

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**METABOLİK MÜHENDİSLİK ve REAKSİYON MÜHENDİSLİĞİ
PRENSİPLERİYLE HÜCRE-DIŞI REKOMBİNANT
İNSAN BÜYÜME HORMONU ÜRETİMİ**

Özge Deniz YILMAZ

KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ANKARA

2008

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Metabolik Mühendislik ve Reaksiyon Mühendisliği Prensipleriyle Hücre-Dışı
Rekombinant İnsan Büyüme Hormonu Üretimi

Özge Deniz YILMAZ

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Güzide ÇALIK
Eşdanışman: Prof. Dr. H. Tunçer ÖZDAMAR

Rekombinant insan büyüme hormonunun (rhGH) doğala özdeş, çözünebilir ve biyolojik aktif yapıda hücre-dışı bir mikroorganizmada üretilebilmesi için, önce metabolik mühendislik tasarımı yapılmıştır. Serin alkali proteaz (SAP) geninin (*subC*) -*pre* dizininin hGH mature peptit dizinini sentezleyen *hGH* geninin önüne entegre edilmesiyle, araştırma grubumuzda bu çalışmadan önce oluşturulan -*pre(subC)::hGH* hibrit-geninin (999 bp), pRB373 *E.coli-Bacillus* shuttle plasmidine (5800 bp) klonlanılması ile yeni bir rekombinant plasmid geliştirilmiştir. Tasarlanan ve oluşturulan pRB373::*pre(subC)::hGH* plasmidinin hücre-dışı yedi proteaz geni silinmiş *Bacillus subtilis* WB700 ve, iki proteaz geni silinmiş *Bacillus subtilis* 1A751 konak-hücrelerine transferi ile, hücre-dışı hGH üretim performansı olan yeni iki rekombinant mikroorganizma geliştirilmiştir. İkinci araştırma programında, hücre-dışı rhGH üretimi yapan üç *r-B.subtilis* ile biyoreaktörlerde yapılan kıyaslamalı üretim deneyleri sonucunda pMK4::*pre(subC)::hGH* taşıyan *r-B.subtilis*'in üretim performansı en yüksek bulunmuş ve hGH üretimi için seçilmiştir. Araştırma programının üçüncü evresinde biyoreaktör işletme parametresi hidrojen iyonu derişiminin (pH) üretime etkisi araştırılmıştır. Başlangıç değeri $pH_0=6.75, 7.00, 7.25, 7.50, 7.75, 8.00, 8.25$ olan yedi koşulda, mikrobiyolojik-hava filtreli kesikli biyoreaktörlerde deneyler yapılmış ve $C_{hGH} = 0.021 \text{ kg m}^{-3}$ değeri ile $pH_0=7.50-7.25$ aralığı en iyi pH-işletim koşulu olarak belirlenmiştir. pH-kontrolunun hGH üretimine olumsuz etki yaptığı belirlendiğinden, dördüncü araştırma programında, $V=1.0 \text{ dm}^3$ hacımlı, karıştırma-, pH-, sıcaklık-, köpük-, çözünen oksijen derişimi- kontrollu biyoreaktörlerde $V_R= 0.55 \text{ dm}^3$, $T=37 \text{ }^\circ\text{C}$, $Q_0/V=0.5 \text{ vvm}$, $N=800 \text{ dk}^{-1}$ işletim koşullarında $pH_0=6.75, 7.25, 7.50, 8.00$ değerlerinde pH-kontrolsuz deneyler yapılmıştır. $pH_0= 7.50$ olan pH-kontrolsuz koşulda maksimum hGH derişimi $t= 32 \text{ st}$ 'da 0.046 kg m^{-3} olarak ölçülmüştür. Kesikli hGH üretim prosesi süresince biyoproses karakteristikleri ve dinamik yöntem ile sıvı faz hacimsel kütle aktarım katsayısı K_{La} ve mikroorganizmanın hacimsel oksijen tüketim hızı $-r_0$ ölçülerek oksijen aktarım karakteristikleri belirlenmiştir.

2008, 180 sayfa

Anahtar kelimeler : İnsan büyüme hormonu, rhGH, metabolik mühendislik, reaksiyon mühendisliği, biyoreaktör işletim koşulları, pH etkisi, rekombinant, *Bacillus subtilis*

ABSTRACT

Master Thesis

Extracellular Recombinant Human Growth Hormone Production by Metabolic Engineering and Reaction Engineering Principles

Özge Deniz YILMAZ

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

Supervisor: Prof. Dr. Güzide ÇALIK
Co-supervisor: Prof. Dr. Tunçer H. ÖZDAMAR

Metabolic engineering design was carried out in order to produce mature, solvable and biologically active extracellular recombinant human growth hormone (rhGH) in protease deficient strains of *Bacillus subtilis*. $-pre(subC)::hGH$ gene (999 bp) which was constructed in our research group by amplification of *subC* signal DNA sequence and hGH mature peptide sequence, was restricted from $pMK4::pre(subC)::hGH$ and cloned to a new shuttle plasmide, r-pRB373 (5800 bp). By the transformation of the constructed $pRB373::pre(subC)::hGH$ plasmid to the seven protease gene deleted *Bacillus subtilis* WB700 and two protease gene deleted *Bacillus subtilis* 1A751 host-cells; two new recombinant microorganisms having the capacity of hGH production are generated. *r-B.subtilis* carrying $pMK4::pre(subC)::hGH$ is chosen for rhGH production due to its higher production performance. In the second stage of the research program, the effect of bioreactor operation parameter ie, hydrogen ion concentration, pH on hGH production is investigated. Experiments are carried out in microbiological-air filtered batch bioreactors at seven different initial pH conditions 6.75, 7.00, 7.25, 7.50, 7.75, 8.00, and 8.25 and the highest hGH production was obtained as $C_{hGH} = 0.021 \text{ kg m}^{-3}$ at $pH_o = 7.50-7.25$. Since pH-control has unfavorable effects on rhGH production in the third stage of the research pH-uncontrolled experiments were carried out in pilot-scale; stirring rate-, pH-, temperature-, foam-, dissolved oxygen concentration controlled bioreactors at $V_R = 0.55 \text{ dm}^3$, $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$, $Q_0/V = 0.5 \text{ vvm}$, and $N = 800 \text{ rpm}$ operation conditions at $pH_o = 6.75, 7.25, 7.50, 8.00$. Maximum hGH concentration is observed at $t = 32 \text{ h}$ as 0.046 kg m^{-3} at $pH_o = 7.50$. Along with the recombinant hGH fermentations, bioprocess characteristics and by the measurement of liquid phase mass transfer coefficient, K_{La} and oxygen consumption rate $-r_o$ using the dynamic-method, oxygen transfer characteristics were found.

2008, 180 pages

Key Words: Human Growth Hormone, rhGH, metabolic engineering, reaction engineering, bioreactor operation conditions, pH effect, recombinant, *Bacillus subtilis*

ÖNSÖZ

‘Metabolik Mühendislik ve Reaksiyon Mühendisliği Prensipleriyle Hücre-Dışı Rekombinant İnsan Büyüme Hormonu Üretimi’ konulu yüksek lisans tezi Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü, Biyokimyasal Reaksiyon Mühendisliği Araştırma Grubunda sürdürülmüş ve tamamlanmıştır. Araştırmalarım TÜBİTAK 107M420 projesi ile ve yüksek lisans bursu ile desteklenmiştir.

Yüksek lisans çalışmalarına 2006 yılında başladım, ilk iki dönemimde derslerimi tamamladım ve kaynak araştırmamı yaptım. Araştırmalarım, metabolik mühendislik tasarımı ile oluşturduğum genetik mühendisliği programı ile başladım. Aldığım dersler sayesinde teorik olarak iyi bildiğim bu teknikler ile rekombinant mikroorganizma geliştirmem yaklaşık beş ay sürdü. Genetik mühendisliği programımı hızlı ve başarılı bir şekilde tamamlamanın heyecanı ile reaksiyon mühendisliği araştırma programına başladım. Bu aşamada uzun bir süre dar-boğaz yaşadıkdan sonra, aldığım ilk pozitif sonuçlar ile araştırmam hız kazandı. Sonuçlarını merakla beklediğim, aldığım pozitif sonuçlarda çok mutlu eden, dar-boğazlarda ise çok yıpratıcı olan bu sürecin ardından, araştırma programım Temmuz 2008’de tamamlanmıştır.

Yüksek lisans çalışmam süresince bilgi ve tecrübesinden çok yararlandığım, yorumlarıyla göremediğim noktaları bana işaret eden, sakin ve yapıcı tavrıyla eleştirilerinden çok yararlandığım, aktardığı bilginin yanı sıra verdiği manevi destek ile bu süreçte her zaman yanımda olan, danışman hocam Sayın Prof. Dr. Güzide Çalık’a içtenlikle teşekkür ederim.

Yüksek lisans çalışmam süresince, araştırmamın her evresinde tartışma fırsatı bulduğum, araştırmamı etkin şekilde devam ettirebilmem için her türlü olanağı ve alt yapıyı hazırlayan, daha iyi yetişmem adına dile getirdiği beklentilerinin zaman zaman yapabileceğimin çok üstünde olduğunu düşünsem de, eleştirileriyle hem araştırmama hem de iyi bir kimya mühendisi olarak yetişmeme çok büyük katkısı olan eş-danışmanım, değerli hocam Sayın Prof. Dr. H. Tunçer Özdamar’a çok teşekkür ederim.

Araştırma programıma başladığım ilk günden itibaren her zaman kendimi araştırma grubunun bir üyesi olarak gördüğüm, tecrübesinden çok yararlandığım, metabolik mühendislik tasarımımdan başlayarak araştırmalarımın her evresinde araştırma programımın gelişimine ve gerçekleşmesine eş-danışman ilgisiyle katkılar yapan, yorumlarıyla araştırmama değer katan, tartışmaktan ve fikrini almaktan asla çekinmediğim ve araştırmamın her sürecinde bana verdiği manevi desteği asla unutmayacağım, değerli hocam Sayın Prof. Dr. Pınar Çalık’a sonsuz teşekkürü borç biliyorum.

Lisans-üstü öğrenciler araştırma programlarına başlarken, tecrübeli lisans-üstü öğrencilerin araştırmalarına katılarak yöntemlerin uygulanmasında ve sistemlerin işletilmesinde tecrübe kazanırlar. Birinci yarıyıl sonrasında yaz döneminde çalışmalarının son aşamasında, biyoreaktör sistemlerinin işletilmesiyle ilgili çalışmalar için KYM Birgül Şentürk ve KYM Yasemin Demirci’ye; hocam Prof.Dr. Pınar Çalık’ın “Endüstriyel Bioteknoloji ve Metabolik Mühendislik Laboratuvarında (ODTÜ)”,

genetik mühendisliği tekniklerini öğrenmemdeki desteği için KYM M. Ali Orman'a; başta MALDI-ToF MS sisteminin işletilmesini ve sonuçların değerlendirilmesindeki yardımları için KYM Eda Çelik'e ve; biyoreaktör deneylerim süresince gece benimle kalılarak eşlik eden, manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen arkadaşım KYM Pınar Kocabaş'a, teşekkür ederim.

İyi bir biyoreaktör mühendisi formasyonu da kazandığım için mutluyum. Chemap ve B.Braun biyoreaktör sistemlerinin revizyonunda sayın Ali Rıza Yücel'in (Proterm Ltd) büyük katkılarını unutamam. Biyoreaktör deneylerime başlamadan önce, hemen her ihtiyaç duyduğumda, akşamdan başlayarak neredeyse sabaha kadar, gece gündüz demeden uzun saatler süresince verdiği teknik destek ile sistemleri tekrar işletmeye alabildim ve araştırmalarımı sürdürebildim. Ali Rıza Yücel beye içten teşekkürü borç biliyorum.

Yüksek lisans çalışmalarımın her aşamasında bana destek olan, ikinci ailem olarak gördüğüm KM Nihan Karakoç ve KM Evrim Akyürek'e çok teşekkür ederim.

Son olarak, hayatımın her evresinde olduğu gibi yüksek lisans çalışmam süresince de beni yalnız bırakmayan, beni dinlemekten asla sıkılmayan, aramızdaki 480 km mesafeye rağmen hep yanımda hissettiğim, uykusuz kaldığım geceleri benimle yaşayan, bu süreçteki tüm hissetiklerimin gerçek tanıkları ve elde ettiğim tüm başarıların olduğu gibi bunun da gerçek mimarları olan, annem Ayşe Yılmaz ve babam İsmail Yılmaz'a, 2.5 yıl süresince zaman bulamadığım tüm işlerimi gönül rahatlığıyla emanet edebildiğim, benden küçük olmasına rağmen fikirleriyle kararlarımın her zaman önemli rol oynayan biricik kardeşim Ozan Yılmaz'a sonsuz sevgimi ve teşekkürlerimi sunarım.

Özge Deniz Yılmaz
Temmuz 2008

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ	iii
SİMGELER DİZİNİ	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI ve KURAMSAL TEMELLER	9
2.1 Süreli Yayınlarda İnsan Büyüme Hormonu Üretimine İlişkin Çalışmalar ..	9
2.1.1 Hidrojen iyonu derişimi: pH etkisi	24
2.1.2 Oksijen aktarımı etkisi	28
2.2 Biyoteknolojik Prosesler ve Mikro-biyoreaktörler: Mikroorganizmalar	31
2.3 <i>Bacillus</i> Türleri ve <i>B.subtilis</i>	32
2.4 Taşınım Mekanizmaları	34
2.5 <i>Bacillus</i> Türlerinde Hücre-Dışına Taşınım	38
2.5.1 <i>Bacillus</i> hücre zarfının yapısı ve fonksiyonu	38
2.5.2 <i>Bacillus</i> türlerinde proteinlerin salgılanması.....	41
2.6 Genetik Mühendisliği Teknikleri ve Moleküler Tasarım	45
2.6.1 Nükleik asitler	45
2.6.2 DNA yapısı ve fonksiyonu	48
2.6.3 Mikro-reaksiyon mühendisliği ve mikro-ayırma işlemleri	50
2.7 İnsan Büyüme Hormonu (hGH)	64
2.7.1 Yapısı ve doğal sentezi	65
2.7.2 Fizyolojik ve metabolik etkileri	65
2.7.3 Üretimi ve kullanım onayı	67
2.8 Biyoproses Karakteristikleri	68
2.9 Biyoreaktör İşletim Parametreleri	71
2.9.1 Sıcaklık	71
2.9.2 pH	72
2.9.3 Oksijen aktarımı	73
2.10 Metabolik Mühendislik	80
3. MATERYAL VE YÖNTEM	82

3.1	Mikroorganizma	82
3.2	Genetik Mühendisliği Yöntemleri	83
3.2.1	Kromozomal DNA izolasyonu	83
3.2.2	DNA derişiminin belirlenmesi	85
3.2.3	PCR cihazıyla gen derişimlerinin artırılması	85
3.2.4	Restriksiyon enzimleri ile kesme ve ligasyon reaksiyonu	86
3.2.5	Plasmid DNA'nın <i>E.coli</i> 'ye transferi: CaCl ₂ yöntemi	88
3.2.6	<i>E. coli</i> 'den plasmid DNA izolasyonu	89
3.2.7	DNA' nın ağaroz jelden ekstaksiyonu.....	89
3.2.8	Plasmid DNA'nın <i>Bacillus</i> türlerine transferi: Elektroporasyon	89
3.2.9	<i>Bacillus</i> 'tan miniprep plasmid DNA izolasyonu: Alkali liziz yöntemi	91
3.3	Rekombinant <i>Bacillus</i> Türleri ile hGH Üretimi	93
3.3.1	Mikrobank (mikroorganizma saklama sistemi)	92
3.3.2	Katı çoğalma ortamı	93
3.3.3	Ön sıvı çoğalma ortamı	93
3.3.4	Sıvı çoğalma ortamı	94
3.3.5	Ölçek büyütme adımları ve biyoreaktör sistemi	95
3.3.6	Pilot-ölçek biyoreaktörde üretim	95
3.4	Analitik Yöntemler	98
3.4.1	Mikroorganizma derişimi	98
3.4.2	Glukoz derişimi	98
3.4.3	hGH derişimi	99
3.4.4	hGH tayini: Dot-blott	100
3.4.5	hGH molekül büyüklüğü: SDS-PAGE	101
3.4.6	hGH molekül büyüklüğü: WESTERN-BLOT	102
3.4.7	hGH yapısı ve molekül büyüklüğü: MALDI- ToFF MS	104
3.4.8	Hücre-içi hGH üretimi	104
3.5	Sıvı Faz Kütle Aktarım Katsayısı Ve Oksijen Tüketim Hızı	105
4.	DENEY VE BULGULAR	106
4.1	hGH Üretim Performansına Sahip Mikroorganizma Geliştirilmesi	106
4.1.1	Hibrit genin pRB373 plasmidine klonlanması	107
4.1.2	r-pRB373 plasmidinin <i>Bacillus</i> türlerine transformasyonu	109
4.2	Üretilen hGH Yapısının Belirlenmesi	111
4.3	hGH Üretim Performanslarının Kıyaslanması	115

4.3.1 r-pRB373 ve r-pMK4 plasmidlerini taşıyan <i>B.subtilis</i> 1A751 hücrelerinin kıyaslanması	115
4.3.2 Farklı <i>Bacillus</i> türlerinin kıyaslanması	117
4.4 Laboratuvar-Ölçekte pH Etkisi	119
4.5 Pilot-ölçekte pH Etkisi	122
4.6 Oksijen Aktarımı ve Biyoproses Karakteristikleri	124
5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR	33
5.1 Metabolik Mühendislik Programı	133
5.2 Üretilen hGH'nin Yapısal Analizi	135
5.3 Mikroorganizma Seçimi	135
5.4 pH Etkisi	136
5.5 Toplu Sonuçlar ve Öneriler	142
KAYNAKLAR	45
EKLER	54
EK 1 Metabolik Mühendislik Tasarımları	155
EK 2 Primerlerin Tasarımı	164
EK 3 Genetik Mühendisliği Programı İşaretleyicileri	170
EK 4 Genetik Mühendisliği Programı Çözeltileri	172
EK 5 Mikroorganizma Derişimi Kalibrasyonu	174
EK 6 Glukoz Derişimi Kalibrasyonu	175
EK 7 hGH Derişimi Kalibrasyonu	176
EK 8 SDS-PAGE ve WESTERN-BLOTT Çözeltileri	177
EK 9 Dinamik Yöntem Örnek Grafik ve Sonuçları	179
ÖZGEÇMİŞ	180

SİMGELER DİZİNİ

Abs	Absobans
C_{A_0}	Başlangıç azot kaynağı derişimi, kg/m^3
C_{K_0}	Başlangıç karbon kaynağı derişimi, kg/m^3
C_{G_0}	Başlangıç glukoz derişimi, kg/m^3
C_G	Glukoz derişimi, kg/m^3
C_O	Çözünmüş oksijen derişimi, mmol dm^{-3}
C_X	Mikroorganizma derişimi, kg/m^3
C_{hGH}	hGH derişimi, kg/m^3
E	Artma faktörü ($=K_{L,a} / K_{L,a_0}$)
$K_{L,a}$	Sıvı faz hacimsel kütle aktarım katsayısı, s^{-1}
N	Karıştırma hızı, dk^{-1}
N_A	A bileşeni için molar kütle aktarım akısı (OTR), $\text{mol m}^{-3} \text{s}^{-1}$
OD	Oksijen ihtiyacı ($\mu_{\max} C_X / Y_{X/O}$), $\text{mol m}^{-3} \text{s}^{-1}$
Q_O/V_R	Birim hacme gönderilen gaz hızı, vvm: hacim/hacim dk
r_o	Oksijen tüketim hızı, $\text{mmol/dm}^3 \text{s}$
r_x	Hücre çoğalma hızı, $\text{kg/m}^3 \text{st}$
r_p	hGH üretim hızı, $\text{kg/m}^3 \text{st}$
t	Kalma süresi, s veya st
T	Sıcaklık, °C
V_R	Biyodönüşüm ortamı hacmi, cm^3
$Y_{X/S}$	Substrat başına hücre verimi
$Y_{X/O}$	Tüketilen oksijen başına hücre verimi
$Y_{P/S}$	Tüketilen substrat başına ürün verimi
$Y_{P/O}$	Tüketilen oksijen başına ürün verimi
$Y_{S/O}$	Tüketilen oksijen başına tüketilen substrat verimi
λ	Dalga boyu, nm
μ	Spesifik çoğalma hızı, s^{-1}
μ_{\max}	Maksimum spesifik çoğalma hızı, s^{-1}
η	Etkinlik katsayısı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1	Serbest yayınma	36
Şekil 2.2	Kolaylaştırılmış yayınma	37
Şekil 2.3	Aktif taşınım	38
Şekil 2.4	Hücre içindeki SAP'ın şematik gösterimi	43
Şekil 2.5	Serin alkali proteaz enziminin hücre dışına taşınımı	44
Şekil 2.6	Nükleotit biriminin yapısı	46
Şekil 2.7	Pürin ve pirimidin bazları	46
Şekil 2.8	DNA'nın birincil yapısı	48
Şekil 2.9	DNA'nın ikincil yapısı	48
Şekil 2.10	DNA'nın üç boyutlu yapısı	48
Şekil 2.11	PCR tepkimesiyle gen derişiminin arttırılması	53
Şekil 2.12	Restriksiyon enzimleri ile küt/yapışkan uçlu kesme tepkimesi	56
Şekil 2.13	Plazmitlerin genel yapıları	57
Şekil 2.14	Hücrede bulunan plazmit şekilleri	57
Şekil 2.15	Ligasyon tepkimesi	59
Şekil 2.16	İndüklenmiş transformasyon sırasında hücre ve plazmidin durumu	61
Şekil 2.17	pUC19 plasmidi	64
Şekil 2.18	22kDa'luk hGH'nin amino asit dizini	66
Şekil 2.19	İki film teorisine göre bir gaz kabarcığından mikroorganizmaya oksijenin aktarım mekanizması	73
Şekil 2.20	Dinamik Yöntem uygulamasında çözünmüş oksijen derişiminin kalma süresi ile değişimi	78
Şekil 2.21	Dinamik Yöntem ile sıvı faz hacımsal kütle aktarım katsayısının Belirlenmesi	79
Şekil 3.1	pRB373::pre(subC)::hGH (r-pRB373) plasmidinin tasarım şeması	84
Şekil 3.2	Pilot-ölçek biyoreaktör sistemi	97
Şekil 3.3	SDS-PAGE modülüne yerleştirilmiş jelle örnek yüklenmesi	102
Şekil 3.4	Proteinlerin poliakrilamid jelden membrana aktarımı	103
Şekil 4.1	r-pUC19 izolasyonu	107
Şekil 4.2	pRB373 izolasyonu	107
Şekil 4.3	r-pUC19 kesme tepkimesi sonucu	108
Şekil 4.4	pRB373 ve r-pRB373'ün PCR öncesi ve sonrasında jel görüntüsü	110

Şekil 4.5	<i>EcoRI</i> enzimi ile kesilmiş pRB373 ve r-pRB373'ün jel görüntüsü	110
Şekil 4.6	Hibrit-genin PCR görüntüsü	111
Şekil 4.7	MALDI-ToF MS analizi	113
Şekil 4.8	Pilot-ölçek biyoreaktörlerde farklı başlangıç pH'ı koşullarının hGH performansına etkisini gösteren Western Blott görüntüsü	115
Şekil 4.9	r-pRB373 ve r-pMK4 plazmitlerini taşıyan <i>B.subtilis</i> 1A751 mikroorganizmalarının hGH üretim performanslarının kıyaslanması	117
Şekil 4.10	Farklı mikroorganizmalar ile hGH üretim deneyi; dot-blot yöntemi ile hGH analizi	119
Şekil 4.11	r- <i>B. subtilis</i> ile hGH üretiminde hücre değişiminin kalma süresi ve başlangıç pH'ı ile değişimi	120
Şekil 4.12	r- <i>B. subtilis</i> ile hGH üretiminde glukoz değişiminin kalma süresi ve başlangıç pH'ı ile değişimi	121
Şekil 4.13	r- <i>B. subtilis</i> ile hGH üretiminde hGH değişiminin kalma süresi ve başlangıç pH'ı ile değişimi	121
Şekil 4.14	r- <i>B. subtilis</i> ile hGH üretiminde ortam pH'ının kalma süresi ve başlangıç pH'ı ile değişimi	125
Şekil 4.15	r- <i>B. subtilis</i> ile hGH üretiminde çözülmüş oksijen değişiminin kalma süresi ve başlangıç pH'ı ile değişimi	125
Şekil 4.16	r- <i>B. subtilis</i> ile hGH üretiminde hücre değişiminin kalma süresi ve başlangıç pH'ı ile değişimi	126
Şekil 4.17	r- <i>B. subtilis</i> ile hGH üretiminde glukoz değişiminin kalma süresi ve başlangıç pH'ı ile değişimi	126
Şekil 4.18	r- <i>B. subtilis</i> ile hGH üretiminde ürün değişiminin kalma süresi ve başlangıç pH'ı ile değişimi	127
Şekil 5.1	r- <i>B. subtilis</i> ile hGH üretiminde hücre değişiminin kalma süresi ve başlangıç pH'ı ile değişimi	141
Şekil 5.2	r- <i>B. subtilis</i> ile hGH üretiminde glukoz değişiminin kalma süresi ve başlangıç pH'ı ile değişimi	141

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1	Rekombinant farmasötik proteinler ve kullanım alanları	4
Çizelge 1.2	<i>Bacillus sp.</i> tarafından üretilen ve hücre-dışına salgılanan rekombinant proteinler	5
Çizelge 1.3	hGH üreten kuruluşlar, ürün adları ve birim fiyatları	7
Çizelge 2.1	hGH üretimiyle ilgili kaynak araştırması: Konak-hücre: <i>E.coli</i>	18
Çizelge 2.2	hGH üretimi ile ilgili kaynaklar: Konak- hücre: <i>Bacillus</i>	20
Çizelge 2.3	hGH üretimi ile ilgili kaynaklar: Konak-hücre: <i>Pichia pastoris</i>	21
Çizelge 2.4	hGH üretimiyle ilgili kaynak araştırması; Biyoreaktör işletim parametreleri: <i>E.coli</i>	22
Çizelge 2.5	hGH üretimiyle ilgili kaynak araştırması; Biyoreaktör işletim parametreleri: <i>Bacillus subtilis</i>	24
Çizelge 2.6	hGH üretimiyle ilgili kaynak araştırması; kullanılan pH değerleri ve işletim koşulları	26
Çizelge 2.7	<i>Bacillus</i> grubu mikroorganizmalar ile SAP üretiminde pH işletim koşulu etkisi	27
Çizelge 2.8	Bakterilerde bazı metabolitlerin taşınım mekanizmaları	35
Çizelge 2.9	DNA molekül büyüklükleri	50
Çizelge 2.10	Restriksiyon enzimlerinden bazılarının izole edildikleri mikroorganizmalar, hedef dizinler ve kesim biçimi	55
Çizelge 2.11	Farklı verim katsayılarının tanımları (Blanch and Clark 1997).....	70
Çizelge 2.12	Farklı verim katsayılarının tanımları	71
Çizelge 3.1	Araştırmada kullanılmış olan mikroorganizma ve plazmitler	82
Çizelge 3.2	Rekombinant <i>Bacillus</i> türleri için katı çoğalma ortamı	93
Çizelge 3.3	Rekombinant <i>Bacillus</i> türleri için ön sıvı çoğalma ortamı	94
Çizelge 3.4	Rekombinant <i>Bacillus</i> türleri için sıvı çoğalma ortamı	94
Çizelge 4.1	Rekombinant plazmitlerin kıyaslanmasında kullanılan koşullar	116
Çizelge 4.2	Rekombinant mikroorganizmaların kıyaslanmasında kullanılan koşullar	118
Çizelge 4.3	Oksijen aktarım karakteristiklerinin biyoproses süresince değişimi	129
Çizelge 4.4	Oksijen aktarım karakteristiklerinin biyoproses süresince değişimi	129
Çizelge 4.5	Oksijen aktarım karakteristiklerinin biyoproses süresince değişim.....	130

Çizelge 4.6	Oksijen aktarım karakteristiklerinin biyoproses süresince değişimi	130
Çizelge 4.7	Verim katsayılarının biyoproses süresince değişimi	131
Çizelge 4.8	Hücre derişimi ve spesifik çoğalma hızının biyoproses süresince değişimi	132

1. GİRİŞ

Biyoteknoloji, yapısındaki bilimsel gerçekler 18. yüzyıla dek bilinmese de, insanlık tarihi boyunca ekmek yapımında, alkollü içeceklerin mayalandırılmasında, tarım bitkilerinin ve evcil hayvanların ıslahında yüzyıllardır kullanılmaktadır. Ancak bilinen ilk tanımı 1919 yılında Karl Ershy tarafından ‘**biyolojik sistemlerin yardımıyla hammaddelerin yeni ürünlere dönüştürüldüğü işlemdir**’ şeklinde yapılmıştır. 1950’li yıllardan itibaren gelişen moleküler biyoloji ve moleküler genetik bilimleri, 1970’lerden başlayarak biyoteknoloji alanında da etkisini göstermiş ve modern biyoteknoloji ortaya çıkmıştır. Rekombinant DNA teknolojisi ve genetik mühendisliği alanındaki gelişmeler, genetik yapısı moleküler düzeyde değiştirilerek elde edilen organizmalar kullanılarak verim ve seçimliliğin artırılmasına olanak sağlamıştır. Biyoteknoloji alanındaki bu gelişmelerin ardından, 2004 yılında yürürlüğe giren Cartagena Biyogüvenlik Protokolü’nde modern biyoteknoloji “**rekombinant DNA ve nükleik asidin hücrelere ya da organelle doğrudan enjekte edilmesini içeren *in vitro* nükleik asit teknikleri**” ya da “**geleneksel ıslah ve seleksiyonda kullanılmayan teknikler olan ve doğal fizyolojik üreme veya rekombinasyon engellerinin üstesinden gelen, sınıflandırılmış familyanın ötesinde hücrelerin füzyonu**” şeklinde tanımlanmıştır.

Mikrobiyal, bitki doku veya hayvan doku hücreleri, enzimler ve diğer biyoteknolojik sistemlerin biyokatalizör olarak kullanımıyla biyokimyasal bir tepkime yoluyla üretilen ürünlere biyoteknolojik ürünler; bu ürünlerin elde edildiği ve çeşitli ayırma işlemleri ile istenen niteliğe getirildiği proseslere de biyoteknolojik prosesler denir. Biyoteknolojik proseslerle üretim 20. yüzyılın son 40 yılında kimya endüstrisinin büyük gelişiminin en önemli alanlarından olmuştur. 20. yüzyılın son yirmi yılında ise yeni buluşlarla başta farmasötik temel maddeler üretiminde yeni ürünlerle, daha sonra ise biyokimyasal temel maddelerle ve enzimlerle farmasötik, gıda, deterjan endüstrisindeki gelişmelerin temel kaynağı olmuştur. Biyoteknolojik prosesle ürünler üreten sektörler:

1. Farmasötik Hammadeler Sektörü
2. Biyokimyasal Temel Maddeler Sektörler Grubu
3. Enzim Üretim Sektörü

4. Klasik Fermentasyon Ürünleri Sektörler Grubu
5. Hayvancılık, Ormancılık, Tarım Sektörleri için Biyoteknolojik Ürünler Üretim Sektörleri
6. Biyoteknolojik Proseslerle Atık Arıtımı ve Enerji Üretimi şeklinde gruplanmaktadır.

Biyoteknolojik proseslerle birim fiyatı yüksek olan amino asitler, organik asitler, hormonlar, enzimler, antibiyotikler, biyopolimerler gibi bir çok ürünün, düşük basınç ve sıcaklıkta çalışılan, işletme maliyeti düşük sistemlerde, küçük ölçekte üretilmesi ve aynı işletmede birden fazla ürünün üretiminin gerçekleştirilebilmesi nedeniyle biyoteknolojik proseslerin endüstrideki önemi ve bu alandaki uluslararası rekabet her geçen gün artmaktadır. Biyoteknolojik ürünler üretiminde -sırasıyla- ABD, Japonya, AB ülkeleri Almanya, Fransa, İngiltere, Danimarka, İsveç, İsviçre, İtalya olmak üzere Avrupa ülkelerinin bir kısmı -üniversitelerde yaptıkları temel ve endüstriyel kuruluşların araştırma merkezlerinde yapılan uygulamalı araştırmalarla- buluşları zamanında endüstriye aktararak, biyoteknolojik ürünlerin satışı ile 2000 yılında yaklaşık \$20 Milyar değerini aşan bir ticaret büyüklüğü elde etmişlerdir. Amino asitler sektöründe Japonya, endüstriyel enzimler sektöründe de AB Dünya lideridir. Biyoteknolojik ürünler üretim gruplarından farmasötik hammaddeler içinde farmasötik proteinler sektöründe ABD yeni ürünlerle liderdir ve 2000 yılı toplam satışı yaklaşık \$10 Milyar değerindedir. Türkiye klasik fermentasyon ürünleri sektöründe maya üretimi ve ihracı ile Fransa'dan sonra Dünya ikincisidir.

Biyoreaktör işletim koşulları ve üretim ortamının geliştirilmesi, biyoteknolojik proseslerde verim ve seçiciliği etkileyen iki önemli parametredir. Bu faktörlerin yanı sıra, üretimde kullanılacak mikroorganizmanın üretim performansının yüksek olması biyoteknolojik proseslerle üretimin birinci koşuludur. 1980'li yılların başından itibaren gelişen rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak, doğal yapısı hedef ürünün üretimine uygun olan mikroorganizmanın üretim performansını artırmak veya doğal formuyla üretimi gerçekleştirilemeyecek bir mikroorganizmaya hedef ürünü kodlayan geni taşıyan plazmidi transforme ederek genetik mühendisliği yöntemleriyle rekombinant mikroorganizma geliştirerek üretimi artırmak mümkündür.

Sağlık sektörü için büyük önem taşıyan farmasötik proteinler, hormonlar, antibiyotikler, monoklonal antikorlar, aşilar, immunodiyagnostik testler, DNA problemleri ve doğum öncesi kalıtsal hastalıkların tanısında kullanılan kitler biyoteknolojik proseslerle; optimum biyoreaktör işletim koşullarının ve ortam bileşiminin belirlenmesinin yanı sıra, rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak geliştirilen rekombinant mikroorganizmaların kullanılmasıyla düşük ilk yatırım ve işletim koşullarında yüksek verim ve seçicilikte üretilmektedir. Çizelge 1.1’de rekombinant DNA teknolojisi ile üretilen farmasötik proteinler verilmiştir.

Biyoteknolojik proseslerle terapötik protein üretiminde mikro-biyoreaktör olarak görev yapan rekombinant mikroorganizmanın doğal olarak hücre-dışı üretim potansiyelinin olması, ürünün yan ürünlerden ve hücreden ayrılmasında ek saflaştırma basamaklarını gerektirmediğinden üretim maliyetini düşürmekte ve prosesi kolaylaştırmaktadır. Ayrıca proteinlerin sitoplazmadaki çözünürlükleri düşüktür, bu nedenle hücre-içi ve periplazmik üretimde karşılaşılan diğer bir sorun da ürünün stoplazmada çözünmeyen granüller olarak kalmasıdır (Kane and Hartley 1988, Chen *et al.* 1989). Kullanılan mikroorganizmanın patojenik olmaması ve endotoksinler içermemesi de mikroorganizma seçiminde dikkate alınması gereken diğer bir kriterdir. *Bacillus* türü mikroorganizmalar hücre-dışı heterolog üretim performansları olması ve patojenik olmamaları nedeniyle terapötik protein üretimi için önemli alternatiflerdir. *Bacillus* türü rekombinant mikroorganizmalar tarafından üretilen ve hücre-dışına salgılanan proteinler Çizelge 1.2’de verilmiştir.

Biyoteknolojik proseslerle üretilen terapötik biyomoleküller içinde önemli bir yere sahip olan hormonlar, özel bezler tarafından kana salgılanan ve kan yolu ile ulaştıkları organ ve dokularda fonksiyon düzenleyici bir etki meydana getiren ve çok düşük miktarları ile etki yapan organik bileşiklerdir. Hormonlar, amino asit, polipeptit, protein veya steroid yapıda olabilirler. Hormon sentezi kontrol sisteminin en üst basamağında beyin tabanını teşkil eden ‘hipotalamus’ yer alır. Hipotalamusa varan herhangi bir sinirsel uyarım, buradan mekanizmayı işleten az miktardaki özel hormonların salınımına yol açar. Salınan hormon sinir lifleri aracılığı ile hipofiz bezinin ön lobuna ulaşır.

Çizelge 1.1 Rekombinant farmasötik proteinler ve kullanım alanları

Farmasötik Protein	Kullanım Alanı
α_1 - Antitripsin	Emphysema tedavisi
Adrenokortikotrofik hormon	Romatizmal hastalıklar tedavisi
Aeromonas Aminopepditaz	Dizin analizinde
B-hücre çoğalma faktörleri	Bağışıklık düzensizlikleri tedavisi
Bone Morfogenetik protein-2	Orthopedik hastalıkların tedavisi
Kalsitonin	Osteomalacia tedavisi
Koloni uyarıcı faktörler	Kan düzensizlikleri tedavisi
Chorionic gonadotropin	Anovulasyon tedavisi
Endorphins ve ankephalins	Analjezik ajan
Endostatin	Angiostatin inhibitörü
Epidermal çoğalma faktörü	Yara tedavisinde hızlandırıcı
Eritropoietin	Anemi tedavisi
Faktör VIII	Koagülasyon faktörü; hemofili tedavisi
Faktör IX	Koagülasyon faktörü; hemofili tedavisi
Büyüme hormonu	Büyüme hızlandırıcı
Büyüme hormon salgılama faktörü	Büyüme hızlandırıcı
İnsülin	Diyabet tedavisi
İnterferonlar (α , β , γ)	Antiviral, Antitümör, Antikanser ajan
İnterlökinler	Bağışıklık düzensizlikleri tedavisi
Keratinocyte büyüme faktörü	Büyümeyi düzenleyici
Limfotoksin	Antitümör ajan
Leptinler	Metabolizmayı düzenleyici
Makrofaj aktive edici faktör	Antitümör ajan
Nörotropik faktör	Epilepsi tedavisinde
Sinir çoğalma faktörü	Onarım hızlandırıcı
Platelet-derived çoğalma faktörü	Atherosclerosis tedavisi
Paratiroid hormonu	Endokrin sistemini düzenleyici
Prolaktin	Süt bezlerinde salgıyı düzenleyici
Relaxin	Doğum kolaylaştırıcı
Serum albumin	Plazma destekleyici
Somatomedin C	Büyüme hızlandırıcı
Doku plasminogen aktivatör	Trombolitik ajan
Tümör nekroz faktörü	Antitümör ajan
Urogastron	Antiülser ajan
Ürokinaz	Trombolitik ajan

Hipotalamustan salınan her salgılama faktörü, hipofiz bezinin ön lobundan özel bir hormonun salımına yol açar.

Terapatik protein üretim sektöründe önemli yere sahip hormonlardan biri olan insan büyüme hormonu (hGH) beynin ön lobunda bulunan somatotropik hücreler tarafından, iki hipotalamus hormonunun (growth hormone-releasing hormone; GHRH ve

somatostatin; GHIF) kontrolünde sentezlenen bir hormondur. hHG kondrosit ve kartilag hücrelerinde bölünmeyi hızlandırarak kol, bacak ve iskelette uzamayı, somatomedin C (IGF1) üretimini stimüle ederek dokularda büyümeyi sağlar. Ayrıca, yeni kas hücrelerinin oluşumunu hızlandırır, lipolizizi başlatarak vücutta yağ oranını düşürür, protein sentezini hızlandırarak beyin haricindeki tüm iç organların büyümesini stimüle eder, karaciğerde glukoz tüketim hızını düşürerek karbonhidrat metabolizmasını düzenler ve bağışıklık sistemini stimüle eder. İkinci bölümde verildiği gibi hGH'nin bir çok terapatik kullanım alanı vardır.

Çizelge 1.2 *Bacillus* türleri tarafından üretilen ve hücre-dışına salgılanan rekombinant proteinler

Bileşik
<ul style="list-style-type: none">• Pertussis toksin alt-birimi• β-laktamaz• İnsan öninsülini (proinsülin)• α-galaktosidaz• İnsan epidermal çoğalma faktörü• İnsan atrial α-faktörü• İnsan serum albümini• α_2-interferon• Makrofaj plasminojen aktivatörü• Stafilokinaz

hGH üretimi 1985 yılına kadar insan kadavrasından çıkartılan hipofiz bezinden izole edilerek yapılmış, ancak bu yöntemle üretilen hormon miktarının sınırlı olması ve bu şekilde elde edilen hGH'nin Creutfeldt-jacobs, hepatit B, hepatit C hastalıklarına neden olması yeni üretim proseslerini gerektirmiştir. Bu sorunlar 1985 yılında genetik mühendisliği prensipleri kullanılarak biyoteknolojik proseslerle hGH üretilmesiyle

çözölmüştür. Günümüzde, r-hGH üreten kuruluşlar, ürün adları ve birim fiyatları Çizelge 1.3'de verilmiştir.

Sürelî yayın literatüründe, insan büyüme hormonunun biyoteknolojik prosesle üretilmesi ilk kez 1979 yılında gerçekleştirilmiştir (Goeddel *et al.* 1979). Hsiung *et al.* (1986) ve Becker and Hsiung (1986) yaptıkları çalışmada geliştirdikleri plazmitlerle memelilere ait bir proteinin periplazmik boşluğa direk salgılanmasını ilk kez gerçekleştirmişlerdir. Chang *et al.* (1987) yaptıkları çalışmada fosfat regölasyonunun farklı rekombinant mikroorganizmalarla hGH üretimi üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Kato *et al.* (1987) geliştirdikleri vektörle *E.coli* konak hücresinde hücre-dışı hGH üretimini ilk kez gerçekleştirmişlerdir.

Hsiung *et al.* (1989) yaptıkları çalışmada farklı sinyal peptitlerin ve IPTG derişimlerinin hGH üretimi üzerindeki etkisini *E.coli* konak-hücresinde incelemişlerdir. Jensen and Carlsen (1990) yaptıkları çalışmada farklı N-uçlarının gösterdiği kararlılığı *E.coli*'de incelemişlerdir. Franchi *et al.* (1991) yaptıkları çalışmada bir hibrit plazmit serisi oluşturarak, *Bacillus subtilis* konak-hücresinde farklı hGH öncüllerinin sentezlenmesini sağlamışlardır. Kajino *et al.* (1997) tarafından, insan büyüme hormonunu degrade eden proteaz aktivitesini düşürmek amacıyla, hücre-dışı proteaz aktivitesi düşük olan *Bacillus brevis* konak hücrelerinde hücre-dışı hGH üretimi gerçekleştirilmiştir. Uchida *et al.* (1997) geliştirdikleri farklı plazmitlerde 20 kDa büyüklüğünde hGH'nin periplazmik üretimini *E.coli* konak-hücresinde incelemişlerdir.

Çizelge 1.3 hGH üreten kuruluşlar, ürün adları ve birim fiyatları.

Zhang *et al.* (1998) *E.coli* konak-hücresinde yüksek hücre derişimi, karbon kaynağı ve çözönmüş oksijen seviyesinin hGH üretime etkisini araştırmışlardır. Patra *et al.* (2000), *E.coli* konak-hücresinde stoplazmik olarak ürettikleri çözözmez yapıdaki hGH'nin çözözürlülüğünü artırmak için farklı tampon çözeltilerin etkisini araştırmışlardır. Bylund *et al.* (2000), *E.coli*'de aerobik yarı-kesikli fermantasyonla hGH üretimini araştırmışlar; fermantasyon süresince oluşan ürün, yan-ürün ve ürün kalitesi (degradeasyon oranı) profillerini belirleyerek glukoz besleme gradyenlerinin ölçek-büyütmede ürün kalitesinin değışimine etkisini incelemiş; format birikimi,

Kuruluş	Ürün adı	Birim fiyat (\$/ IU)
Genentech	Nutropin	13
Eli Lilly	Humatrope	18
Pfizer	Genotropin	22
Saizen	Sereno	13
Serostim	Sereno	10
Nova Nordisk	Norditropin	18
Nova Nordisk	Zorbitive	-
Ferring Pharmaceuticals	Zomacton	20
GeneScience Pharmaceuticals	Jintropin	3.3

heterojenlik seviyesi ve hücre parçalanması arasında bir korelasyon oluşturmuşlardır. Trevino *et al.* (2000) ve Eurwilaichitr *et al.* (2002) *Pichia pastoris* konak-hücresinde hGH üretimini incelemişlerdir. Castan *et al.* (2002) yaptıkları çalışmada yüksek oksijen ve karbondioksit derişimlerinin stokiyometrik ve kinetik sabitler üzerindeki etkisini yarı-kesikli fermantasyon ile *E.coli* konak-hücresinde araştırmışlardır. Tabandeh *et al.* (2004), ısı-indükleme yöntemi ile *E.coli*'de hGH üretimini ve karbon kaynağı etkisini araştırmışlardır. Literatürde hGH üretime ilişkin son çalışma, araştırma grubumuzda yapılan (Şentürk 2006); hGH üretimi için ortam bileşen ve derişimlerinin, pH, hava giriş hızı, karıştırma hızı gibi biyoreaktör işletim koşullarının ürün- ve yan ürün-derişimlerine ve biyoproses oksijen aktarımı karakteristiklerine etkisinin *Bacillus subtilis*'de incelenmesidir ve *Bacillus* türlerinde biyoreaktör işletim koşullarının ayrıntılı olarak incelendiği ilk çalışmadır.

Rekombinant hGH üretimi için önemli bir alternatif mikroorganizma olan *Bacillus* prokaryotik yapıda olması, doğal olarak hücre-dışı üretim potansiyelinin yüksek olması, patojen olmaması, genomunun aydınlatılmış olması, fermentasyon teknolojisinin iyi bilinmesi ve fermentasyon süresinin kısa olması nedeniyle heterolog protein üretimi için çok iyi bir alternatiftir. Ancak çok sayıda avantajı olmasına karşın *Bacillus* türlerinin yüksek seviyede hücre-dışı proteaz aktivitesi göstermesi terapatik proteinin proteolizine neden olan ve üretimini zorlaştırılan çok önemli bir dar-

boğazdır. Bu durum proteaz enzimlerini kodlayan genlerin silindiği (protease-deficient) mikroorganizmalarla önlenabilir. Sırasıyla altı ve yedi proteaz geninin inaktive edildiği WB600 ve WB700 türleri sırasıyla, doğal mikroorganizmanın %0.3 ve %0.1'i kadar proteaz aktivitesi gösterirler.

Bu çerçevede, '**Metabolik Mühendislik ve Reaksiyon Mühendisliği prensipleriyle hücre-dışı rekombinant insan büyüme hormonu üretimi**' konulu yüksek lisans araştırma programının kapsamı:

1. Terapatik protein insan büyüme hormonunun (hGH) hücre-dışı üretimi için genetik mühendisliği prensipleriyle yeni bir plazmit sistemi geliştirilmesi, geliştirilen plazmidin proteaz aktivitesi düşük *Bacillus* türlerine transformasyonu ile rekombinant mikroorganizmaların elde edilmesi;
2. Metabolik mühendislik araştırma programıyla geliştirilen rekombinant *Bacillus* türlerinden hGH üretim kapasitesi en yüksek olanın belirlenmesi;
3. Seçilen mikroorganizma kullanılarak, laboratuvar-ölçek biyoreaktörlerde farklı başlangıç pH değerlerinin hGH üretim performansına etkisinin araştırılması;
4. Pilot ölçek-biyoreaktörlerde pH kontrolsüz işlemin üretim performansına etkisinin biyoproses ve oksijen aktarımı karakteristikleriyle birlikte araştırılmasıdır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI VE KURAMSAL TEMELLER

2.1 Süreli Yayınlarda İnsan Büyüme Hormonu Üretimine İlişkin Çalışmalar

İnsan büyüme hormonunun (hGH) genetik mühendisliği prensipleri kullanılarak geliştirilen mikroorganizmalarca biyoteknolojik yöntemlerle üretilmesi ilk olarak, genomu ilk aydınlatılan mikroorganizma olan *E.coli*'de başlamıştır (Goeddel *et al.* 1979, Ikehara *et al.* 1984, Gray *et al.* 1985, Becker *et al.* 1986). Rekombinant hGH'nin hücre-dışı üretimi, biyoreaktör ürün karışımından ayırma işlemlerini çok kolaylaştıracağından ve üretim maliyetini düşüreceğinden hücre-dışı üretim potansiyeli olan ve genom analizi tamamlanmış olan *Bacillus* türleri ile hGH üretimi literatürde yer alan diğer bir önemli alternatiftir (Franchi *et al.* 1991, Kajino *et al.* 1997). Ökaryot bir mikroorganizma olan *Pichia pastoris* ile hGH üretimine ilişkin çalışmalarda, hücre-dışı protein üretim kapasitesi olması nedeniyle alternatif yaklaşım olarak önemlidir (Trevino *et al.* 2000, Eurwilaichitr *et al.* 2002, Çalık *et al.* 2008). İnsan büyüme hormonu üretimine ilişkin çalışmalar konak-hücrelere göre sınıflandırılarak Çizelge 2.1-2.3'de, biyoreaktör işletim koşullarının etkisini inceleyen çalışmalar ise Çizelge 2.4 ve Çizelge 2.5'de özetlenmiştir.

Literatürde, insan büyüme hormonunun biyoteknolojik proses ile ilk kez üretilmesi 1979 yılında gerçekleştirilmiştir (Goeddel *et al.* 1979). Bu çalışmada, kimyasal olarak sentezlenen hGH hibrit geni *E.coli*'de *lac* başlatıcı kontrolünde ekspres edilmiştir. Araştırmada, çift sarmallı (ds) hGH cDNA, *Hae* III endonükleazıyla kesilerek hGH'nin 24-191 amino asitlerini de kodlayan 551 bp büyüklüğündeki DNA parçası elde edilmiştir. Elde edilen DNA parçası, ATG başlangıç kodunu ve hGH'yi 1-23 amino asitlerini kodlayan kodonu içeren, kimyasal olarak sentezlenmiş bir DNA adaptörüyle birleştirilmiştir. Bu hibrit gen pHGH3 plazmidine klonlanarak, fMet-hGH üretim potansiyeli olan pHGH107 plazmidi geliştirilmiştir. Birçok bakteriyel proteinin N-ucunda metiyonin bulunmadığından, f-met uzaklaştırılarak doğalıyla aynı büyüklükte ve immünolojik özelliklere sahip hGH üretilmiştir.

Ikehara *et al.* (1984) kimyasal olarak sentezledikleri metiyonin ve 191 amino asitten oluşan hGH'yi kodlayan geni *E.coli* triptofan (trp) başlatıcı kontrolü altında *E.coli*'de ekspres etmişlerdir. Çalışmada geliştirilen altı plazmidin; pHGH-1, pGH-L8, pGH-L9, pGH-L11, pGH-L13, pCT-1 hGH, üretim miktarları radyoimmünoassay (RIA) yöntemiyle ölçülmüş ve en yüksek üretim oranı pGH-L9 plazmidinde 168.7 µg/ml olarak belirlenmiştir.

Gray *et al.* (1985) geliştirdikleri iki plazmidi üretim oranları ve osmotik basınç altında insan büyüme hormonunu periplazmik boşluğa salgılamaları açısından kıyaslamışlardır. hGH'yi kodlayan dizin geliştirilen ilk plazmitte, pPreHGH207-2, *E.coli trp* promotörü ve pre-hGH sinyal peptiti kontrolü altında; ikinci plazmitte ise phoA promotörü ve pho-hGH sinyal peptiti kontrolünde ekspres edilmiştir. Araştırmada hGH derişimi RIA yöntemiyle ölçülmüş ve ilk plazmit kullanılarak üretilen 450 ng/ml/A₅₅₀ hGH'nin %76'sı, ikinci plazmit kullanılarak üretilen 230 ng/ml/A₅₅₀ hGH'nin ise %82'si osmotik basınç altında periplazmik boşluğa salgılanmıştır. Saflaştırılmış hormonun N-terminal dizin analizinde, her iki plazmitle üretilen hGH'nin de doğallıyla aynı yapıda phe-pro-thr-ile dizini taşıdıkları, monomer yapıda oldukları ve aynı disülfür bağlarını içerdikleri görülmüştür.

Hsiung *et al.* (1986) ve Becker and Hsiung (1986) insan büyüme hormonunu ve *ompA* sinyal peptidini ekspres eden pOmpA-hGH1 ve pOmpA-hGH2 vektörlerini geliştirmişlerdir. Memelilere ait bir proteinin periplazmik boşluğa direkt salgılanması ilk kez bu çalışmada başarılmıştır. Bu amaçla *ompA* sinyal peptidi kullanılarak, 10-15 µg/A₆₀₀ hGH üretilmiştir. Üretilen hormonun %78'lik kısmı periplazmik boşluğa salgılanmış, ancak bununun %72'sinin doğallıyla aynı yapıda olduğu görülmüştür. Daha önce yapılan çalışmalarda sitoplazmik üretim sonucunda gözlenen, proteinin N-ucunda metillenme ve düşük çözünürlükten kaynaklanan çökelti oluşumu periplazmik üretim sonucunda önlenerek doğallıyla aynı ikincil yapıya sahip hGH üretimi gerçekleştirilmiştir.

Chang *et al.* (1987) yaptıkları çalışmada, yüksek miktarda insan büyüme hormonunu periplazmik boşluğa salgılabilmek amacıyla, hGH'yi kodlayan gen ile entrotoksin II

sinyal peptitinin bileşiminden oluşan hibrit geni, alkali fosfataz promotörü kontrolünde (*phoA*) *E.coli*'de ekspres etmiştir. Çalışmada geliştirilen iki plazmit, pHGH4R ve pHGH4L'nin insan büyüme hormonu üretim potansiyelleri farklı derişimlerde fosfat içeren ortamlarda, *E.coli* 294 ve *E.coli* W3110 mikroorganizmaları kullanılarak kıyaslanmış ve her iki plazmidin de düşük fosfat derişimli ortamda ve *E.coli* W3110 mikroorganizması kullanıldığında daha verimli çalıştığı görülmüştür. *E.coli* W3110 mikroorganizmasının fosfat derişimindeki artıştan %11 etkilendiği görülürken, aynı koşullarda *E.coli* 294, %19 oranında etkilenmiştir. Bu durum *E.coli* W3110'un fosfat regülasyonuna daha az hassas olduğunu göstermiştir. En yüksek hGH üretim oranı, pHGH4L plazmidıyla, düşük fosfat derişimli ortamda, W3110 kullanıldığında 15 µg/ml/A₅₅₀ olarak ölçülmüştür ve doğayla aynı yapı ve aktifliktedir.

Kato *et al.* (1987) geliştirdikleri p8hGH1 vektörüyle, *E.coli* konak-hücresinde hücre-dışı hGH üretimini ilk kez gerçekleştirmişlerdir. Bu amaçla tasarlanan p8hGH1 taşıdığı penisilinaz sinyal peptitinin aktivitesiyle hGH'nin mikroorganizmanın iç zarından geçmesini sağlarken, *kil* geni ve eks-başlatıcının aktivitesiyle de dış zarı geçerek, üretilen 20.5 µg/ml hGH'nin 11.2 µg/ml'sinin kültür ortamına salgılanmasını sağlamıştır. Bu çalışmada tasarlanan diğer bir vektör olan, pPShGH11, *kil* geni taşımadığından, toplam hGH üretiminin 8.4 µg/ml'ye ve hücre-dışına salgılanan hGH miktarının da 1.4 µg/ml'ye düştüğü görülmüştür. pPShGH11 vektörü taşıyan mikroorganizmalarla üretim gerçekleştirildiğinde, toplam hGH'nin %80'i periplazmik boşlukta kalırken, p8hGH1 taşıyanlarda , toplam insan büyüme hormonunun %55'i hücre dışına salgılanmıştır. Üretilen hGH'nin N-ucu amino asit dizininin ve biyolojik aktivitesinin doğayla aynı olduğu görülmüştür.

Nakayama *et al.* (1988) geliştirdikleri pHGH526 plazmidini *Bacillus subtilis*'e transforme ederek, hGH'nin hücre-dışı üretimini gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada geliştirilen ilk plazmit, pHGH324, transkripsiyon terminatörü içermediğinden nötral proteaz terminatörü taşıyan pHGH526 plazmidini geliştirilmiş ve her iki plazmit *Bacillus subtilis* MT500 konak-hücresine transforme edilerek hGH üretim potansiyelleri araştırılmıştır. pHGH526 plazmidini taşıyan hücrelerde 40 mg/L hGH kültür ortamına salgılanırken, pHGH324 taşıyanlarda bu oranın 10 kat azaldığı görülmüştür. Başlatıcıları

ve sinyal peptitleri aynı olan bu iki plazmidin farklı üretim potansiyellerine sahip olmaları, nötral proteaz teminatörünün aktivitesinin önemini göstermiştir. Çalışmada ayrıca çözülmüş oksijen derişiminin, hGH üretimine etkisi de incelenmiş ve çözülmüş oksijen seviyesi arttığında, hGH üretiminde düşüş gözlenmiştir, yüksek hücre yoğunluğunun ise üretimi pozitif etkilediği görülmüştür. Üretilen hGH, doğalıyla aynı yapıda ve biyolojik aktivitededir.

Hsiung *et al.* (1989) insan büyüme hormonunu *E-coli* konak-hücrelerinde üretim ortamına salgılatmak amacıyla, *lac* represörünün regüle ettiği *E-coli llp-lac* promotır/operon sistemini içeren, pOmpA-hGH2 ve PJL3 vektörlerini geliştirmişlerdir. Üretim ortamında düşük konsantrasyonda IPTG varlığında BPR ve ompA-hGH hibrit proteinlerinin ekspres edildiği ve hGH'nin kültür ortamına salgılandığı görülmüştür. Araştırmada optimum IPTG konsantrasyonu 20 µM olarak belirlenmiş ve bu koşulda hGH üretimi 4.5 µg/ml/A₅₅₀ hücre olarak ölçülmüştür. *ompA* sinyal peptitini taşıyan pOmpA-hGH2 vektörünün ortama salgıladığı hormon kolon kromatografi yöntemiyle tek basamakta saflaştırılarak, %98 saflıkta, doğalıyla aynı yapıda hGH elde edilmiştir.

Jensen and Carlsen (1990) yaptıkları araştırmada farklı N-ucu amino asit uzantılarını taşıyan hGH'nin *E-coli*'de sitoplazmik üretimini araştırmışlardır. Araştırmada N-ucu uzantıları arasında en yüksek kararlılığı gösteren MAE-hGH'nin hGH üretim performansı en yüksek alternatif olduğu görülmüştür. Tanımlı ve kompleks ortamlarda hücre çoğalma profilleri dikkate alınarak, araştırmalar zengin ortamda gerçekleştirilmiştir. Karbon kaynağının etkisi incelenmiş ve yüksek glukoz derişimlerinde hGH üretiminin düştüğü gözlenerek, başlangıç glukoz konsantrasyonunun yüksek olduğu kesikli üretim yerine, glukoz derişimini sürekli düşük tutacak şekilde sabit besleme hızıyla glukoz beslenen yarı-kesikli sistem kullanılmasının verimi 3 kat artırdığı belirlenmiştir. Ayrıca glukoz besleme hızı 4.2 g/L st değerini aştığında kesikli sistemdekine benzer bir glukoz inhibisyonu olduğu görülmüş; en yüksek verime glukoz besleme hızının hücre çoğalmasıyla doğru orantılı şekilde, üstel olarak artırıldığı sistemde ulaşılmıştır. Kompleks üretim ortamı kullanıldığında ortamda bulunan hücre özütü ve fosfatın diğer bir kısıtlayıcı basamak olduğu görülmüştür. Glukoz besleme stratejisi geliştirilerek ve ikinci kısıtlayıcı

basamağın, doğru zamanlamayla aşılması sonucunda 2000 mg/L hGH üretimi başarılmıştır. Diğer bir parametre olan sodyum asetat derişiminin hGH üretimine etkisi incelenmiş ve sodyum asetatın çoğalmaya ve dolayısıyla hGH üretimine, inhibe edici etkisi olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, fermentasyon sonucunda ortamın pH'ındaki değişimi önlemek amacıyla kullanılan tuzlardan kaynaklanan asit ve bazların üretime etkisi araştırılmış ve tuzların da üretime negatif etkisi olduğu görülmüştür. Üretilen hormonun N-ucundaki amino asit uzantıları DAPI proteolitik enziminin aktivitesiyle uzaklaştırılmış ve doğala özdeş hGH üretimi başarılmıştır (Jensen and Carlsen 1990).

Franchi *et al.* (1991) yaptıkları çalışmada bir hibrit plazmit serisi oluşturarak, *Bacillus subtilis* konak-hücrelerinde farklı hGH öncüllerinin sentezlenmesini sağlamışlardır. Bu çalışmada, polipeptitin çözünürlüğünün artırılması, üretilen hormonun daha kolay yöntemlerle saflaştırılması ve hormonun doğal yapısında bulunmayan dizinlerin etkin bir şekilde uzaklaştırılmasıyla doğal yapısında hGH üretimi hedeflenmiştir. Bunun için, hGH'nin N-ucundaki farklı büyüklükteki uzantıların çözünürlüğe etkisi incelenmiş, uzun terminallerin çözünürlüğü düşürdüğü görülmüş ve en yüksek çözünürlük değerleri pSM291 ve pSM274 plazmitlerini taşıyan konak-hücrelerin ürünlerinde sırasıyla %70 ve %80 olarak ölçülmüştür. Saflaştırma işlemi hibrit polipeptit ile ondan daha bazik olan yığın proteinleri arasındaki yük farkından yararlanarak kolaylaştırılmıştır. Doğal yapısında hGH üretimiye, hormonun N-ucundaki amino asit dizininin, kendisini tanıyan proteaz faktör Xa aktivitesiyle uzaklaştırılması sonucunda sağlanmıştır. Saflaştırmanın ardından üretilen hormonun %90'ı geri kazanılmış ve jel filitasyon kromatografisi yöntemiyle %98 homojenlikte hGH üretimi başarılmıştır.

Kajino *et al.* (1997) yaptıkları çalışmada, insan büyüme hormonunu değrede eden proteaz aktivitesini düşürmek amacıyla, hücre-dışı proteaz aktivitesi düşük olan *Bacillus brevis* konak-hücrelerinde hücre-dışı hGH üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada geliştirilen plazmitler *B.brevis* HPD31 ve *B.brevis* 31-OK konak-hücrelerine transforme edilerek, proteaz aktivitesini inhibe eden kimyasalların ve sinyal peptit modifikasyonlarının hGH üretimi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar, EDTA'nın proteaz aktivitesini inhibe etmek için en uygun kimyasal olduğunu göstermiştir. *B.brevis* 31-OK konak-hücreleri kullanıldığında, EDTA'nın proteaz

aktivitesini tamamen önlediği görülürken, 4 kat fazla proteaz aktivitesi gösteren HPD31 konak-hücrelerinde aynı verim elde edilememiştir. Sinyal peptit modifikasyonun hGH üretimine etkisini araştırmak amacıyla geliştirilen farklı plazmitler, 31-OK konak-hücrelerine transforme edilerek verimleri kıyaslanmıştır. Elde edilen sonuçlar, MWP sinyal peptidinin R2L4 sinyal peptidiyle değiştirilmesi sonucu, hücre-dışına salgılanan hGH'nin 12 kat arttığı görülmüştür. Proteaz aktivitesinin inhibe edildiği koşullarda, sinyal peptitte yapılan regülasyonlar ve optimum ortam koşullarının belirlenmesiyle 240 mg/L hGH üretimi başarılmıştır. Hücre dışına salgılanan hormon biyolojik olarak aktif ve doğalarıyla aynı yapıdadır.

Uchida *et al.* (1997) geliştirdikleri plazmitlerde hGH'nin periplazmik üretimini *E.coli* konak-hücrelerinde incelenmişlerdir. Araştırmada geliştirilen tüm plazmitlerle üretilen hGH'nin fizikokimyasal yapısı ve etkisi tam olarak açıklanamamış olan 20-kDa büyüklüğünde hGH olduğu görülmüştür. Geliştirilen pGHV40, pGHV42, pGHV45, pGHR10, pGHR12, pGHR13 plazmitlerinde hGH derişimi sırasıyla 2.1, 28.2, 30.9, 76.1, 28.6, 32.1 mg/L olarak ölçülmüştür.

Zhang *et al.* (1998) *E-coli* konak-hücrelerinde yüksek hücre derişiminin, karbon kaynağının ve çözünmüş oksijen seviyesinin hGH üretimi üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Karbon kaynağı olarak glukoz ve gliserol kullanılarak yapılan araştırmada, gliserolün daha etkin bir karbon kaynağı olduğu görülmüştür. Çözünmüş oksijen %25'in altındaki değerlerde hücre konsantrasyonunu artırırken, üstündeki değerlerde etki etmemiştir. Hücre yoğunluğu yüksek ortamda fermentasyon süresinin 16 saatten 10 saate düştüğü ve hücre yoğunluğunun 38.6'dan 118.8 g/L'ye çıktığı görülmüştür.

Shin *et al.* (1998) yüksek verimde saflaştırılmış hGH üretimi amacıyla, insan tümör nekrosis faktör-alfanın N-terminal pentapeptit dizini, histidin tag ve enterokinaz kesme konumundan oluşan füzyon partneri kullanarak yeni bir protein üretim sistemi geliştirmişlerdir. Füzyon proteini gen ekspresyonunun başlangıcında çözünebilir bir yapıda üretilirken, *E-coli* sitoplazmasında çözünürlüğü giderek düşmektedir. Çökelti oluşturan protein, pH'ın alkali değerlere getirilmesiyle çözünür hale getirilerek afinite

kromatografi yöntemiyle homojene yakın bir formda saflaştırılmıştır. T7 promotörü kontrolünde, yarı kesikli işletimle, yüksek hücre derişiminde insan büyüme hormonunun üretimi 9 g/L'ye kadar ulaşmıştır.

Patra *et al.* (2000) yaptıkları çalışmada, insan büyüme hormonunu *E-coli* konak-hücresinde, çözünmeyen yapıda ekspres etmişlerdir. Üretilen hormonu çözünür hale getirmek için farklı tampon çözeltileri denenmiş ve en iyi sonuç pH 12.5'de, 2 M üre içeren 100 mM tris tamponunda, 1.6 g hGH /ml olarak belirlenmiştir. Ayrıca, düşük derişimde üre içeren tamponda çözülen hGH'nin doğal ikincil yapısını kaybetmediği ve proteinin geri kazanım veriminin arttığı görülmüştür. Üretilen hGH, iyon değişim kromatografisi yöntemiyle saflaştırılmış ve jel filtrasyon kromatografisi ile saf monomerik hGH büyüklüğüne göre ayrılarak elde edilmiştir. 10 saatlik yarı kesikli fermentasyon ile, 25 g/L hücre derişiminde, 1.6 g/L hGH üretilmiştir. Üretilen hormonun %50'si monomerik yapıda ve biyolojik aktiviteye sahip hGH olarak saflaştırılmıştır.

Bylund *et al.* (2000) yaptıkları çalışmada *E.coli*'de aerobik yarı-kesikli fermentasyonla hGH üretimini araştırmışlardır. Araştırmada, yarı-kesikli fermentasyon süresince oluşan ürün, yan-ürün ve ürün kalitesi (degradasyon oranı) profilleri belirlenmiş, ayrıca glukoz besleme gradyanlarının ölçek-büyütmede ürün kalitesine etkisi araştırılmış, format birikimi, heterojenlik seviyesi ve hücre parçalanması arasında bir korelasyon oluşturulmuştur. SDR (scale-down reactor) ve pilot-ölçek reaktörler verim, ürün kalitesi ve yan-ürün oluşumu açısından karşılaştırılmıştır. Laboratuvar-ölçekte küçük hacimlerde yan-ürün olarak asetat oluşumu gözlenmezken, format oluştuğu görülmüştür, ayrıca ölçek büyüdükçe format oluşum oranının attığı ve prosesin erken evrelerine kaydığı görülmüştür. SDR kullanıldığında format oluşum oranının ve protein degradasyon seviyesinin düştüğü görülmüştür. Asetatın oksijensiz veya oksijen kısıtlamalı fermentasyonlarda ve glukoz derişimin yüksek olduğu üretim ortamlarında genellikle prosesin başlangıç aşamalarında üretildiği ve daha sonra formata dönüştüğü gözlenmiştir. Sonuç olarak, glukozun oksijen kısıtlamasıyla birlikte kritik parametre olduğu ve SDR ile üretimde hGH degradasyonunun %30 düştüğü ve verimin %80 arttığı belirlenmiştir.

Trevino *et al.* (2000) *Pichia pastoris* ile yaptıkları çalışmada *AOXI* (alkol oksidaz 1) promotörü ve *Saccharomyces cerevisiae* α -faktör sinyal dizini kontrolü altında hGH'yi üretim ortamına salgılatarak üretmişlerdir. Oksijen kısıtlamalı indüksiyon ile 11 mg/L hGH üretilirken, yüksek hücre yoğunluklu kültür ortamında bu miktar 49 mg/L'ye yükselmiş ve kültür ortamına salgılanan toplam proteinin %40'ının hGH olduğu belirlenmiştir.

Castan *et al.* (2002) yaptıkları çalışmada yüksek oksijen ve karbondioksit derişimlerinin stokiyometrik ve kinetik sabitler üzerindeki etkisini yarı-kesikli fermantasyon ile *E.coli* konak-hücrelerinde araştırmışlardır. Karbondioksit derişimi arttığında maksimum büyüme hızı düşerken, asetik asit üretimi artmıştır. Oksijen derişimi arttığında ise üstel büyüme fazı uzamış, büyüme hızı artmış, buna karşın glukoz başına spesifik oksijen tüketim hızı artmış ve proses sonunda verim düşmüştür. Rekombinant hGH üretiminde, oksijence zenginleştirilmiş ortamda (%40 oksijen) glukoz besleme hızı ve ortam derişimi iki katına çıkartıldığında hücre derişimi sadece %77 artmış ve proses sonunda protein degradasyonu düşmesine rağmen toplam ürün %50 azalmıştır. Oksijen derişimi artırılincaya kadar çok düşük seviyede olan format ve asetik asit oluşumuysa sırasıyla 0.35 g/L ve 0.43 g/L'ye yükselmiş, bu artışın hücrelerin parçalanmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Sonuç olarak, referans ortamda 100 au hGH üretilirken bu miktar oksijence zenginleştirilmiş ortamda 37 au'ya düşmüştür.

Eurwilaichitr *et al.* (2002) *Pichia pastoris* konak-hücrelerinde yaptıkları çalışmada *E.coli*'den alınan hGH cDNA'sının ilk 20 amino asitinin *Saccharomyces cerevisiae* ve *Pichia pastoris*'den alınanlarla değiştirerek, PCR ile glutamik asit ve alanin (glu-ala) içermeyen sentetik hGH genini sentezlemişlerdir. Araştırmada *Pichia pastoris*'de karbon kaynağı olan metanolün farklı konsantrasyonları ve farklı indüksiyon süreleri denenerek optimum koşullar, üç gün indüksiyon süresi ve %3 (v/v) metanol derişimi olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda ulaşılan en yüksek hGH derişimi 190 mg/L olarak ölçülmüş ve üretilen hGH'nin doğala özdeş yapıda olduğu görülmüştür.

Soares *et al.* (2003) yaptıkları çalışmada *E.coli* konak-hücrelerinde rekombinant insan büyüme hormonunun periplazmik üretimine etki eden parametreleri incelemişlerdir. Araştırmada λP_L promotörü kontrolü altında 4 farklı sinyal-peptit içeren vektörlerin üretim performansları karşılaştırılmıştır. Sonuçlar 6 saat, 40-42°C’de, zengin ortamda fermentasyon ile DsbA sinyal dizini taşıyan vektörün W3110 mikroorganizmasında en yüksek hGH üretim kapasitesine sahip olduğunu göstermiş ve hGH üretim oranı doğal hGH sinyal dizinini taşıyan referans vektöre oranla 2.5 kat artırılarak 3.9µg/ml/A₆₀₀ olarak ölçülmüştür.

Tabandeh *et al.* (2004) yaptıkları çalışmada ısı-indükleme yöntemi ile *E.coli*’de hGH üretimini ve karbon kaynağı etkisini araştırmışlardır. Hücre yoğunlukları tanımlı ve zengin ortamda sırasıyla 25 ve 60 g/L olarak ölçülürken, fermentasyon süresi zengin ortamda 41 saatten 32 saate düşmüştür. Zengin ortamda 2 g/L rekombinant hGH üretilmiş, karbon kaynağı olarak glukoz yerine gliserol kullanılarak ve üstel besleme stratejisi uygulanarak bu miktar 2.7 g/L’ye yükseltilmiş, ayrıca hücre derişimi de 100 g/L’ye ulaşmıştır.

Çalık *et al.* (2008) yaptıkları çalışmada *Pichia pastoris* konak-hücrelerinde hGH üretimini gerçekleştirecek ve ürünün saflaştırılmasını kolaylaştıracak bir ekspresyon sistemi tasarlamışlardır. Bu amaçla hGH cDNA’sının 5’ ucuna; *EcoRI* restriksiyon enzim konumu, 6xhis tag dizini, Faktör Xa proteaz tanıyıcı dizini PCR tepkimesi ile eklenmiş ve elde edilen hibrit dizin pPICZαA plazmidine klonlanmıştır. Tasarlanan sistem ile, 24 saat fermentasyon sonucunda 115 mg/L hGH derişimine ulaşılmıştır. Üretilen hormon, his-tag dizini taşımasından yararlanılarak, afinite reçine ile %85 oranında saflaştırılmıştır. Saflaştırılmış hormonun MALDI-ToF MS ile analizi sonucunda, standart hGH’den 1573 Da daha büyük olduğu görülmüştür, bu farkın N-ucuna eklenen 12 amino asitten kaynaklandığı düşünülerek saflaştırılmış hormon Faktör Xa proteaz ile inkübe edilmiştir. Faktör Xa proteaz ile inkübasyondan sonra, %88 saflıkta hGH elde edilmiş ve yapısının doğala özdeş olduğu MALDI-TOF MS analizi ile ispatlanmıştır.

Çizelge 2.1 hGH üretimiyle ilgili kaynak araştırması; konak-hücre: *E.coli*

Mikroorganizma	Plazmit (ler)	Promotr	Sinyal peptit	Ortam	C _{hGH} üretim tipi	C _{hGH} ölçüm yöntemi	Sonuçlar	Kaynak
<i>E.coli</i> 294	pHGH107	<i>lac</i>	-	-	Hücre-içi	RIA	2.4 µl/ml metillenmiş hGH üretilmiştir.	Goeddel <i>et al.</i> 1979
<i>E.coli</i> HB101	pGH-1 pGH-L8 pGH-L9 pGH-L11 pGH-L13 pCT-1	<i>trp</i>	-	-	Hücre-içi	RIA	En yüksek hGH üretim oranı pGH-L9 plazmidi kullanılarak, 168,7µl/ml metillenmiş hGH olarak elde edilmiştir.	Ikehara <i>et al.</i> 1984
<i>E.coli</i> 294	pPreHGH207-2 pAPH-1	<i>trp</i> <i>phoA</i>	pre-hGH pho-hGH	Zengin	Periplazmik	RIA	pPreHGH207-2 plaz-mitiyle 450, pAPH-1 plazmidıyla 230 ng/ml/A ₅₅₀ doğallıyla aynı yapıda hGH üretilmiştir.	Gray <i>et al.</i> 1985
<i>E.coli</i> K-12 RV308	pOmpA-hGH1 pOmpA-hGH2	<i>lpp-lac</i>	<i>ompA</i>	Zengin	Periplazmik Hücre-içi	RIA ELISA	10-15 µg hGH/ A ₆₀₀ periplazmik olarak üretilmiştir ve toplam hGH'nin %72'si periplazmik boşluğa salgılanmıştır.	Becker and Hsiung 1986; Hsiung <i>et al.</i> 1986; Hsiung <i>et al.</i> 1989
<i>E.coli</i> HB101	p8hGH1 pShGH11	<i>Ex-K</i> <i>Ex</i>	<i>Bacillus</i> alkalophilic	Zengin	Hücre-dışı Hücre-içi Periplazmik	RIA	kil geni ve Ex promotör taşıyan p8hGH1 plazmidi kullanıldığında hücre zarının geçirgenliği artmış ve üretilen hGH'nin %55'i (11.2mg/l) hücre-dışına %42' periplazmaya %3'ü sitoplazmaya salgılanmıştır.	Kato <i>et al.</i> 1987
<i>E.coli</i> 294 <i>E.coli</i> W3110	pGH4R pGH4L	<i>phoA</i>	STII	Zengin	Periplazmik	RIA	Düşük fosfat derişimli ortamda pGH4L plazmidi ve w3110 konak-hüresi kullanılarak 15.4 µg hGH/ml/ A ₅₅₀ üretilmiştir. Üretilen hGH'nin %90'ı periplazmik boşluğa salgılanmıştır.	Chang <i>et al.</i> 1987
<i>E.coli</i> MC1061	pAT153	Sentetik promotör	-	Zengin	Hücre-içi	ELISA	Yarı kesikli glukoz besleme stratejisi kullanılarak 2000mg/l MAE-hGH üretilmiştir.	Jensen and Carlsen 1990

Çizelge 2.1 devam.

<i>E.coli</i> 294 <i>E.coli</i> W3110	pGHV40 pGHV42 pGHV45 pGHR10 pGHR12 pGHR13	<i>tac</i>	<i>ompA</i> <i>npr</i> <i>npr</i> <i>npr</i> <i>npr</i>	Zengin	Periplazmik	ELISA	En yüksek hGH üretim oranı pGHR10 plazmidi ve W3110 konak-hücreyi kullanarak 76.1 mg/l olarak elde edilmiştir ancak tüm plazmitlerle üretilen hGH'nin 20 kDa büyüklüğünde olduğu görülmüştür.	Uchida <i>et al.</i> 1997
<i>E.coli</i> BL21	pT2GH	<i>lacUV5</i>	-	Zengin	Hücre-içi	Western blot SDS-PAGE	9 g hGH /l sitoplazmik olarak üretilmiştir, üretilen hGH'nin %80'nin sitoplazmada çözünmediği görülmüştür.	Shin <i>et al.</i> 1998b
<i>E.coli</i> k802	-	-	-	Zengin	Hücre-içi	ELISA	Çözünmüş oksijen %20-25 seviyesinde tutularak ve glukoz yerine gliserol kullanılarak hücre derişimi 38.6'dan 118.8 g/l'ye yükselmiştir.	Zhang <i>et al.</i> 1998
<i>E.coli</i> W3110	pRB322 derivatif	-	-	Tanımlı	Hücre-içi	HPLC	En yüksek üretim oranı pilot-ölçek biyoreaktörde 75.8 au olarak ölçülmüştür.	Bylund <i>et al.</i> 2000
<i>E.coli</i> M15	pQE 60-hGH	T5	-	Zengin	Hücre-içi	SDS-PAGE	1.6 g hGH/l üretim gerçekleştirilmiştir. Üretilen hGH'nin tamamı pH 12.5'de 2 M üre varlığında 100 mM tris tamponunda hücre içinde çözünür formda elde edilmiştir.	Patra <i>et al.</i> 2000
<i>E.coli</i> W3110	pRB322 derivatif	-	-	Tanımlı	Periplazmik	HPLC	100 au hGH üretilmiştir.	Castan <i>et al.</i> 2002
<i>E.coli</i> RRI <i>E.coli</i> W3110 <i>E.coli</i> HB2151 <i>E.coli</i> RB791 <i>E.coli</i> TP2339 <i>E.coli</i> BMH7118	pRK248cIts	λP_L	DsbA <i>npr</i> STII	Zengin	Periplazmik	HPLC	En yüksek hGH üretim miktarı DsbA sinyal peptidi kullanılarak RB791 konak-hücrelerinde 420 μ g/ml olarak elde edilmiştir.	Soares <i>et al.</i> 2003
<i>E.coli</i> A6-5	pET21- <i>hgh</i> pGP1-2	T7 λP_L	-	Tanımlı Zengin	Hücre-içi	ELISA	Karbon kaynağı olarak glukoz ve gliserol kullanılarak sırasıyla 2 ve 2.7 g hGH/l üretilmiştir.	Tabandeh <i>et al.</i> 2004.

Çizelge 2.2 hGH üretimi ile ilgili kaynaklar; konak- hücre: *Bacillus* türleri

Mikroorganizma	Plazmit (ler)	Promotr	Sinyal peptit	Ortam	C _{hGH} üretim tipi	C _{hGH} ölçüm yöntemi	Sonuçlar	Kaynak
<i>B.subtilis</i> MT500	phGH324 phGH526	<i>B.amyloliquefaciens</i> Doğal proteaz geninin promotör dizini	<i>B.amyloliquefaciens</i> Doğal proteaz geninin <i>pre</i> - sinyal dizini	Zengin	Hücre-dışı	EIA	Nötral proteaz sonlandırıcı içeren phGH526 plazmidi kullanılarak 40 mg hGH/l hücre-dışına salgılanmıştır.	Nakayama <i>et al.</i> 1988
<i>B.subtilis</i> SMS118	pSM214 pSM215 pSM274 pSM250	-	pSM212	Zengin	Hücre-içi	Western blot		Franchi <i>et al.</i> 1991
<i>B.brevis</i> HPD31 <i>B.brevis</i> 31-OK	pNU211hGH pNU211L4hGH pNU211R2L4hGH pNU211L15hGH	pNU211hGH	MWP L4 R2L4 L15	Zengin	Hücre-dışı	ELISA	MWP sinyal peptidi R2L4 sinyal peptidiyle değiştirilerek hGH üretimi 12 kat arttırılmıştır (148 mg/ml). Üretim ortamı ve işletim parametreleri optimize edilerek hGH üretim miktarı 240 mg/l'ye kadar yükselmiştir.	Kajino <i>et al.</i> 1997
<i>B.subtilis</i> 1A751 <i>B.subtilis</i> 1A179	<i>pre(subC)::hGH::pUC19</i> <i>pre(subC)::hGH::pMK4</i>	SAP geninin promotör dizini	SAP geninin (subC) <i>pre</i> - sinyal dizini	Tanımlı	Hücre-dışı	Kapiler elektroforez	En yüksek hGH derişimi Q ₀ /V _R =0.5 vvm, N=800 dk ⁻¹ koşulunda 70 mg/l olarak elde edilmiştir.	Şentürk 2006

Çizelge 2.3 hGH üretimi ile ilgili kaynaklar; konak-hücre: *Pichia pastoris*

Mikroorganizma	Plazmit (ler)	Promotr	Sinyal peptit	Ortam	C _{hGH} üretim tipi	C _{hGH} ölçüm yöntemi	Sonuçlar	Kaynak
<i>P.pastoris</i> GS115	pPIC9hGH22K	AOX1	<i>S.cerevisiae</i> α-faktör	Zengin	Hücre-dışı	Western-blott	Oksijen kısıtlamalı indüksiyon ile 11 mg hGH /l , yüksek hücre yoğunluklu kültür ortamında 49 mg hGH/l üretilmiştir.	Trevino <i>et al.</i> 2000
<i>P.pastoris</i> KM71	phGH1 PhGH2	-	MFα-1	Zengin	Hücre-dışı	SDS-PAGE	72 saat indüksiyon süresi ve %3 (v/v) metanol derişimi ile ulaşılan en yüksek hGH derişimi 190 mg/l olarak ölçülmüştür.	Eurwilaichtr <i>et al.</i> 2002
<i>P.pastoris</i> X33	pPICZαA	AOX1	-	Zengin	Hücre-dışı	SDS-PAGE Western-blott	24 saat fermentasyon sonunda 115 mg/l hGH derişimine ulaşılmıştır. Üretilen hormon his-Tag afinite yöntemi ile %85, ardından uygulanan Faktör Xa proteaz inkübasyonu ile %88 saflıkta elde edilmiştir. Saflaştırılmış ürünün doğala özdeş yapıda olduğu MALDI-TOF analizi ile ispatlanmıştır.	Çalık <i>et al.</i> 2008

Çizelge 2.4 hGH üretimiyle ilgili kaynak araştırması; biyoreaktör işletim parametreleri: *E. coli*

Mikroorganizma	Biyoreaktör işletim koşulları							Besleme Türü	Üretim Ortamı/ Karbon kaynağı	SONUÇLAR					KAYNAK
	Biyoreaktör/ İşletim Türü	T (°C)	pH	V _R (dm ³)	N (dk ⁻¹)	Q _o /V Vvm	DO%			hGH üretim tipi	hGH ölçüm metodu	C _{hGH} g/l	C _{XC} g/l	C _A g/l	
<i>E. coli</i> MC1061	Kesikli	30	7.2	-	≥ 500	1	≥ 20	-	Kompleks/ Glukoz	Sitoplazmik	ELISA	0.4	30	10	Jensen and Carlsen 1990
	Kemostat	30	7.2	1.3	≥ 500	1	≥ 20	Sürekli				0.12	30	1.6	
	Yarı-kesikli	30	7.2	-	≥ 500	1	≥ 20	Sürekli				1.0	40	2-3	
	Yarı-kesikli	30	7.2	-	≥ 500	1	≥ 20	Geri besleme stratejisi				2.0	40	0	
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Yarı-kesikli	37	6.75	-	-	-	40	Sürekli: dinamik	Kompleks/ Glukoz	Sitoplazmik	SDS-PAGE/ Western blott	15 ^a	70	0	Shin <i>et al.</i> 1998a.
<i>E. coli</i> BL21	Yarı-kesikli	37	6.75	-	-	-	40	pH-stat	Kompleks/ Glukoz	Sitoplazmik	SDS-PAGE/ Western blott	9 ^a	90	0	Shin <i>et al.</i> 1998b
<i>E. coli</i> W3110	Lab. Ölçek Yarı-kesikli	30	7.0	9	1000	1.4	-	Sürekli	Kompleks/ Glukoz	Sitoplazmik	HPLC	64.6	90	0	Bylund <i>et al.</i> 2000
	SDR yarı-kesikli	30	7.0	-	1000	1.4	-	Sürekli				75.8	80	20	
	Pilot-ölçek Yarı-kesikli	30	7.0	3000	205	1.4	-	Sürekli				41.7	95	30	
<i>E. coli</i> K-12 W3110	Yarı-kesikli: Hücre üretimi	34	7.0	4	≤1000	1	20	Sürekli	Tanımlı/ Glukoz	Sitoplazmik	HPLC	-	75	0.5	Castan <i>et al.</i> 2002
	Yarı-kesikli: hGH üretimi	34	7.0	6	≤1000	1	20	Sürekli				37 ^{au}	-	0.7	
<i>E. coli</i> A6-5	Yarı-kesikli	30	7.0	-	400-900	1	≥ 40	pH-stat	Tanımlı/ glukoz	Sitoplazmik	ELISA	-	25	-	Tabandeh <i>et al.</i> 2004
								pH-stat	Kompleks/ glukoz			2	60	2	
								Sürekli: Dinamik	Kompleks/ gliserol			2.7	100	1	

Çizelge 2.5 hGH üretimiyle ilgili kaynak araştırması; biyoreaktör işletim parametreleri: *Bacillus subtilis*

Mikroorganizma	Biyoreaktör işletim koşulları							Besleme Türü	Üretim Ortamı/ Karbon kaynağı	SONUÇLAR				KAYNAK
	Biyoreaktör İşletim Türü	T (°C)	pH	V _R (dm ³)	N (dk ⁻¹)	Q _o /V Vvm	DO%			hGH üretim tipi	hGH ölçüm metodu	C _{hGH} g/l	C _{XC} g/l	
<i>B.subtilis</i> MT500	Kesikli	30	6-7	1	-	-	0-70	-	Tanımlı/ glukoz	Hücre-dışı	Western Blott	0.006	-	Nakayama <i>et al.</i> 1988
	Yarı-kesikli	30	6.5-7	4	-	-	0-10					0.04	0.35	
<i>B.subtilis</i> 1A751	Kesikli	37	7.25	0.55	500	0.5	-	Kesikli	Tanımlı/ Glukoz	Hücre-dışı	Western blott Kapiler Elektroforez	0.036	1.3	Şentürk 2006
					700	0.5						0.054	1.75	
					800	0.5						0.07	1.9	
					800	0.7						0.06	2.1	

2.1.1 Hidrojen iyonu derişimi: pH etkisi

Mikroorganizmalar, ortamdaki hidrojen iyonu derişimi değişse de, hücre-içi pH değerlerini korurlar. Ancak pH değiştğinde, hücre çeperi boyunca oluşan proton gradyenini sabit tutabilmek için harcanan Gibbs serbest enerjisi nedeniyle hücre metabolizmasında değişim olur. Başka bir deyişle, biyokimyasal reaksiyonların gerçekteştiği mikrobiyoreaktörler olan mikroorganizmalar, her ne kadar hücre-içi pH değerlerini sabit tutma yeteneğine sahip olsalar da, ortam pH'ının değişmesi, hücre-içi metabolik akılarda sapmaya neden olur. Endüstriyel biyoteknolojik ürünlerin üretiminde kullanılan farklı tür mikroorganizmaların, hücre-içi pH değerleri ve metabolik yol izleri farklı olduğu için, her bir mikroorganizma türü için optimum üretim ortamı pH'ı veya pH aralığı farklıdır.

Ortam pH'ına bağlı olarak hücre-içi tepkimeler ve hızları değişeceği için, başlangıç ortam pH'ı, ve kontrollü/kontROLSUZ pH işletim stratejileri verim ve seçimliliği etkiler. Bazı biyoprosesler için kontrollü pH stratejisi verim ve seçimliliği artırırken, bazılarında kontROLSUZ pH artırır (Çalık *et al.* 2002). Bu nedenle, kullanılacak pH aralığı ve stratejisi, mikroorganizmaya ve ürüne spesifik olarak belirlenmelidir.

Sürelili yayınlarda hGH üretimine ilişkin çalışmalara bakıldığında biyoreaktör işletim parametrelerinin incelendiği çok az çalışma olduğu görülmektedir (Nakayama *et al.* 1988, Jensen and Carlsen 1990, Shin *et al.* 1998a., Shin *et al.* 1998b., Bylund *et al.* 2000, Castan *et al.* 2002, Tabandeh *et al.* 2004). Bu çalışmaların tamamında, optimum pH aralığı incelenmeksizin veya sonuçlarda sunulmaksızın bir pH değeri seçilmiş ve bir çalışma hariç (Nakayama *et al.* 1988) kontrollü işletim stratejisi kullanılmıştır. Ayrıca, insan büyüme hormonu üretimi üzerine yapılan çalışmaların hiç birinde pH'ın ürün, yan-ürün, oksijen aktarımı ve metabolik akılar üzerindeki etkisi incelenmemiştir. hGH üretimine ilişkin çalışmalarda kullanılan pH değerleri ve pH işletim stratejileri Çizelge 2.6'da özetlenmiştir.

Literatürde, *Bacillus* türlerinde pH'ın biyoproses süresince ürün, yan-ürün, oksijen aktarımı ve metabolik akılar üzerinde etkisinin ayrıntılı olarak incelendiği üç çalışma

yer almaktadır (Çalık *et al.* 2002, Çalık *et al.* 2003, İleri and Çalık 2006). Çalık *et al.* (2002), yaptıkları çalışmada kontrollü ve kontrolsüz pH işletim stratejilerinin doğal *Bacillus licheniformis* ile serin alkali proteaz (SAP) üretimi üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Çalışmada, başlangıç pH'ı etkisi 7.0-7.5 aralığında incelenmiş ve bu aralıkta en yüksek SAP aktivitesinin elde edildiği pH 7.25 koşulunda kontrollü pH işletim stratejisi uygulanmıştır. Çalışmada elde edilen sonuçlar, başlangıç pH'ının değişmesinin; glukoz tüketim hızını, hücre derişim profillerini, çözünmüş oksijen konsantrasyonlarını, SAP aktivitesini ve yan-ürün dağılımlarını değiştirdiğini göstermiştir. Ayrıca, aynı pH değerinde, pH kontrolsüz işletimden pH kontrollü işleme geçilmesinin de benzer şekilde proses verimini ve seçimliliğini değiştirdiği görülmüştür. Aynı araştırma grubunun 2003 yılında yayınladıkları çalışmada rekombinant *Bacillus licheniformis* ile, pH 6.8-7.25 aralığında SAP üretimi için optimum koşullar belirlenmiştir. Bu iki çalışmadan elde edilen bulgular, Çizelge 2.7'de özetlenmiştir. Maksimum SAP aktivitesi, pH 7.1 koşulunda kontrolsüz işletim ile $A=900 \text{ U cm}^{-3}$ olarak bulunmuştur, aynı pH değerinde kontrollü işleme geçildiğinde aktivite 720 U cm^{-3} e düşerken, kontrolsüz işletimde başlangıç pH'ı 7.0 seçildiğinde gözlenen maksimum SAP aktivitesi 700 U cm^{-3} e düşmüştür. Araştırma sonuçları açıkça göstermektedir ki, belli bir biyoteknolojik ürünün üretimi için seçilen pH değerinin dar bir aralıkta değişmesi dahi, proses verimi ve seçimliliği üzerinde önemli fark yaratabilmektedir.

İleri and Çalık (2006), *Bacillus* türlerinde pH'ın hücre-içi ve hücre-dışı metabolitler üzerindeki etkisinin incelendiği tek çalışmadır. Bu çalışmada, *Bacillus licheniformis* konak-hücre-içi ile β -laktamaz biyoprosesi için pH stratejisinin hücre-içi ve hücre-dışı metabolitler üzerindeki etkisi pH 6.5-7.5 aralığında kontrollü pH stratejisi ile ve pH_0 7.5'da kontrolsüz pH stratejisi ile araştırılmıştır. En yüksek enzim aktivitesi $A= 57 \text{ U cm}^{-3}$ olarak kontrolsüz pH stratejisiyle elde edilirken, kontrollü pH stratejisi kullanılarak pH 6.75 ile bu değere çok yakın olan $A= 54 \text{ U cm}^{-3}$ β -laktamaz aktivitesine ulaşılmıştır. Çalışmada, N^+ , K^+ ve H^+ profilleri çıkartılarak, sistemde membran boyunca elekrapotansiyel gradyeni sabit tutan N^+-K^+ pompasının yanı sıra N^+-H^+ pompasının olduğu belirlenmiştir. Hücre-içindeki toplam amino asit ve organik asit derişimlerinin, hücre-dışına salgılanandan sırasıyla 580- ve 20 kat fazla olduğu görülmüştür. Üretim

ortamı pH'nın artmasının, hücre dışına salgılanan iki temel yan-üründen asetik asit derişimini artırırken, laktik asit derişimini düşürdüğü belirlenmiştir.

Bacillus türleri ile yapılan çalışmalar (Çalık *et al.* 2002, Çalık *et al.* 2003, İleri and Çalık 2006) incelendiğinde, aynı mikroorganizma kullanılsa dahi, optimum pH değerinin ve işletim stratejisinin farklı prosesler için farklı olduğu görülmektedir. Bu sonuç, insan büyüme hormonu üretimi prosesi için pH incelemesinin literatürdeki boşluğunu ve önemini işaret etmektedir.

Çizelge 2.6 hGH üretimiyle ilgili kaynak araştırması; kullanılan pH değerleri ve işletim koşulları

Mikroorganizma	pH	pH işletim stratejisi	KAYNAK
<i>E.coli</i>	7.2	Kontrollü	Jensen and Carlsen 1990
<i>E.coli</i>	7.2	Kontrollü	Zhang <i>et al.</i> 1998
<i>E.coli</i>	6.75	Kontrollü	Shin <i>et.al.</i> 1998a,b
<i>E.coli</i>	7.0	Kontrollü	Patra <i>et al.</i> 2000
<i>E.coli</i>	7.0	Kontrollü	Bylund <i>et al.</i> 2000
<i>E.coli</i>	7.0	Kontrollü	Castan <i>et al.</i> 2002
<i>E.coli</i>	7.0	Kontrollü	Tabandeh <i>et al.</i> 2004
<i>Bacillus subtilis</i>	6-7	Kontrolsuz	Nakayama <i>et al.</i> 1988
<i>Pichia pastoris</i>	5.8	Kontrollü	Travino <i>et al.</i> 2000

Çizelge 2.7 *Bacillus* türü mikroorganizmalar ile SAP üretiminde pH işletim koşulu etkisi

Mikroorganizma	N Q ₀ /V _R	İşletim koşulu	A _{SAP} (U cm ⁻³)	C _X (kg m ⁻³)	C _{OA} (kg m ⁻³)	C _{AA} (kg m ⁻³)	KAYNAK								
<i>B.licheniformis</i>	750 dk ⁻¹ 1 vvm	pH Kontrolsuz	170	2.3	0.03-0.85	0.06-0.30	Çalık <i>et al.</i> 2002								
		pH ₀ = 7.00													
		pH ₀ = 7.25													
		pH ₀ = 7.50	390	1.7	0.05-1.20	0.02-0.50									
		pH Kontrollü	330	1.6	0.06-1.45	0.03-0.45									
		pH=7.5 GP	310	1.3	-	-									
		pH=7.5 PP	240	1.7	-	-									
pH=7.5 EP	35	1.2	-	-											
<i>r-B.licheniformis</i> (pHV1431::subC)	750 dk ⁻¹ 0.5 vvm	pH Kontrolsuz	700	2.5	GP	PP	GP	PP	Çalık <i>et al.</i> 2003						
		pH ₀ = 6.80			0.50	0.25	0.30	0.20							
		pH ₀ = 7.10			0.23	0.13	0.38	0.20							
		pH ₀ = 7.25	850	2.5	1.52	0.13	0.45	0.56							
		pH Kontrollü	450	2.5	0.25	0.60	0.14	0.10							
		pH= 6.80													
		pH= 7.10								720	2.5	0.15	1.50	0.15	0.40
		pH= 7.25								620	2.5	0.24	1.10	0.15	0.90

A_{SAP} : SAP aktivitesi

GP: Çoğalma fazı

EP: Tüm fermentasyon süreci

C_X: hücre derişimi

PP: Üretim fazı

C_{OA} : Toplam organik asit derişimi (hücre-dışı)

C_{AA} : Toplam amino asit derişimi (hücre-dışı)

2.1.2 Oksijen aktarımı etkisi

Aerobik fermentasyon proseslerinde mikrobiyal hücreye oksijen aktarımı, metabolik akıların değişmesi ve metabolik yollarının etkilenmesi nedeniyle ürün oluşumunu etkiler. Bu nedenle mikroorganizmanın fizyolojisiyle ilgili biyoreaktör performansının belirlenmesi için mikroorganizma oksijen ihtiyacının aydınlatılması gerekmektedir. Genel olarak, metabolik yollarının ve hücre çoğalma profillerinin analizine göre bazı biyoprosesler yüksek oksijen aktarım hızı gerektirirken, bazıları için düşük oksijen aktarım hızı seçilmesi gerekir (Çalık *et al.* 1998).

Sürekli yayınlarda insan büyüme hormonu üretimine ilişkin çalışmalar incelendiğinde oksijen aktarımının biyoproses verimi üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmanın yer almadığı görülmektedir (Çizelge 2.4 ve Çizelge 2.5). hGH üretimi ile ilgili çalışmalardan ikisinde çözünmüş oksijen %20'de tutulurken (Jensen and Carlsen 1990, Castan *et al.* 2002), üç çalışmada %40'da tutulmuştur (Shin *et al.* 1998a,b, Tabandeh *et al.* 2004), ancak bu çalışmaların hiç birinde karıştırma hızının ve hava giriş hızının ürün verim ve seçimliliği üzerine etkisi araştırılmamıştır. hGH üretimi prosesi için oksijen aktarım etkisinin incelendiği ilk çalışma araştırma grubumuzda yapılmıştır, bu çalışmada $N= 500, 700, 800 \text{ dk}^{-1}$ karıştırma hızlarında $Q_0/V_R= 0.5, 0,7$ vvm hava giriş hızlarında oksijen aktarımının verim ve seçimlilik üzerindeki etkisi, tanımlı ortamda 1 L hacimli biyoreaktörlerde araştırılmıştır (Şentürk 2006). Bu çalışmada hGH üretimi için en uygun oksijen aktarım koşulu, 800 dk^{-1} karıştırma hızı ve 0.5 vvm hava giriş hızı olarak belirlenmiştir.

Oksijen aktarım hızının ürün verim ve seçimliliğinin yanı sıra, yan-ürün dağılımlarını ve metabolik akıları etkilediği bilinmektedir. Çalık *et al.* 1998, *Bacillus* türü mikroorganizma kullanılan biyoprosesler için oksijen aktarım stratejisinin ürün ve yan-ürün dağılımlarına etkisinin ayrıntılı olarak incelendiği ilk çalışmadır. Bu çalışmada, *Bacillus licheniformis* mikroorganizması ile SAP üretim prosesi için oksijen aktarımının etkisi, tanımlı ortamda, 3.5 dm^3 hacimli biyoreaktörlerde, 1 vvm hava giriş hızında $N= 150, 500, 750 \text{ dk}^{-1}$ karıştırma hızlarında incelenmiş, koşullar sırasıyla düşük- (LOT), orta- (MOT) ve yüksek- (HOT) oksijen aktarım koşulu olarak adlandırılmıştır. En

yüksek SAP aktivitesi, MOT koşulunda 441 U cm^{-3} olarak bulunmuştur. Çalışmada farklı oksijen aktarım koşulları için, substrat tüketim hızının biyokütle üretimiyle doğru orantılı olmadığı görülmüştür. Bu sonuç karıştırma hızının değişmesinin hücre metabolizmasını değiştirdiğini işaret etmektedir. Hücre derişimi ve ortamdaki amino asit derişimlerinin LOT ve HOT koşullarında, MOT koşulundaki değerlerinden daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu sonuç ortamda bulunmayan amino asitlerden bir veya daha fazlasının hücre metobolizması üzerinde regüle edici etkisi olduğunu işaret etmektedir. Bu çalışma, oksijen aktarımının hücre metabolizması üzerindeki etkisinin göstererek, oksijen aktarım stratejisinin biyoprosese spesifik olarak belirlenmesinin gerekliliğini işaret etmektedir. Bu çalışmayı takiben yapılan iki çalışma ile, *Bacillus licheniformis* ile SAP üretimi için biyoproses süresince hücrenin gösterdiği metabolik davranış analiz edilmiş ve oksijen aktarımının metabolik akıların dağılımını nasıl etkilediği araştırılarak, üretimi kısıtlayan muhtemel darboğazlar tahmin edilmiştir (Çalık and Özdamar 1999, Çalık *et al.* 1999). Oksijen aktarımının metabolik yollara etkisinin bilinmesi, verim ve seçiciliğin düşmesine neden olan regülasyonların aydınlatılmasının yolunu açar. Üretimi artırması beklenen metabolitlerin akılarının metabolik mühendislik teknikleriyle artırılması veya verimi artıracak metabolitlerin ortama eklenmesi ile ortam tasarımına gidilmesi mümkündür. Ancak bu tip bir metabolik tasarımın veya ortam tasarımının yapılabilmesi için, metabolik yollazlarının oksijen aktarımına gösterdiği tepkilerin iyi analiz edilmesi öncül koşuldur.

Oksijen aktarım hızı biyoprosese spesifik olarak değişmekle birlikte, bir biyoprosesin farklı evreleri farklı oksijen aktarım hızlarına gereksinim duyabilir. Çalık *et al.* 2000, yaptıkları çalışmada, *Bacillus licheniformis* ile SAP üretimi biyoprosesi için, $Q_o/V_R=0.2, 0.5, 1.0$ vvm hava giriş hızlarında, $N=150, 500, 750 \text{ dk}^{-1}$ karıştırma hızlarında oksijen aktarım stratejisinin ürün ve yan-ürün oluşumu üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Bu çalışmada, en yüksek SAP aktivitesi, $Q_o/V_R=0.5$ vvm, $N=750 \text{ dk}^{-1}$ (MOT_2) koşulunda 500 U cm^{-3} olarak gözlenmiştir. Çalışmada, ürün ve yan-ürünlerin farklı indirgenme derecelerine sahip olmaları nedeniyle fermentasyon ortamında proses süresince meydana gelen değişim göz önüne alınarak, iki aşamalı oksijen aktarım stratejisinin verim üzerine etkisi araştırılarak, hücreler üretim fazına gelinceye dek hücre çağalmasının en yüksek olduğu düşük oksijen aktarım koşulunda ($Q_o/V_R=0.2, N=750$

dk⁻¹), üretim evresinde ise SAP üretiminin en yüksek olduğu orta oksijen aktarım hızında çalışılarak ($Q_o/V_R=0.5$, $N=750$ dk⁻¹) SAP üretimi 0.36 kat artırılmıştır.

Fermentasyon proseslerinde kütle aktarımının etkisinin göstergeleri olan oksijen tüketim hızının ve oksijen transfer katsayılarının belirlenmesi önemlidir. Biyoproses karakteristiklerinin zengin ortamda belirlenmesi güç olduğundan bunlarla bir ölçüde ilişkili olan oksijen aktarım karakteristikleri de sistematik araştırmalarda öncelikle tanımlı ortamda belirlenir (Çalık *et al.* 1998). ve Çalık *et al.* (2004), rekombinant *Bacillus licheniformis* mikroorganizması ile karbon kaynağı olarak melas içeren zengin ortamda SAP üretim biyoprosesi için oksijen aktarım etkisini araştırmışlardır. Çalışmada, $Q_o/V_R=0.2$, 0.5 , 0.7 , 1.0 vvm hava giriş hızı ve $N= 500$, 750 dk⁻¹ karıştırma hızlarında çalışılmıştır. En yüksek SAP aktivitesi $Q_o/V_R= 1.0$ vvm, $N= 750$ dk⁻¹ koşulunda 2418 U cm⁻³ olarak 48. saatte gözlenmiştir. Ancak $Q_o/V_R= 0.5$ vvm, $N= 750$ dk⁻¹ koşulunda bu değere yakın bir aktiviteye (2250 U cm⁻³) 36. saatte ulaşılmıştır. Bu nedenle bu koşul en iyi oksijen aktarım koşulu olarak belirlenmiştir. Zengin ortamda bulunan en iyi oksijen aktarım koşulunun, tanımlı ortamda bulunan ile benzer olduğu görülmüştür.

Oksijen aktarımına ilişkin literatürde yer alan çalışmalar incelendiğinde, oksijen aktarımının hücre metabolizması ve proses verimi üzerinde önemli etkisi olduğu açıkça görülmektedir. Diğer biyoproseslerde olduğu gibi, insan büyüme hormonu üretimi prosesi için de verim ve seçimliliğin artırılabilmesi için uygun oksijen aktarım stratejisinin belirlenmesi gereklidir. Bu nedenle, hHG üretimine ilişkin çalışmalarda oksijen aktarımının etkisinin incelenmemiş olması literatürdeki boşluğu işaret etmektedir. *Bacillus* türlerinde SAP üretimi için yapılan çalışmalar, *Bacillus* türleri ile hGH üretimine de ışık tutmaktadır, bu çalışmaların tamamında orta oksijen aktarımının uygun olduğu sonucuna varılmıştır (Çalık *et al.* 1998, Çalık *et al.* 1999, Çalık *et al.* 2004). Bu sonuç, araştırma gurubumuzda tamamlanan bir çalışma ile hGH üretimi için de doğrulanmıştır (Şentürk 2006). Yine de optimum oksijen aktarım stratejisinin belirlenebilmesi için daha dar bir aralıkta inceleme yapılması gereklidir. Optimum oksijen aktarımı koşulunda metabolik akıların incelenmesi ile dar boğazların belirlenmesi, ileriki çalışmalarda uygun metabolik mühendislik tasarımı veya ortam

tasarımı yöntemleri ile hGH üretiminde verim ve seçimliliğin artırılmasına olanak sağlayacaktır.

2.2 Biyoteknolojik Prosesler ve Mikro-biyoreaktörler: Mikroorganizmalar

Biyoteknolojik prosesler aşağıdaki gibi gruplanır:

A. Biyodönüşüm Prosesleri

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

B. Biyoprosesler / Fermentasyon Prosesleri

Biyoproses ile üretim bir karbon (örneğin: melas, soya, glukoz, vd) kaynağının girdi olarak kullanılmasıyla uygun bir organizma ile hücre içinde oluşan çok sayıda tepkime sonucunda gerçekleştirilmektedir. Endüstriyel biyoteknolojik ürünlerin biyoproses ile üretiminde genellikle mutant ve/veya genetik olarak modifiye edilerek üretim kapasitesi artırılmış mikroorganizmalar kullanılır. Biyoproseslerde biyoreaktör işletim koşullarının kolay gerçekleştirilebilir olması ve yapıları karmaşık olmayan biyoreaktör sistemlerinin kullanılabilmesi önemli avantajlarıdır. İstenen ürünün yanısıra biyoreaktör ürün karışımından ayrılması gereken çok sayıda yan ürün -amino asitler ve organik asitler, proteinler, üretim potansiyeli olmayan hücre- oluşması biyoproseslerin önemli dezavantajları olabilirler. Bu nedenle fermentasyon prosesleriyle yüksek verim ve seçimlilikte istenen ürünün üretimi için en uygun biyoreaktör işletim koşullarının belirlenmesinin yanısıra metabolik mühendislik teknikleriyle mikroorganizmanın fonksiyonlarının ve böylece üretimdeki darboğazların belirlenmesi ve bu darboğazların genetik mühendisliği teknikleriyle aşılacak şekilde mikroorganizma geliştirilmesi gerekmektedir. Sonuç olarak, metabolik mühendislik ve genetik mühendisliği teknikleriyle geliştirilen mikroorganizmalar kullanılarak biyoproses ile üretimde yan ürün oluşumu minimuma indirilerek yüksek verim ve seçimlilikte istenen ürün üretimi gerçekleştirilebilir.

Biyodönüşüm proseslerinde ise tek veya bir-kaç basamaktan oluşan enzimatik bir tepkime ile katalizör olarak mikroorganizmanın ürettiği spesifik bir enzimin ya da

dinlenen (resting) hücrenin -enzim deposu olarak- kullanılmasıyla üretim gerçekleştirilir. Bu proseslerde verim ve seçicilik yüksek olmaktadır. Ancak bu proseslerde kullanılan enzimlerin tek substratları vardır ve bu substratların hem az bulunması hem de genellikle pahalı olması prosesin dezavantajları arasında yer almaktadır.

Biyoteknolojik proseslerde istenen nitelikte ve nicelikte ürün üretmenin birinci koşulu onu üretebilen uygun mikroorganizmayı seçmektir. Mikroorganizmalar farklı ürün üretebildikleri gibi, aynı ürünü üretebilen farklı mikroorganizmalar da bulunmaktadır. Biyoteknolojik ürünlerin üretiminde verim ve seçiciliğin artırılması için işletim koşulları ve ortam bileşimi ne kadar değiştirilirse değiştirilsin istenen ürünün üretimi kullanılan mikroorganizmanın kapasitesi ile sınırlıdır. Günümüzde seleksiyon, mutasyon ve genetik mühendisliği teknikleriyle verim ve seçiciliği yüksek mikroorganizmalar geliştirilmektedir.

2.3 *Bacillus* Türleri ve *B.subtilis*

Bacillus, prokaryot sınıftan, aerobik, spor oluşturabilen, çubuk şekilli, gram pozitif bir bakteri türüdür. *Bacillus* türü bakteriler, toksik olmayan hücre duvarına sahip, tek membranı olan, ürettiği proteinleri (enzimleri) hücre dışına aktarabilmek için uygun mekanizmalara sahip, genellikle patojen olmayan mikroorganizmalardır. *Bacillus* 0.3-2.2 µm çapında ve 1.2-7.0 µm uzunluğundadır. *Bacillus*'ların guanin+sitozin (G+C) bileşimi %32-62 arasında değişir. Bunların çoğu yan taraflarında bulunan kırbaç ile kendiliğinden hareket edebilirken bazıları hareket edemezler. *Bacillus*'lar tek hücrelidirler ve ikiye bölünerek çoğalırlar. *Bacillus* türü bakteriler stoplazmalarında spor bulundurma potansiyeline sahiptirler. Sporlar yüksek ve düşük sıcaklık, kuraklık, osmoz, radyasyon ve kimyasal etkilere karşı vejetatif hücrelerden daha dirençlidirler. Çevre koşullarının uygun olmadığı durumlarda bu tür bakteriler kötü dış etkenlere karşı korunabilmek için spor oluştururlar. Spor uygun besi yerinde ve çevre koşullarında bulunduğu zaman aktif olarak faaliyet göstermeye başlar. Bunların metabolizması, şiddetli solunum, şiddetli fermentasyon ya da hem solunum hem de fermentasyon ile organik substratların dissimilasyonunu sağlar. Moleküler oksijen, solunum

metabolizmasında terminal elektron alıcı olarak görev yapar. Bu, bazı türlerde azot ile yer değiştirebilir. Genel olarak, spor oluşturan *Bacillus*'lar toprakta bulunurlar. Bazı türleri patojeniktir ve toksinler üreterek hastalığa neden olurlar (Çalık 1998, Buchanan and Gibbson 1974).

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

Bacillus araştırmaları için; genetik, biyokimyasal ve fizyolojik seviyede en iyi tanımlanmış prokaryotik organizma olması nedeniyle *Bacillus subtilis* kullanılır. *B. subtilis*, üzerinde en fazla çalışma yapılmış gram-pozitif prokaryottur. *B. subtilis* için birçok plazmit geliştirilmiş ve uygun plazmit-vektör sistemleri geliştirmenin farklı evrelerinde farklı problemlerle karşılaşmıştır. Doğal olarak transformasyonla plazmitleri alma potansiyeli olan *B. subtilis* endojen plazmitler içermez. Diğer bazı *Bacillus* suşları da konakçıları üzerinde kolaylıkla seçilebilir fenotipler vermeyen gizli plazmitler içerirler. *B. subtilis* plazmidi ilk olarak *Staphylococcus aureus* kökenli plazmitler kullanılarak elde edilmiştir. Bunların birkaçı *B. subtilis*'de replike olur ve antibiyotik direnç sağlayan proteinleri üretir. *B. subtilis* için bugünkü plazmitlerin çoğu yine *S. aureus* plazmitlerine dayanır. Başarılı klonlama kaydedilmesine rağmen, düşük klonlama verimleri ve plazmit kararsızlığı nedeniyle bu plazmitlerin *B. subtilis* için uygun olmadığı bulunmuştur. Gram-pozitif bakterilerden küçük plazmitlerin tek zincir bir DNA araürünü yoluyla, muhtemelen “rolling-circle” replikasyon ile replike olmaları önemli bir bulgudur (Bron 1990).

2.4 Taşınım Mekanizmaları

Metabolizma substratlarının, ürünlerin ve yan ürünlerin hücre-içine ve hücre-dışına taşınmaları; hücrenin çoğalabilmesi, istenen ürünleri üretebilmesi ve fonksiyonlarını yerine getirebilmesi için önemlidir. Hücreler, içinde çeşitli proteinlerin yerleşik olduğu plazma membranlar ile çevrilidir. Bu membranlar, bazı maddelerin geçişini kolaylaştırırken bazılarının geçişini engeller. Örneğin iyonlar ve çeşitli metabolitler gibi hidrofilik maddelere karşı geçirgen değildir. Membranın bu özelliği seçici geçirgenlik olarak adlandırılır. Hücre içindeki tepkimelerin gerçekleşebilmesi için girdilerin hücreye taşınımı, ürünlerin ve hücre içinde istenmeyen ve gerekenden fazla derişimde bulunan maddelerin hücre dışına aktarımı gereklidir (Erincin 1998).

Maddelerin hücre-dışı veya hücre-içi membranlardan geçişlerinin olduğu mekanizmalar, *taşınım mekanizmaları* olarak adlandırılır. Üç farklı taşınım mekanizması vardır:

- a. Serbest yayınma
- b. Kolaylaştırılmış yayınma
- c. Aktif taşınım.

İlk iki mekanizmada, maddeler derişim gradyenine göre yüksek derişimden düşük derişime doğru taşınırlar. Bunlar pasif proseslerdir ve ekstra bir enerji desteğine gerek duymazlar. Aktif taşınımında maddeler, derişim gradyenin ters yönünde -derişim artış yönünde- de taşınabilirler ve Gibbs serbest enerji girişine ihtiyaç duyarlar. Bakterilerde bazı substrat ve metabolik ürünler için taşınım mekanizması Çizelge 2.8'de verilmiş (Erincin 1998, Nielsen and Viladsen 1994) ve üç taşınım mekanizması aşağıda incelenmiştir.

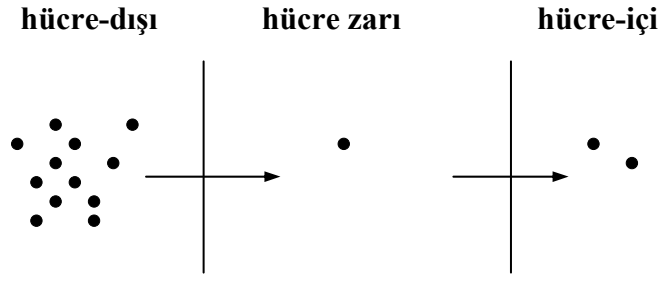
a. Serbest yayınma: Bir maddenin serbest yayınma ile membrandan taşınımı üç basamaktan oluşur.

1. Maddenin hücre-dışı ortamdan membran fazına taşınımı
2. Lipid membran boyunca moleküler yayınma
3. Lipid membran fazından sitoplazmaya taşınım.

Çizelge 2.8 Bakterilerde bazı metabolitlerin taşınım mekanizmaları

Bileşik	Taşınım Mekanizması
Amino asitler	Aktif taşınım
Glukoz	Aktif taşınım
Laktoz	Aktif taşınım
Gliserol	Serbest ve kolaylaştırılmış yayınma
Etanol	Serbest yayınma
Laktik asit	Serbest yayınma ve aktif taşınım
Asetik asit	Serbest yayınma
Karbondioksit	Serbest yayınma
Oksijen	Serbest yayınma
Su	Serbest yayınma

Serbest yayınmada taşınım hızı ve net akı, membrandan geçen maddenin derişim gradyeni ile doğru orantılıdır. Eğer membran maddeye karşı geçirgense ve membranın bir tarafındaki derişimi diğer taraftan yüksekse, madde azalan derişim gradyenine göre membrandan geçme eğiliminde olacaktır. Hücre-içi ve hücre-dışı derişim farkı ne kadar fazla ise yürütücü kuvvet o kadar yüksek olacağından yayınma da o denli hızlı olacaktır. Ayrıca membranın her iki tarafındaki sıvıların farklı hidrostatik basınçları, sıvının yüksek basınçtan düşüğüne pasif hareketi için yürütücü bir kuvvet sağlayabilir. Yürütücü kuvvete aldırış etmeksizin geçirgen membranlar boyunca pasif yayınma sadece, taşınım prosesi için serbest enerjideki değişiminin (ΔG) negatif olduğu yönde kendiliğinden meydana gelir. Serbest yayınma şematik olarak Şekil 2.1’de gösterilmiştir (Erincin 1998, Bailey and Ollis 1986).



Şekil 2.1 Serbest yayınma

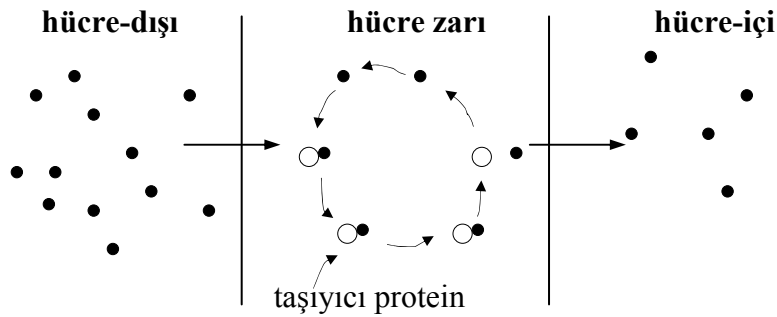
b. Kolaylaştırılmış yayınma: Hücre zarının yapısından dolayı her kimyasal ve biyokimyasal madde aynı kolaylıkla difüzenememektedir. Genellikle zardaki gözeneklerden ötürü, küçük moleküllerin yayınması kolay olduğu halde daha büyük moleküllerinki daha güç olmaktadır. Ancak pek çok metabolit kolaylaştırılmış yayınma ile hücre zarından daha kolay ve hızlı difüzlenebilmektedir.

Kolaylaştırılmış yayınma, enerji gerektirmeyen mekanizmalarla bir bileşiğin, taşıyıcı proteinler yardımıyla membrandan geçişinin yer aldığı proseslerdir. Kolaylaştırılmış yayınmada, difüzlener madde hücre zarından bir taşıyıcı molekül ile birleşir ve zarın içinde kolaylıkla taşınarak öteki uçta taşıyıcıdan ayrılır. Sitoplazmik membranda çok sayıda bulunan, permeazlar ve taşıyıcı proteinler olarak bilinen bu moleküller, substratlarına membranların dış yüzeyinde bağlanır ve membrandan taşıyıcı-substrat kompleksinin ayrıldığı iç yüzeye geçişlerini sağlayarak, substratı hücre içine bırakır. Kolaylaştırılmış yayınma, substratın yüksek derişimden düşük derişime azalan derişim gradyeni boyunca taşınması açısından serbest yayınmaya benzerdir. Ancak serbest yayınmaya kıyasla daha hızlı bir prosestir. Bileşik, ancak uygun boş bir taşıyıcı olduğunda membrana girebilir. Substrat spesifik taşınım mekanizması olan kolaylaştırılmış yayınmada substrat-taşıyıcı protein etkileşimi, enzimatik tepkime mekanizmalarına uyar. Kolaylaştırılmış yayınma ökaryotik mikroorganizmalar (örneğin fungi) için genel, ancak bakteriler/prokaryotlar için az rastlanan bir taşınım mekanizmasıdır. Fungide/ökaryotlarda bu mekanizmayla taşınan en önemli maddeler glukoz ve diğer şekerlerdir. Prokaryotlarda ise bu maddeler diğer mekanizmalarla -aktif

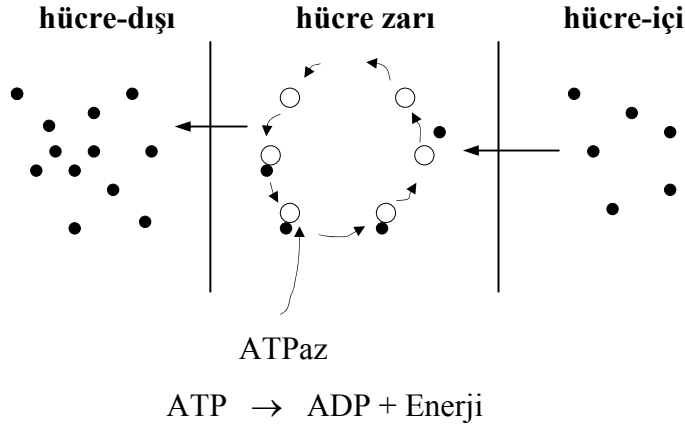
taşıyım veya grup transfer sistemi ile- taşıyımrlar. Şekil 2.2’de kolaylaştırılmış yayıyma görülmektedir (Erincin 1998, Nielsen and Villadsen 1994).

c. Aktif taşıyım: Aktif taşıyım, moleküllerin derişim gradyenleri veya iyonların elektrokimyasal gradyenler oluşturarak membrandan taşıyımının gerçekleştiği proseslerdir.

Aktif taşıyım, taşıyım prosesinde taşıyıcı proteinlerin rol oynaması açısından kolaylaştırılmış difüzyona benzer. Ancak kolaylaştırılmış difüzyonun tersine, taşıyım derişim gradyeninin artan yönünde olabilir. Aktif taşıyım serbest enerji tüketimi gerektiren bir prostedir. Taşıyım prosesi için gereken enerji, ATP molekülündeki yüksek enerjili fosfat bağlarının parçalanması ile veya proteinin yüzeyindeki taşıyıcı olarak görev yapan diğer bir yüksek enerjili bileşiğin hidrolizi ile sağlanabilir (birincil aktif taşıyım) veya proses, tersinmez olarak kendiliğinden yürüyen ($\Delta G < 0$), azalan derişim gradyenine göre hareket eden ikinci bir maddenin eşanlı taşıyımına bağlanabilir (ikincil aktif taşıyım). İkincil aktif taşıyım sistemleri, glukoz ve diğer şekerler için ve nötral amino asitler için belli dokularda bulunurlar. Glukoz, serbest ve kolaylaştırılmış yayıyma dışında Na^+ iyonları yardımı ile aktif taşıymaya da uğramaktadırlar. Bakterilerde ise glukoz, enzimler yardımı ile glukoz-6 fosfata dönüştürülerek aktif taşıyması gerçekleştirilir. Bu taşıyma için gerekli enerji $\text{ATP} \rightarrow \text{ADP}$ dönüşmesinden sağlanır. Şekil 2.3’de aktif taşıyımın şeması görülmektedir (Erincin 1998).



Şekil 2.2 Kolaylaştırılmış yayıyma



Şekil 2.3 Aktif taşınım

2.5 *Bacillus* Türlerinde Hücre-Dışına Taşınım

Hücrelerin yaşam sürecinde yukarıda incelenen mekanizmalarla değişik maddeler sitoplazmaya girer ve içeride oluşan metabolitler dışarı çıkar. Her maddeye özgü olarak meydana gelen bu geçişlerde hücre duvarı, hücre zarı ve diğer kısımlardan oluşan hücre zarfının rolü büyüktür. *Bacillus* türlerinde bu zarfın yapısı ve fonksiyonları ile *Bacillus* hücrelerinin proteinleri salgılaması aşağıda incelenmiştir.

2.5.1 *Bacillus* hücre zarfının yapısı ve fonksiyonu

Bacillus hücresi yapısal olarak çok basit bir organizmadır. *Bacillus*'ların hücre zarfı (cell envelope), sitoplazmik membran, hücre duvarı ve bazı türlerde (*B. brevis* gibi) S-tabakası olarak adlandırılan ve proteinlerden oluşan bir dış tabakadan meydana gelen katmanlar halinde bir yapıdır. Hücre zarfının primer fonksiyonu, sitoplazmayı çevrelemek, korumak ve çevreyle arasındaki madde taşınımını kontrol etmektir. Çubuk şeklinde olan *Bacillus*'lar, yüksek bir yüzey/hacim oranına sahiptirler. Bu, yüksek hızda besin transferini ve kokal şeklinde olanlarından daha yüksek hızda çoğalmalarını sağlar. Fakat, çubuk şekilli olanlar kokal şekillilerden daha az kararlıdır (Bailey and Ollis 1986).

Bacillus türlerinin sitoplazmik zarı, sitoplazmayı sarar ve hücre metabolizmasında önemli bir yer tutar. Membran; sentez, enerji meydana getirme, sinyal transdüksiyon, çözünen translokasyon ve faj bağlama konumudur. Hücre zarı besinlere karşı yarı geçirgen özelliktedir. Kuru hücre ağırlığının yaklaşık %5-10'unu oluşturur. Bu zarın başlıca %50 protein, %28 yağ, %15-20 karbonhidrat içeren bileşimi ve çift katmanlı bir yapısı vardır. Sitoplazmik membran fosfolipitler ve proteinlerce zengindir. *B. subtilis* ve diğer çoğu *Bacillus* türlerinde, fosfotidil etanolamin esas fosfolipittir ve toplam lipit ağırlığının %20-40'ını oluşturur. Diğer fosfolipitler, kardiolipin ve fosfotidil gliserol içerirler. Çoğu türler hiç ya da çok az doymamış yağ asidi üretir. Toplamın yaklaşık %80'ini teşkil eden dallanmış yağ asitleri, zar akıcılığını muhafaza etmek için önemlidir. Küçük oranlarda bulunan izoprenoit lipitler, peptitoglikan ve teikoik asit gibi duvar polimerlerinin sentezi için lipit taşıyıcılar olarak davranırlar. Sitoplazmik membranın en önemli görevlerinden biri çözünen translokasyonudur. Çoğu durumlarda, şok-etiketleme deneylerini tasarlamak veya belirli direnç özelliklerini ve salgılama fenotiplerini belirlemek için, *Bacillus* hücrelerinde salgılama kinetiğini belirlemek için önemlidir (Harwood *et al.* 1990).

Bacillus türlerinin hücre duvarları, sitoplazmik membranları koruyan ve çevreleyen, dinamik olarak değişken ve esnek yapılardır. Hücre duvarları hücrelerin çoğalmasında, morfogenezde, hücre bölünmesinde, genom segregasyonunda, hücre ve çevre etkileşiminde ve materyallerin hücre-içi ve dışına taşınımında önemlidir. *Bacillus*'ların hücre duvarı kalınlığı 20-50 nm arasındadır. *Bacillus* türlerinin ve diğer gram pozitif bakterilerin hücre duvarı, çapraz bağlı yarı geçirgen bir makromoleküldür. *Bacillus* türlerinde, bu temel olarak peptitoglikan ve teikoik ve teikuronik asitler gibi anyonik polimerlerden oluşur. Bu anyonik polimerler duvara ampifilik özellikler kazandırır. Bunun yanında peptitoglikan-anyonik polimer kompleksine kovalent bağlarla veya kovalent olmayan etkileşimlerle bağlı değişik oranlarda protein, nötral polisakkarit, lipoteikoik asit ve hücre duvarı kompleksinin polielektrolit jel yapısının parçası olan katyonlar hücre duvarında bulunurlar. Duvarın fiziksel ve kimyasal özellikleri özellikle sınırlı gözenekliliği ve yüklü grupların yüksek derişiminden dolayı duvar, sitoplazmik membran ile mikroçevre arasındaki materyallerin sınırsız taşınımını engelleyebilecek özelliktedir. Duvarın, katyon bağlama (iyon değişimi) ve membran-bağlı enzim

sistemlerinin etkinliği için uygun iyonik ortam oluşturma işlevi vardır. Duvarın bileşimi ve yapısı kültür koşulları ile değişir ve sonuç olarak onun gözenekliliği ve iyon-değişme kapasitesi de değişebilir. Bu değişikliklerin, protein salgılama ve otoliziz gibi diğer ilgili hücrenel fonksiyonları etkilemesi beklenebilir (Archibald *et al.* 1993).

B.subtilis'in hücre duvarı yaklaşık 12 farklı protein içerir. Bunlardan sadece birkaçının fonksiyonu bilinir. Bunlar, hücre duvarı bileşenlerini degrade eden ve normal çoğalma ve hücre bölünmesi için gerekli olan otolitik enzimlerdir. Çeşitli *Bacillus* türleri -*B. subtilis* dışında- peptitoglikanın dışında protein tabakalarına sahiptir. Bunlar genellikle, bakterinin en dıştaki tabakası olarak düzenli bir kafes oluşturan, bir veya iki protein içerir. Bu tabakalar sadece gram-pozitif bakteriler için tipik değildir. Çoğu gram-negatif bakteriler de bu tabakalara sahiptir. Bu tabakalar geçirgendir ve proteinleri bir taraftan öbür tarafa geçirmek için yeterli büyüklükte gözenekler içerir (Archibald *et al.* 1993). Hücre duvarını oluşturan makromoleküller olan peptitoglikan ve anyonik polimerlerin yapıları aşağıda incelenmiştir:

a. Peptitoglikanların molekül yapıları: Adından da anlaşılacağı gibi peptitoglikanlar iki kısımdan oluşmuşlardır:

- i. Peptit kısmı,
- ii. Glikan yani polisakkarit kısmı.

Glikan yani polisakkarit, birbirlerine β -1,4-glikozid bağlarıyla bağlanmış, N-asetilmuramik asit ve N-asetilglikozamin birimlerinden oluşur. Her muramik asitin karboksil grubu, kısa bir peptitin N terminal aminoasiti ile bir amid bağı oluşturur. Çoğu *Bacillus* türlerinde bu peptit beş amino asitten oluşur. N-terminal amino asiti L-alanindir ve diğer amino asitler sırayla D-glutamik asit, mezo-diaminopimelik asit ve iki D-alanindir.

b. Anyonik polimerler: Çoğu *Bacillus* suşlarının duvarları, teikoik ve/veya teikuronik asit polimerlerini içerir. Bu anyonik polimerler hücre duvarı yapısının yaklaşık yarısını oluşturur ve kovalent olarak bağlı oldukları peptitoglikan katmanının dış tarafında bulunurlar (bunlar, glikan zincirindeki N-asetilmuramik asitin C-6 daki hidroksil grubuna fosfodiester bağı ile bağlanırlar). Bunlar, teikuronik asitlerde karboksil grupları

ve teikoik asitlerde fosfat grupları olmak üzere yüklü gruplara sahiptir. Bu gruplar hücre duvarının net yüküne önemli olarak katkıda bulunurlar ve bunlar arasındaki elektrostatik etkileşimler duvarın polielektrolitik bir jel yapısına sahip olmasıyla sonuçlanır. Hücre duvarında bulunan anyonik polimerlerin tipleri ve bileşimleri çoğalma koşullarıyla değişir. *Bacillus* hücrelerinin duvarında en çok bulunan anyonik polimer teikoik asittir. Teikoik asitlerde en çok gözlenen yapı, gliserol fosfat polimeridir. *Bacillus* hücre duvarlarındaki teikoik ve teikuronik asit miktarları, sırasıyla fosforus ve uranik asit bileşimlerini hesaplayarak belirlenir.

Bunların dışında *Bacillus* hücreleri yaklaşık %1-2 oranında lipoteikoik asit içerirler. Bu asitin çoğu membranla birleşir fakat bazıları ya duvarda hücre yüzeyinde ya da kültür ortamında serbest olarak bulunur. Lipoteikoik asitler yapı olarak hücre duvarlarında bulunan 1,3-poligliserol fosfat teikoik asitine benzerler. Fakat, onlar bir fosfodiester-bağlı glikolipid veya açıl gliserol yoluyla sitoplazmik membrana bağlanırlar (Archibald *et al.* 1993).

2.5.2 *Bacillus* türlerinde proteinlerin salgılanması

Bir proteinin salgılanması, onun sentez konumu olan sitoplazmadan hücre dışına transfer edilmesidir. Salgılanan proteinler ilk olarak sinyal peptitli preproteinler olarak sentezlenir. Bu sinyal peptit, salgılanacak proteinleri sitoplazmik olanlardan ayırt eder ve proteinlerin salgılanma yoluna yönelmeleri için gereklidir (proteinlerin salgılanması için gereklidir). Bu yönlendirme, sinyal peptitin membrana ya direkt olarak ya da sitoplazmik protein bileşenlerinin içinde çözünerek bağlanmasıyla meydana gelir (Harwood *et al.* 1990).

Salgılanan proteinler, sitoplazmada genellikle son üçüncül şekillerini alamazlar. Çünkü şaperonlar olarak adlandırılan çözülebilir proteinler, onların katlanmasını etkiler ve preproteinleri kısmen katlanmamış, translokasyon için yeterli konformasyonda muhafaza ederler. Translokasyon, proteinin sitoplazmadan ya membrana ya da membranın içine transfer edildiği bir basamak olarak tanımlanır. Proteinlerin katlanmasının önlenmesi protein salgılanması için çok önemlidir, çünkü eğer

translokasyondan önce proteinin üçüncül yapısını almasına izin verilirse, protein daha fazla salgılanamaz. Sinyal peptit, şaperon ya da her ikisi yoluyla, “precursor” onun spesifik membranına yönelir. Bundan sonra, membrandan öbür tarafa translokasyon bilinmeyen bir stilde meydana gelir. Translokaz olarak adlandırılan membran protein kompleksi, salgılanan proteinlerin sitoplazmik membran ve endoplazmik retikulum membranından öbür tarafa transferine aracılık eder. Sinyal peptit, translokasyon prosesi sırasında spesifik bir proteaz, sinyal peptitaz tarafından uzaklaştırılır. Translokasyondan ve sinyal peptitin ayrılmasından sonra, salgılanan proteinler onların katlanması tamamlanana kadar membrana birleşmiş olarak kalır. Bu katlanmalar spesifik şaperonlar tarafından desteklenmektedir. Bu şaperonlardan bazıları başarılı translokasyon için de gereklidir (Harwood *et al.* 1990, Simonen and Palva 1993).

Bacillus'lar gram pozitif olduğundan dolayı, bu türler salgılama çalışmaları için *E. coli*, *S. cerevisiae* ve memeli hücrelerinden farklı bir model gösterirler. *Bacillus* salgılaması çalışılan ilk bakteriyel salgılama sistemidir.

Bacillus türleri hücre-dışına büyük miktarlarda protein salgılayabilme potansiyeline sahip olduğundan, alkali proteaz ve α -amilaz gibi endüstriyel enzimlerin üretimi için kullanılmaktadır. *Bacillus* türlerinde homojen ve heterojen proteinlerin salgılanması hakkında çeşitli makaleler yayınlanmıştır. Çeşitli salgılama vektörleri yapılmış ve çoğu proteinlerin üretimi ve salgılanmasına yardım edilmiştir (Simonen and Palva 1993).

Çoğu çalışmada *B. subtilis* konak-hücre olarak kullanılmıştır. Çünkü rekombinant DNA çalışması için gerekli olan vasıtalar, *B. subtilis* için diğer *Bacillus* türlerinden daha iyi geliştirilmiştir. *B. subtilis*'de protein salgılama hakkındaki çalışmalardan toplanan bilgiler, diğer endüstriyel *Bacillus*'lara uygulanabilir.

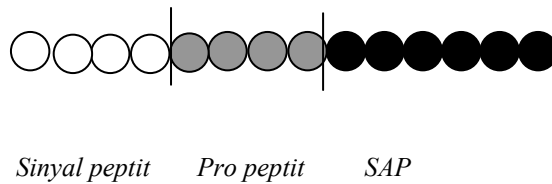
Genel olarak *Bacillus*'ların basit besin ihtiyaçları, fermentasyon teknolojileri hakkında bilgilerin varolması, S-tabakası proteinleri içeren *B. brevis*'de optimum çoğalma koşulları altında 12 mg/ml'e kadar varan protein salgılama potansiyeli ile birleştiğinde bu organizmaları ekonomik işletme için uygun yapar ve birçok *Bacillus* egzoenzimleri,

örneğin amilazlar ve alkali ve nötral proteazlar endüstriyel ölçekte üretilir (Simonen and Palva 1993).

Hücre-dışı proteinlerin hücre-içinden hücre-dışına taşınımları kompleks bir prosestir. Hücre-içinde serin alkali proteaz sinyal peptit, propeptit ve protein (serin alkali proteaz) olmak üzere üç kısımdan oluşur (Şekil 2.4). Hücre-dışı enzimlerin N terminalinde bulunan sinyal peptitlerin kritik fonksiyonları, hücre-dışı proteinin hücre membranından hücre-dışına transferini sağlamaktır. Sinyal peptitler üç bölümden oluşur:

- i. N terminal uç bölge,
- ii. hidrofobik çekirdek ve
- iii. C terminal bölümü.

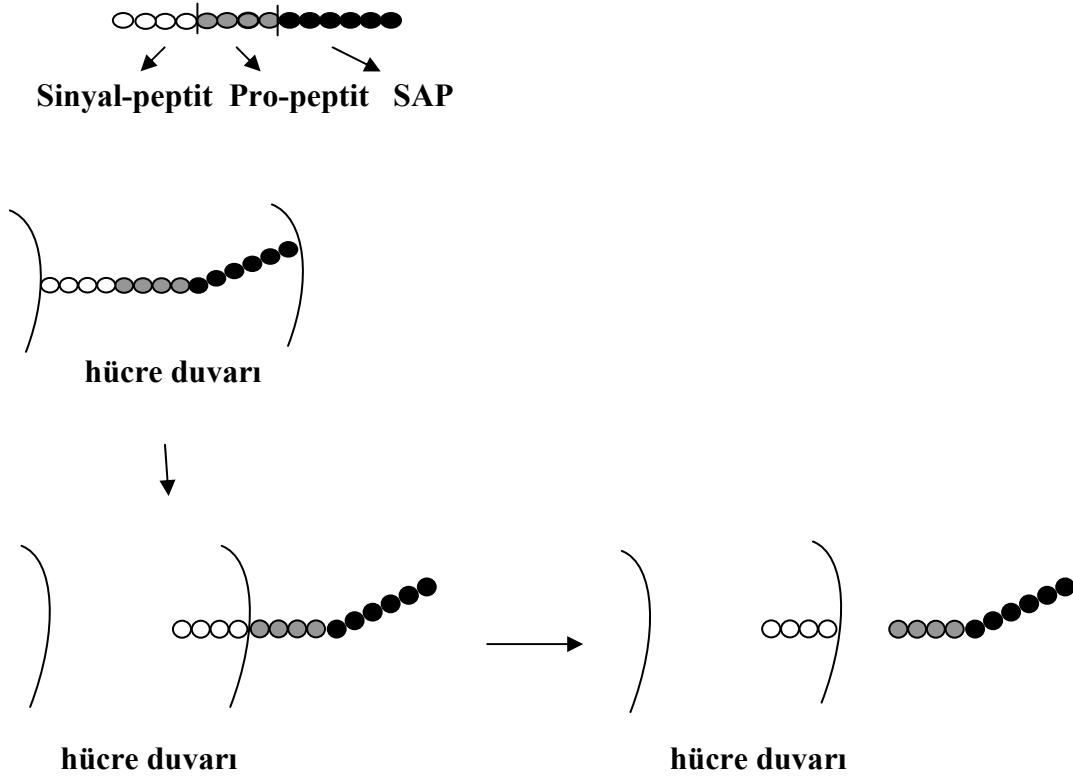
N terminal ucunda bulunan amino asitlerin sayısı 2-7 arasında değişir ve bu amino asitlerin ortalama net yükü 2-3.1 arasındadır. Sinyal peptitin pozitif yüklenmiş N terminal ucu, hücre duvarının negatif yüklü fosfolipit tabakası ile etkileşir. Hidrofobik çekirdek glisin veya prolin amino asitlerinden biriyle sonlanır ve lözin, izolözin, valin, alanin ve fenilalanin gibi yüksüz amino asitlerden oluşur; bu bölümün görevi, hücre membranıyla etkileşmesi (span) ve translokasyonu (taşınımı) başlatmasıdır. Sinyal peptit polar amino asitler içeren C terminal bölümüyle son bulur. Sinyal peptit enzimden ya translokasyon sırasında ya da translokasyondan hemen sonra ayrılır (Şekil 2.5). Alkali proteaz enzimi yapısında, sinyal peptit ve enzim arasında propeptit adı verilen bir bölüm de bulunmaktadır. Propeptit sadece gram pozitif bakterilerde bulunur ve yapısının büyük bölümünü yüklü amino asitler içerir. Propeptitin protein yapısında birçok görevi vardır. Bunlar; sinyal peptit ayrıldıktan sonra membranda askı olarak bulunmak, hücre duvarındaki katyonlarla etkileşmek böylece proteinin çözünürlüğünü artırmak, proteinin üç boyutlu yapısını almasını sağlamak ve proteinin N terminal ucunu proteolitik hidrolizden korumaktır (Nagarajan 1993). Sinyal peptit SAP enziminden sinyal peptitazlar tarafından ayrılır (Erincin 1998).



Şekil 2.4 Hücre-içindeki SAP'ın şematik gösterimi

B. subtilis, yukarıda anlatıldığı gibi peptitoglikan ve teikoik yada teikuronik asitten oluşan kalın bir hücre duvarına sahiptir ve bu hücrenin etrafında negatif yüklü bir kafes oluşturur. Çevreye salgılanan proteinler hücre duvarını geçmelidir. *Bacillus* ve yabancı kaynağın çoğu proteinleri, kültür ortamında kısa bir radyoaktif şoktan sonra ortaya çıkarlar. Proteinlerin duvarı nasıl geçtiği yada salgılanan proteinler için özel kanallar olup olmadığı bilinmemektedir.

Hızlı olarak salgılanan proteinlere ilaveten, uzunca bir süre duvarda kalan bir grup salgılanmış proteinler vardır. 'Pulse-chase' deneyleri bu proteinlerin kültür ortamına yavaş olarak bırakıldığını gösterir. Bu gibi proteinler, ya büyüklükleri ve şekilleri ya da yüklerinden dolayı hücre duvarına yakalanmış olabilirler. Onlar sitoplazmik membrandan dışarıya doğru meydana gelen hücre duvarı büyümesi ile sitoplazmik membrandan dışarı itilebilirler.



Şekil 2.5 Serin alkali proteaz enziminin hücre-dışına taşınımı

Heterojen proteinlerin salgılanmasında, hücre duvarına potansiyel bir engel olarak önem verilmemiştir. Ancak, *Bacillus* hücre duvarı en azından bazı yabancı proteinler için şiddetli bir engel oluşturur. Örneğin insan serum albümini *B. subtilis*'de taşınır, ancak bu, hücre duvarının peptitoglikan tabakası uzaklaştırılmadıkça kültür ortamına salgılanmaz. *Bacillus* hücre duvarının, *S. aureus* protein A ve *Streptococcus* protein G'nin salgılanmasını da geciktirdiği ortaya çıkar. *B. subtilis*'den başka *Bacillus* türleri ya da farklı zayıf hücre duvarına sahip olan diğer dizinler, hücre duvarına yakalanmış proteinlerin salgılanması için daha uygun konak hücre olabilirler. Örneğin; *B. brevis*, *B. subtilis*'den daha ince bir peptitoglikan tabakasına sahiptir ve bu proteinlerin hücre duvarından geçerek salgılanmasını kolaylaştırır. Aynı zamanda, belirli hücre duvarı mutantları üretim konakçıları olarak uygun olabilirler. Örneğin, hücre duvarı yapısında etkili olduğu varsayılan, çeşitli *Bacillus* türlerinin bazı antibiyotik-direnç mutantlarının uygun doğal türlerden daha fazla miktarda egzoenzim salgıladığı kaydedilmiştir (Simonen and Palva 1993).

2.6 Genetik Mühendisliği Teknikleri ve Moleküler Tasarım

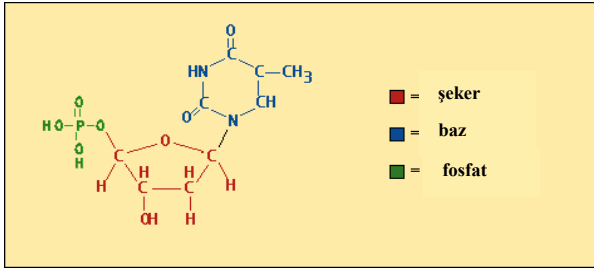
Endüstriyel biyoteknolojik ürünlerin üretiminde darboğaz oluşturan ve kritik bir basamak olan mikroorganizma geliştirilmesinde genetik mühendisliği ve rekombinant DNA teknolojisi uygulanması ve gelişimi için DNA yapısının ve fonksiyonları ile biyokimyasal reaksiyon mühendisliği temellerinin bilinmesi gerekmektedir (Çalık 1998).

2.6.1 Nükleik asitler

Nükleik asitler (DNA, RNA), yaşam bilgilerini içeren, bunları saklayan ve proteine dönüştürülmesini gerçekleştiren biyopolimerlerdir. İki tür nükleik asit vardır. Bunlar; deoksiribonükleik asit (DNA) ve ribonükleik asit (RNA)'dır. Nükleik asitler diğer polimerlerde olduğu gibi, dehidrasyon sentezi ile birleşen monomerlerden oluşmuştur. Nükleik asit monomerleri -nükleotitler- üç birimden oluşmuştur. Bunlar bir azotlu baz, bir şeker ve bir fosforik asittir. Şekil 2.6'da bir nükleotit biriminin yapısı gösterilmiştir (Lehninger 1979).

a. Azotlu bazlar: N içeren halka şeklindeki bazlardır. Nükleotitlerde bulunan azotlu bazlar pürin ve pirimidin bazları olarak iki gruba ayrılırlar.

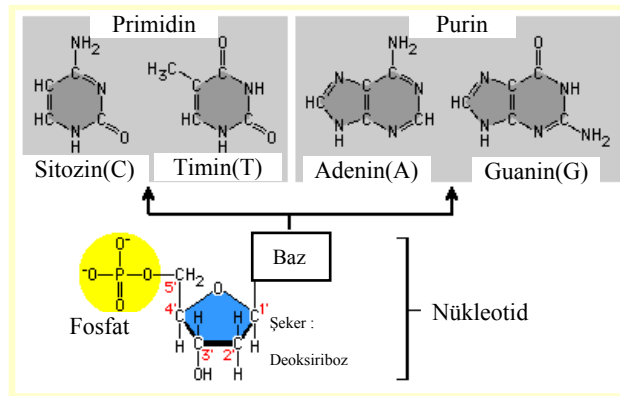
i. Pirimidin bazları: Pirimidin, 1,3-diazindir yani benzen (6'lı karbon) halkasının 1- ve 3- yerlerinde iki azot molekülü bulunur. Bunun türevleri timin (T), sitozin (C) ve urasil (U) dır. Şekil 2.7'de pirimidin bazlarının formülleri gösterilmiştir.



Şekil 2.6 Nükleotit biriminin yapısı

ii. Pürin bazları: Pürin halkası, imidazol ve pirimidin halkalarının kaynaşmasıyla oluşmuştur. Bunun türevleri adenin (A) ve guanin (G) dir. Şekil 2.7'de pürin bazlarının formülleri gösterilmiştir.

Bu azotlu bazlar kısaca ilk harfleri ile gösterilirler. Her nükleik asit sadece dört tür nükleotit moleküllerinden oluşur. DNA'da urasil içeren nükleotit, RNA'da ise timin bazını içeren nükleotit bulunmaz (Lewin 1994).



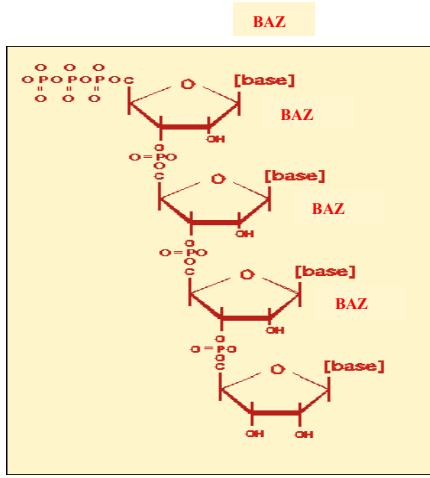
Şekil 2.7 Pürin ve pirimidin bazları

b. Beş karbonlu monosakkarit: Nükleik asitlerin yapısına giren şeker beş karbonlu bir pentozdur. Fakat pentozun molekül yapısı iki tip nükleik asitte farklı olur. D-riboz şeklinde olduğu zaman, nükleik asit, ribonükleik asit (RNA), 2 deoksi-D-riboz olduğu zaman da deoksiribonükleik asit (DNA) adını alır. Çekirdek baz D-riboz halkasının 1-β konumuna bağlanmış ise nükleosit, 2 deoksi-D-riboz halkasının 1-β konumuna bağlanmış ise buna deoksinükleosit denir. Bu iki pentozun moleküler yapısı incelenirse, aralarındaki fark riboz'da iki numaralı karbona bağlı hidroksil grubu olduğu halde deoksiriboz şekerinde bu konumda hidrojenin bulunmamasıdır; bu nedenle ikincisi “oksijensiz” anlamında “deoksi” ön-eki kullanılarak adlandırılmıştır (Stryer 1995, Lewin 1994).

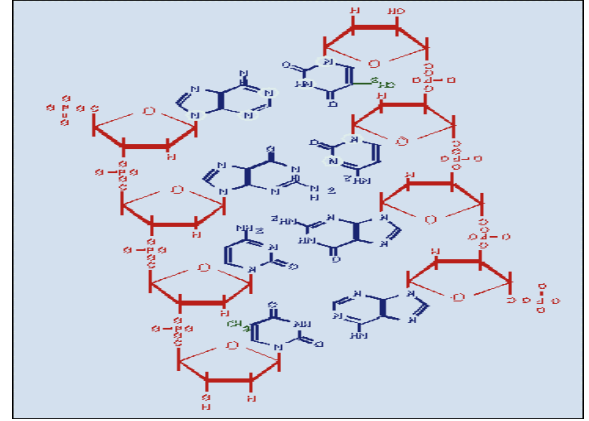
c. Fosfat iyonu: Nükleik asitlerin fosfat kısmı, fosforik asidin diesteri şeklindedir. Bu nükleik asitlerin, uzun zincirlerini 3'-5' yerlerinden birbirine bağlar. Fosfodiester kısmında fosfora bağlı serbest bir -OH grubu bulunduğu pH ~2 olan güçlü bir asittir (Lewin 1994).

Genetik bilgi, DNA yapısındaki bazlar tarafından taşınırken; şeker ve fosfat grupları ise DNA'nın yapısının oluşmasında rol oynarlar (Stryer 1995). Nükleik asit dizini şeker fosfat omurgası üzerine oturur. Fosfat monosakkarit omurgası DNA molekülünün dış kısmındadır ve yapısındaki fosfat grupları nedeniyle negatif yük taşırlar. Nükleotitlerin birbirine fosfat bağlarıyla -5'-ucundan 3'-ucuna-bağlanması sonucunda oluşan zincir yapı DNA molekülünün primer (birincil) yapısını oluşturmaktadır (Şekil 2.8).

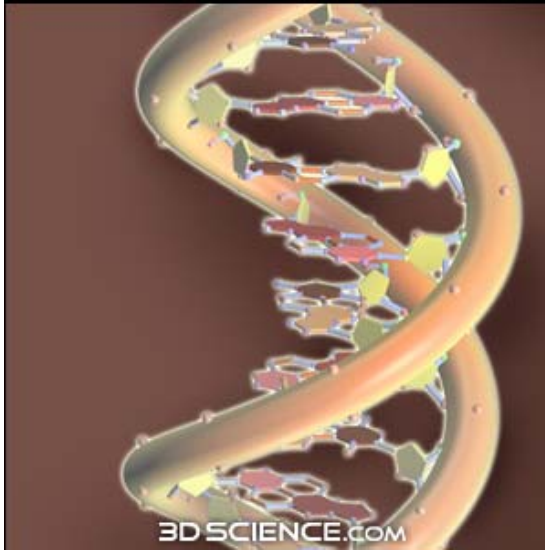
DNA ikincil yapısı primidin ve pürin bazları arasında gerçekleşen düzlemsel hidrojen bağlarıyla oluşur. A ile T iki hidrojen bağı ile, G ile C üç hidrojen bağıyla birbirlerine bağlanırlar (A=T, G≡C). İki zincirin birbirlerine hidrojen bağıyla bağlanmaları sonucunda ortaya çıkan yapıya ise DNA'nın sekonder (ikincil) yapısı denir (Şekil 2.9). DNA'nın tersiyer yapısı sarmal yapının ortaya çıkmasıdır. Bu yapıda DNA molekülü sağa ve sola kıvrılarak üç boyutlu yapısını oluşturur (Şekil 2.10).



Şekil 2.8 DNA'nın birincil yapısı



Şekil 2.9 DNA'nın ikincil yapısı



Şekil 2.10 DNA'nın üç boyutlu yapısı

2.6.2 DNA yapısı ve fonksiyonu

Çift helis DNA, çift sarmallı yapıda polimerik bir makromoleküldür. DNA ipliksi molekülün temel birimi bir organik -adenin(A), sitozin (C), guanin (G) veya timin (T)-içeren nükleotittir. Bazın, deoksiriboz şekerinin 1'-karbon atomuna, fosfat grubunun da deoksiriboz şekerinin 5'-karbon atomuna bağlanmasıyla DNA molekülünün monomerik birimi nükleotit oluşur. Bir nükleotit deoksiriboz şekerinin 3'-hidroksil gruplarının ve

komşu nükleotitin 5'-fosfat gruplarının fosfodiester bağları oluşturması ile binlerce nükleotitten oluşan birincil yapıdaki ipliksi DNA makromolekülü oluşur. İpliksi DNA molekülü üzerinde bir nükleotit sarmal DNA'da karşıt ipliksi DNA makromolekülü üzerinde karşısında bulunacak nükleotiti belirler; çünkü dört baz (A, C, G ve T) iki spesifik eşleşmiş çift oluşturabilir: adenin (A) yalnız timin (T) ile (A=T), ve guanin (G)'de yalnız sitozin (C) ile (G=C) eşleşebilir. DNA'daki adenin miktarı timin miktarına, guanin miktarı da sitozin miktarına eşittir. Ancak toplam A+T miktarının, toplam C+G miktarına oranı her tür mikroorganizma için farklıdır. DNA'nın bileşimi onun G+C miktarı ile tanımlanabilir. Bu, farklı türler için %26-%74 aralığında değişir. Replikasyon olarak adlandırılan DNA'nın enzimatik sentezi sırasında, mevcut her DNA ipliği bir kalıp DNA görevi yüklenerek yeni bir ipliksi makromolekülün oluşmasını sağlar. Adenin ile timin ve guanin ile sitozin baz-eşleşme koşulu yeni sentezlenen ipliksi molekülün nükleotit dizininin doğru olmasını sağlar. DNA replikasyonu prosesi süresince, her nükleotit dizinine uygun olarak enzimatik tepkime ile -uzayan DNA ipliksi polimer molekülünün- deoksiriboz 3'-hidroksil grubu gelen nükleotitin 5'-fosfat grubuna bağlanır. Çift helis DNA molekülünün iki ipliksi molekülü zıt yönlerde (antiparalel) gider; böylece DNA polimerinin bir ucunda 3'-hidroksil grubu ve diğer ucunda ise 5'-fosfat grubu bulunur. Çift sarmal yapıdaki DNA molekülünün uzunluğu genellikle eşleşmiş nükleotitlerin sayısı ile tanımlanır; kısaca baz çiftleri sayısıdır. Bir baz-çifti mertebesi için 'b', binler mertebesi için 'kb', milyon mertebesinde için 'Mb' megabaz çiftleri sayısı uzunluk birimi olarak kullanılır. Bir organizmanın yapısının oluşması ve biyokimyasal fonksiyonları, DNA'da kodlanmış bulunan bilgiye dayanır. Genetik bilginin özgün birimlerine 'GEN' denir. DNA'daki bilgi içeriği nükleotitlerin özgün dizinine bağlıdır. Herhangi bir gen otomatik olarak fonksiyon gösteremez, fonksiyonunu göstermesi veya pertürbe edilmesi için hücre bileşenleri tarafından bilgilendirilmelidir. Her gen kararlı bir yapıya sahiptir ve dışarıdan bir etki geldiği takdirde etkilerden dolayı değişimler olabilir. Gen dizininde meydana gelen değişikliklere mutasyon denir. Mutasyon genetik bilgi yapısındaki bilgi değişimine neden olur (Lewin 1994).

Mikroorganizmaların ve ökaryotik hücrelerin DNA büyüklükleri Çizelge 2.9'da verilmiştir. Bakterilerde ve yüksek organizmalarda genetik bilgiyi bir jenerasyondan

Çizelge 2.9 DNA molekül büyüklükleri

Polimer	Molekül çapı, D
DNA (Mikroorganizma)	20 Å
DNA (Yüksek organizma)*	110 Å
DNA polimeraz	200 Å
RNA polimeraz	100 Å
Protein (50.000 dalton)	50 Å

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

diğer bir jenerasyona çift-sarmal yapıdaki DNA taşır (dsDNA). Bazı bakteriyel virüslerde ise genetik bilgi tek DNA (ssDNA) dizini ile taşınır (Lewin 1994).

2.6.3 Mikro-reaksiyon mühendisliği ve mikro-ayırma İşlemleri

Genetik mühendisliği ile ilgili tekniklerde, tepkimeler ng mertebesinde DNA ve girdiler $V=20-50\mu\text{L}$ tepkime karışımı kullanılarak mikro-reaktörlerde yapılır. Tepkime sonrası DNA parçaları tepkime karışımından mikro-ayırma işlemleri ile (spesifik adsorpsiyon, iyon değişimi, ekstraksiyon, çöktürme vd) ayrılır. DNA'nın kimyasal yapısının aydınlatılması ve hücre içindeki biyokimyasal tepkime koşullarının bulunmasıyla, birçok tepkimeyi hücre-dışında reaksiyon mühendisliği teknikleri kullanılarak mikro-reaktörlerde gerçekleştirmek için geliştirilen yöntemler moleküler biyoteknolojide hızlı gelişmenin temelini oluşturmuştur. Bir DNA molekülünü kimyasal olarak “DNA Sentezleyici” veya “Gen Makinası” adı verilen cihazlarla standart olarak sentezlemek, DNA Dizin Analiz Cihazıyla gen/DNA dizinini analizlemek, Polimeraz Zincir Tepkimesiyle (PCR) gen sentezleyerek derişimini artırmak mikro-reaksiyon mühendisliği prensiplerine uygun olarak geliştirilen mikro-reaktör sistemlerinde gerçekleştirilir (Çalık 1998).

a. DNA'nın kimyasal sentezi: DNA sentezleyicide sentez biyokimyasal tepkimeler ile değil kimyasal bir proses ile, DNA'nın 5'-hidroksil ucundan başlayarak nükleotitlerin

sırayla bağlanması prensibiyle, tüm tepkimeler kontrollü gözenekli cam (KGC/CPG) ile dolgulu bir tek kolonda, kalma süresi farklı tepkimelerin ardışık olarak yapılmasıyla gerçekleştirilir. Geliştirilen dolgulu kolon mikro-reaktör sisteminde ardışık tepkimeler ve tepkimeyi izleyen yıkama işlemleri bilgisayar kontrollü olarak yapılır. Kolondaki tepkime öncesinde adenin, guanin ve sitozin amino grupları sırasıyla benzoil, izobütiril ve tekrar benzoil grupları eklenerek türevleri yapılır ve DNA zincirinin oluşması için yapılan tepkime sırasında yan-ürün vermeleri önlenir (timinin amino grubu olmadığından türevi yapılamaz). DNA molekülü hangi uzunlukta sentezlenecekse herbir ardışık tepkime için girdiler kolona pompalanır; tepkimeden sonra yıkama ile tepkimeye girmeyenler uzaklaştırılır ve ikinci basamak tepkimeye geçilir. Nükleositler, KGC-silisyum gruplarına bağlı hidroksil gruplarına bağlanan, ara molekül (spacer) adı verilen ucunda birinci nükleositin 3'-ucundan bağ yapabileceği fonksiyonel grup bulunan taşıyıcı pellet üzerinde, ardışık tepkimelerle istenen dizinde DNA zincirinin oluşması için sırasıyla tepkimeye sokulur (Glick and Pasternak 1994).

b. Gen dizininin belirlenmesi: DNA dizini iki yöntemle belirlenebilir:

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

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

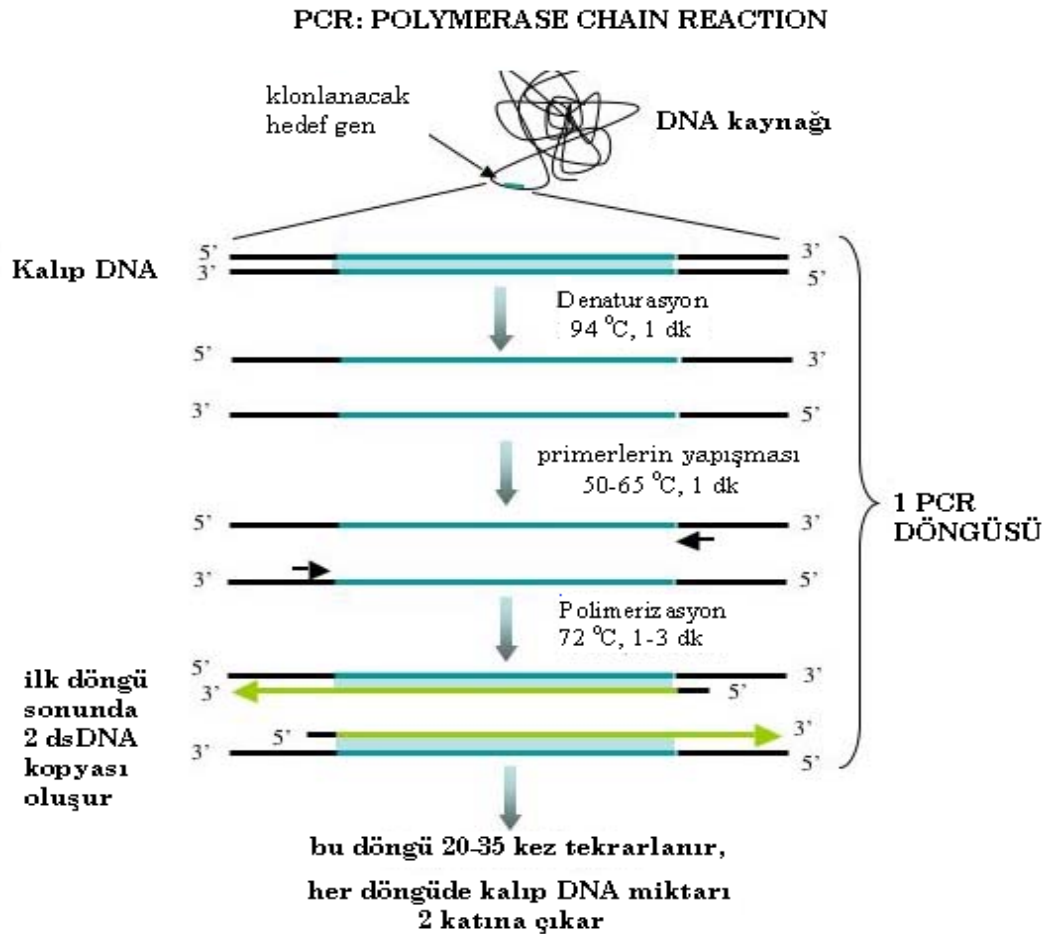
konuma sahip değildir. Pratikte her bir tepkime kabına dört tür dNTP' de konur, ancak ddNTP'lerden sadece bir tanesi tepkime ortamına eklenir. Örneğin; dört dNTP ve ddATP'nin bulunduğu bir tepkime kabında, DNA dizininin sentezi, polimer her ddATP ile karşılaştığında duracaktır. Ortamda hem ddATP hem de dATP bulunduğu için iki nükleotit aynı yer için yarışacaklar ve tepkimeler sonunda değişik uzunlukta olan -hepsinin sonu ddATP ile biten- polimer zincirleri sentezlenebilecektir. Bu tepkime ddATP ile yapıldığı gibi diğer ddNTP-ddCTP, ddGTP, ddTTP- ile farklı tepkime kaplarında yapıp agaroz jelde elektroforetik ayırma ile ayırıldıktan sonra polimerin büyüklüğüne ve son nükleotit bazına bakılarak dizin tayin edilebilmektedir. Günümüzde ise her bir ddNTP farklı bir floresans madde ile işaretlenmekte ve veriler de lazer tarayıcısı ve bilgisayarlar tarafından güvenle işlenebilmektedir (Watson *et al.* 1992).

c. Polimeraz zincir tepkimesiyle (PCR) gen derişiminin artırılması: Polimeraz zincir tepkimesi (PCR: Polymerase Chain Reaction) spesifik bir DNA'nın belirli uzunluktaki bir hedef bölgesinin dizinini (kalıp) hücre dışında yüksek derişimde çoğaltmak için etkili bir yöntemdir. Hedef DNA dizininin derişimi, PCR tepkimesi ile her döngüsü üç basamaktan oluşan çok sayıda (30-60 döngü) ardışık döngü ile üstel olarak artırılır. PCR ile gen derişiminin artırılmasının temeli DNA polimeraz enzimi ile ssDNA'nın kalıp olarak kullanılmasıyla DNA parçasının derişiminin artırılmasıdır. PCR ile hedef genin derişiminin artırılabilmesi için hedef genin her iki ucundaki DNA dizininin tamamlayıcısı olan, uygun koşullarda hedef ssDNA'nın uçlarına bağlanabilen, 3'-hidroksil uçlarından sentezin başlamasını ve devam etmesini sağlayan ve klonlama için uygun restriksiyon enzim konumlarını içeren yaklaşık 20-30 nükleotitten oluşan iki sentetik oligonükleotit primer (ileri primer ve geri primer) tasarlanır (Şekil 2.11). Birbirinden ısı etkisiyle ayrılmış iki DNA zinciri de -primerler yardımıyla- çoğaltılması sırasında kalıp olarak kullanılabilir. Bir PCR prosesindeki her döngü üç önemli basamaktan oluşmaktadır (Watson 1992). Bunlar:

1. dsDNA'dan ssDNA oluşması: PCR sisteminde ilk basamak, tepkime karışımının sıcaklığının 94°C'ye çıkarılmasıyla dsDNA'dan ssDNA oluştuğu basamaktır. Hedef DNA'ya ek olarak tepkime kabında primerler, dört dNTP ve Taq DNA polimeraz

enzimi de bulunmaktadır. Sıcaklık 94°C'ye çıkarıldıktan sonra tepkime kabı 1dk bu sıcaklıkta bekletilir.

2. Primerlerin bağlanması: İkinci basamakta, sıcaklık 94°C'den primerlerin yapışma sıcaklığına (~50-60°C) düşürülür. Böylece primerler hedef DNA üzerindeki spesifik bölgelerine bağlanırlar.
3. DNA sentezi (ds DNA'nın oluşması): Son basamak olan üçüncü basamakta, sıcaklık *Taq* DNA polimerazın katalitik fonksiyonu için optimum olan 72°C'ye çıkartılır ve böylece herbir primerin 3'-hidroksil grubundan DNA sentezi başlar. DNA sentezinin tamamlanması için gerekli süre hedef DNA'nın büyüklüğüne (1dk/kb) bağlı olarak değişir (Sambrook and Russell 2001).



Şekil 2.11 PCR tepkimesiyle gen derişiminin artırılması.

ç. Gen derişiminin ölçümü

Gen derişimi;

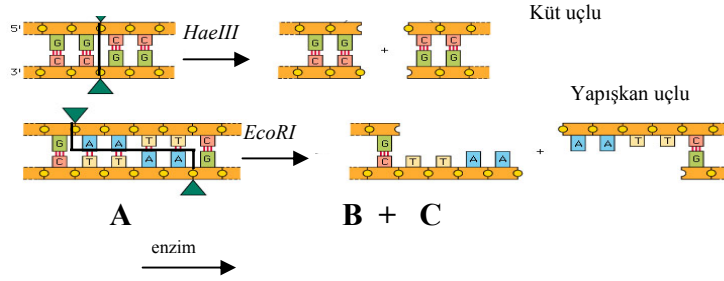
1. Jel elektroforetik, ve
2. UV spektrofotometrik yöntemlerle belirlenebilir.

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

d. Restriksiyon enzimleri ve seçimi: Belli bir gen dizininden hedef DNA parçasının ayrılmasını sağlamak üzere kullanılan yöntem DNA moleküllerinin uygun restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesikli mikro-reaktörlerde enzimatik tepkimelerle kesilmesidir. Bakteriler tarafından yabancı DNA'ları yok etmek için sentezlenen bu enzimlerin diğer endonükleazlardan en önemli farkları DNA'da daima belli hedef dizinleri seçebilmeleri ve hep aynı dizinde özgül ve özgün kesme yapabilmeleridir. Etkilerine göre üç farklı restriksiyon enzim sınıfı bulunmaktadır. Tüm endonükleaz enzimleri, nükleik asitler arasındaki fosfodiester bağlarını keserler. Bunlardan endonükleaz enzimi II grubunda olanlar gen klonlamasında kullanılmaktadır. Bu enzimler DNA'nın genellikle 4 ile 8 adet baz içeren kısmını seçerler ve hedef dizini tanıyarak kesme yaparlar. Spesifik DNA'ları kesen 150'den fazla endonükleaz enzimi izole edilmiş durumdadır (Çalık 1998). Yaptıkları kesme biçimine göre küt (blunt) ya da yapışkan (sticky) uçlu DNA parçaları oluşur, bazı restriksiyon enzimleri ve kesme biçimleri Çizelge 2.10'da gösterilmiştir.

Çizelge 2.10 Restriksiyon enzimlerinden bazılarının izole edildikleri mikroorganizmalar, hedef dizinler ve kesim biçimi

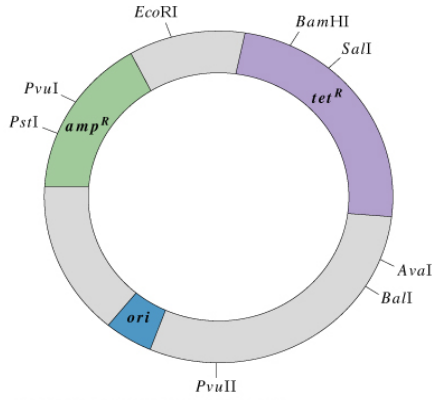
Enzim	Hedef dizin	Mikroorganizma
TaqI	5' TCGA 3' 3' AGCT 5'	<i>Thermus aquaticus</i> YTI
RsaI	5' GTAC 3' 3' CATG 5'	<i>Rhodospseudomonas sphaeroides</i>
Sau3AI	5' GATC 3' 3' CTAG 5'	<i>Staphylococcus aureus</i> 3A
EcoRI	5' GAATTC 3' 3' CTTAAG 5'	<i>Escherichia coli</i>
BamHI	5' GATCC 3' 3' CTAGG 5'	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H.
HindIII	5' AAGCTT 3' 3' TTCGAA 5'	<i>Haemophilus influenzae</i>
KpnI	5' GGTACC 3' 3' CCATGG 5'	<i>Klebsiella pneumoniae</i> OK8
ClaI	5' ATCGAT 3' 3' TAGCTA 5'	<i>Caryophanon latum</i>
BssHII	5' CCGCCG 3' 3' GCGGCC 5'	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
NotI	5' GCGGCCGC 3' 3' CGCCGGCG 5'	<i>Nocardia otitidiscaviarum</i>



Şekil 2.12 Restriksiyon enzimleri ile küt/yapışkan uçlu kesme tepkimesi

Restriksiyon enzimleri spesifik olarak bir nükleotit şekerinin 3'-karbonunun oksijeni ile, komşu nükleotit şekerinin 5'-karbonuna bağlı fosfat grubu arasındaki internükleotit bağı koparır. Restriksiyon enzimleri ile DNA molekülünü kesme işlemi Şekil 2.12'da gösterilmiştir. DNA'nın kesiminde kullanılan restriksiyon enzimlerinin seçimi klonlama prosesinin tasarımında önemli bir basamaktır.

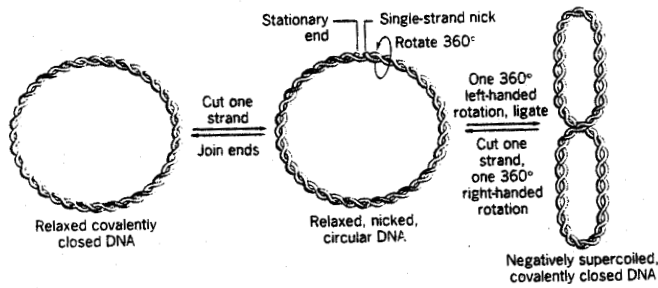
e. Plazmitler ve özellikleri: Bakterilerdeki temel genetik bilgiler kromozomda bulunur. Bakterilerin çoğu büyük DNA kromozomuna ek olarak, bazı özelliklerini genetik kontrol altında tutan, sitoplazma içinde serbest olarak bulunan, kendi kendilerini replike edebilen 1-100kb büyüklüğünde plazmit (vektör) adı verilen dairesel DNA molekülleri içerir (Şekil 2.13). Plazmitler, içinde buldukları konakçı hücre ile uyum içinde yaşarlar. Plazmitlerin en önemli özelliği, bakteri kromozomundan bağımsız olarak replike olabilmeleri ve kendi replikasyonlarını kontrol edebilmeleridir (Kalender 2000). Plazmitlerin büyüklüğü idealde 10kb'ı geçmemelidir. Çünkü büyük DNA moleküllerinin saflaştırma sırasında kırılma olasılığı vardır, ayrıca büyük plazmit molekülleri çok zor manipüle olurlar. Plazmitler genellikle bir veya bir kaç gen taşırlar, ve bu genler konakçı bakterinin belirli karakteristik özellikleri göstermesine neden olurlar. Örneğin; kloramfenikol veya ampisilin gibi antibiyotiklerin toksik derişimlerinde bakterilerin yaşamlarını sürdürebilme kabiliyetleri genellikle bakterilerde bulunan plazmitlerin taşıdığı antibiyotik direnç genleri ile sağlanmaktadır. Plazmitler hücrede sabit ve karakteristik bir kopyalama sayısında muhafaza edilirler. Yani bu sayı nesilden nesile sabit olarak



Şekil 2.13 Plazmitlerin (vektörlerin) genel yapıları

kalır. Kopyalama sayısı plazmitlerde bulunan genler tarafından belirlenir fakat konakçı hücre ve çoğalma koşullarından etkilenir (Kalender 2000).

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



Şekil 2.14 Hücrede bulunan plazmit şekilleri

Aşağıda verilen 4 grup plazmit diğerlerine oranla daha iyi incelenmiştir (Kalender 2000):

1. F plazmidi: F plazmit ilk keşfedilen plazmittir ve çok geniş olarak çalışılmıştır. Bu plazmitler konjugasyon ile bir mikroorganizmadan diğer bir mikroorganizmaya kendilerini transfer edebilmeleri nedeniyle önemlidir.

2. R plazmitleri: Antibiyotiklere karşı direnç özelliğini yöneten genleri içeren plazmitlerdir. Bunu taşıyan bir bakteri hangi antibiyotiğe karşı dirençli ise o ortamda rahatlıkla yaşayabilir. Bir plazmit birden fazla antibiyotiğe karşı dirençli olabilir.

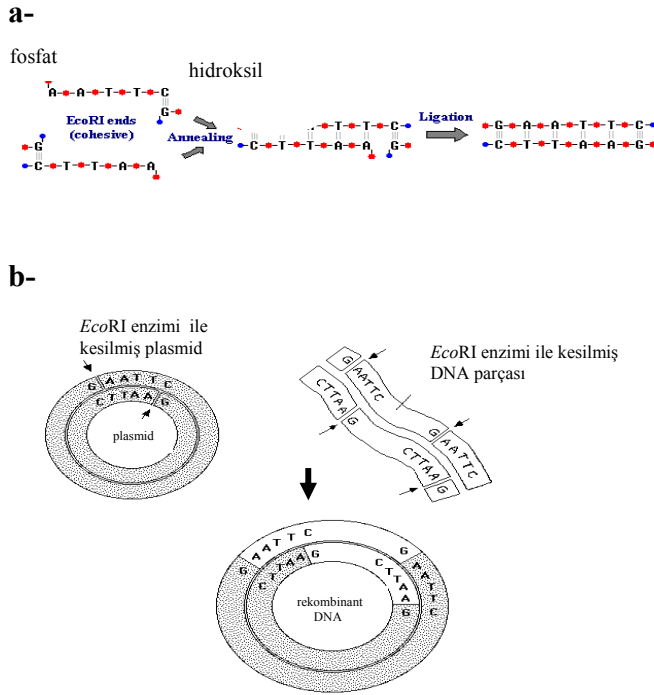
3. Col plazmitleri: Col plazmitleri bakterilerde "colicin" yapımını yöneten genetik bilgiyi taşıyan plazmitlerdir. Colicinler, değişik bakteri türleri tarafından salgılanan ve genellikle aynı türün diğer elemanlarına öldürücü etkisi olan antibiyotik benzeri maddelerdir. Değişik bakteri türleri tarafından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

4. Rekombinant plazmitler: Bu plazmitler, doğal olarak iki veya daha fazla plazmitten türetilen parçaların yeniden birleştirilmesi ile yapılan hibrid plazmitlerdir. Bunlar yaygın olarak klonlama vektörleri olarak kullanılır (Kalender 2000).

f. Klonlama : Ligasyon tepkimesi: Klonlama işlemi, mikro-reaktörlerde sıvı ortamda Taq DNA polimeraz enzimi ile DNA molekülleri arasında fosfodiester bağı oluşturularak gerçekleştirilir (Şekil 2.15). Bu tepkimenin oluşması için ortamda aynı restriksiyon enzimleri ile kesilmiş -aynı uçlara sahip- plazmit DNA ve klonlanmak istenen genin bulunması gerekmektedir. Ligasyon tepkimesi, genetik mühendisliği teknikleri içinde kısıtlayıcı basamağı oluşturmakta, reaksiyon mühendisliği prensipleri ile tepkime koşullarının geliştirilmesi klonlama prosesinin düşük olan başarı olasılığını yükseltebilmektedir. Ligasyon tepkimesi sonunda oluşan ürünler lineer ve gevşemiş (relaxed) plazmit oldukları için bunların transformasyonu süperheliks (supercoiled) plazmide kıyasla daha zor olur. Ligasyon tepkimesi sonunda elde edilen ürünler gen

transfer teknikleri ile uygun konak hücelere transfer edilirler (Çalık 1998, Bloom *et al.* 1996).

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



Şekil 2.15 Ligasyon tepkimesi

g. Genin hücreye transferi: Bakteriler sadece laboratuvar koşullarında değil, doğada da genetik yapılarını değiştirirler. Bakterilere plazmit transferi aşığıdaki üç mekanizma ile gerçekleşmektedir. Bunlar;

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

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

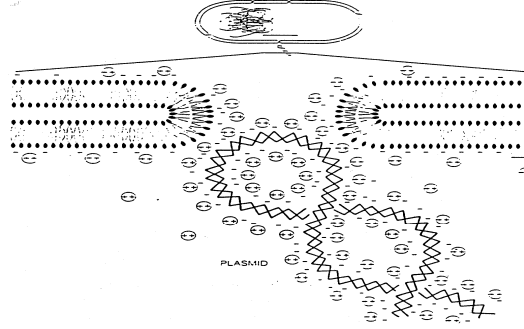
Transformasyon yöntemi genetik çalışmalarda en çok kullanılan yöntemler grubudur. Bu yöntemde bakteri hücreleri DNA molekülünü içine alırlar (Lewin 1994). Dört farklı transformasyon yöntemi vardır. Bunlar;

- i. Doğal aktarım,
- ii. İndüklenmiş aktarım,
- iii. Protoplast transformasyonu, ve
- iv. Elektroporasyondur.

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

İndüklenmiş aktarım yönteminde bakteri hücreleri önışlemlerden geçirildikten sonra DNA transferi yapılır (Şekil 2.16). Bu yöntem ile ilgili farklı protokoller bulunmaktadır. Bunlardan en uygunu ve en çok kullanılanı, *E.coli* hücrelerinin CaCl₂ ile yıkanması ve +4°C'da bekletildikten sonra plazmit DNA ile aynı ortama konulup, 42°C'da 1-2 dakika bekletilerek ısı şokuyla plazmit DNA'nın hücreye transferidir. Transfer yapıldıktan sonra

hücreler katı ortamda uygun bir seçici antibiyotik kullanılarak çoğaltılırlar. Bu yöntemde hücrenin, istenen DNA molekülünü hangi mekanizma ile içine aldığı halen bilinmemektedir.



Şekil 2.16 İnd

plazmidin durumu

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

h. Geni taşıyan plazmitlerin aranması: Transformasyon işleminden sonra, istenen geni taşıyan hücrelerin uygun yöntemlerle seçimi gerekir. Transformasyon sonunda ortamda çok fazla koloni bulunacağı için seçici işaretleyici (selective marker) gereklidir. En yaygın yöntem antibiyotiklere karşı direnç sağlayabilecek gen taşıyan plazmitlerin klonlamada kullanılmasıdır. *E.coli* ile yapılan çalışmalarda genellikle ampisilini etkisiz hale getirecek geni -amp^r- taşıyan plazmitler tercih edilmektedir. Transformasyon işleminden sonra koloniler seçici işaretleyici görevini yapacak antibiyotiği içeren ortamda çoğaltılırlar.

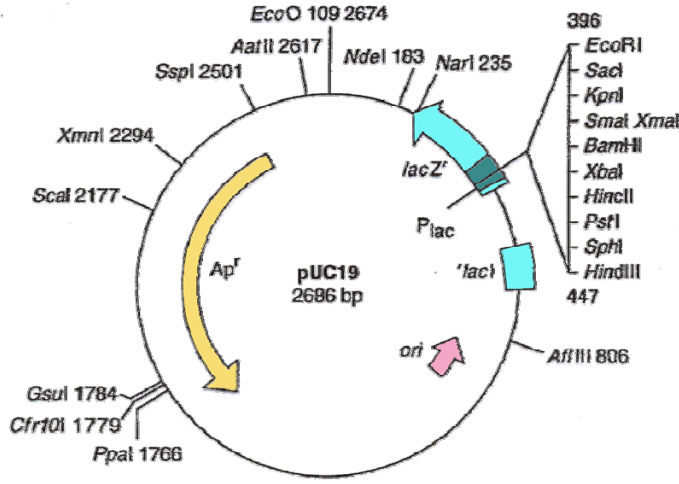
Plazmidi taşıyan hücrelerin hepsi bu ortamda yaşama kapasitesine sahiptir. Antibiyotik içeren ortamda yaşayabilen hücrelerin hepsi klonlamada kullanılan plazmidi taşımalarına rağmen klonlanması amaçlanan geni taşıma olasılıkları çok düşüktür. Kontrol amacı ile her bir hücre tekrar çoğaltılır ve hücrelerden plazmit izolasyonu yapıldıktan sonra plazmitler uygun restriksiyon enzimleri ile kesilerek istenen geni taşıyıp taşımadıkları kontrol edilir.

Plazmidin özelliklerine bağlı olarak geni taşıyan plazmidi seçme yöntemleri de değişir. Diğer bir yöntem de iki antibiyotiğe karşı direnç sağlayan plazmit kullanımudur. Bu yöntemde klonlanmak istenen gen, antibiyotiğe karşı direnç sağlayan genlerden birini pertürbe edecek şekilde klonlanır. İstenen geni taşıyan mikroorganizma ise aşağıdaki yöntemle seçilir:

1. Transformasyondan sonra hücreler, klonlamadan etkilenmemiş antibiyotiği içeren ortamda çoğaltılırlar.
2. İkinci aşamada, bu hücreler iki ayrı ortamda çoğaltılırlar. Birinci ortam geni pertürbe edilen antibiyotiği içerir, ikinci ortam ise klonlamadan etkilenmemiş genin antibiyotiğini içerir.
3. Birinci ortamda çoğalmayan, ikinci ortamda çoğalabilen hücrelere klonlama gerçekleşmiştir. Çünkü birinci antibiyotikli ortamda hücrenin çoğalmaması antibiyotiği etkisiz hale getirecek genin fonksiyon göstermemesi demektir. Bu durum antibiyotiği etkisiz hale getiren genin içine bir başka -yanlış- nükleik asit dizininin girmesi ile mümkündür. Doğru koloniyi seçmek için -bir önceki önceki yöntemde olduğu gibi- alternatif her hücre tekrar çoğaltılır ve hücrelerden plazmit izolasyonu yapıldıktan sonra plazmitler uygun restriksiyon enzimleri ile kesilerek istenen geni taşıyıp-taşımadıkları kontrol edilir.

Klonlanmış plazmidi taşıyan koloninin seçiminde en çok kullanılan yöntemlerden biri, *lacZ* genini taşıyan plazmitlerin kullanımınıdır. Genin ürettiği β -galaktosidaz enziminin galaktozu parçalama fonksiyonundan yararlanılmaktadır. Bu yöntemde galaktozun analogu X-gal (5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktosid) substrat olarak kullanılmaktadır. Plazmit tarafından β -galaktosidaz üretilip ve substrat hidroliz edildiğinde hücrelerin rengi bu substrat analogunun kromatografik özelliklerinden dolayı mavi olmaktadır. *lacZ* geni, gen yapısına herhangi bir nükleik asit dizininin sokulmasıyla pertürbe edildiğinde β -galaktosidaz enzimi sentezlenemeyeceği ve substrat analogunu parçalayamayacağı için kolonilerin rengi beyaz olacaktır. Bu işaretleyici içeren plazmitlerde *lacZ* geni içinde bir poliklonlama konumu bulunur ve klonlama işlemleri bu bölgeye yapılır. Koloniler bu yöntemle renklerine göre seçilir ve tüm yöntemlerdeki gibi restriksiyon analizleriyle genin varlığı kontrol edilir. Şekil 2.17’de pUC19 plazmidi gösterilmiştir. Bu vektör, hem ampisilin direnç genini taşımakta hem de *lacZ* genini taşımaktadır. Bu vektöre benzer çok sayıda vektör temin edilebilir.

Verimi en yüksek olan yöntem ise koloni hibridizasyon (hybridisation) yöntemidir. Bu yöntemde radyoaktif izotop içeren dNTP’ler kullanılarak, klonlanması istenen gen radyoaktif olarak işaretlenerek prop hazırlanır. Prop hazırlamak için ssDNA kalıp olarak kullanılır. ssDNA’nın karşılık gelen zinciri klenow enzimi ile oluşturulur. Ortamdaki nükleik asitlerden birisi radyoaktif izotop taşır. Geni taşıyan plazmidi içeren mikroorganizmalar nitroselüloz filtreler üzerine adsorplanır ve bu filtre radyoaktif prob ile hibridize edilir ve bir sonraki aşamada ya X-ray filmine radyoaktif maddenin ışınları aktarılır veya özel bir görüntü analiz (Molecular Imager) cihazında radyoaktif ışınla oluşan sinyalden yararlanarak klonlanmış geni içeren plazmidin aktarıldığı mikroorganizma seçilir (Sambrook *et al.* 1995).



Şekil 2.17 pUC19 plazmid

2.7 İnsan Büyüme Hormonu (hGH)

Hormonlar insan vücudunun düzenleyici birimleridir. Hormonlar, protein ve yağlar gibi belirli bir gruba girmeyen mesaj taşıyıcı özel maddelerdir. Kan yoluyla vücudun en uzak bölgesine kadar taşınırlar. Her hormonun vücutta etkilediği hücre, doku, organ farklıdır. Kandaki miktarları az olmasına rağmen biyolojik etkileri oldukça yüksektir. Hormonların salgılanması ve parçalanması enzimler tarafından olmaktadır. Sinir sistemi ile birlikte koordinasyon ve bütünleştirme görevini yaparlar. Vücudun iç dengesinin kurulmasında (homeostaside) görev alırlar.

Somatotropin olarak da bilinen insan büyüme hormonu (hGH, human Growth Hormone), beynin ön lobunda bulunan hipofiz bezlerindeki somatotropik hücreler tarafından sentezlenir. hGH özellikle uzun kemiklerin ve kasların büyümesini kontrol eder. Bu hormon 191 amino asitten meydana gelmiş bir polipeptittir. Büyüme hormonu, vücudun tüm olarak büyümesini doğrudan değil, dolaylı olarak etkiler (Pekin 1980). İnsan büyüme hormonunun yapısı, sentezi, fizyolojik ve metabolik etkileri ile üretimi ve kullanım onayı aşağıda incelenmiştir.

2.7.1 Yapısı ve doğal sentezi

22 kDa molekül ağırlığında, küresel bir protein olan hGH'yi kodlayan gen DNA'da kromozom 17 üzerinde bulunmaktadır. Makromolekölün polimerik yapısında 35, 165, 182 ve 189 numaralı konumlarda bulunan dört tane sistein molekölü hGH'nin aktif moleköl konformasyonundaki iki disülfid bağıını oluşturmaktadırlar (Cys³⁵-Cys¹⁶⁵ ve Cys¹⁸²-Cys¹⁸⁹). Bu yapı Şekil 2.18'de şematik olarak gösterilmiştir. Tek bir polipeptit zincirinden oluşan hGH'nin ikincil yapısı α -heliks şeklindedir ve izoelektrik noktası pI= 5.1'dir (Goeddel *et al.* 1979).

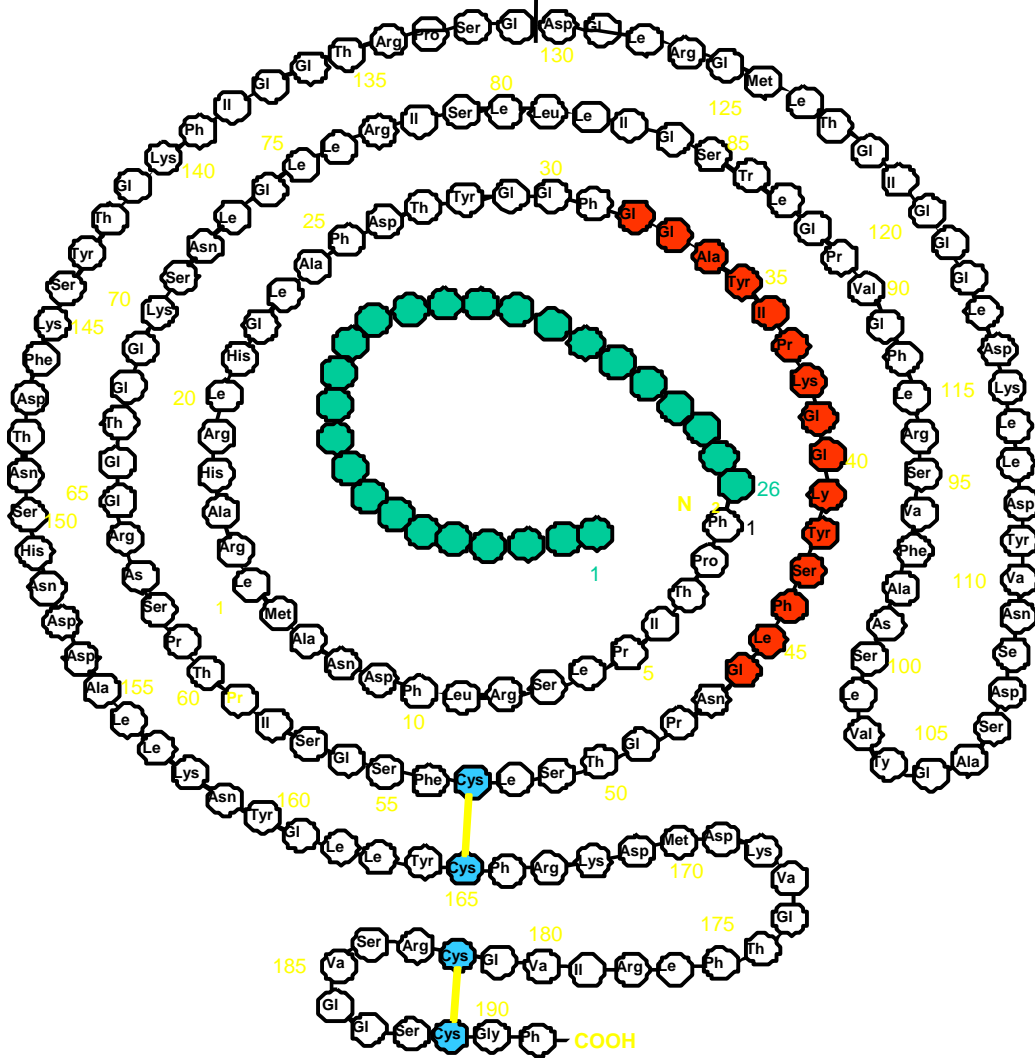
Kromozom 17 üzerinde beş tane büyüme hormon geni bulunmaktadır. Bunlardan ikisi- hGH-N (normal) ve hGH-V (varyant)- birbirine benzer yapıya sahiptir. Aralarındaki farklılık farklı olan 13 amino asitin polipeptit zincirinde farklı dağılmasından ileri gelmektedir. hGH-N geni hipofiz bezinde, hGH-V geni ise plasentada ekspres edilmektedir. hGH-V geninin 22kDa, 25kDa ve 26kDa olmak üzere üç formu mevcuttur. hGH-N geninin ise 22kDa ve 20kDa'lık iki izoformu vardır. Çocuklarda ve yetişkinlerde hGH'nin sirküle eden formu hipofiz bezlerinde üretilen hGH-N gen ürünüdür. Hipofizdeki toplam hGH'nin yaklaşık %90'nı 22kDa'lık, %10'u 20kDa'lık formu oluşturmaktadır. 22kDa'lık formundaki 32-46 arası amino asitler 20kDa'lık formunda yoktur. Sağlıklı büyümenin gerçekleşebilmesi için metabolik ve fizyolojik açıdan 22kDa'lık hGH formu gereklidir. 20kDa'lık formun insanda büyüme üzerindeki etkileri bilinmemektedir.

Büyüme hormonunun salgılanması iki hipotalamus hormonunun -growth hormone-releasing hormone (GHRH) ve somatostatin (GHIF) - kontrolünde gerçekleşmektedir. GHRH büyüme hormonunu stimüle edici; GHIF ise büyüme homonunu inhibe edici etkiye sahiptir.

Fizyolojik ve metabolik etkileri

hGH'nin temel fonksiyonu iskelet ve yumuşak dokunun büyümesini sağlamaktır. Büyüme birbiri ile ilgili bir kısım metabolik olaylar ve organizmanın beslenme durumu ile ilgili olan

kompleks bir prostestir ve çeşitli hormonların koordineli olarak çalışmasını gerektirir. hGH dokular üzerinde direkt ve indirek olmak üzere iki ayrı etki mekanizmasına sahiptir. Direkt etkileri hGH'nin hedef hücreleri üzerinde bulunan reseptörüne bağlanarak gerçekleştirmektedir. İndirek etkileri ise karaciğer ve diğer bazı dokulardan hGH'ye cevap olarak salgılanan İnsulin-like growth factor-1 (IGF-1) hormonu aracılığıyla gerçekleşir. Büyüme hormonunun büyüme destekleyici etkilerinin çoğu, onun hedef hücreleri üzerinde etki gösteren IGF-1'e dayanmaktadır. Salgılanan IGF-1 hormonu; kıkırdak hücrelerinin çoğalmalarını stimüle ederek kemiklerin, kas hücrelerinin çoğalmalarını ve farklılaşmasını sağlayarak kasların büyümesinde rol almaktadır.



Şekil 2.18 22kDa'luk hGH'nin amino asit dizini

Büyüme hormonu, amino asit katabolizmasını geciktirip bunların vücut proteinlerine çevrilmesini hızlandırarak protein metabolizmasını; trigliseritlerin parçalanmasını ve oksidasyonunu stimüle ederek yağ kullanımının artırılmasıyla yağ metabolizmasını; anti-insülin aktiviteye sahip olması sayesinde de karbonhidrat metabolizmasını etkilemektedir. Gelişme çağında yüksek seviyede salgılanan hormonun vücuttaki miktarı yaşlanma ile azalmaktadır. hGH'nin en yoğun salgılandığı periyot derin uykunun başlamasından hemen sonradır.

Başta büyüme geriliği olmak üzere kemik kırıkları, yanık tedavisi, mide kanamaları, yaraların iyileştirilmesi, beslenme yetersizliğinden dolayı adalelerin gelişmemesi gibi pek çok terapatik kullanımı mevcuttur. Kalp-damar hastalıkları, şişmanlık, saçların beyazlaması ve ciltte kırışıklıklar gibi yaşlanma belirtilerinin çoğu yaşlanmayla birlikte büyüme hormonundaki azalmayla ilgilidir. Fazla salgılanması durumunda genç yaştakilerde dev hastalığı (gigantizm) yaşlılarda ise burun, dudak, alın ve kafatasının yumuşak dokularının kalınlaşması, el ve ayak kemiklerini, çene, alın gibi çıkıntı kısımların fazla büyümesi olarak ortaya çıkan akromegaliye neden olmaktadır. Az salgılanması durumunda büyüme gecikmesi (cücelik-dwarfizm) görülmektedir. hGH'nin metabolizma üzerindeki etkilerinden dolayı yaşlanma sürecini yavaşlatılabileceği belirlenmiştir. Bu amaçla 'anti-aging' adı altındaki çalışmalar hız kazanmıştır.

hGH'nin biyolojik ve fizyolojik aktiviteleri ile protein, yağ ve karbonhidrat mekanizması üzerindeki etkileri nedeniyle terapatik protein üretiminde önemli bir yere sahiptir.

2.7.3 Üretimi ve kullanım onayı

1959'dan 1985 yılına kadar insan kadavrasından çıkartılan hipofiz bezinden izole edilmiş olan büyüme hormonu Creutfeldt-jacob hastalığına bağlı ölümler ortaya çıkması sebebiyle genetik mühendisliği teknikleriyle hGH'yi kodlayan genin klonlanmasıyla elde edilen rekombinant hGH'nin biyoteknolojik proseslerle üretimi için araştırmalara hız verilmiştir.

Rekombinant DNA teknolojisindeki gelişmelerle, insan büyüme hormonunu kodlayan gen ilk olarak Goeddel *et al.* (1979) tarafından klonlanmıştır. Bunun üzerine hayvansal formları insanlarda inaktif tek hormon olan hGH'nin, moleküler biyoteknolojik tekniklerle rekombinant üretimi için yapılan endüstriyel biyoteknolojik araştırmalar hız kazanmıştır. 1985'te Genentech (ABD) tarafından Protropin ürün-adı verilerek üretilen ve pazarlanan rekombinant hGH'ye ABD Food and Drug Administration (FDA) tarafından ilk lisans verilmiştir. Doğal hGH 191 amino asitten oluşmaktadır; ancak, Genentech tarafından üretilen hGH N-ucunda metiyonin bulundurmaktadır ve 192 amino asite sahiptir. 1986'da Eli Lilly tarafından 191 amino asitten oluşan rekombinant hGH Humatrope ürün-adiyla üretilmiş ve farklı bir kimyasal yapıya, sonuç olarak farklı etkilere sahip olduğu için FDA tarafından lisans verilmiştir.

Biyoteknolojik proseslerle hGH üretim ile ilgili ilk çalışmalar konak hücre olarak *E. coli* mikroorganizması ile gerçekleştirilmiştir (Gray *et al.* 1985, Becker *et al.* 1986, Chang *et al.* 1987, Kato *et al.* 1987). Fakat hücre dışına salgılanan hGH'nin doğallığıyla aynı özellikler göstermesi, bu özelliğe sahip *Bacillus* hücrelerinin kullanıldığı çalışmaların hız kazanmasına neden olmuştur (Franchi *et al.* 1991, Kajino *et al.* 1997).

2.8 Biyoproses Karakteristikleri

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

nitelendirildiğinde; ayrık hücreleri dikkate alan yapısal model yaklaşımı, gerçek durumu yansıtırken ortak özelliklere sahip hücrelerin tek bileşen gibi düşünüldüğü modeller ideal bir durumu tanımlarlar. Genel olarak hücre kinetiği proste ulaşılmak istenen temel amaca uygun gerekli anahtar değişkenlere bağlı olarak kullanışlı matematiksel modellerle tanımlanmalıdır (Bailey and Ollis1986).

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

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

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

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

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

Tüketilen substrat başına üretilen hücre veya ürün ise aşıadaki verim katsayıları ile tanımlanabilir:

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

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

Benzer şekilde tüketilen oksijen başına üretilen hücre verimi ise,

(2.6)

$$Y_{x/o} = \frac{r_x}{-r_o}$$

şeklinde tanımlanmıştır.

Farklı verim katsayılarının tanımları birimleri ile birlikte Çizelge 2.11'de verilmiştir. Kesikli biyoteknolojik proseslerde spesifik çoğalma hızı ve verim katsayıları mikroorganizmanın çoğalma hızı ve yaşam fonksiyonlarına bağlı olarak proses boyunca değişim gösterebilecekleri gibi doğal olarak kullanılan karbon kaynağına bağlı olarak da değişebilirler. Çizelge 2.12'de farklı substratlar için bakterilerin verim katsayıları yer almaktadır.

Eğer verim faktörü tanımlanan proses için yaklaşık olarak sabitse, proses süresince hücre ve substrat derişimindeki değişiklikler sadece stokiyometri temel alınarak belirlenebilir. Bu durumda biyoreaktör tasarımından gelen etkiler ihmal edilerek değişkenlerden biri diğeri cinsinden ifade edilebilir. Ancak biyoteknolojik proseslerde verim katsayısının sabit olduğunu kabul etmek, mikroorganizmanın yaşamsal faaliyetleri de göz önüne alındığından mümkün değildir. Bu nedenle proses veriminde mikroorganizmanın çoğalma hızına ve yaşamsal işlevlerine bağlı olarak biyoproses

Çizelge 2.11 Farklı verim katsayılarının tanımları (Blanch and Clark 1997)

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

Çizelge 2.12 Farklı substratlar için bakterilerin verim katsayıları (Bailey and Ollis 1986)

Substrat	$Y_{x/s};$ g hücre (g substrat)⁻¹	$Y_{x/o};$ g hücre (g oksijen)⁻¹
Malat	0.34	1.02
Asetat	0.36	0.70
Glukoz bileşikleri (melas, nişasta, seluloz)	0.51	1.47
Metanol	0.40	0.44
Etanol	0.68	0.61
İzopropanol	0.43	0.23
n-Parafin	1.03	0.50
Metan	0.62	0.20

süresince değişim gözlenir. Bu durumda mikroorganizmanın substrat tüketimini belirlemek için ürün oluşumu ve hücre çoğalması yanında hücrenin yaşam fonksiyonlarının da dikkate alınması gerekir (Bailey and Ollis 1986).

2.9 Biyoreaktör İşletim Parametreleri

2.9.1 Sıcaklık

Biyoproses ortamının sıcaklığı çoğalma hızında etkili olduğu gibi karbon ve enerji kaynaklarının kullanımında da etkilidir; substratlardan hücre ve ürün oluşum verimlerini değiştirebilir. Sıcaklık düşünce daha fazla enerjiye gereksinim olacağı için karbon ve enerji kaynağının verimi de düşer. Ayrıca sıcaklık azaldıkça çoğalma sırasındaki magnezyum, potasyum ve fosfat verimlerinde düşmeler gözlenmiştir. Bazı hallerde biyoproses ortamının sıcaklığı ile birlikte mikroorganizmalardaki yozizlerinde de değişiklikler olduğu gözlenebilmiştir (Pekin 1980). Her mikroorganizmanın çoğalmasının/ürün üretiminin maksimum olduğu bir optimum sıcaklık/sıcaklık aralığı vardır. İstenilen ürünün verimini ve seçimliliğini artırmak için mikroorganizmanın aktif olduğu optimum sıcaklık değerinde

veya aralığında çalışılmalıdır. *E. coli* mikroorganizmaları ile hGH üretiminde Jensen and Carlsen (1990), Byund *et al.* (2000) ve Caston *et al.* (2002) 30 °C’de, Shin *et al.* (1998a-b) ve Tabandeh *et al.* (2004) ise 30 °C’de sıcaklık etkisini incelemeyen, ya da sonuçlarını sunmadan yapılan çalışmışlardır. Süreli yayın literatüründeki tek *Bacillus* türleri ile hGH üretimi araştırmasında Nakayama *et al.* (1988) 30 °C’de sıcaklık etkisini incelemeyen çalışmışlardır.

2.9.2 pH

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

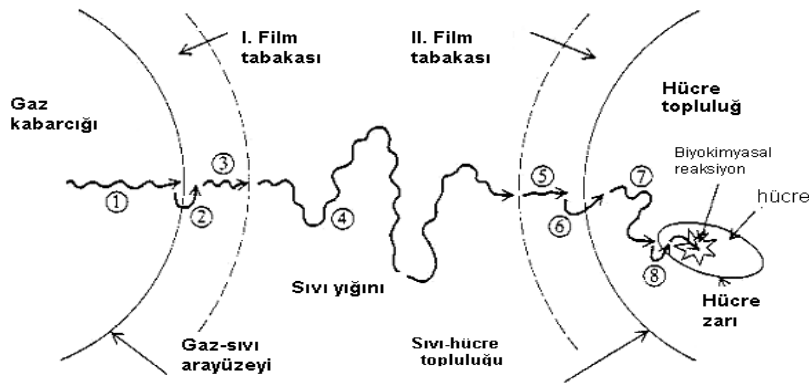
Biyoproses süresince pH değişimi metabolik yolizindeki değişimlerin ve sapmaların önemli bir göstergesidir. Karbonhidratlar, örneğin glukoz kullanıldığında, hücre-içi tepkimelerle oluşan organik asitlerin ve amino asitlerin ortama salgılanmasıyla birlikte ortam pH’ında düşme, ortama salgılanan metabolitlerin tekrar hücreye transferi ve kullanımıyla da artış gözlenir. Ortam pH’ına bağılı olarak hücre-içi tepkimeler ve hızları değiştirdiğinden, biyoteknolojik ürünlerin üretiminde kullanılan mikroorganizmalar, çoğalma ve istenen ürünün üretimi için farklı optimum pH değeri ya da aralığına sahip olabilirler.

Nakayama *et al.* (1988), Jensen and Carlsen (1990), Byund *et al.* (2000) ve Castan *et al.* (2002), Shin *et al.* (1998a-b), Tabandeh *et al.* (2004) *E.coli* ve *Bacillus* türü mikroorganizmalar ile hGH üretimini pH etkisini incelemeyen çalışmışlardır.

2.9.3 Oksijen aktarımı

a. Önemi ve mekanizması: Oksijenin girdi olarak kullanıldığı aerobik proseslerde mikrobiyal hücreler solunum, çoğalma, ürün sentezi gibi metabolik faaliyetlerini sürdürebilmek için temel girdilerden biri olan oksijene ihtiyaç duyarlar. Bu nedenle çoğalma ve üretim ortamındaki çözülmüş oksijen derişimi ve oksijenin aktarım hızı önemlidir. Oksijenin aktarımının eksikliği ya da fazlalığı ürün verimi ve seçimliliğini etkiler. Bir biyoteknolojik proseste oksijen gereksinimi ve aktarımı, mikroorganizma türüyle, üretim ortamının fiziksel özellikleri ile, biyoreaktör ve karıştırıcı konfigürasyonu ile ilgilidir. Karıştırmalı biyoreaktörlerde oksijen aktarımı için oksijen/hava giriş hızı ve karıştırma hızı ile birlikte önemli biyoreaktör işletim parametreleridir. Aerobik üretim proseslerinde mikrobiyal hücrelere oksijenin aktarım hızı, biyolojik dönüşüm hızının belirlenmesinde önemli bir kısıtlayıcı etkidir. Çünkü biyokimyasal reaksiyonların hızları üretim ortamına aktarılan oksijenin aktarım hızına oranla genel olarak daha yüksektir (Bailey and Ollis 1986).

İki film teorisine göre biyoproses ortamındaki bir gaz kabarcığından mikrobiyal hücreye oksijenin aktarımı Şekil 2.19'da görüldüğü gibi sekiz basamakta gerçekleşir (Bailey and Ollis 1986).



Şekil 2.19 İki film teorisine göre bir gaz kabarcığından mikroorganizmaya oksijenin aktarım mekanizması

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

Oksijenin su içerisindeki çözünürlüğü düşüktür. Bu nedenle oksijen aktarımında gaz filminin direnci sıvı film direncine kıyasla ihmal edilebilir düzeydedir. Biyoproses ortamında karıştırma hızının veya havalandırma hızının artırılmasıyla hava kabarcıkları çevresindeki film dirençleri kırılarak oksijenin biyodönüşüm ortamındaki aktarım hızı artırılabilir. Hücre kümeler oluşturmuyorsa altıncı adım ortadan kalkacaktır. Hücreler ara yüzeylere adsorplanma eğiliminde olduklarından çözünmüş oksijen tek bir sıvı film direncini aşmak durumunda kalabilir.

Oksijenin biyoproses ortamındaki çözünme hızı hava kabarcıkları çevresinde yeni filmin oluşma hızı ile kontrol edilir. Eğer biyoproses ortamı iyi bir şekilde karıştırılmıyor ve sıvı faz içinde derişim profilleri önemli ise sıvı yığındaki oksijen aktarım dirençleri de hızı kısıtlar. Bu nedenle sıvı fazdaki tüm oksijen aktarım dirençlerini azaltmak için biyoproses ortamı mekanik ve/veya gaz girişi ile karıştırılmalıdır. Bu durumda, oksijen moleküllerinin biyoproses ortamında mikrobiyal hücrelere taşınımı hem moleküler aktarım hem de konvektif aktarım ile gerçekleşir (Bailey and Ollis 1986).

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

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

Oksijenin sudaki çözünürlüğü düşük olduğundan toplam kütle aktarım katsayısı K_{La} sıvı tarafı kütle aktarım katsayısı k_{La} 'ya eşit olacaktır.

b. Oksijen aktarım karakteristikleri: Aerobik fermentasyon proseslerinde mikrobiyal hücreye oksijen aktarımı, metabolik akıların değişmesi ve metabolik yolizinin etkilenmesi nedeniyle ürün oluşumunu etkiler. Bu nedenle mikroorganizmanın fizyolojisiyle ilgili biyoreaktör performansının belirlenmesi için mikroorganizmanın oksijen ihtiyacının aydınlatılması gerekmektedir. Denklem (2.7) ile tanımlanan gazdan sıvıya oksijen aktarım hızı ise hem gaz hızı ve karıştırma hızıyla belirli fizikokimyasal özelliklere sahip sıvı fazda yaratılan karıştırma etkilerine hem de sıvı fazda oksijenin mikroorganizma tarafından tüketim hızına bağlıdır. Bu nedenle oksijen tüketim hızı ve kütle aktarım katsayısı “oksijen aktarım karakteristikleri” olarak adlandırılırlar.

b.1 Oksijen tüketim hızı: Aerobik biyoreaktörlerin tasarımı çoğunlukla prosesi kontrol eden basamak belirlenerek yapılır. Bu basamak oksijen aktarım hızı, oksijen tüketim hızı ya da başka bir substratın tüketim hızı olabilir. Mümkün olan en yüksek oksijen aktarım ve tüketim hızları belirlenip kıyaslanarak ilgili parametrelerden hangisinin hız kısıtlayıcı olduğu bulunabilir. Maksimum oksijen aktarım hızı $C_o=0$ koşulundaki N_{Aa} değeridir ($N_{Amax}a = k_{La} C_o^*$). Oksijenin maksimum tüketim hızı ise Denklem (2.1) ve (2.6)'dan $OD = C_x \mu_{max} / Y_{x/o}$ olarak bulunur. Burada C_x hücre derişimini, $Y_{x/o}$ tüketilen 1 g oksijene karşılık oluşan hücreyi gösterir. Oksijenin maksimum tüketim hızının, maksimum oksijen aktarım hızına oranı Da sayısını verir, $Da = OD / OTR_{max}$. Oksijen tüketim hızının, maksimum oksijen tüketim hızına oranı ise etkinlik sayısına eşittir, $\eta = r_o / OD$.

Eğer maksimum oksijen aktarım hızı maksimum oksijen tüketim hızından daha büyükse, artan oksijen tüketimi için esas direnç mikrobiyal metabolizmadır ve biyoproses biyokimyasal tepkime ağı kısıtlamalı olur. Bu durumun tersi geçerli ise C_o yaklaşık sıfır ve biyoproses kütle aktarım kısıtlamalı olur. Ara durumlarda prosesi her iki adım da kontrol edebilir. Gerçekte durum yukarıdaki yaklaşımdan çok daha karmaşıktır. Sıvı fazda oksijen derişimi kritik değerinin üzerinde ise hücre metabolizması oksijene doymuş durumdadır ve

solunum zincirinden geçen tüm elektron çiftleri oksijen tarafından alınır. Bu durumda metabolizma içinde başka bir adım prosesin hızını kısıtlayacaktır (Bailey and Ollis 1986).

Pek çok faktör mikroorganizmanın oksijen ihtiyacını etkileyebilir. Biyoprosedeki oksijen tüketim hızı mikroorganizmanın fizyolojik özelliklerine ve ortamdaki karbon kaynağına bağlıdır. Karbon kaynakları içinde glukoz genelde diğer karbonhidratlardan daha hızlı metabolizmaya girer. Örneğin *Penicillium* için gözlenen oksijen ihtiyacı laktoz, sukroz ve glukoz için sırasıyla 4.9, 6.7, 13.4 mol dm⁻³ st⁻¹dir. Oksijen tüketiminin önemli bir kısmını hücre kendini çoğaltmak için kullanırken yaşamsal işlevleri, biyosentez ve ürün oluşumu içindeki oksidasyon tepkimeleri için de oksijen gerekmektedir. Dolayısıyla metabolik stokiyometri yardımıyla çoğalma için oksijen tüketim hızı, substrat tüketim hızıyla doğrudan ilişkilendirilebilir (Bailey and Ollis 1986).

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

b.2 Sıvı-faz kütle aktarım katsayısı: Oksijenin sıvı faz hacımsal kütle aktarım katsayısı (K_{La}), biyoreaktörlerde gaz-sıvı kütle aktarım hızını gösteren önemli bir parametredir. K_{La} , mikroorganizma türüne, fermentasyon ortamının fizikokimyasal özelliklerine, biyoreaktörün ve karıştırma sisteminin tasarımına, karıştırma ve havalandırma hızlarına bağlıdır (Aiba *et al.* 1973). Çözülmüş oksijenin metabolizmaya yeterli hızda aktarılıp aktarılamadığının bilinmesi, oksijen aktarım katsayılarının belirlenmesi ile mümkündür. Rainer (1990) biyolojik ve biyolojik olmayan sistemlerde sıvı faz hacımsal kütle aktarım

katsayısının ($K_L a$) deneysel olarak belirlenmesi için ölçüm yöntemlerini “doğrudan” ve “dolaylı” yöntemler olmak üzere iki grupta sınıflandırmıştır:

1. Doğrudan Ölçüm Yöntemleri

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

2. Dolaylı Ölçüm Yöntemleri

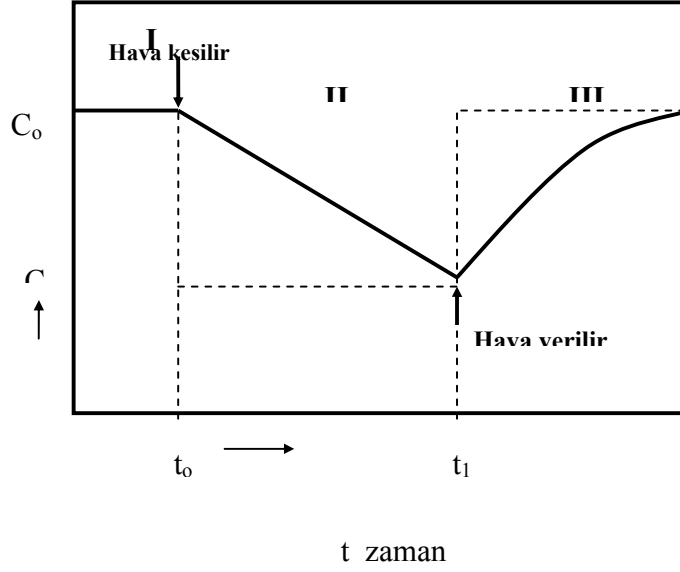
- i. Gaz Çıkış Yöntemi
- ii. Elektrot-Momentum Yöntemi
- iii. Sülfid Oksidasyon Yöntemi
- iv. Glukoz-Oksidaz Yöntemi
- v. CO_2 Yöntemi

1. i. Dinamik yöntem

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

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

Yöntem biyoreaktöre gönderilen havanın kısa süreli olarak kesilmesi ve Şekil 2.20’de görüldüğü gibi, bir oksijen elektrodu ile çözünmüş oksijen derişiminde önce azalmanın; havanın tekrar sisteme verilmesi ile de artışın incelenmesi prensibine dayanmaktadır (Rainer 1990). Havanın kesildiği t_0 anına kadar biyoreaktörde çözünmüş oksijen derişimi yatışkın koşulda C gibi bir değerdedir ve t_1 anında hava yeniden verilmektedir. t_0 Anından t_1 anına kadar zamanla çözünmüş oksijen derişimindeki azalma gözlenir.



Şekil 2.20 Dinamik Yöntem uygulamasında çözünmüş oksijen derişiminin kalma süresi ile derişimi

Burada oksijen aktarımı gerçekleşmediğinden $K_L a(C_o^* - C_o)$ terimi sıfıra eşittir ve Denklem (2.8) Denklem (2.9)'a indirgenir:

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

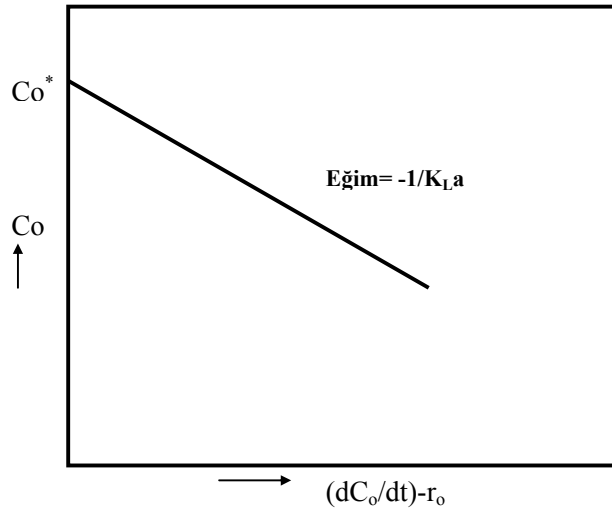
Denklem (2.9)'dan oksijen tüketim hızı $-r_o$; Denklem (2.10)'dan ise birim hücre kütlesi başına oksijen tüketim hızı $-r_o'''$ bulunabilir.

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

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

$$\left\{ \left(\frac{dC_o}{dt} \right) - r_o ; C_o \right\}$$

grafîği elde edilir (Şekil 2.21); grafîğin eğiminden $K_L a$ hesaplanır. Yöntemin bu tez kapsamında uygulandığı "3. MATERYEL VE YÖNTEM" bölümünde verilmiştir.



Şekil 2.21 Dinamik Yöntem ile sıvı faz hacımsal kütle aktarım katsayısının belirlenmesi

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

K_La ; kalma süresi, gaz hızı ve karıştırma hızıyla değişir ve karıştırma hızı arttıkça artar. Biyoprosesin gecikme ve üstel çoğalma evrelerinde sıvı-faz hacımsal kütle aktarım katsayısı, biyoproses periyodlarına bağlı olarak değişim göstermektedir. Biyoproses ortamının reolojik özelliklerinin proses süresince fazla değişmediği koşullarda, K_La 'nın momentum yayınlığının kütle yayınlığına oranı olan Schmidt sayısındaki değişimden etkilenmediği düşünülebilir. Tepkimeli bir sistemde, tepkime ve gaz-sıvı kütle aktarımının birlikte yer aldığı proseslerde kütle aktarımı çok sayıda parametreye bağlı olarak değişebilir. Bunlardan biri tepkime hızının proses süresince değişimi; diğeri ise kütle aktarım alanında bulunan küçük parçacıklardır (mikroorganizma). Bu nedenle mikroorganizmanın bulunduğu ortamda sıvı faz kütle aktarım katsayısının mikroorganizmanın oksijen tüketim hızına, boyutlarına ve derişimine bağlı olarak değişmesi beklenebilir (Çalık *et al.* 1997).

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

2.10 Metabolik Mühendislik

Biyoteknolojik proseslerde üretim kompleks bir tepkime sistemi üzerinden mikro-biyoreaktör olarak görev yapan hücre içerisinde ardışık paralel, çok sayıda tepkime ile gerçekleşmektedir. Hücre içinde meydana gelen çok sayıda biyokimyasal tepkime ve tepkimelerin birbirleri ile olan etkileşimlerini gösteren biyoteknikte yolizlerine *metabolik yolizi* denir. Metabolik mühendislik, istenen ürünün yüksek verimlilik ve seçimlilikte üretimi için genetik mühendisliği teknikleriyle hücre içinde meydana gelen spesifik biyokimyasal tepkimelerin uygun bir şekilde modifikasyonu veya bunlara yeni tepkimelerin eklenmesiyle hücrenin özelliklerinin doğrudan geliştirilmesi olarak tanımlanmaktadır (Stephanopoulos *et al.* 1998). Kısaca; metabolik mühendislik, hedeflenen özel amaca ulaşmak için mühendislik prensipleriyle metabolik tepkime yolizlerinin analizlenmesi ve tasarlanmasıdır (Yang *et al.* 1998). Moleküler biyolojik teknikler, analitik yöntemler ve matematiksel araçlarda son on yılda meydana gelen gelişmelerle endüstriyel- ve medikal-biyoteknolojik amaçlar için metabolik mühendislik yaklaşımının gelişmesine ve bu alan ilgi oluşmasına neden olmuştur (Stephanopoulos 1998). Hücre içerisinde istenen ürün üretiminde hız kısıtlayıcı tepkime(ler) metabolik mühendislik yaklaşımı ile belirlenir. Hız kısıtlayıcı tepkime(ler) belirlendikten sonra, genetik mühendisliği teknikleriyle istenen biyomolekölü (protein, amino asit ve antibiyotik, vitamin vd) üretebilen rekombinant mikroorganizma geliştirilerek verim ve seçimlilik artırılabilir.

Metabolik mühendisliğin bir çok uygulama alanları vardır. Bunlar:

- Proteinler, amino asitler, organik asitler, vitaminler ve antibiyotikler vb. biyokimyasal ürünlerin üretiminde verim ve seçimliliğin artırılmasında,
- Yeni ürünlerin üretiminde (örnek; mikroorganizmalarda ve bitkilerde biyopolimer sentezi),
- Farmasotik ürünlerin üretiminde ara-ürünler olan kiral bileşiklerin üretiminde,
- Medikal alanda, gen-terapi ve beslenme stratejileriyle hastalıkların kontrolü için hedeflerin belirlenmesi ve tüm organ ve dokuların metabolizmalarının analizidir (Stephanopoulos *et al.* 1998).

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

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Mikroorganizma

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 Mikroorganismen 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 3.1).

Bu mikroorganizmalardan, *B. subtilis* 1A751 ve *B. subtilis* WB 700'ün sırasıyla, alkali proteaz enzimlerini kodlatan iki geni (*apr*, *npr*) ve yedi geni silinmiştir.

Mikroorganizmalar, % 0.5 pepton, %1.5 soytripton, 0.001 kg m⁻³ MnSO₄.2H₂O bileşimindeki su içinde hazırlanan ve 121°C ve 1.2 atm'de doymuş buharla 20 dk süreyle sterillenen V=0.5 ml çözeltide 30 °C'da 30 dk çalkalanarak canlandırılmış ve canlandırma ortamında 30 dk bekleyen hücreler, canlandırma ortam bileşimine ek 15 kg/m³ katı agar içeren petri kaplarına steril koşullarda aktarılmıştır. Katı agar ortamlar aşağıdaki yöntemle hazırlanmıştır:

Çizelge 3.1 Araştırmada kullanılmış olan mikroorganizma ve plazmitler

Mikroorganizma	Kaynak/Referans
<i>E.coli</i> XL1Blue	ATCC 31538, Bullock <i>et al.</i> 1987
<i>B. subtilis</i> 1A751	BGSC
<i>B. subtilis</i> WB 700	Wu <i>et al.</i> 1991
Plazmit	Kaynak/Referans
pUC19	Yanisch-Peron <i>et al.</i> 1985
pMK4	Brücknet <i>et al.</i> 1992
- <i>pre(subC)::hGH::pUC19</i>	Şentürk 2006
- <i>pre(subC)::hGH::pMK4</i>	Şentürk 2006
- <i>pre(subC)::hGH::pMK4</i>	Bu çalışma

1. Yukarıda bileşimi verilen çözelti, homojen hale gelinceye kadar manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak kaynatılır;
2. Ortam berrak hale geldiğinde, daha önceden hazırlanmış mikrobiyolojik hava filtreli tüplerin herbirine 6 ml konulur ve steril edilir;
3. Tüpler sterilizasyon işleminden sonra eğilerek, agarın donması beklenir; eğik agar tüpleri 4°C 'da korunur.

Hazırlanan katı ortamlara mikroorganizma öze ile steril koşullarda aktarıldıktan sonra 30°C 'da 18 saat inkübatörde çoğaltılmıştır. Mikroorganizmaların yaşlanmalarını ve zamanla aktivitelerini kaybetmelerini önlemek için katı ortamda çoğaltılmış aktif mikroorganizmalar mikrobanka aktarılarak -20°C 'da saklanmıştır.

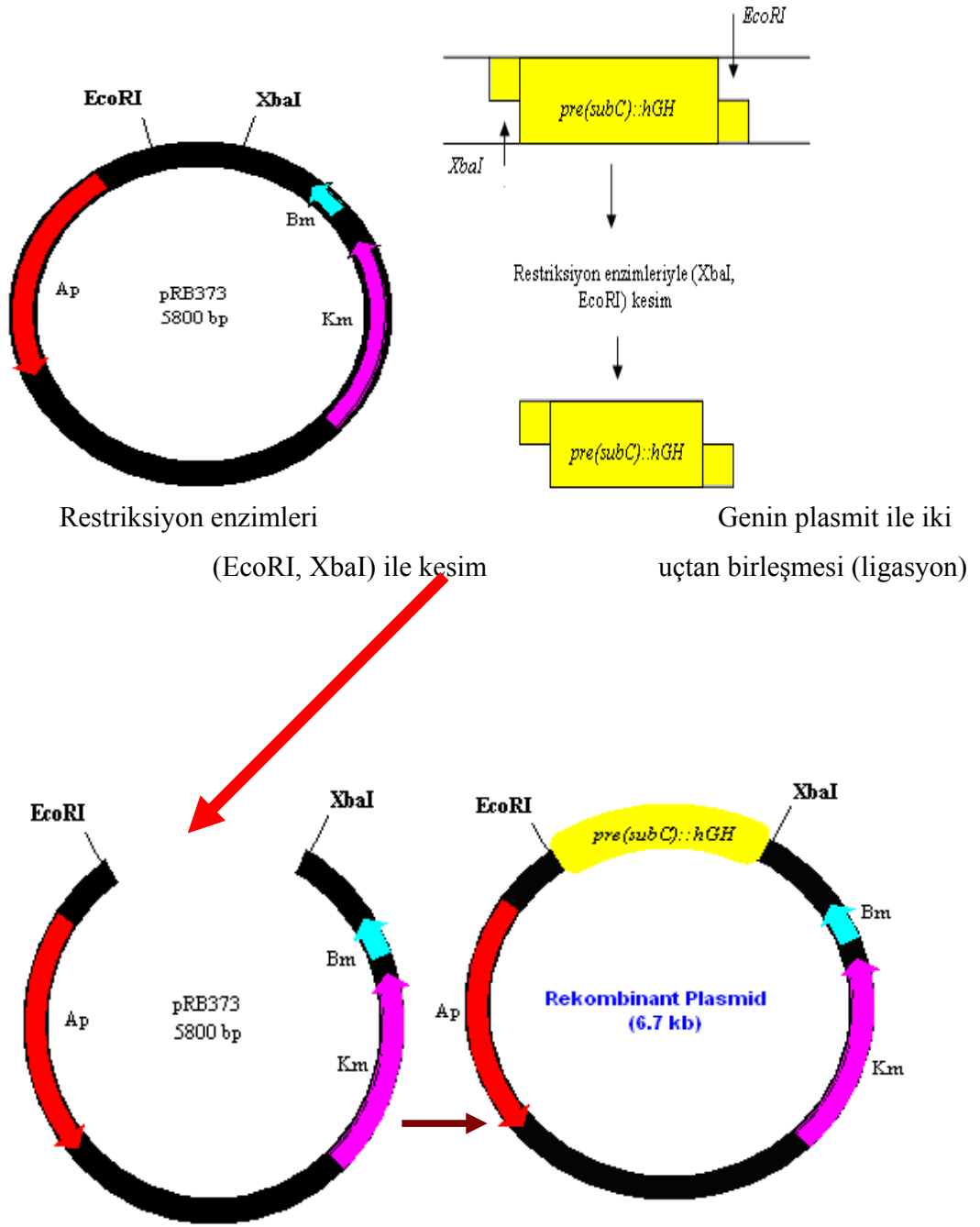
3.2 Genetik Mühendisliği Yöntemleri

Bacillus türleri ile insan büyüme hormonunun (hGH) üretimi için, proteaz genleri silinmiş *Bacillus* türlerinde kullanılmak üzere plasmid geliştirilmesi için üç ayrı metabolik mühendislik tasarımı yapılmış ve detayları EK 1'de verilmiştir. Üç alternatif için Nar bilgisayar programı ile tasarlanan primerlerin tasarım detayları EK 2'de ve genetik mühendisliği yöntemlerinde kullanılan işaretleyiciler (Marker) ise EK 3'de gösterilmiştir. Metabolik tasarımlar içinden, Tasarım I seçilerek uygulanmıştır. hGH'nin *Bacillus* türlerinde üretilip hücre-dışına aktarılabilmesi için *Bacillus* hücre-dışı enzimlerinden SAP geninin *subC* -*pre* dizininin hGH gen dizininin önüne entegre edilmesi ile araştırma grubumuzda geliştirilen -*pre(subC)::hGH* (Şentürk 2006) geninin pRB373 plazmidine klonlanması şeklindeki Metabolik Tasarım I, özetle Şekil 3.1'de gösterilmiştir.

3.2.1 Kromozomal DNA izolasyonu

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

1. Katı ortamdan 30 ml hacimli LB ortamına (EK 4) aktarılan hücreler 30°C 'da 12 st (bir gece) çoğaltılır.



Şekil 3.1 pRB373::*pre(subC)::hGH* (r-pRB373) plazmidinin tasarımı

2. Hücrelerin çoğaldıkları ortam 3000g 'de 10 dk santrifüjenir, sıvı alındıktan sonra hücreler 5 ml SET tamponu (EK 4) içinde tekrar süspansiyon haline getirilir.

3. Son derişimi 1 mg/ml olacak şekilde ortama lizozim enzimi eklenir ve 37°C 'da 60 dk süreyle tepkime gerçekleştirilerek hücre duvarı parçalanır.
4. 1/10 hacim oranında ortama %10 'luk SDS eklenir ve hemen ardından derişimi 0.5 mg/ml olacak şekilde proteinaz-K eklenerek iki saat süreyle -arasıra çalkalayarak- 4°C 'da tepkime gerçekleştirilir.
5. Çözelti hacminin 1/3'ü kadar 5M NaCl; sonra çözelti hacmi kadar kloroform eklenir ve oda sıcaklığında 30 dk süreyle karıştırılır.
6. İki fazlı karışım 4500g 'de 15dk santrifüjlenir ve sulu faz Pasteur pipetiyle tüpe alınır.
7. Sulu fazdaki kromozomal DNA üzerine hacmi kadar izopropanol eklenir; süspansiyon 4500g 'de 15dk santrifüjlenir. DNA %70 EtOH ile yıkanır ve vakum altında kurutulur. DNA uygun miktarda TE tamponu (EK 4) içinde çözülür ve -20°C 'da saklanır (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 4) 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 260nm dalga boyunda UV-spektrofotometre ile absorbans ölçümleri kıyaslanarak hesaplanmıştır.

3.2.3 PCR cihazıyla gen derişimlerinin artırılması

İzole edilen gen dizinlerinin doğru yapıda olup olmadığı, izole edilen genin kalıp DNA olarak kullanıldığı polimeraz zincir tepkimesi (PCR) reaksiyonu ile belirlenmiştir. PCR reaksiyon karışımının agaroz jelde koşturulmasıyla doğru yerde (999 bp) bant veren koloniler seçilmiştir. PCR koşulları ve bileşimi aşağıda verildiği gibidir:

Polimeraz zincir tepkimesi (PCR) için tepkime bileşimi:

dNTPler (1 mM)	10 µl
10 X PCR tamponu (MgSO ₄ 'lü)	5 µl
Kalıp DNA	3 µl
-pre(subC) ileri primeri	1 µl
hGH geri primeri	1 µl
<i>pfu</i> DNA polimeraz (2.5 U/µl)	1 µl
dH ₂ O	<u>29 µl</u>
	V _R = 50 µl

PCR sisteminde mikroreaktörlerin işletim programı:

T ₁ =	94 °C, 2 dk	} 1 döngü
T ₁ (denatürasyon)=	94 °C, 1 dk	} 35 döngü
T ₂ (yapışma)=	55 °C, 1 dk	
T ₃ (sentez)=	72 °C, 1 dk	
T ₃ =	72 °C, 5 dk	} 1 döngü
T ₄ =	4 °C, 1 dk	

3.2.4 Restriksiyon enzimleri ile kesme ve ligasyon reaksiyonları

İzole edilen r-pUC19 ve pRB373 plazmitleri tepkime bileşimi aşağıda verilen koşullarda önce 3 saat süre ile *Eco*RI restriksiyon enzimi ile kesilmiş daha sonra tepkime ortamına *Xba*I enzimi eklenerek tepkimeye 12 saat süre ile devam edilmiştir. Tepkime süresinin tamamlanmasının ardından, tepkime bileşimi 15 dk 65 °C'de inkübe edilerek restriksiyon enzimleri inaktif hale getirilmiştir. Hibrit-genin izolasyonu için, tepkime bileşiminin tamamı agoroz jelde koşturularak, hibrit-gen r-pUC19 plazmidinden ayrılmıştır. Koşturmadan sonra Fermentas DNA Ekstraksiyon Kiti ile hibrit-gen jelden ekstrakte edilmiştir. Yapışkan-uç kesimi için tepkime koşulları aşağıdaki gibidir:

r-pUC19'un EcoRI ve XbaI ile yapışkan-uç kesimi için tepkime koşulları:

r-pUC19 plazmidi (48 ng)	14 µl
Tampon A (tango buffer)	4 µl
EcoRI enzimi (10U/ µl)	1 µl
XbaI enzimi (10U/ µl)	1 µl
T = 37 C°, t = 12 st	V _R = 20 µl

pRB373'ün EcoRI ve XbaI ile yapışkan-uç kesimi için tepkime koşulları:

pRB373 plazmidi (450 ng)	14 µl
Tampon A (tango buffer)	4 µl
EcoRI enzimi (10U/ µl)	1 µl
XbaI enzimi (10U/ µl)	1 µl
T = 37 C°, t = 12 st	V _R = 20 µl

r-pUC19'dan ekstrakte edilen hibrit-genin yukarıda verilen koşullarda kesilerek klonlama için uygun moleküler yapıya getirilen pRB373 plazmidine verilen koşullarda sub-klonlaması ligasyon tepkimesi ile gerçekleştirilmiştir. Klonlamanın başarı olasılığının artırılması için iki farklı gen/vektör oranında (G/V=3, G/V=5) koşulları aşağıda verilen ligasyon tepkimesi paralel olarak gerçekleştirilmiştir:

Hibrit-genin pRB373'e klonlanması için ligasyon tepkime koşulları:

	G/V=3	G/V=5
Hibrit-gen	72 ng	120 ng
pRB373 plazmidi	24 ng	24 ng
Ligasyon tamponu (10 X)	1 µl	1 µl
ATP (10 mM)	1 µl	1 µl
T4 DNA Ligaz (5 U/µl)	1 µl	1 µl
dH ₂ O	V _R =10 µl olacak şekilde belirlenmiştir.	
T= 16 C°, 16 st		

3.2.5 Plazmit DNA'nın *E.coli*'ye transferi: CaCl₂ yöntemi

Klonlama işleminden sonra geni taşıyan plazmit DNA *E.coli*'ye aşağıda verilen CaCl₂ yöntemi ile transfer edilmiştir:

1. *E.coli* LBA katı ortamında, 37°C de bir gece (~ 12 saat) çoğaltılır.
2. Katı ortamdaki 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 yeni LB ortamına aktarılır ve 37°C sıcaklıkta 4 st 250 dk⁻¹da üstel çoğalma fazına kadar tekrar çoğaltılır.
4. Çoğalan hücreler steril, soğuk 100 ml'lik santrifüj tüplerine konular 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 tüpü 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 tüpü 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 plazmit 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).

3.2.6 *E. coli*'den plazmit DNA izolasyonu

E. coli'den plazmit DNA izolasyon yöntemi aşağıda verilmiştir:

1. 12 st (bir gece) LB ortamında çoğaltılmış hücreler, 12,000g'de 30 s santrifüjlenir.
2. Berrak kısım atıldıktan sonra hücrelerin üzerine çoğaltılmış hücrelerden 1ml tekrar eklenir ve önceki basamaktaki gibi tekrar santrifüjlenir.
3. Berrak kısım tekrar atılır ve hücreler üzerinde kalan az miktardaki sıvı da mikropipetler yardımıyla alınır; hücreler buz üzerine yerleştirilir.
4. Hücreler 4°C sıcaklığındaki, 100µl Çözelti I (EK 4) ile tekrar süspansiyon haline getirilir.
5. Üzerine 200 µl yeni hazırlanmış Çözelti II (EK 4) eklenir; Eppendorf tüpü ara sıra aşağı-yukarı çevrilerek 5 dk karıştırılır.
6. Üzerine 150µl 4°C sıcaklığında Çözelti III (EK 4) eklenir ve 5dk buz içerisinde bekletilir.
7. 12,000g 'de, 4°C 'da 5 dk santrifüjlenir; berrak kısım temiz bir tüpe alınır.
8. Berrak çözelti hacminin %10'u kadar 3M NaAc ve 2 katı kadar saf EtOH eklenmiş ve – 20°C 'da 10 dk bekletilir.
9. Plazmit DNA 12,000 g 'de, 4°C 'da 5 dk santrifüjlenerek çöktürülür.
10. Berrak kısım dökülmüş ve çöken plazmit DNA vakum altında kurutulur.
11. Kuruyan pellet amaca göre ya 100 µl TE tamponu (EK 4) (pH=8) veya dH₂O ile çözülür ve -20°C 'da saklanır (Sambrook 1995).

3.2.7 DNA'nın agaroz jelden ekstraksiyonu

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

İstenen DNA molekülünü içeren jel parçası uygun çözeltilerle karıştırılarak 55°C 'de çözülmüş, çözeltiliye geçen DNA molekülü ortama eklenen toz halindeki silika partiküllere adsorplanmıştır. DNA moleküllerini taşıyan silika tozları yıkanmış ve elüasyon tamponu

ile elüasyon işlemi gerçekleştirilerek klonlama tepkimesinde kullanılacak DNA molekülleri saf olarak elde edilmiştir.

3.2.8 Plazmit DNA'nın *Bacillus* türlerine transferi: Elektroporasyon

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.

Elektrokompetent hücrelerin hazırlanması :

1. Hücreler 5ml'lik LB sıvıda 37°C ve 180rpm koşullarında bir gece çoğaltılırlar.
2. 5 ml'lik LB sıvıda çoğaltılan mikroorganizmanın 250 µl 'si 50 ml'lik LB sıvı içeren yeni ortamlara aktarılır ve 1.basamak 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.

DNA'nın hücrelere Elektroporasyonla 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 plazmit 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 şoku 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.

3.2.9 *Bacillus* 'tan miniprep plazmit DNA izolasyonu: Alkali liziz yöntemi

Bacillus'tan plazmit DNA izolasyonu aşağıda verilen yöntem kullanılarak yapılmıştır. Yöntem uygulanırken kullanılan çözeltilerin bileşimleri EK 4'de verilmiştir (Harwood and Cutting 1990).

1. Deney tüpü veya 25ml'lik erlenlerde bulunan, seçici antibiyotik içeren 2.5ml'lik LB sıvı-ortama plazmit DNA'nın izole edileceği mikroorganizmadan tek koloni aktarılır.
2. Mikroorganizma 37°C ve 200rpm koşullarında bir gece çoğaltılır.
3. Çoğalan hücrelerin 1.2ml'si 10,000rpm ve oda sıcaklığında 1dk santrifüjlenir. Sıvı kısım dökülür ve kalan sıvının tamamı bir mikropipet yardımıyla uzaklaştırılır.
4. Hücreler 1.2ml TSE tamponu (EK 4) 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 4) 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 4) 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 4) eklenir ve 10s vorteks işleminden sonra buz üzerinde 5 dk bekletilir.
10. 16,000 rpm ve +4°C koşullarında 6 dk santrifüjlenir. Katının büyük kısmı dibe çöker, bir kısmı çözeltilde kalır.
11. Sıvı kısmın ~ 600 µl'si 1ml mikropipetle yeni Eppendorf 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 16,000 rpm ve +4°C koşullarında 6 dk santrifüjlenir.

14. ~ 500 µl sulu (üst) faz 1 ml mikropipetle yeni tüpe alınır. Ara-faz ve alt-fazdan çekilmemesine dikkat edilir.
15. 500 µl kloroform/izoamilalkol (24/1) eklenir, 5 s vorteks işleminden sonra 16,000 rpm ve +4°C koşullarında 2 dk santrifüjlenerek fazlar ayrılır.
16. 14. basamaktaki gibi yaklaşık 450 µl üst-faz yeni tüpe alınır.
17. 1 ml %96 etanol (oda sıcaklığında) eklenir, karıştırılır ve buz üzerinde 10 dk bekletilir.
18. 16,000 rpm ve +4°C koşullarında 10 dk santrifüjlenerek DNA pellet haline getirilir.
19. Sıvı kısım 4. basamaktaki gibi uzaklaştırılır; pellete dokunulmamalıdır.
20. 1 ml %80 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.

3.3 Rekombinant *Bacillus* Türleri ile hGH Üretimi

Geliştirilen mikroorganizmalar ile hGH üretimi çalışmaları kapsamında mikroorganizma kaynağından başlayarak aşağıda verilen ortamlar/sistemler kullanılmıştır.

3.3.1 Mikrobank (mikroorganizma saklama 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.

3.3.2 Katı çoğalma ortamı

Rekombinant *Bacillus* türleri ile yapılan hGH üretim deneylerinde kullanılan katı çoğalma ortamının bileşimi Çizelge 3.2'de verilmiştir (Çalık 1998). Rekombinant *Bacillus* mikroorganizmalarının aktarılacağı katı çoğalma ortamlarına sterilizasyon işleminden sonra plazmidin korunması için ortamdaki derişimi $7\mu\text{g}/\text{cm}^3$ olacak şekilde kloramfenikol eklenmiş; 30 cm^3 ortam petri kabına boşaltılmıştır. Petrideki ortam donduktan sonra mikrobanktan alınan boncuk ile steril koşullarda mikroorganizma aktarılmış ve 37°C 'da 24 st inkübatörde (Fischer) çoğaltılmıştır. Hücreler çoğaltıldıktan sonra 4°C 'da saklanmıştır.

3.3.3 Ön sıvı çoğalma ortamı

Mikroorganizma çoğalması ve hGH üretiminde kullanılan ön sıvı ortamın bileşimi Çizelge 3.3'de verilmiştir (Çalık 1998). Ön sıvı ortam $7\mu\text{g}/\text{cm}^3$ kloramfenikol içermektedir. Katı ortamda çoğalmalarını tamamlayan hücreler, $V_R=150\text{ cm}^3$ hacimli mikrobiyolojik hava filtreli kesikli biyoreaktörde bulunan bileşimi Çizelge 3.4 'de verilen $V=30\text{ cm}^3$ hacimli ön sıvı ortama öze ile steril koşullarda aktarılmış ve 37°C , karıştırma hızı $N=200\text{ dk}^{-1}$ olan orbital karışmalı inkübatörde (B.Braun, Certomat BS-1) 3 st çoğaltılmışlardır.

Çizelge 3.2 Rekombinant *Bacillus* türleri için katı çoğalma ortamı

<u>Katı çoğalma ortamı A</u>		<u>Katı çoğalma ortamı B</u>	
<u>BİLEŞEN</u>	<u>DERİŞİM (kg m^{-3})</u>	<u>BİLEŞEN</u>	<u>DERİŞİM (kg m^{-3})</u>
Et özütü	3	³⁾	
Pepton	5	Pepton	5
Agar	15	Soyton	15
		Agar	15
		MnSO ₄ .2H ₂ O	0.001

Çizelge 3.3 Rekombinant *Bacillus* türleri için ön sıvı çoğalma ortamı

Bileşen	Derişim, kg m ⁻³
Soyton	15.0
Pepton	5
CaCl ₂	0.1
Na ₂ HPO ₄	0.25
MnSO ₄ .2H ₂ O	0.01

3.3.4 Sıvı çoğalma ortamı

Ön-sıvı ortamda çoğalan mikroorganizmalar pipet yardımıyla steril koşullarda bileşimi Çizelge 3.5’de (Çalık 1998) verilen V=500 cm³ hacimli mikrobiyolojik hava filtreli biyoreaktörde bulunan V_R=100 cm³ hacimli ve 7µg/cm³ kloramfenikol içeren sıvı ortamlara 1:10 ölçek büyütme oranında aktarılmıştır. Aktarma yapıldıktan sonra hücreler karıştırma hızı N=200 dk⁻¹ olan orbital karışmalı inkübatörde 37°C sıcaklıkta çoğaltılmış ve araştırılan parametrelerin etkisi incelenmiştir.

Çizelge 3.4 Rekombinant *Bacillus* türleri için sıvı çoğalma ortamı

Bileşen	Derişim, kg m ³
Glukoz	8.0
(NH ₄) ₂ HPO ₄	4.71
KH ₂ PO ₄	2.0
Na ₂ HPO ₄	0.043
NaH ₂ PO ₄	5.63

3.3.5 Ölçek büyütme adımları ve biyoreaktör sistemi

hGH üretiminde kullanılan pilot ölçek biyoreaktör sistemi Şekil 3.2'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.

hGH üretim deneyleri, laboratuvar- ve pilot-ölçek olmak üzere iki farklı ölçekte yapılmıştır. Laboratuvar-ölçekte bileşimi Çizelge 3.3'de verilen üretim ortamı kullanılarak $V_R=33\text{cm}^3$ çalışma hacimli mikrobiyolojik hava filtreli tam karıştırmalı kesikli biyoreaktörlerde $N=200\text{dk}^{-1}$ karıştırma hızı, $T=37^\circ\text{C}$ sıcaklıkta yaklaşık $t=32$ st süreyle hGH üretimi gerçekleştirilmiştir.

Pilot ölçekte yapılan hGH üretim deneylerinde aşı, bileşimi Çizelge 3.4'de verilen başlangıç pH değeri $\text{pH}_0=7.25$ olan $V_R=500\text{cm}^3$ hacimli biyoreaktör üretim ortamına 1/10 oranında aktarılmıştır. Bu adımda kullanılan biyoreaktör sistemindeki (B.Braun Biostat Q, Almanya) biyoreaktörlerin herbiri $V_R=1\text{dm}^3$ toplam hacimli, iki adet Rushton türbin karıştırıcı ile mekanik karıştırmalı, pH, sıcaklık, çözünmüş oksijen ve karıştırma hızı kontrollü pilot ölçek kesikli biyoreaktör sistemleridir. Sterillenen biyoreaktörlerde iki engel, iki adet türbin tipi karıştırıcı, ve nokta- delikli halka-şekilli gaz dağıtıcısı olan bir gaz giriş borusu bulunmaktadır. Sıcaklık kontrolü ceketten sıcaklığı $T=-10-18^\circ\text{C}$ 'e ayarlanabilen soğutmalı su sirkülatörü (Eyela CA 111, Japonya) ile yapılmış; reaktöre beslenen hava ise Larfon (İtalya) yapımı yağsız-hava kompresörü ile pompalanmıştır.

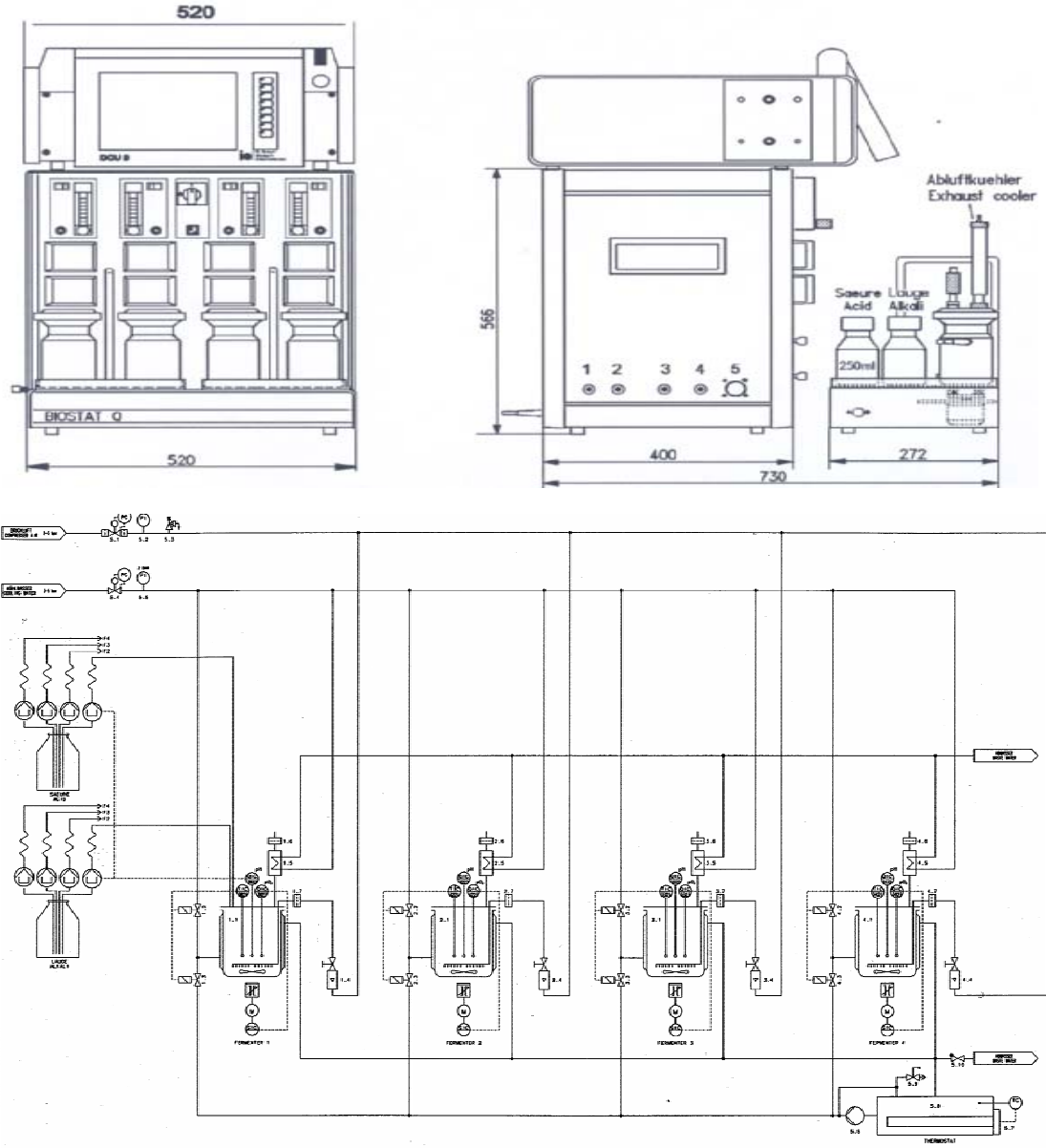
3.3.6 Pilot-ölçek biyoreaktörde üretim

hGH üretimi için kullanılan 4'lü biyoreaktör sisteminin (B.Braun Biostat Q, Almanya) hazırlanmasında izlenecek adımlar aşağıda sırasıyla anlatılmıştır (Özçelik, 2003):

1. Temiz ve saf su ile dolu olarak bırakılmış olan biyoreaktörler boşaltılır.

2. Her reaktörün pH elektrodu reaktör bağlantılarından sökülerek ayrı bir beher içinde pH=7.0 ve pH=4.0 olan Mettler Toledo 'nun standart tamponları ile sırasıyla kalibrasyonları yapılır ve elektrotlar yerine takılır.
3. Sterilizasyon işleminden önce biyoreaktörler 450 cm³ glukoz içermeyen üretim ortamları (Çizelge 3.4) ile, ceketleri ise saf su ile doldurulur. pH elektrodu ve oksijen elektrodunun kabloları elektrotlardan çıkarılır ve bağlantı yerleri uygun bir şekilde sterilizasyon sırasında zarar görmemeleri için kapatılır. Reaktörlerin hava çıkışları açık olmalı, gaz-çıkış soğutucu ucuna filtre bağlanmış olmalıdır. Asit ve baz şişeleri asit ve baz çözeltileriyle doldurulduktan sonra reaktörlerle bağlantıları yapılır ve hortumlar kısaçlanır. Açık olan hortum uçları ve sıcaklık probu bağlantı kablosunun ucu uygun şekilde kapatıldıktan sonra reaktörler ikişerli gruplar halinde T=121 °C sıcaklık, P=1.2 atm koşullarında t=20 dk süre ile buhar sterilizatöründe (Hirayama HA 240 MII) sterillenir.
4. Sterillenen reaktörler dikkatle soğutulduktan sonra ana üniteye ve kontrol ünitesine bağlantıları yapılır.
5. Aynı gün hazırlanmış ve buhar sterilizatöründe (Hirayama HA 240 MII) 121°C ve 20 dk süreyle sterillenmiş olan üretim ortamının diğer bileşeni (glukoz çözeltisi) V_R=500cm³ olacak şekilde steril enjektörler yardımıyla silikon hortumlarla steril koşullarda biyoreaktörlere aktarılır.
6. Biyoreaktörler belirlenen işletme koşullarında (sıcaklık, karıştırma hızı ve hava giriş hızı) çalıştırılmak üzere kontrol sistemine istenen değerler girilir ve sıcaklık ve karıştırma hızlarının kontrolleri aktif hale getirilir.
7. Oksijen elektrotlarının kalibrasyonu için biyoreaktör ortamına, önce N₂ gazı gönderilerek oksijen uzaklaştırılır ve çözünmüş oksijen doygunluk değeri %0'a ayarlanır. Daha sonra hava gönderilerek sabit kalan değer %100 doygunluk değerine ayarlanır. Çoğunlukla tek noktada yani %100 doygunluk değerinde kalibrasyon yapmak yeterlidir.
8. Oksijen elektrotları kalibre edildikten sonra ön sıvı ortamda çoğaltılan mikroorganizma biyoreaktöre aşlanır.

9. Mikroorganizma derişimi 1.2 kg m^{-3} değerine ulaştığında ($t=4 \text{ st}$) sisteme 0.744 M proteaz inhibitor kokteyli (Sigma P-2714) eklenir.
10. İşletim sırasında -gerektiğinde- köpük giderici olarak sterillemiş %0.5 (h/h) Antifoam A (Sigma 5758) çözeltisi gereken miktarda steril koşullarda sisteme enjekte edilir.



şekil 3.2 Pilot ölçek biyoreaktör sistemi

3.4 Analitik Yöntemler

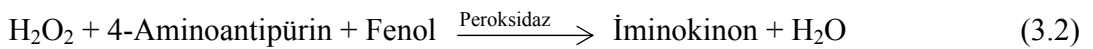
Laboratuvar ve pilot ölçekli biyoreaktörlerde gerçekleştirilen biyoprosesler süresince farklı kalma sürelerinde alınan örneklerin önce mikroorganizma derişimi ölçülmüş, daha sonra üretim ortamı 10dk süreyle 12,000g 'de 4°C sıcaklıkta santrifüj cihazı (Hermle Z 323 K, Almanya) ile santrifüjlenerek hücreler ayrılmıştır. Ortamdan alınan mikroorganizmalardan ayrılan sıvı faz 0.45 µm gözenekli filtrelerden süzöldükten sonra sıvı ortamdaki hGH ve glukoz aşağıda açıklanan yöntemlerle analizlenmiştir.

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 farklı dalga boylarında 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 (EK 5).

3.4.2 Glukoz derişimi

İndirgenmiş şeker -glukoz- derişimi $\lambda=505\text{nm}$ UV spektrofotometrede glukoz oksidasyon metoduyla ölçölmüştür (Boyacı vd 2005). Denklem 3.1'de D-glukozun glukoz oksidaz enzimi katalizörlüğünde oksidasyonundan peroksit oluşumu tepkimesi verilmiştir. Denklem 3.2'de ise 4-aminoantipürin ve fenolün peroksidaz katalizörlüğündeki tepkimesi gösterilmiştir. Tepkime sonucunda kırmızı renk gözlenmektedir.



Önce derişimi bilinen miktarlarda glukoz içeren ortamlar kullanılarak kalibrasyon eğrisi hazırlanmıştır. Oluşturulan kalibrasyon eğrisi EK 6'da 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 çözeltinin absorpsiyonu ölçülür.

3.4.3 hGH derişimi

hGH derişimi, tanımlanan bir elektrik alan içinde iyon veya yüklenmiş kolloidlerin farklı göç hızlarına bağlı ayırma yapan kapiler elektroforez cihazıyla (CE; Quanta 4000E, Waters) belirlenmiştir. hGH derişiminin belirlenebilmesi için analizlerde 75 µm çapında, 60 cm uzunluğunda kapiler ayırma kolonu kullanılmıştır. Taşıyıcı faz, çift tuz Z1-Metil (Waters) içeren 100 mM'lık borat tamponudur; çift tuz kapiler yüzeyine protein adsorpsiyonunu azaltmak için kullanılmıştır (Çalık *et al.* 1995). Analizlerde enjeksiyon sırasında örneklerin ve tampon çözeltinin bulunduğu karusel yukarı kalkmakta; yaratılan yükseklik farkıyla (Δh) oluşan hidrostatik basınç etkisiyle enjeksiyon yapılmaktadır. 12 kV güç kullanarak 30 dakika süreyle analiz sürdürülmüş ve elektroferogramlar alınmıştır. CE'de analizlere başlamadan önce standart verilerek, derişimi bulunacak hGH'nin kalma süresi ve cihazın performansı kontrol edilmiştir. Kalibrasyon grafiği, derişimleri bilinen hGH (Humatrope, Elli Lilly, Fransa) örnekleri standart olarak CE'de analiz edilip derişim- alan eğrisi oluşturulması ile hazırlanmıştır (EK 7).

Kapiler elektroforezde hGH analiz koşulları toplu halde aşağıdadır:

- Kolon : Silika (SiO₂) kaplı kapiler kolon
- Kolon boyutları : 60cm x 75µm
- Güç kaynağı : Pozitif
- İşletme voltajı : 12kV

- Enjeksiyon türü : Hidrostatik basınç
- Enjeksiyon hacmi : 10µL
- Enjeksiyon süresi : 30s
- Analiz sıcaklığı :15°C
- Kullanılan tampon : Modifiye Borat tamponu pH=10
- Dedektör, dalga boyu : UV, 214nm
- Analiz süresi : 20 dk.

3.4.4 hGH tayini: Dot-blott

Üretilen hGH'nin yapısını doğrulamak amacıyla kullanılan Dot-blott yöntemi aşağıda verildiği gibidir:

1. Uygun büyüklükteki membran (milli-pore Immobilan), metanol ile 15 saniye ve ardından saf su ile 20 saniye yıkanır.
2. 10 ml standart ve 20 ml numune membran kurumadan, membrana yüklenir.
3. Yüklenen numune tam olarak kuruduktan sonra, membran 2-3 kez 1X-TBST tamponuyla yıkanır.
4. Membran yaklaşık 1 saat TBST-milk içinde yaklaşık 1 saat süreyle devamlı karıştırılarak (25 C°, 60 rpm) bekletilir.
5. Membran 3 kez (toplamda 30 dakika olacak şekilde) 1X-TBST tamponu ile yıkanır.
6. Membran 1.5 saat oda sıcaklığında veya 1 gece +4 C°'de, primer antikor (Poliklonal Rabbit Anti-Human Growth Hormone, BioMeda, ABD) içeren TBST-milk ile bekletilir.
7. Membran 5. basamaktaki gibi tekrar yıkanır.
8. Membran 1.5 saat, oda sıcaklığında, sekonder antikor (Horseradish Peroxidase Label Goat-Anti Rabbit IgG (H+L), BioMeda, ABD) içeren TBS-milk ile devamlı karıştırılarak (25 C°, 60 rpm) bekletilir.
9. Membran 5. basamaktaki gibi tekrar yıkanır.

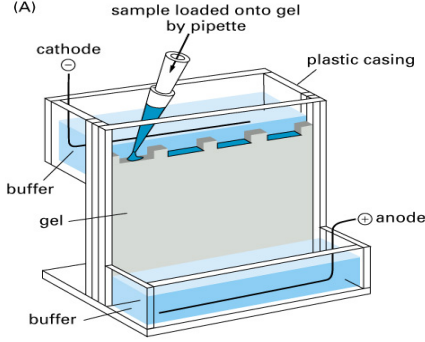
10. Membran 5 ml substrat çözeltisinde (S10 HRP Substrate-Chromogen (DAB tablets) Kit, BioMeda, ABD) renk oluşumu gözleninceye kadar bekletilir.

3.4.5 hGH molekül büyüklüğü: SDS-PAGE

En yaygın kullanılan elektroforez tiplerinden biri olan SDS-PAGE ile üretilen ve protein yapısındaki hGH'nin beklenen molekül büyüklüğünde olup olmadığı aşağıdaki yöntemle belirlenmiştir:

1. Analizlenecek olan protein çözeltisi eşit hacimde örnek yükleme tamponu (EK 8) ile karıştırılarak kaynar-su banyosunda 2-3 dakika inkübe edilir. Protein moleküllerinin üç boyutlu yapısındaki kuvvetler ısıtılarak yok edilir ve böylece protein molekülleri düz zincir haline geçerler. Örnek yükleme tamponundaki gliserol, yüklenecek protein çözeltisinin yoğunluğunu artırarak jelin kuyucuklarının dibine çökmesini sağlar.
2. Jelin yükleneceği SDS-PAGE jel yükleme tankı hazırlanır. Jel, "Slab" denilen iki cam tabaka arasında hazırlanır. Cam tabakaların iki yanına jelin arzu edilen kalınlığı (0.5-1 mm) ölçüsünde birer "spacer" yerleştirilir. Camlar kıskaç yardımıyla sıkıca tutturulur. Jelin alt kısmının geleceği yere de yine aynı kalınlıkta dip "spacer"ı yerleştirilir ve kıskaç yardımıyla sıkıştırılır. Herhangi bir sızıntı olup olmadığı su ile kontrol edilir. Sızıntı olmadığından emin olunduktan sonra hazırlanmış olan resolving jel (EK 8) bir enjektör yardımıyla dökülür. Jeli dökerken hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edilmelidir. Polimerizasyon havadaki oksijenden etkileneceği için jel polimerleşmek üzere iki cam arasına doldurulduktan sonra üzerine pipet yardımıyla su ile doyurulmuş bütanol konur. Polimerleşmeden sonra jel üzerindeki bütanol saf su ile yıkanarak uzaklaştırılır. Sonra polimerleşmiş olan resolving jelin üzerine stacking jel (EK 8) dökülüp üzerine tarak yerleştirilir.
3. Polimerleşme tamamlandıktan sonra jelin üst kısmına yerleştirilmiş olan tarak çıkartılır ve iki cam arasında bulunan jel bu durumda tanka yerleştirilir. Sonra tanka koşturma tamponu eklenir ve 40 mA sabit akım verilerek proteinler koşturulur. Jelde yürütülen protein bantlarının moleküler ağırlıklarının belirlenebilmesi için jelle moleküler ağırlığı

bilinen standart protein bantlarına sahip işaretleyici yüklenir. Şekil 3.3’de poliakrilamid jele örneklerin yüklenmesi gösterilmiştir.



Şekil 3.3 SDS-PAGE modülüne yerleştirilmiş jele örnek yüklenmesi

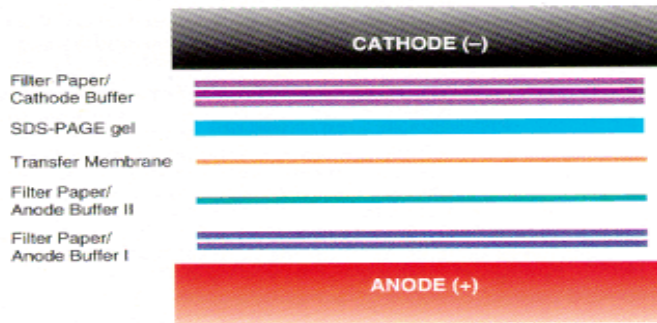
3.4.6 hGH molekül büyüklüğü: WESTERN-BLOTT

Metabolik mühendislik araştırma programı ile geliştirilmiş olan *Bacillus* türlerini kullanarak biyoreaktör üretim ortamına sentezlenen hGH'nin aktif/doğru yapıda olup olmadığını belirlemek ve derişimini ölçmek için Western-Blott yöntemi kullanılmıştır. Western-Blott yönteminin uygulanabilmesi için ilk aşamada üretim ortamına salgılanan tüm proteinlerin ayrıldığı SDS-PAGE yöntemi uygulanmalıdır. Ayrılan proteinlerin uygun bir yolla tanımlanmasına dayanan ve aranan spesifik proteinin derişiminin de belirlenebildiği yöntem aşağıda verilmiştir (Towbin *et al.* 1979, Sambrook *et al.* 2001, Burnette 1981):

1. SDS-PAGE Elektroferez yöntemiyle koşturulmuş olan jel, transfer tamponunda (EK 8) ~15dk bekletilir. Nitroselüloz membran, sünger ve filtre kağıdı, jel ile aynı büyüklükte olacak şekilde kesilir ve bir kaptaki transfer tamponu ile ıslatılır. Bu işlemden sonra Western-Blott kasedinin içine sırasıyla bir kat sünger, filtre kağıdı, poliakrilamid jel, membran, filtre kağıdı ve sünger yerleştirilir (Şekil 3.4).
2. Hazırlanmış olan Western-Blott kasedi tanka yerleştirilir. 200mA’de 1st süreyle negatif yüklü olan jeldeki proteinlerin nitroselüloz membrana transferi sağlanır. Transfer

sonunda membran ponso kırmızısı ile 5 dk boyanarak transferin kontrolü gerçekleştirilir. Boya tersinirdir. Boyanmış olan membran suyla yıkayıp PBS çözeltisinde (EK 8) birkaç dakika bekletilerek boya silinir.

3. Transferin kontrolünden sonra proteinlerin bulunduğu yerlerin dışındaki alanın bloke edilebilmesi için membran (IPVH 15150 Immobilan-P, Millipore, ABD) bir gece tween20 içeren sütte (EK 8) bekletilir. Sonra süt dökülür ve tween20 TBS ile yıkanır. Yıkamak için hazırlanan TBS üç bölünür: Birinci yıkama 15 dakika, ikinci yıkama 10 dakika ve üçüncü yıkama 5 dakika süreyle yapılır.
4. Yıkamış olan membrana primer antikor (A10 Poliklonal Rabbit Anti-Human Growth Hormone, BioMeda, ABD) ilave edilip 1 saat karıştırıcıda bekletilir. Primer antikor hedef proteini tanıyan bir antikor olmalıdır. Süre sonunda proteine bağlanmamış olan primer antikoları ortamdaki uzaklaştırmak amacıyla tween20 içeren TBS ile üç aşamalı yıkanır.
5. Yıkama işleminden sonra sekonder antikor enzim kompleksi (SJ29096 Horseradish Peroxidase Label Goat-Anti Rabbit IgG (H+L), BioMeda, ABD) ilave edilip 1 st. karıştırıcıda bekletilir. Sekonder antikor primer antikorun antijenidir. Sekonder antikorun seyreltilmesi TBST (EK 8) ile yapılır. Seyreltme için 10 ml hacim yeterlidir. Sulandırım antikorun yoğunluğuna göre yapılır (1/1000- 1/10000 gibi). Bir saatlik bekletme sonunda primer antikora bağlanmamış olan sekonder antikoların ortamdaki uzaklaştırılması için tween20'li TBS ile üç aşamalı yıkama yapılır.
6. Yıkama sonunda ortama ilave edilen substrat (S10 HRP Substrate-Chromogen (DAB tablets) Kit, BioMeda, ABD) enzim kompleksi tarafından parçalanarak reaksiyon gerçekleşir. Bu aşamada ortama ilave edilen boya (4 kloro-1 naftol) ile reaksiyonun gerçekleştiği yerlerde oluşan bantların şiddetine göre görüntü analiz sistemi ile hedef proteinin varlığı belirlenir. Reaksiyonun olduğu yerler primer antikorun yani hedef proteinin bulunduğu yerlerdir. Görüntü analiz sistemine bağlanan bir bilgisayar programı aracılığı ile de hedef proteinin derişimi belirlenir.



Şekil 3.4 Proteinlerin poliakrilamid jelden membrana aktarımı

3.4.7 hGH yapısı ve moleköl büyüklüğü: MALDI-ToF MS

Üretilen hGH yapısı MALDI-LR (Waters-Micromass,UK) sistemi ile Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarında belirlenmiştir. Spekturumlar; puls azot gaz lazeri ile (337 nm), küçük kütle geçişinde, 15 kV voltaj uygulanarak, pozitif doğrusal modda alınmıştır (Çalık *et al.*2008). Bu amaçla;

1. Ürün karışımından alınan örnekler EK 9'da verilen yöntemle saflaştırılır.
2. 3µl, 10 mg ml⁻¹ derişimdeki sinopinik asit matrisi, %50 asetonitril, %50 TFA çözeltilisinde çözölür.
3. Yaklaşık 10 pmol µl⁻¹ derişimdeki 1 µl örneğe bu çözeltiliden 1 µl eklenir.
4. Karışım hedef (target) plakaya yüklenir ve hava akımında "kuruyan damlalar" (dried droplet) yöntemi ile kurutulur (Karas *et al.* 1998).
5. Spektrum, 100-200 sinyalin toplamıyla elde edilir ve moleköler ağırlık, sinyallerin toplamından elde edilen pikin merkez noktası baz alınarak Savitzky-Golay algoritması ile belirlenir.
6. Moleköler ağırlık standartı olarak, Sitokrom c ve standart hGH kullanılır.

3.4.8 Hücre-içi hGH analizi

Hücre-içi hGH analizi aşağıdaki yöntemle yapılmıştır:

1. Üretim ortamından 1 ml örnek bir Eppendorf tüpüne alınır. Santrifüjlendikten sonra sıvı faz ayrılır ve kalan hücre -55C de saklanır. Analiz için hücrenin üzerine, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl-pH 8.0, 1mM EDTA, 10% gliserol 1 mM proteaz inhibitör kokteyli (Sigma, p-2714) bileşimindeki hücre liziz tamponundan 0.5 ml eklenir ve sıvı seviyesini geçmeyecek kadar cam boncuk konur.
2. Eppendorf tüpleri 20 s vortekslendikten sonra 30 s buzda bekletilir, bu işlem üç kez tekrarlanır.
3. Eppendorf tüpleri, +4°C'de 3000 g'de 2 dk santrüfjlendikten sonra hücre bileşenlerini içeren sıvı faz alınır.
4. Sıvı faz 12,000g'de 5 dk daha santrüfjlenir, varsa katı safsızlıklardan ayrılır.
5. Sıvı faz da hGH ölçümü uygun yöntemle yapılır.

3.5 Sıvı Faz Kütle Aktarım Katsayısı ve Oksijen Tüketim Hızı

Pilot ölçekte hGH üretim prosesi boyunca sıvı faz hacımsal kütle aktarım katsayısı ve oksijen tüketim hızı Bölüm 2.8'de prensibi açıklanan yöntemle belirlenmiştir. Yöntem, dinamik koşullarda oksijen için kurulan kütle korunum denklemi yorumlanarak, biyoreaktöre gönderilen havanın kısa 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.

Üretim ortamına aş yapılmadan önce fiziksel oksijen aktarım katsayısı; aşılama yapıldıktan sonra ise kimyasal tepkimeli oksijen aktarım katsayısı belirlenmiştir. Biyoreaktöre beslenen hava mikroorganizmanın biyolojik faaliyetlerini etkilemeyecek şekilde, kısa süreli olarak kesilmiştir. Yüzey havalandırma etkisini azaltmak amacıyla karıştırma hızı $N=20-50 \text{ dk}^{-1}$ arasında tutulmuş ve zamanla biyoreaktör içinde sıvı-fazda çözünmüş oksijen derişiminin doğrusal azalmasından yararlanılarak mikroorganizmanın oksijen tüketim hızı, r_o hesaplanmıştır (Denklem 2.9). Sıvı tarafı hacımsal kütle aktarım katsayısının belirlenmesi için incelenen oksijen aktarım koşullarında sisteme tekrar hava verilerek çözünmüş oksijen derişimindeki doğrusal olmayan artış ölçülmüştür. Denklem 3.4'ün düzenlenmesi ile $((dC_o/dt)-r_o, C_o)$ grafiğinin eğiminden $K_L a$ değeri hesaplanmıştır. Örnek grafikler ve örnek bir hesap EK 9'da görülmektedir.

4. DENEY VE BULGULAR

Bu çalışmada yaşam süresince insan metabolizmasında üretilen hGH'nin, metabolik mühendislik araştırma programı kapsamında tasarlanan ve geliştirilen rekombinant *Bacillus* türü mikroorganizmalar kullanılarak biyoreaktör ortamında üretilmesi amaçlanmıştır.

'Metabolik mühendislik ve reaksiyon mühendisliği prensipleriyle hücre-dışı rekombinant insan büyüme hormonu üretimi' konulu yüksek lisans çalışmasının birinci araştırma programında hücre-dışı proteaz aktivitesi inhibe edilmiş, hGH üretim performansına sahip rekombinant plazmit ve mikroorganizma(lar) geliştirilmesi hedeflenmiştir. İkinci araştırma programı kapsamında, hGH üretim performansı en yüksek olan rekombinant mikroorganizma seçilmiş ve araştırma programını üçüncü aşamasında bu mikroorganizma ile 6.75, 7.00, 7.25, 7.50, 7.75, 8.00, 8.25 başlangıç ortam pH'ı koşullarının hGH üretim performansına etkisi laboratuvar-ölçek biyoreaktörlerde araştırılmıştır. Araştırma programının son aşamasında; 6.75, 7.25, 7.50, 8.00 başlangıç ortam pH'ı koşullarının hGH üretim performansı, proses süresince oksijen ve pH profilleri, hücre derişimleri ve substrat tüketimi, ve biyoproses karakteristiklerine etkisi pilot-ölçek biyoreaktörlerde araştırılmıştır.

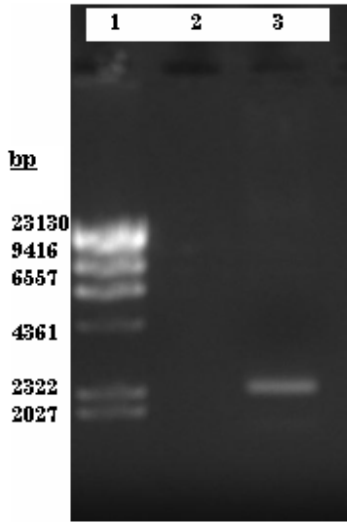
4.1 hGH Üretim Performansına Sahip Mikroorganizma Geliştirilmesi

Bacillus türü mikroorganizmaların proteaz enzimlerini üretmesi, terapötik protein olan hGH üretiminde önemli bir dar boğaz oluşturmaktadır. Bu nedenle, proteaz aktivitesi inhibe edilmiş mikroorganizmalar ile hGH üretimi için, *Bacillus subtilis* WB 700 konak-hücrelerine transforme edilmek üzere rekombinant pRB373::pre(subC)::hGH (r-pRB373) plazmidi tasarlanmış ve geliştirilmiştir. Geliştirilen plazmidin *Bacillus subtilis* WB 700 ve *Bacillus subtilis* 1A751 mikroorganizmalarına transferi ile hGH üretim potansiyeline sahip iki yeni rekombinant mikroorganizma geliştirilmiştir.

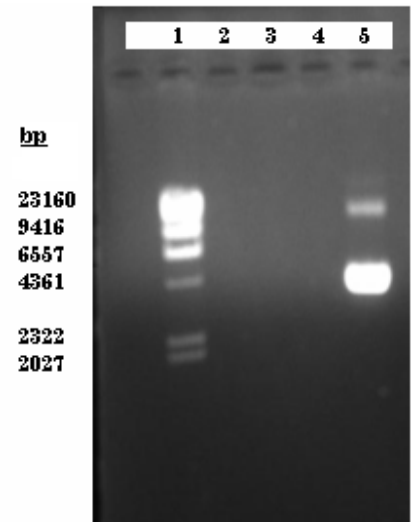
4.1.1 Hibrit genin pRB373 plazmidine klonlanması

Rekombinant plazmit geliştirilmesi için, hibrit-genin araştırma gurubumuzda daha önce geliştirilen r-pUC19 (pUC19::*pre(subC)::hGH*) plazmidinden restriksiyon enzimleri ile kesilerek alınacağı ve aynı restriksiyon enzim konumlarından kesilen pRB373 plazmidine ligasyon tepkimesi ile klonlanacağı şekilde genetik mühendisliği tasarımı yapılmıştır. Hibrit-genin r-pUC19 plazmidinden kesilerek alınması ve pRP373 plazmidine klonlanması için kullanılacak restriksiyon enzimleri *EcoRI* (⁵GAATTC³) ve *XbaI* (⁵TCTAGA³) olarak seçilmiştir, r-pRB373 plazmidinin tasarım şeması Şekil 3.1’de verildiği gibidir.

Hibrit-genin pRB373 plazmidine klonlanması için, ilk basamakta hibrit-gen, daha önce geliştirilmiş olan r-pUC19 (3586 bp) plasmidinden izole edilmiştir. Bu amaçla, plazmidin derişimi *E.coli*’de artırılmış ve agaroz jelde koşturularak, plazmit jelden ekstrakte edilmiştir (Şekil 4.1). İkinci basamakta, pRB373 (5800 bp) plazmidinin izolasyonu plazmidi taşıyan *E.coli*’de çoğaltılıp agaroz jelde koşturmak suretiyle yapılmıştır (Şekil 4.2).



Şekil.4.1 r-pUC19 izolasyonu (48 ng)
1.Marker (λ DNA/*HindIII*), 3. r-pUC19

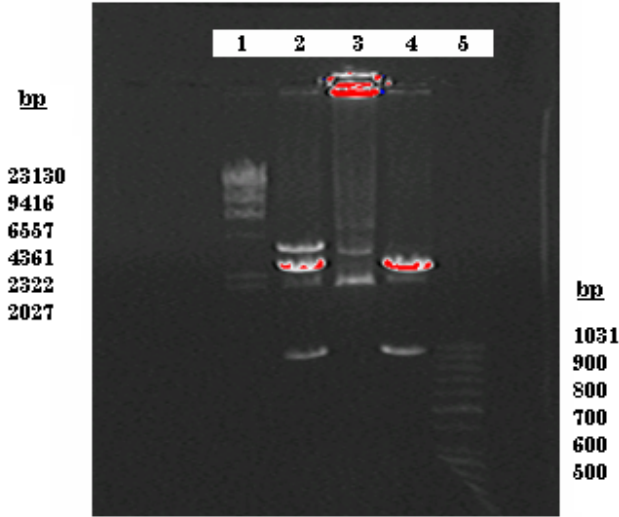


Şekil 4.2 pRB373 izolasyonu (450 ng)
1.Marker (λ DNA/*HindIII*), 5. pRB373 plazmidi

İzole edilen r-pUC19 ve pRB373 plazmitleri tepkime bileşimi üçüncü bölümde verilen koşullarda *Eco*RI ve *Xba*I restriksiyon enzimleriyle kesilerek hibrit-genin klonlanacağı bölge oluşturulmuştur.

Hibrit-genin (990 bp) izolasyonu için, tepkime karışımının tamamı agoroz jelde koşturularak, hibrit-gen r-pUC19 plazmidinden ayrılmış (Şekil 4.3) ve jelden ekstrakte edilmiştir.

r-pUC19'dan ekstrakte edilen hibrit-genin üçüncü bölümde verilen koşullarda kesilerek klonlama için uygun moleküler yapıya getirilen pRB373 plazmidine (Şekil 4.4) sub-klonlaması ligasyon tepkimesi ile gerçekleştirilmiştir. Klonlamanın başarı olasılığının artırılması için iki farklı gen/vektör oranında (G/V=3, G/V=5) ligasyon tepkimesi paralel olarak gerçekleştirilmiş, G/V=5 koşulunda klonlama başarılmıştır.



Şekil 4.3. r-pUC19 kesme tepkimesi sonucu; 1. İşaretleyici (λ DNA/*Hind*III); 2-4: kesik r-pUC19; 3: kesik pUC19; 5: İşaretleyici (DNA ladder Low Range Marker)

Klonlamanın ardından, hibrit-gen taşıyan r-pRB373 (pRB373::*pre(subC)::hGH*) plazmidini içermesi beklenen ligasyon tepkime karışımı plazmit taşımayan *E.coli XLI-Blue* konak-hücrelerine CaCl₂ yöntemi ile aktarılmış ve seçici antibiyotik içeren LB-katı ortama yayılarak koloni oluşumu gözlenmiştir.

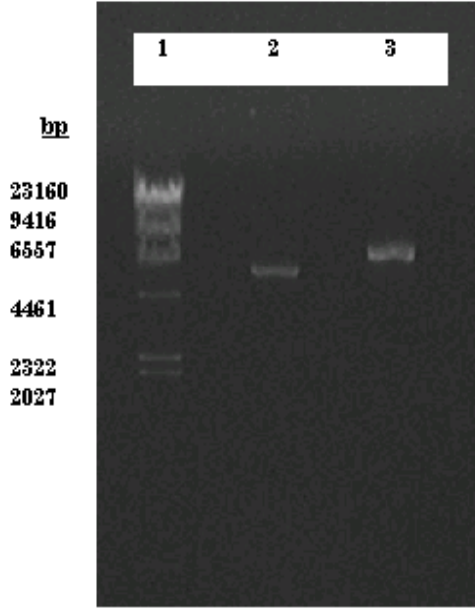
pRB373 plazmidini *lacZ* genini içermediğinden oluşan kolonilerden rekombinant olanların mavi/beyaz koloni oluşumu yöntemiyle seçilmesi mümkün olmamıştır. Bu nedenle, oluşan kolonilerin rekombinant olup olmadığı, kolonilerden izole edilen plazmidin agaroz jelde koşturulması ve rekombinant olmayan pRB373 plazmidinin büyüklüğü ile kıyaslanması ile belirlenmiştir. Buna ek olarak her bir koloniden izole edilen muhtemel r-pRB373 plazmitlerinin kalıp DNA olarak kullanıldığı, koşulları materyal yöntemde verilen PCR reaksiyonu gerçekleştirilerek, plazmidin hibrit-gen taşıyıp taşımadığı belirlenmiştir. Hibrit-genin derişimi, dizinleri EK 1’de verilen *-pre(subC)* dizini ileri primeri ve *-hGH* dizini geri primerleri kullanılarak, artırılmıştır.

PCR reaksiyonunun ardından, reaksiyon karışımı agaroz jelde koşturularak, rekombinant kolonilerden izole edilen plazmitler ile gerçekleştirilen PCR reaksiyonu sonucu jelde koşturulan tepkime ortamında hibrit-gen dizinine ait bant oluşumu görülmüştür. Rekombinant olmayan kolonilerden izole edilen plazmitler ise hibrit-gen taşımadığından, PCR ile gen derişiminin artırılması mümkün olmamış ve agaroz jelde hibrit-gen dizinine ait bant gözlenmemiştir (Şekil 4.5).

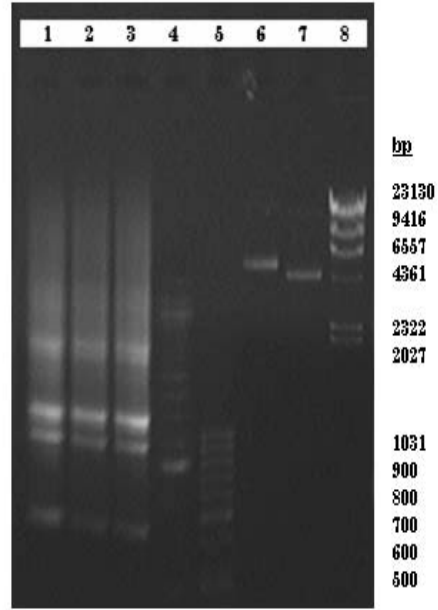
4.1.2 Geliştirilen r-pRB373 plazmidinin *Bacillus* türlerine transformasyonu

Hibrit-genin pRB373 *Bacillus-E.coli* shuttle plazmidine klonlanmasının ardından, r-pRB373 *E.coli XLI-Blue*’da çoğaltılıp izole edilmiş, proteaz genleri silinmiş *Bacillus* grubu mikroorganizmalardan *Bacillus subtilis* WB700, *Bacillus subtilis* 1A751 konak-hücrelerine elektroporasyon yöntemi ile transforme edilmiştir. Elde edilen kolonilerin rekombinant plazmidini taşıyıp taşımadığını kontrol edebilmek için, *Bacillus* türlerinden plazmit izolasyonları yapılmış ve izolasyon ürünleri kalıp olarak kullanılarak PCR ile hibrit gen

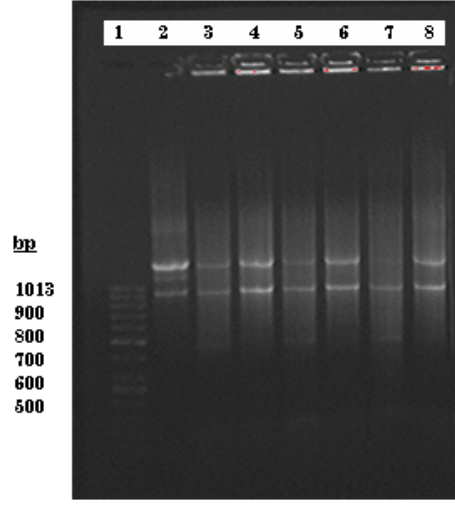
sentezlenmiştir. r-pRB373 plazmidinin transforme edildiği iki konak-hücreden izole edilen plazmitlerin kontrolü için yapılan PCR'a ait jel görüntülerinden (Şekil 4.6), her iki hücreye de transformasyonun başarılı olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.4 *EcoRI* enzimi ile kesilmiş pRB373 ve r-pRB373 plazmidlerinin jel görüntüsü; 1: İşaretleyici (λ DNA/*HindIII*); 2: kesik pRB373; 3: kesik r-pRB373



Şekil 4.5 pRB373 ve r-pRB373'ün PCR öncesi ve sonrasında jel görüntüsü; 1-3: r-pRB373 ile PCR; 4: pRB373 ile PCR; 5: İşaretleyici (DNA Ladder Low Range); 6: r-pRB373, 7: pRB373; 8: İşaretleyici (λ DNA/*HindIII*)



Şekil 4.6 Hibrit-genin PCR görüntüsü 1: İşaretleyici (DNA ladder Low Range Marker); 2-4: Hibrit-gen r-pRB373 (*B.subtilis* WB 700'den izole); 5-8: Hibrit-gen r-pRB373 (*B.subtilis* 1A751'den izole)

Böylece metabolik mühendislik araştırma programı çerçevesinde, proteaz enzimlerini kodlayan genleri silinmiş *Bacillus* türü mikroorganizmalarda hGH üretimi için kullanılmak üzere rekombinant pRB373::pre(subC)::hGH plazmidi tasarlanmış ve geliştirilmiştir. Geliştirilen rekombinant plazmid, *Bacillus subtilis* WB700 ve *Bacillus subtilis* 1A751 konak-hücrelerine transforme edilerek hücre-dışı hGH üretim performansı olan yeni rekombinant mikroorganizmaların geliştirilmesi başarılmıştır.

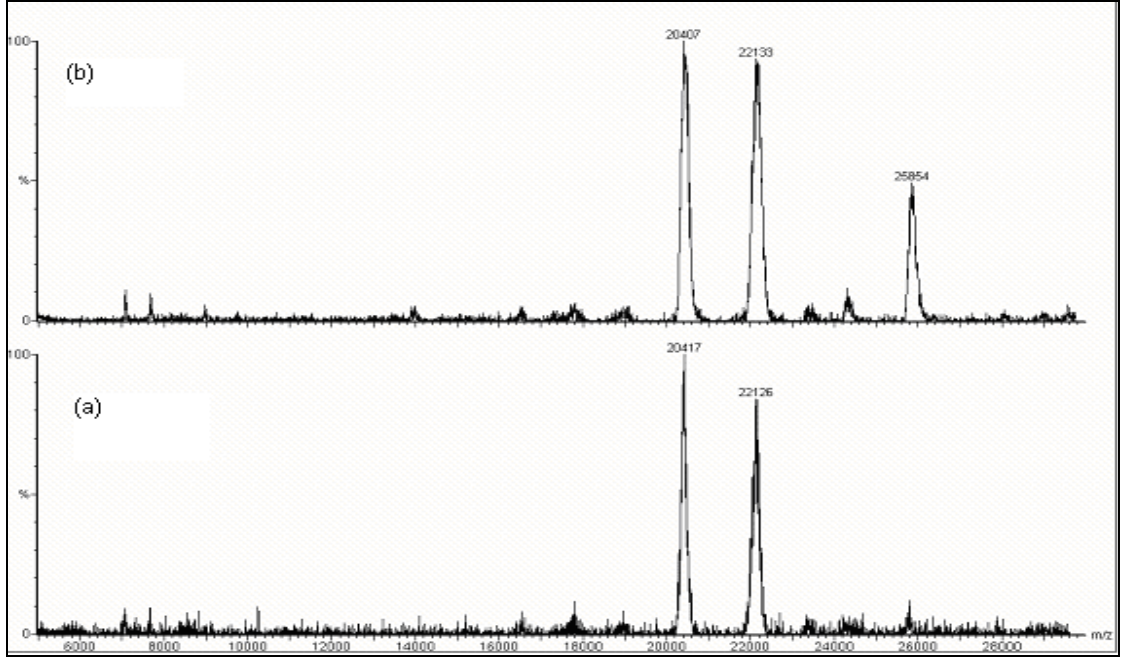
4.2 Üretilen hGH Yapısının Belirlenmesi

Geliştirilen mikroorganizmaların ürettikleri hGH'nin yapısının ve moleküler ağırlığının doğruluğu; bileşimi üçüncü bölümde verilen tanımlı ortamda laboratuvar-ölçek biyoreaktörlerde üç rekombinant mikroorganizma ile yapılan deneylerde, fermentasyon ortamından t=30 st'de alınan ve saflaştırılan örneklerin MALDI-ToF MS sistemi ile analizlenmesiyle sınıanmıştır.

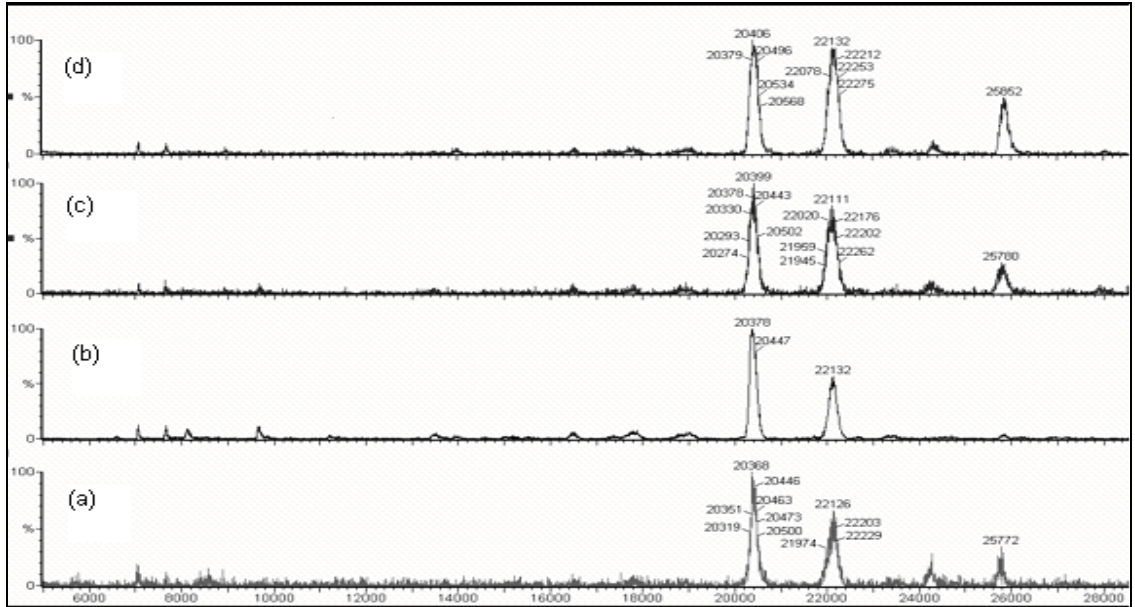
Öncelikle hGH standartı analizleri yapılmış ve m/z 22126 (22126 Da) değerinde hGH piki gözlenmiştir (Şekil 4.7a, (a)). Standart olarak kullanılan hormonun molekül ağırlığı, 22125 Da olarak verilmiştir. MALDI-ToF MS analizleri sonucunda belirlenen m/z 22126 değerindeki pikin $[M+H]^+$ iyonuna ait olduğu ve dolayısı ile, standart proteinin moleküler ağırlığının cihaz ile doğru tespit edildiği gözlenmiştir. Rekombinant *B.subtilis* 1A751 (pMK4 taşıyan) konak-hücrenin ürettiği hGH'nin moleküler ağırlığı ise 22133 Da olarak belirlenmiştir (Şekil 4.7a, (b)). Standart hGH ile kıyaslandığında bu ölçümün %0.03 farklı olduğu görülmüş, bu oranda hatanın büyük moleküllerin MALDI-ToF MS sistemi ile analizinde kabul edilebilirdir.

Üç farklı rekombinant mikroorganizma ile (r-pMK4 taşıyan *B.subtilis* 1A751, r-pRB373 taşıyan *B.subtilis* 1A751 ve r-pRB373 taşıyan *B.subtilis* WB700) üretilen hGH'nin MALDI-ToF MS sistemi ile analiz sonuçları ise standart ile kıyaslamalı olarak Şekil 4.7b'de görülmektedir. Bu analizde standartta m/z 25772 değerinde bir pik daha belirlenmiş; bu sistemin fento-mol mertebesinde hassasiyet ile ölçüm yaptığı dikkate alınarak, bu pikin ihmal edilebilir mertebede safsızlık olduğu düşünülmüştür.

Şekil 4.7b'de görüldüğü gibi *B.subtilis* 1A751 (pMK4 taşıyan) ve *B.subtilis* WB 700 (pRB373 taşıyan) mikroorganizmaları ile üretilen hGH'nin molekül ağırlığı %0.03, *B.subtilis* 1A751 (pRB373 taşıyan) mikroorganizması ile üretilen ise %0.06 oranında standart hGH'den farklıdır. Daha önce de belirtildiği gibi bu hata aralığında her üç mikroorganizma ile üretilen hGH'nin moleküler ağırlığının doğala özdeş olduğu düşünülebilir. Diğer yandan, standart hGH'de olduğu gibi, rekombinant mikroorganizmalar ile üretilen hGH'de de 25.8 kDa büyüklüğünde bir pik belirlenmiştir (Şekil 4.7b). Her ne kadar bu piklerin büyüklüğü standarttakine çok yakın olsa da, standartta bu pikin tekrarlanabilir şekilde elde edilememesi, daha önce de belirtildiği gibi, standartta veya tabakada safsızlık olduğuna işaret etmiştir.



Şekil 4.7a MALDI-ToF MS analizi. (a) standart hGH, (b) *B.subtilis* 1A751 (r-pMK4 taşıyan) ile üretilip saflaştırılan hGH

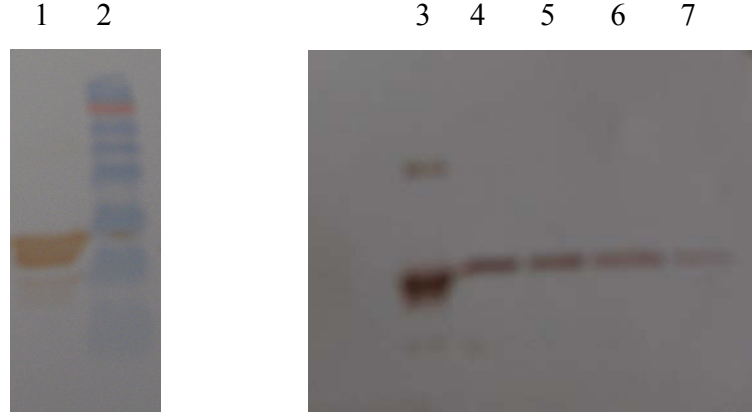


Şekil 4.7b MALDI-ToF MS analizi. (a) standart hGH, (b) *B.subtilis* 1A751 (r-pRB373 taşıyan) ile üretilip saflaştırılan hGH (c) *B.subtilis* WB 700 (pRB373 taşıyan) ile üretilip saflaştırılan hGH (d) *B.subtilis* 1A751 (pMK4 taşıyan) ile üretilip saflaştırılan hGH

Geliştirilen mikroorganizmalar ile üretilen hormonun molekül ağırlığının, standart hGH'ye özdeş olduğu MALDI-ToF MS sistemi ile belirlenmiş; laboratuvar- ve pilot-ölçek deneylerinde, prosesde t=32 st'de alınan örneklerin sırasıyla, Dot-blott ve WESTERN-BLOTT yöntemleri ile analizlenmesiyle ise üretilen hormonun doğru yapıda olup olmadığı sınıanmıştır.

Pilot-ölçekte gerçekleştirilen deneylerde, proses sonunda ürün analizi WESTERN-BLOTT yöntemi ile yapılmış ve membranda hGH'nin gözlenebilmesi için Poliklonal Mause Anti-Human Growth Hormone, Horseradish Peroxidase Label-Goat Anti-Mause IgG antikor-antijen çifti kullanılmıştır. Böylece farklı antikor-antijen çifti ile yapılan analiz sonucunda da, hGH'nin istenen yapıda olduğu belirlenmiş ve WESTEN-BLOTT görüntüleri Şekil 4.8'de verilmiştir.

Rekombinant *Bacillus* hücreleri ile hücre-dışı hGH üretimi için, geliştirilen plazmidlerden ve mikroorganizmalardan en yüksek performansa sahip olanının belirlenmesi için laboratuvar-ölçekte gerçekleştirilen deneylerde, proses sonunda ürün analizi Dot-blott yöntemi ile yapılmış ve membranda hGH'nin gözlenebilmesi için Poliklonal Rabbit Anti-Human Growth Hormone, Horseradish Peroxidase Label-Goat Anti-Rabbit IgG antikor-antijen çifti kullanılmıştır. Analizler sonucunda, Bölüm 4.3'de de görüldüğü gibi, üretilen hormon bu antijen-antikor çiftine bağlanmış ve Dot-blott görüntülerinde verildiği gibi doğru yapıda olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.9, Şekil 4.10).



Şekil 4.8 Pilot-ölçek biyoreaktörde farklı başlangıç pH'ı koşullarında üretilen hGH'nin WESTERN-BLOTT ile yapısal konfirmasyonu. 1: standart hGH; 2: işaretleyici (PageRuler™ Prestained Protein Ladder); 3: standart hGH; 4: pH₀ 6.75; 5: pH₀ 7.25; 6: pH₀ 7.50; 7: pH₀ 8.00

4.3 hGH Üretim Performanslarının Kıyaslanması

Metabolik mühendislik araştırma programı doğrultusunda geliştirilen rekombinant mikroorganizmaların hGH üretim performansları, kendi içlerinde ve araştırma grubumuzda daha önce geliştirilen (Şentürk 2006) pMK4::pre(subC)::hGH (r-pMK4) plazmidini taşıyan rekombinant *Bacillus subtilis* 1A751 mikroorganizması ile kıyaslanarak en yüksek hGH üretim performansına sahip mikroorganizma, araştırma programının devamında kullanılmak üzere seçilmiştir.

4.3.1 r-pRB373 ve r-pMK4 plazmitlerini taşıyan *B.subtilis* 1A751 hücrelerinin kıyaslanması

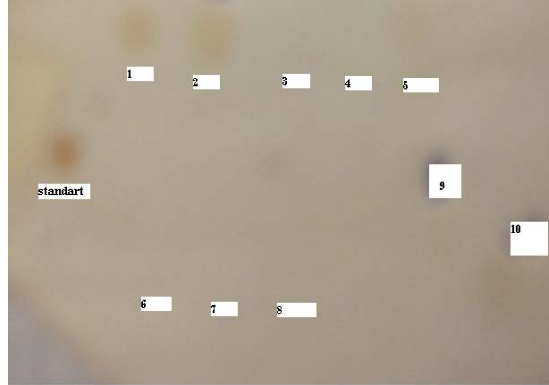
Farklı plazmitler içeren mikroorganizmaların üretim performansları, Çizelge 3.4'de verilen ortam bileşiminde, $V_R=110 \text{ cm}^3$ çalışma hacimli mikrobiyolojik hava filtreli laboratuvar-ölçek biyoreaktörlerde, $T=37 \text{ }^\circ\text{C}$, $N=200 \text{ dk}^{-1}$ işletme koşullarında gerçekleştirilen üretim deneyi ile kıyaslanmıştır. hGH üretimi için gerçekleştirilen proseste, farklı plazmitler

taşıyan *Bacillus subtilis* 1A751 türü rekombinant mikroorganizmaların hGH üretim performansları kıyaslanırken, farklı katı çoğalma ortamları ve r-pRB373 taşıyan mikroorganizmalar için üretim ortamına eklenen antibiyotik derişiminin etkisi incelenmiştir. Prosesin 32. saatinde alınan örnekler, Dot-blott yöntemi ile analizlenerek Çizelge 4.1’de verilen koşullarda mikroorganizmaların hGH üretim performansları gözlenmiştir. En yüksek hGH derişimi ≈ 20 mg/L olarak r-pMK4 taşıyan *B. subtilis* 1A751 mikroorganizması ile üretilmiştir (Şekil 4.9; 1-2). hGH üretiminin kullanılan her iki katı ortamda inkübe edilen mikroorganizmalarda aynı olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.9; 1-2). Aynı koşullar altında, r-pRB373 taşıyan hücrelerin ise r-pMK4 taşıyanların yaklaşık yarısı kadar hGH ürettiği görülmüştür (Şekil 4.9; 9-10). r-pRB373 taşıyan rekombinant mikroorganizma için optimum kanamisin konsantrasyonu 3.5 $\mu\text{g/ml}$ olarak belirlenmiş ve bu derişimin üstünde, mikroorganizmanın hGH üretmediği gözlenmiştir. r-pMK4 taşıyan mikroorganizmalarda hücre-içi üretim gözlenirken, r-pRB373 taşıyanlarda hücre-içi hGH üretimi gözlenmemiştir.

Çizelge 4.1 Rekombinant plazmitlerin kıyaslanmasında kullanılan koşullar

Örnek No	Plazmit	Katı ortam	Antibiyotik derişimi ($\mu\text{g/ml}$)
1	r-pMK4	A	7 ^a
2	r-pMK4	B	7 ^a
3	r-pRB373	A	5 ^b
4	r-pRB373	A	3.5 ^b
5	r-pRB373	A	2.5 ^b
6	r-pRB373	A	5 ^b (K)
7	r-pRB373	B	5 ^b (K)
8	r-pRB373	B	5 ^b
9	r-pRB373	B	3.5 ^b
10	r-pRB373	B	2.5 ^b

^a Seçici antibiyotik; kloramfenikol, ^bSeçici antibiyotik; kanamisin, K; Kontrol deneyi



Şekil 4.9 r-pRB373 ve r-pMK4 plazmitlerini taşıyan *B.subtilis* 1A751 mikroorganizmalarının hGH üretim performanslarının kıyaslanması; 1-2; r-pMK4 taşıyan *B.subtilis* 1A751, 3-10; r-pRB373 *B.subtilis* 1A751

4.3.2 Farklı *Bacillus* türlerinin kıyaslanması

Farklı plazmitler içeren, *Bacillus subtilis* 1A751 ve *Bacillus subtilis* WB700 hücrelerinin üretim performansları, Çizelge 3.4’de verilen ortam bileşiminde, $V_R=110 \text{ cm}^3$ çalışma hacimli mikrobiyolojik hava filtreli laboratuvar-ölçek biyoreaktörlerde, $T=37 \text{ }^\circ\text{C}$, $N=200 \text{ dk}^{-1}$ işletme koşullarında gerçekleştirilen proses ile kıyaslanmıştır. Deney setinde ayrıca, farklı hacimlerde (100, 150, 200 μl) proteaz inhibitörü (Sigma P-2714) eklenerek, inhibitör derişiminin ve üretim ortamına eklenen, $0.25 \text{ kg m}^{-3} \text{ MgSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$, $0.001 \text{ kg m}^{-3} \text{ FeSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$, $0.001 \text{ kg m}^{-3} \text{ ZnSO}_4.\text{H}_2\text{O}$, $7.5 \times 10^{-5} \text{ kg m}^{-3} \text{ MnSO}_4.\text{H}_2\text{O}$, $1.0 \times 10^{-5} \text{ kg m}^{-3} \text{ CuSO}_4.5\text{H}_2\text{O}$ bileşimdeki tuz çözeltisinin hGH üretim performansına etkisi araştırılmıştır. Deney setinde incelenen parametreler, Çizelge 4.2’de verildiği gibidir.

r-pMK4 plazmidini taşıyan *B.subtilis* mikroorganizmasının her dört koşulda da hGH üretimini gerçekleştirdiği Dot-blott analizi ile gözlenmiştir (Şekil 4.10; 7-10). Üretim ortamına; verilen koşullarda tuz çözeltisi eklenmesinin üretimi negatif etkilediği görülmüştür (Şekil 4.10; 7). En yüksek hGH derişimi, üretim ortamına 200 μl proteaz inhibitörü eklenendiğinde $\sim 22 \text{ mg/L}$ olarak r-pMK4 plazmidini taşıyan *B.subtilis* 1A751

mikroorganizması ile gözlenmiştir (Şekil 4.10; 10). Diğer mikroorganizmalar ile hGH üretiminin gerçekleştiği MALDI-ToF MS analizi ile belirlenmesine karşın, Dot-blott yöntemiyle belirlenebilecek derişimin altında kaldığı görülmüştür. Bu sonuçlar doğrultusunda hGH üretimi için r-pMK4 plazmidini taşıyan *B.subtilis* 1A751 mikroorganizması üçüncü araştırma programı için seçilmiştir.

Çizelge 4.2 Rekombinant mikroorganizmaların kıyaslanmasında kullanılan koşullar

Örnek No	Mikroorganizma/plazmit	Proteaz inhibitörü (µl)	Tuz Çözeltilisi
1	<i>B.subtilis</i> WB 700 (r-pRB373)	25	+
2	<i>B.subtilis</i> WB 700 (r-pRB373)	50	+
3	<i>B.subtilis</i> WB 700 (r-pRB373)	50	-
4	<i>B.subtilis</i> 1A751 (r-pRB373)	100	-
5	<i>B.subtilis</i> 1A751 (r-pRB373)	150	-
6	<i>B.subtilis</i> 1A751 (-pRB373)	250	-
7	<i>B.subtilis</i> 1A751 (r-pMK4)	100	+
8	<i>B.subtilis</i> 1A751 (r-pMK4)	100	-
9	<i>B.subtilis</i> 1A751 (r-pMK4)	150	-
10	<i>B.subtilis</i> 1A751 (r-pMK4)	200	-



Şekil 4.10 Farklı mikroorganizmalar ile hGH üretimi; Dot-blott görüntüsü

4.4 Laboratuvar-Ölçekte pH Etkisi

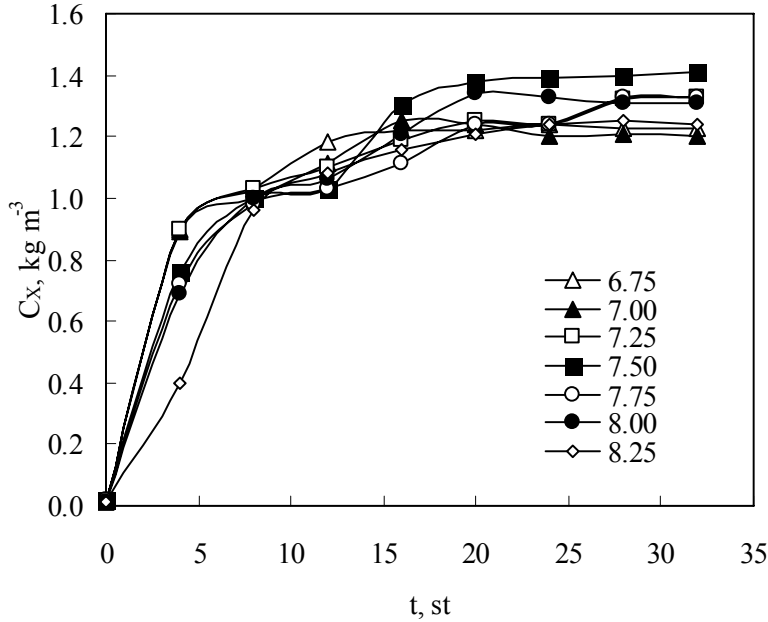
İkinci araştırma programında seçilen rekombinant mikroorganizma ile hGH üretimi prosesinde başlangıç pH'ının etkisi araştırılmıştır. Çizelge 3.4'de verilen ortam bileşiminde, $V_R=110 \text{ cm}^3$ çalışma hacimli mikrobiyolojik hava filtreli laboratuvar-ölçek biyoreaktörlerde, $T=37 \text{ }^\circ\text{C}$, $N=200 \text{ dk}^{-1}$, $C_{G0}=8.00 \text{ kg m}^{-3}$ koşullarında gerçekleştirilen deney seti ile, başlangıç hidrojen iyonu derişiminin hGH üretim performansı, hücre derişimi ve substrat derişimine etkisi, $\text{pH}_0=6.75, 7.00, 7.25, 7.50, 7.75, 8.00, 8.25$ değerlerinde araştırılmıştır. Başlangıç pH değerleri 10 M KOH ile istenilen değere getirilmiştir.

r- *B. subtilis* ile hGH üretimi prosesi boyunca başlangıç pH'ının hücre derişimine etkisi Şekil 4.11'de verilmiştir. Proteaz inhibitörünün eklendiği $t=7 \text{ st}$ 'e kadar hücre derişimi hızlı artmış, $t=7 \text{ st}$ 'den sonra $t=16 \text{ st}$ 'e kadar artmaya devam etmiş, 20 st'den sonra durgunluk fazına ulaşmıştır. Proses süresince en yüksek hücre derişimi $t=20 \text{ st}$ 'de $\text{pH}_0=7.50$ koşulunda 1.40 kg m^{-3} olarak belirlenmiştir.

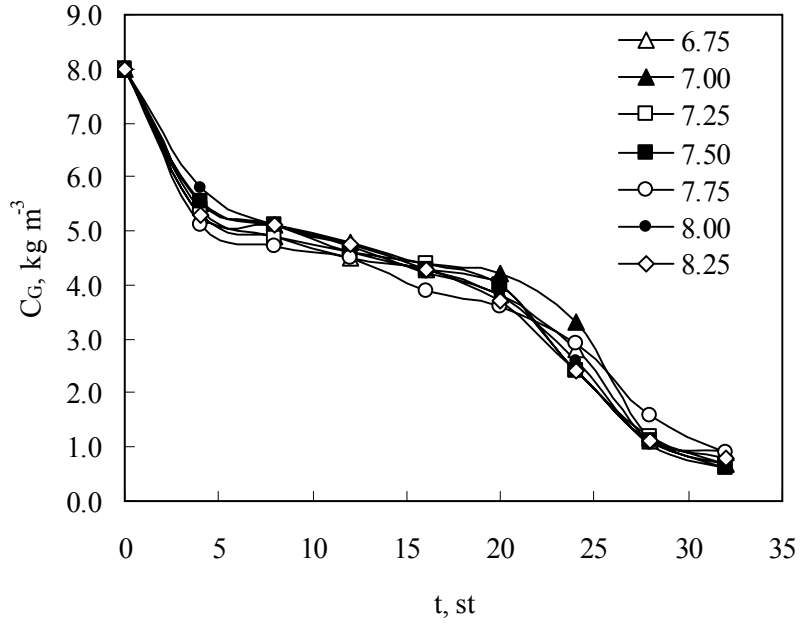
Glukoz derişiminin kalma süresi ve pH_0 ile değişimi değişimi Şekil 4.12'de verilmiştir. Proses süresince farklı pH_0 değerinde glukoz profillerinin tek bir eğri ailesi gibi davrandığı görülmektedir. Glukoz derişiminin hücre derişiminin hızlı arttığı ilk 7 st'de hızlı düştüğü ve tüm koşullar için maksimum hGH derişim aralığında kalan $t = 23-27 \text{ st}$ aralığında, glukoz

derişimde ikinci bir hızlı düşüş olduğu gözlenmiştir. Daha sonraki saatlerde düşüşün yavaşladığı ve proses sonunda tüm koşullarda, glukozun %85'inden fazlasının tüketildiği görülmüştür.

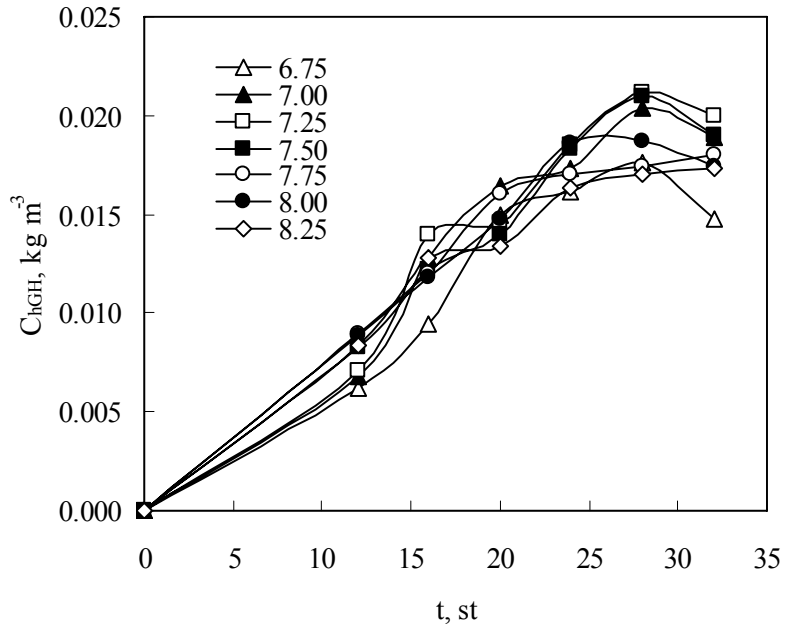
Proses süresince, hGH derişiminin kalma süresi ve pH_0 ile değişimi Şekil 4.13'de verildiği gibidir. En yüksek hGH derişimi $t=28$ st'de, $pH_0=7.25$ ve $pH_0=7.50$ koşullarında birbirine çok yakın derişimlerde, yaklaşık 0.021 kg m^{-3} olarak belirlenmiştir. Tüm koşullarda maksimum hGH derişimine $t=28$ st'de ulaşılmış, bu saatten sonra, hGH derişiminde düşüş gözlenmiştir. Başlangıç pH'ının seçilen uç koşullarında, $pH_0 = 6.75$ ve $pH_0 = 8.25$ 'de, elde edilen maksimum hGH derişimininde düşüş olmuştur. Maksimum hGH derişiminin, hücre derişimi ile paralellik göstermediği, yüksek hücre derişimine ulaşılan, $pH_0 = 8.00$ koşulunda maksimum hGH üretiminin daha az hücre derişimine sahip olan $pH_0=7.25$ koşulunun altında kaldığı görülmüştür.



Şekil 4.11 r- *B. subtilis* ile hGH üretiminde hücre derişiminin kalma süresi ve başlangıç pH'ı ile değişimi. $V=0.11 \text{ dm}^3$, $N=200 \text{ dk}^{-1}$, $T=37 \text{ }^\circ\text{C}$, $C_{G0}=8.0 \text{ kg m}^{-3}$



Şekil 4.12 *r- B. subtilis* ile hGH üretiminde glukoz derişiminin kalma süresi ve başlangıç pH'ı ile değişimi. $V=0.11 \text{ dm}^3$, $N=200 \text{ dk}^{-1}$, $T=37 \text{ }^\circ\text{C}$, $C_{G_0}=8.0 \text{ kg m}^{-3}$



Şekil 4.13 *r- B. subtilis* ile hGH üretiminde hGH derişiminin kalma süresi ve başlangıç pH'ı ile değişimi. $V=0.11 \text{ dm}^3$, $N=200 \text{ dk}^{-1}$, $T=37 \text{ }^\circ\text{C}$, $C_{G_0}=8.0 \text{ kg m}^{-3}$

4.5 Pilot-Ölçekte pH Etkisi

Laboratuvar-ölçek reaktörlerde başlangıç ortam pH'ının hGH üretim performansı üzerindeki etkisinin araştırılmasının ardından, dört başlangıç ortam pH'ı koşulu pilot ölçek biyoreaktörde sınanmak üzere seçilmiştir. Bu kapsamda, $V_R = 0.55 \text{ dm}^3$ çalışma hacimli pilot ölçek biyoreaktörde, $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$, $N = 800 \text{ dk}^{-1}$, $V/Q_0 = 0.5 \text{ vvm}$, $C_{G_0} = 8 \text{ kg m}^{-3}$ koşullarında, $\text{pH}_0 = 6.75, 7.25, 7.50, 8.00$ değerlerinde başlangıç ortam pH'ının çözünmüş oksijen ve pH profilleri, hücre, glukoz, ürün derişimleri ile oksijen aktarımı ve biyoproses karakteristiklerine etkisi araştırılmıştır.

Proses süresince pH profilleri gözlenmiş ve tüm koşullar için hücre derişiminin hızlı arttığı $t = 4 \text{ st}$ 'e kadar ortam pH'ının hızla düştüğü, ve bu düşüşün 27 saatte kadar devam ettiği, bu saatten sonra ise pH değerlerinde hafif bir yükseliş olduğu görülmüş ve $t = 32 \text{ st}$ 'ten sonra profillerde değişim gözlenmemiştir (Şekil 4.14). En yüksek pH değişiminin en yüksek başlangıç pH'ı olan $\text{pH}_0 = 8.00$ koşulunda olduğu ($\Delta\text{pH}=0.96$) ve azalan başlangıç pH değerleri için, proses süresinceki pH düşüşünün de azaldığı görülmüştür. Bu durum proses sonunda, ortam pH'ları arasındaki farkın başlangıçtaki farka oranla daha az olmasına neden olmuştur. hGH üretiminin hızlı olduğu $t = 27 - 32 \text{ st}$ aralığında ortam pH'ında artış gözlenmiştir. Tüm koşullar için, $t = 27 \text{ st}$ 'de ortam pH'ı minimum değerine ulaşmış ve düşük başlangıç pH'ı koşulundan yükseğe giderken sırasıyla, 6.33, 6.80, 6.86, 7.13 olarak ölçülmüştür.

Biyoproses üretim ortamında çözünmüş oksijen derişimlerinin kalma süresi ve başlangıç pH koşullarıyla değişimi Şekil 4.15'de verilmiştir. Hücre derişiminin hızlı arttığı ilk 3.5 - 4 st'de, tüm başlangıç pH koşulları için ortamdaki çözünmüş oksijen derişimi düşmüş, $t = 4 \text{ st}$ 'de ortama proteaz inhibitörü eklenmesinin ardından tekrar yükselme eğilimi göstermiştir. Çözünmüş oksijen derişimleri, $t = 8-26 \text{ st}$ periyodunda salınım göstermiş ve hGH üretiminin hızlandığı ve hücre derişiminin durgunluk fazına geçtiği $t = 26 \text{ st}$ 'den sonra tekrar yükselmiştir. Ortamdaki çözünmüş oksijen derişimi profili $\text{pH}_0 = 7.25, 7.50, 8.00$ koşullarında benzer bir eğilim göstermiş ve $t = 26 \text{ st}$ 'de sıfıra düşmüş, $\text{pH}_0 = 6.75$

koşulunda ise oksijen derişimi $t = 8-26$ periyodunda yaklaşık sabit kalmıştır. Proses sonunda en yüksek çözünmüş oksijen derişimi, $pH_0=8.00$ koşulunda 0.177 mmol/L olarak ölçülmüştür. Tüm koşullar için, hücre derişiminin arttığı ve hGH üretiminin hızlandığı evrelerde çözünmüş oksijen derişiminin azaldığı görülmektedir; bu durum hGH üretim prosesinde oksijen ihtiyacının yüksek olduğunu göstermiştir. Oksijen aktarımının daha etkin olduğu pilot-ölçek reaktörlerde laboratuvar-ölçeğe oranla daha yüksek ürün derişimi elde edilmiş olması da bu sonucu desteklemektedir.

r- *B. subtilis* ile hGH üretimi prosesinde başlangıç pH 'ının hücre derişimine etkisi Şekil 4.16'da verilmiştir. Proteaz inhibitörünün eklendiği $t = 4 \text{ st'e}$ kadar hücre derişimi hızlı artmış, $t = 4-20 \text{ st}$ aralığında proteaz inhibitörünün hücre çoğalması üzerindeki geçici inhibisyonu nedeniyle yaklaşık sabit kalmış, $t = 20 \text{ st'den}$ sonra tekrar artış göstermiş ve $t=24 \text{ st'den}$ sonra durgunluk fazına ulaşmıştır. Proses süresince en yüksek hücre derişimi $t=24 \text{ st'de}$ $pH_0=7.25$ koşulunda 1.92 kg m^{-3} olarak belirlenmiştir.

Glukoz derişiminin kalma süresi ile değişimi Şekil 4.17'de verildiği gibidir. Laboratuvar ölçek deneylerinde olduğu gibi, proses süresince farklı pH_0 değerlerinde glukoz profillerinin tek bir eğri ailesi gibi davrandığı görülmektedir. Proses süresince, hücre derişiminin hızlı artış gösterdiği ilk 4 saatte, glukozun yaklaşık %50'si tüketilmiş ve hücre derişimlerinin tüm koşullarda yakın değerlerde seyretmesine bağlı olarak ilk 4 saat periyodunda glukoz tüketim hızları yaklaşık aynı bulunmuştur. Prosesin ilerleyen saatlerinde, hücre derişiminin daha yüksek olduğu, $pH_0 = 6.75$ ve 7.25 koşullarında glukoz tüketim hızı diğer koşullardan - çok belirgin olmamakla birlikte - bir miktar daha yüksek olmuştur. Proses sonunda ise tüm koşullar için başlangıç glukoz derişiminin %96'sından fazlası tüketilmiştir.

Proses süresince, hGH derişiminin kalma süresi ve pH_0 ile değişimi Şekil 4.18'de verildiği gibidir. Proses süresince en yüksek hGH derişimi laboratuvar-ölçeğe kıyasla 4 saat kayarak, $t = 32 \text{ st'de}$, $pH_0=7.50$ koşulunda, 0.046 kg m^{-3} olarak belirlenmiştir. Tüm koşullarda maksimum hGH derişimi $t=32 \text{ st'de}$ gözlenmiş, daha sonraki saatlerde hGH derişiminde

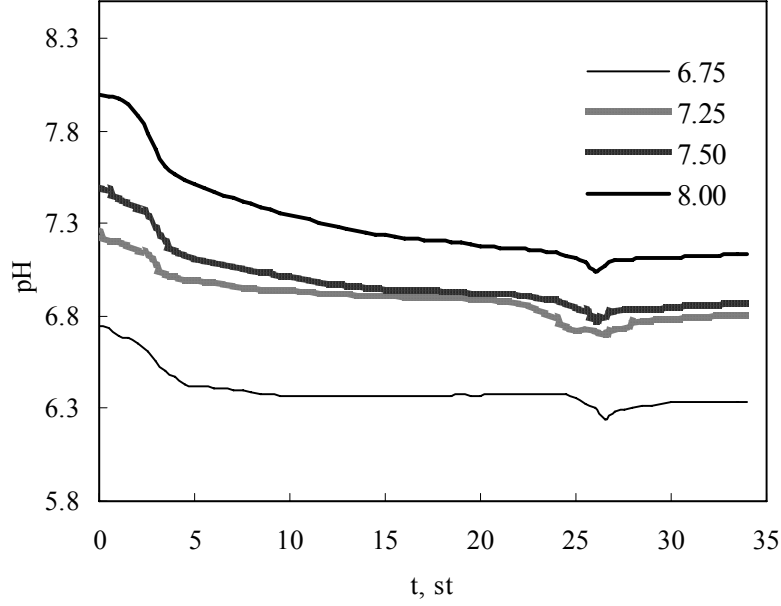
yaklaşık %20 düşüş olmuştur. Proseses süresince tüm koşullar için ulaşılan maksimum değerler arasında, en düşük hGH derişimi $pH_0=6.75$ koşulunda, 0.031 kg m^{-3} olarak ölçülmüştür. hGH üretiminin maksimuma ulaştığı $t = 30-32$ st aralığında ortam pH'ında belirgin bir değişim gözlenmemiş, hücre çoğalması durgunluk fazına gelmiş ve glukoz tüketim hızı sıfıra yaklaşmıştır.

4.6 Oksijen Aktarımı ve Biyoproses Karakteristikleri

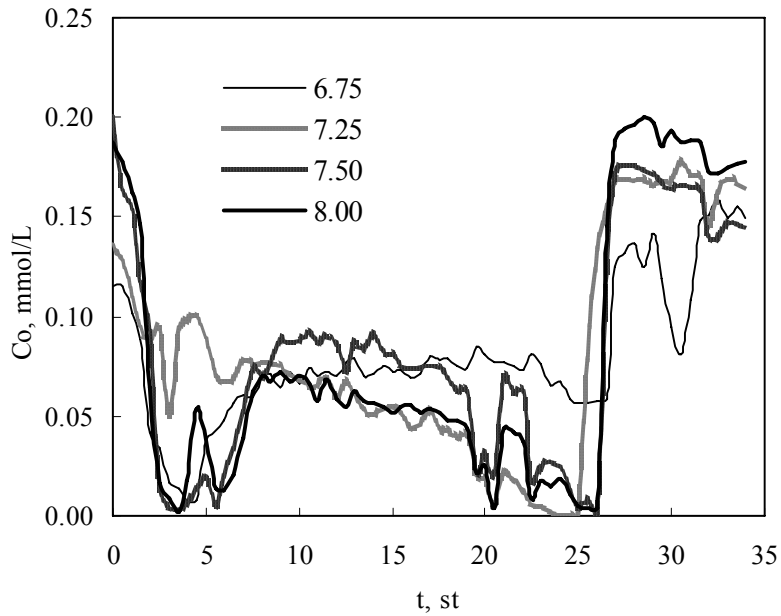
Pilot ölçek biyoreaktör sisteminde, dört farklı başlangıç ortam pH'ı koşulunda, hGH üretim prosesi için sıvı hacmi başına oksijen tüketim hızının ($-r_O$) değişimi araştırılmıştır. Proses süresince oksijen tüketim hızının $pH_0 = 6.75, 7.25, 7.50, 8.00$ koşullarında kalma süresi ile değişimi Çizelge 4.3-4.6'da verilmiştir.

Proses süresince oksijen tüketim hızının farklı ortam başlangıç pH koşullarında değişimi incelendiğinde, tüm koşullar için metabolik faaliyetlerin hızlı olduğu prosesin ilk saatlerinde artış gösterdiği, daha sonra ise kalma süresi ile düşüşe geçtiği görülmektedir. Tüm koşullar içinde en yüksek oksijen tüketim hızı, $t = 4$ st'te, $pH_0 = 7.25$ koşulunda, $2.3 \text{ mol m}^{-3} \text{ s}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

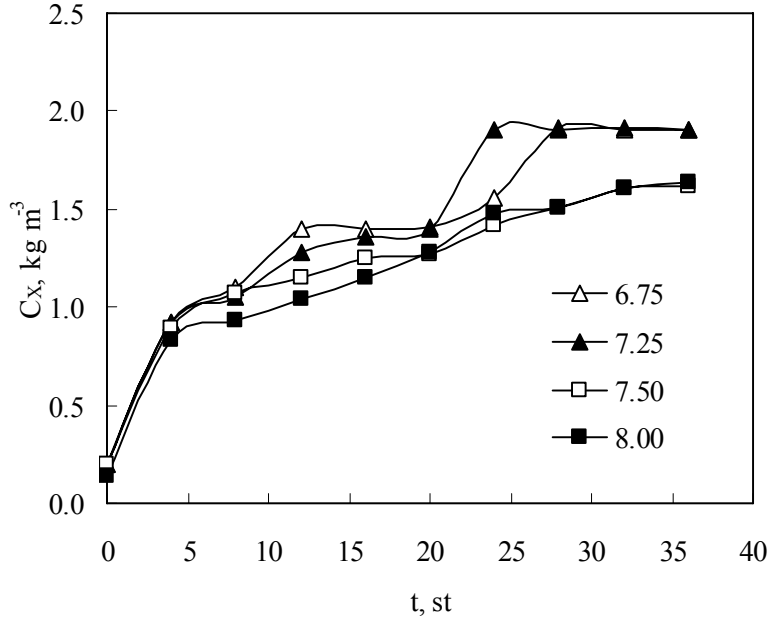
Kütle aktarım katsayıları proses süresince salınım göstermiş ve en yüksek kütle aktarım katsayısı, $K_{La} = 0.033 \text{ s}^{-1}$ olarak, $pH_0 = 6.75$ koşulunda, $t = 24$ st'de gözlenmiştir. Fiziksel kütle aktarım katsayıları değerleri, tüm koşullar için birbirine çok yakın değerlerde, 0.011 s^{-1} olarak hesaplanmıştır. Proses süresince artma faktörleri, $E (K_{La}/ K_{La0})$, kütle aktarım katsayılarındaki salınıma bağlı olarak salınım göstermiştir. Proses süresince, tüm koşullar için en düşük artma faktörü, $E = 1.00$ olarak $pH_0 = 8.00$ koşulunda, $t = 24$ 'de , ve en yüksek $E = 3.00$ olarak $pH_0 = 6.75$ koşulunda, $t = 24$ 'de hesaplanmıştır.



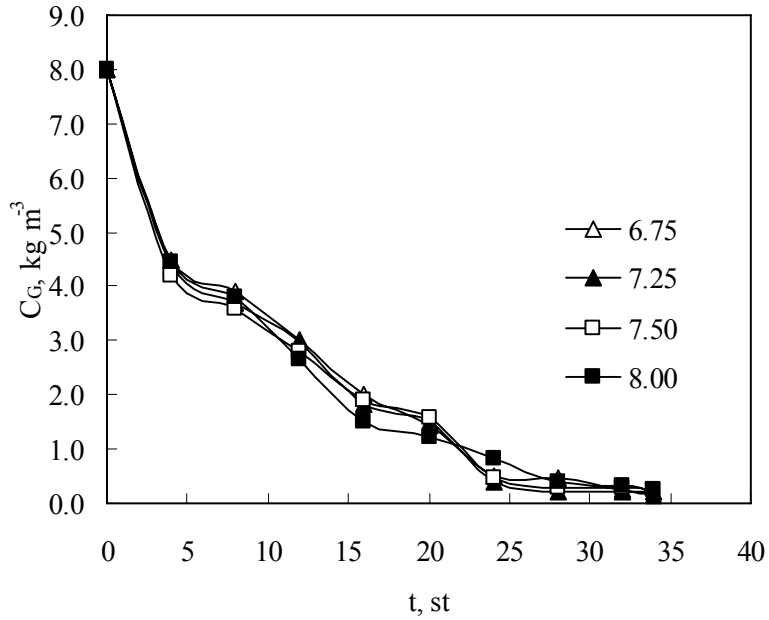
Şekil 4.14 *r-B. subtilis* ile hGH üretiminde ortam pH'ının kalma süresi ve başlangıç pH'ı ile değişimi. $V=0.55 \text{ dm}^3$, $N=800 \text{ dk}^{-1}$, $V/Q_0=0.5 \text{ vvm}$, $T=37 \text{ }^\circ\text{C}$, $C_{G_0}=8.0 \text{ kg m}^{-3}$



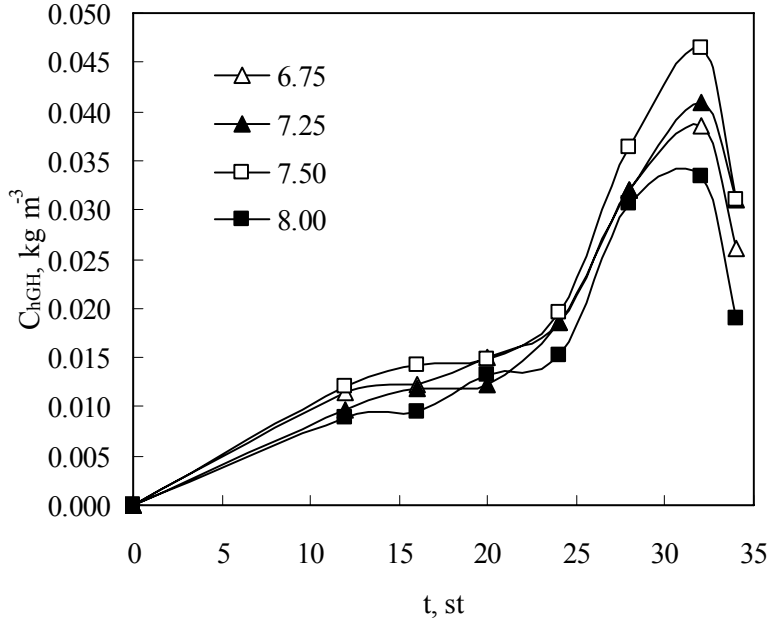
Şekil 4.15 *r-B. subtilis* ile hGH üretiminde çözülmüş oksijen derişiminin kalma süresi ve başlangıç pH'ı ile değişimi. $V=0.55 \text{ dm}^3$, $N=800 \text{ dk}^{-1}$, $V/Q_0=0.5 \text{ vvm}$, $T=37 \text{ }^\circ\text{C}$, $C_{G_0}=8.0 \text{ kg m}^{-3}$



Şekil 4.16 r- *B. subtilis* ile hGH üretiminde hücre derişiminin kalma süresi ve başlangıç pH'ı ile değişimi. $V=0.55 \text{ dm}^3$, $N=800 \text{ dk}^{-1}$, $V/Q_0=0.5 \text{ vvm}$, $T=37 \text{ }^\circ\text{C}$, $C_{G_0}=8.0 \text{ kg m}^{-3}$



Şekil 4.17 r- *B. subtilis* ile hGH üretiminde glukoz derişiminin kalma süresi ve başlangıç pH'ı ile değişimi. $V=0.55 \text{ dm}^3$, $N=800 \text{ dk}^{-1}$, $V/Q_0=0.5 \text{ vvm}$, $T=37 \text{ }^\circ\text{C}$



Şekil 4.18 r- *B. subtilis* ile hGH üretiminde ürün derişiminin kalma süresi ve başlangıç pH'ı ile değişimi. $V=0.55 \text{ dm}^3$, $N=800 \text{ dk}^{-1}$, $V/Q_0=0.5 \text{ vvm}$, $T=37 \text{ }^\circ\text{C}$, $C_{G0}=8.0 \text{ kg m}^{-3}$

Oksijen ihtiyacı, OD, spesifik çoğalma hızının, μ , yüksek olduğu prosesin ilk 0.5 saatlik periyodunda tüm koşullar için en yüksek değerlerine ulaşmış, daha sonraki periyotlarda kalma süresi ile salınım göstermiştir. En yüksek oksijen ihtiyacı, $OD = 76 \text{ mol m}^{-3} \text{ s}^{-1}$ olarak, $pH_0 = 7.50$, koşulunda $t = 24 \text{ st}$ 'de görülmüştür.

Proses süresince Damköhler sayısı (Da), Çalık *et al.* 2000, tüm koşullar için prosesin ilk 0.5 saatlik periyotunda, 1'den küçük, daha sonraki periyotlarda ise tüm koşullar için 1'den büyük değerlerde hesaplanmıştır. En yüksek ve düşük değerleri sırasıyla; 29.33 ve 0.44 olarak $pH_0 = 7.5$ koşulunda sırasıyla, $t = 12$ ve $t = 0.5 \text{ st}$ 'lerde görülmüştür. Etkinlik katsayıları (η) ise proses süresince 1'den küçük değerlerde bulunmuş, en yüksek ve düşük

değerleri sırasıyla; 0.467 ve 0.008 olarak sırasıyla, $pH_o = 7.20$ ve $pH_o = 8.00$ koşullarında görülmüştür.

hGH üretim prosesinde farklı başlangıç ortam pH'ı koşullarında gerçekleştirilen deney verileri kullanılarak tüketilen substrat başına üretilen hücre ve hGH verimleri ($Y_{X/S}$, $Y_{P/S}$), tüketilen oksijen başına üretilen hücre verimi ($Y_{X/O}$), ve üretilen hücre başına üretilen hGH verimi ($Y_{P/X}$) hesaplanmış; değerler Çizelge 4.7'de verilmiştir. Çizelgede görüldüğü gibi, verim katsayıları proses süresince salınım göstermiştir, en yüksek değerler; $Y_{X/S} = 1.33 \text{ kg kg}^{-1}$; $t = 28 \text{ st}$, $pH_o = 6.75$ koşulunda; $Y_{P/S} = 0.134 \text{ kg kg}^{-1}$; $t = 28 \text{ st}$ ve $pH_o = 7.50$ koşulunda; $Y_{P/S} = 0.134 \text{ kg kg}^{-1}$; $t = 28 \text{ st}$, $pH_o = 7.50$ koşulunda; $Y_{P/X} = 0.120 \text{ kg kg}^{-1}$; $t = 20 \text{ st}$, $pH_o = 7.50$ koşulunda; $Y_{X/O} = 1.40 \text{ kg kg}^{-1}$, $t = 8 \text{ st}$ ve $pH_o = 7.25$ koşullarında görülmüştür. Biyoproses süresince hücre derişimi ve spesifik çoğalma hızının değişimi Çizelge 4.8'de verildiği gibidir. Maksimum spesifik çoğalma hızının en yüksek değeri $\mu_{\max} = 0.91 \text{ st}^{-1}$ olarak $t = 0.5 \text{ st}$ 'de, $pH_o = 7.25$ koşulunda, en düşük değeri ise $\mu_{\max} = 0.89 \text{ st}^{-1}$ olarak $t = 0.5 \text{ st}$ 'te, $pH_o = 8.00$ ve $pH_o = 7.50$ koşullarında gözlenmiştir. Proses süresince tüm koşullar için, $t = 12 \text{ st}$ 'e kadar spesifik çoğalma hızı azalmış, $t = 16 \text{ st}$ 'te sifira düştükten sonra, tekrar artmıştır. Hücre çoğalmasının durgunluk fazına geçtiği $t = 28 \text{ st}$ 'den sonra, tüm koşullar için spesifik çoğalma hızı sıfırdır.

Çizelge 4.3 Oksijen aktarım karakteristiklerinin biyoproses süresince değişimi: $N=800 \text{ dk}^{-1}$, $V/Q_0=0.5 \text{ vvm}$, $T=37 \text{ }^\circ\text{C}$, $C_{G_0}=8.0 \text{ kg m}^{-3}$

pH_0	t (st)	$K_L a$ (s^{-1})	$E= K_L a / K_L a_0$	$ro \cdot 10^3$ ($\text{mol m}^{-3} s^{-1}$)	$OTR \cdot 10^3$ ($\text{mol m}^{-3} s^{-1}$)	$OTR_{max} \cdot 10^3$ ($\text{mol m}^{-3} s^{-1}$)	$OD \cdot 10^3$ ($\text{mol m}^{-3} s^{-1}$)	Da OD / OTR_{max}	η ro / OD
6.75	0	0.011	1.00	-	-	-	-	-	-
	0.5	0.013	1.08	0.4	1.10	2.6	1.35	0.519	0.296
	4	-	-	-	-	-	-	-	-
	8	0.015	1.36	1.4	1.95	3.0	18.00	6.00	0.077
	12	0.014	1.27	1.6	1.80	2.8	29.01	10.35	0.055
	16	0.030	2.70	1.6	4.00	6.0	-	-	-
	20	-	-	-	-	-	-	-	-
	24	0.033	3.00	1.3	4.38	6.6	24.00	3.65	0.054
	28	-	-	-	-	-	-	-	-
32	-	-	-	-	-	-	-	-	

Çizelge 4.4 Oksijen aktarım karakteristiklerinin biyoproses süresince değişimi: $N=800 \text{ dk}^{-1}$, $V/Q_0=0.5 \text{ vvm}$, $T=37 \text{ }^\circ\text{C}$, $C_{G_0}=8.0 \text{ kg m}^{-3}$

pH_0	t (st)	$K_L a$ (s^{-1})	$E= K_L a / K_L a_0$	$ro \cdot 10^3$ ($\text{mol m}^{-3} s^{-1}$)	$OTR \cdot 10^3$ ($\text{mol m}^{-3} s^{-1}$)	$OTR_{max} \cdot 10^3$ ($\text{mol m}^{-3} s^{-1}$)	$OD \cdot 10^3$ ($\text{mol m}^{-3} s^{-1}$)	Da OD / OTR_{max}	η ro / OD
7.25	0	0.011	1.00	-	-	-	-	-	-
	0.5	0.013	1.18	0.4	1.17	2.6	1.78	0.68	0.224
	4	0.015	1.36	2.3	1.65	3.0	29.40	9.67	0.078
	8	0.017	1.54	1.9	2.09	3.4	4.10	1.21	0.463
	12	0.012	1.09	0.6	1.69	2.4	-	-	-
	16	0.031	2.81	0.6	4.85	6.2	-	-	-
	20	0.012	1.09	0.4	2.18	2.4	26.40	11.00	0.025
	24	-	-	-	-	-	-	-	-
	28	0.024	2.18	0.5	0.74	4.8	-	-	-
32	0.014	1.27	0.3	0.43	2.8	-	-	-	

Çizelge 4.5 Oksijen aktarım karakteristiklerinin biyoproses süresince değişimi: $N=800 \text{ dk}^{-1}$, $V/Q_0=0.5 \text{ vvm}$, $T=37 \text{ }^\circ\text{C}$, $C_{G_0}=8.0 \text{ kg m}^{-3}$

pH_0	t (st)	$K_L a$ (s^{-1})	$E=K_L a / K_{L a_0}$	$r_o \cdot 10^3$ ($\text{mol m}^{-3} \text{ s}^{-1}$)	$\text{OTR} \cdot 10^3$ ($\text{mol m}^{-3} \text{ s}^{-1}$)	$\text{OTR}_{\max} \cdot 10^3$ ($\text{mol m}^{-3} \text{ s}^{-1}$)	$\text{OD} \cdot 10^3$ ($\text{mol m}^{-3} \text{ s}^{-1}$)	Da $\text{OD} / \text{OTR}_{\max}$	η r_o / OD
7.50	0	0.012	1.00	-	-	-	-	-	-
	0.5	0.014	1.16	0.4	0.06	2.8	1.24	0.44	0.322
	4	0.015	1.25	1.7	2.82	3.0	16.42	5.34	0.104
	8	0.014	1.16	1.2	1.84	2.8	57.13	20.36	0.021
	12	0.013	1.08	1.3	1.83	2.6	76.76	29.23	0.017
	16	0.021	1.75	1.3	2.60	4.2	-	-	-
	20	-	-	-	-	-	-	-	-
	24	0.030	2.50	1.0	5.28	6.0	69.08	11.50	0.014
	28	-	-	-	-	-	-	-	-
32	0.019	1.58	0.7	0.057	3.8	-	-	-	

Çizelge 4.6 Oksijen aktarım karakteristiklerinin biyoproses süresince değişimi: $N=800 \text{ dk}^{-1}$, $V/Q_0=0.5 \text{ vvm}$, $T=37 \text{ }^\circ\text{C}$, $C_{G_0}=8.0 \text{ kg m}^{-3}$

pH_0	t (st)	$K_L a$ (s^{-1})	$E=K_L a / K_{L a_0}$	$r_o \cdot 10^3$ ($\text{mol m}^{-3} \text{ s}^{-1}$)	$\text{OTR} \cdot 10^3$ ($\text{mol m}^{-3} \text{ s}^{-1}$)	$\text{OTR}_{\max} \cdot 10^3$ ($\text{mol m}^{-3} \text{ s}^{-1}$)	$\text{OD} \cdot 10^3$ ($\text{mol m}^{-3} \text{ s}^{-1}$)	Da $\text{OD} / \text{OTR}_{\max}$	η r_o / OD
8.00	0	0.011	1.00	-	-	-	-	-	-
	0.5	0.012	1.09	0.2	0.03	2.4	1.25	0.520	0.160
	4	0.030	2.72	2.0	5.49	6.0	75.76	12.60	0.026
	8	0.011	1.00	1.1	1.43	2.2	-	-	-
	12	0.012	1.09	1.3	1.70	2.4	46.48	-	-
	16	0.027	2.45	1.3	3.91	5.4	10.18	1.89	0.127
	20	-	-	-	-	-	-	-	-
	24	0.030	2.72	0.4	5.46	6.0	53.00	8.83	0.008
	28	-	-	-	-	-	-	-	-
32	0.025	2.27	0.3	0.33	5.0	-	-	-	

Çizelge 4.7 Verim katsayılarının biyoproses süresince değişimi

pH ₀	t, st	Y _{x/s} kg kg ⁻¹	Y _{x/o} kg kg ⁻¹	Y _{p/x} kg kg ⁻¹	Y _{p/s} kg kg ⁻¹
6.75	0.5	-	0.800	-	-
	4	0.210	0.230	-	-
	8	0.310	0.330	-	-
	12	0.150	0.260	0.010	0.002
	16	0.006	-	0.030	0.002
	20	0.110	0.310	0.040	0.004
	24	0.520	0.350	0.040	0.020
	28	1.330	-	0.040	0.060
Toplam		0.220		0.023	0.005
7.25	0.5	-	0.600	-	-
	4	0.190	0.170	-	-
	8	0.250	1.400	-	-
	12	0.160	-	0.002	0.001
	16	0.090	0.110	0.050	0.002
	20	0.370	0.290	0.030	0.005
	24	0.380	0.350	0.040	0.015
	28	0.050	-	-	0.120
Toplam		0.210		0.027	0.005
7.50	0.5	-	0.840	-	-
	4	0.200	0.290	-	-
	8	0.180	0.100	-	-
	12	0.100	0.080	0.002	0.002
	16	0.090	0.890	0.040	0.002
	20	0.120	-	0.120	0.004
	24	0.180	0.120	0.110	0.016
	28	0.930	-	-	0.134
Toplam		0.207		0.030	0.006
8.00	0.5	-	0.820	-	-
	4	0.190	0.060	-	-
	8	0.110	-	-	-
	12	0.090	0.120	0.004	0.002
	16	0.160	0.610	0.023	0.003
	20	0.480	-	0.050	0.090
	24	0.290	0.130	0.070	0.011
	28	0.260	0.090	-	0.037
Toplam		0.200		0.025	0.005

Çizelge 4.8 Hücre derişimi ve spesifik çoğalma hızının biyoproses süresince değişimi

pH₀	t, st	C_X	μ, st⁻¹	μ_{max}, st⁻¹
6.75	0.5	0.200	0.900	0.90
	4	0.918	0.160	
	8	1.101	0.054	
	12	1.397	0.027	
	16	1.403	0.000	
	20	1.407	0.014	
	24	1.562	0.050	
	28	1.910	0.000	
7.25	0.5	0.196	0.910	0.91
	4	0.918	0.120	
	8	1.050	0.042	
	12	1.277	0.030	
	16	1.355	0.000	
	20	1.403	0.050	
	24	1.902	0.030	
	28	1.908	0.000	
7.50	0.5	0.196	0.890	0.89
	4	0.892	0.130	
	8	1.070	0.030	
	12	1.150	0.020	
	16	1.248	0.000	
	20	1.267	0.017	
	24	1.423	0.021	
	28	1.506	0.000	
8.00	0.5	0.190	0.900	0.90
	4	0.844	0.120	
	8	0.936	0.026	
	12	1.040	0.025	
	16	1.150	0.025	
	20	1.277	0.032	
	24	1.478	0.043	
	28	1.512	0.000	

5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

‘Metabolik mühendislik ve reaksiyon mühendisliği prensipleriyle hücre-dışı rekombinant insan büyüme hormonu üretimi’ konulu yüksek lisans araştırma programı kapsamında, birinci aşamada proteaz enzimlerini kodlayan genleri silinmiş *Bacillus* türü mikroorganizmalar ile hGH üretimi için rekombinant mikroorganizmalar geliştirilmiştir. Araştırma programının ikinci aşamasında, geliştirilen mikroorganizmaların hGH üretim performansları $T=37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $N=200\text{ dk}^{-1}$, $C_{G0}=8.00\text{ kg m}^{-3}$ koşullarında $V_R=110\text{ cm}^3$ çalışma hacimli mikrobiyolojik hava filitreli laboratuvar-ölçek biyoreaktörlerde yapılan deney programı ile kıyaslanarak hGH üretim biyoprosesi için en uygun mikroorganizma seçilmiştir. Araştırma programının üçüncü aşamasında, seçilen mikroorganizma ile hGH üretim prosesine başlangıç ortam pH’sının etkisi mikrobiyolojik hava filitreli laboratuvar-ölçek biyoreaktörlerde yukarıda verilen koşullarda araştırılmıştır. Araştırma programının dördüncü aşamasında $V_R=550\text{ cm}^3$ çalışma hacimli pilot-ölçek biyoreaktörlerde $T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $N = 800\text{ dk}^{-1}$, $Q_0/V=0.5\text{ vvm}$, $C_{G0}=8.00\text{ kg m}^{-3}$ işletim koşullarında başlangıç ortam pH’sının hGH üretim prosesine etkisi biyoproses ve oksijen aktarım karakteristikleri ile birlikte araştırılmıştır.

5.1 Metabolik Mühendislik Programı

Bacillus türü mikroorganizmalar ile terapatik protein üretiminde karşılaşılan en önemli dar-boğaz, mikroorganizmanın gösterdiği proteaz aktivitesi nedeniyle, ürünün parçalanmasıdır. Bu çalışmada, proteaz genleri silinmiş mikroorganizmalar ile hGH üretimi için metabolik mühendislik programı yapılarak, bu dar-boğazın aşılması amaçlanmıştır. Bu program kapsamında üç alternatif tasarım yapılmıştır (EK 1). Alternatif tasarımlar için seçilen plazmitlerin her üçünün de küçük, yüksek kopyalama sayılı ve heterolog protein üretim kapasitelerinin yüksek olması nedeniyle, promotör farkı, klonlanacak gen büyüklüğü ve klonlama başarı olasılığının yüksekliği dikkate alınarak seçim yapılmıştır. Mikroorganizmanın başlatıcısını kullanarak hGH üretimi yapan $pMK4::pre(subC)::hGH$ plazmidinin hGH üretim performansının yüksek olduğunun, daha önce araştırma grubumuzda yapılan (Şentürk 2006) çalışmada görülmüş olması nedeniyle *vegII* başlatıcı taşıyan pRB374 plazmidinin ilk etapta

denenmemesi gerektiğine karar verilmiştir . pRB373 plazmidinin ise kopyalama sayısı, büyüklük ve başlatıcı taşımaması açısından daha önce denenmiş olan pMK4::*pre(subC)::hGH* plazmidine benzer özellikler taşıması nedeniyle pMK4::*pre(subC)::hGH* plazmidine alternatif olabileceğine karar verilmiştir. Bunun yanı sıra, pRB373 plazmidine klonlanacak olan genin daha küçük olması ve klonlamada PCR yöntemine gereksinim duyulmaması başarılı klonlama olasılığını artırarak bu plazmidi avantajlı kılmıştır. Bunlara ek olarak, seçilen mikroorganizmaların hGH üretim performanslarının daha kısa sürede sınanması ve karşılaştırılması için, başarılı klonlama olasılığı diğer alternatiflerden yüksek olan pRB373 plazmidi ile metabolik mühendislik programı gerçekleştirilmiştir.

Metabolik mühendislik araştırma programı kapsamında, proteaz aktivitesi inhibe edilmiş mikroorganizmalar ile hGH üretimi için, *Bacillus subtilis* WB 700 ve *Bacillus subtilis* 1A751 konak-hücrelerine transforme edilmek üzere rekombinant pRB373::*pre(subC)::hGH* (r-pRB373) plazmidi tasarlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, rekombinant plazmit geliştirilmesi için, hibrit-genin araştırma gurubumuzda daha önce geliştirilen r-pUC19 (pUC19::*pre(subC)::hGH*) plazmidinden restriksiyon enzimleri ile kesilerek alınacağı ve aynı restiksiyon enzim konumlarından kesilen pRB373 plazmidine ligasyon tepkimesi ile klonlanacağı şekilde genetik mühendisliği tasarımı yapılmıştır. r-pUC19'dan ekstrakte edilen hibrit-genin metaryal yöntemde verilen koşullarda kesilerek klonlama için uygun moleküler yapıya getirilen pRB373 plazmidine G/V=5 olan koşulda klonlanması başarılmıştır. Hibrit-genin pRB373 *Bacillus-E.coli* shuttle plazmidine klonlanmasının ardından, r-pRB373 *E.coli* XLI-Blue'da çoğaltılıp izole edilen r-rRB373 plazmidinin, sırasıyla yedi ve iki proteaz geni silinmiş *Bacillus* grubu mikroorganizmalardan *Bacillus subtilis* WB700 ve *Bacillus subtilis* 1A751 konak-hücrelerine transformasyonu gerçekleştirilmiştir.

5.2 Üretilen hGH'nin Yapısal Analizi

Üretilen hormonun aktifliğinin yapısal karakterizasyonu, MALDI-ToF MS sistemi ile analizlenmiştir. Analizler sonucunda *B.subtilis* 1A751 (r-pMK4 veya r-pRB373 taşıyan) ve *B.subtilis* WB 700 (r-pRB373 taşıyan) mikroorganizmaları ile üretilen hGH'nin molekül ağırlıkları sırasıyla 22132, 22132, 22111 Da olarak belirlenmiş, molekül ağırlığı 22126 Da olarak belirlenen standart hGH'den sırasıyla %0.03, %0.03 ve %0.06 sapma göstermiştir. Bu sapma değerlerinde, her üç mikroorganizma ile üretilen hGH'nin yapısının doğala özdeş olduğu görülmüştür. Tüm mikroorganizmaların, 22 Da büyüklüğündeki, aktif hGH'nin yanı sıra izomeri olan 20 Da'luk hGH'yi de ürettiği belirlenmiştir. Her ne kadar, tüm mikroorganizmalara ait kromotogramlarda (Şekil 4.7b) 20 Da'luk hGH'ye ait pikler, 22 Da'luktan daha büyük olsa da, MALDI-ToF MS analizinin derişim ölçen bir yöntem olmaması ve fento-mol mertebesinde hassasiyet ile ölçüm yapması dikkate alındığında, bu yöntem aktif yapıdaki hGH derişiminin (22 Da), izomer hGH derişimine (20 Da) oranının belirlenmesinde kullanılamaz.

Üretilen hGH'nin aktifliği, literatürde hGH araştırmalarında kullanılan yöntemler olan Dot-blott ve WESTERN-BLOTT analizi ile yapılmıştır. Bu yöntemlerde sırası ile Poliklonal Rabbit Anti-human Growth Hormone Primer ve Horseradish Peroxidase Label Goat-Anti Rabbit IgG ve Poliklonal Mause Anti-human Growth Hormone Primer ve Horseradish Peroxidase Label Goat-Anti Mouse IgG (H+L) sekonder antikor-antijen çifti kullanılarak gerçekleştirilen analizlerle, üretilen hGH'nin yapısının doğruluğu kanıtlanmıştır.

5.3 Mikroorganizma Seçimi

Kolonlamanın başarılmasının ardından, laboratuvar-ölçek biyoreaktörlerde, tanımlı ortamda yapılan deneyler ile r-pRB373 plazmidini taşıyan *B.subtilis* 1A751 ile r-pMK4 plazmidini taşıyan *B.subtilis* 1A751 (Şentürk 2006) rekombinat mikroorganizmalarının hGH üretim performansları kıyaslanarak, r-pMK4 plazmidini taşıyan mikroorganizmaların, hücre-dışı hGH üretim performansının r-pRB373'i taşıyanların

yaklaşık iki katı olduğu görülmüş ve 0.02 g/L olarak belirlenmiştir (Şekil 4.9). Ayrıca her iki mikroorganizmanın hücre-içi hGH üretimleri ölçülmüş ve sadece r-pMK4 plazmidini taşıyan mikroorganizmaların hücre-içi hGH üretimi gerçekleştirdiği gözlenmiştir. Bu durum, r-pRB373'i taşıyan mikroorganizmaların ürettikleri hormonun tamamını hücre-dışına salgıladıklarını göstermiştir.

Aynı mikroorganizmaya transforme edilen iki plazmidin hGH üretim performansına etkisinin araştırılmasının ardından, r-pRB373 plazmidi taşıyan *B. subtilis* WB 700, *B. subtilis* 1A751 ve r-pMK4 plazmidini taşıyan *B. subtilis* 1A751 laboratuvar-ölçek biyoreaktörlerde kıyaslanmış ve en yüksek hGH derişimi, daha önce olduğu gibi r-pMK4 plazmidini taşıyan *B. subtilis* 1A751 ile 0.02 g/L olarak elde edilmiştir (Şekil 4.10). Bu sonuç yedi proteaz geni silinmiş olan *B. subtilis* WB 700 mikroorganizmasının, her ne kadar daha az proteaz aktivitesi gösteriyor olsa da, muhtemelen proteaz genlerinin silinmesinden kaynaklanan bir metabolik değişim nedeni ile hGH üretimini inhibe ettiğini göstermiştir. Bu nedenle araştırma programının devamı için r-pMK4 taşıyan *B. subtilis* 1A751 mikroorganizması seçilmiştir.

5.4 pH Etkisi

Araştırma programının üçüncü aşamasında, seçilen rekombinant mikroorganizma ile hGH üretimi prosesinde başlangıç pH'ının etkisi deney ve bulgularda verilen koşullarda $pH_0=6.75, 7.00, 7.25, 7.50, 7.75, 8.00$ ve 8.25 değerlerinde araştırılmıştır.

Tüm koşullar için, proteaz inhibitör kokteylinin eklendiği $t = 7$ st'den sonra hücre derişimlerindeki artışın $t = 12$ st'e kadar geçici inhibisyona uğradığı görülmüştür. Bu durum, araştırma grubumuzda tamamlanan çalışmada (Şentürk 2006) verildiği gibi proteaz inhibitör kokteylinin hücre çoğalmasını inhibe ettiği sonucuyla uyum göstermiştir. Biyoproses süresince, ilk yedi saatlik periyotta, başlangıç ortam pH'ındaki değişim hücre çoğalmasını etkilememiş, ancak bu periyottan sonra başlangıç ortam pH'ının hücre derişimine etkisi artmış ve en yüksek hücre derişimi $pH_0=7.50$ koşulunda 1.40 kg m^{-3} olarak ölçülmüştür (Şekil 4.11).

Tüm koşullar için glukoz derişim profilleri benzer bir değişim göstermiş ve en yüksek glukoz tüketimi, hücre derişiminin en yüksek olduğu $pH_o = 7.50$ koşulunda gerçekleşmiştir. Tüm koşullar için, proses süresince başlangıçtaki glukozun %90'ından fazlası tüketilmiştir (Şekil 4.12). *Bacillus* türleri için hücre-içi pH değeri 7.5'tur (Frankena *et al.* 1986) ve ortam pH'ı ile değişmez. Farklı ortam pH'larında mikroorganizmanın hücre-içi pH'ını sabit tutmak için harcadığı enerji deęiőeçeęinden metabolik faaliyetlerin ve buna bağlı olarak glukoz tüketiminin farklılık göstermesi beklenebilir. hGH üretim prosesinde glukoz tüketim hızlarının birbirine yakın değerlerde olması ürün, hücre, yan-ürün oluşum hızlarının birlikte analizi ile aydınlatılabilir, bu nedenle organik ve amino asit analizlerinin yapılması gerekmektedir.

Seçilen pH aralığında, tüm koşulların hGH üretimi için uygun olduğu görülmüştür. Seçilen aralıkta, en yüksek hGH derişimi $t = 28$ st'de, $pH_o=7.25$ ve $pH_o=7.50$ koşullarında birbirine çok yakın derişimlerde, yaklaşık 0.021 kg m^{-3} olarak ölçülmüş; bu saatten sonra, *Bacillus* türlerinin gösterdiği proteaz aktivitesi nedeniyle hGH derişiminde düşüş gözlenmiştir. Bu düşüş, proses süresince ürünün ortamdan ayrılmasının hGH üretim prosesinin verimini artıracağını işaret etmektedir. Maksimum hGH derişiminin, hücre derişimi ile paralellik göstermediği, yüksek hücre derişimine ulaşılan, $pH_o = 8.00$ koşulunda maksimum hGH üretiminin, daha düşük hücre derişimine ulaşılan $pH_o=7.25$ koşulunun altında kalması, başlangıç ortam pH'ındaki değişimin, hücre çoğalması ve ürün derişimi üzerinde farklı etki yaptığını göstermiştir (Şekil 4.13).

Laboratuvar ölçek reaktörlerde elde edilen sonuçlar doğrultusunda, sınanan tüm koşullarda hGH üretiminin gerçekleştiğinin belirlenmesinin ardından, oksijen aktarımın etkisiyle bu sonuçların nasıl deęiőeçeęinin, oksijen aktarım ve biyoproses karakteristiklerinin başlangıç pH'ındaki değişimden nasıl etkileneceğinin araştırılması için dört başlangıç ortam pH'ı koşulu pilot-ölçek biyoreaktörde sınanmak üzere seçilmiştir. Pilot-ölçekte araştırılacak olan başlangıç pH'ı değerleri, laboratuvar-ölçek sonuçlarına göre en yüksek üretimin gerçekleştiği 7.25 ve 7.50 koşulları ile, daha asitik

ve bazik bölgelerde yer alan ve ürün derişiminde düşüşe neden olduğu belirlenen 6.75 ve 8.00 koşulları olarak seçilmiştir.

Proses süresince, hücre derişiminin hızlı arttığı t=4 st'ye kadar ortam pH'ında hızlı bir düşüş gözlenmiş ve bu eğilim t= 27 st'ye kadar azalarak devam etmiştir. Bu saatten sonra, hafif bir yükselişin ardından profiller platoya ulaşmıştır. Proses süresince ortama en fazla hidrojen iyonu salgılanan koşul, pH₀ = 8.00 olarak belirlenmiştir (ΔpH=0.96), düşen başlangıç pH'ı değerleriyle birlikte bu miktarda da düşüş gözlenmiştir. Bu durum, hücre ve ürün derişimlerini etkilemekle birlikte, muhtemelen organik asit ve amino asit derişimlerini de etkilemiştir, ortam pH'ındaki değişimin nedeninin daha net anlaşılabilmesi için yan-ürün dağılım profillerinin, özellikle ortama salgılanan organik asit derişimlerinin belirlenmesi gerekmektedir. pH₀= 7.25 koşulu için tüm biyoreaktör karakteristikleri, araştırma grubumuzda tamamlanan (Şentürk 2006) çalışmanın MOT2 koşulu ile aynıdır.

Biyoreaktör deneylerinde, biyoproses ortamındaki çözülmüş oksijen derişimlerinin kalma süresi ve başlangıç pH koşullarıyla değişimi gözlenmiştir. Tüm başlangıç pH koşulları için ortamdaki çözülmüş oksijen derişiminin hücre derişiminin hızlı arttığı ilk 4 saattlik periyotta hızla düştüğü, t = 4-26 saatlik periyotta salınım gösterdiği ve t=26 saatten sonra tekrar yükseldiği gözlenmiştir. Proses sonunda en yüksek ve en düşük çözülmüş oksijen derişimleri sırasıyla; pH = 8.00 ve pH = 7.50 koşullarında gözlenmiştir.

Biyoproses süresince ulaşılan en yüksek ve en düşük hücre derişimi değerleri sırasıyla, pH₀ = 6.75 ve 7.25 koşulunda t=24 st'de 1.92 kg m⁻³ ve pH₀ = 8.00 koşulunda t=24 st'de 1.60 kg m⁻³ olarak belirlenmiştir. Seçilen aralıkta görece daha düşük başlangıç pH'ı koşullarında hücre derişiminin daha yüksek olduğu ve artan başlangıç pH'ı değerleri ile düştüğü görülmüştür. Tüm koşullar için, hücre derişimindeki artış t=4 st'de eklenen proteaz inhibitörü kokteyli ile yavaşlamış, ancak pH₀=6.75 ve 7.25 koşullarında protez inhibitörünün hücre derişimi üzerindeki inhibisyon etkisi, t=20 st'den sonra gözlenmezken, diğer iki koşulda bu etki proses sonuna kadar devam etmiştir (Şekil 3.16). pH₀= 7.25 koşulu için tüm biyoreaktör karakteristikleri, araştırma grubumuzda

tamamlanan (Şentürk 2006) çalışmanın MOT2 koşulu ile aynıdır. Bu koşulun, hücre derişimi profili, tamamlanan çalışma ile karşılaştırıldığında tüm saatler için ölçülen hücre derişimi değerleri %95'in üzerinde uygunluk ile elde edilmiştir (Şekil 5.1).

Glukoz derişimi profilleri laboratuvar-ölçek deneylerinde olduğu gibi, tek bir eğri ailesi gibi davranış göstermiş ve ortam pH'ındaki değişimde olduğu gibi tüm koşullar için aynı karakteristik yapıya sahip olduğu görülmüştür. Bu durum, başlangıç ortam pH'ının hücre-içi metabolik akıların yönünü değiştirmedeği sonucunu göstermektedir. Tüm koşullarda, hücre derişimindeki artışa bağlı olarak prosesin ilk dört saatinde glukoz tüketiminin hızlı olduğu ve proses sonunda glukozun %96'sından fazlasının tüketildiği belirlenmiştir. $pH_0 = 7.25$ koşulu için elde edilen glukoz tüketim profili araştırma grubumuzda tamamlanan çalışmanın MOT2 koşulu ile karşılaştırıldığında pH profillerindeki değişimin glukoz tüketim hızına da yansıdığı ve $t = 16-20$ st'lerindeki sapma haricinde aynı olduğu görülmüştür (Şekil 5.2).

Farklı başlangıç pH'ı koşullarında gerçekleştirilen proseslerde hGH derişiminin $t=12$ st'den itibaren arttığı, $t=26$ st'de artışın ivme kazandığı ve $t=32$ st'de tüm koşullarda en yüksek hGH derişimine ulaşıldığı görülmüştür. Bu saatten sonra, proteaz aktivitesi nedeniyle hGH derişiminde yaklaşık %20 düşüş olmuştur. En yüksek hGH üretimi $H_0=7.50$ koşulunda, $t=32$ st'de 0.046 kg m^{-3} olarak ölçülmüş ve aynı örneğin iki kez analizlenmesi ile hGH ölçümlerinin %98 oranında uyum gösterdiği belirlenmiştir. Bu çalışmada belirlenen hGH derişimleri, araştırma grubumuzda daha önce gerçekleştirilmiş olan çalışmada (Şentürk 2006) aynı koşullarda elde edilen ile %92 uyum göstermiştir.

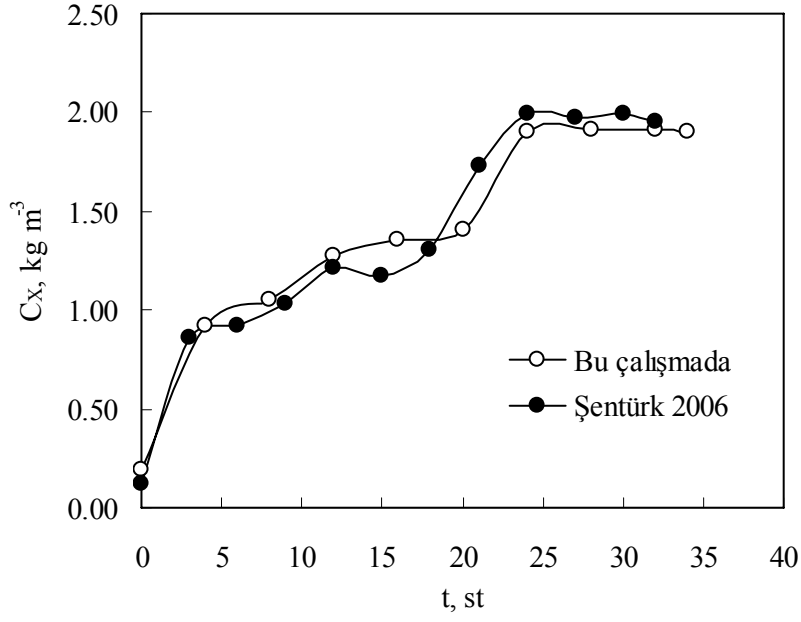
Sıvı faz hacimsel kütle aktarım katsatısı, $K_L a$ ve artma faktörü, E sırasıyla 0.011-0.033 ve 1.00- 3.00 aralığında değişmiştir, en yüksek değerlerine $t = 24$ st'de, $pH = 6.75$ koşulunda ulaşmıştır. Bioproses süresince, oksijen tüketim hızları, metabolik faaliyetlerin hızlı olduğu, $t = 8-16$ st aralığına kadar artmış, daha sonra düşen metabolik aktiviteye bağlı olarak düşüş göstermiştir. Ancak, hücrenin tekrar hızlı çoğalmaya başladığı $t = 20-24$ st aralığında oksijen tüketim hızlarında artış gözlenmemiş olması beklenen bir sonuç değildir,

bu durumun daha iyi analizi için yan ürün profillerinin belirlenmesi ve hücrenin oksijen tüketimini yavaşlatan metabolik faaliyetin ne olduğunun analizi gerekmektedir.

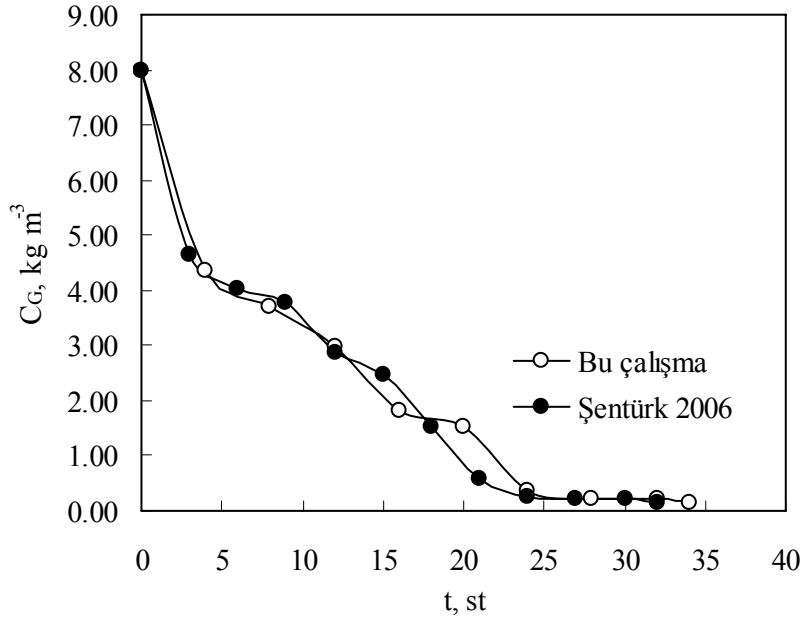
Proses süresince hız kısıtlayıcı basamak analizi için, Damköhler sayıları (Da) hesaplanmış ve tüm koşullar için prosesin ilk 0.5 saatlik bölümünde Da sayısının bire yakın olduğu dolayısıyla, biyokimyasal reaksiyon ve kütle aktarım kısıtlamalarının aynı oranda etkin olduğu görülürken, daha sonraki saatlerde genel olarak Da sayısının birin üstünde değerlere

ulaştığı ve kütle aktarımı kısıtlamasının baskın olduğu görülmüştür. Etkinlik katsayısı (η) analizleri ile, tüm koşullar için oksijen tüketim hızının ($-r_O$) oksijen ihtiyacının (OD) altında kaldığı sonucuna varılmıştır, en yüksek ve en düşük etkinlik katsayıları sırasıyla, 0.008 ve 0.468 olarak $pH_o = 8.00$ ve $pH_o = 7.25$ koşullarında hesaplanmıştır.

hGH üretim prosesinde farklı başlangıç ortam pH 'ı koşullarında gerçekleştirilen deney verileri kullanılarak tüketilen substrat başına üretilen hücre, hGH verimi ($Y_{X/S}$, $Y_{P/S}$), tüketilen oksijen başına üretilen hücre verimi ($Y_{X/O}$), ve üretilen hücre başına üretilen hGH verimi ($Y_{P/X}$) hesaplanmış ve verim katsayıları proses süresince salınım göstermiştir, en yüksek değerler; $Y_{X/S} = 1.33 \text{ kg kg}^{-1}$, $t = 28 \text{ st}'de$, $pH_o = 6.75$ koşulunda, $Y_{P/S} = 0.134 \text{ kg kg}^{-1}$, $t = 28 \text{ st}'de$, $pH_o = 7.50$ koşulunda, $Y_{P/S} = 0.134 \text{ kg kg}^{-1}$, $t = 28 \text{ st}'de$, $pH_o = 7.50$ koşulunda, $Y_{P/X} = 0.120 \text{ kg kg}^{-1}$, $t = 20 \text{ st}'de$, $pH_o = 7.50$ koşulunda, $Y_{X/O} = 1.40 \text{ kg kg}^{-1}$, $t = 8 \text{ st}'de$, $pH_o = 7.25$ koşulunda görülmüştür. Biyoproses süresince hücre derişimi ve spesifik çoğalma hızının değişimi Çizelge 4.8'de verildiği gibidir. Maksimum spesifik çoğalma hızının en yüksek değeri $\mu_{max} = 0.91 \text{ st}^{-1}$ olarak $t = 0.5 \text{ st}'de$, $pH_o = 7.25$ koşulunda, en düşük değeri ise $\mu_{max} = 0.43 \text{ st}^{-1}$ olarak $t = 0.5 \text{ st}'de$, $pH_o = 6.75$ ve $pH_o = 7.50$ koşullarında gözlenmiştir. Proses süresince tüm koşullar için, $t = 12 \text{ st}'ye$ kadar spesifik çoğalma hızı azalmış, $t = 16 \text{ st}'de$ ortama eklenen proteaz inhibitör kokteylinin yarattığı geçiçi inhibisyon nedeni ile hücre çoğalmasının durması nedeni ile sıfıra düştükten sonra, tekrar artmıştır. Hücre çoğalmasının durgunluk fazına geçtiği $t = 28 \text{ st}'den$ sonra, tüm koşullar için spesifik çoğalma hızı sıfırdır.



Şekil 5.1 *r-B. subtilis* ile hGH üretiminde hücre derişiminin kalma süresi ve başlangıç pH'ı ile değişimi. $V=0.55 \text{ dm}^3$, $N=800 \text{ dk}^{-1}$, $V/Q_0=0.5 \text{ vvm}$, $T=37 \text{ }^\circ\text{C}$, $C_{G_0}=8.0 \text{ kg m}^{-3}$.



Şekil 5.2 *r-B. subtilis* ile hGH üretiminde glukoz derişiminin kalma süresi ve başlangıç pH'ı ile değişimi. $V=0.55 \text{ dm}^3$, $N=800 \text{ dk}^{-1}$, $V/Q_0=0.5 \text{ vvm}$, $T=37 \text{ }^\circ\text{C}$, $C_{G_0}=8.0 \text{ kg m}^{-3}$.

İnsan büyüme hormonu rhGH üretimine ilişkin süreli yayınlarda yer alan çalışmalarda *Escherichia coli* (Goeddel *et al.* 1979; Ikehara *et al.* 1984; Gray *et al.* 1985; Hsiung *et al.* 1986; Becker and Hsiung, 1986; Keto *et al.* 1987; Hsiung *et al.* 1989; Jensen and Carlsen, 1990; Jorgensen *et al.* 1998; Shin *et al.* 1998; Zhang *et al.* 1998; Bylund *et al.* 2000; Petra *et al.* 2000; Castan *et al.* 2002; Soaares *et al.* 2003; Tabandeh *et al.* 2004), *Bacillus brevis* (Kanjo *et al.* 1997), *Bacillus subtilis* (Nakayama *et al.* 1988; Franchi *et al.* 1991; Özdamar *et al.* 2008) ve *Pichia pastoris* (Trevino *et al.* 2000; Eurwilaichitr *et al.* 2002; Çalık *et al.* 2008) konak hücreleri ile yapılan çalışmalar yer almaktadır. Bu çalışmalar içinde, biyoreaktör işletim parametrelerinin etkisi Nakayama *et al.* 1988, Jensen and Carlsen 1989, Shin *et al.* 1998, Bylund *et al.* 2000, Castan *et al.* 2002, Tabandeh *et al.* 2004, Özdamar *et al.* 2008 tarafından yapılan çalışmalarda araştırılmıştır. hGH üretiminde biyoreaktör işletim parametrelerinden oksijen aktarımının etkisinin incelendiği ilk çalışma araştırma grubumuzda tamamlanmıştır (Sentürk 2006), bu yüksek çalışması ise hGH üretimde başlangıç ortam pH'ının etkisinin incelendiği ilk çalışmadır.

5.5 Toplu Sonuçlar ve Öneriler

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

Birinci Araştırma Programı: Metabolik Mühendislik

1. pRB373::*pre(subC)::hGH* plazmidi tasarlanmış ve üretilerek *Bacillus subtilis* 1A751 hücresine aktarılmıştır.
2. pRB373::*pre(subC)::hGH* plazmidi tasarlanmış ve üretilerek *Bacillus subtilis* WB700 hücresine aktarılmıştır.

İkinci Araştırma Programı: rhGH için en uygun r-B.subtilis seçimi

3. Tasarlanan ve üretilen iki rekombinant mikroorganizma ve araştırma grubunda daha önce üretilen pMK4::*pre(subC)::hGH* taşıyan *Bacillus subtilis* 1A751 ile üretilen hGH'nin doğru molekül büyüklüğünde olduğu MALDI-ToF MS ile belirlenmiştir.

4. r-pRB373 ve r-pMK4 plazmitlerini taşıyan *r-B.subtilis* 1A751 konak-hücreleri ile üretilen hGH'nin Dot-blott analizi ile doğru yapıda olduğu bulunmuştur.
5. İki farklı plazmidi taşıyan *r-B.subtilis* 1A751 ve *r-B.subtilis* WB700 konak-hücreleri hGH üretim potansiyelleri açısından Dot-blott ölçümleri ile kıyaslanmış r-pMK4 plazmitlerini taşıyan *r-B.subtilis* 1A751, en iyi bulunmuştur.

Üçüncü Araştırma Programı: Laboratuvar-ölçekte hGH üretimi ve pH₀ etkisi

6. Başlangıç pH değeri 6.75, 7.00, 7.25, 7.50, 7.75, 8.0, 8.25 olan koşullarda;
 - en yüksek 1.4 kg m⁻³ olan hücre derişimine t=20 st'de, pH₀=7.5 koşulunda;
 - en yüksek 0.021 kg m⁻³ olan hGH derişimine t=28 st'de, pH₀=7.25-7.50 koşulunda ulaşılmıştır.
7. Başlangıç pH değeri farkı glukoz tüketiminde belirgin bir fark yaratmamış; proses sonunda %95'in üzerinde glukoz dönüşümü elde edilmiştir.

Dördüncü Araştırma Programı: Pilot-ölçekte hGH üretimi ve pH₀ etkisi

8. Başlangıç pH değeri 6.75, 7.25, 7.50 ve 8.00 olan koşullarda, Q₀/V=0.5 vvm ve N=800 dk⁻¹de;
 - en yüksek 1.9 kg m⁻³ olan hücre derişimine t=24 st'de, pH₀=6.75 koşulunda;
 - en yüksek 0.046 kg m⁻³ olan hGH derişimine t=32 st'de, pH₀=7.50 koşulunda ulaşılmıştır.
9. Başlangıç pH değeri farkı glukoz tüketiminde belirgin bir fark yaratmamış; proses sonunda %97'nin üzerinde glukoz dönüşümü elde edilmiştir.
10. Tüketilen toplam substrat başına oluşan hücre miktarı en yüksek pH₀=6.75 koşulunda %22 olmuştur.
11. Tüketilen toplam substrat başına oluşan ürün miktarı en yüksek pH₀=7.50 koşulunda %0.6 olmuştur.
12. Oluşan toplam hücre başına oluşan ürün miktarı en yüksek pH₀=7.50 koşulunda %3 olmuştur.
13. Spesifik çoğalma hızı en yüksek prosesin başlarında ve 0.91 st⁻¹ değeri ile pH₀=7.25 koşulunda elde edilmiştir; tepkime boyunca değeri giderek azalmıştır.

14. Tüm koşullarda artma faktörü, E değeri 1-3 mertebesinde olup proste oksijen aktarımı hızı oksijen tüketim hızına göre daha yavaştır yani proses kütle aktarımı kısıtlamalıdır ve “yavaş tepkime” rejimine uymaktadır.
15. Damköhler sayısı değerlerine göre prosesin başlarında hem oksijen aktarımı hem de tepkime prosesi kontrol ederken $t > 4$ st kolullarında proses kütle aktarımı kısıtlamalı olarak yürümektedir.
16. Oksijen tüketim hızına göre etkinlik katsayısı ise her koşulda bir değerinin altındadır.
17. hGH ölçümlerinin tekrarlanırlığı %98'in üstündedir.
18. Aynı koşullarda 30 ay süre fark ile yapılan iki pilot-ölçek deney sonuçları kıyaslandığında genel olarak hücre ve glukoz derişimi ölçümlerinin %90'ın üzerinde uyumlu olduğu; maksimum hGH derişimlerinde yapılan hatanın ise %8 olduğu bulunmuştur.

Rekombinant *Bacillus* türü mikroorganizmalar kullanılarak hücre-dışı rhGH üretimi araştırmalarında, verim ve seçimliliği artırmak üzere aşağıdaki öncelikli incelemelere ihtiyaç duyulduğu düşünölmektedir:

1. Proses süresince üretilen amino asit ve organik asitler analizlenerek, metabolik akı analizi yapılması ve üretimdeki muhtemel darboğazların belirlenmesi
2. Araştırma sonucunda bulunan en iyi başlangıç ortam pH'ı koşulunda pilot-ölçekte oksijen aktarımı etkilerinin araştırılması
3. Farklı oksijen aktarımı ve başlangıç pH'ı koşullarında gen ekspresyonlarının belirlenmesi ve kısıtlayıcı basamak doğrultusunda metabolik mühendislik tasarımının geliştirilmesi
4. Kompleks ortam tasarımı ile hGH verim ve seçimliliğindeki değişimlerin incelenmesi.

KAYNAKLAR

- Aiba, S., Humphery, A.E., and Milles, N.F., 1973. *Biochemical Engineering*, Academic Press Inc. New York.
- Arbige, M. V., Bulthuis, B.A., Schultz, J., and Crabb, D., 1993. Fermentation of *Bacillus* In: *Bacillus subtilis* and Other Gram-positive Bacteria: biochemistry, physiology, and molecular genetics. Sonenshein, A.L., Hoch, J.A. and Lorich, R. (Editors). American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Archibald, A.R., Hancock, I.C., and Harwood, C.R., 1993. Cell Wall Structure, Synthesis, and Turnover. In: *Bacillus subtilis* and Other Gram-positive Bacteria: biochemistry, physiology, and molecular genetics. Sonenshein, A.L., Hoch, J.A. and Lorich, R. (Editors). American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Atkinson, B., and Mavituna, F., 1991. *Biochemical Engineering and Biotechnology*. 2nd Edition, Handbook, Macmillan Publishers Ltd.,
- Bailey, J.E. and Ollis, D.F., 1986. *Biochemical Engineering Fundamentals*, 2nd ed. McGraw Hill. New York.
- Bailey, J.E., Chen, R., Hatzimanikatis, V., Yap, W.M.G.J. and Postma, P.W., 1997. Metabolic consequences of phosphotransferase (PTS) mutation in a phenylalanine-producing recombinant *E. coli*. *Biotechnology Progress*, 13:768-775.
- Bayram, A., 2002. Serine alkali protease enziminin hücreiçi üretimini kontrol eden alanin- ve serin- grubu amino asitlerin enzim üretimine etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara.
- Becker, G.W. and Hsiung, H.M., 1986. Expression, secretion and folding of human growth hormone in *Escherihia coli*. *FEBS Letters*, 204(1):145-150.
- Blanch, W.H. and Clark, S.D., 1997. *Biochemical Engineering*, Marcel Dekker, Inc. New York.
- Bloom, V.M., Freyer, G.A. and Micklos, D.A., 1996. *Laboratory DNA Science*, The Benjamin/Cummings Publishing Company, INC.

- Breitling, R., Gerlach, D., hartmann, M. and Behnke, D., 1989. Secretory expression in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* of human interferon alpha genes directed by staphylokinase signals. *Molecular and General Genetics*, 217(2-3):384-391.
- Bron, S., 1990. Plasmids. In: *Molecular Biology Methods for Bacillus*. Harwood, C.R. and Cutting, S.M.(Editors). John Wiley & Sons Ltd, New York.
- Brückner, R., 1992. A Series of Shuttle Vectors for *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Gene*, 122, 187-192.
- Buchanan, R.E., and Gibbons, N.E., 1974. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th Edition, The Williams Wilkins Company, Baltimore.
- Bullock, W. O., Frenandez, J. M. and Short, J. M., 1987. XL1-Blue- A High Efficiency Plasmid Transforming *recA Escherichia coli* Strain with β -Galactosidase Selection. *Bitechniques*, 5, 376.
- Burnette, W.N., 1981. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analalitical Biochemistry*, 112 (2), 195-203.
- Bylund, F., Castan, A., Mikkola, R., Andide, A. and Larsson, G., 2000. Influence of Scale-Up on the Quality of Recombinant Human Growth Hormone. *Biotechnology and Bioengineering*, 69(2):119-128.
- Castan, A., Nasman, A. and Enfors, S.O., 2002. Oxygen enriched air supply in *Escherichia coli* processes: production of biomass and recombinant human growth hormone. *Enzyme and Microbial Technology*, 30:847-854.
- Chang, C.N., Rey, M., Bochner, B., Heyneker, H.L., and Gray, G., 1987. High-leandl secretion of human growth hormone by *Escherihia coli*. *Gene*, 55:189-196.
- Chen, G.J., Qiu, N. and Page, M.P., 2002. Uniandrsal Restriction Site-Free Cloning Method Using Chimeric Primers. *BioTechniques*, 32:516-520.
- Çalik, P., Çalik, G. and Özdamar, T.H., 1997a. Effect of Oxygen Transfer Strategy on Product Distribution of Serine Alkaline Protease Fermentation. *Proc. Euro. 8 th Congress on Biotechnology, Budapest, 1: 289.*
- Çalık, P., 1998. Serine Alkali Protease Enzimi Üretimi için Biyoproses Geliştirilmesi. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara.

- Çalık, P., Çalık, G. and Özdamar, T.H., 1998. Oxygen transfer effects in serine alkaline protease fermentation by *Bacillus licheniformis*: Use of citric acid as the carbon source. *Enzyme and Microbial Technology*. 23:451-461.
- Çalık, P., Çalık, G., Takaç, S. and Özdamar, T.H., 1999. Metabolic flux analysis for serine alkaline protease fermentation by *Bacillus licheniformis* in a defined medium: Effect of the oxygen transfer rate. *Biotechnology and Bioengineering* 64(2):151-167.
- Çalık, P., Çalık, G. and Özdamar, T.H., 2000. Oxygen-transfer strategy and its regulation effects in serine alkaline protease production by *Bacillus licheniformis*. *Biotechnology and Bioengineering*, 69(3):301-311.
- Çalık, P., Takaç, S., Çalık, G. and Özdamar, T.H., 2000. Serine alkaline protease overproduction capacity of *Bacillus licheniformis*. *Enzyme and Microbiol Technology*. 26(1):45-60.
- Çalık, P. and Özdamar, T.H., 2002. Bioreaction Network Flux Analysis for Industrial Microorganisms: A review. *Reviews in Chemical Engineering* 18(6):553-596.
- Çalık P., Tomlin, G., Oliver, S.G. and Özdamar, T.H., 2003. Overexpression of a serine alkaline protease in *Bacillus licheniformis* and its impact on the metabolic reaction network. *Enzyme and Microbial Technology* 32(6):706-720.
- Çalık., P., Bilir, E., Özçelik, İ.Ş., Çalık, G. and Özdamar, T.H., 2004. Inorganic compounds have dual effect on recombinant protein production: influence of anions and cations on serine alkaline protease production. *Journal of Applied Microbiology*, 96:194-200.
- Çalık., P., Orman, M.A., Çelik, E., Halloran, M., Çalık, G., Özdamar, T.H., 2008. Expression system for synthesis and purification of recombinant human growth hormone in *Pichia pastoris* and structural analysis by MALDI-ToF mass spectrometry. *Biotechnology Progress*.
- Çelik, E., Çalık, P., Halloran., M., Oliver, S.G. Production of recombinant human erythropoietin from *Pichia pastoris* and its structural analysis. *J.or Appl. Microbiology*, 103(6), 2084-2094
- Erincin, H., 1998. Hidrojen İyonu Derişimi ve Kontrolunun Alkali Protease Üretimine Etkisinin Reaksiyon Mühendisliği Prensipleriyle İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara.

- Eurwilaichitr, L., Roytroku, R., Suprosongsin, C., Manitchotpisit, P. and Panyim, S., 2002. Glutamic acid and alaline spacer is not necessary for removal of MF α -1 signal sequence fused to the human growth hormone produced from *Pichia pastoris*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18 : 493-495.
- Franchi, E., Maisano, F., Testori, S.A., Galli, G., Toma, S., Parente, L., Ferra, F. and Grandi, G., 1991. A new human growth hormone production process using a recombinant *Bacillus subtilis* strain. *Journal of Biotechnology*, 18:41-54.
- Frost, G.M. and Moss, A.D., 1987. Production of Enzymes by Fermentation. Rehm, N.J., Reed, G., (Eds), Vol 7a, VCH, Weinheim, Germany, Pp: 65-213.
- Glazer, A. N. and Nikaido, H., 1995. *Microbial Biotechnology: Fundamentals Of Applied Biotechnology*, W.H. Freeman And Company, USA.
- Glick, B.R. and Pasternak, J.J., 1994. *Molecular Biotechnology: Principles And Applications Of Recombinant DNA*, ASM Press, Washington D.C.
- Goeddel, D.V., Heyneker, H.L., Hozumi, T., Arentzen, R., Itakura, K., Yansura, D.G., Ross, M.J., Miozzari, G., Crea, R. and Seeburg, P.H., 1979. Direct expression in *Escherichia coli* of a DNA sequence coding for human growth hormone. *Nature*, 281:544-548.
- Gray, G.L., Baldridge, J.S., McKeown, K.S., Heyneker, H.L. and Chang, C.N., 1985. Periplasmic production of correctly processed human growth hormone in *Escherichia coli*: natural and bacterial signal sequences are interchangeable. *Gene*, 39:247-254.
- Harwood, C.R., Rosemary, D.C. and Ian, C.H., 1990. The *Bacillus* Cell Envelope and Secretion. In: *Molecular Biology Methods for Bacillus*. Harwood, C.R. and Cutting, S.M.(Editors). John Wiley & Sons Ltd, New York.
- Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K. and Pease, L.R., 1989. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*, 77:51-59.
- Horton, R.M., Ho, S.N., Jeffrey, K., Pullen, J.K., Hunt, H.D., Cai, Z. and Pease, L.R., 1993. Gene Splicing by Overlap Extension. *Methods in Enzymology*, 217:270-279.

- Horton, R.M., Hunt, H.D., Ho, S.N., Pullen, J.K. and Pease, L.R., 1989. Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene*, 77:61-68.
- Hsiung, H.M., Cantrll, A., Luirink, J., Oudega, B., Andros, A.J. and Becker, G.W., 1989. Use of bacteriocin release protein in *E. coli* for excretion of human growth hormone into the culture medium, *Bio/technology*, 7:267-271.
- Hsiung, H.M., Mayne, N.G. and Becker, G.W., 1986. High-leandl expression efficient secretion and folding of human growth hormone in *Escherichia coli*, *Bio/technology*, 4:991-995.
- Ikehara, M., Ohtsuka, E., Tokunaga, T., Taniyama, Y., Iwai, S., Kitano, K., Miyamoto, S., Ohgi, T., Sakuragawa, Y., Fujiyama, K., Ikari, T., Kobayashi, M., Miyake, T., Shibahara, S., Ono, A., Ueda, T., Tanaka, T., Baba, H., Miki, T., Sakura, A., Oishi, T., Chisaka, O. and Matsubara, K., 1984. Synthesis of a gene for human growth hormone and its expression in *Escherihia coli*. *The Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 81: 5956-5960.
- İleri, N. and Çalık, P., 2006. Effects of pH strategy on endo- and exo- metabolome profiles and sodium potassium hydrogen ports of beta-lactamase-producing *Bacillus licheniformis*. *Biotechnology Progress*, 22(2):411-419.
- Jensen, E.B. and Carlsen, S., 1990. Production of Recombinant Human Growth Hormone in *Escherihia coli*: Expression of Different Precursors and Physiological Effects of Glucose, Acetate, and Salts. *Biotechnology and Bioengineering*, 36:1-11.
- Kajino, T., Saito, Y., Asami, O., Yamada, Y., Hirai, M. and Udata, S., 1997. Extracellular production of an intact and biologically actiand human growth hormone by the *Bacillus brevis* system. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 19(4):227-31.
- Kalender, N., 2000. Serine Alkali Protease Geni *subC Bacillus* Plasmidlerine Klonlanarak Rekombinant Biyokatalizör ile Alkali Protease Üretimi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara.
- Karas, M., Hillenkamp, F., 1998. Laser desorption of proteins with molecular masses exceeding 10000 Daltons. *Anal. Chem*, 60, 2299-2301.

- Kato, C., Kobayashi, T., Kudo, T., Furusato, T., Murakami, Y., Tanaka, T., Baba, H., Oishi, T., Ohtsuka, E., Ikehara, M., Yanagida, T., Kato, H., Moriyama, S. and Horikoshi, K., 1987. Construction of an excretion and/or and extracellular production of human growth hormone from *Escherichia coli*. *Gene*, 54:197-202.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227, 680-685.
- Lehninger, A.L., 1979. *Biochemistry*, 2nd ed., Worth Publishers Inc., New York.
- Lewin, B., 1994. *Genes VII*, Oxford University Press, Oxford.
- Nagarajan, V., 1993. Protein secretion. In: *Bacillus subtilis* and Other Gram-positive Bacteria: biochemistry, physiology, and molecular genetics. Sonenshein, A.L., Hoch, J.A. and Lorich, R. (Editors). American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Nakayama, A., Ando, K., Kawamura, K., Mita, I., Fukazawa, K., Hori, M., Honjo, M. and Furutani, Y., 1988. Efficient secretion of the authentic mature human growth hormone by *Bacillus subtilis*. *Journal of Biotechnology*, 8:123-134.
- Nielsen, J. and Villadsen, J., 1994. *Bioreaction Engineering Principles*, New York.
- Özçelik, İ.Ş., 2003. Genetik Mühendisliği ve Metabolik Yoluzi Mühendisliği Teknikleriyle L-Fenilalanin Üretimi İçin Biyoproses Geliştirilmesi. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara.
- Özdamar, T.H., Şentürk, Yılmaz, Ö.D., Çalık, G., Çelik, E., Çalık, P. 2008. Expression system for recombinant human growth hormone production by *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Progress*. 2008. in press
- Patra, A.K., Mukhopadhyay, R., Mukhija, R., Krishnan, A., Garg, L.C. and Panda, A.K., 2000. Optimization of inclusion body solubilization and refolding of recombinant human growth hormone from *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 18: 182-192
- Pekin, B., 1980. *Biyokimya Mühendisliği*. Ege Üniv. Kim. Fak. Yayınları, İzmir
- Pollock, M.R., 1965. Purification and properties of Penicillinases from two strains of *Bacillus licheniformis*: a chemical, physicochemical and physiological comparison. *Biochemical Journal*, 94:666-675.

- Rainer, B.W., 1990. Determination Method of Volumetric Oxygen Transfer K_{La} in Bioreactors. *Chemical and Biochemical Engineering Q.*, 4(4), 185-186.
- Sambrook, J. and Russell, D.W., 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, the third edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Shin, C.S., Hong, M.S., Kim, D.Y., Shin, H.C. and Lee, J., 1998. Growth-associated synthesis of recombinant humanglucagon and human growth hormone in high-cell-density cultures of *Escherichia coli*. *Applied Microbiol Biotechnology*, 49:364-370.
- Shin, N.K., Kim, D.Y., Shin, C.S., Hong, M.S., Lee, J. and Shin, H.C., 1998. High-leandl production of human growth hormone in *Escherihia coli* by a simple recombinant process. *Journal of Biotechnology*, 62:143-151.
- Simonen, M. and Palva, I., 1993. Protein Secretion in *Bacillus* species. *Microbiological Reviews*. 57(1):109-137.
- Simons, G., Remaut, E., Allet, B., Devos, R. and Fiers, W., 1984. High leandl expression of human interferon gamma in *Escherichia coli* under control of the PL promoter of bacteriophage lambda. *Gene*, 28:55-64.
- Smith, Wood, 1991. *Molecular Biology and Biotechnology*. Chapman & Hall Limited, Hong Kong.
- Sonenshein, A.L., Hoch, J.A. and Losick, R., 2002. *Bacillus subtilis* and its closest relatiands: from genes to cells. ASM Press, Washington D.C.
- Soares, C.R.J., Gomide, F.I.C., Ueda, E.K.M, Bartolini, P., 2003. Periplasmic expression of human growth hormone via plasmid vectors containing the λP_L promoter: use of HPLC for product quantification. *Protein Engineering*, 16: 1113-1138.
- Stephanopoulos, G., 1998. *Metabolic Engineering. Biotechnology & Bioengineering*, Vol.58, 119-120.
- Stephanopoulos, G. and Vallino, J.J., 1991. Network Rigidity and Metabolic Engineering Metabolite Overproduction. *Science.*, 252: 1675-1681.
- Stephanopoulos, G.N., 1998. *Metabolic Engineering. Biotechnology & Bioengineering*, vol:58, 119-120.

- Stephanopoulos, G.N., Aristidou, A.A. and Nielsen, J., 1998. Metabolic Engineering: Principals and Methodologies. Academic Press, New York.
- Strobl, J.S. and Thomas, M.J., 1994. Human Growth Hormone. Pharmacological Reviews, 46(1):1-34.
- Stryer, L., 1995. Biochemistry. 4th Edition, W.H. Freeman and Company, New York.
- Şentürk, B., 2006. Reaksiyon mühendisliği prensipleriyle rekombinant insan büyüme hormono üretimi için bioproses geliştirilmesi. Y.Lisans tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara
- Tabandeh, F., Shojaosadati, S.A., Zomorodipour, A., Khodabandeh, M., Sanati, M.H. and Yakhehali, B., 2004. Heat-induced production of human growth hormone by high cell density cultivation of recombinant *Escherichia coli*. Biotechnology Letters, 26:245-250.
- Towbin, H., Staehelin J. and Gordon J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. The Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 76, 4350-4354.
- Trevino, L.L., Viader-Salvado, J.M., Barrera-Saldana, H.A., Guerrero-Olazarán, M., 2000. Biosynthesis and secretion of recombinant human growth hormone in *Pichia pastoris*. Biotechnology Letters, 22: 109-114.
- Uchida, H., Naito, N., Asada, N., Wada, M., Ikeda, M., Kobayashi, H., Asanagi, M., Mori, K., Fujita, Y., Konda, K., Kusuhara, N., Kamioka, T., Nakashima, K., Honjo, M., 1997. Secretion of authentic 20-kDa human growth hormone in *Escherichia coli* and properties of the purified product. Journal of Biotechnology, 55: 101-112
- Watson, J.D., Gilman, M., Witkowski, J. and Zoller, M., 1992. Recombinant DNA. 2nd Edition, Scientific American Books, W.H. Freeman and Co.
- Wong, S.L., 1995. Advances in the use of *Bacillus subtilis* for the expression and secretion of heterologous proteins. Current Opinion in Biotechnology, 6: 517-522
- Yamakawa, M., Sugisaki, K., Morimoto, M., Tanaka, M., Yamamoto, M., Ichikawa, T., and Nakashima, K., 1989. Effects of gene dosage on the expression of human growth hormone cDNA in *Escherichia coli*. Biochimica et Biophysica Acta, 1009:156-160.
- Yang, Y. T., Bennet, G. N. and San, K.Y., 1998. Genetic and Metabolic Engineering.

- Process Biotechnology. EJB Electronic Journal of Biotechnology, vol. 1, no.3.
- Yanisch-Perron, C., Viera, J. and Messing, J., 1985. Improved M13 Phage Cloning Vectors and Host Strains: Nucleotide Sequences of the M13mp18 and pUC19 Vectors. *Gene*, 33, 103-119.
- Zang, X.W., Sun, T., Liu, X., Gu, D.X. and Huang, X.N. 1998. Human growth hormone production by high cell density fermentation of recombinant *Escherichia coli*, *Process Biochemistry*. 33:683-686.
- Wu, X.C., Lee, W., Tran, L., Wong, S.L., 1991. Engineering a *Bacillus subtilis* expression-secretion system with a strain deficient in six extracellular proteases. *Journal of Bacteriol.*, 173: 4952-4958.

EKLER

EK 1 Metabolik Mühendislik Tasarımları

EK 2 Primer Tasarımları

EK 3 Genetik Mühendisliği Programı İşaretliyileri

EK 4 Genetik Mühendisliği Programı Çözeltileri

EK 5 Mikroorganizma Derişim Kalibrasyonu

EK 6 Glukoz Derişimi Kalibrasyonu

EK 7 hGH Derişimi Kalibrasyonu

EK 8 SDS-PAGE ve WESTERN-BLOTT yöntemlerinde kullanılan çözeltiler

EK 9 Dinamik Yöntem Örnek Grafik ve Sonuçları

EK 1 Metabolik Mühendislik Tasarımları

Tasarım I: *pre(subC)::hGH::pRB373* plazmidi tasarımı

Daha önce araştırma grubumuzda geliştirilen *-pre(subC)::hHG* hibrit geninin klonlanmış olduğu *pre(subC)::hGH::pMK4* plazmidinden kesilerek izole edilimesi, kanamisin rezistans genini taşıyan bir plazmit olan pRB373'e klonlanmasını içeren Tasarım I aşağıda verilmiştir..

-pre(subC)::hHG geninin pRB373 plazmidine klonlanacak bölümünün nükleik asit dizini, primer dizinleri, promotör, subC, Hgh:

5' _ttttcataaaatgaatcagatggagcaatctcctgtcattcggccctcgggacctttccctgccaggctgaagcggct
tattcatactttcgaactgaacattttctaaaacagttattaataacaaaaatttaaatggctctcaaaaaataggcctacc
atataattcattttttctataataaattaacagaataattggaatagattatattatccttctatttaaatttctgaataaagaggagg
agagtgagtaatgatgaggaaaagagttttggcttgggatgctgacggcctcatgctcgtgttcacgatggcattcagcgat
tccgcttctgcttcccaactataaccactatctcgtctattcgataacgctatgcttcgtgctcatcgttctcatcagctggcctttgac
acctaccaggagtgaagaagcctatatcccaaaggaacagaagtattcattcctgcagaacccccagacctccctctgtttct
cagagtctattcgcacacctccaacaggaggaaacacaacagaaatccaacctagagctgctccgcatctccctgctgctc
atccagctgtggctggagcccgtgcagttcctcaggagtgtcttcgccaacagcctagtgtacggcgcctctgacagcaacgt
ctatgacctcctaaaggacctagaggaaggcatccaaacgctgatggggaggctggaagatggcagccccggactgggc
agatcttcaagcagacctacagcaagtgcacacaaactcacacaacgatgacgcactactcaagaactacgggctgctctac
tgettcaggaaggacatggacaaggctgagacattcctgcgcatcgtgcagtccgctctgtggagggcagctgtggetteta
gctgcccgggtggcatccctgtgacctccccagtgctctcctgcc_3'

Tasarlanan ve kullanılan (Şentürk 2006) primerler:

1. Restriksiyon enzim konumu *Xba*I (TCTAGA)) + *-pre(subC)* ileri primeri

5'_GCTCTAGAGCGCAATCTCCTGTCATTCG_3'

2. hGH'na tamamlayıcı uzantı + *-pre(subC)* geri primeri

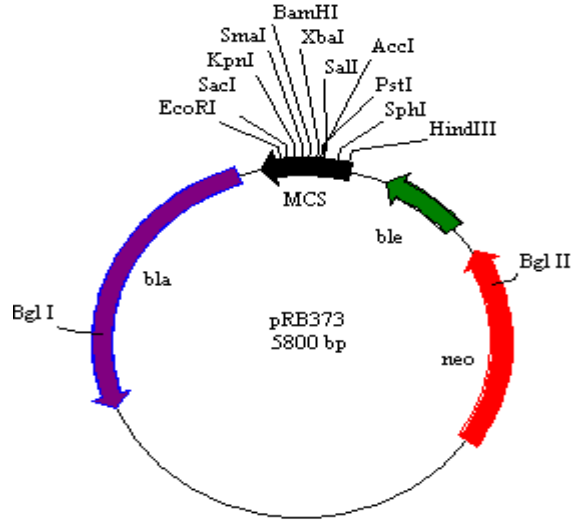
5'_GGTATAGTTGGGAAAGCAGAAGCGGAATCG_3'

3. *-pre(subC)*'a tamamlayıcı uzantı + hGH ileri primeri

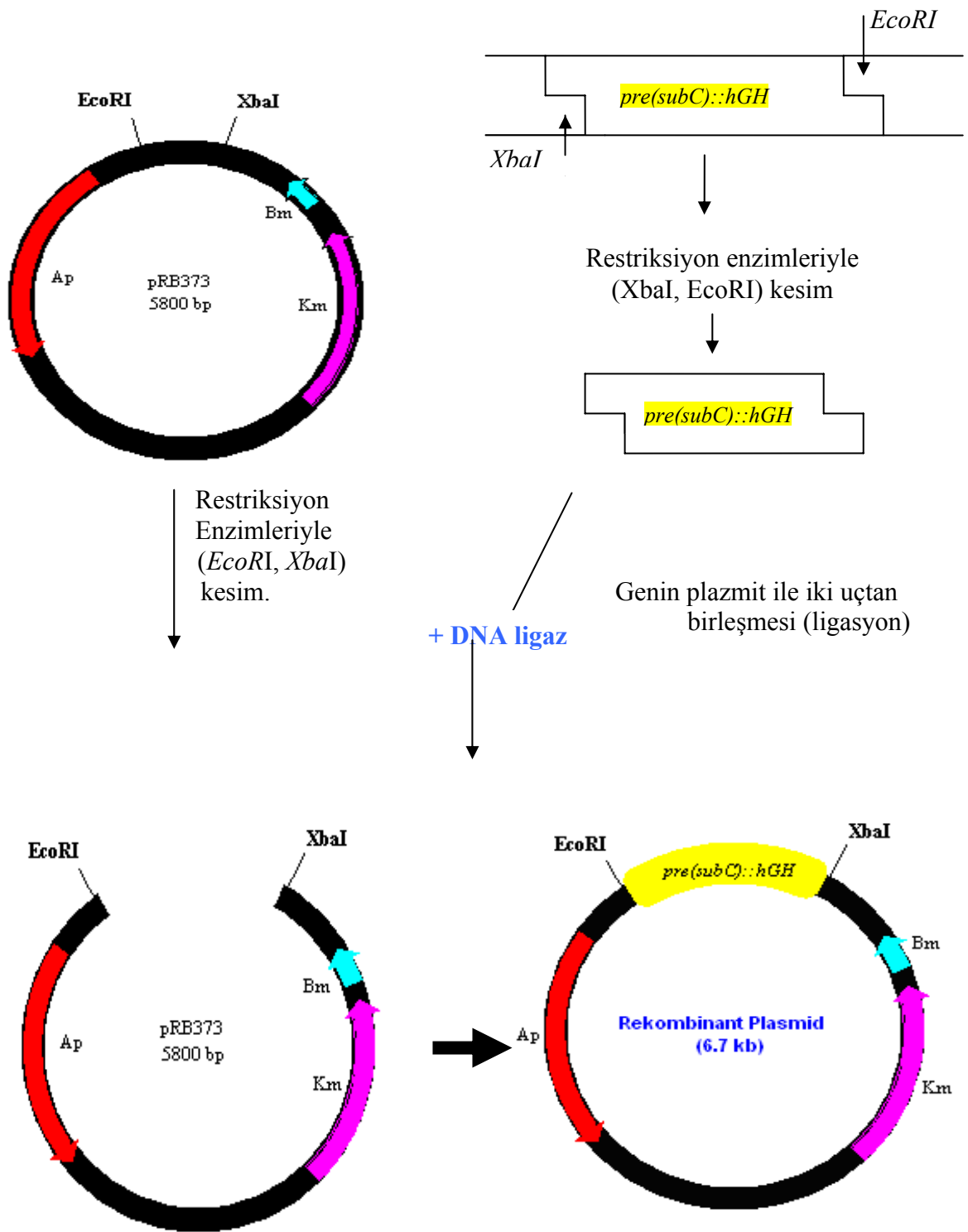
5'_GCTTCTGCTTTCCCAACTATACTACTATCTC_3'

4. Restriksiyon enzim konumu (*Bam*HI (GGATCC)) + hGH geri primeri

5'_GCGGATCCGCACTGGGGAGGGGTCAC_3'



Şekil EK-1.1 pRB373 plazmidi ve klonlama bölgesi. Antibiyotik rezistans genleri; Ampisilin, *bla*, kanamisin, *neo*, bleomisin, *ble*. MCS (multiple cloning side), klonlama bölgesi.



Şekil EK-1.2 *pre(subC)::hGH* geninin pRB373 plazmitine klonlanması

Tasarım-II: *kan::pre(subC)::hGH::pMK4* plazmidi tasarımı

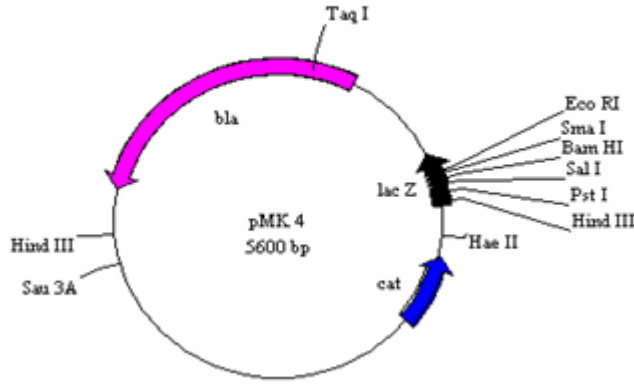
Kanamisinin rezistansını kodlayan (*kan*) geninin, araştırma grubumuzda daha önce geliştirilen *pre(subC)::hGH::pMK4* plazmidine klonlanmasını içeren tasarım aşağıda verilmiştir.

4 *kan* geninin nükleik asit dizini ; **ileri ve geri primer dizinleri** , **promotr**, **kan**, **terminatör**. (1439 bp):

```
gatctgttagcttgctcgtccccgccgggtcaccgccagcgacatggaggcccagaataccctccttgacagtctga  
cgtgcgagctcagggcatgatgtgactgtcgccgtacatttagccatacatcccatgtataatcattgcatccatacatt  
tgatggccgcacggcgcgaagcaaaaattacggctcctcgctgcagacctgcgagcagggaaacgctcccctcacagacg  
cgttgaattgtccccacgccgcgccctgtagagaaataaaaaggtaggattgccactgaggttcttcttcatatactcctt  
taaatcttctagtagacagttctcacatcacatccgaacataaacaaccatgggtaaggaaaagactcacgttcgaggccg  
cgatfaaattccaacatggatgctgattatagggtataaatgggctcgcgataatgctgggcaatcaggtgcacaatctatcg  
attgatgggaagcccgatgcgccagagttgttctgaacatggcaaaggtagcgttgccaatgatgttacagatgagatggt  
cagactaaactggctgacggaatttatgcctctccgaccatcaagcatttatccgtactcctgatgatgcatggttactcaccac  
tgcgatccccggcaaacagcattccaggtatagaagaatctctgattcaggtgaaaatattgttgatgcgctggcagtggtc  
ctgcgccggttgattcattcctgtttgtaattgtccttttaacagcgcgcgtatttcgtctcagcgcgaatcacgaatga  
ataacggtttggtgatgcgagtgattttgatgacgagcgtaatggctggcctgtgaacaagtctggaaagaaatgcataagct  
ttgccattctaccggattcagtcgtcactcatggtgatttctcacttgataacctattttgacgaggggaaattaataggttgat  
tgatgttgacgagtcggaatgcagaccgataaccaggatcttccatcctatggaactgcctcggtagtttctcctcattac  
agaaacggcttttcaaaaataggattgataatcctgatatgaataaattgcagtttcatttgatgctgatgagttttctaatcag  
tactgacaataaaaagattcttgtttcaagaacttgcatttgatagtttttatattgtagtttctattttaatcaaatgttagcgtg  
atttatattttttcgcctcgacatcatctgccagatgcgaagtaagtgcgcgaaagtaatatcatgcgtcaatcgtatgtgaa  
tgctggtcgtatactgctgtcgattcgataactaacgccccatccagtgtcgaaaacgagctctcgagaacccttaat
```

Tasarlanan ileri ve geri primerlerin nükleik asit dizinleri :

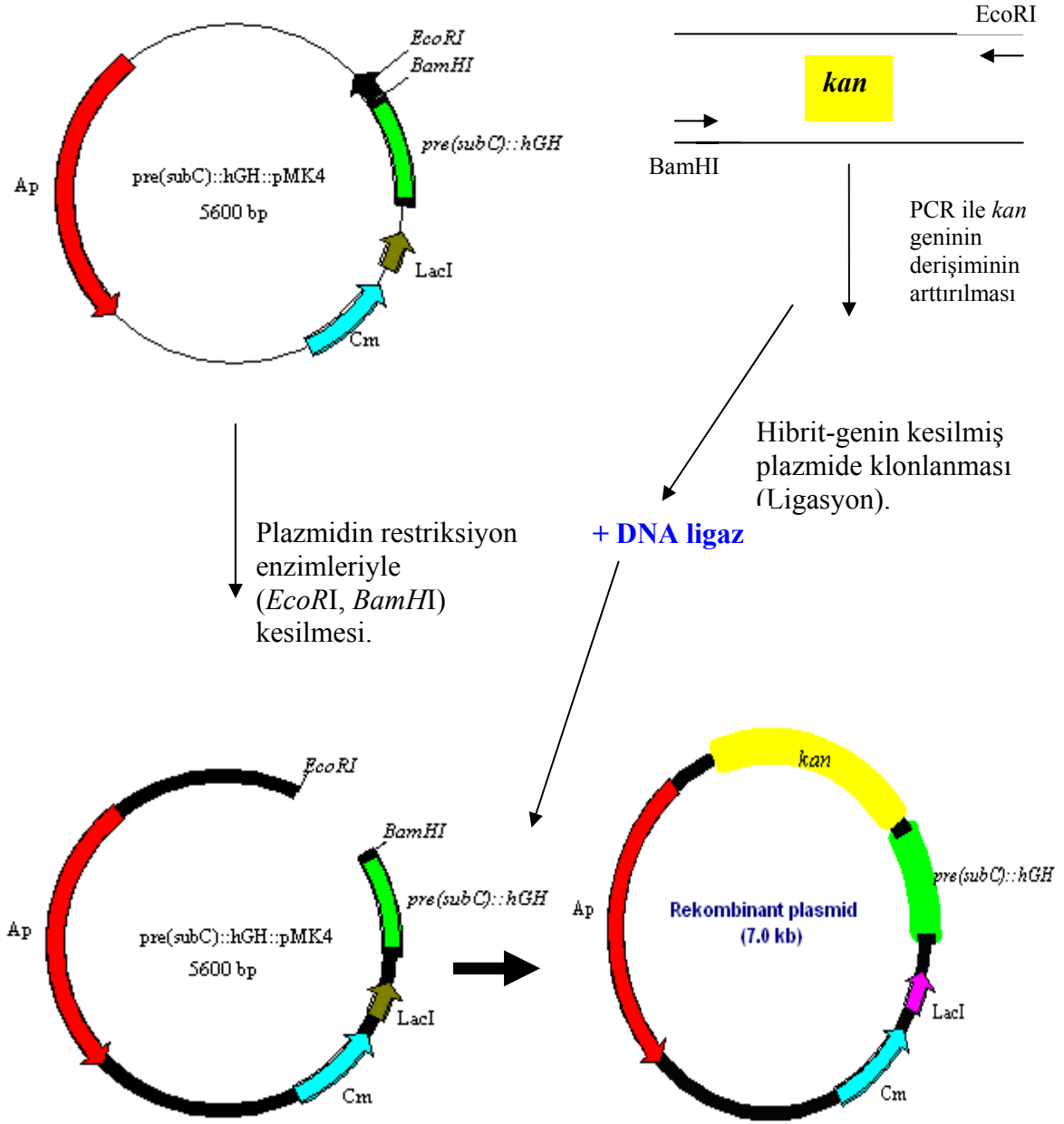
1. restriksiyon enzim konumu ((*Bam*HI) (GGATCC)) + *kan* ileri primeri
5' CTGGATCCGATCTGTTTAGCTTGCCTC 3'
2. restriksiyon enzim konumu ((*Eco*RI) (GAATTC)) + *kan* ileri primeri
5' GCGAATTCTTCGACACTGGATGGC 3'



Şekil Ek-1-3. pMK4 plazmidi

Çizelge EK-1.1 Tasarım II için tasarlanan primer dizinlerinin termodinamik özellikleri

PRİMERLER	T _d [*] (°C)	T _d (°C)	ΔG (kcal/mol)	ΔH (kcal/mol)	ΔS (eu)
<i>kan</i> ileri	56.7	76.3	- 46.7	- 208.5	-536.0
<i>kan</i> geri	56.4	75.7	-42.8	-186.5	-475.2



Şekil EK-1.4 *kan* geninin *pre(subC)::hGH::pMK4* plazmidine klonlanması

Tasarım-III: *-pre(subC)::hGH::pRB374* plazmidi tasarımı

-pre(subC)::hGH hibrit geninin veg II başlatıcı taşıyan pRB374 plazmidine klonlanması için yapılan tasarım aşağıda verildiği gibidir.

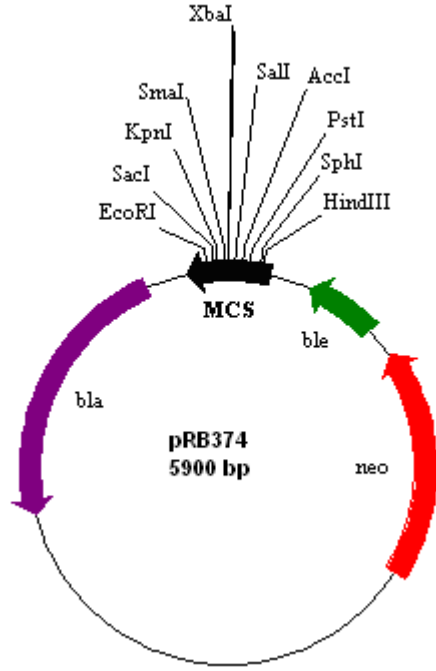
-pre(subC)::hGH hibrit geninin plazmide klonlanacak bölümünün nükleik asit dizini;

İleri ve geri primerler, **SubC**, **hGH** :

5' **tctgaataaagaggagg**agagtgagtaatgatgaggaaaaagagttttggcttgggatgctgacggccttcagctcgtttcacgatggcattcagcgattccgcttctgcttccaactataccactatctcgtctattcgataacgctatgcttcgtgctcatcgtttcatcagctggcctttgacacctaccaggagttgaagaagcctatatcccaaaggaacagaagtattcattcctgcagaa
ccccagacctccctctgtttctcagagtctattccgacacctccaacagggaggaaacacaacagaaatccaacctagagc
tgctccgcatctccctgctgctcatccagtcgtggctggagcccgtgcagttcctcaggagtgtcttcgccaacagcctagtga
cggcgctctgacagcaacgtctatgacctcctaaaggacctagaggaaggcatccaaacgctgatggggaggctggaaga
tggcagccccggactgggcagatctcaagcagacctacagcaagttcgacacaaactcacacaacgatgacgcactactc
aagaactacgggctgcttactgcttcaggaaggacatggacaaggctgagacattcctgcgcatcgtgcagtgccgctctgt
ggagggcagctgtggcttctagctgcccgggtggcatccctgtgaccttccc**agtgctctct**ggcc_3'

***-pre(subC)::hGH* hibrit geninden promotıra ait nükleik asit dizinini dışarda bırakacak şekilde tasarlanan ileri ve geri primerler:**

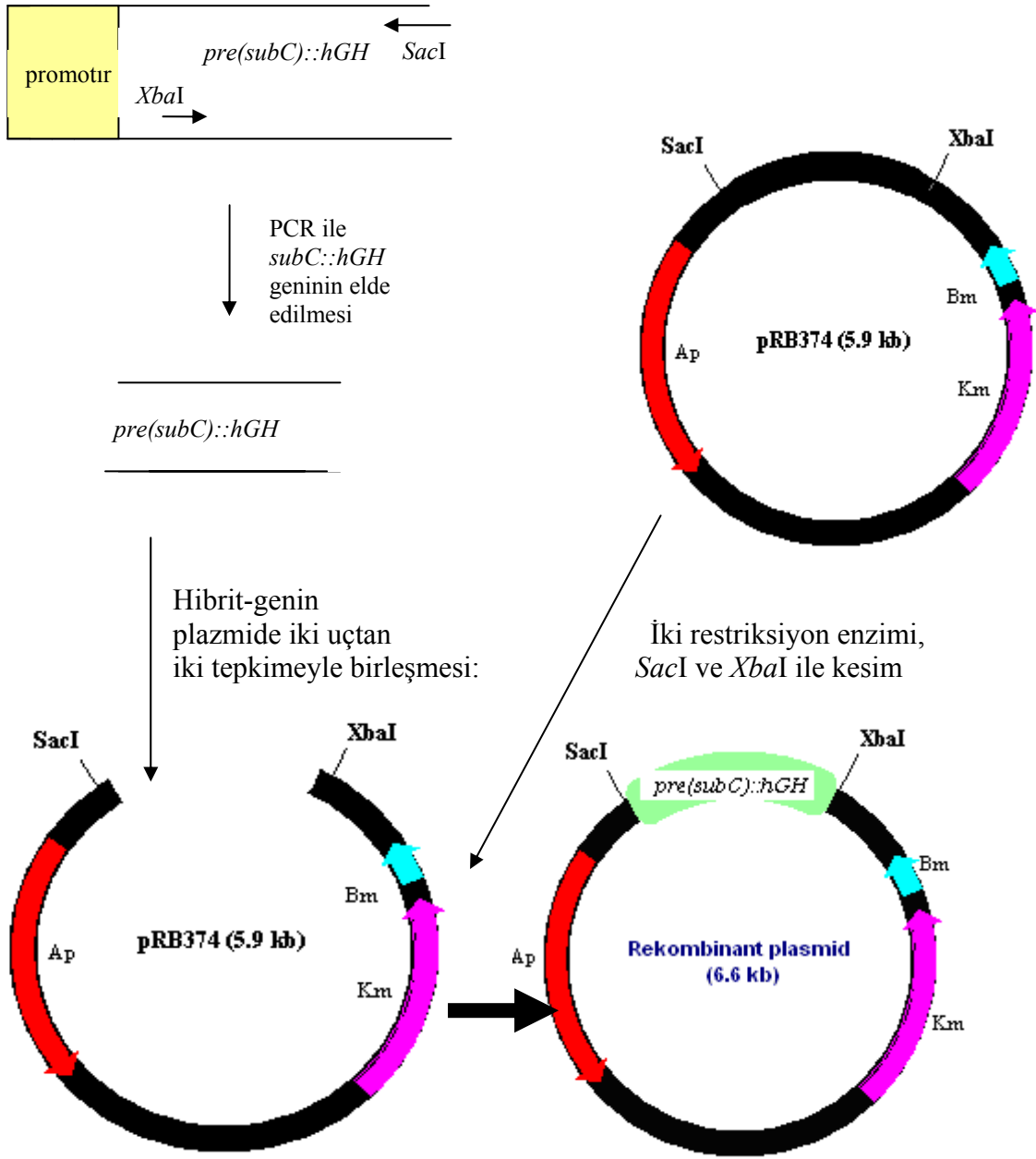
1. restriksiyon enzimi konumu (*XbaI* (TCTAGA)) + *-pre(subC)::hGH* ileri primeri
5'_GCGCTCTAGATCTGAATAAAGAGGAGG_3'
2. restriksiyon enzimi konumu (*SacI* (GAGCTC)) + *-pre(subC)::hGH* geri primeri
5'_GCGAGCTCAGGAGAGGCACTGG_3'



Şekil EK-1.5 pRB374 plazmidini

Çizelge EK-1.2 Tasarım III için tasarlanan primer dizinlerinin özellikleri

PRİMERLER	T_d^* (°C)	T_d (°C)	ΔG (kcal/mol)	ΔH (kcal/mol)	ΔS (eu)
<i>pre(subC)::hGH</i> ileri	48.0	71.7	-44.2	-206.6	-538.3
<i>pre(subC)::hGH</i> geri	47.4	75.1	-40.2	-171.3	-433.3



Şekil EK-1.6 $pre(subC)::hGH$ geninin pRB374 plazmidine klonlanması

EK 2 Primerlerin Tasarımı

TASARIM I

-pre(subC) ileri primeri :

```
od1.txt
29 nt.
Position
& Length
of fragm.
1 28
Td [°C]
78.3
ΔG
kcal/mol
-48.5
ΔH
kcal/mol
-213.8

press a key to continue

Dimer formation:
                    5' GCTCTAGAGCGCAATCTCCTGTCATTGG 3'
                    |||||
3' GCTTACTGTCCTCTAACGGGAGATCTCG 5'
-11.7

Self-complementarity:
5' GCTCT
3' GCTTACTGTCCTCTAACGGGAGA
-11.7
```

-pre(subC) geri primeri :

```
od1.txt
31 nt.
Position
& Length
of fragm.
1 30
Td [°C]
80.0
ΔG
kcal/mol
-54.3
ΔH
kcal/mol
-242.9

press a key to continue

Dimer formation:
                    5' GGIATAGTIGGGAAGCAGAAGC 3'
                    ||||
3' GCTAAGGCGAAGACGAAAGGTTGATATGG 5'
1.7

Self-complementarity:
5' GGIATAGTIGG
3' GCTAAGGCGAAGACGAAAG
1.7
```

hGH ileri primeri

C:\DOCUME~1\ADMINI~1\Desktop\WAR.EXE

press a key to continue

odi.txt
32 nt.
Position & Length of fragm.
1 31
Td [°C]
74.4
ΔG
kcal/mol
-49.4
ΔH
kcal/mol
-232.9

Dimer formation:

```

5' GCTTCIGCTTTCCCAACTATACCACTATCTC 3'
      ||||
3' CTCTATCACCATATCAACCCITTCGICTTCG 5'

```

Self-complementarity:

```

5' GCTTCIGCTTTCCCAACTATACC]
      |||
3' CTCTATCA]

```

1.7

hGH geri primeri

C:\DOCUME~1\ADMINI~1\Desktop\WAR.EXE

press a key to continue

odi.txt
27 nt.
Position & Length of fragm.
1 26
Td [°C]
87.5
ΔG
kcal/mol
-53.9
ΔH
kcal/mol
-217.5

Dimer formation:

```

5' GCGGATCCGCACCTGGGGAGGGGTCAC 3'
      |||||
3' CACTGGGAGGGGTCACGCCTAGGCG 5'

```

Self-complementarity:

```

5' GCGGA]
      |||
3' CACTGGGAGGGGTCACGCCT]

```

-19.3

TASARIM II.

kan ileri primeri

```

C:\> C:\DOCUME~1\ADMINI~1\Desktop\NAR.EXE
press a key to continue

Dimer formation:
                    5' CTGGATCCGATCTGTTAGCTTGCCTC 3'
                      |||||
                    3' CTCGGTTCGATTGCTAGCCTAGGTC 5'
                                -5.9

Self-complementarity:
                    5' CTGGATC1
                      ||
                    3' CTCGGTTCGATTGCTAG1

```

1.txt
28 nt.
Position & Length of fragm.
1 27
Td [°C]
76.3
ΔG
kcal/mol
-46.7
ΔH
kcal/mol
-208.5

```

C:\> C:\DOCUME~1\ADMINI~1\Desktop\NAR.EXE

GATCTGTTAGCTTGCCTC
CTAGACAAATCGAACGGAG

```

1.txt
20 nt.
Position & Length of fragm.
1 19
Td [°C]
56.7
ΔG
kcal/mol
-28.7
ΔH
kcal/mol
-141.2
ΔS (eu)
-370.4
Mean ΔG
-28.70
ΔG scale
0.5/line
I = Info

kan geri primeri

```

C:\> C:\DOCUME~1\ADMINI~1\Desktop\NAR.EXE
1.txt
17 nt.
Position
& Length
of fragm.
1 16
Td [°C]
56.4
ΔG
kcal/mol
-26.0
ΔH
kcal/mol
-117.7
ΔS (eu)
-301.0
Mean ΔG
-26.00
ΔG scale
0.5/line
I = Info

TTCGACACITGGATGGC
AAGCTGTGACCTACCG
  
```

```

C:\> C:\DOCUME~1\ADMINI~1\Desktop\NAR.EXE
1.txt
25 nt.
Position
& Length
of fragm.
1 24
Td [°C]
75.7
ΔG
kcal/mol
-42.8
ΔH
kcal/mol
-186.5

press a key to continue

Dimer formation:
                    5' GCGAATTCITCGACACITGGATGGC 3'
                    |||||
                    3' CGGTAGGTCACAGCTTCTTAAGCG 5'
                    -3.5

Self-complementarity:
                    5' GCGAAT1
                    ||| 1
                    3' CGGTAGGTCACAGCTT1
  
```

TASARIM III

pre(subC)::hGH ileri primeri

C:\ C:\DOCUME~1\ADMINI~1\Desktop\NAR.EXE

1.TXT	18 nt.
Position & Length of fragm.	1 17
Td [°C]	48.0
ΔG kcal/mol	-24.0
ΔH kcal/mol	-123.3
ΔS (eu)	-326.9
Mean ΔG	-24.00
ΔG scale	0.5/line
I = Info	

```

TCTGAATAAAGAGGAGG
AGACTTATTTCTCCTCC
    
```

C:\ C:\DOCUME~1\ADMINI~1\Desktop\NAR.EXE

press a key to continue

1.TXT	28 nt.
Position & Length of fragm.	1 27
Td [°C]	71.7
ΔG kcal/mol	-44.2
ΔH kcal/mol	-206.6
	-2.9

Dimer formation:

```

          5' GCGCTCTAGATCTGAATAAAGAGGAGG 3'
              | | | | | | | |
          3' GGAGGAGAAATAAGTCTAGATCTCGCG 5'
    
```

Self-complementarity:

```

          5' GCGCTCTAGATCT ]
              | | | | | | |
          3' GGAGGAGAAATAAG ]
    
```

pre(subC)::hGH geri primeri

C:\> C:\DOCUME-1\ADMINI-1\Desktop\NAR.EXE

```

1.TXT
15 nt.
Position & Length of fragm.
  1 14
Td [°C]
  47.4
ΔG
kcal/mol
 -22.1
ΔH
kcal/mol
-104.6
ΔS (eu)
-270.6
Mean ΔG
 -22.10
ΔG scale
 0.5/line
I = Info
AGGAGAGGGCACTGG
TCCTICCGTGACC

```

C:\> C:\DOCUME-1\ADMINI-1\Desktop\NAR.EXE

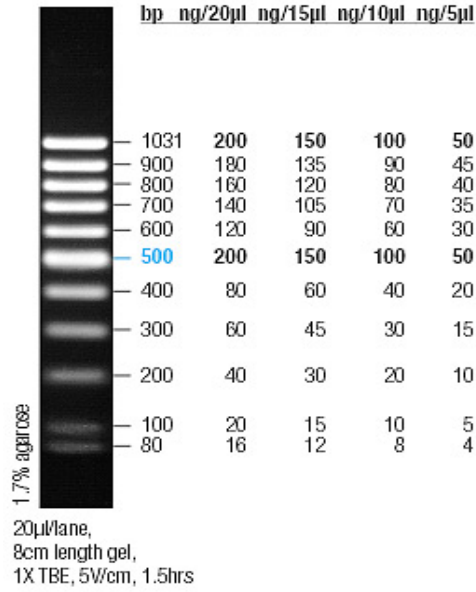
```

1.txt
23 nt.
Position & Length of fragm.
  1 22
Td [°C]
  75.1
ΔG
kcal/mol
 -40.2
ΔH
kcal/mol
-171.3
press a key to continue
Dimer formation:
          5' GCGAGCTCAGGAGAGGGCACTGG 3'
              |||||
          3' GGTCACGGAGAGGACTCGAGCG 5'
-4.5
Self-complementarity:
          5' GCGAGCTCAG
              |||
          3' GGTCACGGAGAG

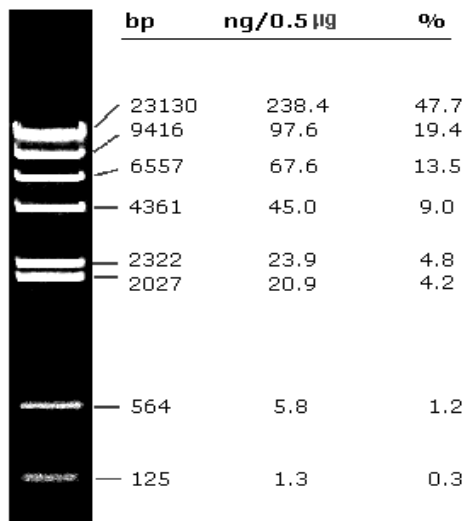
```

EK 3 Genetik Mühendisliği Programı Çözümleri

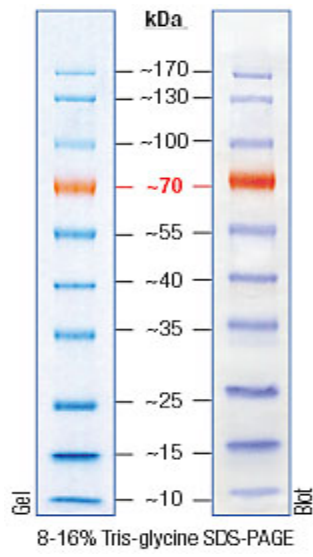
DNA Ladder Low Range Marker



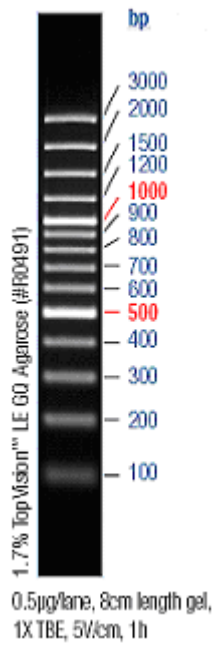
Lambda DNA HindIII Marker



PageRuler™ Prestained Protein Ladder



DNA Ladder Plus Marker



EK 4 Genetik Mühendisliği Programı Çözeltileri

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

TSE

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

EK 4 Devam

DTA

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

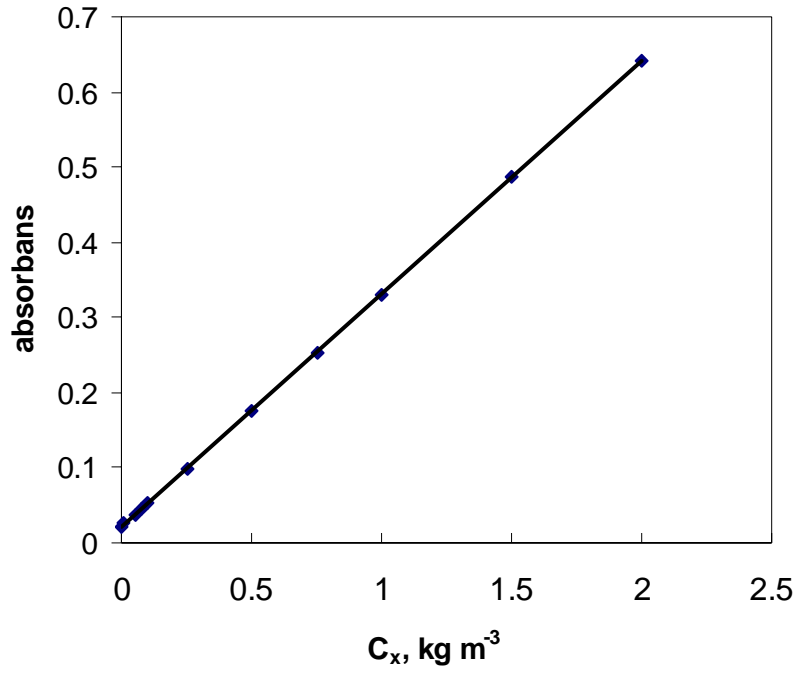
ÇÖZELTİ C

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

10X TE

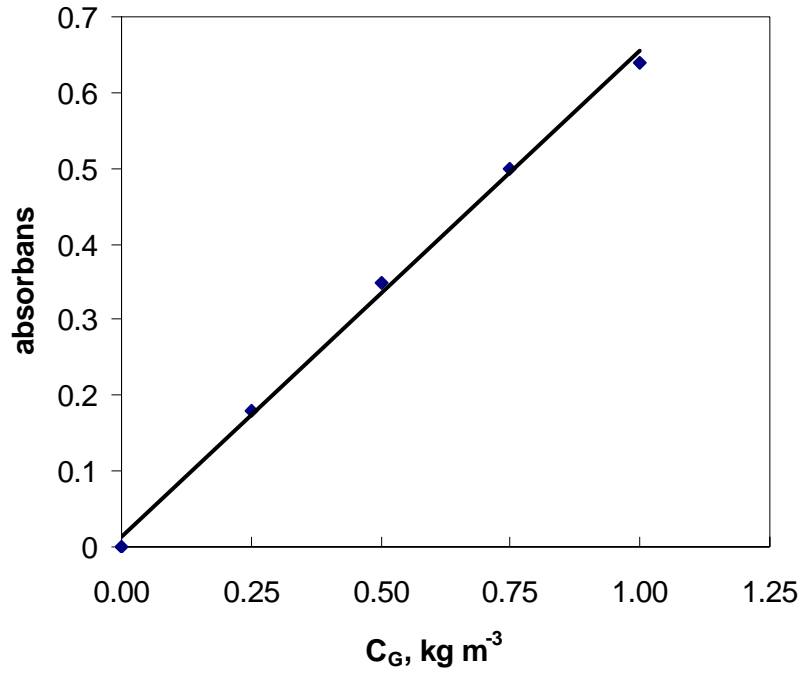
Tris-HCl	0.1 M
EDTA pH=7.5	0.01 M

EK 5 Mikroorganizma Derişimi Kalibrasyonu



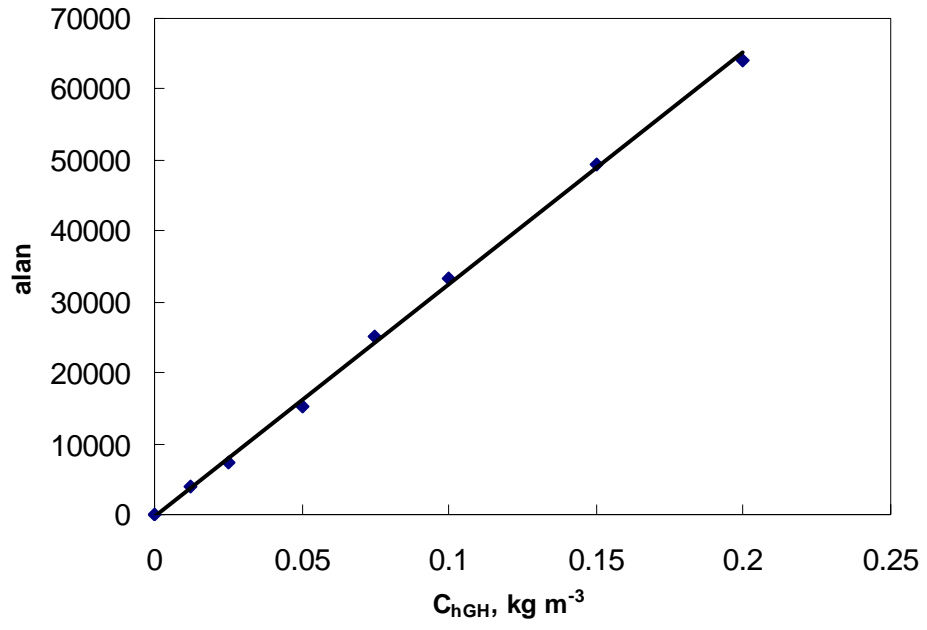
Kalibrasyon doğrusunun eğimi, $m=0.309$

EK 6 Glukoz Derişimi Kalibrasyonu



Kalibrasyon doğrusunun eğimi, $m=0.64$

EK 7 hGH Derişim Kalibrasyonu



Kalibrasyon doğrusunun eğimi, $1/m = 3.1 \times 10^{-6}$

EK 8 SDS-PAGE ve WESTERN-BLOTT Çözeltileri

Örnek Yükleme Tamponu : 10 ml

Tris-CI (0.5M, pH=6.8)	1.25 ml
Gliserol	1.875 ml
SDS (%10)	2.0 ml
Merkaptoetanol	0.5 ml
Bromofenol blue	0.625 ml

Akrilamid (%30'luk)

Akrilamid	29.2 g
Bis-akrilamid	0.8 g
Su	100ml

Resolving jel (%12'lik)

Akrilamid (%30)	4.0 ml
Tris-CI (1.5M, pH=8.8)	2.532 ml
SDS (%10)	0.1 ml
APS (%10)	0.1 ml
TEMED	0.004 ml
Su	3.264 ml

Stacking jel (%5'lik)

Akrilamid (%30)	0.657 g
Tris-CI (1.5M, pH=8.8)	0.5 g
SDS (%10)	0.039 g
APS (%10)	0.039 g
TEMED	0.004 g
Su	

10X Koşturma Tamponu: 1 L

Trizma base (= 0.25 M)	30.3 g
Glisin (= 1.92 M)	144 g
SDS (= 1%)	10 g

EK 8 Devam

10X Transfer Tamponu: 1L

Trizma base (= 0.25 M)	30.3 g
Glisin (= 1.92 M)	144 g

1x Transfer Tamponu: 1 L

Metanol	200 ml
10x Transfer Tamponu	100 ml
Su	700 ml

Blocking Çözeltisi: 0.5L

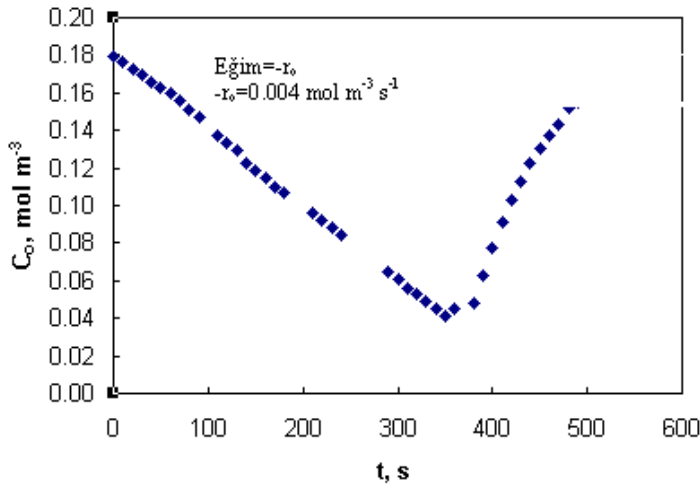
Bovin serum albümin	% 3
Tween 20	% 0.05
PBS	0.5 L

TBS-Tween 20 (TBST) Çözeltisi (%0.1'lik)

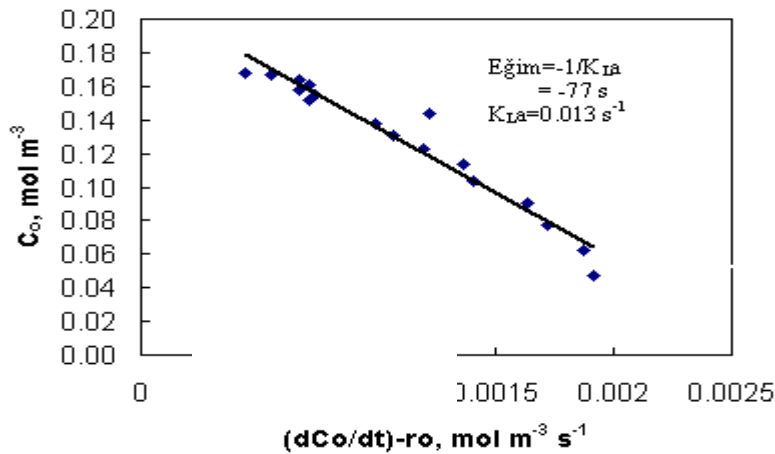
Na ₂ HPO ₄	11.5 g
NaH ₂ PO ₄	2.969 g
NaCl	5.84 g
Tween 20	1 ml

EK 9 Dinamik Yöntem Örnek Grafik ve Sonuçları

Ortama verilen hava kesildiğinde elde edilen (t; C_o) grafiğinde azalan doğrusal ilişkiden -r_o değeri bulunur. ((dC_o/dt)-r_o); C_o) grafiği çizilir. Doğrunun eğimi -1/K_{LA} değerini verir. Aşağıda pH_o=7.25, Q_o/V=0.5 vvm ve N=800 dk⁻¹, V_R=0.550 dm³, T=37°C ve t=0.5 st koşullarında uygulanan Dinamik Yöntem sonuçları ile ilgili hesaplamalar gösterilmiştir.



Şekil 1 Çözünmüş oksijen derişiminin t ile değişimi. C_{G0}=8 kg m⁻³, pH_o=7.25, T=37°C, V_R=550 cm³, Q_o/V_R= 0.5vvm, N=800 dk⁻¹, t=0.5 st



Şekil 2 Sıvı faz hacımsal kütle aktarım katsayısının belirlenmesi. C_{G0}=8 kg m⁻³, pH_o=7.25, T=37°C, V_R=550 cm³, Q_o/V_R= 0.5vvm, N=800 dk⁻¹, t=0.5 s

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Özge Deniz YILMAZ

Doğum Yeri: Sivas

Doğum Tarihi: 08.08.82

Medeni Hali: Bekar

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

- Lise: Adana Anadolu Lisesi (2000)
- Lisans: Orta Doğu Teknik Üniversitesi Mühendislik Fakültesi
Kimya Mühendisliği Bölümü (2005)
- Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı (2006-2008)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

- Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi,
Araştırmacı, 2006

Yayımlar

- Özdamar, T.H., Şentürk, Yılmaz, Ö.D., Çalık, G., Çelik, E., Çalık, P. 2008.
Expression system for recombinant human growth hormone production by
Bacillus subtilis. Biotechnology Progress, in press.