

Proje No: 104M258

**METABOLİK + GENETİK + BİYOKİMYASAL
REAKSİYON MÜHENDİSLİĞİ PRENSİPLERİYLE
REKOMBİNANT ENZİM ÜRETİMİ**

Prof.Dr. PINAR ÇALIK

AĞUSTOS 2008
ANKARA

Önsöz

"Metabolik+Genetik+Biyokimyasal Reaksiyon Mühendisliği Prensipleriyle Rekombinant Enzim Üretimi" konulu araştırma projesi, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, "Endüstriyel Biyoteknoloji ve Metabolik Mühendislik Laboratuvarında" yürütülmüştür. Farmasötik sanayinde kullanılan benzaldehit liyaz enziminin biyoteknolojik prosesle üretimi için projelendirilmiş ve TÜBİTAK-MAG tarafından 104M258 nolu proje ile desteklenmiştir. MAG 104M258 projesi **Kariyer Projesi** olarak **30 Temmuz 2004**'de sunulmuş; **25 Kasım 2004** tarihinde projenin kabul edildiği e-posta ile bildirilmiş; ancak "Kariyer Programının" esaslarındaki değişimler sonucu diğer araştırma projeleri statüsüne geçirilmesi sonucunda dört aylık gecikmeyle proje resmen **1 Nisan 2005** tarihinde başlamıştır. **30 Temmuz 2004** tarihinde sunulan proje araştırma grubunun çalışmalarına özellikle lisans-üstü burslarla destek vererek proje yürütücüsünün bilimsel kariyer etkinliğinin gelişmesi ve derinleşmesini hedeflediğinden proje bütçesi ağırlıklı olarak sarf malzemesi alımlar ve öğrenci burslarından oluşmuş; makine teçhizat olarak sadece dörtlü su banyosu talep edilmiş ve alınmıştır. Böylece, Kariyer programı projesi olarak kabul edilen, ancak kabul edildikten sonra statüsü değiştirilen proje ile yürümekte olan proje çok sayıda lisans-üstü öğrenciye burs verilerek etkin olarak sürdürülmüştür. Bu çerçevede, proje 30 Temmuz 2004'de sunulduktan sonra, temel alt-yapı eksikliği olmadığı için, araştırmalar sürdürülmüş; **1 Nisan 2005** tarihinde proje resmen başlatıldıktan sonra da proje kapsamında araştırmalar yoğun olarak devam etmiştir.

Türkiye'nin Avrupa Birliğine, Bağımsız Devletler Topluluğuna, Orta Doğu Pazarlarına yakınlığı ve büyük nüfusu, ortaya çıkan ve yeni çıkacak taleplerin karşılanması için doğal kaynaklarımızın kullanılarak yeni ürünler üretilmesini ve bunun için özgün proseslerin geliştirilmesini, bu çerçevede biyoteknolojik proseslerle birim fiyatı yüksek ürünler üretimini öncelikli araştırma ve uygulama alanı yapmaktadır. Bilim-buluş-teknoloji güdümünde sanayileşmenin temel strateji olarak benimsendiği Sekizinci Plan Döneminde önerilen ve desteklenen ve 9.Plan Döneminde tamamlanan 104M258 Projesi biyoteknolojik ürünler üretim alanında, enzim üretim sektörünün oluşması için önemli bir araştırma projesidir. Farmasötik ürünler endüstrisinde kiral izomerin türü molekülün işlevi açısından özgün olduğundan, izomerik karışım halinde ise diğer izomerin işlevinin farklı olması gerektiğinden, kiral moleküllerin üretiminde tek izomerlerinin elde edilmesi farmasötik aktif moleküllerin üretiminde önemli araştırma uygulama alanıdır. Bu çerçevede, proje kapsamında üretilen benzaldehit liyaz (BAL, EC 4.1.2.38) enzimi, benzoinin açıl bağının kırılması ve oluşması tepkimesini dönüşümlü olarak katalizleyerek aril aldehitlerin ve açiloinlerin sentezinde katalizör olarak kullanılma potansiyeline sahiptir.. Bağ kırılma reaksiyonunda, benzaldehit liyaz enzimi yalnız R-konfigürasyonundaki benzoin molekülünü katalizleyerek tepkimeyi oluşturmakta; S-konfigürasyonundaki benzoin ise tepkimeye girmemekte; açiloin reaksiyonunda da sadece R-benzoin oluşmaktadır. Bu katalizör özelliğiyle benzaldehit liyaz enzimi kiral madde sentezi için potansiyel enzimdir; üretimi bu nedenle önemlidir.

TÜBİTAK-104M258 projesi dört değerli lisans-üstü araştırmacının, KYM Hande Kaya, KYM Vahideh Angardı, KYM Hande Levent ve Biyolog Arda Büyüksungur, yetişmesi için olanak sağlamıştır. Proje kapsamında elde edilen bilgiler doğrultusunda literatüre önemli katkılar yapılmaktadır. Birincisi Enzyme and Microbial Technology, ikincisi Langmuir'de, iki araştırma makalemiz yayınlanmıştır.

Pınar Çalık
10 Ekim 2008

İçindekiler

	Sayfa
Önsöz	i
İçindekiler Listesi	iii
Şekillerin Listesi	iv
Çizelgelerin Listesi	vi
Simgeleme	vii
Özet	viii
Abstract	ix
1 GİRİŞ	1
2 GENEL BİLGİLER	3
3 GEREÇ VE YÖNTEM	7
3.1 Mikroorganizmalar ve Çoğalma Ortamları	7
3.2 Rekombinant <i>E.coli</i> , <i>Bacillus</i> ve <i>P.pastoris</i> Türleri Geliştirmede	8
Kullanılan Genetik Mühendisliği Teknikleri	
3.2.1 Kromozomal DNA izolasyonu	12
3.2.2 Gen değişiminin belirlenmesi	12
3.2.3 Polimeraz zincir tepkimeleriyle (PCR) gen değişiminin artırılması	12
3.2.4 Ligasyon tepkimesiyle klonlama	12
3.2.5 DNA dizin analizi	12
3.2.6 Plasmid DNA'nın <i>E.coli</i> 'ye $CaCl_2$ yöntemiyle transferi	12
3.2.7 <i>E. coli</i> 'den plasmid DNA izolasyonu	14
3.2.8 DNA'nın agaroz jelden ekstraksiyonu	15
3.2.9 Elektroporasyonla plasmid DNA'nın <i>Bacillus</i> türlerine transferi	15
3.2.10 <i>Bacillus</i> 'tan miniprep plasmid DNA izolasyonu: alkali liziz yöntemi	16
3.2.11 <i>Pichia pastoris</i> 'e gen aktarımı ve genomic DNA izolasyonu	17
3.3 Rekombinant Benzaldehit Liyaz Üretimi: Ölçek Büyütme Adımları ve Biyoreaktör Sistemi	18
3.4 Analitik Yöntemler	18
3.4.1 Mikroorganizma değişimi	20
3.4.2 Benzaldehit Liyaz aktivite tayini ve SDS-PAGE analizi	20
3.4.3 Glukoz değişimi	21
3.4.4 Amino asit değişimleri	21
3.4.5 Organik asit değişimleri	22

3.4.6 Sıvı faz kütle aktarım katsayısı ve oksijen tüketim hızının belirlenmesi	
4 BULGULAR VE TARTIŞMA	23
4.1. Rekombinant BAL üretimi için mikroorganizma geliştirilmesi	23
4.1.1. Rekombinant <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) pLysS ile BAL üretimi	23
: Tasarım-1	
4.1.1.1 Rekombinant konak <i>E.coli</i> seçimi	29
4.1.2 Hücre dışı benzaldehit liyaz üretimi için rekombinant <i>Bacillus</i> türü geliştirilmesi: Tasarım-II	33
4.1.2.1 Rekombinant <i>Bacillus</i> türleri ile benzaldehit liyaz üretimi	39
4.1.3 Hücre dışı Benzaldehit Liyaz için Rekombinant <i>P. pastoris</i>	39
Geliştirilmesi: Tasarım-III	
4.1.3.1 Rekombinant <i>P. pastoris</i> Hücreleri ile Benzaldehit Liyaz Üretimi	52
4.2 Rekombinant <i>E.coli</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>P.pastoris</i> 'ın Benzaldehit Liyaz Üretim Performanslarının Kıyaslanması	61
4.3 pRSETA:: <i>bal</i> Plasmidini Taşıyan <i>E. coli</i> Hücreleri ile Benzaldehit Liyaz üretimi	62
4.4 BAL Üretime Oksijen Aktarımının Etkisi	63
4.4.1 Oksijen Aktarım Karakteristikleri	70
4.5 Benzaldehit Liyaz Üretimi için Kompleks Ortam Tasarımı	71
4.6 Benzaldehit Liyaz Üretimi için Besleme Stratejisi Geliştirilmesi	74
5 SONUÇLAR	80
Kaynaklar	82
EKLER	85

Şekillerin Listesi

Şekil 1a. pUC18/pUC19 plasmidi

Şekil 1b. pUC18::*bal* plasmidi

Şekil 1c. pRSET plasmidi

Şekil 1d. pRB374 plasmidi

Şekil 1e. pPICZα plasmidi

Şekil 2. Pilot ölçek biyoreaktör sistemi

Şekil 3. Tasarlanan primerler ve dizinleri

Şekil 4. BAL geninin agaroz jel elektroforez görüntüsü ve çoğaltıldığı PCR tepkime parametre ve bileşenleri

Şekil 5. Saflaştırılan BAL geni ve PRSETA plazmidi

Şekil 6. pRSETA::*bal* ligasyon tepkime koşulları ve şematik gösterimi

Şekil 7. Plazmid DNA izolasyonu sonucu

Şekil 8. Rekombinant-pRSETA plazmidinin PCR tepkime parametre ve koşulları

Şekil 9. r-pRSETA plazmidi

Şekil 10. Farklı ekspresyon vektörleri taşıyan *E. coli* 'lerin BAL üretim performanslarının kıyaslanması

Şekil 11. Benzaldehid liyaz enziminin SDS-PAGE görüntüsü

Şekil 12. Hücre derişiminin ve benzaldehit liyaz aktivitesinin başlangıç glukoz derişimi ile değişimi.

Şekil 13. Tasarlanan primerler ve dizinleri

Şekil 14. SOE yöntemiyle *pre*-subC ve BAL genlerinin birbirine entegrasyonu

Şekil 15. BAL geninin ve Hibrid genin agaroz jel elektroforez görüntüsü ve çoğaltıldığı PCR tepkime parametre ve bileşenleri

Şekil 16. *pre*-subC geninin agaroz jel elektroforez görüntüsü ve çoğaltıldığı PCR tepkime parametre ve bileşenleri

Şekil 17. r-pUC19 plazmidinin izolasyonu ve kesim kontrolleri.

Şekil 18. Kesik r-pUC19 plazmidi ve pRB374 plazmidi.

Şekil 19. Rekombinant pRB374 plazmidi.

Şekil 20. Rekombinant mikroorganizma geliştirilmesi için uygulanan araştırma planı

Şekil 21. *P.pastoris* için tasarlanmış primerlerin şematik olarak gösterimi

Şekil 22. pUC18::*bal* plazmidinin jel elektroforez görüntüsü

Şekil 23. *bal* geninin jel elektroforezde görünümü

Şekil 24. *bal* geninin ve pPICZαA vektörünün restriksiyon enzimlerle kesildikten sonraki jel elektroforezdeki görüntüleri

Şekil 25. *P.pastoris* ile benzaldehit liyaz enzimi üretimi için pPICZα::*bal* plazmid tasarımı şematik gösterimi

Şekil 26. Potansiyel rekombinant plazmidler

- Şekil 27. pPICZαA::*bal* plazmidinin restriksiyon enzimleri ile kesildikten sonraki agarose jel elektroforez görüntüsü
- Şekil 28. pPICZαA::*bal* plazmidinin PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü
- Şekil 29. pPICZαA::*bal* plazmidinin *P. pastoris* genomuna entegrasyonunun şematik gösterimi
- Şekil 30. *P.pastoris* kolonilerinin genomik DNA'ları ile *bal* geni için yapılan PCR tepkimesinin agaroz jel elektroforez görüntüsü
- Şekil 31. Rekombinant *P.pastoris* hücrelerinin hücre dışı proteinlerinin SDS-PAGE analizleri
- Şekil 32. Benzaldehit liyaz enziminin SDS-PAGE görüntüsü
- Şekil 33. Proteolitik aktiviteyi gösteren SDS-PAGE görüntüsü.
- Şekil 34. Rekombinant *P.pastoris* hücrelerinin hücre dışı ürettiği BAL'ın FPLC görüntüsü
- Şekil 35. Benzoin dönüşüm reaksiyonunun TLC sonuçları
- Şekil 36. I. benzoin kondenzasyon tepkime ürünü analizi GC-MS kromatogramı
- Şekil 37. II. benzoin kondenzasyon tepkime ürünü analizi GC-MS kromatogramı
- Şekil 38. Çözünmüş oksijen derişiminin kalma süresi ve oksijen aktarım koşulları ile değişimi
- Şekil 39. Hava giriş hızının kalma süresi ve oksijen aktarım koşulları ile değişimi
- Şekil 40. Glukoz derişiminin kalma süresi ve oksijen aktarım koşulları ile değişimi
- Şekil 41. Hücre derişiminin kalma süresi ve oksijen aktarım koşulları ile değişimi
- Şekil 42. BAL aktivitesinin kalma süresi ve oksijen aktarım koşulları ile değişimi
- Şekil 43. Asetik asit derişiminin kalma süresi ve oksijen aktarım koşulu ile değişimi
- Şekil 44. Hücre derişiminin melas derişimi ve zamanla değişimi.
- Şekil 45. Glukoz ve fruktoz derişiminin melas derişimi ve zamanla değişimi
- Şekil 46. BAL aktivitesinin melas derişimi ve zamanla değişimi
- Şekil 47. Spesifik BAL aktivitesinin melas derişimi ve zamanla değişimi
- Şekil 48. Hava giriş hızının, glukoz ve fruktoz derişimlerinin FB1 stratejisi için zamanla değişimi
- Şekil 49. Hücre derişiminin FB1 stratejisi için zamanla değişimi.
- Şekil 50. BAL hacımsel ve spesifik aktivitesinin FB1 stratejisi için zamanla değişimi.
- Şekil 51. Hava giriş hızının, glukoz ve fruktoz derişimlerinin FB1 stratejisi için zamanla değişimi
- Şekil 52. Hücre derişiminin FB1 stratejisi için zamanla değişimi.
- Şekil 53. BAL hacımsel ve spesifik aktivitesinin FB1 stratejisi için zamanla değişimi.
- Şekil 54. Hava giriş hızının, glukoz ve fruktoz derişimlerinin FB1 stratejisi için zamanla değişimi
- Şekil 55. Hücre derişiminin FB1 stratejisi için zamanla değişimi.
- Şekil 56. BAL hacımsel ve spesifik aktivitesinin FB1 stratejisi için zamanla değişimi.

Çizelgelerin Listesi

- Çizelge 1. Araştırmada kullanılmış olan mikroorganizma ve plasmidler
- Çizelge 2. *E.coli* için katı ortam bileşimi
- Çizelge 3. Plasmid stabilitesi için kullanılan antibiyotikler ve derişimleri
- Çizelge 4. Tasarlanan primerlerin özellikleri
- Çizelge 5. Hücre derişimi ve benzaldehit liyaz aktivitesinin azot kaynağı ve derişimi ile değişimi.
- Çizelge 6. Hücre derişimi ve benzaldehit liyaz aktivitesinin glukoz ve $(NH_4)_2HPO_4$ derişiminin değişimi ile değişimi
- Çizelge 7. Tasarlanan primerlerin özellikleri: *E.coli*
- Çizelge 8. *bal* gen derişiminin artırılması için PCR parametreleri ve karışım oranları
- Çizelge 9. *bal* geni ve pPICZaA için *EcoRI* restriksiyon enzim ile kesim reaksiyon bileşenleri
- Çizelge 10. *bal* geni ve pPICZaA için *XbaI* restriksiyon enzim ile kesim reaksiyonun bileşenleri
- Çizelge 11. pPICZaA::*bal* için 1/3 oranındaki ligasyon reaksiyon koşulları
- Çizelge 12. Olası rekombinant pPICZaA vektörünün *EcoRI*, *XbaI* and *PstI* restriksiyon enzimleri ile kesilme reaksiyonunun bileşenleri
- Çizelge 13. Primerler ve beklenen PCR ürünleri baz uzunlukları
- Çizelge 14. pPICZaA::*bal* plazmidinin lineerizasyonu için *SacI* restriksiyon enzimi ile kesim reaksiyon bileşenleri
- Çizelge 15. Rekombinant *P.pastoris* için katı çoğalma ortamı
- Çizelge 16. Rekombinant *P.pastoris* için ön-sıvı çoğalma ortamı (BMGY).
- Çizelge 17. BAL üretimi için rekombinant *P.pastoris* kompleks üretim ortamı (BMMY)
- Çizelge 18. FPLC analizi için standart proteinlerin moleküler büyüklükleri ve elüsyon zamanları
- Çizelge 19. Benzoin kondensasyon reaksiyon girdileri
- Çizelge 20. Rekombinant *E.coli* için katı çoğalma ortamı
- Çizelge 21. Rekombinant *E.coli* için ön-sıvı çoğalma ortamı
- Çizelge 22. BAL üretimi için rekombinant *E.coli* üretim ortamı
- Çizelge 23. Oksijen aktarım koşulları ve kısaltmaları
- Çizelge 24. Organik asit derişimlerinin kalma süresi ve oksijen aktarım koşulu ile değişimi
- Çizelge 25. Oksijen aktarım karakteristiklerinin kalma süresi ile değişimi
- Çizelge 26. Kompleks ortam bileşimi
- Çizelge 27. Biyoreaktör deney koşulları ve kısaltmalar

Simgeler

C_{AA}	Toplam amino asit derişimi, kg m^{-3}
C_G	Glukoz derişimi, kgm^{-3}
C_{O_2}	Çözünmüş oksijen derişimi, mol m^{-3}
$C_{O_2}^*$	Oksijen doygunluk derişimi, mol m^{-3}
C_{OA}	Toplam organik asit derişimi, kg m^{-3}
C_x	Hücre derişimi, kg m^{-3}
G/V	Gen/vektör oranı
K_{La}	Sıvı faz hacimsel kütle aktarım katsayısı, s^{-1}
N	Karıştırma hızı, dk^{-1}
pH_0	Başlangıç pH değeri
PCR	Polimeraz zincir tepkimesi
$-r_O$	Oksijen tüketim hızı: (OUR), $-r_O$, $\text{mol/m}^3 \text{s}$
r_p	L-fenilalanin üretim hızı, $\text{kg/m}^3 \text{st}$
r_x	Hücre çoğalma hızı, $\text{kg/m}^3 \text{st}$
t	Kalma süresi, s veya st
T	Sıcaklık, $^{\circ}\text{C}$
Q_0/V_R	Birim hacime gönderilen gaz hızı, hacim/hacim dk (vvm)

Özet

Benzoinin açıl bağının kırılması ve oluşması tepkimesini dönüşümlü olarak katalizleyerek aril aldehytlerin ve açılöinlerin sentezinde katalizör olarak kullanılma potansiyeline sahip benzaldehyt liyaz (BAL, EC. 4.1.2.38) enzim üretimi için rekombinant mikroorganizma ile biyoproses geliştirilmesi araştırma projesinin temel amacıdır. Beş alt-programdan oluşan araştırma programının ilk programında yapılan metabolik mühendislik tasarımları ile, *E. coli* BL21 (DE3) pLySs ile hücre içi, *Bacillus* türleriyle ve *P.pastoris* ile hücre dışı rekombinant benzaldehyt liyaz üreten mikroorganizmalar geliştirilmiş; ikinci alt-program ile mikroorganizmaların üretim kapasiteleri kıyaslanmıştır. pRSETA::*bal* taşıyan *E. coli* BL21 (DE3) pLyS ile en yüksek BAL aktivitesi elde edilmiştir. Araştırmanın üçüncü alt-programında laboratuvar ölçekte bulunan en uygun koşullarda, $V_R=1.65 \text{ dm}^3$ hacimli, mekanik karıştırıcı, pH, sıcaklık, çözünmüş oksijen ve karıştırma hızı kontrollü pilot-ölçek kesikli biyoreaktörlerde $Q_O/V_R = 0.5$ vvm hava giriş hızında, $N= 250, 500, 625, \text{ and } 750 \text{ dk}^{-1}$ karıştırma hızlarında ve çözünmüş oksijen $DO= 20\%, 40\%$ koşullarında oksijen aktarım etkileri yan ürün dağılımları ile birlikte incelenmiş, oksijen aktarımı ve biyoproses karakteristikleri belirlenmiştir. En yüksek hücre derişimi ve benzaldehyt liyaz üretimi $C_{\text{Glukoz}} = 8.0 \text{ kg m}^{-3}$; $pH_c=7.2$ ve $DO=40\%$ 'da sırasıyla 3.0 kg m^{-3} ve $A=1095 \text{ U cm}^{-3}$ olarak bulunmuştur. Dördüncü alt-programda, benzaldehyde liyaz üretimi için melas temelli kompleks ortam tasarlanmıştır. En yüksek hücre derişimi ve benzaldehyt liyaz aktivitesi $C_{\text{Glukoz}}=7.5 \text{ kg m}^{-3}$ ve $C_{\text{Fruktoz}}=7.5 \text{ kg m}^{-3}$ derişimlerinde sırasıyla 5.3 kg m^{-3} ve 1617 U cm^{-3} olarak bulunmuştur. Beşinci alt-program ile yüksek hücre derişimi ve BAL üretimine ulaşabilmek için besleme stratejileri geliştirilmiştir. Optimum koşullarda, kesikli biyoreaktör işletiminde $t=10 \text{ st}$ 'te hava giriş hızının minimuma indiği gözlenmiştir. Bu durum ortamdaki karbon kaynağının bittiğini gösterdiği varsayıldığı için birinci stratejide glukoz ve fruktozun hava giriş hızı minimuma indiğinde 2.5 kg m^{-3} e çıkması sağlanmıştır. Bu strateji proses süresince tekrarlanmıştır. En yüksek hücre derişimi $t=24 \text{ st}$ 'te $C_X=7.4 \text{ kg m}^{-3}$, en yüksek BAL aktivitesi ise $t=20 \text{ st}$ 'te $A=2360 \text{ U cm}^{-3}$ olarak elde edilmiştir. Ancak hava giriş hızının değişimine bağlı geliştirilen strateji yalnızca glukozun tüketildiğini gösterdiği bulunmuş ve, glukoz ve fruktoz derişimi proses süresince izlenerek yeni bir strateji geliştirilmiştir. Yeni stratejide glukoz ve fruktoz tüketildiğinde derişimleri üretim ortamında 2.5 kg m^{-3} e çıkarılmış; en yüksek BAL aktivitesi $t=26 \text{ st}$ 'te $A=2370 \text{ U cm}^{-3}$ olarak bulunmuştur. Bu noktadaki hücre derişimi ise $C_X=7.5 \text{ kg m}^{-3}$ tür. Asetik asit birikimini azaltmak için yapılan beslemeler ile glukoz ve fruktoz derişimi 1.5 kg m^{-3} e düşürülmüştür. Bu son strateji ile $t= 24 \text{ st}$ 'te en yüksek BAL aktivitesi ve hücre derişimi sırasıyla $A=2315 \text{ U cm}^{-3}$ ve $C_X=8.04 \text{ kg m}^{-3}$ olarak bulunmuştur. İncelenen stratejilerin hepsinde aktiviteler yaklaşık aynı olmasına rağmen son koşulda en yüksek hücre derişimine en az girdi kullanılarak ulaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler : Benzaldehyt liyaz, reaksiyon mühendisliği, metabolik mühendislik, rekombinant, biyoreaktör, oksijen aktarımı, besleme stratejisi

Abstract

In this project microorganism and bioprocess was developed for the production of benzaldehyde lyase (BAL, EC 4.1.2.38), a thiamine pyrophosphate (TPP) dependent enzyme, catalyzes the cleavage of the acyloin linkage of benzoin to form two molecules of benzaldehyde; which is also used for the synthesis of enantiopure α -hydroxy ketones, an important class of compounds in natural product and drug synthesis. In this first research programme, *bal* gene was cloned into *E. coli* BL21 (DE3) pLysS for intracellular production and thereafter cloned into *Bacillus* species and *P.pastoris* for the extracellular production. In the second research programme, production capacity of the developed recombinant microorganisms were compared, and the highest BAL production was obtained with pRSETA::*bal* carrying *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. Thus, in the third research programme, the effects of oxygen transfer together with the mass transfer coefficient and volumetric oxygen transfer rate were investigated using pRSETA::*bal* carrying *E. coli* BL21 (DE3) pLysS, in the pilot scale batch bioreactors at $Q_O/V_R = 0.5$ vvm and agitation rates of $N = 250, 500, 625, \text{ and } 750 \text{ min}^{-1}$, and dissolved oxygen levels $DO = 20\%, 40\%$ conditions, in glucose based defined medium. The highest cell concentration and benzaldehyde lyase activity were obtained at $DO = 40\%$ condition as 3.0 kg m^{-3} and $A = 1095 \text{ U cm}^{-3}$, respectively. In the fourth research programme, molasses based complex medium was designed and the highest cell concentration and benzaldehyde lyase activity were obtained as $C_X = 5.3 \text{ kg m}^{-3}$ and $A = 1617 \text{ U cm}^{-3}$, respectively, in the medium containing 7.5 kg m^{-3} glucose and 7.5 kg m^{-3} fructose. In the fifth research programme, feeding strategy was developed. As after 10 hours of batch-cultivation with molasses based medium having 7.5 kg m^{-3} glucose and 7.5 kg m^{-3} fructose concentration, based on the airflow rate, pretreated molasses was fed to the system. When air flow rate decreased considerably, fed was given to the system that results in increase in glucose and fructose concentration in the medium to 2.5 kg m^{-3} . At the end of the process, the highest cell concentration obtained was $C_X = 7.4 \text{ kg m}^{-3}$. The maximum activity was reached at 20th hour as $A = 2360 \text{ U cm}^{-3}$. On the other hand, as air flow variation only demonstrated the absence of glucose not fructose, a second strategy, based on the detection of the fructose and glucose concentrations during the process, was applied. In this strategy when glucose and fructose were depleted, fed was given to the system that results in increase in glucose and fructose concentration in the medium to 2.5 kg m^{-3} ; and the highest BAL activity was obtained as 2370 U cm^{-3} at $t = 26 \text{ h}$ where the cell concentration was 7.5 kg m^{-3} . At the last strategy, when glucose and fructose were depleted, fed was given to the system that results in increase in $C_{\text{Glucose}} = 1.5 \text{ kg m}^{-3}$ and $C_{\text{Fructose}} = 1.5 \text{ kg m}^{-3}$ in the production medium to decrease the accumulation of acetic acid. By this strategy the highest cell concentration was obtained as 8.04 kg m^{-3} at $t = 24 \text{ h}$ and the highest BAL activity was 2315 U cm^{-3} . These strategies could be accepted having the same BAL activity with little distinctions. However, cell concentration of the last one was higher than others and also the lowest amount of carbon source was used. Thus, last one could be chosen as the most favorable strategy.

Key Words: Benzaldehyde lyase, reaction engineering, metabolic engineering, recombinant, bioreactor, oxygen transfer, complex medium, feeding strategy.

1 GİRİŞ

Biyoteknolojik ürünler üretiminde -sırayla- ABD, Japonya, başta AB ülkeleri Almanya, Hollanda, Fransa, İngiltere, Danimarka, İsveç, İsviçre, İtalya olmak üzere Avrupa ülkelerinin bir kısmı -üniversitelerde yaptıkları temel ve kuruluşların araştırma merkezlerinde yapılan uygulamalı araştırmalarla- buluşları zamanında endüstriye aktararak, biyoteknolojik ürünlerin satışı ile 1990 Yılında yaklaşık \$10Milyar değerinde bir ticaret büyüklüğü elde etmişlerdir. *Endüstriyel yeni kimyasal maddeler* sektörlerinde Japonya, *endüstriyel enzimler* sektöründe de AB Dünya liderleridir. Türkiye *klasik fermentasyon ürünleri* sektöründe maya üretimi ve ihracı ile Fransa 'dan sonra Dünya ikincisidir. Gelecek on yılda biyoteknolojik ürünlerin ve biyoteknolojinin Sağlık ve Endüstriyel Yeni Kimyasal Maddeler Sektörlerine etkisi sırasıyla çok büyük ve büyük olarak öngörülmektedir.

Enzimler amino asitlerin peptit bağları ile bağlanması sonucu oluşan ve biyokimyasal tepkimeleri katalizleyen protein yapısındaki biyopolimerlerdir. Mikrobiyal hücre, hayvan ve bitki dokularından üretilebilen enzimlerin endüstride farmasötik, gıda, deri, tekstil ve deterjan sanayilerinde kullanımı gereklidir. Farmasötik ürünler endüstrisinde kiral izomerin türü molekülün işlevi açısından özgün olduğundan, izomerik karışım halinde ise diğer izomerin işlevinin farklı olması gerektiğinden, kiral moleküllerin üretiminde tek izomerlerinin elde edilmesi farmasötik aktif moleküllerin üretiminde önemli araştırma uygulama alanıdır. Benzaldehit liyaz (BAL, EC. 4.1.2.38) enzimi, benzoinin açıl bağının kırılması ve oluşması tepkimesini dönüşümlü olarak katalizleyerek aril aldehitlerin ve açiloinlerin sentezinde katalizör olarak kullanılma potansiyeline sahiptir. Bağ kırılma reaksiyonunda, benzaldehit liyaz enzimi yalnız R-konfigürasyonundaki benzoin molekülünü katalizleyerek tepkimeyi oluşturmakta; S-konfigürasyonundaki benzoin ise tepkimeye girmemekte; açiloin reaksiyonunda da sadece R-benzoin oluşmaktadır. Bu katalizör özelliğiyle benzaldehit liyaz enzimi kiral madde sentezi için potansiyel enzimdir; üretimi bu nedenle önemlidir.

Gonzales ve Vicuna (1989), BAL enzimini üreten *Pseudomonas fluorescens Biovar I¹* izole etmişler, Hinrichsen vd., (1994) *bal* pUC18 plasmidine klonlamış ve *Escherichia coli* HB101'e transfer etmişlerdir. Pohl vd., (2002) BAL enzimi gen dizinini modifiye etmiş ve proteinin C-ucunu 6xhis ekleyerek modifiye pUC18::*bal* plasmidini geliştirmişlerdir; ve geliştirdikleri BAL enzimini biyo-organik tepkimede katalizör olarak kullanılmışlardır (Demir vd., 2001, 2002, 2003, 2004; Dünkeltmann vd., 2002; Sanchez vd., 2003).

Mosbacher vd (2005), enzimin X-ray difraksiyon analizi ile yapısını incelemiş ve yapının homo-tetramer olduğunu bildirmişlerdir. Janzen vd., (2006) BAL enziminin karalığını araştırmış ve enzimin pH=8'de en yüksek aktiviteyi gösterdiğini bildirmişlerdir.

Bu çerçevede, "**Metabolik+Genetik+Biyokimyasal Reaksiyon Mühendisliği Prensipleriyle Rekombinant Enzim Üretimi**" konulu TÜBİTAK projesi beş temel araştırma programından oluşmaktadır.

1. Araştırma Programı: *Metabolik mühendislik araştırma programı*

Bu araştırma programının amacı, rekombinant BAL üretimi için en uygun konak hücrenin ve ekspresyon sisteminin tasarlanmasıdır.

2. Araştırma Programı: *Tasarlanan ve geliştirilen üç rekombinant mikroorganizmanın (E.coli, Bacillus sp. ve Pichia pastoris) BAL üretim performanslarının kıyaslanması*

Rekombinant hücreler kullanılarak laboratuvar ölçek biyoreaktörlerde tanımlanmış üretim ortamında mikroorganizmaların BAL üretim performanslarının karşılaştırılmasıdır.

3. Araştırma Programı: *BAL üretimine oksijen aktarımı etkilerinin incelenmesi*

Üretim performansı en yüksek rekombinant *E.coli* ile BAL üretimine oksijen aktarım etkilerinin pilot-ölçek biyoreaktörlerde, araştırılması, BAL ve yan-ürünlerin üretimine oksijen aktarım etkileri incelenerek biyoproses ve oksijen aktarım karakteristiklerinin belirlenmesidir.

4. Araştırma Programı: *Kompleks ortam tasarımı*

BAL üretiminin artırılması için kompleks ortam tasarlanmasıdır.

5. Araştırma Programı: *Besleme stratejisi geliştirilmesidir.*

BAL üretiminin artırılması için yarı-kesikli besleme stratejinin belirlenmesidir.

2 GENEL BİLGİLER

2.1. Biyoteknolojik Ürün ve Proses ile İlgili Temel Bilgiler

2.1.1. Enzimler ve biyokimyası

Biyolojik sistemlerin katalizörleri olan enzimler protein yapısındadırlar. Protein molekülleri, amino asitlerin birbirlerine kovalent bağlarla bağlanmasıyla oluşurlar. Bir α -amino asit, karbon atomuna bağlı bir amino grubuna, bir karboksil grubuna, bir hidrojen atomuna ve amino asiti simgeleyen hidrofilik veya hidrofobik; asitik, nötral veya bazik; alifatik veya aromatik bir R grubuna sahiptir. R gruplarının etkisiyle özellikleri farklılaşan amino asitler değişik gruplamalarla sınıflandırılmaktadırlar. Enzimlerin ve proteinlerin yapısı ve fonksiyonları açısından R gruplarının polaritelerine dayanan sınıflandırma en önemlisidir. Buna göre amino asitler dört ana gruba ayrılırlar:

- a. Polar olmayan (nonpolar) veya hidrofobik R grubuna sahip amino asitler,
- b. Nötral (yüksüz) polar R grubuna sahip amino asitler,
- c. Pozitif yüklü (bazik) R grubuna sahip amino asitler,
- ç. Negatif yüklü (asitik) R grubuna sahip amino asitler.

2.1.2. Enzimlerin yapıları

Atomların, "protein yapısını" oluşturan üç boyutlu özel düzenlerine "protein konformasyonu" adı verilir. Bir protein, polipeptit zincirindeki peptit bağları ve grupları arasındaki kovalent olmayan etkileşimler ile üç boyutlu özel yapıya sahip olur. Protein yapısı, kovalent olarak bağlanmamış atomlar arasındaki zayıf molekül içi kuvvetlerle yönlendirilirler. Kovalent olmayan bu etkileşimler hidrojen bağları, hidrofobik bağlar, van der Waals kuvvetleri, disülfid bağları ve elektrostatik etkileşimlerdir (Lehninger vd. 1993). Protein yapısı genellikle polipeptit zincirinin - termodinamik açıdan Gibbs serbest enerjisinin en düşük değeri olarak- en kararlı olduğu düzende oluşur (Stryer 1995).

Doğal durumlarına göre protein molekülleri üç boyutlu karakteristik yapıya sahiptir ve özgül yapılarına (konformasyon) göre de sınıflandırılır. Yapılarına göre proteinler ipliksi ve küresel olmak üzere iki gruba ayrılırlar. İpliksi proteinler, bir eksen boyunca paralel yerleşmiş uzun iplik veya şerit şeklindeki polipeptit zincirlerinden oluşur. İpliksi proteinler, fiziksel olarak sağlamdır; su veya tuzlu suda çözünmezler. İpliksi proteinler yüksek organizmaların özellikle bağlantı dokularında temel yapı elemanlarıdır. Elastik bağlantı dokularındaki elastin, tendon ve kemik

dokusu üzerindeki kollagen; saçta, tırnakta, deride bulunan α -keratin ipliksi proteinlere örneklerdir. Küresel proteinlerde ise polipeptit zincirleri küre şeklinde sıkı olarak sarılmışlardır. Küresel proteinlerin çoğu suda çözünür; hücre içinde genellikle hareketli veya dinamik işleve sahiptirler. Enzimlerin hemen tümü, hormonların bir kısmı, antikorlar, serum albumin ve hemoglobin gibi taşınım işlevi olan proteinler küresel proteinlerdir.

Proteinlerin yapısal özelliklerini açıklamak için özgün terimler kullanılır. Protein moleküllerinin birincil (primer) yapısı, polipeptit zincirin kovalent bağlarla amino asitlerden oluşan biyopolimerik omurgasını yani amino asit dizinini belirler. Protein moleküllerinin ikincil (sekonder) yapısı, oluşan polipeptit zincirinin düzenli, *tek-boyutta* kovalent olmayan etkileşimlerle sarılarak kıvrılmasıyla oluşur. Protein moleküllerinin üçüncül (tersiyer) yapısı, uzun polipeptit zincirinin -yine kovalent olmayan etkileşimlerle- *üç-boyutta*, birbiri üzerine kıvrılıp, katlanmasıyla meydana gelir; böylece küresel proteinlerin küresel yapısı ortaya çıkar. Protein moleküllerinin dördüncül (kuaterner) yapısı, iki veya daha fazla zincir içeren bir proteinin bireysel polipeptit zincirlerinin birbirleriyle etkileşim içinde düzenini belirtir. Dördüncül yapı özellikle enzim görevindeki proteinlerinde önem taşımakta ve enzim aktivitesi üzerinde etkin olmaktadır (Lehninger 1976, Branden ve Tooze 1991).

Molekül içi kuvvetlerin oluşturduğu etkileşimler, proteinlerin bütünlüğü ve kararlılığı açısından çok önemlidir. Enzim moleküllerinin çevrelerindeki herhangi bir değişiklik enzimin yapısındaki ve kararlılığındaki dengeyi tayin eder. Bir başka deyişle kararlı veya bozunmuş olmasını sağlar. Enzim yapısı ve kararlılığı:

- Fiziksel Bileşiklerden (yüksek ve düşük sıcaklıklar, mekanik kuvvetler, ve radyasyon)
- Kimyasal Bileşiklerden (asitler ve bazlar, organik hidrojen bağ yapıcılar, nötral tuzlar, organik çözücüler, yüzey aktif maddeler, oksidantlar, ağır metaller ve şelat bileşikler), ve
- Biyolojik Bileşiklerden (proteolitik enzimler ve proteolitik aktivitesi olan mikroorganizmalardan, etkilenir.

2.1.3. Enzimlerin sınıflandırılması

Uluslararası Enzim Komisyonu (International Enzyme Commission: IEC, 1955) enzimleri işlevlerine göre sınıflamak için sistematik bir yöntem geliştirmiş; enzimler altı ana gruba ayrılmıştır. Enzim numaralamasında -EC 'den sonra- ilk rakam

katalizledikleri tepkime türünü gösteren ana enzim grubunu; ikinci rakam katalizlenen grubu gösteren alt grubu; üçüncü rakam bir alt grubu göstermekte ve dördüncü rakam grubu ise bu grup enzimler arasındaki özgül numarasını göstermektedir. Benzaldehit liyaz enzimi (EC 4.1.2.38):

EC 4. Liyaz

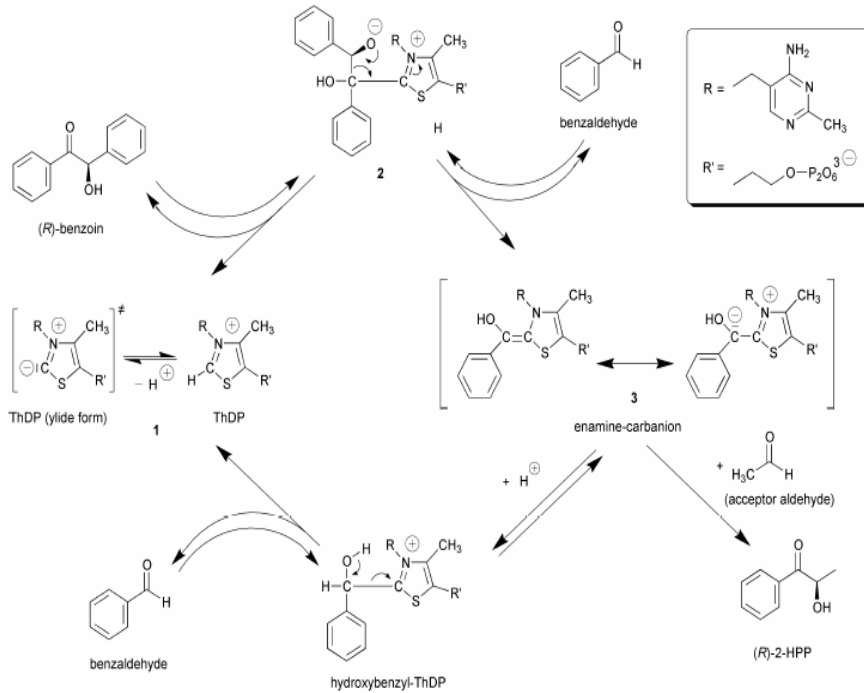
EC 4.1. Karbon-karbon bağı üzerine etkili

EC 4.1.2. Aldehit liyazı

EC 4.1.2.38. Benzoin'deki karbon-karbon bağı tanımlanmaktadır.

2.2 Benzaldehit liyaz

Benzaldehit liyaz (BAL, EC 4.1.2.38) enzimi, benzoinin açıl bağına kırılması ve oluşması tepkimesini dönüştürücü olarak katalizleyerek aril aldehitlerin ve açılollerin sentezinde katalizör olarak kullanılmaya potansiyeline sahiptir. Bağ kırılma reaksiyonunda, benzaldehit liyaz enzimi yalnız R-konfigürasyonundaki benzoin molekülünü katalizleyerek tepkimeyi oluşturmaktadır; S-konfigürasyonundaki benzoin ise tepkimeye girmemekte; açılollerin reaksiyonunda da sadece R-benzoin oluşmaktadır. BAL'ın katalitik mekanizması aşağıda gösterilmiştir:



2.3. Biyoteknolojik Proseslerde Üretimi Etkileyen Biyoproses Parametreleri

C kaynağı, N kaynağı, P kaynağı, inorganik tuzlar, vitaminler girdi olarak kullanılarak, mikrobiyal, bitki doku veya hayvan doku hücrelerinin, enzimlerin veya biyolojik sistemlerin kullanılmasıyla -biyokimyasal bir tepkime yoluyla- üretilen ürünlere *biyoteknolojik ürünler* ; bu ürünlerin (antibiyotikler, farmasötik proteinler, amino asitler, organik asitler, enzimler) elde edildiği ve çeşitli ayırma işlemleri ile istenen niteliğe getirildiği proseslere de *biyoteknolojik prosesler* denir. Biyoteknolojik proseslerle üretim 20.Yüzyılın ikinci yarısında özellikle son yirmi yılda -önem sırasına göre- farmasötik temel maddeler, biyokimyasal temel maddeler, enzimler, klasik fermentasyon ürünleri yanında hayvancılık-ormancılık-tarım sektörleri için biyoteknolojik ürünler üretim sektörlerinin hızlı ve büyük gelişimini sağlamıştır. Düşük basınçta ve düşük sıcaklıklarda çalışılması ile işletme maliyetinin düşük olması, küçük ölçekte yüksek birim fiyatlı ürünlerin üretilebilmesi, iyi tasarlanmış mikro ve küçük ölçekli üretim sistemlerinde araştırma-geliştirme (A+G) desteği ile çok sayıda ürün üretilebilmesi kimya sanayinin biyoteknolojik ürünler üretim sektörlerine büyük önem kazandırmaktadır.

Biyoteknolojik proseslerde üretimi etkileyen biyoproses ve biyoreaktör parametreleri :

1. Mikroorganizma
2. Ortam tasarımı
3. Biyoreaktör işletim türü ve hidrodinamiği
4. Biyoreaktör işletim parametreleri
 - a) Oksijen aktarımı ve stratejisi
 - * Havalandırma hızı, (Q_0/V)
 - * Karıştırma hızı, (N)
 - b) Hidrojen iyonu derişimi (pH), ve sıcaklıktır.

2.3.3. Biyoreaktör işletim türü ve hidrodinamiği

Biyoreaktör işletim türü;

- a) Kesikli veya yarıkesikli işletim
 - b) Sürekli işletim
 - c) Periyodik pulse (fed batch) beslemeli işletim
- şeklinde sınıflandırılabilir.

Sıvı faza göre kesikli, oksijene göre yarıkesikli olan işletimler, küçük ve orta kapasiteli üretim proseslerinde kullanılırlar.

3 GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Mikroorganizmalar

Aşağıda tür adları ve numaraları verilen mikroorganizmalar United States Department of Agriculture Northern Regional Research Laboratory (NRRL, ABD), American Type Culture Collection (ATCC, ABD), Deutsche Sammlung Von Mikroorgaismen Und Zellkulturen GmbH (DSM, Almanya)'dan, ve *Bacillus* Genetic Stock Center (BGSC Ohio State University, ABD) dondurularak-kurutulmuş olarak getirilmiş ve -20 °C'da derin-dondurucuda korunmuştur (Çizelge 1).

Çizelge 1. Araştırmada kullanılmış olan mikroorganizma ve plasmidler

Mikroorganizma	Kaynak/Referans
<i>E. coli</i>	
XL1Blue	Bullock et. al. (1987)
JM109	Yanisch-Peron et. al. (1985)
K12	ATTC 10798
BL21 (DE3) pLySs	Invitrogen Life Technologies (USA)
<i>B. licheniformis</i>	DSM 1969; Çalık et. al. (2003-b)
<i>B. brevis</i>	NRRL NRS 604
<i>B. firmus</i>	NRRL B1107
<i>B. sphaericus</i>	NRRL NRS 732
<i>B. subtilis</i>	
1A751	BGSC
1S19	BGSC
WB600	Wu et. al. ,1991
WB700	Ye et. al., 1999
<i>P. pastoris</i> X-33	Invitrogen Life Technologies (USA)
Plasmid	Kaynak/Referans
pUC18:: <i>bal</i>	Çalık et. al., 2004
pRSETA	Invitrogen Life Technologies (USA)
pUC19	Yanisch-Peron et. al. (1985)
pRB374	Brücknet et. al., 1991
pRSETA:: <i>bal</i>	Bu çalışmada
pUC19:: <i>hybrid</i>	Bu çalışmada
pRB374:: <i>hybrid</i>	Bu çalışmada
pPICZaA:: <i>bal</i>	Bu çalışmada

E.coli hücreleri Çizelge 2'de bileşimi verilen katı ortamlara öze ile steril koşullarda aktarıldıktan sonra 37°C 'da 12 saat inkübatörde çoğaltılmıştır. Mikroorganizmaların yaşlanmalarını ve zamanla aktivitelerini kaybetmelerini önlemek için katı ortamda çoğaltılmış aktif mikroorganizmalar mikrobanka aktarılarak -20°C 'da saklanmıştır.

Çizelge 2. *E.coli* için katı ortam bileşimi

Bileşen	Derişim, kg m ⁻³
Soytripton	10.0
Maya Özüdü	5.0
NaCl	10.0
Agar	15.0
pH	7.5

Katı ortamda çoğalan mikroorganizmalar, Çizelge 2'de verilen ortamdan agar çıkarılarak hazırlanan sıvı ortamda 12 st 37°C 'da 12 saat inkübatörde çoğaltılmıştır.

3.2 Rekombinant *E.coli*, *Bacillus* ve *P.pastoris* Türleri Geliştirmede Kullanılan Genetik Mühendisliğı Teknikleri

BAL üretimi için biyoproses geliştirilmesi için kullanılan genetik mühendisliğı teknikleriyle aşağıda verilmiştir. Çizelge 3'de mikroorganizmalarda plasmid stabilitesi için kullanılan antibiyotikler ve derişimleri verilmiştir.

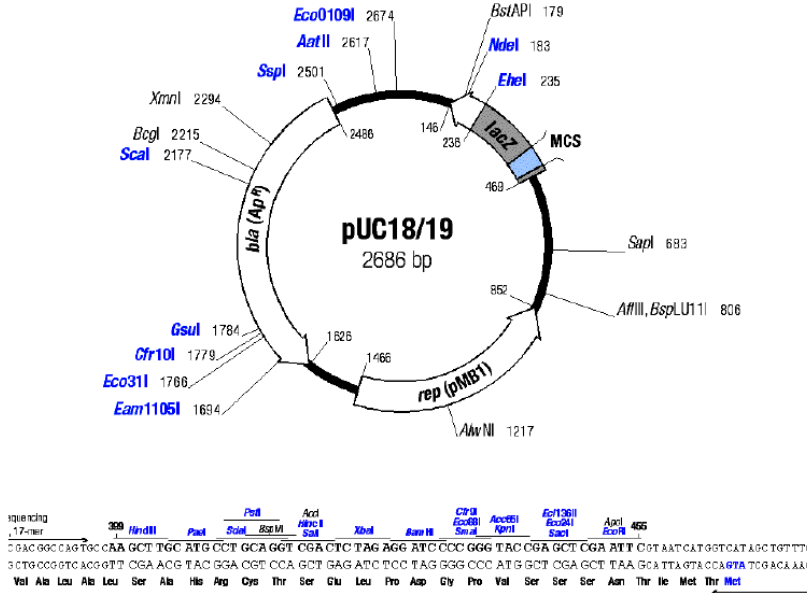
Çizelge 3. Plasmid stabilitesi için kullanılan antibiyotikler ve derişimleri

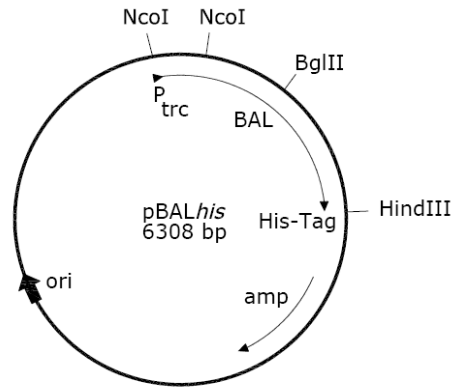
Antibiyotik	Derişim, kg m ⁻³
Kanamaysin	0.010
Ampisilin	0.100
Kloramfenikol	0.035
Eritromisin	0.005
Linkomisin	0.005
Zeosin (<i>E.coli</i> pPICZαA:: <i>bal</i> için)	0.025
Zeosin for (<i>P.pastoris</i> pPICZαA:: <i>bal</i>)	0.100

Kullanılan bakteriler, çoğalma ortamı ve plasmidler

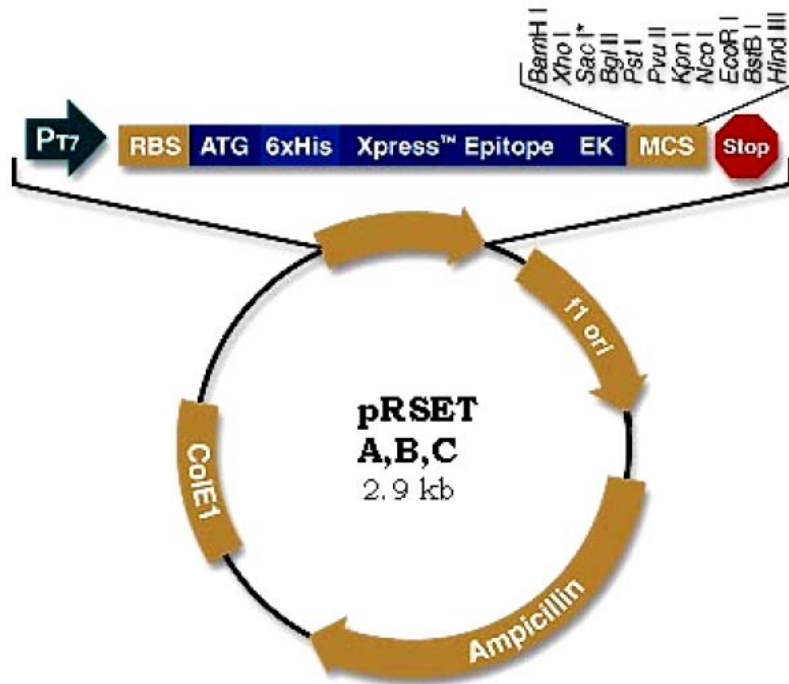
- a. *E.coli* ile BAL üretimi için mikroorganizma geliştirme araştırmalarında, PCR ile *bal* geni çoğaltılırken bal proteinini afinite saflaştırma yöntemiyle saflaştırmak üzere proteinin C-terminaline gelecek şekilde poli-histidine tag konumu eklenmiştir.
- a. PCR'a dayanan SOE yönteminde tasarlanan primerler yardımıyla önce ayrı-ayrı çoğaltılacak *pre(subC)* dizini ve BAL mature peptid dizini için kalıp DNA olarak, SAP üretme potansiyeli olan *Bacillus* türü mikroorganizmanın kromozomal DNA'sı ve *bal* genini kodlayan DNA'yı taşıyan plasmid DNA kullanılacaktır. Bu amaç doğrultusunda *B.licheniformis* (DSM 1969) SAP geni ve *bal* geni için de *E.coli* XL1-Blue pUC18::*bal* plasmidi için kaynak mikroorganizmalar olarak kullanılmıştır.
- c. *P.pastoris* ile BAL üretimi için mikroorganizma geliştirme araştırmalarında, PCR ile *bal* geni çoğaltılırken bal proteinini afinite saflaştırma yöntemiyle saflaştırmak üzere proteinin N-terminaline gelecek şekilde poli-histidine tag konumu eklenmiştir.

Klonlamalarda kullanılan plasmidler Şekil 1'de verilmiştir.

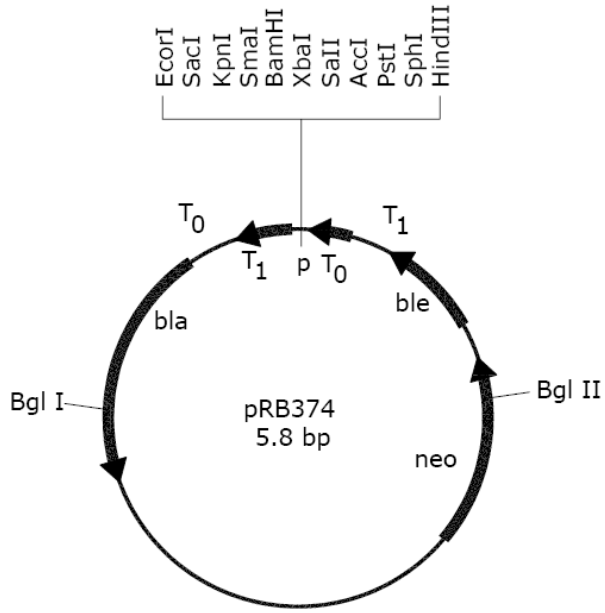




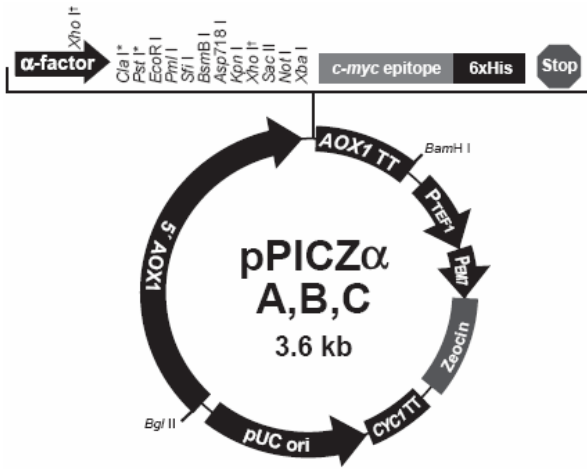
Şekil 1b. pUC18::*bal* plasmidi



Şekil 1c. pRSET plasmidi



Şekil 1d. pRB374 plasmidi



Şekil 1e. pPICZα plasmidi

3.2.1. Kromozomal DNA izolasyonu

Kromozomal DNA'nın *Bacillus* türlerinden izolasyonu için aşağıdaki yöntem uygulanmıştır:

1. Katı ortamdaki 30 ml hacimli LB ortamına (EK 1) aktarılan hücreler 30°C 'da 12 st (bir gece) çoğaltılmıştır.
2. Hücrelerin çoğaldıkları ortam 3000 g 'de 10 dk santrifüjlenmiş, sıvı alındıktan sonra hücreler 5 ml SET tamponu (EK 1) içinde tekrar süspansiyon haline getirilmiştir.
3. Son derişimi 1 mg/ml olacak şekilde ortama lizozim enzimi eklenmiş ve 37°C 'da 60 dk süreyle tepkime gerçekleştirilerek hücre duvarı parçalanmıştır.
4. 1/10 hacim oranında ortama %10 'luk SDS eklenmiş ve hemen ardından derişimi 0.5 mg/ml olacak şekilde proteinaz-K eklenmiş ve iki saat süreyle -arasıra çalkalayarak- 4°C 'da tepkime gerçekleştirilmiştir.
5. Çözelti hacminin 1/3'ü kadar 5M NaCl; sonra çözelti hacmi kadar kloroform eklenmiş ve tepkime oda sıcaklığında 30 dk süreyle karıştırılarak gerçekleştirilmiştir.
6. İki fazlı karışım 4500g 'de 15dk santrifüjlenmiş ve sulu faz Pasteur pipetiyle tüpe alınmıştır.
7. Sulu fazdaki kromozomal DNA üzerine hacmi kadar izopropanol eklenmiş; süspansiyon 4500g 'de 15dk santrifüjlenmiştir. DNA %70 'lik EtOH ile yıkanmış ve vakum altında kurutulmuştur. DNA uygun miktarda TE tamponu (EK 1) içinde çözülmüş ve -20°C 'da saklanmıştır (Posprech ve Neumann 1995) .

3.2.2 DNA derişiminin belirlenmesi

DNA moleküllerinin ayrılmasında jel elektroforez, jel oluşturma maddesi olarak agaroz; jel çözeltisi olarak da TBE tamponu (EK 1) kullanılmıştır. Agaroz derişimi 1.0-1.7 (a/h) arasında amaca göre değiştirilmiştir. Jel elektroforez cihazının işletim voltajı 100 V 'tur. Bu işlemden sonra jel büyüklüğüne göre 20-50µl EtBr (10mg/ml) ile boyanarak UV ışığı altında fotoğrafı çekilmiş ve işaretleyiciden yararlanılarak her bandın derişimi hesaplanmıştır. Plasmid DNA derişimi izolasyonundan sonra 260nm dalga boyunda UV-spektrofotometre ile ölçülmüştür.

3.2.3 PCR cihazıyla gen derişimlerinin artırılması

Polimeraz zincir tepkimeleriyle (PCR) termal-döngü cihazında gen derişiminin artırılabilmesi için ilk olarak gerekli primer tasarımları yapılmıştır ve bilgisayar programı NAR ile primerlerin yapıları kontrol edilmiştir. hGH'nun hücre dışı üretimi için rekombinant *Bacillus* geliştirilmesi amacıyla hücre içinde üretilen hGH'nun hücre dışına aktarılmasını sağlayacak *Bacillus* hücre dışı enzimlerinden serin alkali proteaz geninin *-pre* dizini için iki ve *hGH* gen dizini için de iki primer tasarlanmıştır. Primerlerin tasarımında, *pre-pro(subC)* ve *pre(subC)* dizininin ileri primerlerine *XbaI*, *hGH* gen dizininin geri primerine *BamHI* restriksiyon konumları plasmide klonlanabilmesi için eklenmiştir.

3.2.4 Ligasyon tepkimesiyle klonlama

Ligasyon tepkimelerinde **yapışkan uçlu (sticky end) DNA** parçası -gen (insert)- ve vektör kullanıldığında **gen (insert)/vektör molar oranının 3** olması; **küt uçlu (blunt end)** insert ve vektör kullanıldığında **gen (insert)/vektör molar oranının 5-10** kullanılması uygundur. Ligasyon tepkimeleri aşağıdaki verilen koşullarda gerçekleştirilmiştir:

Gen (Insert) DNA	~60-200 ng
Vektör DNA	~10-60 ng
Ligasyon tamponu (ATP içeren)	2µl
T4 DNA ligaz	0.5-2U
dH2O	Gen + vektör sulu çözeltisi $V_R = 20 \mu\text{l}$ 'ye tamamlanır.
Mikroreaktör hacmi	$V_R = 20 \mu\text{l}$
Mikroreaktör sıcaklığı	$T = 15^\circ\text{C}$
Kalma süresi	$t = 16 \text{ st}$

3.2.5 DNA dizin analizi

Plasmide klonlana hibrid genin dizin analizi için tasarlanan primerler kullanılmıştır. Klonlamanın doğruluğunu kontrol etmek için elde edilen hibrid genin (*-pre(subC)* + hGH genleri) nükleotit dizini Microsynth GmbH (Balgach, İsviçre) laboratuvarlarında DNA dizin analiz cihazı ile analizlenmiştir.

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

Klonlama işleminden sonra geni taşıyan plasmid DNA *E.coli*'ye CaCl₂ yöntemi ile transfer edilmiştir.

CaCl₂ Yöntemi (Competent cell transformasyonu) :

1. *E.coli* LBA katı ortamında, 37°C de bir gece (~ 12 saat) çoğaltılır.
2. Katı ortamdan 5 ml hacimli LB ortamına aktarılır ve 37°C'da bir gece daha inkübe edilir.
3. LB ortamında çoğaltılan hücrelerden 1 ml alınarak 100 ml'lik yeni LB ortamına aktarılır ve 37°C sıcaklıkta 4 st 250 dk⁻¹'da üstel çoğalma fazı başına kadar tekrar çoğaltılır.
4. Çoğalan hücreler steril, soğuk 100 ml'lik santrifüj tüplerine konulur ve tüpler buz üzerinde 10 dk tutularak 0°C 'a soğutulması sağlanır.
5. Hücreler 4000 g'de, 4°C'da 10 dk santrifüjlenerek çöktürülür.
6. Sıvı kısım atılır; çöken hücreler santrifüj tüpünün kağıt havlu üzerinde ters çevrilerek 1 dk kurutulur.
7. Hücreler 10 ml, 0,1M CaCl₂ ile süspansiyon haline getirilir ve buzda bekletilir.
8. Süspansiyon 4000 g'de, 4°C'da 10 dk santrifüjlenerek hücreler tekrar çöktürülür.
9. Sıvı kısım dökülür ve hücreler santrifüj tüpünün kağıt havlu üzerinde ters çevrilerek 1 dk kurutulur.
10. Çöken hücreler 4 ml, 0,1M CaCl₂ içinde tekrar süspansiyon haline getirilir ve buzda bekletilir.
11. Mikropipetle 200 µl süspansiyon eppendorf tüpüne alınır ve tüpe DNA (10 ml hacminde 50 ng'dan fazla olmayacak şekilde) eklenir, yavaş yavaş aşağı yukarı çevrilerek karıştırılır ve 30 dk buzda bekletilir.
12. Daha sonra tüpler 42°C'daki su banyosuna alınarak 90 saniye bekletilir ve ısı şokuyla plasmid DNA'nın hücreye transferi sağlanır. Bundan sonra tüpler hızlı bir şekilde buz banyosuna alınır ve 1-2 dk hücrelerin çökmesi için beklenir.
13. Her tüpe 800 µl LB çözeltisi eklenir ve 37°C'da, 45 dk su banyosunda inkübe edildikten sonra LBA ve seçici antibiyotiği içeren petri kaplarının her birine uygun hacimde (~250 µl) aktarılır (Sambrook 1995).

3.2.7 *E. coli*'den plasmid DNA izolasyonu

1. 12 st (bir gece) LB ortamında çoğaltılmış hücreler, 12000 g 'de 30 s santrifüjlenmiştir.
2. Berrak kısım atıldıktan sonra hücrelerin üzerine çoğaltılmış hücrelerden 1ml tekrar eklenmiş ve önceki basamaktaki gibi tekrar santrifüjlenmiştir.
3. Berrak kısım tekrar atılmış ve hücreler üzerinde kalan az miktardaki sıvı da mikropipetler yardımıyla alınmış; hücreler buz üzerine yerleştirilmiştir.
4. Hücreler 4°C sıcaklığındaki, 100µl Çözelti I (EK 1) ile tekrar süspansiyon haline getirilmiştir.
5. Üzerine 200 µl yeni hazırlanmış Çözelti II (EK 1) eklenmiş; eppendorf tüpü ara sıra aşağı-yukarı çevrilerek 5 dk karıştırılmıştır.
6. Üzerine 150µl 4°C sıcaklığında Çözelti III (EK 1) eklenmiş ve 5dk buz içerisinde bekletilmiştir.
7. 12000g 'de, 4°C 'da 5 dk santrifüjlenmiş; berrak kısım temiz bir tüpe alınmıştır.
8. Berrak çözelti hacminin 0.1 hacmi kadar 3M NaAc ve 2 katı kadar saf EtOH eklenmiş ve -20°C 'da 10 dk bekletilmiştir.
9. Plasmid DNA 12000 g 'de, 4°C 'da 5 dk santrifüjlenerek çöktürülmüştür.
10. Berrak kısım dökülmüş ve çöken plasmid DNA vakum altında kurutulmuştur.
11. Kuruyan pellet amaca göre ya 100 µl TE tamponu (EK 1) (pH=8) veya dH₂O ile çözülmüş ve -20°C 'da saklanmıştır (Sambrook 1995).

3.2.8 DNA'nın agaroz jelden ekstraksiyonu

Jelde ayrılan gen parçalarından klonlama tepkimesinde kullanılacak olanı UV-ışığı altında jelden kesilerek alınmış ve sonra da Fermentas DNA Ekstraksiyon Kit ile ekstrakte edilmiştir.

3.2.9 Elektroporasyonla plasmid DNA'nın *Bacillus* türlerine transferi

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

Ependorf Elektroporasyon Yöntemi : *B.subtilis* 'in transformasyonu

Elektrokompetent hücrelerin hazırlanması :

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

Elektroporasyonla DNA'nın hücrelere aktarılması :

1. Elektroporasyon cihazı belirlenen voltaj değerine ayarlanır. Başlangıç voltaj değeri 16kV/cm olabilir (1mm'lik küvetler için 1600 V kullanılmıştır).
2. 40 µl elektrokompetent hücre içeren tüpe 5 µl'den daha az plasmid DNA (100 ile 500ng 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.

3.2.10 *Bacillus* 'tan miniprep plasmid DNA izolasyonu: Alkali liziz yöntemi

Bacillus'tan plasmid DNA izolasyonu aşağıda verilen yöntem kullanılarak yapılmıştır. Yöntem uygulanırken kullanılan çözeltilerin bileşimleri Ek 1'de verilmiştir (Harwood and Cutting 1990).

1. Deney tüpü veya 25ml'lik erlenlerde bulunan, seçici antibiyotik içeren 2.5ml'lik LB sıvı-ortama plasmid DNA'nın izole edileceği mikroorganizmadan tek koloni aktarılır.

2. Mikroorganizma 37°C ve 200rpm koşullarında bir gece çoğaltılır.
3. Çoğalan hücrelerin 1.2ml'si 10000rpm ve oda sıcaklığında 1dk santrifüjlenir. Sıvı kısım dökülür ve kalan sıvının tamamı bir mikropipet yardımıyla uzaklaştırılır.
4. Hücreler 1.2ml TSE tamponu (EK 1) ile tekrar süspansiyon haline getirilerek yıkanır.
5. 3.basamak tekrarlanır.
6. Hücre pelleti 2mg/ml egg-white lizozim içeren (kullanmadan hemen önce toz olarak eklenmiş) 500 µl Çözelti A (EK 1) ile süspansiyon haline getirilir.
7. 10s 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 (EK 1) 400 µl eklenir, 10s vorteks işlemi ile homojenizasyondan sonra 4 dk buz üzerinde bekletilir. Süspansiyon gerçekte berrak olmalıdır; eğer berrak değilse vorteks işlem basamağı tekrarlanır.
9. 300 µl Çözelti-C (EK 1) eklenir ve 10s vorteks işleminden sonra buz üzerinde 5 dk bekletilir.
10. 16000 rpm ve +4°C koşullarında 6 dk santrifüjlenir. Çökeltinin büyük kısmı dibe çöker, bir kısmı çözültide kalır.
11. Sıvı kısmın ~ 600 µl'si 1ml'lik mikropipetle yeni ependorf tüpüne alınır.
12. 600 µl fenol/kloroform/izoamilalkol (25/24/1) karışımı eklenir, 10s vorteks işlemi uygulanır ve 1 dk sonra işlem tekrarlanır.
13. Fazları ayırmak için 16000 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 16000 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. 16000 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'lık etanol eklenir. Genellikle DNA pelleti tüpün bir tarafında sabit kalır. Eğer kalmazsa, ya da herhangi bir şüphe olursa, 1dk tekrar santrifüjlenir. Sıvı kısım 19. basamaktaki gibi uzaklaştırılır.
21. 20.basamak tekrarlanır.
22. Pellet vakumda kurutulur ve 25µl TE tamponunda çözülür.
23. 1 µl RNaz eklenir ve 37°C'de 20 dk inkübe edilir. DNA -20°'de saklanır.

3.2.11 *Pichia pastoris*'e Gen Aktarımı ve Genomic DNA İzolasyonu

P. pastoris'e gen aktarımı LiCl yöntemi (Invitrogen, catalog V195-20), *P. pastoris*'den genomic DNA izolasyonu Sambrook vd (1995) yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.3 Rekombinant BAL Üretimi: Ölçek büyütme adımları ve biyoreaktör sistemi

1.8 cm³ hacimli 25 adet kimyasal reaksiyondan geçirilmiş mikroorganizmaları tutucu özellikte porlu yapıya sahip seramik boncuk ve mikroorganizmaların kolayca ve homojen olarak boncuklara yapışmasını sağlayan Cryoprezervatif sıvı içeren tüplere (PRO-LAB, Microbank^{TS}) katı ortamda çoğaltılmış aktif mikroorganizma aktarılmış, bir süre çalkalandıktan sonra şişedeki gliserol atılmış, mikroorganizmaların gözenekli boncuklara adsorpsiyonu sağlanmıştır. Tüpler derin dondurucuda, -20°C'da saklanmıştır.

BAL üretiminde kullanılan pilot ölçek biyoreaktör sistemi Şekil 2'de verilmiştir. Birinci basamakta mikroorganizma mikrobanktan katı ortama aktarılmış, ikinci basamakta katı-ortamdan ön-sıvı çoğalma ortamına, üçüncü basamakta 1/10 aşılama oranı ile ön-sıvı çoğalma ortamına; dördüncü basamakta ise 1/10 aşılama oranı ile üretim ortamının yer aldığı pilot ölçek biyoreaktöre aktarılmıştır.

BAL üretim deneyleri, laboratuvar ve pilot ölçek olmak üzere iki farklı ölçekte yapılmıştır. Laboratuvar ölçekte $V_R=33\text{cm}^3$ çalışma hacimli mikrobiyolojik hava filtreli tam karıştırmalı kesikli biyoreaktörlerde $N=200\text{dk}^{-1}$ karıştırma hızı, $T=37^\circ\text{C}$ sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. Pilot ölçekte yapılan BAL üretim deneylerinde $V_R=3000\text{cm}^3$ hacimli biyoreaktör üretim ortamına 1/10 oranında aktarılmıştır. Bu adımda kullanılan biyoreaktör sistemindeki (B.Braun, Almanya) biyoreaktörlerin herbiri $V_R=1.65\text{dm}^3$ toplam hacimli, iki adet Rushton türbin karıştırıcı ile mekanik

karıştırmalı, pH, sıcaklık, çözünmüş oksijen ve karıştırma hızı kontrollü pilot ölçek kesikli biyoreaktör sistemleridir.

3.4. Analitik yöntemler

Laboratuvar ve pilot ölçekli biyoreaktörlerde gerçekleştirilen biyoprosesler süresince farklı kalma sürelerinde alınan örneklerin önce mikroorganizma derişimi ölçülmüş, daha sonra üretim ortamı 10dk süreyle 12000g 'de 4°C sıcaklıkta santrifüj cihazı (Hermle Z 323 K, Almanya) ile santrifüjlenerek hücreler ayrılmıştır. Ortamdan alınan mikroorganizmalardan ayrılan sıvı faz 0.45 µm gözenekli filtrelerden süzöldükten sonra sıvı ortamdaki hGH, amino asit, organik asit ve glukoz derişimleri aşağıda açıklanan analitik yöntemlerle ölçölmüştür.

3.4.1 Mikroorganizma derişimi

Mikroorganizma derişimi UV-spektrofotometrede (Shimadzu UV 160A) türbidimetrik olarak absorbans ölçümüyle belirlenmiştir. Belli derişimde 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 daha sonraki aşamalarda hücre derişiminin 600 nm dalga boyunda belirlenmesine karar verilmiştir.

3.4.2 BAL aktivite tayini ve SDS-PAGE analizi

BAL aktivitesi T=37°C, pH=8.0, t=10s koşullarında, benzoinin benzaldehite dönüşümünün $\lambda=250$ nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmesiyle belirlenmiştir. 0.035 mM benzoin, 20 mM Tris-HCl (pH=8.0), 0.01 mM TPP, 0.1 mM MgCl₂, ve 7.5% PEG tepkime bileşimini oluşturmaktadır (Gonzalez ve and Vicuna, 1989). Hücreiçi BAL aktivitesi için *E.coli* hücre duvarı $f=10$ s⁻¹ 10 dk hücre parçayıcı ile parçalanmıştır. Hücre dışı Bal aktivitesi belirlenirken, sıvı ortam direk olarak BAL aktivitesinin belirlenmesi için kullanılmıştır (Çalık vd. 2004, 2006).

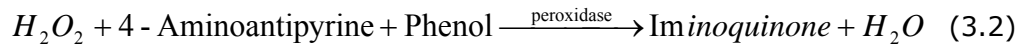
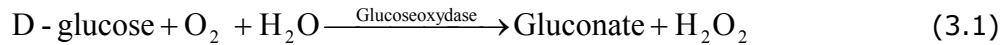
$$\text{Oluşan ürün} = [2(A_f - A_i)/(\epsilon_s - 2\epsilon_p)] * 10^6$$

ϵ_s ve ϵ_p sırasıyla benzoin ve benzaldehitin molar ekstinksiyon katsayılarıdır.

Sodyumdodesilsulfat (SDS) poliakrilamid jel elektoroforez [Laemmli vd. \(1970\)](#) proteinler ayrılmıştır. 15, 25, 35, 50, 75 ve 100 kDa (Sigma M 0671) içeren protein karışımı marker olarak kullanılmış; oluşan bantlar gümün ile boyanmıştır.

3.4.3 Glukoz derişimleri

İndirgenmiş şeker -glukoz- derişimi $\lambda=505$ nm UV sperktrofotometrede glukoz oksidasyon metoduyla ölçülmüştür (Boyacı 2005). Denklem 3.1'deki gibi D-glukoz glukoz oksidaz enzimi katalizörlüğünde oksidasyonundan peroksidaz oluşumu verilmiştir. Denklem 3.2'de ise oluşan peroksidazın 4-aminoantipürin ve fenol ile peroksidaz katalizörlüğünde tepkimesi gösterilmiştir. Tepkime sonucunda kırmızı renk gözlenmektedir.



Önce derişimi bilinen miktarlarda glukoz içeren ortamlar kullanılarak kalibrasyon eğrisi hazırlanmıştır. Oluşturulan kalibrasyon eğrisi Ek 3'de, yöntemde kullanılan çözeltinin ve glukoz standartlarının hazırlanması ise Ek 4'de verilmiştir. Kalibrasyon eğrisinin ve örneklerin analizinde kullanılan yöntem aşağıda verilmiştir:

1. Örnekler derişimleri 0.1 g/l veya daha düşük olacak şekilde seyreltilir.
2. 2 ml analiz çözeltisine 0.05 ml örnek çözeltisi eklenir.

3. Oda sıcaklığında 20 dk veya 37 °C 10 dk inkübe edilerek tepkime gerçekleştirilir ve 505nm dalga boyunda UV-spektrofotometrede gözeltiniin absorbansı ölçülür.

3.4.4 Amino asit derişimleri

BAL üretiminde üretim ortamına mikroorganizma tarafından salgılanan yan ürün olarak oluşan amino asitlerin derişimlerinin belirlenmesi için yüksek basınç sıvı kromatografı (Waters, Amino Asit Analiz Sistemi) kullanılmıştır. Amino asitler fenilizotiyosiyanat (PITC) ile tepkimeye sokularak feniltiyokarbamilamino asit (PTC-AA) türevleri elde edildikten sonra sisteme enjekte edilmiştir. Elde edilen kromatogramlardan amino asit derişimleri, amino asit standartları temel alınarak hesaplanmıştır. Amino asitlerin analizi için aşağıda verilen koşullar kullanılmıştır (Cohen 1983):

Kolon	: Amino asit analiz kolonu (Nova-Pak C18, Millipore)
Kolon boyutları	: 3.9mm x 30cm
Sistem	: Ters faz kromatografı
Hareketli faz akış hızı	: 1ml/dk
Kolon sıcaklığı	: 38°C
Dedektör, dalga boyu ve duyarlılık	: UV/VIS, 254 nm, 0.05AUFS
Enjeksiyon hacmi	: 4µl
Analiz süresi	: 18dk

3.4.5 Organik asit derişimleri

BAL üretiminde üretim ortamına mikroorganizma tarafından salgılanan organik asitlerin derişimlerinin belirlenmesinde yüksek basınç sıvı kromatografı (Waters, Alliance 2695, Organik Asit Analiz Sistemi) kullanılmıştır. Organik asit derişimleri, derişimleri bilen standart organik asit analizleriyle elde edilen standart kromatogramlar yardımı ile hesaplanmıştır. Organik asitlerin analizi için aşağıda verilen koşullar kullanılmıştır (İleri ve Çalık 2006):

Kolon	: Capital Optimal ODS, 5 µm
Kolon boyutları	: 4.6 mm x 250 mm
Sistem	: Ters faz kromatografı
Hareketli faz akış hızı	: 0.8 cm ³ /dk
Kolon sıcaklığı	: 30 °C

Dedektör, dalga boyu ve duyarlılık : Waters 2487 Dual absorbans dedektör, 254 nm
Enjeksiyon hacmi : 5 µl
Analiz süresi :15 dk
Hareketli faz bileşimi : % 3.6 (NH₄)₂HPO₄ (a/h), % 96.4 Deiyonize su

3.4.6 Sıvı faz kütle aktarım katsayısının ve oksijen tüketim hızının belirlenmesi

Pilot ölçekte BAL üretim prosesi boyunca sıvı faz hacımsal kütle aktarım katsayısı ve oksijen tüketim hızı 'Dinamik Yöntem' ile belirlenmiştir. Yöntem, dinamik koşullarda oksijen için kurulan kütle korunum denklemi yorumlanarak, reaktöre gönderilen havanın kısa bir süre kesilmesi ve bir oksijen elektrodu yardımıyla biyotepkime ortamındaki çözünmüş oksijen derişimindeki azalmanın, daha sonra havanın sisteme tekrar verilmesi ile oksijen derişimindeki artışın zamanla ölçülmesi prensibine dayanmaktadır (Bandyopadhyay, 1967)

Üretim ortamına aş yapılmadan önce fiziksel oksijen aktarım katsayısı; aşılama yapıldıktan sonra ise kimyasal tepkimeli oksijen aktarım katsayısı belirlenmiştir. Farklı oksijen aktarım koşulları ve kalma sürelerinde biyoteknolojik prosesin oksijen aktarım dinamiğini etkilemeyecek şekilde çok kısa süreli olarak biyoreaktöre beslenen hava mikroorganizmanın biyolojik faaliyetlerini etkilemeyecek şekilde kesilmiş; yüzey havalandırma etkisini azaltmak amacıyla karıştırma hızı $N=20-50 \text{ dk}^{-1}$ arasında tutulmuş; ve zamanla biyoproses ortamında çözünmüş oksijen derişiminin doğrusal azalmasından yararlanılarak mikroorganizmanın oksijen tüketim hızı, r_o ($r_o=dC_o/dt$) hesaplanmıştır. Sıvı tarafı hacımsal kütle aktarım katsayısının belirlenmesi için incelenen oksijen aktarım koşullarında sisteme tekrar hava verilerek çözünmüş oksijen derişimindeki doğrusal olmayan artış ölçülmüştür. ($(dC_o/dt-r_o)$, C_o) grafiğinin eğiminden K_La değeri hesaplanmıştır.

4 BULGULAR VE TARTIŞMA

BAL enziminin hücreiçi üretimi için rekombinant *E.coli*; ve hücreiçinde sentezlenen BAL protein molekülünün hücre dışına aktarılabilmesi için, rekombinant *Bacillus sp.* ve *Pichia pastoris* hücreleri için ekspresyon sistemleri tasarlanmıştır.

4.1. Rekombinant BAL üretimi için mikroorganizma geliştirilmesi

4.1.1. Rekombinant *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS ile BAL üretimi : Tasarım-1

Üretim için ilk konak hücre *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS olarak belirlenmiştir. *E.coli* BL21 (DE3) pLysS hücresi T7 promotörü ile kontrol edilen genler ve genleri içeren plazmidler için tasarlanmıştır. Fermentasyon ortamına IPTG eklendiğinde, lacUV5 promotörü ve *lacZ* geninin küçük bir kısmını içeren yapının kontrolü altında olan T7 RNA polimeraz sentezlenerek salgılanmaya başlar ve T7 promotörü aktifleşerek kontrolü altındaki genin transkripsiyonunu gerçekleştirir. Bu nedenle, BL21 (DE3) pLysS hücresi potansiyel üretici olarak pRSETA da klonlama vektörü olarak seçilmiştir.

BAL enzimini kodlayan geninin çoğaltılıp *E.coli* pRSETA plazmidine klonlanması ve yüksek hücre derişimi ve yüksek BAL üretimi için primerler tasarlanmıştır. BAL geni (*bal*) pRSETA *E.coli* plazmidine klonlanmış ve rekombinant *E.coli* hücreleri elde edilmiştir.

a) *bal* gen klonlanması için primer tasarımı

Primer tasarımı yapabilmek amacıyla, BAL'ı kodlayan gen dizini National Institutes of Health (ABD), National Library of Medicine, National Center for Biotechnology Information'dan (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) alınmıştır. Genler üzerinde bulunan ve bulunmayan restriksiyon enzim konumları da ABD Molecular Biology Resources kuruluşları içinde yer alan Restriction Mapper internet sayfası (<http://www.restrictionmapper.org>) kullanılarak belirlenmiştir. Klonlama için primerlere eklenecek restriksiyon enzim konumları seçilmiş ve *bal* geninin çoğaltılması ve pRSETA *E.coli* plazmidine klonlanması için gerekli uygun primerler tasarlanmıştır. İleri primerin başına *NdeI*, geri primerin ucuna *SacI* restriksiyon enzim konumları eklenmiştir (Şekil 3). Primerlerin dimer oluşturma ve kendi kendini tamamlama özellikleri bilgisayar programı NAR ile kontrol edilmiş ve T_d , ΔG , ΔH ve ΔS değerleri bulunmuştur. Tasarlanan ileri ve geri primerlerin T_d değerlerinin

birbirine yakın olması gerekmektedir. Bu temelde, tasarlanan primerlerin dizinleri ve termodinamik özellikleri aşağıda sırayla verilmiştir (Çizelge 4):



❶ restriksiyon enzim konumu + BAL İleri primeri

NdeI (5'CATATG3')

❷ restriksiyon enzim konumu + BAL Geri primeri

SacI (5'GAGCTC3')

BAL ileri primeri: 5' CATATGGCGATGATTACAGGC 3'

BAL geri primer: 5' GCGAGCTCGCTTAGTGATGGTGATGGTGATG 3'

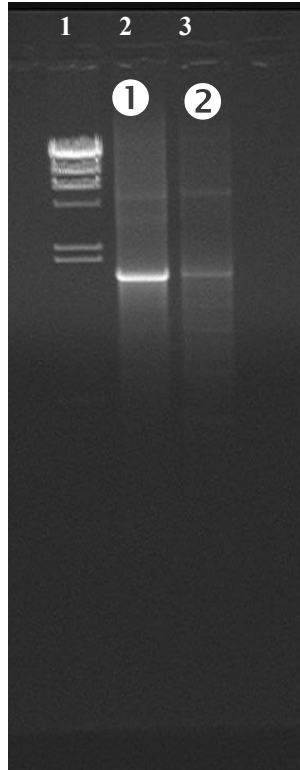
Şekil 3. Tasarlanan primerler ve dizinleri

Çizelge 4. Tasarlanan primerlerin özellikleri

İsim	Td (°C)	ΔG kcal/mol	ΔH kcal/mol	ΔS eu	Kendi kendini tamamlama	Dimer oluşturma
NdeI-BAL İleri Primeri	60.7	-34.4	-60.3	-415.3	5' CATATG ₁ 3' CGGACATTAGTAGCG ₁	5' CATATGGCGATGATTACAGGC 3' 3' CGGACATTAGTAGCGGTATAC 5'
BAL Geri Primeri	60.7	-54.7	-233.5	-592.3	5' GCGAG ₁ 3' GTAGTGGTAGTGGTA GTGATTCGCTC ₁	5' GCGAGCTCGCTTAGTGA 3' 3' TGGTAGTGGTAGTGATTCGC TCGAGCG 5'

Tasarlanan primerler yardımıyla BAL geni r-pUC18 plasmidinin kalıp DNA olduğu ve aşağıda parametreleri ve bileşenleri belirtilen PCR tepkimesiyle hem *Taq* DNA polimeraz hem de *Pfu* DNA polimeraz ile çoğaltılmıştır (Şekil 4). *Taq* DNA polimeraz ile aynı koşullarda daha yüksek derişimde BAL geni elde edildiği için daha sonraki tepkimelerde *Taq* DNA polimeraz tercih edilmiştir.

Çoğaltılan BAL geni *NdeI* ve *SacI* restriksiyon enzimleriyle kesilerek yapışkan uçlu hale getirildikten sonra QIAGEN PCR saflaştırma kiti ile saflaştırılmış ve aynı enzimlerle kesilen ve DNA ekstraksiyon kiti ile saflaştırılan PRSETA ifade vektörüne klonlanmıştır (Şekil 5).



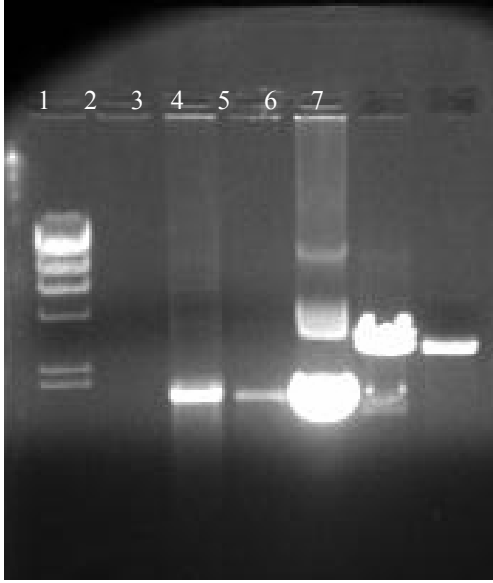
PCR tepkime parametreleri:

1 döngü	T ₁ = 94°C,	2 dak
30 döngü	T ₁ = 94°C,	1 dak
	T ₂ = 60°C,	1 dak
	T ₃ = 72°C,	3 dak
1 döngü	T ₃ = 72°C,	5 dak
	T ₄ = 4°C,	5 dak

PCR tepkime bileşenleri:

	①	②
10XPCR Tamponu	5µl	5µl
dNTPs (1mM)	10µl	10µl
İleri Primer (10µM)	1µl	1µl
Geri Primer (10µM)	1µl	1µl
Kalıp DNA	2µl pUC18::bal	2µl pUC18::bal
dH2O	30.5µl	30 µl
DNA polimeraz	0.5µl (Taq)	1µl (Pfu)

Şekil 4. BAL geninin agaroz jel elektroforez görüntüsü ve çoğaltıldığı PCR tepkime parametre ve bileşenleri. 1.kuyu: LambdaDNA/HindIII Marker; 2.kuyu: Bal geni (*Taq* DNA polimeraz ile çoğaltılmış); 3.kuyu: Bal geni (*Pfu* DNA polimeraz ile çoğaltılmış).



Şekil 5. Saflaştırılan BAL geni ve PRSETA plasmidi. 1.kuyu: LambdaDNA/HindIII Marker; 3.kuyu: NdeI ve SacI RE ile kesik Bal geni; 4. kuyu QIAgen ile saflaştırılmış NdeI ve SacI RE ile kesik Bal geni; 5. kuyu: izole dilmiş PRESTA plasmidi; 6.kuyu:NdeI ve SacI RE ile kesik PRSETA plasmidi; 7.kuyu: DNA extraction kiti ile saflaştırılmış NdeI ve SacI RE ile kesik PRSETA plasmidi

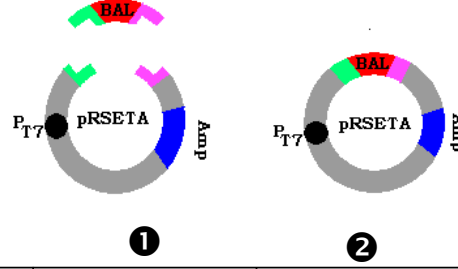
Tasarlanan primerlerle belirlenen, genin çoğaltılması sırasında uçlarına eklenen *NdeI* ve *SacI* restriksiyon enzim konumlarından sırasıyla kesilerek, yapışkan-uçlu hale getirilen BAL geni, aynı restriksiyon enzimleriyle ardışık olarak kesilen *E.coli* plasmidi pRSETA 'ya gen/vektör oranı 5 ve 3 olan iki ayrı ligasyon tepkimesiyle aşağıda belirtilen koşullarda, T4 DNA ligaz enzimi katalizörlüğünde klonlanmıştır (**Şekil 6**). Klonlamanın gerçekleşip-gerçekleşmediğini belirlemek için ligasyon tepkime karışımından plasmid taşımayan *E.coli* XLI-Blue mikroorganizmasına CaCl₂ yöntemi ile aktarıldıktan sonra hücreler 100 µg/ml ampisilin içeren katı ortamlara yayılmış ve 37°C'de 18-24 st süreyle çoğaltılmışlardır.

[BAL]: 8.4 ng/ μ l

[pRSETA]: 26.7 ng/ μ l

t: 16 h

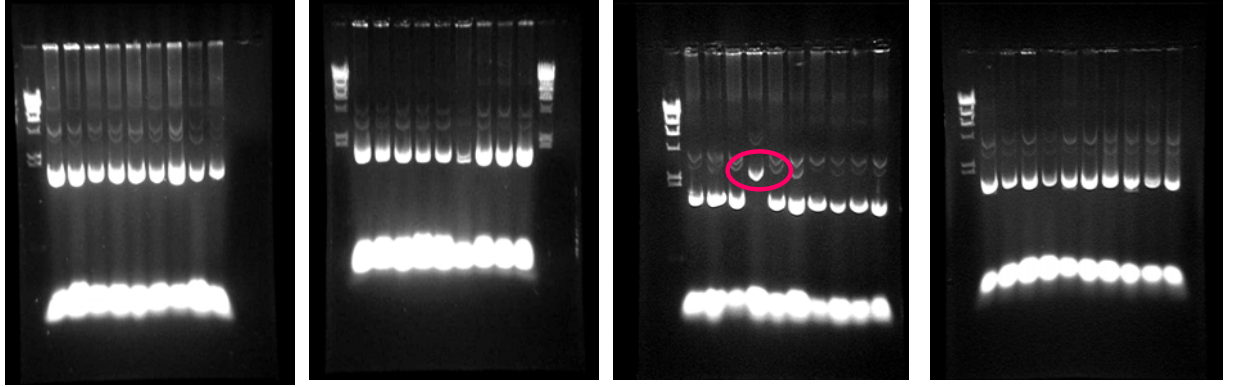
T: 22°C



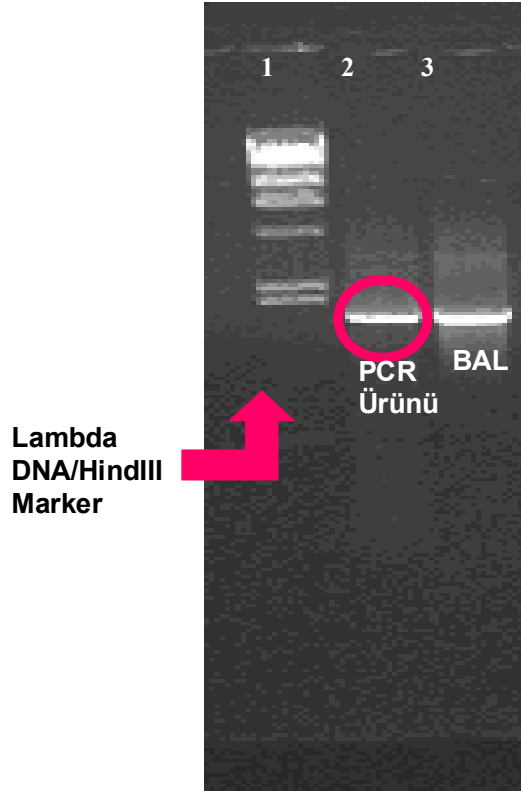
Ligasyon tepkimesi:	G/V:5	G/V:3
İlgili gen	~ 120 ng	~ 60 ng
Vektör DNA	~ 24 ng	~ 20 ng
Ligasyon Tamponu (ATP'li)	2 μ l	2 μ l
T4 DNA ligaz (5u/ μ l)	1 μ l	1 μ l
ATP	1.5 μ l	1.5 μ l
dH ₂ O	max:19 μ l	max:19 μ l
TOPLAM	20 μ l	20 μ l

Şekil 6. pRSETA::*bal* ligasyon tepkime koşulları ve şematik gösterimi

Katı ortamlarda oluşan 64 koloninin *bal* genini içeren r-pRSETA taşıyıp taşımadığını kontrol etmek için, elde edilen kolonilerden paralel olarak plasmid DNA izolasyonu yapılmıştır. İlk ligasyon ürününden 18, ikinci ligasyon ürünü transformasyonundan 24 koloni izole edilmiştir (Şekil 7). İzolasyon ürünlerinin jel elektroforez görüntülerine bakıldığında kolonilerden bir tanesinin (1. örnekten 10. koloni) pRSETA'dan daha büyük plasmid DNA molekülü taşıdığı görülmüştür. pRSETA'dan daha büyük plasmid DNA molekülleri taşıdığı belirlenen koloniden izole edilen muhtemel rekombinant- pRSETA'nın *bal* geni taşıyıp-taşımadığı ilk aşamada PCR tepkimesi ile kontrol edilmiş (Şekil 8), BAL gen bandı büyüklüğü kontrol edildikten sonra, rekombinant- pRSETA plasmidi BAL genini ortadan (938. nükleotidden) ve sondan kestiği bilinen *Pst*I (5'CTGCGA3') restriksiyon enzimiyle kesilerek kontrol edilmiş ve beklenen 778 bp büyüklüğünde DNA molekülü gözlenmesi ile (Şekil 9) klonlamanın başarılı belirlenmiş ve DNA dizin analiziyle de kanıtlanmıştır.



Şekil 7. Plasmid DNA izolasyon sonucu



PCR tepkime parametreleri:

1 döngü	$T_1 = 94^\circ\text{C}$,	2 dak
30 döngü	$T_1 = 94^\circ\text{C}$,	1 dak
	$T_2 = 60^\circ\text{C}$,	1 dak
	$T_3 = 72^\circ\text{C}$,	3 dak
1 döngü	$T_3 = 72^\circ\text{C}$,	5 dak
	$T_4 = 4^\circ\text{C}$,	5 dak

PCR tepkime bileşenleri:

10XPCR Tamponu	5 μl
dNTPs (1mM)	10 μl
İleri Primer (10 μM)	1 μl
Geri Primer (10 μM)	1 μl
Kalıp DNA	2 μl 10. koloni
dH ₂ O	30.5 μl
Taq DNA polimeraz (5U/ μl)	0.5 μl

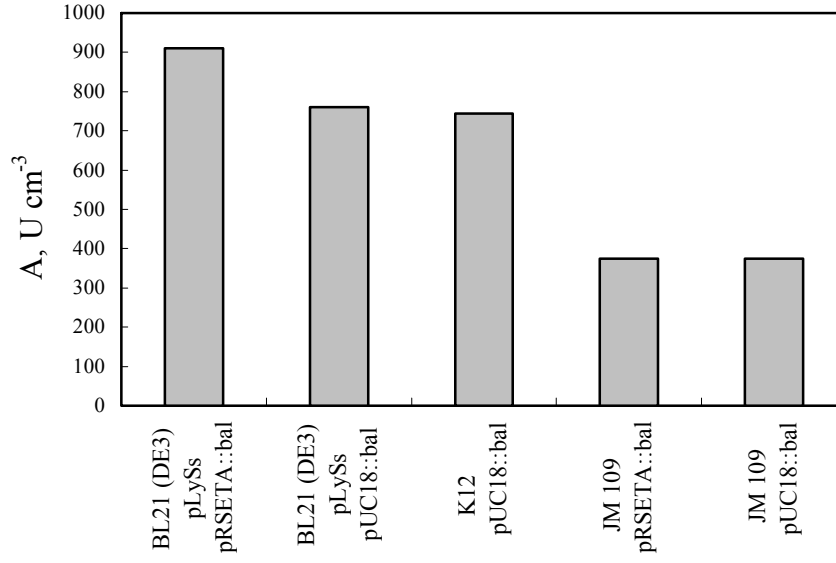
Şekil 8. Rekombinant-pRSETA plasmidinin PCR tepkime parametre ve koşulları. 1. kuyu: LambdaDNA/HindIII Marker; 2. kuyu: PCR ürünü; 3. kuyu: BAL geni



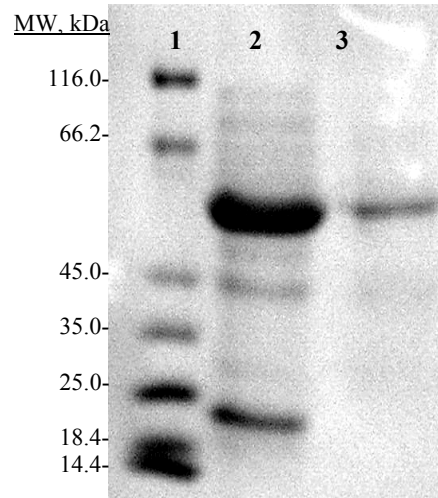
Şekil 9. r-pRSETA plasmidi. 1.kuyu: LambdaDNA/HindIII Marker; 2. kuyu: r-PRSETA plasmidi; 3. kuyu: r-PRSETA + SacI + NdeI; 3.kuyu: r-PRSETA + PstI

4.1.1.1 Rekombinant konak *E.coli* seçimi

T7 faz promoteri kontrolunda olan pRSETA::*bal* plasmidini taşıyan *E. coli* BL21 (DE3) pLySs ve *E. coli* JM 109, ve *trc* promoteri kontroldeki modifiye pUC18::*bal* plasmidini taşıyan *E. coli* K12, *E. coli* JM 109 ve *E. coli* BL21 (DE3) pLySs hücrelerinin BAL üretim performansları referans üretim ortamı (RÜO) kullanılarak (kg m^{-3}): glukoz, 8.0; Na_2HPO_4 , 6.7; KH_2PO_4 , 3.1; NaCl, 0.5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 5.0; $\text{pH}_0=7.2$ kıyaslanmıştır. Hücreler $t=4$ st'te 1mM IPTG ile indüklenmiştir. En yüksek aktivite r-pRSETA::*bal* genini taşıyan *E. coli* BL21 (DE3) pLySs ile $A=910 \text{ U cm}^{-3}$ olarak elde edilmiştir (**Şekil 10**). Modifiye pUC18::*bal* plasmidini taşıyan *E. coli* K12 ve r-pRSETA::*bal* taşıyan *E. coli* BL21 (DE3) pLySs 'in performansları aktivite deneylerine ek olarak SDS-PAGE elektroforez ile kıyaslanmıştır (**Şekil 11**). r-pRSETA::*bal* taşıyan *E. coli* BL21 (DE3) pLySs 'nin ürettiği BAL'ın aktivite ve derişimi diğer konak-plasmid kombinasyonlarından daha yüksek olduğu için üretim deneylerine r-pRSETA::*bal* taşıyan *E. coli* BL21 (DE3) pLySs ile devam edilmiştir.



Şekil 10. Farklı ekspresyon vektörleri taşıyan *E. coli* 'lerin BAL üretim performanslarının kıyaslanması. $C_G^0 = 8.0 \text{ kg m}^{-3}$, $C_N^0 = 5.0 \text{ kg m}^{-3}$, $t=12 \text{ st}$, $V=33 \text{ cm}^3$, $T=37^\circ\text{C}$, $N=200 \text{ dk}^{-1}$.



Şekil 11. Benzaldehide liyaz enziminin SDS-PAGE görüntüsü. 1: Protein Marker; 2: *E. coli* BL21 (DE3) pLySs pRSETA::bal BAL'ı; 3: *E. coli* K12 modifiye pUC18::bal BAL'ı.

Azot kaynağının benzaldehit liyaz üretimi üzerine etkisi

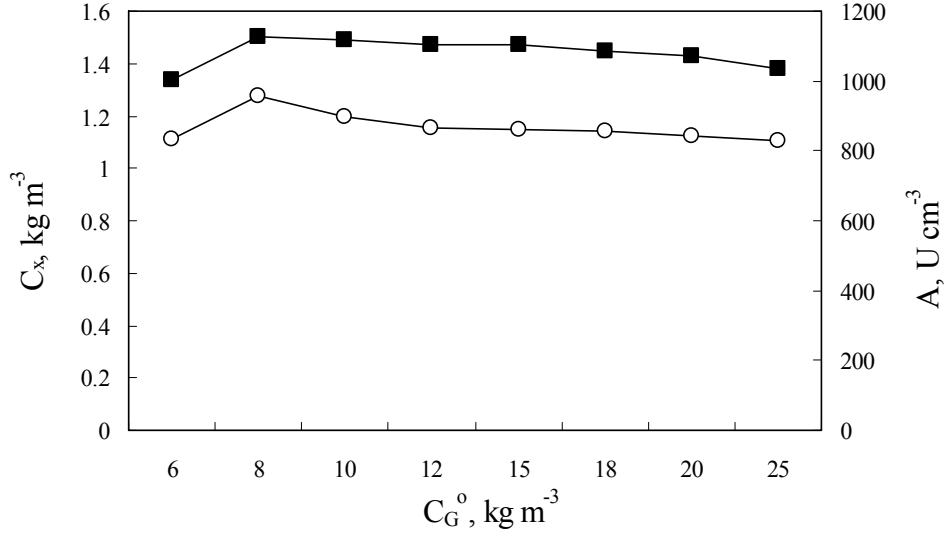
NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, ve $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ etkisi NH_4Cl , (kg m^{-3}): 5.0, 5.5, 6.0, 6.5; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, (kg m^{-3}): 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0; ve $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, (kg m^{-3}): 4.5, 5.0, 5.5 derişimlerinde RÜO'dan azot kaynağı çıkartılarak araştırılmıştır. En yüksek BAL aktivitesi 4.5 kg m^{-3} $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ içeren ortamda $A= 955 \text{ U cm}^{-3}$ olarak bulunmuştur (Çizelge 5).

Çizelge 5. Hücre derişimi ve benzaldehit liyaz aktivitesinin azot kaynağı ve derişimi ile değişimi. $C_G^0 = 8.0 \text{ kg m}^{-3}$, $t=12 \text{ st}$, $V=33 \text{ cm}^3$, $T=37^\circ\text{C}$, $N=200 \text{ dk}^{-1}$.

Azot kaynağı	kg m^{-3}	$C_x, \text{kg m}^{-3}$	$A, \text{U cm}^{-3}$
NH_4Cl	5.0	1.2	695
	5.5	1.3	840
	6.0	1.3	875
	6.5	1.3	905
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	4.0	1.4	945
	4.5	1.5	955
	5.0	1.5	910
	5.5	1.5	905
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	6.0	1.5	900
	4.5	1.1	675
	5.0	1.1	736
	5.5	1.2	760

Glukoz derişiminin benzaldehit liyaz üretimi üzerine etkisi

Başlangıç glukoz derişiminin hücre derişimi ve benzaldehit liyaz üretimi üzerine etkisi $C_G^0=6.0, 8.0, 10.0, 12.0, 15.0, 18.0, 20.0$ ve 25.0 kg m^{-3} başlangıç glukoz derişimlerinde araştırılmıştır. $C_G^0=8.0 \text{ kg m}^{-3}$ en yüksek hücre derişimi $C_x=1.5 \text{ kg m}^{-3}$ benzaldehit liyaz aktivitesi de $A=955 \text{ U cm}^{-3}$ olarak bulunmuştur. (Şekil 12).



Şekil 12. Hücre derişiminin ve benzaldehit liyaz aktivitesinin başlangıç glukoz derişimi ile değişimi. $C_N^0 = 4.5 \text{ kg m}^{-3}$, $t=12 \text{ st}$, $V=33 \text{ cm}^3$, $T=37^\circ\text{C}$, $N=200 \text{ dk}^{-1}$. Hücre derişimi : (■); Benzaldehit liyaz aktivitesi: (○).

Glukoz ve $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ benzaldehit liyaz üretimi üzerine ikili etkisi

Glukoz ve $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ikili etkisi $C_G^0/C_{(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4}^0=1.7$ sabit tutularak $C_G^0=6.0, 8.0, 10.0, 12.0, 15.0, 18.0, 20.0$ ve 25.0 kg m^{-3} için araştırılmıştır. $C_G^0=20 \text{ kg m}^{-3}$ ve $C_{(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4}^0=11.8 \text{ kg m}^{-3}$ koşullarında en yüksek benzaldehit liyaz aktivitesi $A=1060 \text{ U cm}^{-3}$ olarak elde edilmiştir (Çizelge 6).

Çizelge 6. Hücre derişimi ve benzaldehit liyaz aktivitesinin glukoz ve $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ derişiminin değişimi ile değişimi. $C_G^0/C_N^0=1.7$, $t=12 \text{ st}$, $V=33 \text{ cm}^3$, $T=37^\circ\text{C}$, $N=200 \text{ dk}^{-1}$.

Glukoz kg m ⁻³	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ kg m ⁻³	C_x , kg m ⁻³	A , U cm ⁻³
6	3.5	1.3	900
8	4.5	1.5	955
10	5.9	1.6	965
12	7	1.7	975
15	8.8	1.7	1000
18	10.5	1.8	1040
20	11.8	2.0	1060

4.1.2 Hücre dışı Benzaldehit Liyaz Üretimi İçin Rekombinant *Bacillus* türü

Geliştirilmesi: Tasarım-II

BAL geninin hücre dışı üretimi için gerekli genlerin sentezlenmesi ve *B. subtilis*'te üretiminin amaçlandığı çalışmada, hücre dışı salgılamada aktif olduğu bilinen *B. licheniformis* mikroorganizmasının salgıladığı serin alkalik proteaz geninin sinyal peptidini (*pre-subC*) ve ribozomal bağlanma bölgesini içeren gen parçası (National Institutes of Health (ABD), National Library of Medicine, National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)) tasarlanan primerlerin yardımıyla çoğaltılmış ve yine r-PUC18 plasmidinin kalıp DNA olarak kullanıldığı PCR tepkimesiyle çoğaltılan BAL geninin başına entegrasyonu gerçekleştirilmiştir. Sub-klonlama çalışmalarında hibrid gen pUC19 plasmidine klonlanmış ve *E. coli* XL1Blue hücresine transforme edilmiştir. *B. subtilis*'te üretim amacıyla pRB374 ifade vektörü ve *B. subtilis* 1A751 (*Bacillus* Genome Stock Center) konak hücresi seçilmiştir. pRB374 *E. coli* /*B. subtilis* shuttle vektörü promotor bölgesi içermeyen genlerin *B. subtilis*'te log-fazda transkripsiyonunu daha etkin hale getiren *vegII* promotoru taşımaktadır. Bu vektörün çoklu bağlanma bölgesinin ardında transkripsiyonu sonlandıracak terminal bölge bulunmaktadır. Çoklu klonlama bölgesine entegre edilen hibrid gen kontrolü altında bulunduğu promotor bölge sayesinde (*vegII*) vejetatif büyüme fazında üretilmeye başlayacaktır. Bu fazda proteaz enzimlerinin üretimi durgun faza göre daha az olduğundan klonlanan yabancı genin üretim kapasitesi artmakta ve proses süresi kısalmaktadır. Bu nedenle, *B. subtilis* 1A751 hücresi potansiyel üretici olarak pRB374 de klonlama vektörü olarak seçilmiştir.

BAL ve *pre-subC* genlerinin PCR tepkimesiyle çoğaltılması için gerekli uygun primerler NAR programı yardımıyla tasarlanmış (Şekil 13) ve özellikleri Çizelge 7'de sıralanmıştır.



- ❶ Ekstra sekans + *pre-subC* ileri primeri
- ❷ *pre-subC* geni geri primeri + BAL genine komplementer dizin
- ❸ *pre-subC* genine komplementer dizin + BAL geni ileri primeri
- ❹ Ekstra sekans + BAL geni geri primeri

pre-subC ileri primeri: 5' GCGGATCCGCAGCAATCTCCTGTCATTCG 3'

pre-subC geri primeri: 5' CCTGTAATCATCGCCATAGCAGAAGCGGAATCG 3'

BAL ileri primeri: 5' CGATTCCGCTTCTGCTATGGCGATGATTACAGGC 3'

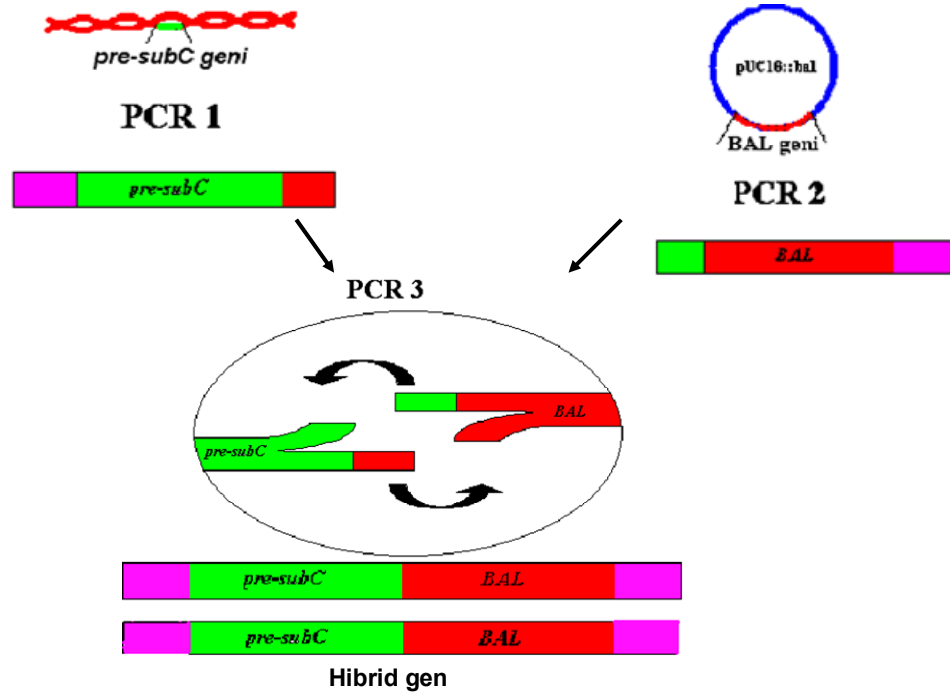
BAL geri primeri: 5' GCGAGCTCGCTTAGTGATGGTGATGGTGATG 3'

Şekil 13. Tasarlanan primerler ve dizinleri

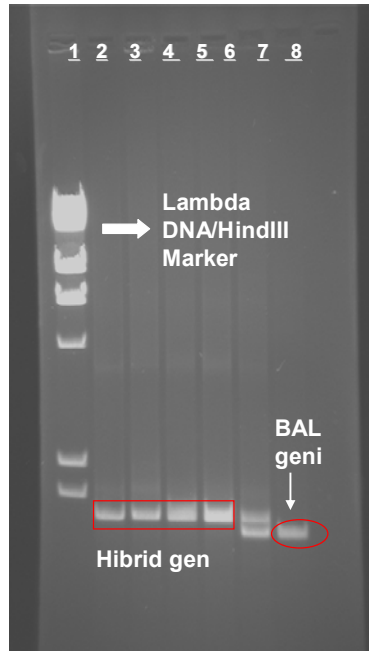
Çizelge 7. Tasarlanan primerlerin özellikleri: *E.coli*

İsim	Td (°C)	ΔG kcal/mol	ΔH kcal/mol	ΔS eu	Kendi kendini tamamlama	Dimer oluşturma
<i>pre-subC</i> İleri Primeri	59.9	-59.4	-255.6	-651.9	5' GCGGA ₁ 3' AGAGGAGGAGAAAATAAGTCCGCCT ₁	5' GCGGATCCGCCTGAATAA 3' 3' AGGAGAAAATAAGTCCGCCTAGGCG 5'
<i>pre-subC</i> Geri primeri	58.8	-61.2	-264.6	-675.1	5' CCTGTAATCAT ₁ 3' GCTAAGGCGAAGACGATACCG ₁	5' CCTGTAATCATCGCCATAGCAGAAGCGGAAT3' 3' GCTAAGGCGAAGACGATACCGCTACT 5'
BAL İleri primeri	60.7	-64.3	-275.7	-701.8	5' CGATTCCGCTTCTG ₁ 3' CGGACATTAGTAGCGGTATC ₁	5' CGATTCCGCTTCTGCTATGGCGATGATTACA 3' 3' CGGACATTAGTAGCGGTATCGTC 5'
BAL Geri Primeri	60.7	-54.7	-233.5	-592.3	5' GCGAG ₁ 3' GTAGTGGTAGTGGTAGTGATTCGCTC ₁	5' GCGAGCTCGCTTAGTGATGGTGA 3' 3' GTAGTGATTCGCTCGAGCG 5'

Çoğaltılan BAL geni (Şekil 15) ve *pre-subC* geni (Şekil 16), 'gene splicing by overlap extension' (SOE) yöntemiyle Şekil 14'da gösterildiği gibi üçüncü bir PCR tepkimesinde *pre-subC* ileri primeri ve BAL geri primeri yardımıyla birbirine yapıştırılmış ve hibrid gen (Şekil 14) elde edilmiştir.



Şekil 14. SOE yöntemiyle *pre-subC* ve *BAL* genlerinin birbirine entegrasyonu



PCR tepkime parametreleri
(*BAL* için):

1 cycle	$T_1 = 94^\circ\text{C}$,	2 min
30 cycle	$T_1 = 94^\circ\text{C}$,	1 min
	$T_2 = 60^\circ\text{C}$,	1 min
	$T_3 = 72^\circ\text{C}$,	3 min
1 cycle	$T_3 = 72^\circ\text{C}$,	5 min
	$T_4 = 4^\circ\text{C}$,	5 min

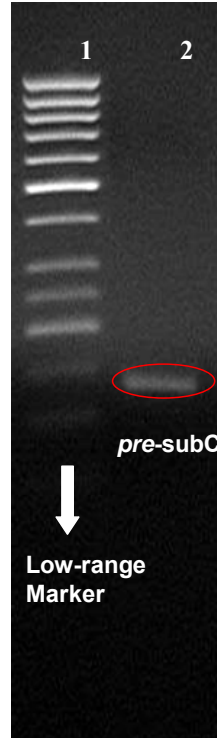
PCR tepkime parametreleri
(*Hibrid gen* için):

1 cycle	$T_1 = 94^\circ\text{C}$,	2 min
30 cycle	$T_1 = 94^\circ\text{C}$,	1 min
	$T_2 = 55^\circ\text{C}$,	1 min
	$T_3 = 72^\circ\text{C}$,	4 min
1 cycle	$T_3 = 72^\circ\text{C}$,	30 min
	$T_4 = 4^\circ\text{C}$,	5 min

PCR tepkime bileşenleri:

	<i>BAL</i> için	<i>Hibrid gen</i> için
10XPCR Buffer	5 μl	5 μl
dNTPs (1mM)	10 μl	10 μl
Forward Primer (10 μM)	0.5 μl	0.5 μl
Reverse Primer (10 μM)	0.5 μl	0.5 μl
Template DNA	2 μl pUC::BAL	2 μl <i>BAL</i> geni+ 2 μl <i>pre-subC</i> geni
dH ₂ O	31 μl	31 μl
DNA polymerase	1 μl (Pfu)	1 μl (Taq)

Şekil 15. *BAL* geninin ve *Hibrid gen*in agaroz jel elektroforez görüntüsü ve çoğaltıldığı PCR tepkime parametre ve bileşenleri. 1.kuyu: LambdaDNA/HindIII Marker; 2., 3., 4., 5., kuyu: *Hibrid gen*; 6.kuyu: *BAL* geni



PCR tepkime parametreleri:

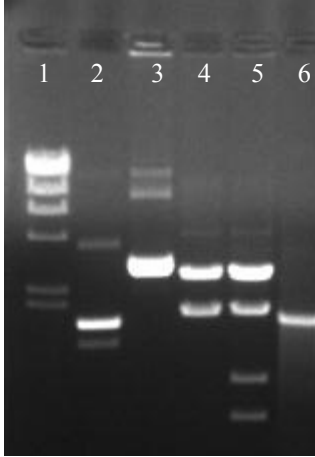
1 döngü	T ₁ = 94°C,	2 dak
30 döngü	T ₁ = 94°C,	1 dak
	T ₂ = 60°C,	1 dak
	T ₃ = 72°C,	15 sn
1 döngü	T ₃ = 72°C,	5 dak
	T ₄ = 4°C,	5 dak

PCR tepkime bileşenleri:

10XPCR Tamponu	5µl
dNTPs (1mM)	10µl
İleri Primer (10µM)	1µl
Geri Primer (10µM)	1µl
Kalıp DNA	2µl genomik DNA
dH ₂ O	30.5µl
DNA polimeraz	0.5µl (Taq)

Şekil 16. *pre-subC* geninin agaroz jel elektroforez görüntüsü ve çoğaltıldığı PCR tepkime parametre ve bileşenleri. 1.kuyu: Low-range Marker; 2.kuyu: *pre-subC* geni

*Bam*HI ve *Sac*I restriksiyon enzimleriyle muamele edilerek yapışkan uçlu hale getirilen hibrid gen ligasyon tepkime koşulları **Şekil 17**'de belirtildiği gibi T4 DNA ligaz katalizörlüğünde yine aynı enzimlerle lineer hale getirilen pUC19 plasmidine klonlanmıştır. 24 st, 100µl Ampisilin, IPTG ve X-GAL içeren katı ortamda çoğaltılan transformantlardan seçilen beyaz kolonilerden pUC19 plasmidine göre daha büyük bant veren bir koloni, hibrid geni taşıyıp taşımadığı ve uygun konfigürasyonda entegrasyonun gerçekleşip gerçekleşmediğinin kontrolü için önce *Bam*HI ve *Sac*I restriksiyon enzimleriyle kesilmiş ve içinden hibrid gen ile aynı büyüklükte gen parçası çıktığı gözlemlenmiştir. Daha sonra kesik r-pUC19 plasmidi hibrid geni ortasından kestiği (1058bp ve 778bp olmak üzere iki gen parçası) bilinen *Pst*I ile muamele edilmiş ve uygun büyüklükte gen parçalarının gözlemlenmesiyle klonlamanın başarılı olduğu kabul edilmiştir. Ayrıca r-pUC19 plasmidi kalıp DNA olarak kullanılmış ve BAL geninin çoğalması gözlemlenmiştir.



Şekil 17. r-pUC19 plasmidinin izolasyonu ve kesim kontrolleri. 1.kuyu: LambdaDNA/HindIII Marker; 2.kuyu: pUC19 plasmidi; 3.kuyu: rekombinant pUC19 plasmidi; 4. kuyu: SacI ve BamHI RE ile kesik r-pUC19 plasmidi; 5. kuyu: SacI, BamHI ve PstI ile kesik r-pUC19 plasmidi; 6. kuyu: BAL geni (PCR ürünü).

pUC 19 plasmidine sub-klonlama gerçekleştirildikten sonra hibrid gen *Bam*HI ve *Sac*I restriksiyon enzimleriyle kesilerek DNA extraction kit yardımıyla saflaştırılmış ve paralel olarak aynı enzimlerle yapışkan uçlu hale getirilen pRB374 ifade vektörüne gen/vektör oranı 3 olacak şekilde entegrasyonu gerçekleştirilmiştir. Ligasyon tepkime koşulları aşağıdaki gibi ayarlanmıştır.

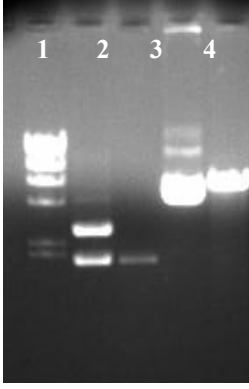
[Hibrid]: 9.1 ng/µl

[pUC19]: 15.4 ng/µl

t: 16 h

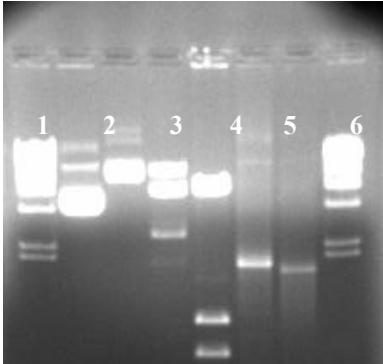
T: 22°C

Ligasyon tepkimesi:	G/V:3
İlgili gen	~ 90 ng
Vektör DNA	~ 30 ng
Ligasyon Tamponu (ATP'li)	2µl
T4 DNA ligaz (5u/µl)	1µl
ATP	2µl
dH₂O	max:19µl
TOPLAM	20 µl



Şekil 18. Kesik r-pUC19 plasmidi ve pRB374 plasmidi. 1.kuyu: LambdaDNA/HindIII Marker; 2.kuyu: SacI ve BamHI RE ile kesik r-pUC19 plasmidi; 3.kuyu: DNA extraction kit ile saflaştırılmış hibrid gen; 4. kuyu: pRB374 plasmidi; 5. kuyu: SacI ve BamHI RE ile kesik pRB374 plasmidi.

Katı ortamlarda oluşan beyaz kolonilerin r- pRB374 taşıyıp taşımadığını kontrol etmek için, elde edilen kolonilerden paralel olarak plasmid DNA izolasyonu yapılmış ve sadece bir kolonide pRB374 plasmidine göre daha büyük bant gözlemlenmiştir. Muhtemel rekombinant plasmid izole edildikten sonra *Bam*HI, *Sac*I ve *Pst*I restriksiyon enzimleriyle kesilerek ve hibrid ve BAL genlerinin çoğaltılma tepkimesinde kalıp DNA olarak kullanılarak konlamanın gerçekleşip gerçekleşmediği kontrol edilmiş (**Şekil 19**) ve olumlu sonuçlar alınmıştır. Klonlanan geninin doğruluğunun kesin kontrolü için, *bal* genini taşıyan rekombinant plasmid Microsynth (İsviçre)'ye gen dizin analizi için gönderilecektir.



Şekil 19. Rekombinant pRB374 plasmidi. 1.kuyu: LambdaDNA/HindIII Marker; 2.kuyu: PRSETA vektörü; 3. kuyu: r- pRB374 vektörü; 4. kuyu: SacI ve BamHI RE ile kesik r-pRB374 plasmidi; 5.kuyu: PstI, SacI ve BamHI RE ile kesik r-pRB374 plasmidi 6. kuyu: hibrid gen (PCR ürünü); 7. kuyu: BAL geni (PCR ürünü); 8. kuyu LambdaDNA/HindIII Marker.

4.1.2.1 Rekombinant *Bacillus* türleri ile benzaldehit liyaz üretimi

B. firmus, *B. brevis*, *B. sphaericus*, *B. subtilis* (*npr-*, *abr-*), *B. subtilis* (*spo-*), altı proteaz geni silinmiş *Bacillus subtilis* WB600'e ve yedi proteaz geni silinmiş *Bacillus subtilis* WB700'e aktarılmış herbir rekombinant mikroorganizma 10 µg/ml kanamycin içeren LB ortamında çoğaltılmış ve klonilerden plasmid DNA izolasyonu yapılmış; *Bacillus*'ların *pre(subC)::pRB374* taşıdıkları belirlendikten sonra üretim deneyleri yapılmıştır. *Bacillus* 'ler ile üretim deneyleri referans üretim ortamı (RÜO) kullanılarak (kg m⁻³): glukoz, 8.0; Na₂HPO₄, 6.7; KH₂PO₄, 3.1; MgSO₄.7H₂O, 0.5; (NH₄)₂HPO₄, 5.0; pH₀=7.2 yapılmış ve *Bacillus*'lar kıyaslanmıştır. *Bacillus subtilis* WB700 ile 20 U cm⁻³ aktivite elde edilirken diğer *Bacillus* türleri ile hücre-dışı enzim aktivitesi elde edilememiştir. BAL'ın tetramer yapıya sahip olması ve hücre içinde sentezlenip hücre- dışına aktarılan monomerlerin hücre-dışında tetramer yapıya geçememeleri ve ortamdaki proteaz enzimleri nedeniyle, aktif BAL enzim aktivitesinin çok düşük olduğu sonucuna varılmıştır.

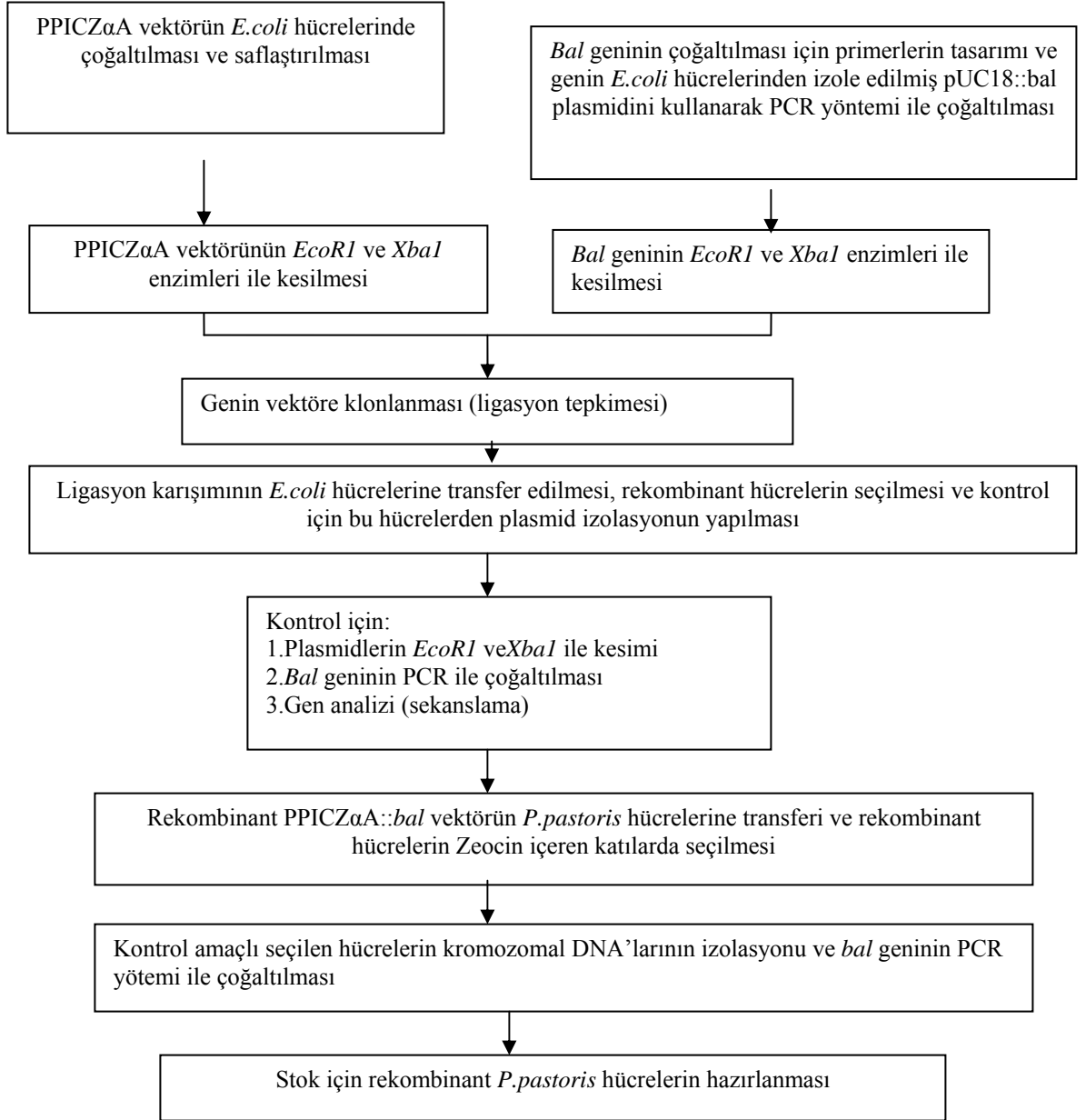
4.1.3 Hücre dışı benzaldehit liyaz üretimi için rekombinant *P. pastoris* geliştirilmesi: Tasarım-III

BAL geninin hücre dışı üretimi için gerekli genlerin sentezlenmesi ve *P.pastoris* ile üretiminin amaçlandığı yeni organize edilen alt programda, BAL enzimini kodlayan gen, rekombinant proteinin hücre dışına taşınımı için gerekli olan sinyal dizini (α -Factor pre-pro) içeren pPICZ α A (Şekil 1e) vektörüne klonlanmış, daha sonra rekombinant vektör, *P. pastoris* hücrelerine aktarılmış ve rekombinant *P.pastoris* elde edilmiştir. Hücre dışı benzaldehit liyaz enzim üretimi için rekombinant mikroorganizma geliştirilmesi çerçevesindeki araştırma planı Şekil 20'de özetlenmiştir.

bal Geninin Çoğaltılması İçin Primer Tasarımı

bal geninin çoğaltılması amacı ile *EcoRI* restriksiyon enziminin tanıdığı dizini içeren *EcoRI-bal* ileri primer, diğeri *XbaI* enziminin tanıdığı dizini içeren *XbaI-bal* geri primer olmak üzere iki primer tasarlanmıştır. Tasarlanan primer dizinleri Şekil 21'te verilmiştir. Primerler Thermo Hybaid GmbH (Almanya) laboratuvarlarında sentezlenmiştir.

Enzim seçiminde iki parametreye dikkat edilmiştir; i) enzimlerin *bal* geninin pPICZαA'ya uygun bir şekilde klonlanmasını sağlamasına, ve ii) *bal* genini kesmeyen enzimler olmasına. 5' uçlara eklenen restriksiyon enzim tanıma dizinleri 'USA Molecular Biology Resources' (<http://www.restrictionmapper.org>) web-sayfasında bulunan, *bal* genini kesmeyen restriksiyon enzimlerden seçilmiştir.



Şekil 20. Rekombinant mikroorganizma geliştirilmesi için uygulanan araştırma planı

Polimeraz Zincir Tepkimesi (PCR) ile *bal* Geninin Çoğaltılması

EcoRI ve *XbaI* kesim dizinlerinin uzantılarını içeren *bal* geni (1730 bç) polimeraz zincir tepkimesi (PCR) ile çoğaltılmıştır. PCR tepkimesi için *EcoRI* restriksiyon konumunu içeren ileri primer ve *XbaI* restriksiyon konumu içeren geri primer gerekli olup, bu primerler yüksek sıcaklıkta birbirinden ayrılmış olan DNA bantlarının zıt kutuplarına bağlanarak polimeraz enziminin DNA sentezine başlamasını sağlar. Böylece oluşan çift bantlı sarmal DNA ikinci döngü ile tekrardan yüksek sıcaklıkta birbirinden ayrılır ve primerlerin bağlanması gerçekleşir ve polimeraz enzim ile DNA sentezi başlar.



❶ Restriksiyon enzim sekansı + *EcoRI-bal* İleri Primer

EcoRI (5'-GAATTC-3')

Sekans: 5' GGAATTCATGGCGATGATTACAGGC 3'

❷ Restriksiyon enzim sekansı + *bal* Geri Primer

XbaI (5'-TCTAGA-3')

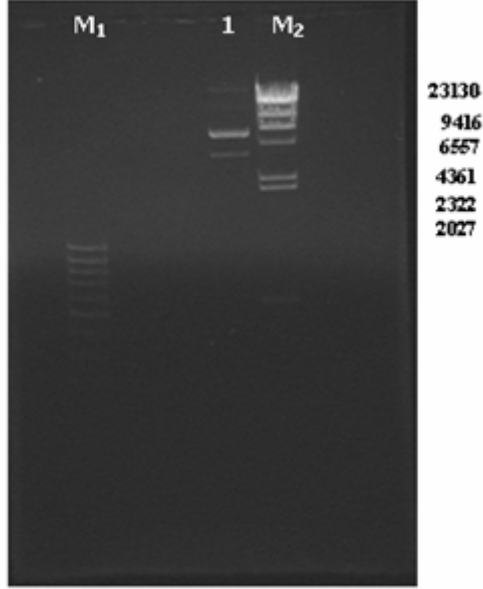
Sekans: 5' GGTCTAGATTAGTGATGGTGATGGTGATG 3'

Şekil 21. *P.pastoris* için tasarlanmış primerlerin şematik olarak gösterimi. 1) *EcoRI* restriksiyon konum dizini *bal* ileri primerin önüne eklenmiştir. İleri primer *bal* geninin tamamlayan sarmalının tamamlayıcısıdır. 2) *XbaI* restriksiyon konum dizini *bal* geninin kodlayan sarmalın tamamlayıcısı olan geri primerin önüne eklenmiştir.

Polimeraz zincir reaksiyonu için parametreler ve karışım oranları **Çizelge 8'** de verilmiştir. *pfu* DNA polimeraz enziminin 3' den 5' e düzeltme özelliği olduğu için doğru *bal* dizine sahip geni elde etmek amacıyla bu enzim kullanılmıştır.

DNA kaynağı olarak kullanılan pUC18::*bal* plasmidin, Mg²⁺ iyonlarının PCR ortamında kullanımını engelleyen ve böylece PCR verimini düşüren proteinlerden, RNA'lardan ve izolasyon için kullanılan bazı kimyasallardan tamamıyla saflaştırılması

ve hücreden izolasyonu için Plasmid Saflaştırma Kit'i (QIAGEN) kullanılmıştır. [Şekil 22](#)'te kesilmemiş pUC18::*bal* plasmidi gösterilmiştir.

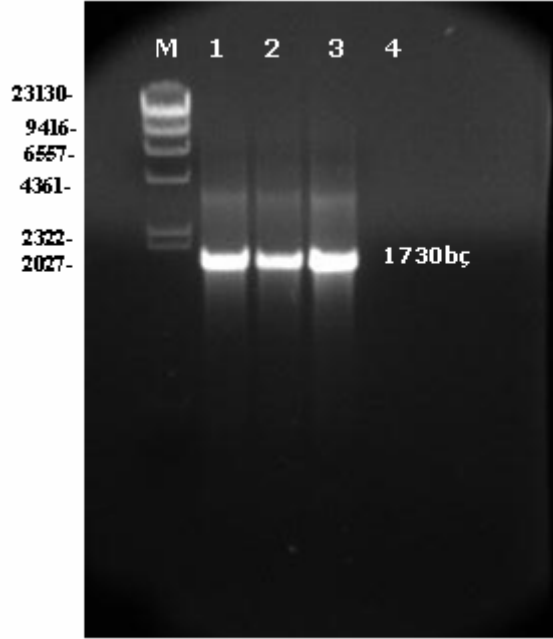


[Şekil 22.](#) pUC18::*bal* plasmidinin jel elektroforez görüntüsü. M1: 50 bp DNA ladder, M2: lambda DNA/HindIII marker, 1: kesilmemiş pUC18::*bal* plasmid

[Çizelge 8.](#) *bal* gen derişiminin artırılması için PCR parametreleri ve karışım oranları

Hedef DNA	PCR parametreleri	PCR tepkimesi karışımı içerikleri:
<i>bal</i> geni	1 Döngü $T_1 = 94^{\circ}\text{C}, 4 \text{ dak}$ 30 Döngü $\left\{ \begin{array}{l} T_1 = 94^{\circ}\text{C}, 1 \text{ dak} \\ T_2 = 60^{\circ}\text{C}, 1 \text{ dak} \\ T_3 = 72^{\circ}\text{C}, 2 \text{ dak} \end{array} \right.$ 1 Döngü $\left\{ \begin{array}{l} T_4 = 72^{\circ}\text{C}, 10 \text{ dak} \\ T_5 = 4^{\circ}\text{C}, 5 \text{ dak} \end{array} \right.$	10XPCR Tamponu 5 μl dNTPs (1mM) 10 μl İleri Primer (10 μM) 1 μl Geri Primer (10 μM) 1 μl Kaynak DNA ~60ng pUC18:: <i>bal</i> 1 μl dH ₂ O 31 μl <i>Pfu</i> DNA polimeraz (2.5 U/ μl) 1 μl

Şekil 23, tasarlanan primerlerle çoğaltılan *bal* geni beklenen büyüklükte (1730 bç) olduğunu göstermektedir.



Şekil 23. *bal* geninin jel elektroforezde görünümü. M: LamdaDNA/HindIII Marker, 1-3: *pfu* polimeraz enzimi ile çoğaltılmış *bal* geni, 4:Negatif control (DNA yok)

Restriksiyon Enzim kesimi ve ligasyon

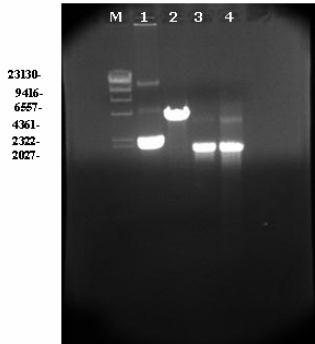
PCR ile çoğaltılmış ve PCR saflaştırma Kiti (QIAquick) ile saflaştırılmış 1.7 kb büyüklüğündeki *bal* geni, ve plasmid saflaştırma Kiti (QIAGEN) ile izole edilmiş pPICZαA vektörü ayrı ayrı 37 °C de özel tamponlar içeren 20 µl'lik reaksiyon hacminde *EcoRI* ve *XbaI* enzimleri ile 12 saat kesilmiştir. *bal* geni ve pPICZαA için *EcoRI* ve *XbaI* restriksiyon enzimleri ile kesim reaksiyon bileşimi sırasıyla Çizelge 9 ve 10 'da verilmiştir. Reaksiyon sonunda, tepkime ortamı 65 °C de yaklaşık 20 dakikada bekletilerek enzimler deaktive edilmiştir. Şekil 24'da *bal* geninin ve pPICZαA vektörünün restriksiyon enzimlerle kesildikten sonraki jel elektroforezdeki görüntüleri verilmiştir.

Çizelge 9. *bal* geni ve pPICZαA için *EcoRI* restriksiyon enzim ile kesim reaksiyon bileşenleri

	<i>bal</i> geni	pPICZαA
Bileşenler	Miktar	Miktar
DNA parçası	~ 150 ng	~ 150 ng
<i>EcoRI</i> RE (10U/ µl)	1µl	1µl
10X <i>EcoRI</i> Tamponu	2µl	2µl
dH ₂ O	19µl' ye kadar	19µl'ye kadar

Çizelge 10. *bal* geni ve pPICZαA için *XbaI* restriksiyon enzim ile kesim reaksiyonun bileşenleri

	<i>bal</i> geni	pPICZαA
Bileşenler	Miktar	Miktar
DNA parçası	~ 150 ng	~ 150 ng
<i>XbaI</i> RE (10U/ µl)	1µl	1µl
10X Tango Tamponu	2µl	2µl
dH ₂ O	19µl' ye kadar	19µl'ye kadar



Şekil 24. *bal* geninin ve pPICZαA vektörünün restriksiyon enzimlerle kesildikten sonraki jel elektroforezdeki görüntüleri. M: lambda DNA/HindIII Marker, 1: Kesilmemiş pPICZαA vektörü, 2: *EcoRI* ve *XbaI* enzimleri ile kesilmiş pPICZαA vektörü, 3: *EcoRI* ve *XbaI* ile kesilmiş ve saflaştırılmış *bal* geni, 4: *EcoRI* ve *XbaI* ile kesilmiş *bal* geni.

Ligasyon tepkimesi için gen miktarı denklemde de görüldüğü gibi reaksiyon karışımına gen/vektör oranı 1/3 olacak şekilde belirlenmiştir.

$$100 \text{ ng vektör} \times \frac{1.7 \text{ bç (} ba/ \text{ geni)}}{3.5 \text{ bç (vektör)}} \times \frac{3}{1} = 145.1 \text{ ng } ba/ \text{ geni}$$

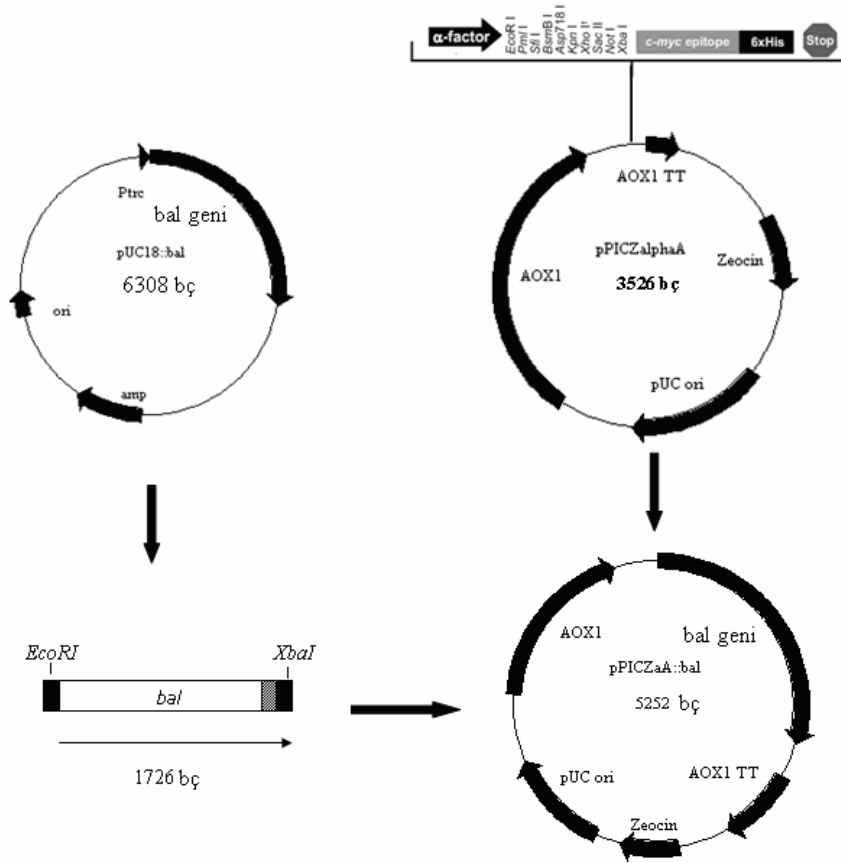
Ligasyon reaksiyonu hacmi 10 µl olacak şekilde hazırlanıp 16 °C de 16 saat bekletilerek gerçekleştirilmiştir (Çizelge 11). pPICZαA::*ba/* plasimidinin tasarım şeması Şekil 25’de gösterilmiştir.

Çizelge 11. pPICZαA::*ba/* için 1/3 oranındaki ligasyon reaksiyon koşulları

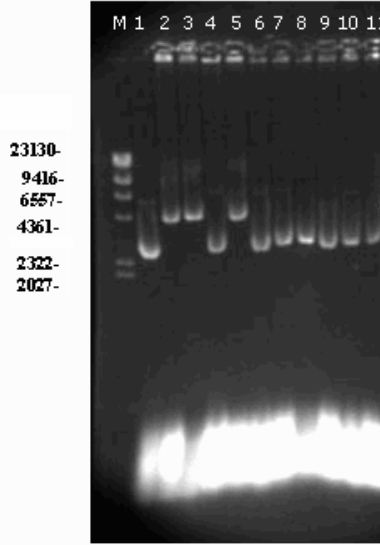
10X ligasyon tamponu	: 1µl
Klonlanacak DNA (1730 bç)	: 145 ng
Restriksiyon enzimleri ile kesilmiş vektör DNA (3536 bç)	: 100 ng
T4 DNA ligaz	: 1µl
Steril dH ₂ O	: 10 µl’ye

pPICZαA::*ba/* plasmidinin *E.coli* mikroorganizmasına aktarılması ve kolonilerin seçilmesi

Rekombinant plasmidlerin belirlenmesi için, ligasyon ürün karışımı *E. coli* JM109 ‘a CaCl₂ yöntemi ile aktarılmış ve koloniler Zeosin (0.025 kg m⁻³) içeren katı ortamda 12-18 saat çoğaltılmıştır. 32 koloni seçilmiş ve plasmid izolasyonu için tekrar çoğaltılmışlardır. Olası rekombinant kolonilerden üç koloninin pPICZαA vektöründen daha büyük moleküler ağırlığa sahip olduğu gözlenmiştir (Şekil 26). Bu üç koloni daha sonraki kontrol deneyleri ve uzun süre saklayabilmek için tekrar çoğaltılmışlardır.



Şekil 25. *P.pastoris* ile benzaldehit liyaz enzimi üretimi için pPICZaA::bal plasmid tasarımının şematik gösterimi. EcoRI ve *XbaI* ile kesilmiş 1726 bç büyüklüğündeki *bal* geni aynı restriksiyon konumları içeren pPICZaA vektörüne klonlanmıştır. Transkripsiyon yönü oklarla belirtilmiştir. Taralı bölge poly-his kuyruğunu belirtir; TT, transkripsiyon bitiş bölgesi; ori, *E.coli'* deki replikasyon başlangıç bölgesi.

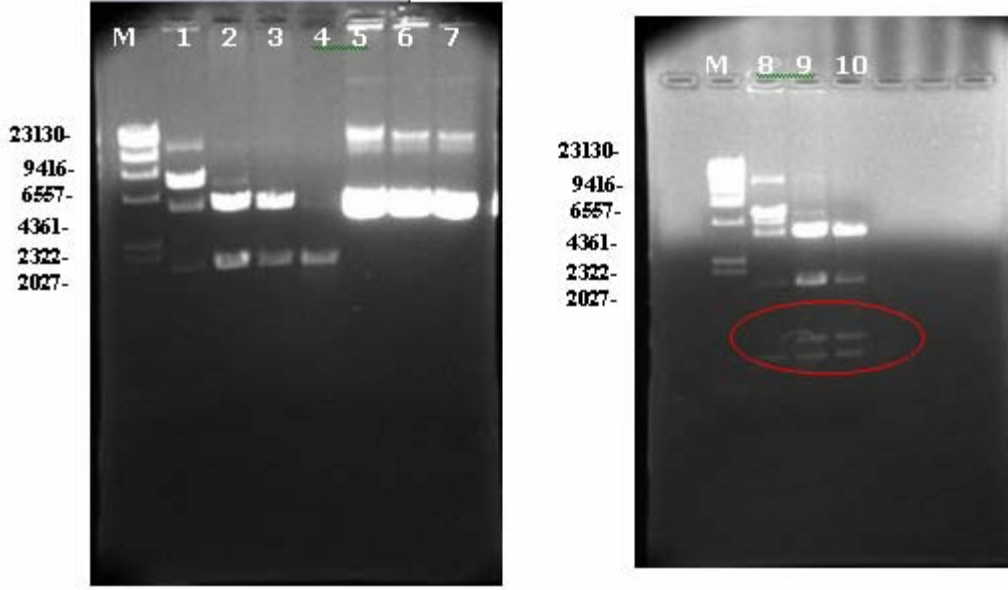


Şekil 26. Olası rekombinant plasmidler M: λ DNA/HindIII DNA Marker; 2-3-5: Olası rekombinant plasmidler

Olası rekombinant plasmidler öncelikle *EcoRI*, *XbaI* ve *PstI* restriksiyon enzim kesimleri ile kontrol edilmişlerdir. *bal* geninin restriksiyon enzimleri ile muamele bileşenleri Çizelge 12' de verilmiştir. *PstI* restriksiyon enzimi *bal* genini 938. bazından kesmektedir ve *bal* geni 778bp ve 938bp olmak üzere iki DNA parçası halinde agaroz jel elektroforezinde görülmesi beklenmektedir (Şekil 27).

Çizelge 12. Olası rekombinant pPICZaA vektörünün *EcoRI*, *XbaI* and *PstI* restriksiyon enzimleri ile kesilme reaksiyonunun bileşenleri

Bileşenler	Miktarlar	Bileşenler	Miktarlar	Bileşenler	Miktarlar
DNA parçası	~ 120 ng	DNA parçası	~ 120 ng	DNA parçası	~ 120 ng
<i>XbaI</i> RE (10U/ μ l)	1.5 μ l	<i>PstI</i> RE (10U/ μ l)	1.5 μ l	<i>EcoRI</i> RE(10U/ μ l)	1.5 μ l
10XTangoTamponu	2 μ l	10XTangoTamponu	2 μ l	<i>EcoRI</i> Tamponu	2 μ l
dH ₂ O	19 μ l	dH ₂ O	19 μ l	dH ₂ O	19 μ l



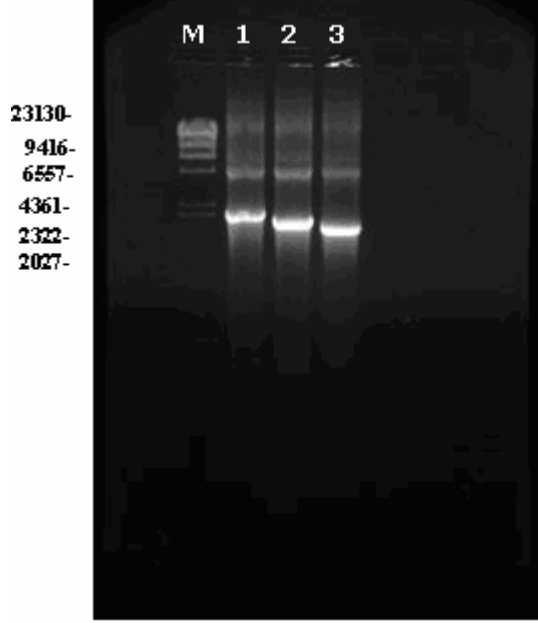
Şekil 27. pPICZαA::*bal* plasmidinin restriksiyon enzimleri ile kesildikten sonraki agarose jel elektroforez görüntüsü. M: λDNA/HindIII Marker; 1: Birinci olası pPICZαA::*bal* plasmidi *EcoRI* and *XbaI* restriksiyon enzimleri ile kesilmiş görüntüsü; 2: İkinci olası pPICZαA::*bal* plasmidi *EcoRI* and *XbaI* restriksiyon enzimleri ile kesilmiş görüntüsü; 3: Üçüncü olası pPICZαA::*bal* plasmidi *EcoRI* and *XbaI* restriksiyon enzimleri ile kesilmiş görüntüsü; 4: *bal* geni pUC18::*bal* plasmidinden çoğaltılmış görüntüsü; 5-7: Kesilmemiş olası pPICZαA::*bal* plasmidleri; M: λDNA/HindIII Marker; 8-10: Olası pPICZαA::*bal* plasmidlerinin *EcoRI*, *XbaI* and *PstI* restriksiyon enzimleri ile kesilmiş görüntüsü.

EcoRI ve *XbaI* restriksiyon enzimleri ile yapılan kesme işlemi beklendiği gibi *bal* geni ile aynı büyüklükte elde edilmiştir, 1730 bç. Agaroz jel elektroforez sonuçları *bal* geninin vektör plasmide klonlandığını kanıtlamıştır (Şekil 28).

Olası recombinant üç koloni, PCR tepkimesi ile de *bal* geninin varlığını araştırmak amacı ile tekrar kontrol edilmişlerdir. Primerler ve beklenen PCR ürünleri Çizelge 13'da listelenmiştir. Agaroz jel electroforez görüntüsü (Şekil 28) *bal* geninin bu plasmidlerde olduğunu göstermiştir.

Çizelge 13. Primerler ve beklenen PCR ürünleri baz uzunlukları

İleri Primer	Geri Primer	Beklenen Uzunluk(bç)
5' AOX primeri	<i>bal</i> geni primeri	2085
<i>bal</i> geni primeri	3' AOX primeri	1899
<i>bal</i> geni primeri	<i>bal</i> geni primeri	1726



Şekil 28. pPICZαA::*bal* plasmidinin PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. M: λDNA/HindIII Marker; 1: pPICZαA::*bal* plasmidinin 5'-AOX1 ileri primeri ve *XbaI-bal* geri primeri ile yapılan PCR ürünü 2: pPICZαA::*bal* plasmidinin 3'-AOX1 geri primeri ve *EcoRI-bal* ileri primeri ile yapılan PCR ürünü 3: pPICZαA::*bal* plasmidinin *EcoRI-bal* ileri primeri ve *XbaI-bal* geri primeri ile yapılan PCR ürünü (*bal* geni).

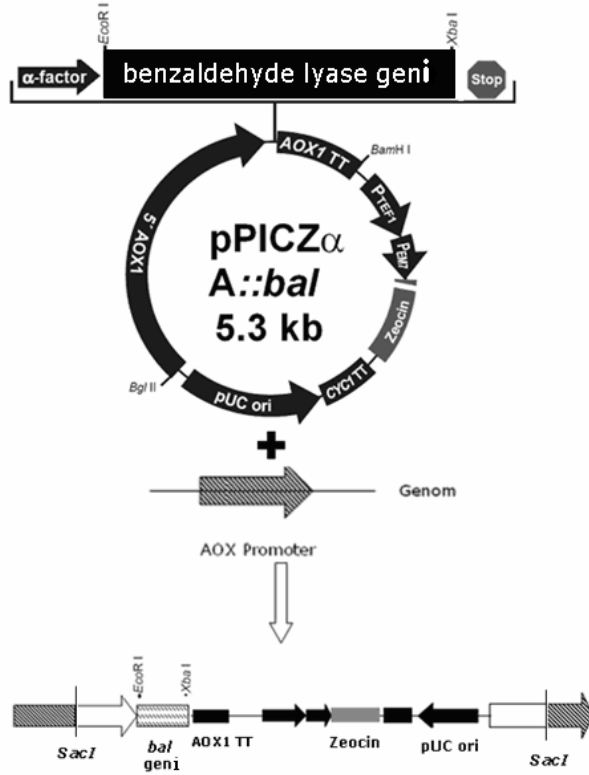
Klonlanan genin DNA dizi sekansı otomatik DNA sekans cihazı ile (Microsynth GmbH, İsviçre) AOX primerleri kullanılarak bir daha kontrol edilmiştir. Sonuçlar klonlama çalışmasının başarılı olduğunu ve klonlanan genin *bal* geni sekans ile aynı olduğunu kanıtlamıştır.

pPICZaA::*bal* plasmidinin *P.pastoris* hücrelerine aktarılması

pPICZaA::*bal* plasmidinin *P. pastoris* genomuna entegrasyonu şematik olarak [Şekil 29](#)'de gösterilmiştir. pPICZaA vektörü bir entegrasyon vektörüdür ancak vektörün ilk önce AOX promoter kısmında lineer hale getirilmelidir daha sonra genoma AOX lokusundan entegre olabilir. *SacI* restriksiyon enzimi pPICZaA::*bal* plasmidini lineer hale getirmek için tek-kesici olarak seçilmiştir. pPICZaA::*bal* plasmidi *SacI* restriksiyon enzimi [Çizelge 14](#)'de verilen koşullarda tam olarak kesilmiş ve bu tam kesim agaroz jel elektroforezi ile doğrulanmıştır. Daha sonra kesim ürünü agaroz jelden çıkarılarak saflaştırılmıştır. Verimli bir aktarım için kesilmiş plasmidin derişimi 0.1-0.2 µg/µl olarak ayarlanmıştır.

[Çizelge 14.](#) pPICZaA::*bal* plasmidinin lineerizasyonu için *SacI* restriksiyon enzimi ile kesim reaksiyon bileşenleri

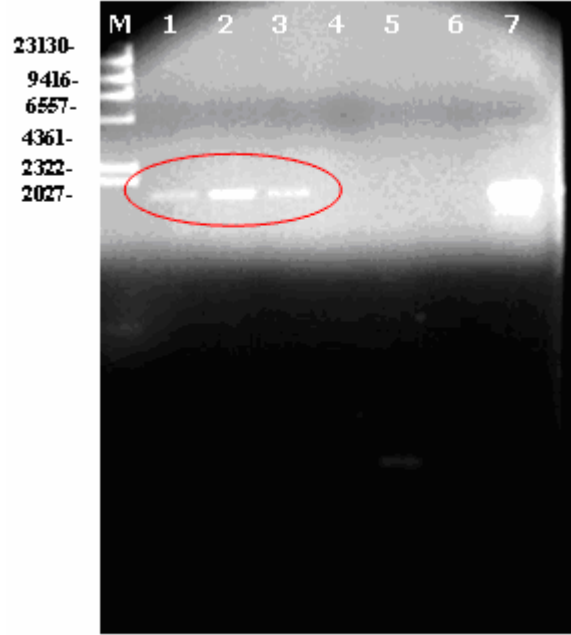
Bileşenler	Miktar
DNA parçası	~ 150 µg/µl
<i>SacI</i> RE (10U/ µl)	1µl
10X <i>SacI</i> Tamponu	2µl
dH ₂ O	19µl'ye kadar



Şekil 29. pPICZαA::bal plasmidinin *P. pastoris* genomuna entegrasyonunun şematik gösterimi. Rekombinant plasmid *SacI* restriksiyon enzimi ile genomu entegre olabilmesi amacı ile her iki ucunda da AOX promoter bölgesine benzer sekanslar bulunacak biçimde kesilmiştir. Plasmidin genomu entegrasyonundan sonra genomda AOX promoterun iki işlevsel kopyası oluşmuştur.

Aktarım LiCl_2 yöntemi ile yapılmıştır. 30°C 'da $t=60$ st'te altı ayrı koloni oluşmuş ve bu koloniler doğrulama testleri için tekrar çoğaltılmışlardır. Seçilen koloniler YPD + Zeosin (0.100 kg m^{-3}) katı besiyerinde kısa süreli saklama için çoğaltılmış daha sonra 10 ml YPD + Zeosin sıvı besiyerine aktarılmışlardır. Seçilen kolonilerin genomik DNA molekülleri PCR tepkimesi ile aktarımın kontrolü için izole edilmiştir.

Seçilen altı olası koloni içerisinde yalnızca üç koloni klonlama bal genini taşımaktadır (Şekil 30).



Şekil 30. *P.pastoris* kolonilerinin genomik DNA'ları ile *bal* geni için yapılan PCR tepkimesinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. M: λ DNA/HindIII Marker; 1: Birinci koloninin PCR ürünü; 2: İkinci koloninin PCR ürünü; 3: Üçüncü koloninin PCR ürünü; 4: Dördüncü koloninin PCR ürünü; 5: Beşinci koloninin PCR ürünü; 6 Altıncı koloninin PCR ürünü; 7: pozitif kontrol olarak *bal* geni

4.1.3.1 Rekombinant *P. pastoris* hücreleri ile benzaldehit liyaz üretimi

Benzaldehit liyaz enzim (BAL) geni *bal*'i taşıyan rekombinant *P.pastoris* hücrelerinin ürettiği hücre dışı benzaldehit liyaz üretimi için yapılan BAL üretim deneylerinde kullanılan katı çoğalma ortamının bileşimi [Çizelge 15](#)'de verilmiştir. Mikroorganizma çoğalması ve enzim üretiminde kullanılan ön-sıvı ortamın bileşimi [Çizelge 16](#)'de verilmiştir.

Katı ortamda çoğalmalarını 30°C'de 48 st'te tamamlayan hücreler, $V_R=10 \text{ cm}^3$ hacimli ön-sıvı ortamı içeren mikrobiyolojik hava filtreli $V=150 \text{ cm}^3$ hacimli kesikli biyoreaktöre steril koşullarda aktarılmış ve sıcaklığı 30°C, karıştırma hızı $N=225 \text{ dk}^{-1}$ olan orbital karışmalı inkübatörde $t=24 \text{ st}$ süreyle çoğaltılmışlardır.

Çizelge 15. Rekombinant *P.pastoris* için katı çoğalma ortamı

Bileşen	Derişim, kg m ⁻³
Maya özütü	10.0
Peptone	20.0
Glukoz	20.0
Agar	20.0
Zeosin	0.100
Kloramfenikol	0.035

Çizelge 16. Rekombinant *P.pastoris* için ön-sıvı çoğalma ortamı (BMGY).

Bileşen	Derişim, kg m ⁻³
Maya özütü	10.0
Peptone	20.0
Potasyum fosfat tamponu (pH 6.0)	0.1 M
Amino asitsiz maya özütü (Yeast nitrogen base: YNB)	13.4
Biyotin	4×10 ⁻⁵
Gliserol	10.0
Zeosin	0.100

Çizelge 17. BAL üretimi için rekombinant *P.pastoris* kompleks üretim ortamı (BMMY)

Bileşen	Derişim, kg m ⁻³
Maya özütü	10.0
Peptone	20.0
Potasyum fosfat tamponu (pH 6.0)	0.1 M
Amino asitsiz maya özütü (Yeast nitrogen base: YNB)	13.4
Biyotin	4×10 ⁻⁵
1 Metanol	10.0
Zeosin	0.100

Çoğalan hücreler $+4^{\circ}\text{C}$ ' da 4000 rpm'de 10 dk santrifüjlenerek on-sıvı ortamdan ayrıldıktan sonra Çizelge 17'de bileşimi verilen, $V_R=50\text{ cm}^3$ hacimli üretim ortamı içeren mikrobiyolojik hava filtreli $V=150\text{ cm}^3$ hacimli kesikli biyoreaktöre steril koşullarda aktarılmış ve sıcaklığı 30°C , karıştırma hızı $N=225\text{ dk}^{-1}$ olan orbital karışmalı inkübatörde $t=24$ st BAL üretimi gerçekleştirilmiştir. Hücreler üretim ortamından santrifüjlenerek ayrıldıktan sonra BAL üretim ortamı analizler için kullanılmıştır.

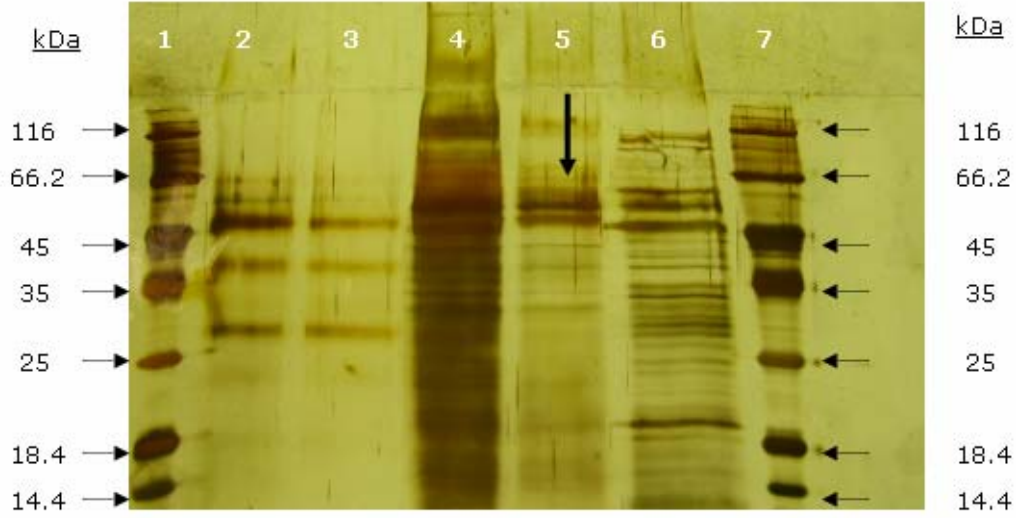
Benzaldehit Liyaz Enziminin SDS-PAGE ile Analizi

Benzaldehit liyaz enziminin derişiminin artırılması için ultrafiltrasyon sistemi kullanılmıştır. Benzaldehit liyaz enziminin monomer yapısının moleküler ağırlığı 59 kDa olması nedeniyle herhangi bir kayıp yaşanmaması için 10 kDa ve 30 kDa'luk ultrafiltrasyon membranları kullanılmıştır. Rejenere sellüloz membran proteinleri adsorbe etmeden tutma kapasitesi bakımından polietersülfon membrana karşı yüksek olması nedeniyle tercih edilmiştir. Üretim ortamındaki BAL enzimini proteolitik parçalanmadan korunmak amacı ile ultrafiltrasyon ile deriştirme deneyleri $T=2-8^{\circ}\text{C}$ arasında yapılmıştır. Örnekler tüm ara-işlemlerde buz üzerinde saklanmıştır.

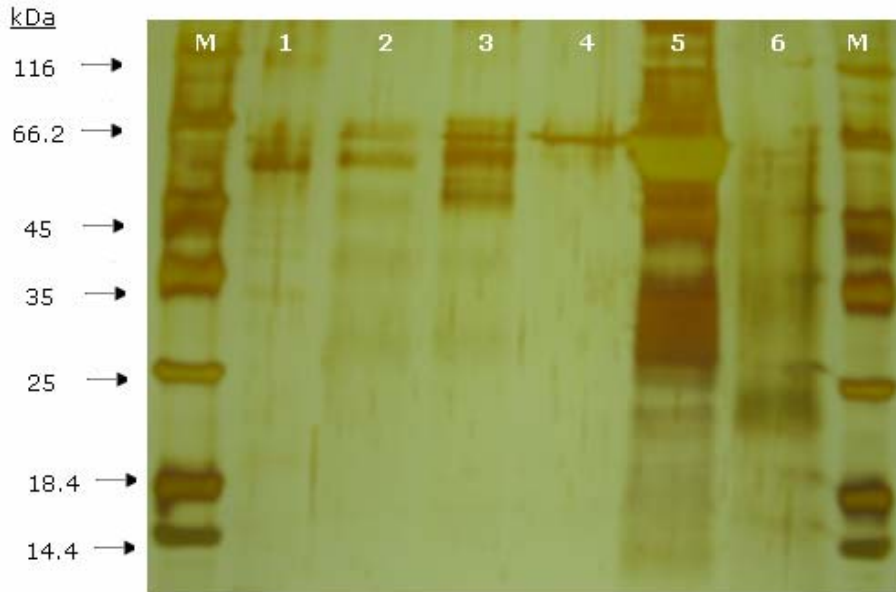
Polihistidin uzaması içeren benzaldehit liyaz enzimi konsantre edildikten sonra doğal yapısını bozmayacak şekilde QIAexpress Nİ-NTA (Qiagen, Almanya) saflaştırma kolonları (Şekil 31) ve kobalt bazlı metal ilgi rezineleri (BD Talon, İngiltere) ile saflaştırılmıştır (Şekil 32).

Benzaldehit liyaz enziminin elektroforez sisteminde analizi, enziminin indirgeyici ajanı olan sodium-dodesil-sülfat ve ısı uygulaması ile monomerlerine ayrıldıktan sonra poliakrilamid jel vasıtası ile yapılmıştır. Elektroforez uygulamasından sonra, jelde ayrılan proteinler gümüş boyama yöntemi yardımıyla görünür hale getirilmiştir. Enzim SDS içeren poliakrilamid jelde monomer yapıda yürümüş ve yaklaşık 59 kDa moleküler büyüklüğe sahip olduğu gözlenmiştir. Sonuç literatürle uyum içindedir.

SDS-PAGE sonuçları his-tag saflaştırmasının %100 verimli olmadığını göstermiştir, saflaştırma kolonları sadece benzaldehit liyazı değil, yapılarında histidin içeren proteinleri de tutmuştur. Şekil 33'te benzaldehit liyaz enzim bandının derişiminin zamanla azaldığı ve diğer bantların derişimlerinin arttığı gözlenmiştir. Bunun nedeni, rekombinant *P.pastoris* tarafından üretilen hücre dışı proteazların BAL enzimini parçalamasıdır.

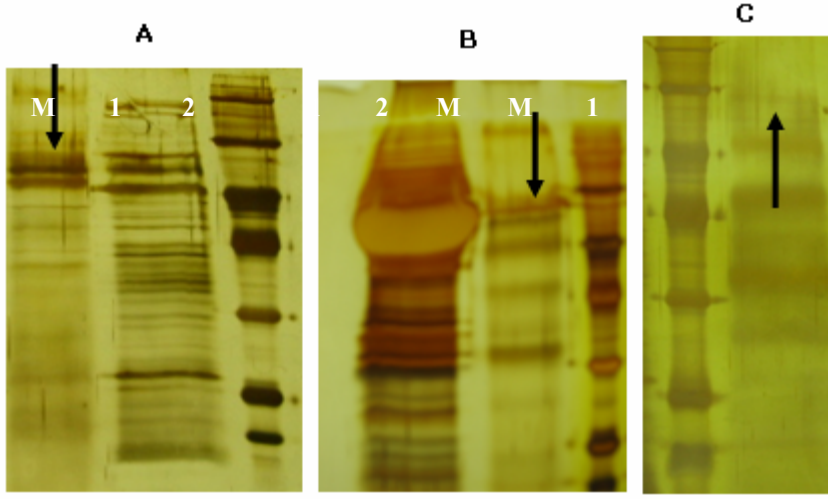


Şekil 31. Rekombinant *P.pastoris* hücrelerinin hücre dışı proteinlerinin SDS-PAGE analizleri. 1: Protein Markeri; 2: üretim ortamı; 3: üretim ortamı; 4: konsantre süpernatant; 5: Rekombinant *P.pastoris* tarafından üretilen saflaştırılmış benzaldehit liyaz; 6: saflaştırma kolonundan ikinci elüsyon; 7: Protein Markeri



Şekil 32. Benzaldehit liyaz enziminin SDS-PAGE görüntüsü. M: Protein Markeri; 1: üretim ortamı; 2: BD Talon yöntemi ile saflaştırılmış benzaldehit liyaz; 3: BD Talon yöntemi ile saflaştırılmış benzaldehit liyaz ikinci; 4: BD Talon yöntemi ile saflaştırılmış benzaldehit liyaz üçüncü; 5: pUC18::*bal* plazmitini taşıyan *E.coli* K12

hücrede üretilen benzaldehit liyaz enzimi; 7: kontrol olarak doğal tip *P.pastoris*;
M: Protein Markerı



Şekil 33. Proteolitik aktiviteyi gösteren SDS-PAGE görüntüsü. A jeli: 1: saflaştırmanın birinci günü; 2: saflaştırma kolonundan ikinci elüsyon; M: Protein Markerı, B jeli: 1: *E.coli* BL21 hücrede üretilen BAL enzimi; 2: saflaştırmanın ikinci günü; M: Protein Markerı C jeli: M: Protein Markerı; 1: saflaştırmanın ikinci günü

SDS-PAGE sonuçları benzaldehit liyaz enziminin *P.pastoris* ile hücre dışı olarak üretildiğini göstermiştir. Ancak SDS-PAGE analizleri ile proteinlerin sadece monomerik yapıları görülebilmektedir. Bu nedenle tetramer (çoklu yapının) araştırılması için FPLC analizleri yapılmıştır.

***P.pastoris* Tarafından Üretilen Hücre Dışı Proteinlerin FPLC ile Analizi**

Rekombinant *P.pastoris* ile üretilen hücre dışı proteinlerin belirlenmesi amacı ile üretim ortamı FPLC ile analizlenmiştir. Rekombinant *P.pastoris* hücreleri Çizgele 17'te bileşimi verilen üretim ortamında çoğaltılarak t=24 st BAL üretimi gerçekleştirildikten sonra üretim ortamı santrifüjlenmiş ve ortam FPLC analizi için kullanılmıştır. Üretim tamamlandıktan sonra ilk aşamada *P.pastoris* üretim ortamı t=7 st dondurularak kurutularak üretim ortamı 25 kat değiştirilmiştir. Örnekler 0.20 µm filtrelerde (Sartorius) süzülmuş ve moleküler ağırlıklarına göre proteinleri ayıran Hiload 16/60 superdex 200pg kolonuna yüklenmiştir. Analiz 0.5 ml dk⁻¹ akış hızında yapılmış ve UV dedektör (λ=280 nm) kullanılmıştır. Ayırma işlemi +4°C de gerçekleştirilmiştir (Şekil 34). Standart proteinlerin elüsyon zamanları Şekil 4'te kırmızı daire içerisine alınmıştır.

t=141 dk'daki pik monomer benzaldehit liyaz enzimine t=115 dk'daki pik benzaldehit liyaz enziminin tetramer formuna karşılık gelmektedir (Şekil 34). FPLC sonuçlarına göre *P.pastoris* hücresinin hücre dışı ürettiği BAL enzimi çoğunlukla monomer formda kalmış fermentasyon ortamında tetramer yapısını alamamıştır.

Çizelge 18. FPLC analizi için standart proteinlerin moleküler büyüklükleri ve elüsyon zamanları

	Moleküler büyüklük(kDa)	Zaman (Dk)
Ferritin	440	103
Albümin	67	140
Riba MA	13.7	198

Benzoin Kondansasyon Reaksiyonu İçin İnce Tabaka Kromatografisi

Analizleri

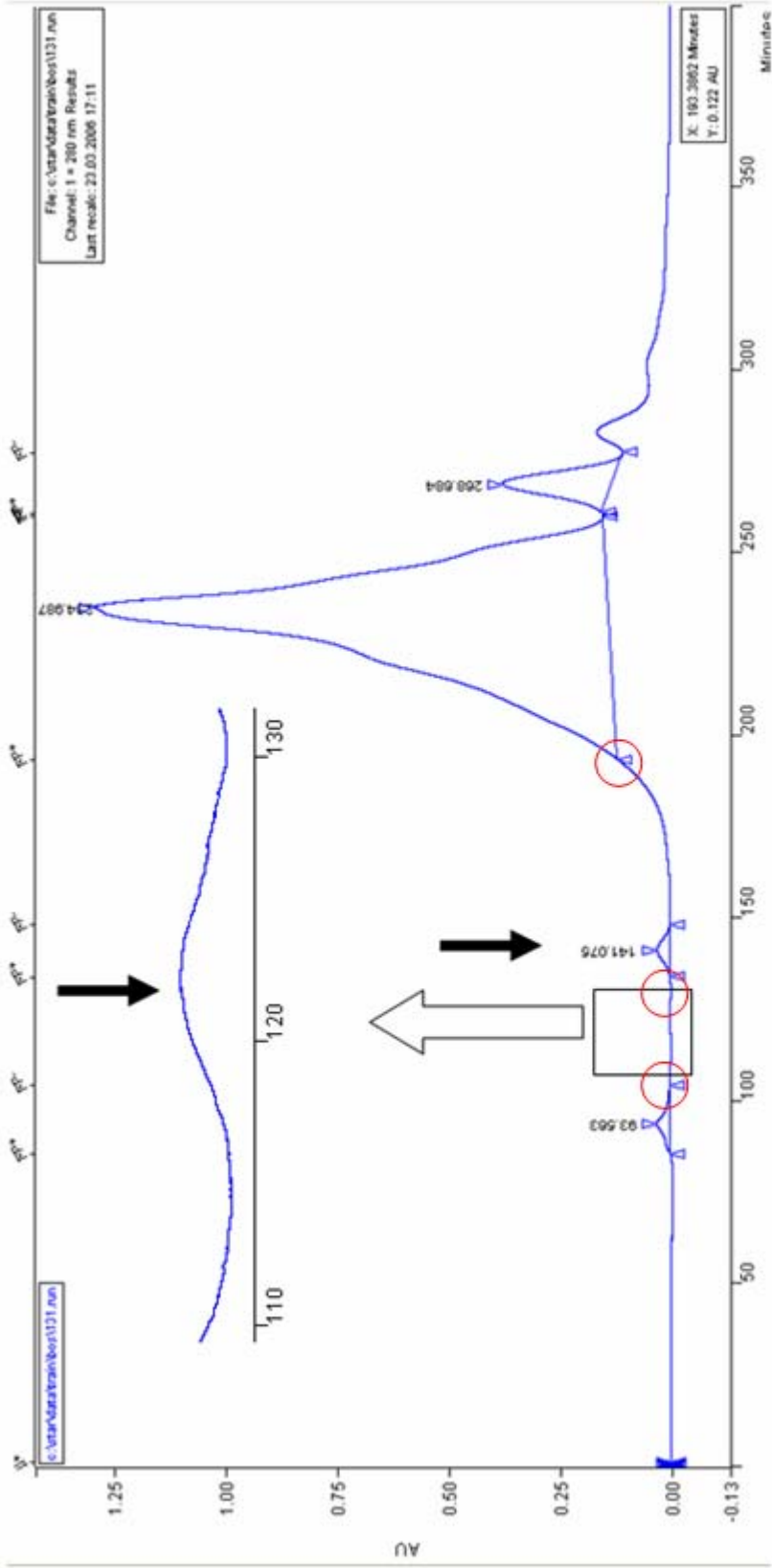
İnce tabaka kromatografisi benzaldehitten benzoine dönüşüm reaksiyonunun izlenmesi amacı ile yapılmıştır. Örnekler reaksiyon ortamından t=1 st ve t=24 st'te alınmıştır. Benzaldehit, benzoin ve reaksiyon ürünleri F₂₅₄ jel tabakaları ile Ethil asetat: kloroform [3:1 (v/v)] kullanılarak analizlenmiştir. Tepkime girdi ve ürünleri Çizelge 19'te gösterilmiştir. II. kondenzasyon tepkimesi Maria vd., (2006) tarafından bulunan optimum koşullarda gerçekleştirilmiştir.

Benzaldehit ve benzoin standartları ve tepkime ürünleri Şekil 35'te gösterilmiştir. Hücre dışı benzaldehit liyaz enzimi substratı benzoin ile tepkimeye girmiştir. Ancak Maria vd (2006) tarafından belirtilen optimum benzaldehit konsantrasyonu aktivite tepkimesi için uygun koşullar olmadığı bulunmuş; %20 DMSO ve ve 90 mM benzaldehit derişiminin enzim akarlılığı için Maria vd (2006) ortamına kıyasla daha iyi olduğu bulunmuştur.

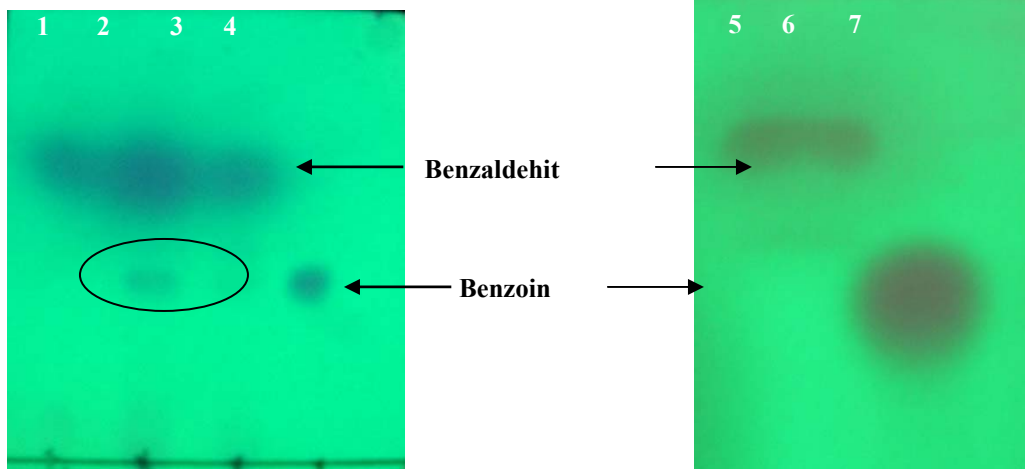
Çizelge 19. Benzoin kondansasyon reaksiyon girdileri

Bileşen	Derişim	
	I	II
ThDP*	1 mM	1 mM
Mg ²⁺	0.5 mM	0.5 mM
DMSO**	20%	30%
Benzaldehit) mM)mM

*ThDP: Tiyamin difosfat; **DMSO: Dimetil Sülfoksit



Görüntü 4.33 Rekombinant *P. pastoris* hücrelerce üretilen hücre dışı proteinlerin FPLC kromatogramı



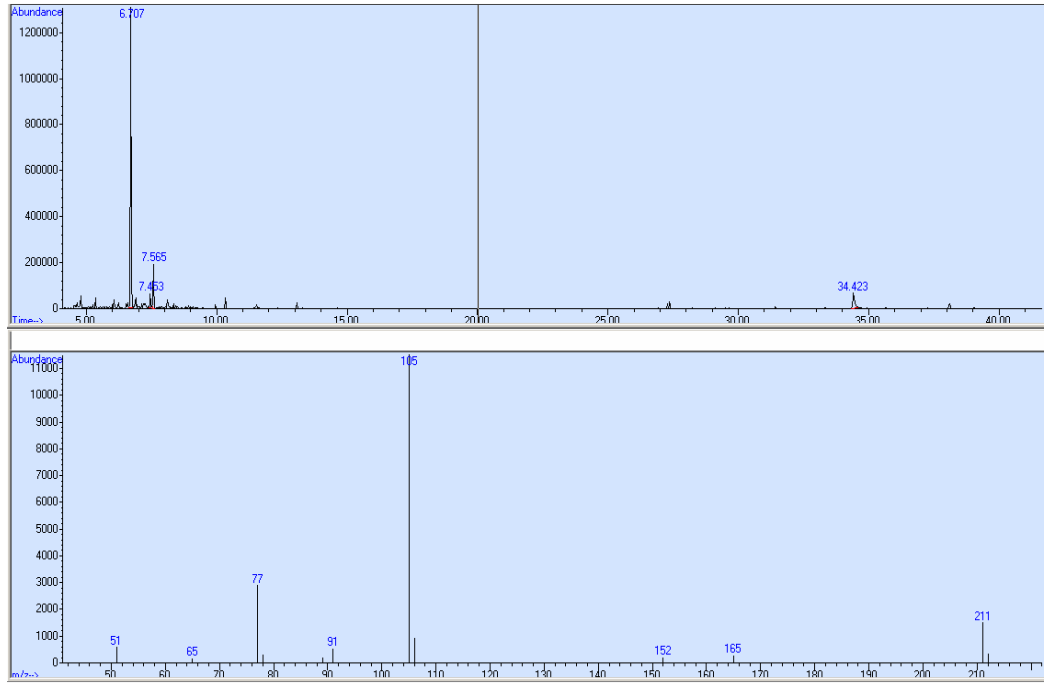
Şekil 35. Benzoin dönüşüm reaksiyonunun TLC sonuçları. 1: Benzaldehit standartı; 2: Birinci reaksiyon karışımı; 3: ikinci reaksiyon karışımı; 4: Benzoin standartı; 5: Benzaldehit standartı; 6: Doğal *P.pastoris*; 7: Benzoin standartı

Benzoin Kondansasyon Tepkimesi Analizi : GC-MS

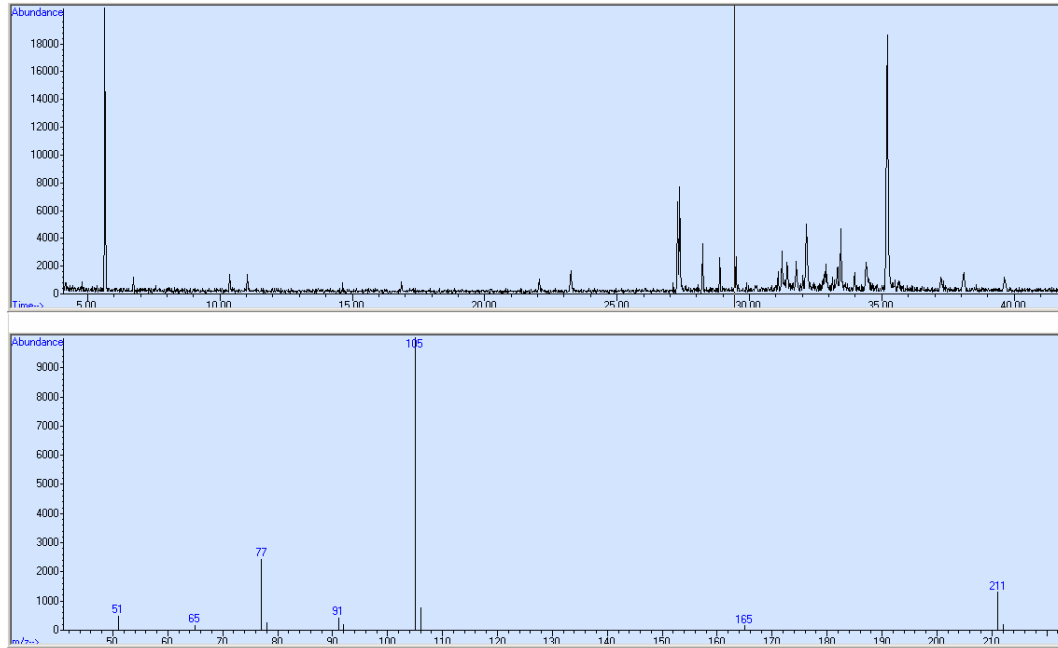
TLC analizlerinde kullanılan tepkime ürün karışımları GC-MS ile de analizlenmiştir. Reaksiyon ortamı etil asetat ile ayrıştırılmıştır. Geride kalan DMSO'nun ortamdan uzaklaştırılması için organik faz su ile defalarca yıkanmıştır. Organik faz magnezyum sülfat ile kuruttuktan ve çözücü düşük basınç altında ortamdan uzaklaştırılarak oluşan ürünler silica kolon ile ortamdan uzaklaştırılmıştır. GC-MS analizlerinde kolona giriş sıcaklığı 2 dk boyunca 60 °C de sabit tutulduktan sonra 5°C/dk olacak şekilde 240°C yükseltilmiş ve 12 dakika boyunca bu sıcaklıkta tutulmuştur.

Şekil 36 ve 37'de benzoin ve benzaldehitin kolon içinde kalma süresi ve zebron kolondan (60 m) elde edilen kütle spektrum değerleri gösterilmiştir. 211, 195, 181,165, 135 ve 119 tepe noktaları benzoinin moleküler spectrum değerleridir benzoin kolondan 28-34 dakikalar arasında çıkmıştır. 105, 90, 77 ve 65 tepe noktaları benzaldehitin moleküler spectrum değerleridir. Benzaldehit kolondan 18-25 dakikalar arasında çıkmıştır. Şekil 36 ve 37'de görüldüğü gibi benzoin kondensasyon tepkimesi gerçekleşmiş ancak benzaldehit molekülleri tamamen benzoine dönüşmemiştir.

GC-MS ve TLC sonuçları, benzoin kondensasyon tepkimesinin gerçekleştirildiğini göstermiştir. Hücre dışı benzaldehit liyaz enzimi benzaldehit ile reaksiyona girmiş ve onu benzoine dönüştürmüştür.



Şekil 36. I. benzoin kondenzasyon tepkime ürünü analizi GC-MS kromatogramı



Şekil 37. II. benzoin kondenzasyon tepkime ürünü analizi GC-MS kromatogramı

4.2 Rekombinant *E.coli*, *B. subtilis*, *P.pastoris*'ın BAL üretim Performanslarının Kıyaslanması

bal geni üç alternatif konak hücre *E.coli*, *B. subtilis* ve *P.pastoris*'e klonlamıştır. BAL enzim yapısının tetramer olmasından dolayı rekombinant *B. subtilis* ile elde edilememiş, *P.pastoris* ile düşük BAL aktivitesi elde edilmiştir. Hücre içi üretimin gerçekleştiği *E.coli* ile en yüksek üretim ve aktivite elde edilmiş; pRSETA::*bal* plasmidini taşıyan konak hücre olarak seçilmiş ve biyoreaktör işletim parametrelerinin BAL üretimine etkisi pRSETA::*bal* taşıyan *E. coli* BL21 (DE3) pLySs ile araştırılmıştır.

4.3 pRSETA::*bal* Plasmidini Taşıyan *E. coli* Hücreleri ile BAL üretimi

Benzaldehit liyaz enzim (BAL) geni *bal*'i taşıyan rekombinant *E. coli* BL21 (DE3) pLySs katı çoğalma ortamının bileşimi Çizelge 20'de verilmiştir. Mikroorganizma çoğalması ve enzim üretiminde kullanılan ön-sıvı ortamın bileşimi Çizelge 21'de verilmiştir.

Katı ortamda çoğalmalarını 37°C'de 12 st'te tamamlayan hücreler, $V_R=20 \text{ cm}^3$ hacımlı ön-sıvı ortamı içeren mikrobiyolojik hava filtreli $V=150 \text{ cm}^3$ hacımlı kesikli biyoreaktöre steril koşullarda aktarılmış ve sıcaklığı 37°C, karıştırma hızı $N=250 \text{ dk}^{-1}$ olan orbital karışmalı inkübatörde $t=12 \text{ st}$ süreyle çoğaltılmışlardır.

Çizelge 20. Rekombinant *E.coli* için katı çoğalma ortamı

Bileşen	Derişim, kg m^{-3}
Maya özütü	5.0
Soyton	10.0
NaCl	10.0
Agar	15.0
Ampisilin	0.1
Kloramfenikol	0.035

Çizelge 21. Rekombinant *E.coli* için ön-sıvı çoğalma ortamı

Bileşen	Derişim, kg m^{-3}
Maya özütü	5.0
Soyton	10.0
NaCl	10.0
Ampisilin	0.1
Kloramfenikol	0.035

Çizelge 22. BAL üretimi için rekombinant *E.coli* üretim ortamı

Bileşen	Derişim, kg m ⁻³
Glukoz	8.0
Na ₂ HPO ₄	6.7
KH ₂ PO ₄	3.1
(NH ₄) ₂ HPO ₄	5.0
NaCl	0.5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5
FeSO ₄ .7H ₂ O	1.0 x 10 ⁻³
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.1 x 10 ⁻³
MnSO ₄ .7H ₂ O	7.5 x 10 ⁻⁵
CuSO ₄ .5H ₂ O	1.0 x 10 ⁻⁵
Ampisilin	0.1
Kloramfenikol	0.035

Çoğalan hücreler Çizelge 22'de bileşimi verilen, V_R=20 cm³ hacımlı üretim ortamı içeren mikrobiyolojik hava filtreli V=150 cm³ hacımlı kesikli biyoreaktöre steril koşullarda aktarılmış ve sıcaklığı 30°C, karıştırma hızı N=225 dk⁻¹ olan orbital karışmalı inkübatörde t=12 st BAL üretimi gerçekleştirilmiştir. Hücreler üretim ortamından santrifujlenerek ayrıldıktan sonra BAL üretim ortamı analizler için kullanılmıştır.

4.4. BAL Üretime Oksijen Aktarımının Etkisi

Laboratuvar ölçekteki en uygun biyoreaktör işletim koşulları olarak bulunan T=37°C ve pH₀=7.25 kullanılarak, tanımlanmış üretim ortamında oksijen aktarımının substrat tüketimine, mikroorganizma derişimine, ürün BAL ve yan-ürün oluşumuna etkileri Q₀/ V_R = 0.5 vvm hava giriş hızında, dört farklı karıştırma hızında, N=250, 500, 625, 750 dk⁻¹; ve %20 ve %40 oksijen doygunluk değerinde V= 3.0 dm³ hacımlı, sıcaklık, pH, köpük, karıştırma ve çözünmüş oksijen derişimi kontrollü kesikli biyoreaktörlerde araştırılmıştır. Oluşturulan oksijen aktarım koşulları ve tanımlama için kullanılan kısaltmalar Çizelge 23'de verilmiştir.

Çizelge 23. Oksijen aktarım koşulları ve kısaltmaları

Oksijen aktarım koşulu $N, dk^{-1}; Q_o/V_R, vvm$	Kısaltma	Oksijen aktarım koşulu $N, dk^{-1}; Q_o/V_R, vvm$	Kısaltma
$N=250, Q_o/V_R = 0.5$	OT₁	$N=750, Q_o/V_R = 0.5$	OT₄
$N=500, Q_o/V_R = 0.5$	OT₂	DO=20%	OT₅
$N=625, Q_o/V_R = 0.5$	OT₃	DO=40%	OT₆

Çözünmüş oksijen profilleri

Çözünmüş oksijen derişiminin (C_{DO}) kalma süresi ve oksijen aktarım koşulları ile değişimi Şekil 38’de verilmiştir. Oksijen aktarım hızı (OAH), oksijen tüketim hızına kıyasla düşük olduğu (OT₁) koşulda prosesin başından itibaren aktarılan oksijenin tamamı tüketilmiştir. OAH’nın daha yüksek olduğu koşullarda (OT₂, OT₃) hücre metabolik faaliyetlerine bağlı olarak zamanla çözünmüş oksijen derişiminde artma ve/veya azalma gözlenmiş; yüksek OAH’ları OT₄’te hücre çoğalmasına rağmen yüksek oksijen aktarımı nedeniyle C_{DO} proses süresince az değişmiştir. OT₅ ve OT₆ koşullarında ise C_{DO} sabit tutulmuştur. Ancak OT₅, OT₆ ’da ortamdaki çözünmüş oksijenin %20 ve %40’da tutulmak için aktarılan havanın giriş hızının kalma süresi ve oksijen aktarım koşulları ile değişimi Şekil 39’de verilmiştir. Hava giriş hızı t=6 st’e kadar artmış sonra azalmıştır. İncelenen oksijen aktarım koşullarında pH 7.25’de sabit tutulmuştur (Çalık vd 2006).

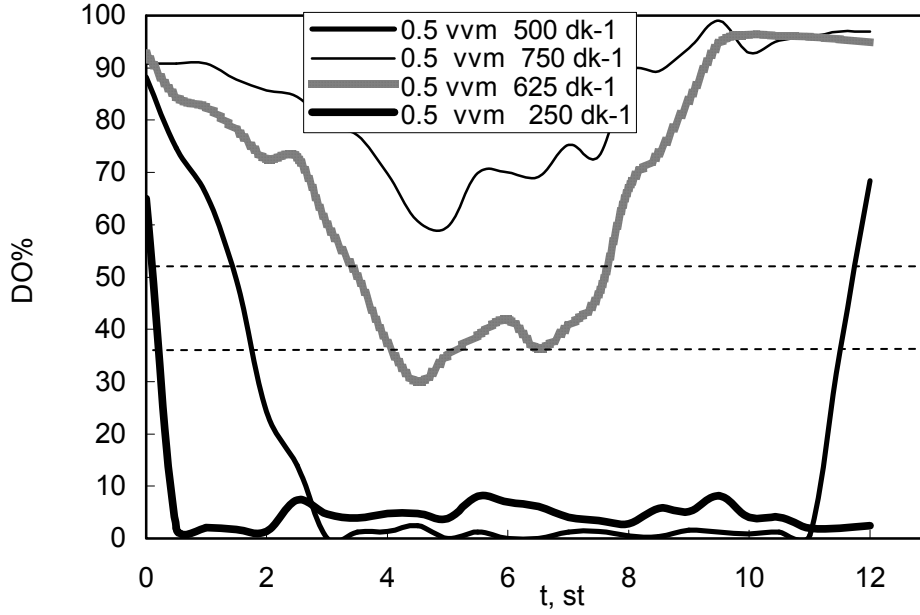
Glukoz Derişimi Profilleri

Glukoz derişiminin (C_G) kalma süresi, ve oksijen aktarım koşulu ile değişimi Şekil 40’te verilmiştir. C_G proses süresince beklendiği gibi azalmıştır. Proses sonunda, başlangıçta ortamda bulunan glukozun tamamı tüketilmiştir, tüketim karıştırma hızının artması (oksijen aktarımının artması) ile artmıştır.

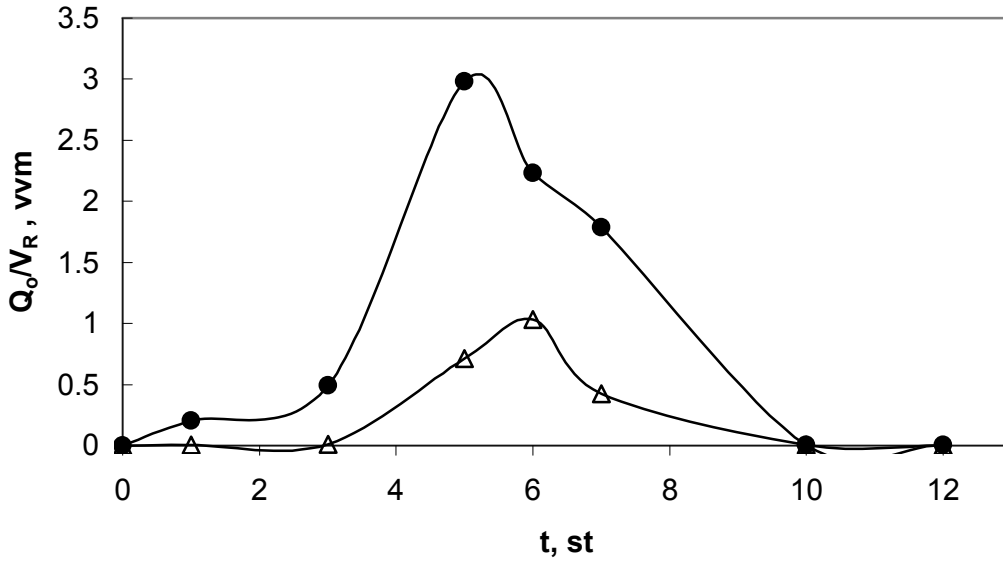
Hücre Derişimi Profilleri

Hücre derişiminin (C_x) kalma süresi ve oksijen aktarım koşulu ile değişimi Şekil 41’te verilmiştir. Hücre derişimi t=0-4 st’te oksijen aktarımından etkilenmemiş, ancak t=4 st’ten sonra hücre derişiminin artması ile oksijen aktarım koşullarına bağlı olarak hücre profillerine

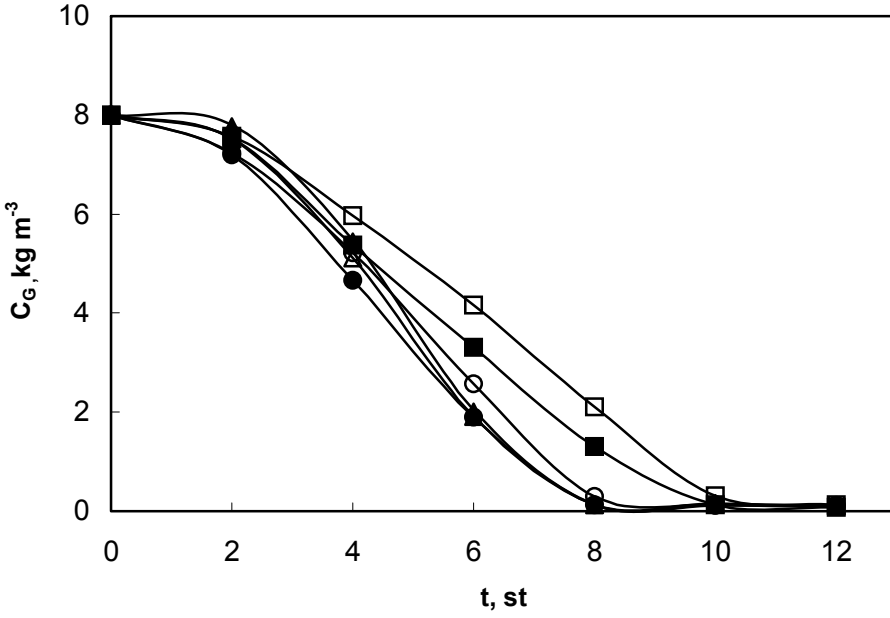
değişmiştir. En yüksek hücre derişimi OT_3 ve OT_6 koşullarında $C_X = 3.0 \text{ kg m}^{-3}$ olarak en düşük hücre derişimi de OT_1 koşullarının $C_X = 1.2 \text{ kg m}^{-3}$ olarak bulunmuştur.



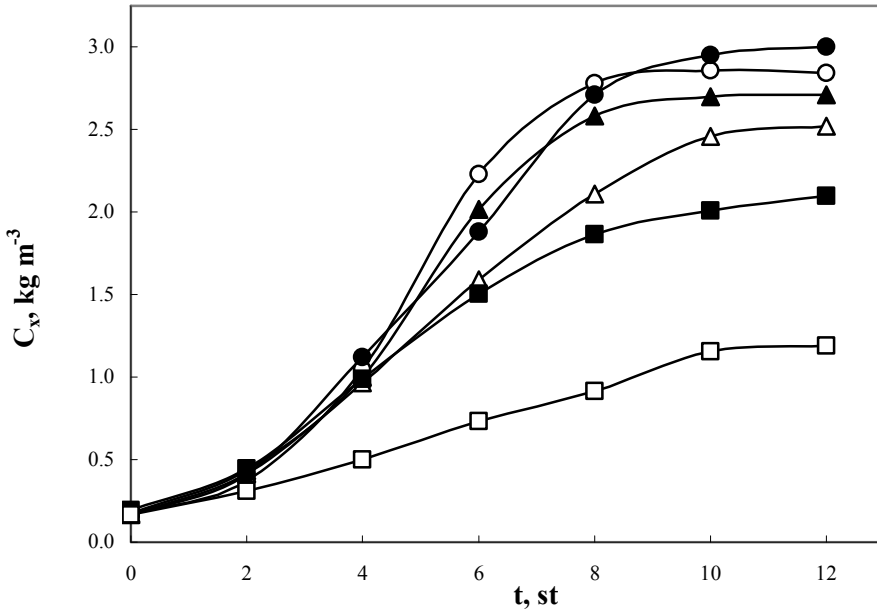
Şekil 38. Çözünmüş oksijen derişiminin kalma süresi ve oksijen aktarım koşulları ile değişimi. $C_G = 8.0 \text{ kg m}^{-3}$, $T = 37^\circ\text{C}$, $V_R = 1.65 \times 10^{-3} \text{ m}^3$, $\text{pH}_c = 7.2$. $C_{\text{DO}} = 0.21 \text{ mol m}^{-3}$.



Şekil 39. Hava giriş hızının kalma süresi ve oksijen aktarım koşulları ile değişimi. $C_G = 8.0 \text{ Kg m}^{-3}$, $T = 37^\circ\text{C}$, $V_R = 1.65 \times 10^{-3} \text{ m}^3$, $\text{pH}_c = 7.2$. $C_{\text{DO}} = 0.21 \text{ mol m}^{-3}$. OT_5 (Δ); OT_6 (\bullet).



Şekil 40. Glukoz derişiminin kalma süresi ve oksijen aktarım koşulları ile değişimi. $C_G=8.0$ Kg m^{-3} , $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=1.65 \times 10^{-3} \text{ m}^3$, $\text{pH}_c=7.2$: OT₁ (□); OT₂ (■); OT₃ (○); OT₄ (▲) OT₅ (Δ); OT₆ (●).



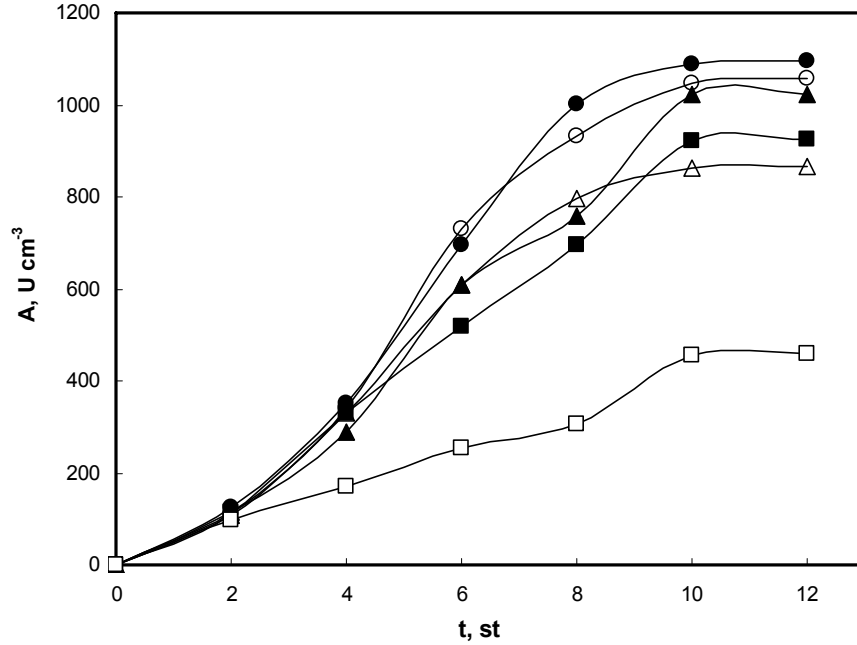
Şekil 41. Hücre derişiminin kalma süresi ve oksijen aktarım koşulları ile değişimi. $C_G=8.0$ Kg m^{-3} , $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=1.65 \times 10^{-3} \text{ m}^3$, $\text{pH}_c=7.2$: OT₁ (□); OT₂ (■); OT₃ (○); OT₄ (▲) OT₅ (Δ); OT₆ (●).

BAL Aktivite Profilleri

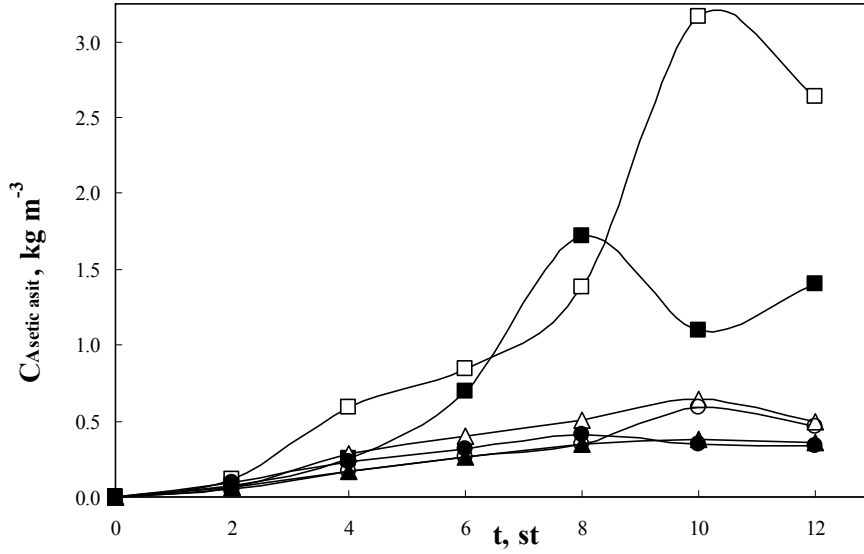
BAL aktivitesinin kalma süresi ve oksijen aktarım koşulu ile değişimi Şekil 42'te verilmiştir. En düşük aktivite ($A=459 \text{ U cm}^{-3}$) en az hücrenin çoğaldığı OT_1 koşulunda elde edilmiştir. Proses sonunda en yüksek aktivite ($A=1095 \text{ U cm}^{-3}$) OT_6 koşulunda $t=12 \text{ st}$ 'te, ikinci yüksek aktivite ise OT_3 koşulunda elde edilmiştir.

Organik Asit Derişimleri

Organik asit derişimlerinin oksijen aktarım koşulları ile değişimi Çizelge 24'te verilmiştir. Altı oksijen aktarım koşulunda da ortama asetik asit salgılanmıştır. Bunun yanında formik, sitrik, malik ve süksinik asitte genel olarak ortamda gözlenen organik asitlerdir. Şekil 43'da da görüldüğü gibi en yüksek derişimde asetik asit ($C_{AC}=3.16 \text{ kg m}^{-3}$) ortama OT_1 koşulunda salgılanmıştır.



Şekil 42. BAL aktivitesinin kalma süresi ve oksijen aktarım koşulları ile değişimi. $C_G=8.0 \text{ Kg m}^{-3}$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=1.65 \times 10^{-3} \text{ m}^3$, $\text{pH}_c=7.2$: OT_1 (□); OT_2 (■); OT_3 (○); OT_4 (▲) OT_5 (△); OT_6 (●).



Şekil 43. Asetik asit derişiminin kalma süresi ve oksijen aktarım koşulu ile değişimi. $C_G^0 = 8.0 \text{ kg m}^{-3}$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R = 1.65 \times 10^{-3} \text{ m}^3$, $\text{pH}_c = 7.2$: OT_1 (\square); OT_2 (\blacksquare); OT_3 (\circ); OT_4 (\blacktriangle) OT_5 (\triangle); OT_6 (\bullet).

Çizelge 24. Organik asit derişimlerinin kalma süresi ve oksijen aktarım koşulu ile değişimi

$\text{OT}_1, C_{\text{OA}} (\text{kg} \cdot \text{m}^{-3})$						
t, st	2	4	6	8	10	12
Ac	0.1148	0.5902	0.8430	1.3836	3.1608	2.6332
Form	0.0060	0.0969	0.0713	0.1037	0.0777	0.0557
Cit	0.0747	0.1185	0.1977	0.3535	0.7992	0.9495
T_{OA}	0.1955	0.8056	1.1120	1.8408	4.0377	3.6384
$\text{OT}_2, C_{\text{OA}} (\text{kg} \cdot \text{m}^{-3})$						
t, st	2	4	6	8	10	12
Ac	0.0778	0.2518	0.6958	1.7248	1.0952	1.4076
Form	0.0044	0.0086	0.0013	0.0288	0.0183	0.0181
Cit	0.0898	0.1138	0.2409	0.3006	0.0875	0.0770
Mal	-	-	-	-	-	-
Suc	-	-	-	0.0232	0.0707	0.0614
T_{OA}	0.1720	0.3742	0.9380	2.0774	1.2717	1.5641

OT₃, C_{OA} (kg.m⁻³)						
t, st	2	4	6	8	10	12
Ac	0.0504	0.1722	0.2688	0.3512	0.5940	0.4680
Form	-	0.0482	0.2838	0.8282	0.0213	0.0090
Cit	0.0950	0.0173	0.1767	0.1823	0.1023	0.0883
Mal	-	-	-	0.1590	0.1886	0.1433
Suc	-	0.0189	0.0408	-	0.1460	0.1075
T_{OA}	0.1454	0.2566	0.7701	1.5207	1.0522	0.8161
OT₄, C_{OA} (kg.m⁻³)						
t, st	2	4	6	8	10	12
Ac	0.0596	0.1640	0.2596	0.3448	0.3824	0.3596
Form	0.0044	0.0093	0.3000	0.4460	0.0068	0.0130
Cit	0.0878	0.0986	0.1645	0.1828	0.0784	0.0735
Mal	-	-	0.0582	0.1340	0.1322	0.1261
Suc	-	0.0215	-	-	0.0780	0.0740
T_{OA}	0.1518	0.2934	0.7823	1.1076	0.6778	0.6462
OT₅, C_{OA} (kg.m⁻³)						
t, st	2	4	6	8	10	12
Ac	0.0596	0.2892	0.4016	0.5108	0.6436	0.4976
Form	-	0.0620	0.1530	0.2605	0.0198	0.0075
Cit	0.0864	0.1161	0.1357	0.1807	0.1527	0.0392
Mal	-	-	-	0.0907	0.1387	0.1087
Suc	-	0.0114	0.0235	0.0169	0.0819	0.0603
T_{OA}	0.1460	0.4787	0.7138	1.0596	1.0367	0.7133
OT₆, C_{OA} (kg.m⁻³)						
t, st	2	4	6	8	10	12
Ac	0.0498	0.2322	0.3118	0.4064	0.3468	0.3388
Form	0.0387	0.0390	0.2079	0.2079	0.0333	0.0880
Cit	0.0954	0.0982	0.1451	0.2424	0.0494	0.0491
Mal	-	0.0076	-	0.1474	0.1035	0.1233
Suc	.0155	0.0288	0.0684	0.0654	0.0920	0.1127
T_{OA}	0.1994	0.4058	0.7332	1.0695	0.6250	0.7119

4.4.1 Oksijen Aktarım Karakteristiği

Rekombinant *E.coli* ile BAL üretimi için glukoz temelli tanımlanmış ortamda farklı oksijen aktarım koşullarında sıvı faz hacımsal kütle aktarım katsayısı K_{La} proses süresince belirlenmiştir (Çizelge 25). Çizelge 25’de de görüldüğü gibi, K_{La} karıştırma hızının artmasıyla artmıştır. En yüksek K_{La} OT_4 koşullarında $t=5$ st’te $0.039 s^{-1}$ olarak bulunmuştur.

Oksijen tüketim hızı (OUR) lag ve üstel çoğalma fazında ($t=3-5$ st) yüksektir. En fazla oksijen tüketim hızı $t=5$ st’te OT_4 koşulunda ($OUR=0.0025 molm^{-3}s^{-1}$) elde edilmiştir.

Çizelge 25. Oksijen aktarım karakteristiklerinin kalma süresi ile değişimi

	t	K_{La}	E	$OAH \times 10^3$	$OAH_{max} \times 10^3$	$OUR \times 10^3$
	(st)	(s^{-1})	K_{La}/K_{La_0}	($molm^{-3}s^{-1}$)	($molm^{-3}s^{-1}$)	($molm^{-3}s^{-1}$)
OT_1	0.25	0.008	1.05	1.08	1.68	0.70
	1	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-
OT_2	0.25	0.017	1.42	1.03	3.57	1.2
	1	0.019	1.58	1.47	3.99	1.5
	3	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-
OT_3	0.25	0.022	1.57	0.63	4.62	0.90
	1	0.023	1.65	0.74	4.83	1.3
	3	0.025	1.78	2.14	5.25	2.2
	5	0.021	1.5	2.63	4.41	2.2
	10	0.020	1.43	0.2	4.20	0.40
OT_4	0.25	0.034	1.62	0.81	7.56	1.10
	1	0.036	1.71	0.85	6.93	1.30
	3	0.038	1.81	1.92	8.19	2.40
	5	0.039	1.86	2.48	8.61	2.50
	10	0.037	1.76	0.55	5.88	0.60
OT_5	0.25	0.006	-	0.80	1.26	0.80
	1	0.007	-	1.00	1.47	1.00
	3	0.009	-	1.24	1.89	1.24
	5	0.006	-	1.0	1.26	1.00
	10	0.007	-	0.82	1.47	0.82
OT_6	0.25	0.006	-	0.82	1.26	0.82
	1	0.009	-	1.05	1.89	1.05
	3	0.012	-	1.41	2.52	1.41
	5	0.010	-	1.37	2.1	1.37
	10	0.005	-	0.58	1.05	0.58

4.5 BAL Üretimi için Kompleks Ortam Tasarımı

pRSETA::*bal* plasmidini taşıyan rekombinant *E. coli* BL21 (DE3) pLySs ile benzaldehide liyaz üretimi için melas temelli kompleks ortam tasarlanmış ve tasarlanan ortam temel alınarak besleme stratejisi geliştirilmiştir.

Bu amaçla, ilk olarak, melas derişimi etkisi laboratuvar ölçekli biyoreaktörlerde incelenmiştir. *E. coli* BL21 sukrozu tüketemediği için, kimyasal önışlem uygulanarak melas fruktoz ve glukozu indirgenmiş (Çalık vd 2003) ve melas derişiminin etkisi 16 kg m⁻³ ile 56 kg m⁻³ aralığında incelenmiştir (Çizelge 26); üretim koşullarının kısaltmaları Çizelge 27'de verilmiştir.

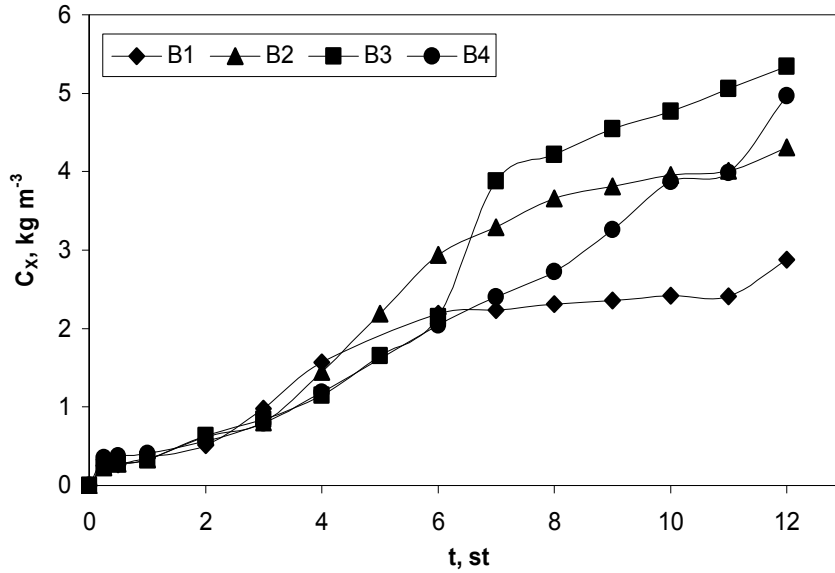
Çizelge 26. Kompleks ortam bileşimi

Bileşen	Derişim, kg m ⁻³
Melas	8.0 - 40.0
Na ₂ HPO ₄	6.7
KH ₂ PO ₄	3.1
(NH ₄) ₂ HPO ₄	5.0
NaCl	0.5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.2 x 10 ⁻⁵
MnSO ₄ .7H ₂ O	0.1
CoCl ₂ .6H ₂ O	2.0 x 10 ⁻⁵
Ampisilin	0.1
Kloramfenikol	0.035

Çizelge 27. Biyoreaktör deney koşulları ve kısaltmalar

Melas Derişimi (kg m ⁻³)	Sukroz Derişimi (kg m ⁻³)	Fruktoz - Glukoz Derişimi (kg m ⁻³)	Kısaltma
16	8	4-4	B1
24	12	6-6	B2
30	15	7.5-7.5	B3
56	28	14-14	B4

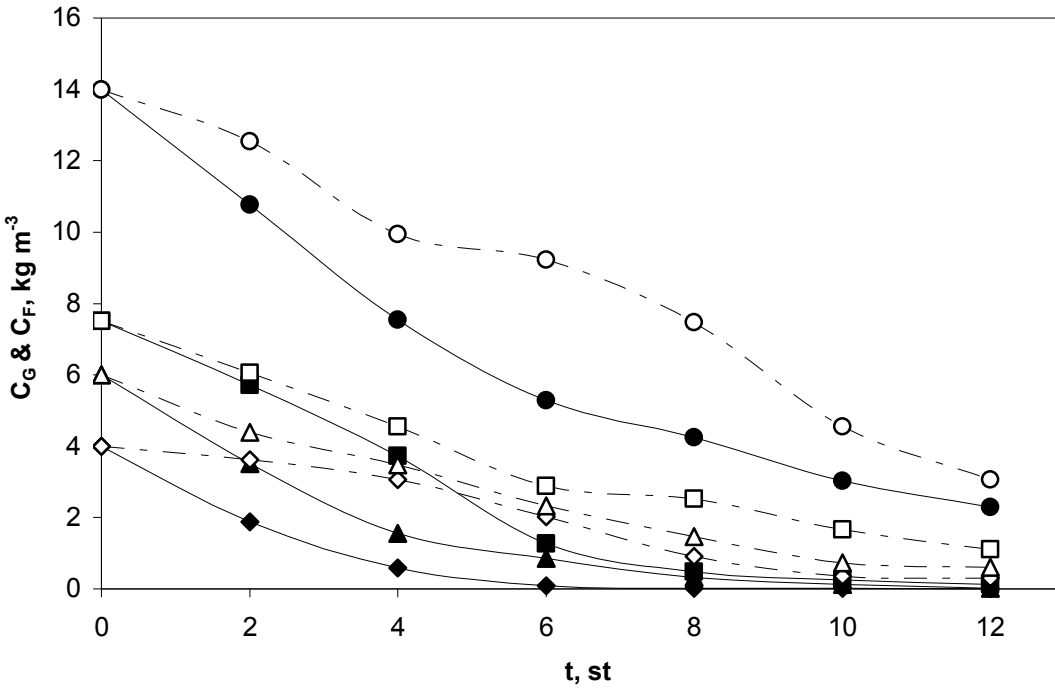
Hücre derişiminin melas derişimi ve zamanla değişimi Şekil 44'de verilmiştir. Hücre profili ilk dört saatte melas derişimin etkilenmemiştir. En yüksek hücre derişim B3 koşulunda ($C_X=5.34 \text{ kg m}^{-3}$) bulunmuştur.



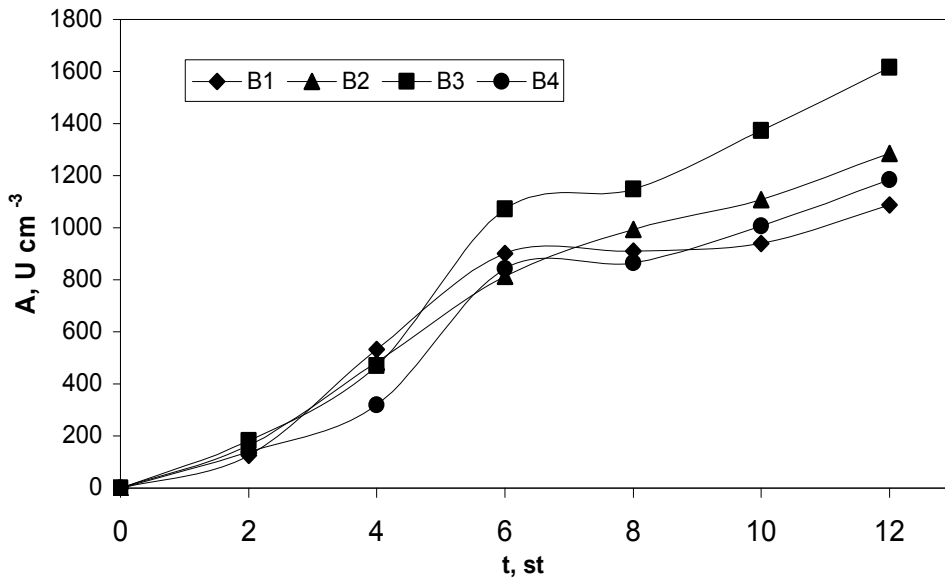
Şekil 44. Hücre derişiminin melas derişimi ve zamanla değişimi. B1, (◆); B2, (▲); B3, (■); B4, (●); $T=37^\circ\text{C}$, $V_R= 1.65 \times 10^{-3} \text{ m}^3$, $\text{DO}=40\%$, $N=625 \text{ min}^{-1}$, $\text{pH}_C=7.2$.

Glukoz ve fruktoz derişiminin melas derişimi ve zamanla değişimi (Şekil 45) incelendiğinde B1, B2 ve B3 koşullarında glukozun proses sonunda tüketildiği B4 koşulunda ise toplam şeker inhibisyonu nedeniyle tüketilmediği görölmüştür.

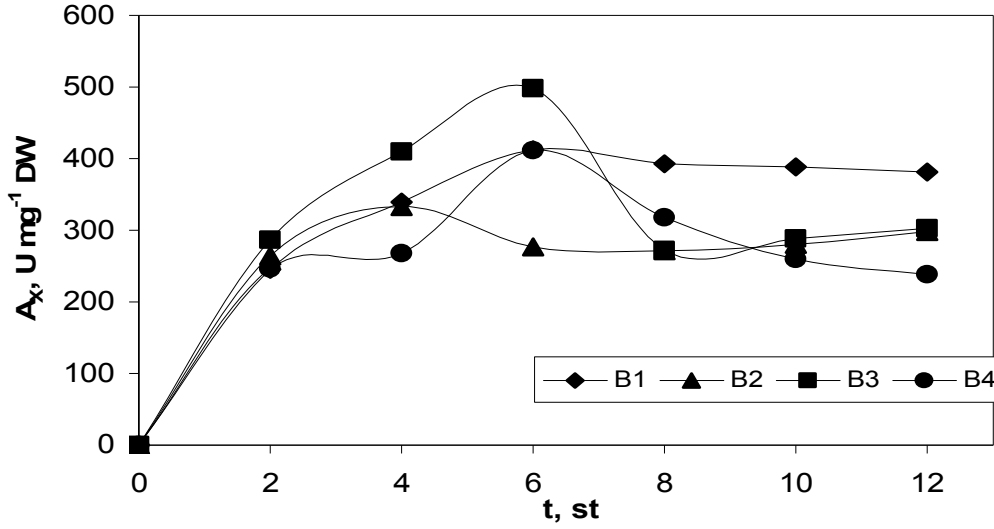
BAL hacımsal ve spesifik aktivitesinin melas derişimi ve zamanla değişimi Şekil 46 ve 47'de gösterilmiştir. En yüksek BAL hacımsal aktivitesi B3 koşulunda 1617 U cm^{-3} olarak elde edilmiştir.



Şekil 45. Glukoz ve fruktoz derişiminin melas derişimi ve zamanla değişimi. B1, (◆, ◇); B2, (▲, Δ); B3, (■, □); B4, (●, ○); $T=37^{\circ}\text{C}$, $V_R= 1.65 \times 10^{-3} \text{ m}^3$, $\text{DO}=40\%$, $N=625 \text{ min}^{-1}$, $\text{pHC}=7.2$.



Şekil 46. Hacimsal BAL aktivitesinin melas derişimi ve zamanla değişimi. B1, (◆); B2, (▲); B3, (■); B4, (●); $T=37^{\circ}\text{C}$, $V_R= 1.65 \times 10^{-3} \text{ m}^3$, $\text{DO}=40\%$, $N=625 \text{ min}^{-1}$, $\text{pHC}=7.2$.

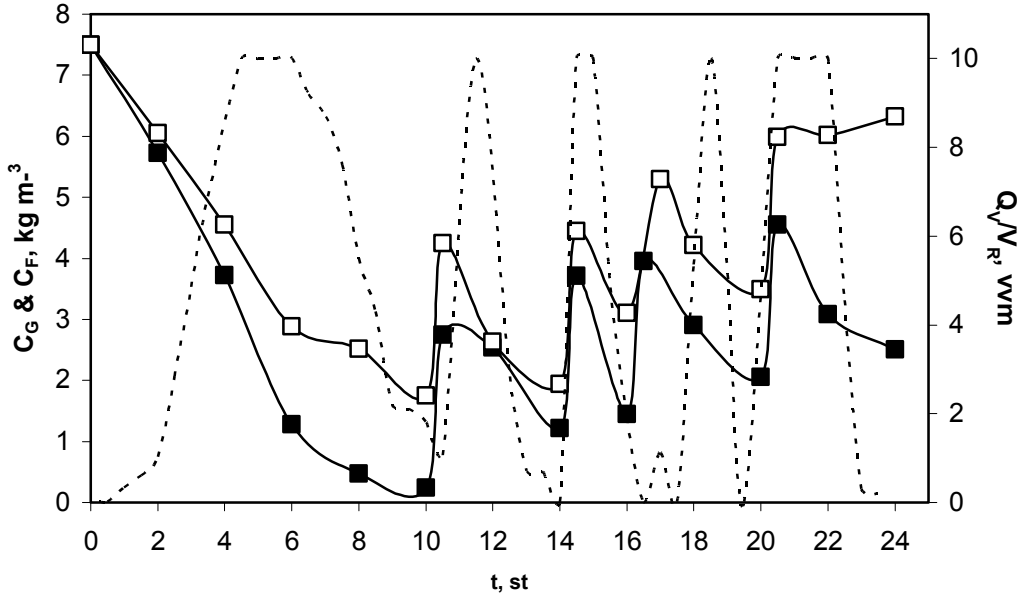


Şekil 47. Spesifik BAL aktivitesinin melas derişimi ve zamanla değişimi. B1, (◆); B2, (▲); B3, (■); B4, (●); $T=37^{\circ}\text{C}$, $V_R=1.65 \times 10^{-3} \text{ m}^3$, $\text{DO}=40\%$, $N=625 \text{ min}^{-1}$, $\text{pH}_C=7.2$.

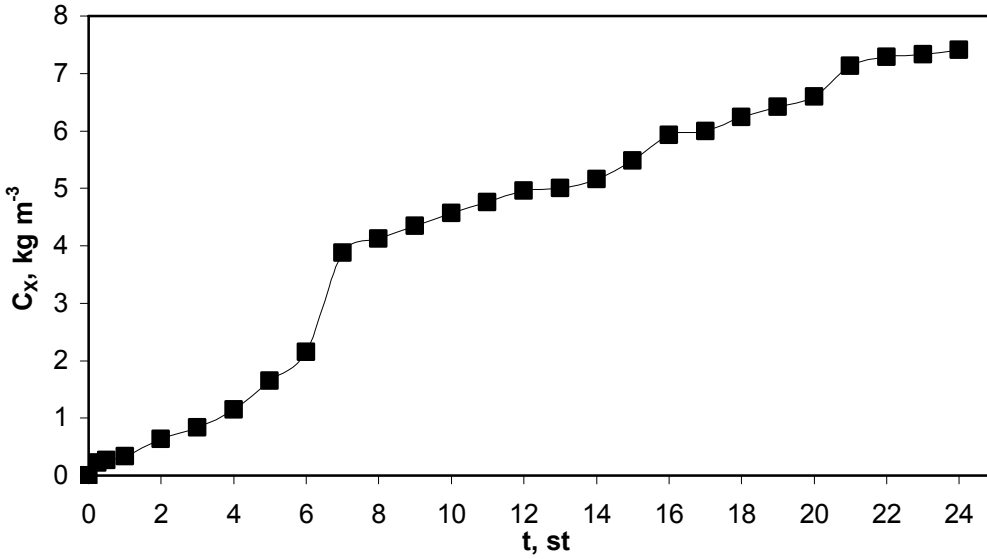
4.6 BAL Üretimi için Besleme Stratejisi Geliştirilmesi

En yüksek hücre derişimi ve benzaldehit liyaz aktivitesi $C_{\text{Glukoz}}=7.5 \text{ kg m}^{-3}$ ve $C_{\text{Fruktoz}}=7.5 \text{ kg m}^{-3}$ derişimlerinde sırasıyla 5.3 kg m^{-3} ve 1617 U cm^{-3} olarak bulunmuş ve bir sonraki aşamada, daha yüksek hücre derişimi ve BAL üretimine ulaşabilmek için besleme stratejileri geliştirilmiştir. Optimum koşullarda, kesikli biyoreaktör işletiminde B3 koşulunda $t=10 \text{ st}$ 'te hava giriş hızının minimuma ulaştığı gözlenmiştir. Bu durum ortamdaki karbon kaynağının bittiğini gösterdiği varsayıldığı için birinci stratejide besleme yapılarak glukoz ve fruktozun 2.5 kg m^{-3} e çıkması sağlanmıştır. Bu strateji proses süresince tekrarlanmıştır. Bu strateji FB1 olarak adlandırılmıştır.

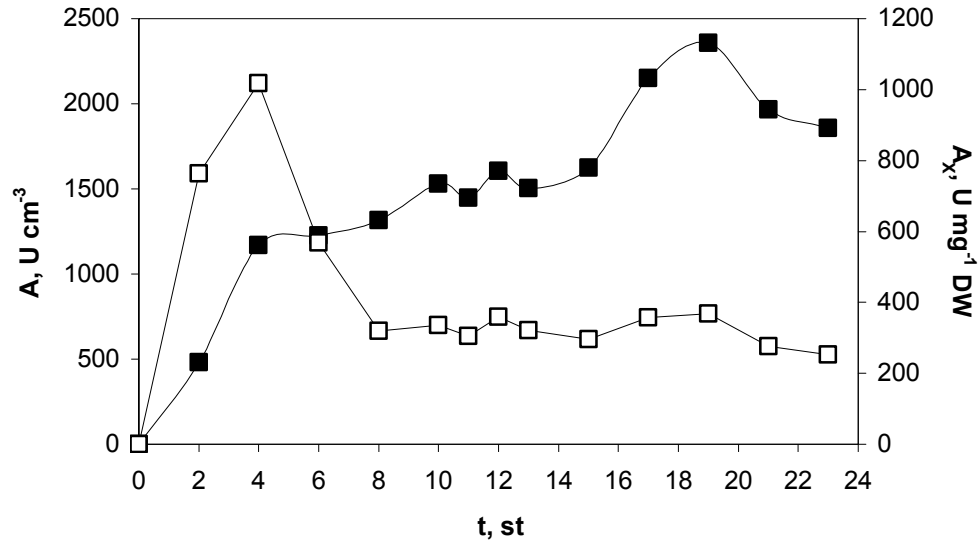
Sabit karıştırma hızında, $N=625 \text{ dk}^{-1}$, hava giriş hızı, glukoz ve froktoz derişiminin zamanla değişimi Şekil 48'de, hücre derişimi Şekil 49'de, BAL hacımsal ve spesifik aktivitesinin değişimi Şekil 50'de gösterilmiştir. En yüksek hücre derişimi $t=24 \text{ st}$ 'te $C_X=7.4 \text{ kg m}^{-3}$, en yüksek BAL aktivitesi ise $t=20 \text{ st}$ 'te $A=2360 \text{ U cm}^{-3}$ olarak elde edilmiştir. Ancak hava giriş hızının değişimine bağlı geliştirilen strateji yalnızca glukozun tüketildiğini gösterdiği sonucuna varıldığı için, glukoz ve fruktoz derişimi proses süresince izlenerek yeni bir strateji geliştirilmiştir.



Şekil 48. Hava giriş hızının (kesikli çizgi), glukoz (■) ve fruktoz (□) derişimlerinin FB1 stratejisi için zamanla değişimi. $C_{G\&F}=7.5 \text{ kg m}^{-3}$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R= 1.65 \times 10^{-3} \text{ m}^3$, $\text{DO}=40\%$, $N=625 \text{ dk}^{-1}$, $\text{pH}_C=7.2$.



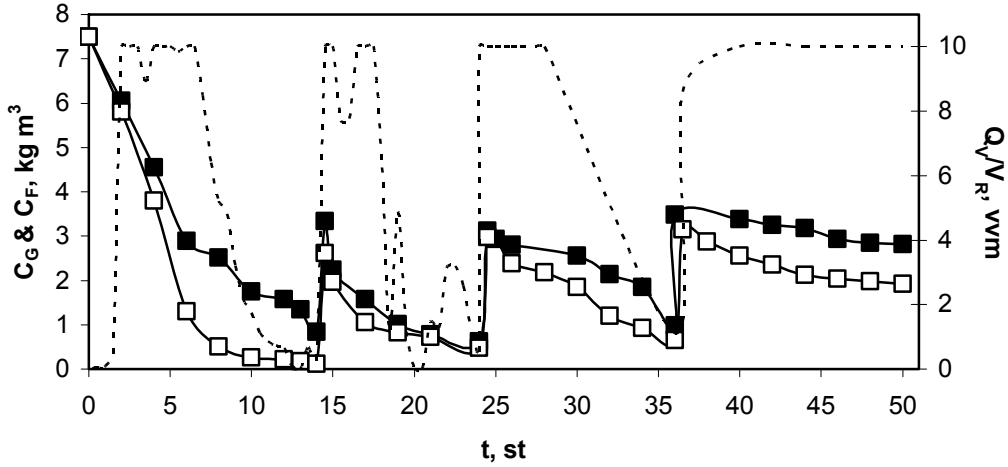
Şekil 49. Hücre derişiminin FB1 stratejisi için zamanla değişimi. $C_{G\&F}=7.5 \text{ kg m}^{-3}$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R= 1.65 \times 10^{-3} \text{ m}^3$, $\text{DO}=40\%$, $N=625 \text{ dk}^{-1}$, $\text{pH}_C=7.2$.



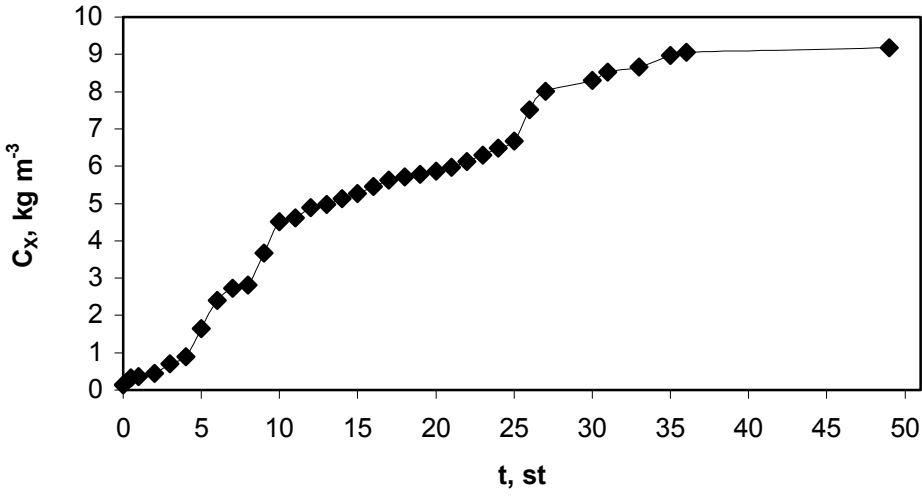
Şekil 50. BAL hacımsal (■) ve spesifik aktivitesinin (□) FB1 stratejisi için zamanla değişimi. $C_{G\&F}=7.5 \text{ kg m}^{-3}$, $T=37^{\circ}\text{C}$, $V_R= 1.65 \times 10^{-3} \text{ m}^3$, $\text{DO}=40\%$, $N=625 \text{ dk}^{-1}$, $\text{pH}_C=7.2$.

Yeni stratejide glukoz ve fruktoz tüketildiğinde derişimleri üretim ortamında 2.5 kg m^{-3} e çıkarılmıştır. Bu strateji FB2 olarak adlandırılmıştır. Sabit karıştırma hızında, $N=625 \text{ dk}^{-1}$, hava giriş hızı, glukoz ve fruktoz derişiminin zamanla değişimi Şekil 51’de, hücre derişimi Şekil 52’ de, BAL hacımsal ve spesifik aktivitesinin değişimi Şekil 53’ de gösterilmiştir. FB2 strateji ile en yüksek BAL aktivitesi $t=26 \text{ st'te } A=2370 \text{ U cm}^{-3}$ olarak bulunmuştur. Bu saatta hücre derişimi ise $C_x=7.5 \text{ kg m}^{-3}$ tür.

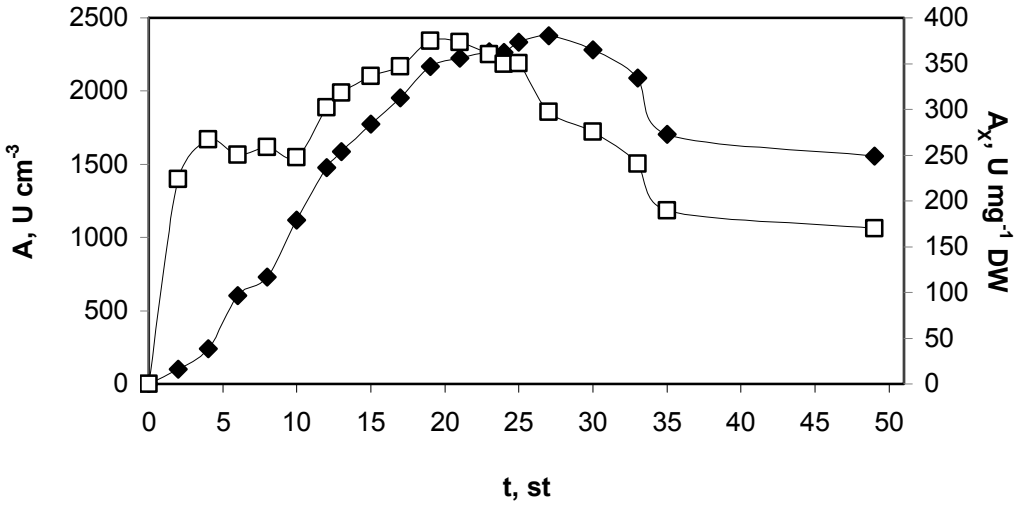
FB2 stratejisini alternatif, asetik asit birikimini azaltmak için yapılan beslemelerin glukoz ve fruktoz derişimi 1.5 kg m^{-3} e düşürülmüş ve bu strateji FB3 stratejisi olarak adlandırılmıştır. FB3 stratejisi için hava giriş hızı, glukoz ve fruktoz derişiminin zamanla değişimi Şekil 54’de, hücre derişimi Şekil 55’ de, BAL hacımsal ve spesifik aktivitesinin değişimi Şekil 56’de gösterilmiştir. Bu son strateji ile $t= 24 \text{ st'te}$ en yüksek BAL aktivitesi ve hücre derişimi sırasıyla $A=2315 \text{ U cm}^{-3}$ ve $C_x=8.04 \text{ kg m}^{-3}$ olarak bulunmuştur. İncelenen stratejilerin hepsinde aktiviteler yaklaşık aynı olmasına rağmen son koşulda en yüksek hücre derişimine en az girdi kullanılarak ulaşılmıştır.



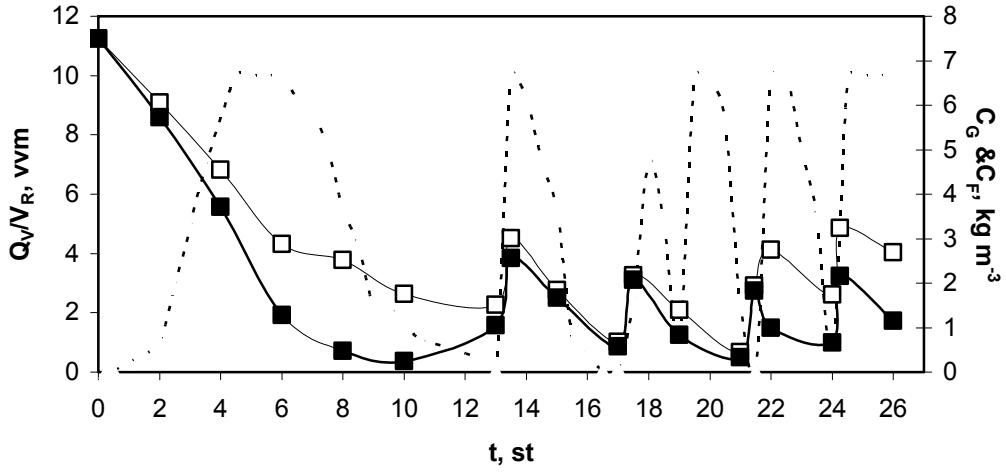
Şekil 51. Hava giriş hızının (kesikli çizgi), glukoz (■) ve fruktoz (□) derişimlerinin FB2 stratejisi için zamanla değişimi. $C_{G\&F}=7.5 \text{ kg m}^{-3}$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R= 1.65 \times 10^{-3} \text{ m}^3$, $DO=40\%$, $N=625 \text{ dk}^{-1}$, $pH_C=7.2$.



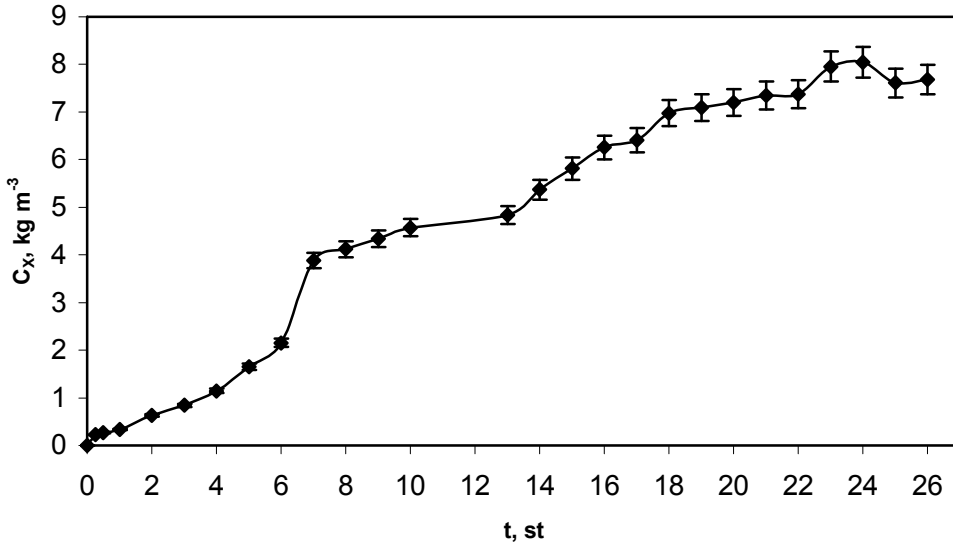
Şekil 52. Hücre derişiminin FB2 stratejisi için zamanla değişimi. $C_{G\&F}=7.5 \text{ kg m}^{-3}$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R= 1.65 \times 10^{-3} \text{ m}^3$, $\text{DO}=40\%$, $N=625 \text{ dk}^{-1}$, $\text{pH}_C=7.2$.



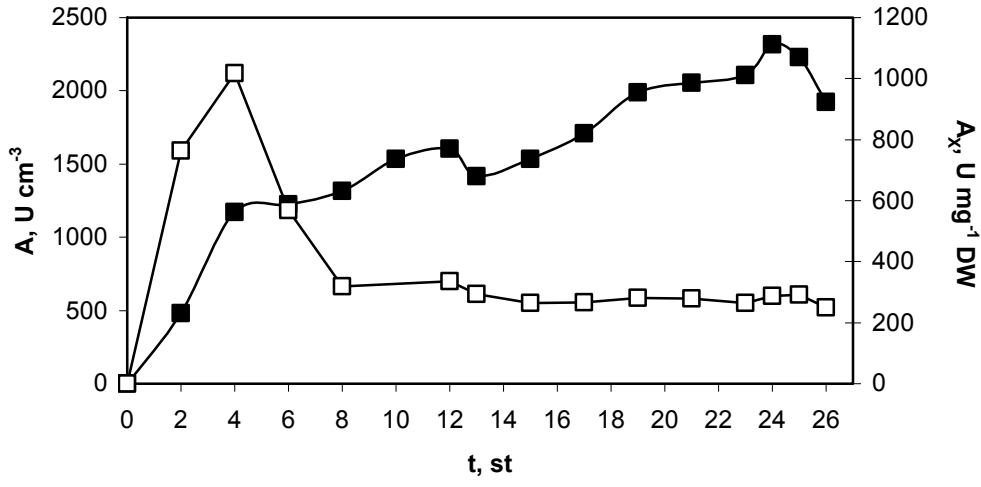
Şekil 53. BAL hacımsal (■) ve spesifik aktivitesinin (□) FB2 stratejisi için zamanla değişimi. $C_{G\&F}=7.5 \text{ kg m}^{-3}$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R= 1.65 \times 10^{-3} \text{ m}^3$, $\text{DO}=40\%$, $N=625 \text{ dk}^{-1}$, $\text{pH}_C=7.2$.



Şekil 54. Hava giriş hızının (kesikli çizgi), glukoz (■) ve fruktoz (□) derişimlerinin FB3 stratejisi için zamanla değişimi. $C_{G\&F}=7.5 \text{ kg m}^{-3}$, $T=37^{\circ}\text{C}$, $V_R= 1.65 \times 10^{-3} \text{ m}^3$, $\text{DO}=40\%$, $N=625 \text{ dk}^{-1}$, $\text{pH}_C=7.2$.



Şekil 55. Hücre derişiminin FB3 stratejisi için zamanla değişimi. $C_{G\&F}=7.5 \text{ kg m}^{-3}$, $T=37^{\circ}\text{C}$, $V_R= 1.65 \times 10^{-3} \text{ m}^3$, $\text{DO}=40\%$, $N=625 \text{ dk}^{-1}$, $\text{pH}_C=7.2$.



Şekil 56. BAL hacımsal (■) ve spesifik aktivitesinin (□) FB3 stratejisi için zamanla değişimi. $C_{G\&F}=7.5 \text{ kg m}^{-3}$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R= 1.65 \times 10^{-3} \text{ m}^3$, $\text{DO}=40\%$, $N=625 \text{ dk}^{-1}$, $\text{pH}_C=7.2$.

5 SONUÇLAR

“**Metabolik+Genetik+Biyokimyasal Reaksiyon Mühendisliği Prensipleriyle Rekombinant Enzim Üretimi**” konulu 104M258 nolu proje kapsamında, benzoinin açıl bağının kırılması ve oluşması tepkimesini dönüşümlü olarak katalizleyerek aril aldehytlerin ve açılöinlerin sentezinde kullanılan benzaldehit liyaz (BAL, EC. 4.1.2.38) enzim üretimi için rekombinant mikroorganizma ile biyoproses geliştirilmesi amaçlanmıştır. Beş alt-araştırma programından oluşan projenin birinci alt-araştırma programında hücreiçi üretim için *bal* geni pRSETA plasmidini klonlanmış ve *E. coli* BL21 (DE3) pLySs ekspres edilmiştir. *E. coli* hücreleri ile hücreiçi üretime alternatif olarak BAL enziminin *Bacillus* sp ve *P.pastoris* ile hücredişi üretimi için alternatif tasarımlar yapılmıştır. BAL'ın biyokimyasal yapısının tetramer olması ve BAL enziminin sulu ortamda kararlılığının düşük olması nedeniyle rekombinant *Bacillus* sp aktivite gözlenemezken rekombinant *P.pastoris* ile düşük enzim aktivitesi elde edilmiştir. Bulgular ışığında pRSETA::*bal* taşıyan *E. coli* BL21 (DE3) pLysS ile biyoreaktör işletim parametrelerinin etkisi araştırılmıştır. Araştırmanın üçüncü alt-programında laboratuvar ölçekte bulunan en uygun koşullarda, $V_R=1.65 \text{ dm}^3$ hacımlı, mekanik karıştırıcı, pH, sıcaklık, çözünmüş oksijen ve karıştırma hızı kontrollü pilot-ölçek kesikli biyoreaktörlerde $Q_O/V_R = 0.5$ vvm hava giriş hızında ve $N= 250, 500, 625, \text{ and } 750 \text{ dk}^{-1}$ karıştırma hızlarında ve çözünmüş oksijen $DO= 20\%, 40\%$ koşullarında oksijen aktarım etkileri yan ürün dağılımları ile birlikte incelenmiş, oksijen aktarımı ve biyoproses karakteristikleri belirlenmiştir. En yüksek hücre derişimi ve benzaldehit liyaz üretimi $C_{\text{Glukoz}}= 8.0 \text{ kg m}^{-3}$; $pH_c=7.2$ ve $DO=40\%$ 'da sırasıyla 3.0 kg m^{-3} ve $A=1095 \text{ Ucm}^{-3}$ olarak bulunmuştur. Dördüncü alt-programda, benzaldehyde liyaz üretimi için melas temelli kompleks ortam tasarlanmıştır. En yüksek hücre derişimi ve benzaldehit liyaz aktivitesi $C_{\text{Glukoz}}=7.5 \text{ kg m}^{-3}$ ve $C_{\text{Fruktoz}}=7.5 \text{ kg m}^{-3}$ derişimlerinde sırasıyla 5.3 kg m^{-3} ve 1617 U cm^{-3} olarak bulunmuştur. Beşinci alt-program ile yüksek hücre derişimi ve BAL üretime ulaşabilmek için besleme stratejileri geliştirilmiştir. Optimum koşullarda, kesikli biyoreaktör işletiminde $t=10 \text{ st}$ 'te hava giriş hızının minimuma ulaştığı gözlenmiştir. Bu durum ortamdaki karbon kaynağının bittiğini gösterdiği varsayıldığı için birinci stratejide besleme yapılarak glukoz ve fruktozun 2.5 kg m^{-3} e çıkması sağlanmıştır. Bu strateji proses süresince tekrarlanmıştır. En yüksek hücre derişimi $t=24 \text{ st}$ 'te $C_x=7.4 \text{ kg m}^{-3}$, en yüksek BAL aktivitesi ise $t=20 \text{ st}$ 'te $A=2360 \text{ U cm}^{-3}$ olarak elde edilmiştir. Ancak hava giriş hızının değişimine bağlı geliştirilen strateji yalnızca glukozun tüketildiğini gösterdiği sonucuna varıldığı için, glukoz ve fruktoz derişimi proses süresince izlenerek yeni bir strateji geliştirilmiştir. Yeni stratejide glukoz ve fruktoz tüketildiğinde derişimleri üretim ortamında 2.5 kg m^{-3} e çıkarılmış; en yüksek BAL aktivitesi $t=26 \text{ st}$ 'te $A=2370 \text{ U cm}^{-3}$ olarak bulunmuştur. Bu noktadaki hücre derişimi ise $C_x=7.5 \text{ kg m}^{-3}$ tür. Asetik asit birikimini

azaltmak için yapılan beslemelerin glukoz ve fruktoz derişimi 1.5 kg m^{-3} ' e düşürülmüştür. Bu son strateji ile $t= 24 \text{ st}$ 'te en yüksek BAL aktivitesi ve hücre derişimi sırasıyla $A=2315 \text{ U cm}^{-3}$ ve $C_x=8.04 \text{ kg m}^{-3}$ olarak bulunmuştur. İncelenen stratejilerin hepsinde aktiviteler yaklaşık aynı olmasına rağmen son koşulda en yüksek hücre derişimine en az girdi kullanılarak ulaşılmıştır.

Kaynaklar

- BANDYOPADHYAY, B. and Humprey, A.E., Dynamic measurement of the umetric oxygen transfer coefficient in fermentation systems, *Biotechnology and Bioengineering*, 9, 533-544, (1967).
- BOYACI, I. H., A New Approach for Determination of Enzyme Kinetic Constants Using Response Surface Methodology, *Biochemical Engineering Journal*, 25:55-62 (2005).
- BRANDEN, C., and Tooze, J., *Introduction to protein structure*, Garland Pulishing Inc., New York (1991).
- BRÜCKNET, R., A series of shuttle vectors for *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*, *Gene*, 122, 187-192, (1992)..
- BULLOCK, W. O., Frenandez, J. M. and Short, J. M., XL1-Blue- A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with β -Galactosidase Selection. *Biotechniques*, 5, 376, (1987).
- COHEN, S.A., The PICO-TAG system: A new method to analysize primary and secondary amino acids with one picomole sensitivity, *BioTechniques*, set/oct., 273-275, (1983).
- ÇALIK, P. and Özdamar, T.H., Bioreaction network flux analysis for industrial microorganisms, A review. *Reviews in Chemical Engineering* 18(6),553-596, (2002).
- ÇALIK, P., Çalık, G. and Özdamar, T.H., 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, (1998).
- ÇALIK, P., Çalık, G., Takaç, S., Özdamar, T.H., Metabolic flux analysis for serine alkaline protease fermentation by *Bacillus licheniformis* in a defined medium, Effect of the oxygen transfer rate. *Biotechnology and Bioengineering* 64(2),151-167, (1999).
- ÇALIK, P., Çalık, G., Özdamar, T.H., Oxygen Transfer Strategy and its Regulation Effects in Serine Alkaline Protease Production by *Bacillus licheniformis*, *Biotechnology and Bioengineering* 69(3), 301-311, (2000).

- ÇALIK, P., Tomlin, G., Oliver, SG. and Özdamar, T.H., Overexpression of a serine alkaline protease in *Bacillus licheniformis* and its impact on the metabolic reaction network. *Enzyme and Microbial Technology* 32(6),706-720, (2003).
- ÇALIK, P., Bilir, E., Özçelik, İ.Ş., Çalık, G., and Özdamar, T.H., Inorganic compounds have dual effect on recombinant protein production, influence of anions and cations on serine alkaline protease production. 96,194-200, (2004a).
- ÇALIK, P., Yılgör, P., Ayhan, P., Demir, A.S., Oxygen transfer effects on recombinant benzaldehyde lyase production. *Chemical Engineering Science*, 59(22-23), 5075-5083 (2004b).
- ÇALIK, G., Berk, M., Boyaci, F. G., Calik, P., Takac, S., and Ozdamar, T. H., Pretreatment processes of molasses for the utilization in fermentation Processes, Focus in biotechnology. In *Engineering and Manufacturing for Biotechnology*, eds. M. Hofman and P. Thonart, Vol. 4, pp. 21- 28, Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands (2001).
- ÇALIK, G., Pehlivan, P., Kalender, N., Calik, P., and Özdamar, T.H., Utilization of pretreated molasses for serine alkaline protease production with recombinant *Bacillus* species. *Chem Eng Comm* 190:630-644 (2003).
- ÇALIK, P., Yılgör, P., Ayhan, P., Demir, A. S., Oxygen Transfer Effects on Recombinant Benzaldehyde Lyase Production, *Chemical Engineering Science*, 59:5075-5083 (2004b).
- ÇALIK, P., İleri, N., Erdinç, B.I., Aydoğan, N., Argun, M. A novel anti-foam for fermentation processes: fluorocarbon-hydrocarbon unsymmetrical bolaform surfactant. *Langmuir*, 21(19), 8613-8619 (2005).
- ÇALIK, P., Yılgör, P., Demir, A. S., Influence Of Controlled-pH and Uncontrolled-pH Operations on Recombinant Benzaldehyde Lyase Production by *Escherichia coli*, *Enzyme and Microbial Technology*, 38:617-627 (2006).
- DEMİR, A. S., Pohl, M., Janzen, E., Muller, M., Enantioselective Synthesis of Hydroxy Ketones Through Cleavage and Formation of Acyloin Linkage, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, 633-635 (2001).
- DEMİR, A. S., Şeşenoğlu Ö., Eren, E., Hosrik, B., Pohl, M., Janzen, E., Kolter, D., Feldmann, R., Dünkemann, P., Müller, M., Enantioselective Synthesis of α -Hydroxy Ketones via Benzaldehyde Lyase-Catalyzed C-C Bond Formation Reaction, *Advanced Synthesis & Catalysis*. 344(1):96-103 (2002).
- DEMİR, A. S., Şeşenoğlu, Ö., Dünkemann, P., Muller, M., Benzaldehyde Lyase-Catalyzed Enantioselective Carbonylation of Aromatic Aldehydes with Mono- and Dimethoxy Acetaldehyde, *Organic Letters*, 5:2047-2050 (2003).

- DEMİR, A. S., Ayhan, P., Iğdir, C. A., Duygu, N. A., Enzyme Catalyzed Hydroxymethylation of Aromatic Aldehydes with Formaldehyde. Synthesis of Hydroxyacetophenones and (S) – Benzoin, *Tetrahedron*, 60: 6509-6512 (2004).
- DÜNKELMANN, P., Kolter-Jung, D., Nitsche, A., Demir, A., S., Development of a Donor-Acceptor Concept for Enzymatic Cross-Coupling Reactions of Aldehydes: The First Asymmetric Cross-Benzoin Condensation, *J. Am. Chem. Soc.*, 124:12084-12085 (2002)
- GONZALEZ, B., Vicuna, R., Benzaldehyde lyase, a novel thiamine PPI requiring enzyme from *Pseudomonas fluorescens* Biovar I, *J. Bacteriol.*, 171: 2401-2405 (1989).
- HEWITT, C. J., Nebe-Von Caron, G., Nienow, A. W., McFarlane, C. M., 1999. Use of multi-staining flow cytometry to characterise the physiological state of *Escherichia coli* W3110 in high cell density fed-batch cultures. *Biotechnol. Bioeng.*, 63:705–711.
- HINRICHSEN, P., Gomez, I., Vicuna, R., Cloning and sequencing of the gene encoding benzaldehyde lyase *Pseudomonas fluorescens* Biovar I., *Gene*, 144:137-138 (1994).
- İLERİ, N., Çalık, P., Effects of pH strategy on endo- and exo- metabolome profiles and sodium potassium hydrogen ports of beta-lactamase-producing *Bacillus licheniformis*, *Biotechnology Progress*, 22(2),411-419, (2006).
- JANZEN, E., Muller, M., Characterization of benzaldehyde lyase from *Pseudomonas fluorescens*: A versatile enzyme for asymmetric C–C bond formation, *Bioorganic Chemistry*, 34:345–361 (2006).
- KNEEN, M. M., Pogocheva, D. I., Kenyon, L. G., Mcleish, J. M., Exploring the Active Site of Benzaldehyde Lyase by Modeling and Mutagenesis, *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1753:263-271 (2005).
- LEHNINGER, A.L., Nelson, D.L., and Cox, M.M. *Principles of Biochemistry*, 2nd Edition, Worth Publishers Inc., , New York, NY (1993).
- LAEMMLI, U. K., Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature*, 227, 680-685 (1970).
- MARAITE, A., Schmidt, T., Ansörge-Schumacher, M. B., Brzozowski, A. M., Grogan G., Structure of the ThDP-dependent enzyme benzaldehyde lyase refined to 1.65 Å resolution. *Acta Cryst.*, F63:546-548 (2007).
- MARIA, D. D. P., Stillger, T., Pohl, M., Wallert, S., Et Al., Preparative Enantioselective Synthesis of Benzoin and (R)-2-Hydroxy-1-Phenylpropanone Using Benzaldehyde Lyase, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 38, 43-47 (2005).

- MOSBACHER, G. T., Mueller, M., Schulz, E. G., Structure and Mechanism of the ThDP-Dependent Benzaldehyde Lyase from *Pseudomonas fluorescens*, FEBS Journal, 272, 6067-6076 (2005).
- POHL, M., Mueller, M., Demir, A. S., Nucleotide Sequence Encoding Benzaldehyde Lyase and Method for the Stereoselective Synthesis of 2-Hydroxyketone, Patent: WO0202753-A (2002).
- POSPRECH A, and Neumann B, A Versatile Quick-prep of Genomic DNA from Gram-positive Bacteria. Trends in Genetics 11(6), 217-218, (1995).
- SAMBROOK, J. and Russell, D.W., Molecular cloning, A Laboratory Manual, 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, , (2001).
- SAMBROOK, Fritsch and Maniatis, A laboratory manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, (1995).
- SANCHEZ-GONZALES, M., Rosazza, P. N. J., Mixed Aromatic Acyloin Condensations with Recombinant Benzaldehyde Lyase: Synthesis of α -Hydroxydihydrochalcones and Related α -Hydroxy Ketones, Adv. Synth. Catal., 345, 819-824 (2003).
- STRYER, L., Biochemistry, 4th Edition, W.H. Freeman and Company, New York (1995).
- WU, X. C., Lee, W., Tran, L., Wong, S. L., Engineering a *Bacillus subtilis* Expression Secretion System with a Strain Deficient in Six Extracellular Proteases. J. Biotechnol. 173, 4952-4958, (1991).
- YANISCH-PERRON, C., Viera, J. and Messing, J., Improved M13 phage cloning vectors and host strains, Nucleotide Sequences of the M13mp18 and pUC19 Vectors, Gene, 33, 103-119, (1985).
- YE, R., Kim, B. G., Szarka, S., Sihota, E., Wong, S. L., High-Level Secretory Production of Intact, Biologically Active Staphylokinase from *Bacillus subtilis*. Biotechnol. Bioeng. 62, 87-96 (1999).

Ekler

EK 1 Genetik Mühendisliği Araştırma Programında Kullanılan Çözeltilerin Bileşimi

LB

Soytripton	10 kg m ⁻³
Maya özütü	5 kg m ⁻³
NaCl	10 kg m ⁻³

LBA

Soytripton	10 kg m ⁻³
Maya özütü	5 kg m ⁻³
NaCl	10 kg m ⁻³
Agar	15 kg m ⁻³

ÇÖZELTİ I

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

ÇÖZELTİ II

NaOH	0.2 N
SDS	1%

ÇÖZELTİ III

Potasyum asetat	5 M
Asetik asit	11.5 (v/v)

SET

NaCl	75 mM
EDTA	25 mM

10X TBE

Tris	108 kg m ⁻³
Borik asit	55 kg m ⁻³
EDTA	9.3 kg m ⁻³

EK 1 Genetik Mühendisliği Araştırma Programında Kullanılan özeltilerin Bileşimi (devam)

TSE

Tris HCl, pH= 8.0	10 mM
NaCl	300 mM
EDTA	10 mM

ÇÖZELTİ A

Tris HCl, pH= 8.1	10 mM
EDTA	10 mM
NaCl	50 mM
Sakkaroz	8% (w/v)

ÇÖZELTİ B

SDS	1% (w/v)
NaOH	0.2 M

ÇÖZELTİ C

Potasyum asetat	5 M
Asetik asit	60 ml
dH ₂ O	100 ml'ye tamamlanır

10X TE

Tris-HCl	0.1 M
EDTA pH=7.5	0.01 M

PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Kodu: 104M258
Proje Başlığı: Metabolik+Genetik+Biyokimyasal Reaksiyon Mühendisliği Prensipleriyle Rekombinant Enzim Üretimi
Proje Yürütücüsü ve Yardımcı Araştırmacılar: Prof.Dr. Pınar Çalık
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: ODTÜ, Kimya Mühendisliği Bölümü İnönü Bulvarı, 06531 Ankara
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: -
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 1 Nisan 2005 - 1 Haziran 2008
Öz Benzoinin açil bağının kırılması ve oluşması tepkimesini dönüşümlü olarak katalizleyerek aril aldehitlerin ve açiloinlerin sentezinde kullanılan benzaldehit liyaz (BAL, EC. 4.1.2.38) enzim üretimi için rekombinant mikroorganizma ile biyoproses geliştirilmesi araştırma projesinin temel amacıdır. <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLYsS, <i>Bacillus</i> türleriyle ve <i>P.pastoris</i> içinde en yüksek BAL ajktivitesi pRSETA::bal taşıyan <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLYsS ile elde edilmiştir ve biyoreaktör işletim parametrelerinin etkisi de pRSETA::bal taşıyan <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLYsS ile araştırılmış; pH _c =7.2 ve çözünmüş oksijen derişiminin 40%'da tutulduğu koşulda en yüksek aktivite elde edilmiştir. Besleme stratejileri içinde, hücre derişimi, benzaldehit liyaz aktivitesi ve karbon kaynağı tüketimi temel alındığında en uygun besleme stratejisi ortamdaki glukoz ve fruktoz tüketildiğinde üretim ortamında glukoz ve fruktozun derişimlerinin 1.5 kg m ⁻³ e çıkarılması olarak bulunmuştur. Bu strateji ile t= 24 st'te en yüksek BAL aktivitesi ve hücre derişimi sırasıyla A=2315 U cm ⁻³ ve C _x =8.04 kg m ⁻³ olarak elde edilmiştir.
Benzaldehit liyaz, reaksiyon mühendisliği, metabolik mühendislik, rekombinant, biyoreaktör, oksijen aktarımı, besleme stratejisi
Projeden Kaynaklanan Yayınlar: Makaleler: Kaya, H., Angardi, V., Çalık P. Overexpression of <i>Pseudomonas fluorescens</i> benzaldehyde lyase gene in <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3): Effect of oxygen transfer, AIChE Journal (sunuldu) Çalık P., Yılgör, P., Demir, A.S., 2006. Influence of controlled-pH and uncontrolled-pH operations on recombinant benzaldehyde lyase production by <i>Escherichia coli</i> . Enzyme and Microbial Technology, 38(5), 617-627. Çalık P., İleri, N., Erdinç, B.I., Aydoğan, N., Argun, M., 2005. A novel anti-foam for fermentation processes: fluorocarbon-hydrocarbon unsymmetrical bolaform surfactant. Langmuir, 21(19), 8613-8619. Kongre Tebliğleri: Buyuksungur, A., Çalık, P., 2007. Extracellular benzaldehyde lyase production by <i>Pichia pastoris</i> , 13th European Congress on Biotechnology, Journal of Biotechnology, 131 (2): S175-S176, Barselona, İspanya. Levent, H., Buyuksungur, A., Çalık, P., 2007. Fed-batch operation for benzaldehyde lyase production by recombinant <i>Escherichia coli</i> , 13th European Congress on Biotechnology, Journal of Biotechnology, 131(2), S225-S226, Barselona, İspanya. Kaya, H., Büyüksungur, A., Çalık P., Özdamar, T.H., 27-30/8/2006. Recombinant microorganism development and medium design for extracellular benzaldehyde lyase production, ESBES 6 th European Symposium on Biochemical Engineering Science, Abstract Book, P: 148, Salzburg, Austria.
Bilim Dalı : Kimya Mühendisliği Doçentlik Bilim Dalı Kodu: 912

