC</i>	<i>tpi</i>	<i>bkdAA</i>	<i>acdA</i>	<i>purK</i>	<i>yitA</i>	<i>yjjA</i>	
<i>gpsA</i>	<i>gerCB</i>	<i>trxB</i>	<i>proH</i>	<i>aroB</i>	<i>leuC</i>	<i>sucD</i>	<i>pgk</i>	<i>lpdV</i>	<i>pksI</i>	<i>purB</i>	<i>yvgR</i>	<i>yjpA</i>	
<i>gapA</i>	<i>ywaB</i>	<i>yfkN</i>	<i>proI</i>	<i>trpC</i>	<i>leuD</i>	<i>yppP</i>	<i>galE</i>	<i>yqiD</i>	<i>yusL</i>	<i>purA</i>	<i>yvgQ</i>	<i>ymfJ</i>	
<i>eno</i>	<i>yqeJ</i>	<i>yloD</i>	<i>comER</i>	<i>trpF</i>	<i>leuA</i>	<i>purN</i>	<i>yubB</i>	<i>yfhR</i>	<i>ysiB</i>	<i>purH</i>	<i>yubG</i>	<i>paiB</i>	
<i>yvyH</i>	<i>menB</i>	<i>yjbN</i>	<i>asnB</i>	<i>aroA</i>	<i>ilvC</i>	<i>qcrC</i>	<i>ctaC</i>	<i>yhfB</i>	<i>yfjR</i>	<i>pyrB</i>	<i>yuaA</i>	<i>yvdD</i>	
<i>ybbT</i>	<i>menE</i>	<i>prs</i>	<i>asnH</i>	<i>aroD</i>	<i>yjcI</i>	<i>qcrB</i>	<i>pabC</i>	<i>yjbW</i>	<i>ycgT</i>	<i>pyrD</i>	<i>trkA</i>	<i>ywrD</i>	
<i>yabH</i>	<i>ytfD</i>	<i>cmk</i>	<i>aspB</i>	<i>aroI</i>	<i>tdh</i>	<i>qcrA</i>	<i>folC</i>	<i>ycsD</i>	<i>yfnB</i>	<i>pyrDII</i>	<i>ykqB</i>	<i>ackA</i>	
<i>yluB</i>	<i>folD</i>	<i>adk</i>	<i>yugH</i>	<i>lysA</i>	<i>mtbP</i>	<i>pdhD</i>	<i>sul</i>	<i>yjaX</i>	<i>yqfW</i>	<i>pyrC</i>	<i>ykrM</i>	<i>gntK</i>	
<i>yqiE</i>	<i>gerCC</i>	<i>tmk</i>	<i>ilvB</i>	<i>aroF</i>	<i>gapB</i>	<i>odhB</i>	<i>ctaD</i>	<i>pksF</i>	<i>ytdI</i>	<i>purF</i>	<i>yvdB</i>	<i>ybcF</i>	
<i>pgm</i>	<i>gerCA</i>	<i>guaB</i>	<i>ilvH</i>	<i>serA</i>	<i>pgcA</i>	<i>odhA</i>	<i>folA</i>	<i>yhfL</i>	<i>nrdEB</i>	<i>guaA</i>	<i>ylbA</i>	<i>ytiB</i>	
<i>mraY</i>	<i>menD</i>	<i>yybQ</i>	<i>alsS</i>	<i>serC</i>	<i>yloR</i>	<i>dltA</i>	<i>folK</i>	<i>lcfA</i>	<i>nrdEB</i>	<i>pyrE</i>	<i>ybaR</i>	<i>yvdA</i>	
<i>tagA</i>	<i>dfrA</i>	<i>pdhA</i>	<i>pabA</i>	<i>cysE</i>	<i>pfk</i>	<i>dltB</i>	<i>pabB</i>	<i>yngI</i>	<i>pdp</i>	<i>pyrF</i>	<i>yfkE</i>	<i>ywaA</i>	

EK 13 rhGH üretimi için MOT koşulunda Periyod III için gerçekleştirilen akı değişkenliği analizi sonuçları

Çizelge 5 rhGH üretiminin MOT koşulunda Periyod III için kapalı tepkimelerin genleri

dapL	ywpB	mtnW	gudB	ytkP	bsaA	lacA	citG	yhcW	ycdF	yjbV	bkdAA	ctaA	purH	tetB	ycbD	tuaG	yydE	ywbM	snaB
asd	acpS	mtnX	aroC	cysK	yqjR	ycbH	citC	yodV	yxjF	thiL	lpdV	nfrAA	pyrDII	trpD	ywdH	tuaD	ywjI	ytgA	alsD
dapF	yhdO	yitC	trpF	alrB	yjcI	ycbF	citH	yqjD	xynB	thiE	pdhD	lctE	pyrC	trpA	yfmT	ywqF	yycR	ytgB	nagBA
glyA	yluA	mtnB	aroA	rocF	ycnH	nagA	bglC	araB	yfnG	panD	yisP	yfnB	katB	trpC	aldY	ykpB	qoxA	ytgC	nagBB
metK	yfkN	bcsA	aroD	argH	ureA	yjmJ	yqkG	araD	yngB	dhbA	bkdAB	ytdI	pyrE	pabA	dhaS	dhbC	adeC	yugO	glcD
alrA	yjbN	mtnA	hisC	argG	ansA	yjmA	araA	yulC	tuaH	ykkE	bkdB	yknA	pyrR	glsB	yticB	ribB	yncF	yfkC	aroH
racE	yloD	gltA	patB	hisZ	ansB	yjmF	yqiU	tkf	yticA	dhbB	ypgA	pdp	gbsA	glsA	sdhC	yacB	relQ	trpB	pheA
gpsA	cmk	gltB	mccB	hisG	bltD	yjmE	ycbC	treA	cwlD	yqjS	yjbW	drm	gbsB	ilvE	sdhB	lcfA	rsh	trpE	aroX
eno	adk	ald	yxep	hutG	paiA	yjmI	fruB	yckG	ybbD	hemY	yfhR	yaaF	penP	leuD	sucD	yngI	yurE	yubE	ilvA
yvyH	tmk	speB	metC	defA	mtbP	comD	gmuE	yckF	ylbI	ydbD	yhfL	yerA	spoVFA	comER	bglH	yhfT	yurD	yqiI	yloR
ybbT	hprT	argF	cysH	pdxT	ywfE	kduI	gdh	xylA	ylbQ	ribR	yhfS	yunH	spsK	proI	gmuD	pksJ	yurC	lytC	ysfD
ydiP	fnt	argD	yisZ	yrcP	yxag	kduD	mdxM	xylB	menF	tenA	yusK	udk	spsJ	proH	yjhB	ydaB	yurF	yrvJ	yoaN
ydiO	metS	speA	ylnc	kbl	bdhA	kdgK	galK	pta	panB	efeN	ydbM	yaaG	yjbO	ureC	glgD	yhfB	pyrD	blyA	yvrK
prs	gltX	argC	serA	ycgN	gntK	kdgA	melA	pgi	pncA	hemL	mmgC	dra	yxel	ureB	gmuF	pksF	upp	sleB	pckA
pgm	mrpF	lysC	serC	hutH	rbsK	yugT	galT	tpi	panC	gsaB	acdA	yosS	sodA	yccC	yvyI	yjaX	ybbE	ykvT	acsA
guaB	mrpD	dapG	cysE	rocA	gutB	yvdL	glgB	pgk	yaaD	hemH	dgkA	yumD	cah	ymfJ	licH	ycsD	ybxI	cwlJ	ybcF
gcaD	yufV	yclM	hipO	defB	pycA	sacA	glgP	yulE	dhbE	hemC	ysiB	relP	yqcM	paiB	iolE	mmgA	spoVFB	cwlA	ydcI
ddla	mrpB	yugH	nasD	bcd	gndA	ykwC	glgA	iolB	bioF	ylnc	pksI	ndk	phoA	yvdD	iolC	yusJ	sodF	cwlC	rppG
fold	yufT	aspB	ytjP	ilvK	pgcA	ycsA	glgC	yisS	folN	sirB	yhdW	purC	yitA	ywrD	iolD	yqiK	sodC	xlyA	ytiB
yqeJ	ctrA	proJ	nasE	leuC	cdd	argB	pksG	iolG	ribG	nasF	fadN	pnP	yvgQ	gntZ	iolJ	glpQA	phoD	xlyB	yvdA
ytaG	cdsA	yhdR	mtnN	ilvC	glpD	aldX	glvA	yuxG	ribH	hemB	yngG	deoD	ygcA	yjpA	gtaB	yfjR	phoB	cwlH	hutU
yueK	groES	hom	speD	kamA	purT	galE	yyaI	yktC	hemZ	hemD	cotJC	tdk	yqgK	yjiA	ytdA	dltA	ylnc	hemN	hutI

EK 13 rhGH üretimi için MOT koşulunda Periyod III için gerçekleştirilen akı değişkenliği analizi sonuçları

Çizelge 5.1 rhGH üretiminin MOT koşulunda Periyod III için genomdan silinmeye aday genler

<i>yvzE_pseudo</i>	<i>mtnW</i>	<i>gudB</i>	<i>ytkP</i>	<i>bsaA</i>	<i>lacA</i>	<i>citG</i>	<i>yhcW</i>	<i>ycdF</i>	<i>yjbV</i>	<i>bkdAA</i>	<i>ctaA</i>	<i>purH</i>	<i>tetB</i>	<i>ycbD</i>	<i>tuaG</i>	<i>yydE</i>	<i>ywbM</i>
<i>msrB</i>	<i>mtnX</i>	<i>aroC</i>	<i>cysK</i>	<i>yqjR</i>	<i>ycbH</i>	<i>citC</i>	<i>yodV</i>	<i>yxjF</i>	<i>thiL</i>	<i>lpdV</i>	<i>nfrAA</i>	<i>pyrDII</i>	<i>trpD</i>	<i>ywdH</i>	<i>tuaD</i>	<i>ywjI</i>	<i>ytgA</i>
<i>snaB</i>	<i>yitC</i>	<i>trpF</i>	<i>alrB</i>	<i>yjcl</i>	<i>ycbF</i>	<i>citH</i>	<i>yqjD</i>	<i>xynB</i>	<i>thiE</i>	<i>pdhD</i>	<i>lctE</i>	<i>pyrC</i>	<i>trpA</i>	<i>yfmT</i>	<i>ywqF</i>	<i>yycR</i>	<i>ytgB</i>
<i>alsD</i>	<i>mtnB</i>	<i>aroA</i>	<i>rocF</i>	<i>ycnH</i>	<i>nagA</i>	<i>bglC</i>	<i>araB</i>	<i>yfnG</i>	<i>panD</i>	<i>yisP</i>	<i>yfnB</i>	<i>katB</i>	<i>trpC</i>	<i>aldY</i>	<i>ykpB</i>	<i>qoxA</i>	<i>ytgC</i>
<i>nagBA</i>	<i>bcsA</i>	<i>aroD</i>	<i>argH</i>	<i>ureA</i>	<i>yjmJ</i>	<i>yqkG</i>	<i>araD</i>	<i>yngB</i>	<i>dhbA</i>	<i>bkdAB</i>	<i>ytdI</i>	<i>pyrE</i>	<i>pabA</i>	<i>dhaS</i>	<i>dhbC</i>	<i>adeC</i>	<i>yugO</i>
<i>nagBB</i>	<i>mtnA</i>	<i>hisC</i>	<i>argG</i>	<i>ansA</i>	<i>yjmA</i>	<i>araA</i>	<i>yulC</i>	<i>tuaH</i>	<i>ykkE</i>	<i>bkdB</i>	<i>yknA</i>	<i>pyrR</i>	<i>glsB</i>	<i>ytcB</i>	<i>ribB</i>	<i>yncF</i>	<i>yfkC</i>
<i>glcD</i>	<i>gltA</i>	<i>patB</i>	<i>hisZ</i>	<i>ansB</i>	<i>yjmF</i>	<i>yqiU</i>	<i>tkl</i>	<i>ytcA</i>	<i>dhbB</i>	<i>ypgA</i>	<i>pdp</i>	<i>gbsA</i>	<i>glsA</i>	<i>sdhC</i>	<i>yacB</i>	<i>relQ</i>	<i>trpB</i>
<i>aroH</i>	<i>gltB</i>	<i>mccB</i>	<i>hisG</i>	<i>bltD</i>	<i>yjmE</i>	<i>ycbC</i>	<i>treA</i>	<i>cwlD</i>	<i>yqjS</i>	<i>yjbW</i>	<i>drm</i>	<i>gbsB</i>	<i>ilvE</i>	<i>sdhB</i>	<i>lcfA</i>	<i>rsh</i>	<i>trpE</i>
<i>pheA</i>	<i>ald</i>	<i>yxeP</i>	<i>hutG</i>	<i>paiA</i>	<i>yjmI</i>	<i>fruB</i>	<i>yckG</i>	<i>ybbD</i>	<i>hemY</i>	<i>yfhR</i>	<i>yaaF</i>	<i>penP</i>	<i>leuD</i>	<i>sucD</i>	<i>yngI</i>	<i>yurE</i>	<i>yubE</i>
<i>aroX</i>	<i>speB</i>	<i>metC</i>	<i>defA</i>	<i>mtbP</i>	<i>comD</i>	<i>gmuE</i>	<i>yckF</i>	<i>ylbI</i>	<i>ydbD</i>	<i>yhfL</i>	<i>yerA</i>	<i>spoVFA</i>	<i>comER</i>	<i>bglH</i>	<i>yhfT</i>	<i>yurD</i>	<i>yqiI</i>
<i>ilvA</i>	<i>argF</i>	<i>cysH</i>	<i>pdxT</i>	<i>ywfE</i>	<i>kduI</i>	<i>gdh</i>	<i>xylA</i>	<i>ylbQ</i>	<i>ribR</i>	<i>yhfS</i>	<i>yunH</i>	<i>spsK</i>	<i>proI</i>	<i>gmuD</i>	<i>pksJ</i>	<i>yurC</i>	<i>lytC</i>
<i>yloR</i>	<i>argD</i>	<i>yisZ</i>	<i>yrpC</i>	<i>yxaG</i>	<i>kduD</i>	<i>mdxM</i>	<i>xylB</i>	<i>menF</i>	<i>tenA</i>	<i>yusK</i>	<i>udk</i>	<i>spsJ</i>	<i>proH</i>	<i>yjhB</i>	<i>ydaB</i>	<i>yurF</i>	<i>yrvJ</i>
<i>ysfD</i>	<i>speA</i>	<i>ylnC</i>	<i>kbl</i>	<i>bdhA</i>	<i>kdgK</i>	<i>galK</i>	<i>pta</i>	<i>panB</i>	<i>efeN</i>	<i>ydbM</i>	<i>yaaG</i>	<i>yjbO</i>	<i>ureC</i>	<i>glgD</i>	<i>yhfB</i>	<i>pyrD</i>	<i>blyA</i>
<i>yoaN</i>	<i>argC</i>	<i>serA</i>	<i>ycgN</i>	<i>gntK</i>	<i>kdgA</i>	<i>melA</i>	<i>pgi</i>	<i>pncA</i>	<i>hemL</i>	<i>mmgC</i>	<i>dra</i>	<i>yxeI</i>	<i>ureB</i>	<i>gmuF</i>	<i>pksF</i>	<i>upp</i>	<i>sleB</i>
<i>yvrK</i>	<i>lysC</i>	<i>serC</i>	<i>hutH</i>	<i>rbsK</i>	<i>yugT</i>	<i>galT</i>	<i>tpi</i>	<i>panC</i>	<i>gsaB</i>	<i>acdA</i>	<i>yosS</i>	<i>soda</i>	<i>yccC</i>	<i>yvyI</i>	<i>yjaX</i>	<i>ybbE</i>	<i>ykvT</i>
<i>pckA</i>	<i>dapG</i>	<i>cysE</i>	<i>rocA</i>	<i>gutB</i>	<i>yvdL</i>	<i>glgB</i>	<i>pgk</i>	<i>yaaD</i>	<i>hemH</i>	<i>dgkA</i>	<i>yumD</i>	<i>cah</i>	<i>ymfJ</i>	<i>licH</i>	<i>ycsD</i>	<i>ybxI</i>	<i>cwlJ</i>
<i>acsA</i>	<i>yclM</i>	<i>hipO</i>	<i>defB</i>	<i>pycA</i>	<i>sacA</i>	<i>glgP</i>	<i>yulE</i>	<i>dhbE</i>	<i>hemC</i>	<i>ysiB</i>	<i>relP</i>	<i>yqcM</i>	<i>paiB</i>	<i>iolE</i>	<i>mmgA</i>	<i>spoVFB</i>	<i>cwlA</i>
<i>ybcF</i>	<i>yugH</i>	<i>nasD</i>	<i>bcd</i>	<i>gndA</i>	<i>ykwC</i>	<i>glgA</i>	<i>iolB</i>	<i>bioF</i>	<i>ylnF</i>	<i>pksI</i>	<i>ndk</i>	<i>phoA</i>	<i>yvdD</i>	<i>iolC</i>	<i>yusJ</i>	<i>sodF</i>	<i>cwlC</i>
<i>ydcI</i>	<i>aspB</i>	<i>ytjP</i>	<i>ilvK</i>	<i>pgcA</i>	<i>ycsA</i>	<i>glgC</i>	<i>yisS</i>	<i>folN</i>	<i>sirB</i>	<i>yhdW</i>	<i>purC</i>	<i>yitA</i>	<i>ywrD</i>	<i>iolD</i>	<i>yqiK</i>	<i>sodC</i>	<i>xlyA</i>
<i>rppG</i>	<i>proJ</i>	<i>nasE</i>	<i>leuC</i>	<i>cdd</i>	<i>argB</i>	<i>pksG</i>	<i>iolG</i>	<i>ribG</i>	<i>nasF</i>	<i>fadN</i>	<i>pnp</i>	<i>yvgQ</i>	<i>gntZ</i>	<i>iolJ</i>	<i>glpQA</i>	<i>phoD</i>	<i>xlyB</i>
<i>ytiB</i>	<i>yhdR</i>	<i>mtnN</i>	<i>ilvC</i>	<i>glpD</i>	<i>aldX</i>	<i>glvA</i>	<i>yuxG</i>	<i>ribH</i>	<i>hemB</i>	<i>yngG</i>	<i>deoD</i>	<i>ygcA</i>	<i>yjpA</i>	<i>gtaB</i>	<i>yfjR</i>	<i>phoB</i>	<i>cwlH</i>
<i>yvdA</i>	<i>hom</i>	<i>speD</i>	<i>kamA</i>	<i>purT</i>	<i>galE</i>	<i>yyaI</i>	<i>yktC</i>	<i>hemZ</i>	<i>hemD</i>	<i>cotJC</i>	<i>tdk</i>	<i>yqgK</i>	<i>yjjA</i>	<i>ytDA</i>	<i>dltA</i>	<i>ylNB</i>	<i>hemN</i>
<i>hutU</i>	<i>proA</i>	<i>racX</i>	<i>rocD</i>	<i>fbaA</i>	<i>sdhA</i>	<i>manA</i>	<i>yvdK</i>	<i>bioB</i>	<i>hemE</i>	<i>narI</i>	<i>yunL</i>	<i>ytgD</i>	<i>yetA</i>	<i>tuaA</i>	<i>dltB</i>	<i>yvgR</i>	<i>qoxB</i>

EK 14 rhGH üretimi için MOT koşulunda Periyod III için gerçekleştirilen akı değişkenliği analizi sonuçlarının Morimoto vd. (2008) ile karşılaştırılması

Çizelge 1 rhGH üretiminin MOT koşulunda aktif tepkimelerin genlerinin Morimoto vd.(2008)'nin *B.subtilis* MBG874'ü oluşturmak için sildiği genlerle karşılaştırılması

*rhGH üretiminde MOT'da aktif tepkimelerin genleri	Morimoto vd.(2008) geni sildi mi? (+/-)	Aktif tepkime için <i>iBsu1144</i> -rhGH R#	Aktif tepkimenin izoenzimi var mı? (+/-)
<i>dapL</i>	-	R19	-
<i>asd</i>	-	R37	-
<i>dapF</i>	-	R44	-
<i>dapB</i>	-	R46	-
<i>dapA</i>	-	R47	-
<i>glyA</i>	-	R81	-
<i>glmS</i>	-	R99	-
<i>dapH</i>	-	R107	-
<i>alrA</i>	-	R124	+
<i>racE</i>	-	R140	+
<i>ydiP</i>	-	R208	+
<i>ydiO</i>	-	R208	+
<i>gpsA</i>	-	R262	-
<i>gapA</i>	-	R282	+
<i>eno</i>	-	R283	-
<i>yvyH</i>	-	R298	-

EK 14 rhGH üretimi için MOT koşulunda Periyod III için gerçekleştirilen akı değişkenliği analizi sonuçlarının Morimoto vd. (2008) ile karşılaştırılması

Çizelge 2 rhGH üretiminin MOT koşulunda kapalı tepkimelerin genlerinin Morimoto vd.(2008)'nin *B.subtilis* MBG874'ü oluşturmak için sildiği genlerle karşılaştırılması

rhGH üretiminde MOT'da kapalı tepkimelerin genleri	Gen Morimoto vd.(2008) tarafından silindi mi? (+/-)	Gen aktif bir tepkimeden sorumlu mu? (+/-)	Kapalı tepkime için <i>iBsu1144-rhGH</i> R#
<i>dapL</i>	-	+	R20
<i>asd</i>	-	+	R36
<i>dapF</i>	-	+	R45
<i>glyA</i>	-	+	R82
<i>metK</i>	-	-	R98
<i>alrA</i>	-	+	R125
<i>racE</i>	-	+	R139
<i>gpsA</i>	-	+	R261
<i>eno</i>	-	+	R284
<i>yvyH</i>	-	+	R299, R466-R467
<i>ybbT</i>	-	+	R304
<i>ydiP</i>	-	+	R207
<i>ydiO</i>	-	+	R207
<i>pgm</i>	-	+	R478
<i>guaB</i>	-	+	R503
<i>gcaD</i>	-	+	R533, R546

EK 14 rhGH üretimi için MOT koşulunda Periyod III için gerçekleştirilen akı değişkenliği analizi sonuçlarının Morimoto vd. (2008) ile karşılaştırılması

Çizelge 3 rhGH üretiminin MOT koşulunda izoenzimleri olmayan aktif tepkimelerin genleri

<i>dapL</i>	<i>murD</i>	<i>guaB</i>	<i>trpA</i>	<i>odhA</i>	<i>yqiD</i>	<i>pyrF</i>	<i>ctaF</i>
<i>asd</i>	<i>murC</i>	<i>pdhA</i>	<i>trpB</i>	<i>dltA</i>	<i>pssA</i>	<i>nrgA</i>	<i>yhaU</i>
<i>dapF</i>	<i>murB</i>	<i>argF</i>	<i>argH</i>	<i>dltB</i>	<i>ypfP</i>	<i>ykaB</i>	<i>yhaT</i>
<i>dapB</i>	<i>murF</i>	<i>argB</i>	<i>argG</i>	<i>dltD</i>	<i>yfiX</i>	<i>yvgR</i>	<i>yppP</i>
<i>dapA</i>	<i>gerCB</i>	<i>argD</i>	<i>kbl</i>	<i>dltC</i>	<i>yusL</i>	<i>yvgQ</i>	<i>purN</i>
<i>glyA</i>	<i>ywaB</i>	<i>argC</i>	<i>bcd</i>	<i>tagE</i>	<i>nrdEB</i>	<i>yfkE</i>	<i>qcrC</i>
<i>glmS</i>	<i>yqeJ</i>	<i>argJ</i>	<i>leuB</i>	<i>glpK</i>	<i>nrdEB</i>	<i>tyrA</i>	<i>qcrB</i>
<i>dapH</i>	<i>menB</i>	<i>pabA</i>	<i>ilvD</i>	<i>tkt</i>	<i>pdp</i>	<i>gltB</i>	<i>qcrA</i>
<i>gpsA</i>	<i>menE</i>	<i>trpD</i>	<i>leuC</i>	<i>pgi</i>	<i>cdd</i>	<i>gltA</i>	<i>pfk</i>
<i>eno</i>	<i>ytfD</i>	<i>trpE</i>	<i>leuD</i>	<i>tpi</i>	<i>yaaF</i>	<i>hisH</i>	
<i>yvyH</i>	<i>folD</i>	<i>pheA</i>	<i>leuA</i>	<i>pgk</i>	<i>ndk</i>	<i>hisF</i>	
<i>ybbT</i>	<i>gerCC</i>	<i>aroX</i>	<i>ilvC</i>	<i>galE</i>	<i>deoD</i>	<i>hisD</i>	
<i>yabH</i>	<i>gerCA</i>	<i>hom</i>	<i>yjcI</i>	<i>yubB</i>	<i>purD</i>	<i>hisJ</i>	
<i>yluB</i>	<i>menD</i>	<i>thrB</i>	<i>tdh</i>	<i>pabC</i>	<i>purM</i>	<i>hisB</i>	
<i>yqiE</i>	<i>dfrA</i>	<i>thrC</i>	<i>pgcA</i>	<i>folC</i>	<i>purC</i>	<i>hisI</i>	
<i>pgm</i>	<i>nadE</i>	<i>yitB</i>	<i>yloR</i>	<i>sul</i>	<i>purE</i>	<i>hisA</i>	
<i>mraY</i>	<i>pgsA</i>	<i>aroB</i>	<i>fbaA</i>	<i>folA</i>	<i>pyrH</i>	<i>gntK</i>	
<i>tagA</i>	<i>yqfP</i>	<i>trpC</i>	<i>citG</i>	<i>folK</i>	<i>purK</i>	<i>glcK</i>	
<i>tagB</i>	<i>yqfY</i>	<i>trpF</i>	<i>citC</i>	<i>pabB</i>	<i>purB</i>	<i>pta</i>	
<i>tagO</i>	<i>yacN</i>	<i>aroA</i>	<i>citH</i>	<i>ytxM</i>	<i>purA</i>	<i>pdhC</i>	
<i>tagG</i>	<i>yacM</i>	<i>aroD</i>	<i>sdhA</i>	<i>nadB</i>	<i>purH</i>	<i>pdhB</i>	
<i>tagH</i>	<i>yhdO</i>	<i>aroI</i>	<i>sdhB</i>	<i>nadC</i>	<i>pyrB</i>	<i>lctE</i>	

EK 15 rhGH üretiminin MOT koşulunda Periyod II ve III için hesaplanan iBsu1144-
rhGH tepkime hızları ve analizleri

Çizelge 1 rhGH üretiminin MOT koşulunda Periyod II ve III için hesaplanan iBsu1144-
rhGH tepkime hızları ve oranları

R#	Tepkime	Akı, mmol/(g _{KH} st)		Akı oranı
		PII	PIII	PIII/PII
1	b2d3k5m + o2 => ikmb + for + h	0	0	-
2	b2d3k5m + o2 => umtp + co + for + h	0	0	-
3	dkmpp => ih3k5m + h	0	0	-
4	ih3k5m + h => dkmpp	0	0	-
5	ih3k5m + h2o => b2d3k5m + pi	0	0	-
6	pslac + h2o => slac + pi	0	0	-
7	bmdru1p => dkmpp + h2o	0	0	-
8	gluL + h + nadh => bpyr5c + (2) h2o + nad	0.005	0.014	2.8
9	(2) gluL + nadp => glnL + akg + nadph + h	12.639	0.068	0
10	(3) malcoa + coucoa => (4) coa + nncl + (3) co2	0	0	-
11	(4) coa + nncl + (3) co2 => (3) malcoa + coucoa	0	0	-
12	bmdr1p => bmdru1p	0	0	-
13	bmdru1p => bmdr1p	0	0	-
14	glnL + prlp => aicar + eig3p + gluL + h	0.002	0.005	2.5
15	akg + glnL + h + nadph => (2) gluL + nadp	0	0	-
16	(2) atp + glnL + h2o + hco3 => (2) adp + cbp + gluL + (2) h + pi	0.007	0.02	2.9
17	atp + gluL + nh4 => adp + glnL + h + pi	0	0	-
18	accoa + gluL => acglu + coa + h	0.006	0	0
19	i6dapime + h2o => i6dap + ac	0.01	0.018	1.8
20	i6dap + ac => i6dapime + h2o	0	0	-
21	alaL + h2o + nad => h + nadh + nh4 + pyr	0	0	-
22	glu5sa => bpyr5c + h + h2o	0	0	-
23	bpyr5c + h + h2o => glu5sa	0	0	-
24	bpyr5c + (2) h + nadph => nadp + proL	0.005	0.014	2.8
25	cbp + ornL => citrL + h + pi	0.006	0.019	3.2
26	citrL + h + pi => cbp + ornL	0	0	-
27	acglu + atp => acg5p + adp	0.006	0.019	3.2
28	acorn + akg => acg5sa + gluL	0	0	-
29	acg5sa + gluL => acorn + akg	0.006	0.019	3.2
30	agm + h2o => ptrc + urea	0	0	-
31	acg5sa + nadp + pi => acg5p + nadph + h	0	0	-
32	acg5p + nadph + h => acg5sa + nadp + pi	0.006	0.019	3.2

EK 15 rhGH üretiminin MOT koşulunda Periyod II ve III için hesaplanan iBsu1144-rhGH tepkime hızları ve analizleri

Çizelge 2 rhGH üretiminin MOT koşulunda Periyod II ve III için hesaplanan iBsu1144-rhGH tepkime hızları ve oranları: Glikoliz yolizi

R #	Tepkime	Akı, mmol/(g _{KH} st)		Akı oranı
		PII	PIII	PIII/PII
323	atp + glcD => adp + g6p	3.442	2.846	0.8
475	g6p => f6p	3.438	2.564	0.7
474	atp + f6p => adp + fdp + h	3.57	2.543	0.7
285	fdp => dhap + g3p	3.57	2.543	0.7
480	dhap => g3p	3.559	2.539	0.7
282	g3p + nad + pi => b3dpgj + nadh	7.193	5.055	0.7
482	b3dpgj + adp => upg + atp	7.193	5.055	0.7
477	upg => ipg	11.116	5.94	0.5
283	ipg => h2o + pep	11.116	5.94	0.5
479	adp + pep + h => atp + pyr	11.09	5.862	0.5
1055	rhGH sentez tepkimesi	2.21E-04	0.002	9

EK 15 rhGH üretiminin MOT koşulunda Periyod II ve III için hesaplanan iBsu1144-rhGH tepkime hızları ve analizleri

Çizelge 3 rhGH üretiminin MOT koşulunda Periyod II ve III için hesaplanan iBsu1144-rhGH tepkime hızları ve oranları: TCA döngüsü

R#	Tepkime	Akı, mmol/(g _{KH} st)		Akı oranı
		PII	PIII	PIII/PII
371	accoa + h ₂ o + oaa => cit + coa + h	11.053	5.514	0.5
368	cit => icit	11.053	5.514	0.5
374	icit + nadp => akg + co ₂ + nadph	11.053	5.514	0.5
370	akg + coa + nad => co ₂ + nadh + succoa	11.025	5.433	0.5
360	adp + pi + succoa => atp + coa + succ	11.017	5.417	0.5
357	fad + succ => fadh ₂ + fum	11.025	5.433	0.5
372	fum + h ₂ o => malL	11.039	5.464	0.5
376	malL + nad => h + nadh + oaa	19.019	7.479	0.4
1055	rhGH sentez hızı	2.21E-04	0.002	9

EK 15 rhGH üretiminin MOT koşulunda Periyod II ve III için hesaplanan iBsu1144-rhGH tepkime hızları ve analizleri

Çizelge 4 rhGH üretiminin MOT koşulunda Periyod II ve III için hesaplanan iBsu1144-rhGH tepkime hızları ve oranları: Pentoz fosfat yolizi

R#	Tepkime	Akı, mmol/(g _{KH} st)		Akı oranı
		PII	PIII	PIII/PII
279	g6p + nadp => apgl + h + nadph	0	0.28	-
495	apgl + h2o => apgc + h	0	0.28	-
263	atp + glcnD => apgc + adp + h	0.22	0	0
264	apgc + adp + h => atp + glcnD	0	0.28	-
270	apgc + nadp => co2 + nadph + ru5pD	0.22	0	0
271	co2 + nadph + ru5pD => apgc + nadp	0	0	-
274	ru5pD => xu5pD	0.138	0	0
275	xu5pD => ru5pD	0	0.019	-
276	r5p => ru5pD	0	0	-
277	ru5pD => r5p	0.082	0.019	0.2
455	g3p + s7p => e4p + f6p	0.075	0.01	0.1
456	e4p + f6p => g3p + s7p	0	0	-
457	r5p + xu5pD => g3p + s7p	0.075	0.01	0.1
458	g3p + s7p => r5p + xu5pD	0	0	-
459	e4p + xu5pD => f6p + g3p	0.063	0	0
460	f6p + g3p => e4p + xu5pD	0	0.029	-
859	atp + r5p => amp + prpp + h	0.008	0.009	1.1
860	amp + prpp + h => atp + r5p	0	0	-
1055	rhGH sentez tepkimesi	2.21E-04	0.002	9

EK 15 rhGH üretiminin MOT koşulunda Periyod II ve III için hesaplanan iBsu1144-rhGH tepkime hızları ve analizleri

Çizelge 5 rhGH üretiminin MOT koşulunda Periyod II ve III için hesaplanan iBsu1144-rhGH tepkime hızları ve oranları: Pyr nodu

R#	Tepkime	Akı, mmol/(g _{KH} st)		Akı oranı
		PII	PIII	PIII/PII
803	lacL + nad => h + nadh + pyr	0.149	0.031	0.2
804	h + nadh + pyr => lacL + nad	0	0	-
479	adp + pep + h => atp + pyr	11.09	5.862	0.5
34	gluL + pyr => akg + alaL	0.014	0.016	1.1
55	h + (2) pyr => alac + co2	0.02	0.059	3
164	alac + h + nadph => i3dhmb + nadp	0.02	0.059	3
133	i3dhmb => umob + h2o	0.02	0.059	3
473	coa + nad + pyr => accoa + co2 + nadh	3.188	3.714	1.2
280	ac + atp => actp + adp	0.017	0.025	1.5
472	actp + coa => accoa + pi	0.017	0.025	1.5
371	accoa + h2o + oaa => cit + coa + h	11.053	5.514	0.5
269	atp + hco3 + pyr => adp + h + oaa + pi	0	0	-
291	pyr + co2 + nadh => malL + nad	7.98	2.015	0.3
1055	rhGH sentez tepkimesi	2.21E-04	0.002	9

*Ardışık tepkimeler aynı renkle gösterilmiştir.

EK 15 rhGH üretiminin MOT koşulunda Periyod II ve III için hesaplanan iBsu1144-rhGH tepkime hızları ve analizleri

Çizelge 6 rhGH üretiminin MOT koşulunda Periyod II ve III için hesaplanan iBsu1144-rhGH tepkime hızları ve oranları: Serin grubu amino asitlerin yolizi

R #	Tepkime	Akı, mmol/(g _{KH} st)		Akı oranı
		PII	PIII	PIII/PII
88	upg + nad => uphp + h + nadh	0.029	0.048	1.7
90	uphp + gluL => akg + pserL	0.029	0.048	1.7
211	h2o + pserL => pi + serL	0.029	0.048	1.7
92	accoa + serL => acser + coa	0.002	0.007	3.5
85	acser + h2s => ac + cysL + h	0.002	0.007	3.5
81	serL + thf => gly + h2o + mlthf	0.017	0.008	0.5
551	h + mlthf + nadph => bmthf + nadp	0.008	0	0
100	bmthf + hcysL => metL + thf	0.008	0	0
1055	rhGH sentez tepkimesi	2.21E-04	0.002	9

*Ardışık tepkimeler aynı renkle gösterilmiştir.

EK 15 rhGH üretiminin MOT koşulunda Periyod II ve III için hesaplanan iBsu1144-rhGH tepkime hızları ve analizleri

Çizelge 7 rhGH üretiminin MOT koşulunda Periyod II ve III için hesaplanan iBsu1144-rhGH tepkime hızları ve oranları: Alanin grubu amino asitlerin yolizi

R#	Tepkime	Akı, mmol/(g _{KH} st)		Akı oranı
		PII	PIII	PIII/PII
34	gluL + pyr => akg + alaL	0.014	0.016	1.1
55	h + (2) pyr => alac + co2	0.02	0.059	3
164	alac + h + nadph => i3dhmb + nadp	0.02	0.059	3
133	i3dhmb => umob + h2o	0.02	0.059	3
161	umob + accoa + h2o => uc3hmp + coa + h	0.013	0.045	3.5
160	uc3hmp => iippm + h2o	0.013	0.045	3.5
158	iippm + h2o => uc2hmp	0.013	0.045	3.5
156	uc2hmp + nad => uc4mop + h + nadh	0.013	0.045	3.5
210	uc4mop + h => dmop + co2	0.013	0.045	3.5
167	dmop + gluL => akg + leuL	0	0	-
169	dmop + h + nadh + nh4 => h2o + leuL + nad	0.012	0.045	3.8
198	umob + h + nadh + nh4 => h2o + nad + valL	20.709	2.272	0.1
199	akg + valL => umob + gluL	20.702	2.258	0.1
1055	rhGH sentez tepkimesi	2.21E-04	0.002	9

*Ardışık tepkimeler aynı renkle gösterilmiştir.

EK 15 rhGH üretiminin MOT koşulunda Periyod II ve III için hesaplanan iBsu1144-rhGH tepkime hızları ve analizleri

Çizelge 8 rhGH üretiminin MOT koşulunda Periyod II ve III için hesaplanan iBsu1144-rhGH tepkime hızları ve oranları: Aromatik asit grubu amino asitlerin yolizi

R#	Tepkime	Akı, mmol/(g _{KH} st)		Akı oranı
		PII	PIII	PIII/PII
62	e4p + h2o + pep => idda7p + pi	0.012	0.038	3.2
65	idda7p => udhq + pi + h	0.012	0.038	3.2
63	udhq => udhsk + h2o	0.012	0.038	3.2
73	udhsk + h + nadph => nadp + skm	0.012	0.038	3.2
75	atp + skm => adp + skm5p + h	0.012	0.038	3.2
71	pep + skm5p => upsme + pi	0.012	0.038	3.2
61	upsme => chor + pi + h	0.012	0.038	3.2
60	chor => pphn	0.011	0.036	3.3
67	nad + pphn => u4hpp + co2 + nadh	0.004	0.014	3.5
78	u4hpp + gluL => akg + tyrL	0.004	0.014	3.5
68	h + pphn => co2 + h2o + phpyr	0.007	0.022	3.1
97	gluL + phpyr => akg + pheL	0.007	0.022	3.1
58	chor + glnL => anth + gluL + h + pyr	0.001	0.002	2
59	anth + prpp => ppi + pran	0.001	0.002	2
69	pran => icpr5p	0.001	0.002	2
66	icpr5p + h => uig3p + co2 + h2o	0.001	0.002	2
76	uig3p + serL => g3p + h2o + trpL	0.001	0.002	2
1055	rhGH sentez tepkimesi	2.21E-04	0.002	9

*Ardışık tepkimeler aynı renkle gösterilmiştir.

EK 15 rhGH üretiminin MOT koşulunda Periyod II ve III için hesaplanan iBsu1144-rhGH tepkime hızları ve analizleri

Çizelge 9 rhGH üretiminin MOT koşulunda Periyod II ve III için hesaplanan iBsu1144-rhGH tepkime hızları ve oranları: Aspartik asit grubu amino asitlerin yolizi

R#	Tepkime	Akı, mmol/(g _{KH} st)		Akı oranı
		PII	PIII	PIII/PII
42	gluL + oaa => akg + aspL	7.966	1.966	0.2
38	aspL + atp + glnL + h2o => amp + asnL + gluL + ppi + h	0.01	0.012	1.2
39	aspL + atp => dpasp + adp	7.937	1.907	0.2
37	dpasp + nadph + h => aspsa + nadp + pi	7.937	1.907	0.2
47	aspsa + pyr => i3dhdp + h + (2) h2o	0.01	0.018	1.8
46	i3dhdp + h + nadph => nadp + thdp	0.01	0.018	1.8
107	accoa + h2o + thdp => acamoxm + coa	0.01	0.018	1.8
108	acamoxm + gluL => i6dapime + akg	0.01	0.018	1.8
19	i6dapime + h2o => i6dap + ac	0.01	0.018	1.8
44	i6dap => i6dap2	0.01	0.018	1.8
43	i6dap2 + h => co2 + lysL	0.008	0.017	2.1
49	aspsa + h + nadph => homL + nadp	7.928	1.889	0.2
50	atp + homL => adp + phom + h	7.919	1.874	0.2
51	h2o + phom => pi + thrL	7.919	1.874	0.2
**194	thrL => iobut + nh4	0.008	0	0
118	iobut + h + pyr => iahbut + co2	0.008	0.016	2
165	iahbut + h + nadph => i3dhmp + nadp	0.008	0.016	2

EK 15 rhGH üretiminin MOT koşulunda Periyod II ve III için hesaplanan iBsu1144-rhGH tepkime hızları ve analizleri

Çizelge 10 rhGH üretiminin MOT koşulunda Periyod II ve III için hesaplanan iBsu1144-rhGH tepkime hızları ve oranları: Glutamik asit grubu amino asitlerin yolizi

R#	Tepkime	Akı, mmol/(g _{KH} st)		Akı oranı
		PII	PIII	PIII/PII
{175, 199, 1067, 15, 28, 33, 41, 77, 91, 95, 96, 116, 154}, {167, 200, 9, 29, 34, 42, 57, 78, 90, 94, 97, 108, 117, 155}	akg => gluL	0.027	0.082	3
{9, 17, 1066}, {557, 577, 949, 965, 973, 974, 14-16, 38, 58, 99, 138}	gluL => glnL	0.008	0.024	3
8	gluL + h + nadh => bpyr5c + (2) h2o + nad	0.005	0.014	2.8
24	bpyr5c + (2) h + nadph => nadp + proL	0.005	0.014	2.8
18	accoa + gluL => acglu + coa + h	0.006	0	0
27	acglu + atp => acg5p + adp	0.006	0.019	3.2
32	acg5p + nadph + h => acg5sa + nadp + pi	0.006	0.019	3.2
29	acg5sa + gluL => acorn + akg	0.006	0.019	3.2
119	acorn + h2o => ac + ornL	0.006	0	0
176	acorn + gluL => acglu + ornL	0	0.019	-
25	cbp + ornL => citrL + h + pi	0.006	0.019	3.2
129	aspL + atp + citrL => amp + argsuc + ppi + h	0.006	0.019	3.2
127	argsuc => argL + fum	0.006	0.019	3.2
126	argL + h2o => ornL + urea	0	0	-
1055	rhGH sentez tepkimesi	2.21E-04	0.002	9

*Ardışık tepkimeler aynı renkle gösterilmiştir.

EK 15 rhGH üretiminin MOT koşulunda Periyod II ve III için hesaplanan iBsu1144-rhGH tepkime hızları ve analizleri

Çizelge 11 rhGH üretiminin MOT koşulunda Periyod II ve III için hesaplanan iBsu1144-rhGH tepkime hızları ve oranları: Histidin sentezi yolizi

R#	Tepkime	Akı, mmol/(g _{KH} st)		Akı oranı
		PII	PIII	PIII/PII
131	atp + prpp => ppi + prbatp	0.002	0.005	2.5
180	h2o + prbatp => ppi + prbamp + h	0.002	0.005	2.5
179	h2o + prbamp => prfp	0.002	0.005	2.5
181	prfp => prlp	0.002	0.005	2.5
14	glnL + prlp => aicar + eig3p + gluL + h	0.002	0.005	2.5
151	eig3p => h2o + imacp	0.002	0.005	2.5
94	gluL + imacp => akg + hisp	0.002	0.005	2.5
147	h2o + hisp => histd + pi	0.002	0.005	2.5
146	h2o + histd + (2) nad => (3) h + hisL + (2) nadh	0.002	0.005	2.5
1055	rhGH sentez tepkimesi	2.21E-04	0.002	9

*Ardışık tepkimeler aynı renkle gösterilmiştir.

EK 15 rhGH üretiminin MOT koşulunda Periyod II ve III için hesaplanan iBsu1144-rhGH tepkime hızları ve analizleri

Çizelge 12 Amino asitlerin MOT koşulu için PII ve PIII’de toplam sentez hızları

Amino asitler	Kısaltma	Amino asit hücre dışında HPLC ile belirlendi mi? (+/-)		Amino asitin toplam sentez hızı, mmol/(g _{KH} st)		*Akı oranı
		PII	PIII	PII	PIII	PIII/PII
L-Triptofan	TrpL	+	+	0.001	0.002	2
L-Histidin	HisL	-	-	0.002	0.005	2.5
L-Sisteyn	CysL	-	-	0.002	0.007	3.5
L-Tirozin	TyrL	-	-	0.004	0.014	3.5
L-Prolin	ProL	-	-	0.005	0.014	2.8
L-Arjinin	ArgL	-	+	0.006	0.019	3.2
L-Fenilalanin	PheL	+	+	0.007	0.022	3.1
L-Izolözin	IleL	-	+	0.008	0.015	1.9
L-Lizin	LysL	+	+	0.008	0.017	2.1
L-Asparajin	AsnL	+	+	0.01	0.012	1.2
L-Lözin	LeuL	-	+	0.012	0.045	3.8
L-Alanin	AlaL	-	-	0.014	0.016	1.1
L-Serin	SerL	-	-	0.029	0.048	1.7
L-Metiyonin	MetL	+	+	7.913	1.867	0.2
L-Treonin	ThrL	-	-	7.919	1.874	0.2
L-Glisin	Gly	+	+	7.922	1.864	0.2
L-Aspartik asit	AspL	-	-	7.966	1.966	0.2
L-Glutamin	GlnL	-	-	12.639	0.068	0
L-Valin	ValL	-	+	20.709	2.272	0.1
L-Glutamik asit	GluL	-	-	33.335	2.302	0.1

*3> akı oranı ≥ 1.5, 3.0 ≤ akı oranı, akı değeri oksijen aktarımıyla azalır, değişim yok

EK 15 rhGH üretiminin MOT koşulunda Periyod II ve III için hesaplanan iBsu1144-rhGH tepkime hızları ve analizleri

Çizelge 13 rhGH üretiminin MOT koşulunda PII için darboğazların belirlenmesi

Hücre dışında belirlenmeyen amino asitler	Kısaltma	$\sum r_{ai}$, mmol/(g _{KH} st)	α_{ai-PSR}	R_{LF-i}	Darboğazlık derecesi
L-Lözin	leuL	0.012	26	2166.7	Birincil
L-Sisteyn	cysL	0.002	4	2000	Birincil
L-Tirozin	tyrL	0.004	8	2000	Birincil
L-Arjinin	argL	0.006	11	1833.3	Birincil
L-Prolin	proL	0.005	8	1600	Birincil
L-Histidin	hisL	0.002	3	1500	Birincil
L-Izolözin	ileL	0.008	8	1000	İkincil
L-Serin	serL	0.029	18	620.7	İkincil
L-Alanin	alaL	0.014	7	500	İkincil
L-Aspartat	aspL	7.966	11	1.4	Üçüncül
L-Treonin	thrL	7.919	10	1.3	Üçüncül
L-Glutamin	glnL	12.639	13	1.0	Üçüncül
L-Glutamat	gluL	33.335	14	0.4	Üçüncül
L-Valin	valL	20.709	7	0.3	Üçüncül

$\sum r_{ai}$: *i* amino asitinin toplam sentez akışı, α_{ai-PSR} : *i* amino asitinin rhGH sentez tepkimesindeki stokiyometrik katsayısı, **R_{LF-i}**: Hız-kısıtlayıcı basamak fonksyonu, $R_{LF-i} = \alpha_{ai-PSR} / \sum r_{ai}$

EK 16 *B.subtilis*'ten rhGH üretiminin MOT koşulunda PII ve PIII'e ait RMA değerleri ve iç düzen geni *tyrS*'e dayanan ekspresyon oranları (ER)

Çizelge 1 *B.subtilis*'ten rhGH üretiminin MOT koşulunda PII ve PIII'e ait RMA değerleri ve ekspresyon oranı (ER)

	Probe seti	BsRN-2016 R#	iBsu1144-rhGH R#	PII	PIII	$\log_2(ER_{PIII/PII})$	$ER_{PIII/PII}$
1	AFFX-BioB-5_at	-	-	5.30906	4.936562	-0.372498	0.8
2	AFFX-BioB-M_at	-	-	5.193908	4.744689	-0.449219	0.7
3	AFFX-BioB-3_at	-	-	5.283117	4.792319	-0.490798	0.7
4	AFFX-BioC-5_at	-	-	5.489538	4.838144	-0.651394	0.6
5	AFFX-BioC-3_at	-	-	5.344205	4.77644	-0.567765	0.7
6	AFFX-BioDn-5_at	-	-	4.862318	4.517106	-0.345212	0.8
7	AFFX-BioDn-3_at	-	-	5.612961	4.929034	-0.683927	0.6
8	AFFX-CreX-5_at	-	-	5.062598	4.637178	-0.42542	0.7
9	AFFX-CreX-3_at	-	-	5.314448	4.8648	-0.449648	0.7
10	AFFX-BioB-5_st	-	-	5.400247	4.804832	-0.595415	0.7
11	AFFX-BioB-M_st	-	-	5.743761	4.995697	-0.748064	0.6
12	AFFX-BioB-3_st	-	-	5.202995	4.846441	-0.356554	0.8
13	AFFX-BioC-5_st	-	-	5.095905	4.705927	-0.389978	0.8
14	AFFX-BioC-3_st	-	-	4.932443	4.665312	-0.267131	0.8
15	AFFX-BioDn-5_st	-	-	5.174878	4.791695	-0.383183	0.8
16	AFFX-BioDn-3_st	-	-	5.518208	5.026878	-0.49133	0.7
17	AFFX-CreX-5_st	-	-	5.519824	4.80756	-0.712264	0.6
18	AFFX-CreX-3_st	-	-	5.317418	4.793915	-0.523503	0.7
19	AFFX-DapX-5_at	-	-	8.322125	7.525799	-0.796326	0.6

EK 16 *B.subtilis*'ten rhGH üretiminin MOT koşulunda PII ve PIII'e ait RMA değerleri ve iç düzen geni *tyrS*'e dayanan ekspresyon oranları (ER)

Çizelge 2 *B.subtilis*'ten rhGH üretiminin MOT koşulunda PII ve PIII'e ait, iç düzen geni *tyrS*'e dayanan ekspresyon oranları (ER): Glikoliz yolizi

Gen	iBsu1144-rhGH R#	log ₂ (ER)		log ₂ (ER _{PIII/PII})	ER _{PIII/PII}
		PII	PIII		
<i>glcK</i>	R323	0.38	0.38	0	1
<i>pgi</i>	R475	3.67	3.33	-0.34	0.8
<i>pfk</i>	R474	1.89	1.38	-0.51	0.7
<i>fbaA</i>	R285	6.13	5.58	-0.55	0.7
<i>tpi</i>	R480	5.15	4.41	-0.74	0.6
<i>gapA</i>	R282	4.02	3.53	-0.49	0.7
<i>gapB</i>	R282	0.77	1.35	0.58	1.5
<i>pgk</i>	R482	5.18	4.79	-0.39	0.8
<i>pgm</i>	R477	4	2.95	-1.05	0.5
<i>eno</i>	R283	4.4	3.2	-1.2	0.4
<i>pykA</i>	R479	4.14	2.86	-1.28	0.4

EK 16 *B.subtilis*'ten rhGH üretiminin MOT koşulunda PII ve PIII'e ait RMA değerleri ve iç düzen geni *tyrS*'e dayanan ekspresyon oranları (ER)

Çizelge 3 *B.subtilis*'ten rhGH üretiminin MOT koşulunda PII ve PIII'e ait, iç düzen geni *tyrS*'e dayanan ekspresyon oranları (ER): TCA döngüsü

Gen	iBsu1144-rhGH R#	log ₂ (ER)		log ₂ (ER _{PIII/PII})	ER _{PIII/PII}
		PII	PIII		
<i>citZ</i>	R371	5.37	4.3	-1.07	0.5
<i>citA</i>	R371	0.53	0.74	0.21	1.2
<i>mmgD</i>	R371	0.31	0.72	0.41	1.3
<i>citB</i>	R368	3.85	3.64	-0.21	0.9
<i>citC</i>	R374	5.4	3.45	-1.95	0.3
<i>odhA</i>	R370	2.6	1.75	-0.85	0.6
<i>odhB</i>	R370	4.77	4.38	-0.39	0.8
<i>pdhD</i>	R370	4.65	2.7	-1.95	0.3
<i>sucC</i>	R360	3.93	3.26	-0.67	0.6
<i>sucD</i>	R360	4.2	3.73	-0.47	0.7
<i>sdhA</i>	R357	3.53	3.49	-0.04	1
<i>sdhB</i>	R357	3.47	3.57	0.1	1.1
<i>sdhC</i>	R357	1.29	1.4	0.11	1.1
<i>citG</i>	R372	2	0.97	-1.03	0.5
<i>citH</i>	R376	5.66	4.47	-1.19	0.4

EK 16 *B.subtilis*'ten rhGH üretiminin MOT koşulunda PII ve PIII'e ait RMA değerleri ve iç düzen geni *tyrS*'e dayanan ekspresyon oranları (ER)

Çizelge 4 *B.subtilis*'ten rhGH üretiminin MOT koşulunda PII ve PIII'e ait, iç düzen geni *tyrS*'e dayanan ekspresyon oranları (ER): Pentoz fosfat yolizi

		log ₂ (ER)			
Gen	iBsu1144-rhGH R#	PII	PIII	log ₂ (ER _{PIII/PII})	ER _{PIII/PII}
<i>yqjJ</i>	R279	2.44	1.67	-0.77	0.6
<i>ykgB</i>	R495	2.35	1.88	-0.47	0.7
<i>gntK</i>	R263-R264	0.27	0.57	0.3	1.2
<i>yqjI</i>	R270-R271	2.44	2.07	-0.37	0.8
<i>gntZ</i>	R270-R271	1.57	1.03	-0.54	0.7
<i>yloR</i>	R274-R275	1.04	0.92	-0.12	0.9
<i>ywlF</i>	R276-R277	1.8	1.9	0.1	1.1
<i>prs</i>	R859-R860	2.17	1.18	-0.99	0.5
<i>tkl</i>	R457-R460	0.34	0.28	-0.06	1
<i>ywjH</i>	R455-R456	3.05	1.86	-1.19	0.4

EK 16 *B.subtilis*'ten rhGH üretiminin MOT koşulunda PII ve PIII'e ait RMA değerleri ve iç düzen geni *tyrS*'e dayanan ekspresyon oranları (ER)

Çizelge 5 *B.subtilis*'ten rhGH üretiminin MOT koşulunda PII ve PIII'e ait, iç düzen geni *tyrS*'e dayanan ekspresyon oranları (ER): Pyr nodu

		$\log_2(ER)$			
Gen	iBsu1144-rhGH R#	PII	PIII	$\log_2(ER_{PIII/PII})$	$ER_{PIII/PII}$
<i>pykA</i>	R479	4.14	2.86	-1.28	0.4
<i>ilvB</i>	R55	2.84	1.09	-1.75	0.3
<i>ilvH</i>	R55	3.8	1.92	-1.88	0.3
<i>alsS</i>	R55	0.79	1.76	0.97	2
<i>ilvC</i>	R164	4.36	2.11	-2.25	0.2
<i>ilvD</i>	R133	3.72	2.03	-1.69	0.3
<i>pdhA</i>	R473	3.28	1.00	-2.28	0.2
<i>pdhB</i>	R473	3.34	0.75	-2.59	0.2
<i>pdhC</i>	R473	6.09	3.41	-2.68	0.2
<i>pdhD</i>	R473	4.65	2.7	-1.95	0.3
<i>purT</i>	R280	1.03	0.8	-0.23	0.9
<i>ackA</i>	R280	1.52	0.58	-0.94	0.5
<i>pta</i>	R472	1.34	1.06	-0.28	0.8
<i>pycA</i>	R269	3.78	1.58	-2.2	0.2

EK 16 *B.subtilis*'ten rhGH üretiminin MOT koşulunda PII ve PIII'e ait RMA değerleri ve iç düzen geni *tyrS*'e dayanan ekspresyon oranları (ER)

Çizelge 6 *B.subtilis*'ten rhGH üretiminin MOT koşulunda PII ve PIII'e ait, iç düzen geni *tyrS*'e dayanan ekspresyon oranları (ER): Serin grubu amino asitlerin yolizi

Gen	iBsu1144-rhGH R#	log ₂ (ER)		log ₂ (ER _{PIII/PII})	ER _{PIII/PII}
		PII	PIII		
<i>serA</i>	R88	1.96	0.88	-1.08	0.5
<i>serC</i>	R90	4.46	3.88	-0.58	0.7
<i>rsbX</i>	R211	2.8	3.09	0.29	1.2
<i>rsbP</i>	R211	0.86	0.77	-0.09	0.9
<i>glyA</i>	R81	4.29	4.74	0.45	1.4
<i>cysE</i>	R92	2.45	2.38	-0.07	1
<i>cysK</i>	R85	4.45	3.32	-1.13	0.5
<i>mccA</i>	R85	1.18	1.36	0.18	1.1
<i>ytkP</i>	R85	0.44	0.74	0.3	1.2
<i>yitJ</i>	R551	0.44	0.44	0	1

EK 16 *B.subtilis*'ten rhGH üretiminin MOT koşulunda PII ve PIII'e ait RMA değerleri ve iç düzen geni *tyrS*'e dayanan ekspresyon oranları (ER)

Çizelge.7 *B.subtilis*'ten rhGH üretiminin MOT koşulunda PII ve PIII'e ait, iç düzen geni *tyrS*'e dayanan ekspresyon oranları (ER): Alanin grubu amino asitlerin yolizi

Gen	iBsu1144-rhGH R#	log ₂ (ER)		log ₂ (ER _{PIII/PII})	ER _{PIII/PII}
		PII	PIII		
<i>ilvB</i>	R55	2.84	1.09	-1.75	0.3
<i>ilvH</i>	R55	3.8	1.92	-1.88	0.3
<i>alsS</i>	R55	0.79	1.76	0.97	2
<i>ilvC</i>	R164	4.36	2.11	-2.25	0.2
<i>ilvD</i>	R133	3.72	2.03	-1.69	0.3
<i>yqiT</i>	R169, R198	0.91	0.67	-0.24	0.8
<i>leuA</i>	R161	4.35	2.6	-1.75	0.3
<i>leuC</i>	R160, R158	4.84	3.71	-1.13	0.5
<i>leuD</i>	R160, R158	2.17	1.02	-1.15	0.5
<i>leuB</i>	R156	3.05	1.82	-1.23	0.4
<i>ilvE</i>	R167, R199	1.53	1.65	0.12	1.1
<i>ilvK</i>	R167, R199	2.8	1.72	-1.08	0.5

EK 16 *B.subtilis*'ten rhGH üretiminin MOT koşulunda PII ve PIII'e ait RMA değerleri ve iç düzen geni *tyrS*'e dayanan ekspresyon oranları (ER)

Çizelge 8 *B.subtilis*'ten rhGH üretiminin MOT koşulunda PII ve PIII'e ait, iç düzen geni *tyrS*'e dayanan ekspresyon oranları (ER):
Aromatik asit grubu amino asitlerin yolizi

Gen	iBsu1144-rhGH R#	log ₂ (ER)		log ₂ (ER _{PIII/PII})	ER _{PIII/PII}
		PII	PIII		
<i>aroF</i>	R61	2.88	1.33	-1.55	0.3
<i>aroC</i>	R63	0.16	0.53	0.37	1.3
<i>yqhS</i>	R63	1.87	1.63	-0.24	0.8
<i>aroB</i>	R65	1.35	0.69	-0.66	0.6
<i>aroA</i>	R71	3.07	1.67	-1.4	0.4
<i>aroD</i>	R73	1.07	0.7	-0.37	0.8
<i>aroI</i>	R75	0.96	1.31	0.35	1.3
<i>pabA</i>	R58	1.2	0.74	-0.46	0.7
<i>trpD</i>	R58-R59	0.19	0.49	0.3	1.2
<i>trpE</i>	R58	0.77	1.02	0.25	1.2
<i>trpF</i>	R69	-0.09	0.04	0.13	1.1
<i>trpC</i>	R66	-0.11	0.05	0.16	1.1
<i>trpA</i>	R76	2.49	2.36	-0.13	0.9
<i>trpB</i>	R76	0.69	0.61	-0.08	0.9
<i>aroH</i>	R60	3.67	2.46	-1.21	0.4

EK 16 *B.subtilis*'ten rhGH üretiminin MOT koşulunda PII ve PIII'e ait RMA değerleri ve iç düzen geni *tyrS*'e dayanan ekspresyon oranları (ER)

Çizelge 9 *B.subtilis*'ten rhGH üretiminin MOT koşulunda PII ve PIII'e ait, iç düzen geni *tyrS*'e dayanan ekspresyon oranları (ER): Aspartik asit grubu amino asitlerin yolizi

Gen	iBsu1144-rhGH R#	log ₂ (ER)		log ₂ (ER _{PIII/PII})	ER _{PIII/PII}
		PII	PIII		
<i>asnB</i>	R38	0.94	0.68	-0.26	0.8
<i>asnH</i>	R38	0.64	0.69	0.05	1
<i>asnO</i>	R38	0.07	0.38	0.31	1.2
<i>dapG</i>	R39	1.67	0.92	-0.75	0.6
<i>yclM</i>	R39	1.38	0.94	-0.44	0.7
<i>lysC</i>	R39	1.42	0.47	-0.95	0.5
<i>yhdR</i>	R42	1.35	0.89	-0.46	0.7
<i>aspB</i>	R42	1.28	1.08	-0.2	0.9
<i>yugH</i>	R42	2.35	1.73	-0.62	0.7
<i>asd</i>	R37	5	4.29	-0.71	0.6
<i>dapA</i>	R47	2.59	1.36	-1.23	0.4
<i>dapB</i>	R46	4.83	4.38	-0.45	0.7
<i>dapH</i>	R107	2.27	1.26	-1.01	0.5
<i>dapL</i>	R19	1.37	1.11	-0.26	0.8
<i>dapF</i>	R44	0.54	0.8	0.26	1.2

EK 16 *B.subtilis*'ten rhGH üretiminin MOT koşulunda PII ve PIII'e ait RMA değerleri ve iç düzen geni *tyrS*'e dayanan ekspresyon oranları (ER)

Çizelge 10 *B.subtilis*'ten rhGH üretiminin MOT koşulunda PII ve PIII'e ait, iç düzen geni *tyrS*'e dayanan ekspresyon oranları (ER): Glutamik asit grubu amino asitlerin yolizi

Gen	iBsu1144-rhGH R#	log ₂ (ER)		log ₂ (ER _{PIII/PII})	ER _{PIII/PII}
		PII	PIII		
<i>ycgN</i>	R8	2.07	0.82	-1.25	0.4
<i>rocA</i>	R8	0.47	0.73	0.26	1.2
<i>proG</i>	R24	0.32	0.2	-0.12	0.9
<i>proH</i>	R24	0.01	0.04	0.03	1
<i>proI</i>	R24	0.2	0.35	0.15	1.1
<i>comER</i>	R24	0.29	0.77	0.48	1.4
<i>argD</i>	R29	2.5	0.8	-1.7	0.3
<i>argC</i>	R32	0.71	0.92	0.21	1.2
<i>argF</i>	R25	3.01	1.2	-1.81	0.3
<i>argB</i>	R27	2.64	0.95	-1.69	0.3
<i>argG</i>	R129	3.03	0.78	-2.25	0.2
<i>argH</i>	R127	2.04	0.42	-1.62	0.3
<i>argJ</i>	R176, R18	2.55	1.05	-1.5	0.4
<i>rocF</i>	R126	0.78	1.01	0.23	1.2

EK 16 *B.subtilis*'ten rhGH üretiminin MOT koşulunda PII ve PIII'e ait RMA değerleri ve iç düzen geni *tyrS*'e dayanan ekspresyon oranları (ER)

Çizelge 11 *B.subtilis*'ten rhGH üretiminin MOT koşulunda PII ve PIII'e ait, iç düzen geni *tyrS*'e dayanan ekspresyon oranları (ER): Histidin sentezi yolizi

Gen	iBsu1144-rhGH R#	log ₂ (ER)		log ₂ (ER _{P_{III}/P_{II}})	ER _{P_{III}/P_{II}}
		PII	PIII		
<i>hisG</i>	R131	4.87	6.12	1.25	2.4
<i>hisZ</i>	R131	2.79	3.84	1.05	2.1
<i>hisI</i>	R179, R180	4.16	5.26	1.1	2.1
<i>hisA</i>	R181	6.55	7.9	1.35	2.5
<i>hisB</i>	R151	4.27	5.49	1.22	2.3
<i>hisJ</i>	R147	0.49	0.77	0.28	1.2
<i>hisD</i>	R146	4.15	5.23	1.08	2.1
<i>hisF</i>	R14	4.19	4.98	0.79	1.7
<i>hisH</i>	R14	6.03	7.61	1.58	3
<i>hisC</i>	R94	1.55	0.58	-0.97	0.5

EK 17 *B.subtilis*'ten rhGH üretiminin (Özdamar vd. 2009) MOT koşulunda kalma süresinden etkilenen mikrodizin prob setleri

Çizelge 1 *B.subtilis*'ten rhGH üretiminin (Özdamar vd. 2009) MOT koşulunda kalma süresinden etkilenen mikrodizin prob setleri; $p<0.05$, $ER>3$

Probe Seti	ER ([t=12 st]'e karşı [t=0 st])	Regülasyon ([t=12 st]'e karşı [t=0 st])	ER ([t=16 st]'e karşı [t=0 st])	Regülasyon ([t=16 st]'e karşı [t=0 st])	ER ([t=16 st]'e karşı [t=12 st])	Regülasyon ([t=16 st]'e karşı [t=12 st])
BG19003/lctE_at	10.8434	artış	63.56955	artış	5.8625097	artış
BG12001/lctP_at	18.09343	artış	59.878212	artış	3.30939	artış
BG11846/wprA_at	-18.5087	azalış	-8.074725	azalış	2.2921767	artış
BG11846/wprA_1_at	-22.645088	azalış	-11.128599	azalış	2.0348554	artış
BG11087/appA_at	-35.848106	azalış	-32.918175	azalış	1.0890064	artış
BG13284/ykrY_at	-5.1981444	azalış	-1.3748013	azalış	3.7810152	artış
BG13285/ykrZ_at	-6.333952	azalış	-1.8052108	azalış	3.508705	artış
BG13401/ylqB_at	-10.848033	azalış	-4.6190443	azalış	2.3485448	artış
BG10478/citB_at	-13.654295	azalış	-10.584137	azalış	1.2900716	artış
BG10478/citB_1_at	-20.355669	azalış	-13.158559	azalış	1.5469525	artış
BG10478/citB_2_at	-9.169084	azalış	-8.233246	azalış	1.1136658	artış
BG11949/leuC_at	-6.1083717	azalış	-2.7741904	azalış	2.2018573	artış
BG10670/ilvB_at	-5.3461776	azalış	-1.7462981	azalış	3.0614347	artış
BG13922/ytsJ_at	2.3851378	artış	4.1688375	artış	1.7478392	artış
BG11527/bioF_at	-15.717534	azalış	-5.286365	azalış	2.9732215	artış
BG14076/yvaY_at	-5.3086553	azalış	-2.7934575	azalış	1.9003887	artış
BG10827/gap_at	4.241532	artış	6.8991637	artış	1.6265736	artış
BG11084/narI_at	33.574898	artış	24.87155	artış	-1.3499318	azalış
BG11083/narJ_at	74.81685	artış	28.218803	artış	-2.6513119	azalış
BG11081/narG_1_at	14.864277	artış	12.729708	artış	-1.1676841	azalış
BG11081/narG_2_at	45.3587	artış	29.884949	artış	-1.5177779	azalış
BG11081/narG_3_at	20.537104	artış	18.650726	artış	-1.1011426	azalış
BG11928/cydD_at	8.991818	artış	10.412365	artış	1.1579821	artış
BG11926/cydB_at	18.814253	artış	22.761173	artış	1.2097832	artış
BG11925/cydA_at	8.015224	artış	22.757065	artış	2.8392298	artış
BG11156/yxjG_at	-8.636784	azalış	-3.3113627	azalış	2.6082263	artış
BG10797/wapA_at	-8.372499	azalış	-5.139483	azalış	1.6290547	artış
BG10797/wapA_1_at	-9.527209	azalış	-4.4311004	azalış	2.1500776	artış
BG10797/wapA_2_at	-6.177762	azalış	-3.6412058	azalış	1.6966252	artış
BG10797/wapA_3_at	-10.020596	azalış	-3.1709828	azalış	3.1600912	artış
BG10797/wapA_4_at	-12.813149	azalış	-5.3837466	azalış	2.379969	artış

EK 17 *B.subtilis*'ten rhGH üretiminin (Özdamar vd. 2009) MOT koşulunda kalma süresinden etkilenen mikrodizin prob setleri

Çizelge 2 *B.subtilis*'ten rhGH üretiminin (Özdamar vd. 2009) MOT koşulunda kalma süresinden etkilenen mikrodizin prob setlerinin proteinleri, enzimleri, tepkimeleri; $p < 0.05$, $ER > 3$

Probe Seti	Protein veya enzim	Tepkime numarası	iBsu1144-rhGH R#	Tepkime(ler)	Kaynak
BG19003/lctE_at	L-lactate dehydrogenase	1	R803	lacL + nad => h + nadh + pyr	SubtiList, GenoList, UniProt, SEED, MicroCyc
	L-lactate dehydrogenase	2	R804	h + nadh + pyr => lacL + nad	SubtiList, GenoList, UniProt, SEED, MicroCyc
	2-hydroxybutyrate:NAD+ oxidoreductase	3	R817	ihbut + nad => iobut + h + nadh	GenoList, UniProt, SEED
	2-hydroxybutyrate:NAD+ oxidoreductase	4	R818	iobut + h + nadh => ihbut + nad	GenoList, UniProt, SEED
BG13284/ykrY_at	methylthioribulose-1-phosphate dehydratase	5	R7	bmdru1p => dkmpp + h2o	GenoList, UniProt, SEED, MicroCyc
BG13285/ykrZ_at	acireductone dioxygenase [iron(II)-requiring]	6	R1	b2d3k5m + o2 => ikmb + for + h	MicroCyc
	acireductone dioxygenase (Ni2+-requiring)	7	R2	b2d3k5m + o2 => umtp + co + for + h	MicroCyc
BG13401/ylqB_at	conserved hypothetical protein	-	-	-	MicroCyc
BG10478/citB_at	methyl-cis-aconitase	8	R364	imcit => micit	Sonenshein (2002), SEED
	methyl-cis-aconitase	9	R365	micit => imcit	Sonenshein (2002), SEED
	aconitate hydratase	10	R368	cit => icit	SubtiList, GenoList, UniProt, KEGG, SEED
	aconitate hydratase	11	R369	icit => cit	SubtiList, GenoList, UniProt, KEGG, SEED
	aconitate hydratase	12	-	cis-aconitate + H2O → D-threo-isocitrate	MicroCyc

EK 17 *B.subtilis*'ten rhGH üretiminin (Özdamar vd. 2009) MOT koşulunda kalma süresinden etkilenen mikrodizin prob setleri

Çizelge 3 *B.subtilis*'ten rhGH üretiminin (Özdamar vd. 2009) MOT koşulunda kalma süresinden etkilenen, iBsu1144-rhGH tepkime sistemi ile bağlantılı olmayan, BsRN-2016 ile bağlantılı mikrodizin prob setleri, proteinleri, enzimleri, tepkimeleri; $p < 0.05$, $ER > 3$

Tepkime numarası	Tepkime(ler)	Protein/Enzim	Prob seti	Kaynak
1	cis-aconitate + H ₂ O → D-threo-isocitrate	aconitate hydratase	BG10478/citB_at	MicroCyc
2	citrate → cis-aconitate + H ₂ O	aconitate hydratase	BG10478/citB_at	MicroCyc
1	cis-aconitate + H ₂ O → D-threo-isocitrate	aconitate hydratase	BG10478/citB_1_at	MicroCyc
2	citrate → cis-aconitate + H ₂ O	aconitate hydratase	BG10478/citB_1_at	MicroCyc
1	cis-aconitate + H ₂ O → D-threo-isocitrate	aconitate hydratase	BG10478/citB_2_at	MicroCyc
2	citrate → cis-aconitate + H ₂ O	aconitate hydratase	BG10478/citB_2_at	MicroCyc
3	b3dpgj + nadh => g3p + nad + pi	-	BG10827/gap_at	MicroCyc
4	a menaquinone + 2 H ⁺ [out] + 2 e ⁻ → a menaquinol	nitrate reductase (gamma subunit); nitrate reductase (beta subunit); nitrate reductase (alpha subunit); cytochrome aa3-600 quinol oxidase (subunit IV); cytochrome aa3-600 quinol oxidase (subunit III); cytochrome aa3-600 quinol oxidase (subunit I); cytochrome aa3-600 quinol oxidase (subunit II)	BG11084/narI_at	MicroCyc

EK 17 *B.subtilis*'ten rhGH üretiminin (Özdamar vd. 2009) MOT koşulunda kalma süresinden etkilenen mikrodizin prob setleri

Çizelge 4 *B.subtilis*'ten rhGH üretiminin (Özdamar vd. 2009) MOT koşulunda kalma süresinden etkilenen, tepkimeleri keşfedilmediği için BsRN-2016 ile bağlantılı olmayan mikrodizin prob setleri, proteinleri, enzimleri; $p < 0.05$, $ER > 3$

Probe seti	Protein ya da enzim	Kaynak
BG13401/ylqB_at	conserved hypothetical protein	MicroCyc
BG14076/yvaY_at	Polypeptide: killing factor SdpC	MicroCyc
BG11083/narJ_at	nitrate reductase molybdenum cofactor assembly chaperone NarJ	MicroCyc
BG11928/cydD_at	ABC membrane transporter (ATP-binding protein) required for cytochrome bb' function	MicroCyc
BG11156/yxjG_at	putative methyltetrahydrofolate methyltransferase	MicroCyc
BG10797/wapA_at	cell wall-associated tRNA nuclease precursor; intercellular growth inhibitor	MicroCyc
BG10797/wapA_1_at	cell wall-associated tRNA nuclease precursor; intercellular growth inhibitor	MicroCyc
BG10797/wapA_2_at	cell wall-associated tRNA nuclease precursor; intercellular growth inhibitor	MicroCyc
BG10797/wapA_3_at	cell wall-associated tRNA nuclease precursor; intercellular growth inhibitor	MicroCyc
BG10797/wapA_4_at	cell wall-associated tRNA nuclease precursor; intercellular growth inhibitor	MicroCyc
BG10797/wapA_5_at	cell wall-associated tRNA nuclease precursor; intercellular growth inhibitor	MicroCyc
BG11352/yxbB_at	putative S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase	MicroCyc
ig/4096209-4095700_at	intergenetic region	Affymetrix
BG11351/yxbA_at	conserved hypothetical protein	MicroCyc
BG11115/yxaM_at	putative efflux transporter	MicroCyc
BG11479/yydF_at	peptide controlling LiaRS	MicroCyc
BG12001/lctP_at	L-lactate permease	MicroCyc
BG11846/wprA_at	cell wall-associated protease	MicroCyc
BG11846/wprA_1_at	cell wall-associated protease	MicroCyc
BG11087/appA_at	oligopeptide ABC transporter (oligopeptide-binding lipoprotein)	MicroCyc

EK 17 *B.subtilis*'ten rhGH üretiminin (Özdamar vd. 2009) MOT koşulunda kalma süresinden etkilenen mikrodizin prob setleri

Çizelge 5 *B.subtilis*'ten rhGH üretiminin (Özdamar vd. 2009) MOT koşulunda kalma süresinden etkilenen, *iBsu1144-rhGH* ile bağlantılı mikrodizin prob setleri, proteinleri, enzimleri, tepkimeleri; $p < 0.05$, $ER > 3$

Probe Seti	Protein ya da enzim	Tepkime numarası	<i>iBsu1144-rhGH</i> R#	Tepkime	Kaynak
BG19003/lctE_at	L-lactate dehydrogenase	1	R803	lacL + nad => h + nadh + pyr	SubtiList, GenoList, UniProt, SEED, MicroCyc
BG19003/lctE_at	L-lactate dehydrogenase	2	R804	h + nadh + pyr => lacL + nad	SubtiList, GenoList, UniProt, SEED, MicroCyc
BG19003/lctE_at	2-hydroxybutyrate:NAD ⁺ oxidoreductase	3	R817	ihbut + nad => iobut + h + nadh	GenoList, UniProt, SEED
BG19003/lctE_at	2-hydroxybutyrate:NAD ⁺ oxidoreductase	4	R818	iobut + h + nadh => ihbut + nad	GenoList, UniProt, SEED
BG13284/ykrY_at	methylthioribulose-1-phosphate dehydratase	5	R7	bmdru1p => dkmpp + h ₂ o	GenoList, UniProt, SEED, MicroCyc
BG13285/ykrZ_at	acireductone dioxygenase [iron(II)-requiring]	6	R1	b2d3k5m + o ₂ => ikmb + for + h	MicroCyc
BG13285/ykrZ_at	acireductone dioxygenase (Ni ²⁺ -requiring)	7	R2	b2d3k5m + o ₂ => umtp + co + for + h	MicroCyc
BG10478/citB_at	methyl-cis-aconitase	8	R364	imcit => micit	Sonenshein (2002), SEED
BG10478/citB_at	methyl-cis-aconitase	9	R365	micit => imcit	Sonenshein (2002), SEED
BG10478/citB_at	aconitate hydratase	10	R368	cit => icit	SubtiList, GenoList, UniProt, KEGG, SEED
BG10478/citB_at	aconitate hydratase	11	R369	icit => cit	SubtiList, GenoList, UniProt, KEGG, SEED
BG10478/citB_1_at	methyl-cis-aconitase	8	R364	imcit => micit	Sonenshein (2002), SEED
BG10478/citB_1_at	methyl-cis-aconitase	9	R365	micit => imcit	Sonenshein (2002), SEED

EK 17 *B.subtilis*'ten rhGH üretiminin (Özdamar vd. 2009) MOT koşulunda kalma süresinden etkilenen mikrodizin prob setleri

Çizelge 6 *B.subtilis*'ten rhGH üretiminin (Özdamar vd. 2009) MOT koşulunda kalma süresinden etkilenen mikrodizin prob setlerinin transkriptomlarının ve ilgili tepkime hızlarının kalma süresiyle değişimlerinin karşılaştırılması; $p < 0.05$, $ER > 3$

Probe Seti	PIII-PII			Akı, mmol/(g _{KH} st)	PIII-PII			Transkriptomların ve tepkime hızlarının kalma süresiyle değişimlerdeki uyum: +/- (uyumlu/ uyumsuz)
	Periyod II'den III'e geçişte ekspresyonundaki değişim	Periyod II'den III'e gen	iBsu1144-rhGH R#		Periyod II	Periyod III	Periyod II'den III'e akılardaki değişim	
BG19003/lctE_at	Azalma		R803	lacL + nad => h + nadh + pyr	0.149	0.031	Azalma	+
			R804	h + nadh + pyr => lacL + nad	0	0	Değişim yok	-
			R817	ihbut + nad => iobut + h + nadh	0	0	Değişim yok	-
			R818	iobut + h + nadh => ihbut + nad	0	0	Değişim yok	-
BG13284/ykrY_at	Azalma		R7	bmdru1p => dkmpp + h ₂ o	0	0	Değişim yok	-
BG13285/ykrZ_at	Azalma		R1	b2d3k5m + o ₂ => ikmb + for + h	0	0	Değişim yok	-
			R2	b2d3k5m + o ₂ => umtp + co + for + h	0	0	Değişim yok	-
BG10478/citB_at	Azalma		R364	imcit => micit	0	0	Değişim yok	-
			R365	micit => imcit	0	0	Değişim yok	-
			R368	cit => icit	11.053	5.514	Azalma	+
			R369	icit => cit	0	0	Değişim yok	-
BG10478/citB_1_at	Azalma		R364	imcit => micit	0	0	Değişim yok	-
			R365	micit => imcit	0	0	Değişim yok	-
			R368	cit => icit	11.053	5.514	Azalma	+
			R369	icit => cit	0	0	Değişim yok	-
BG10478/citB_2_at	Azalma		R364	imcit => micit	0	0	Değişim yok	-
			R365	micit => imcit	0	0	Değişim yok	-
			R368	cit => icit	11.053	5.514	Azalma	+
			R369	icit => cit	0	0	Değişim yok	-

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Pınar KOCABAŞ
Doğum Yeri : Konya
Doğum Tarihi : 11 Mart 1980
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce, Fransızca (başlangıç düzeyi)

Eğitim Durumu

Lise : Bornova Anadolu Lisesi, İzmir (1998)
Lisans : ODTÜ Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü (2002)
Yüksek Lisans : ODTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği
Anabilim Dalı (2004)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

ODTÜ Kimya Mühendisliği Bölümü 2003-2004
UC Davis Kimya Mühendisliği Bölümü 2004-2005
Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü 2010-

Aldığı Burslar

2006-2010: TÜBİTAK-BİDEB 2210 Yurtiçi Doktora Bursu

SCI Yayınlar

Kocabaş, P., Çalık, P., Özdamar, T.H. 2006. Fermentation characteristics of l-tryptophan production by thermoacidophilic *Bacillus acidocaldarius* in a defined medium. **Enzyme & Microbial Technology** 39, 1077-1088.
Özdamar, T.H., Şentürk, B., Yılmaz, Ö.D., **Kocabaş, P.**, Çalık, G., Çalık, P. 2010. Bioreaction network flux analysis for human protein producing *Bacillus subtilis* based on genome-scale model. *Chemical Engineering Science* 65, 574-580.
Çalık, G., **Kocabaş, P.**, Afşar, H., Çalık, P., Özdamar, T.H. 2016. Parametric continuous feed stream design to fine-tune fed-batch bioreactor performance:

Recombinant human growth hormone production in *Bacillus subtilis*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 91, 2740-2750.

Kocabaş, P., Çalık, P., Çalık, G., Özdamar, T.H. (submitted: 20 Dec 2016, under revision: 17 March 2017-). Analyses of extracellular protein production in *Bacillus subtilis*: I- Genome-scale metabolic model reconstruction based on updated gene-enzyme-reaction data. **Biochemical Engineering Journal**.

Kocabaş, P., Çalık, G., Çalık, P., Özdamar, T.H. (submitted: 20 Dec 2016, under revision: 17 March 2017-). Analyses of extracellular protein production *Bacillus subtilis*: II- Responses of reaction network to oxygen transfer at transcriptional level. **Biochemical Engineering Journal**.

Hakemli Dergiler

Kocabaş, P., Çalık, P., Çalık, G., Özdamar, T.H. 2009. Microarray studies in *Bacillus subtilis*. **Biotechnology Journal** 4, 1012-1027.

Uluslararası Kongreler

T.H. Özdamar, B. Şentürk, Ö.D. Yılmaz, **P. Kocabaş**, G. Çalık. 2008. Bioreaction network flux analysis for human protein producing *Bacillus subtilis* based on genome-scale model. **20th International Symposium on Chemical Reaction Engineering (ISCRE 20)**, Kyoto, Japan.

Özdamar, T.H., **Kocabaş, P.**, Yılmaz, Ö.D. and Çalık, G. 2012. Flux analysis by microarray supported genome-scale model for human protein producing *Bacillus subtilis*. **22nd International Symposium on Chemical Reaction Engineering (ISCRE 22)**, Maastricht, Netherlands. (Sunan: Pınar Kocabaş)

Kocabaş, P., Çalık, G., Özdamar, T.H. 2012. Metabolic Flux Analysis by Transcriptome-Data Supported Genome-Scale Model for Human Protein Producing *Bacillus subtilis*. **9th European Symposium on Biochemical Engineering Science (ESBES-9)**, İstanbul, Turkey. (Sunan: Pınar Kocabaş)

Kocabaş, P., Çalık, P., Çalık, G. and Özdamar, T.H. 2014. Assesment of genome-scale and biochemical reaction based network models for protein production in *Bacillus subtilis*. **10th European Symposium on Biochemical Engineering Sciences and 6th International Forum on Industrial Bioprocesses (ESBES-IFIBIOP 2014)**-Lille-France. (Sunan: Pınar Kocabaş)

Ulusal Kongreler

Kocabaş, P., Çalık, G., Özdamar, T.H. 2012. Protein Üretiminde *B. subtilis* Hücreiçi Tepkimelerinin Reaksiyon Mühendisliği Prensipleriyle Analizi. 10. Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi (UKMK-10), İstanbul. (*Sunan: Pınar Kocabaş*)

Kocabaş, P., Çalık, P., Çalık, G. and Özdamar, T.H. 2014. Terapötik Protein rhGH Üretiminde Oksijen Aktarımının Reaksiyon Hızlarına Etkisi. 11. Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi (UKMK-11), Eskişehir. (*Sunan: Pınar Kocabaş*)

Kocabaş, P., Çalık, P., Çalık, G., Özdamar, T.H. 2016. Oksijen aktarımının terapötik protein üretiminde hücreiçi tepkime hızlarına etkisinin reaksiyon mühendisliği prensipleriyle analizi. 12. Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi (UKMK-12), İzmir. (*Sunan: Pınar Kocabaş*)

