

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**REAKSİYON MÜHENDİSLİĞİ PRENSİPLERİYLE REKOMBİNANT
İNSAN BÜYÜME HORMONU ÜRETİMİ İÇİN BİYOPROSES
GELİŞTİRİLMESİ**

Birgül ŞENTÜRK

KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2006**

Her hakkı saklıdır

Prof. Dr. H. Tunçer zdamar danışmanlığında, Birgöl Şentürk tarafından hazırlanan bu çalışma / /2006 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği ile Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Güzide alık GARCÍA

Üye: Prof. Dr. H. Tunçer ÖZDAMAR, Ankara Üniversitesi
Danışman

Üye: Prof. Dr. Semra KOCABIYIK

Yukarıdaki sonucu onaylım.

Prof. Dr. Ülkü MEHMETOğLU
Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

REAKSİYON MÜHENDİSLİĞİ PRENSİPLERİYLE REKOMBİNANT İNSAN BÜYÜME HORMONU ÜRETİMİ İÇİN BİYOPROSES GELİŞTİRİLMESİ

Birgül ŞENTÜRK

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. H. Tunçer ÖZDAMAR

Terapatik protein insan büyüme hormonunun (hGH) üretimi için gerçekleştirilen ve altı aşamadan oluşan araştırma programının ilk aşamasında doğala özdeş, çözünebilir ve biyolojik olarak aktif yapıda sadece insanda üretilebilen hGH'nin mikroorganizmalarca hücre-dışı üretilebilmesi için *Bacillus* hücre-dışı enzimi serin alkali proteaz (SAP) geninin (*subC*) *pre*- sinyalizasyonu hGH gen dizininin önüne SOE yöntemiyle entegre edilerek oluşturulan hibrit gen önce pUC19 *E.coli* plasmidine klonlanmış, sonra da pMK4 *E.coli-Bacillus* shuttle plasmide sub-klonlama yapılmış ve rekombinant DNA – *pre(subC)::hGH::pMK4* farklı *Bacillus* türlerine aktararak rekombinant *Bacillus subtilis* türleri elde edilmiştir. İkinci aşamada, rekombinant mikroorganizmalar ile mikro-biyolojik hava-filtreli, kesikli, $V_R=110\text{cm}^3$ çalışma hacimli laboratuvar-ölçek biyoreaktörlerde, $T=37\text{ }^\circ\text{C}$, $N=200\text{ dk}^{-1}$ ve $\text{pH}_0=7.25$ işletme koşullarında üretim ortamına eklenen proteaz inhibitörü ve karbon kaynağı glukozun derişimleri belirlenmiştir. En yüksek $C_{hGH}=0.03\text{ kg/m}^3$ hGH derişimine *Bacillus subtilis* BGSC-1A751 ile $C_{G0}=8.0\text{ kg/m}^3$ glukoz derişiminde ortama $100\mu\text{l}$ proteaz inhibitörü eklenerek ulaşılmıştır. Araştırmanın üçüncü aşamasında laboratuvar ölçekte bulunan en uygun koşullarda, $V_R=550\text{ cm}^3$ hacimli, mekanik karıştırmalı, pH, sıcaklık, çözünmüş oksijen ve karıştırma hızı kontrollü pilot-ölçek kesikli biyoreaktörlerde farklı hava giriş ($Q_0/V_R=0.5$ ve 0.7 vvm) ve karıştırma hızlarında ($N=500, 700$ ve 800 dk^{-1}) oksijen aktarım etkileri yan ürün dağılımları ile birlikte incelenmiş, oksijen aktarımı ve biyoproses karakteristikleri belirlenmiştir. En yüksek hGH derişimine ($C_{hGH}=0.07\text{ kg/m}^3$) $Q_0/V_R=0.5\text{ vvm}$, $N=800\text{ dk}^{-1}$ koşulunda ulaşılmıştır. Dördüncü aşamada belirlenen en iyi oksijen aktarım koşulunda hibrit gen içeren (*pre(subC)::hGH::pMK4*) ve içermeyen (pMK4) plasmidli *Bacillus* BGSC-1A751 ile üretim deneyi gerçekleştirilerek *pre(subC)::hGH* hibrit genin etkisi incelenmiştir. Beşinci aşamada belirlenen en iyi oksijen aktarım koşulunda üretim ortamına farklı zamanlarda ($t_c=0$ ve 24 st'te) $C=2.5\text{ mM}$ derişimde eklenen serin, aspartik asit, lözin+ valin ve glutamik asitin üretime etkisi araştırılmış. Üretim ortamına ayrı ayrı eklenen serin, aspartik asit, lözin+ valin ve glutamik asit hGH derişimini sırasıyla $t_c=0\text{ st'te}$ % 6.1, 34.3, 42.4 ve 48.4, $t_c=24\text{ st'te}$ eklenen karışımları ve lözin+valinin ise % 25.7 ve 31.4 azaltmıştır. Son aşamada ise 149 tepkime ve 109 metabolitten oluşan hücre-içi tepkime sistemi için matematik model oluşturulmuş ve reaksiyon mühendisliği prensipleriyle tepkime akıları hesaplanarak sonuçlar yorumlanmıştır.

2006, 314 sayfa

Anahtar Kelimeler : İnsan büyüme hormonu, hGH, üretimi, rekombinant *Bacillus subtilis*, ortam tasarımı, oksijen aktarımı, amino asit, metabolik yol izi analizi, metabolik mühendislik

ABSTRACT

Master Thesis

BIOPROCESS DEVELOPMENT FOR RECOMBINANT HUMAN GROWTH HORMONE PRODUCTION BY REACTION ENGINEERING PRINCIPLES

Birgül ŞENTÜRK

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

Supervisor : Prof. Dr. H. Tunçer ÖZDAMAR

Metabolic engineering in *Bacillus subtilis* for extracellular human growth hormone (hGH) synthesis system design is conceptually based on construction of a hybrid gene of two DNA fragments, i.e. signal DNA sequence of a *B.subtilis* extracellular enzyme gene and the DNA encoding human therapeutic protein. Complementary oligodeoxyribo-nucleotide (oligo) primers and the polymerase chain reaction (PCR) are used to generate two DNA fragments having overlapping ends. The two DNA fragments having overlapping ends are combined to form the hybrid gene in a subsequent 'fusion' reaction in which the overlapping ends anneal, allowing the 3' overlap of each strand to serve as a primer for the 3' extension of the complementary strand. Extracellular protease (*subC*) *pre*- signal DNA sequence of *B. licheniformis* chromosomal DNA and plasmid carrying hGH cDNA were used as templates in PCRs, respectively, for the amplification of *subC* signal DNA sequences and hGH mature peptide sequence. Extension of the overlaps by DNA polymerase has yielded a recombinant hybrid-gene. Hybrid gene fragment was cloned into pUC19, and then sub-cloned into pMK4 *E.coli*- *Bacillus* shuttle plasmid. Thus, the new expression vector was transferred into host *B. subtilis* strains. Effects of oxygen-transfer on product and by-product distributions in extracellular rhGH production by recombinant *B. subtilis* carrying *-pre(subC)::hGH::pMK4* were investigated in 1.0dm³ batch bioreactor-systems at four different conditions with the parameters, air-inlet rate of $Q_O/V_R = 0.5$ vvm, and agitation rates of $N = 500$ (low:LOT), 700 (medium:MOT₁), 800 (medium:MOT₂) min⁻¹ and, at $Q_O/V_R = 0.7$ vvm, $N = 800$ min⁻¹ (high:HOT), on a glucose-based defined-medium. Cell, rhGH, amino and organic acid concentrations, yield values, $K_{L,a}$, and oxygen-uptake and oxygen-transfer rates were determined throughout the bioprocess. Considering the cell and rhGH concentration profiles, the bioprocess was divided into five periods. Period I (0<t<4h) is the cell first-growth-phase; Period II (4<t<12h) is the growth-interruption-phase; Period III (12<t<16h) is the lag-phase after the growth-interruption-phase where rhGH synthesis starts; Period IV (16<t<24h) is the second-cell-growth-phase where rhGH synthesis increases; and Period V (24<t<32h) is the end of the growth-phase where rhGH synthesis was the highest. The highest rhGH production was obtained as $C_{hGH} = 0.07$ kg m⁻³ at MOT₂. At $Q_O/V_R = 0.5$ vvm, with the increase in N, Damköhler number that is the oxygen-transfer-limitation decreases. At MOT₁, MOT₂, and HOT, in Period IV both oxygen-transfer and biochemical-reaction resistances are effective; Period V at MOT₂ has a tendency to proceed under biochemical-reaction-limited conditions. The results encourages the design of a two-step oxygen-transfer strategy based on the periods of the bioprocess that starts with HOT in Periods I-III that yields higher cell concentration using less glucose and producing the lowest amount of organic acids; and proceeds with MOT₂ in Periods IV and V to increase rhGH production further. The metabolic flux distributions were calculated using the mass balance based stoichiometric model. The effects of the addition of 2.5 mM serine, leucine+valine, aspartic acid and glutamic acid on hGH production were investigated at MOT₂. C_{hGH} was decreased by % 34.3, 42.4 and 48.4, respectively, by addition of Asp, Leu+Val, and Glu; whereas addition of Ser increased the flux through rhGH and rhGH production rate in Period V.

2006, 314 pages

Key Words: Human growth hormone, hGH, production, recombinant *Bacillus subtilis*, medium design, oxygen transfer, amino acid, metabolic flux analysis, metabolic engineering

ÖNSÖZ

İnsan büyüme hormonu üretimi için yapılan yüksek lisans araştırması Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü Biyokimyasal Reaksiyon Mühendisliği Araştırma Grubu'da yürütülmüştür. “Endüstriyel Biyoteknolojik Prosesle İnsan Büyüme Hormonu Üretimi” konulu TÜBİTAK-MİSAG: 275 projesi ile de desteklenmiştir.

Haziran 2003'te Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü'nden mezun olduktan sonra Eylül 2003'de yüksek lisans programına başladım. Bir yandan derslerime devam ederken diğer yandan laboratuvarlarda yürümekte olan lisans-üstü çalışmalara etkin olarak katıldım. Bu aşamada sistemlerin ve cihazların kullanımı ile ilgili tecrübe kazanarak, laboratuvarlara uyumumu geliştirdikten ve deneysel programımla ilgili alt-yapıyı oluşturduktan sonra geniş bir kaynak araştırması ile çalışmalarına başladım. Araştırmamın özellikle metabolik mühendislik tasarımının genetik mühendisliği teknikleriyle gerçekleştirilmesi ile ilgili araştırma programında karşılaştığım problemleri; biyoreaktör sistemlerinde gerçekleştirdiğim 32 saatlik üretim proseslerinin ön-hazırlık çalışmalarıyla 40 saati aşan süreçlerdeki yoğun tempoda çalışmalarımı, telaşımı, yorgunluğu ve karşılaştığım pek çok tatlı- buruk anıyı hiç unutmuyacağım.

Araştırmam süresince sonuçların yorumlanması, değerlendirilmesi, alternatif çözüm yöntemlerinin bulunması ve olgunlaşması için periyodik olarak ve istediğim her zaman benimle tartışan; formasyonumun hızlı gelişmesi için bana verdiği destek ve özellikle sorumluluk ve inisiyatif sahibi iyi bir araştırmacı olarak yetişmeye olanak veren koşulları sağlayan danışman hocam Sayın Prof. Dr. H. Tunçer ÖZDAMAR'a teşekkür ederim.

Yüksek lisans araştırmalarımda “*filen ikinci bir danışman olarak*” düşüncelerini ve emeğini, akademik tartışmalarla da zamanını esirgemeyen ve moleküler genetik konusundaki ve metabolik akı analizi ile ilgili bilgi birikiminden çok yararlandığım Sayın Prof. Dr. Pınar ÇALIK'a içtenlikle teşekkür ederim.

Araştırmalarım süresince her zaman düşüncelerinden ve tecrübelerinden yararlandığım, tartışabildiğim ve, bilgi, destek ve önerilerini asla esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Güzide ÇALIK'a içtenlikle teşekkür ederim.

Western Blott yönteminin uygulanmasında ilk aşamada bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan Prof. Dr. Ongun ONARAN'a, glukoz analiz yönteminin uygulanmasında yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. İ. Hakkı BOYACI'ya teşekkür ederim.

Araştırmalara yeni başladığım dönemde deneyimlerini benimle paylaşan ve özellikle laboratuvarlara oryantasyonumda büyük payı olan Sayın Dr. İlnur ŞENVER ÖZÇELİK'e teşekkür ederim. Çalışmalarım sırasında destek ve yardımlarını esirgemeyeceklerinden emin olduğum, gerektiğinde deney sistemlerimi emanet ettiğim, deneylerim sırasında bana eşlik ederek gece benimle kalan, her zaman tartışma ve önerilerle karşılıklı bilgi alışverişinde bulunduğum ve güzel bir dostluk ortamı yaratan sevgili arkadaşlarım KM Yasemin DEMİRCİ'ye, KYM Nurhan GÜNGÖR'e, KYM Hande KAYA'ya ve Biyolog Arda BÜYÜKSUNGUR'a teşekkür ederim.

Yüksek lisans çalışmalarım sırasında ve öncesinde her zaman yanımda olan en büyük desteğim, başarıım için maddi ve manevi hiçbir şeyi esirgemeyen, her zaman bana güvenen sevgili annem Güldaniye ŞENTÜRK ve sevgili babam Emin ŞENTÜRK'e ve sevgili kardeşim Bilgin ŞENTÜRK'e, beni sabırla bıkmadan dinleyen ve en stresli anlarımda bile bana destek olan sevgili ev-arkadaşım Kimyager A. Gökçe GÜRKÖK'e çok teşekkür ederim.

Birgül ŞENTÜRK
Ankara, Ağustos 2006

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ.....	iii
SİMGELER DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xxiv
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAKLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ... 8	
2.1 Mikro-biyoreaktörler: Mikroorganizmalar	9
2.1.1 Mikrobiyolojik yapı	9
2.1.1.1 Prokaryotik hücreler	10
2.1.1.2 Ökaryotik hücreler	11
2.1.2 Bakteriler	12
2.2 <i>Bacillus</i> Türü ve Özellikleri.....	14
2.2.1 <i>Bacillus</i> 'ların sınıflandırılması	15
2.2.2 <i>Bacillus subtilis</i> ve özellikleri	17
2.3 Taşınım Mekanizmaları	18
2.3.1 Serbest yayınma	19
2.3.2 Kolaylaştırılmış yayınma	20
2.3.3 Aktif taşınım	22
2.4 <i>Bacillus</i> Hücre Zarfı ve Enzimin Hücre İçinden Biyoreaktöre Taşınımı ve Mekanizması	22
2.4.1 <i>Bacillus</i> hücre zarfının yapısı ve fonksiyonu	22
2.4.1.1 Sitoplazmik membran	23
2.4.1.2 <i>Bacillus</i> hücre duvarı	23
2.4.2 <i>Bacillus</i> türlerinde proteinlerin salgılanması	25
2.4.2.1 Salgilama çalışmalarında <i>Bacillus</i> türleri	26
2.4.2.2 Alkali proteaz enziminin hücre dışına taşınımı.....	27
2.4.2.3 Salgilama için hücre duvarı engeli.....	29
2.5 Genetik Mühendisliği Teknikleri ve Moleküler Tasarım.....	30

2.5.1 Nükleik asitler	30
2.5.2 DNA yapısı ve fonksiyonu	33
2.5.3 RNA ve yapısı	35
2.5.4 Mikro-Reaksiyon Mühendisliği ve Mikro-Ayırma İşlemleri	36
2.5.4.1 DNA'nın kimyasal sentezi.....	36
2.5.4.2 Gen dizininin belirlenmesi	37
2.5.4.3 Polimeraz zincir tepkimesiyle (PCR) gen derişiminin artırılması	38
2.5.4.4 PCR tekniği kullanılarak hibrit gen oluşturulması: SOE yöntemi	40
2.5.4.5 Gen derişiminin ölçümü	42
2.5.4.6 Restriksiyon enzimleri ve seçimi	43
2.5.4.7 Plasmidler ve özellikleri	45
2.5.4.8 Klonlama : Ligasyon tepkimesi	47
2.5.4.9 Genin hücreye transferi	48
2.5.4.10 Geni taşıyan plasmidlerin aranması	50
2.6 Proteinler	53
2.6.1 Proteinlerin sınıflandırılması	53
2.6.2 Proteinlerin yapısı	54
2.7 Hormonlar	55
2.7.1 İnsan Büyüme Hormonu (hGH - Human Growth Hormone)	55
2.7.1.1 Yapısı ve doğal sentezi	55
2.7.1.2 Fizyolojik ve metabolik etkileri	57
2.7.1.3 hGH'nin terapatik protein için kullanım onayı: Tariğçesi ve üretimi	58
2.8 Biyoproses Karakteristikleri	59
2.9 Biyoreaktör İşletim Parametreleri	62
2.9.1 Sıcaklık	62
2.9.2 pH	63
2.9.3 Oksijen aktarımı	64
2.10 Metabolik Mühendislik	71
2.10.1 Hücre-içi tepkimeler	73
2.10.2 Hücre-içi tepkime hızlarının belirlenmesi ve analizi :	
Metabolik Akı Analizi (MAA)	76
2.11 Süreli Yayınlarda İnsan Büyüme Hormonu (hGH) Üretimi	85

3. MATERYAL VE YÖNTEM	99
3.1 Mikroorganizmalar	99
3.2 Rekombinant <i>Bacillus</i> Türleri Geliştirmede Kullanılan	
Genetik Mühendisliği Teknikleri	100
3.2.1 Kullanılan bakteriler, çoğalma ortamı ve plasmidler	100
3.2.2 Kromozomal DNA izolasyonu	101
3.2.3 DNA derişiminin belirlenmesi	102
3.2.4 PCR cihazıyla gen derişiminin artırılması	102
3.2.5 Ligasyon tepkimesiyle klonlama	104
3.2.6 DNA dizin analizi	105
3.2.7 Plasmid DNA'nın <i>E.coli</i>'ye CaCl₂ yöntemiyle transferi	105
3.2.8 <i>E. coli</i>'den plasmid DNA izolasyonu	106
3.2.9 DNA'nın agaroz jelden ekstraksiyonu	107
3.2.10 Elektroporasyonla plasmid DNA'nın <i>Bacillus</i> türlerine transferi	107
3.2.11 <i>Bacillus</i>'tan miniprep plasmid DNA izolasyonu: alkali liziz yöntemi	108
3.3 Rekombinant <i>Bacillus</i> Türleri ile hGH Üretimi	110
3.3.1 Mikrobank (mikroorganizma saklama sistemi)	110
3.3.2 Katı çoğalma ortamı	110
3.3.3 Ön sıvı çoğalma ortamı	111
3.3.4 Üretim ortamı	111
3.3.5 Ölçek büyütme adımları ve biyoreaktör sistemi	112
3.3.5.1 Pilot ölçek biyoreaktörde üretim	113
3.3.6 Analitik yöntemler	116
3.3.6.1 Mikroorganizma derişimi	116
3.3.6.2 hGH derişimi	116
3.3.6.3 hGH tayini : WESTERN-BLOT yöntemi	117
3.3.6.3.1 SDS-PAGE elektroforez yöntemi	119
3.3.6.3.2 Western-Blott yöntemi	121
3.3.6.4 Glukoz derişimleri	122
3.3.6.5 Amino asit derişimleri	123
3.3.6.6 Organik asit derişimleri	124
3.3.6.7 Serin alkali proteaz enziminin aktivitesi	125

3.3.6.8 Sıvı faz kütle aktarım katsayısının ve oksijen tüketim hızının belirlenmesi	126
3.4 Hücre-içi Tepkime Hızlarının Hesaplanması	127
4. DENEY VE BULGULAR	130
4.1 hGH Üretimi için Rekombinant Mikroorganizma Geliştirilmesi	131
4.1.1 Primer tasarımı ve PCR ile gen derişiminin artırılması	131
4.1.1.1 PCR ile gen derişimi artırılması için kalıp seçimi	133
4.1.1.2 PCR ile gen derişiminin artırılması	133
4.1.1.2.1 <i>-pre(subC)</i> dizininin PCR tepkimesiyle çoğaltılması	134
4.1.1.2.2 hGH dizininin PCR tepkimesiyle çoğaltılması	135
4.1.1.2.3 <i>-pre(subC)</i> dizini ile hGH mature peptid dizininin birleştirilmesi: Hibrit-gen sentezi	138
4.1.2 Hibrit-genin pUC19 klonlanması, <i>E.coli</i> 'ye transformasyonu ve derişiminin artırılması	140
4.1.3 Hibrit-genin pMK4 <i>E.coli</i> - <i>Bacillus</i> shuttle vektörlerine klonlanması	143
4.1.4 Geliştirilen r-pMK4'ün <i>Bacillus subtilis</i> 'e türlerine transformasyonu ...	148
4.2 <i>-pre (subC)::hGH::pMK4</i> Taşıyan Mikroorganizmaların hGH Üretim Performansı (Expression)	149
4.2.1 hGH üretimi için ortam tasarımı	149
4.2.1.1 Üretim ortamında eklenen tuz çözeltisinin etkisi	150
4.2.1.2 Başlangıç glukoz derişiminin etkisi	157
4.3 Rekombinant hGH Üretimine Oksijen Aktarım Etkileri	163
4.3.1 Oksijen aktarımının etkileri	163
4.3.2 hGH üretiminde oksijen aktarım karakteristikleri	186
4.3.2.1 Oksijen aktarım katsayısı	186
4.3.2.2 Oksijen tüketim hızı	188
4.3.3 Metabolik akı analizi: Hücreiçi tepkime hızları	191
4.4 Hibrit-gen <i>subC::hGH</i> İçeren ve İçermeyen pMK4 Taşıyan <i>B. subtilis</i> ile hGH Üretim ve Biyoproses Karakteristiklerinin Kıyaslanması	207
4.4.1 Ürün ve yan-ürün dağılımına etkileri	207
4.4.2 Oksijen aktarım karakteristikleri	217
4.4.3 Metabolik yolizi analizi ile hücreiçi akıların bulunması	220

4.5 Amino Asit Eklenmesinin hGH Üretimine Etkisi	226
4.5.1 $t_e=0$ st'te amino asit eklenmesinin hGH üretimine etkisi	226
4.5.1.1 Metabolik akı analizi.....	244
4.5.2 $t_e=24$ st'te amino asit eklenmesinin hGH üretimine etkisi	249
5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR	260
5.1 Rekombinant Mikroorganizma Geliştirilmesi	260
5.2 <i>r-Bacillus subtilis</i> ile hGH Üretiminde Ortam Optimizasyonu	263
5.3 Oksijen Aktarım Karakteristikleri	264
5.4 Hibrit-gen <i>-pre(subC):hGH</i> İçeren ve İçermeyen pMK4 Taşıyan <i>B. subtilis</i> ile hGH Üretim ve Biyoproses Karakteristiklerinin Kıyaslanması	272
5.5 Üretim Ortamına Eklenen Amino Asitlerin hGH Üretimine Etkileri	275
5.6 Sonuçlar	277
5.7 Hedeflenen Çalışma	279
KAYNAKLAR	280
EKLER.....	287
EK 1 Genetik Mühendisliği Araştırma Programında Kullanılan Çözeltilerin Bileşimi	288
EK 2 Mikroorganizma Derişimi İçin Kalibrasyon Eğrisi	290
EK 3 Glukoz Derişimi İçin Kalibrasyon Eğrisi	291
EK 4 Glukoz Analiz Çözeltisi	292
EK 5 CE Enzim Analizi Örnek Elektroferogramı	293
EK 6 hGH Derişim Kalibrasyonu	294
EK 7 SDS-PAGE ve WESTERN-BLOTT yöntemlerinde kullanılan çözeltileri	295
EK 8 Serin Alkali Proteaz (SAP) Aktivitesi Kalibrasyonu	297
EK 9 Dinamik Yöntem ile Sıvı Faz Kütle Aktarım Katsayısı ve Mikroorganizma Oksijen Tüketim Hızının Belirlenmesi	298
EK 10 Primerlerin Tasarımı.....	299
EK 11 Araştırma Programında Kullanılmış Olan Marker'lar	302
EK 12 GAMS Paket Programı ile MYM Analizi İçin Matematik Modelin Çözümünde Kullanılan Program	304
ÖZGEÇMİŞ	313

SİMGELER DİZİNİ

A	Metabolik tepkime sisteminin $m \times n$ stokiyometrik katsayılar matrisi
Abs	Absobans
C_{AA}	Toplam amino asit derişimi, kg/m^3
C_{Ao}	Başlangıç azot kaynağı derişimi, kg/m^3
C_{Ko}	Başlangıç karbon kaynağı derişimi, kg/m^3
C_{Go}	Başlangıç glukoz derişimi, kg/m^3
C_G	Glukoz derişimi, kg/m^3
C_{OA}	Toplam organik asit 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
$c(t)$	Metabolit birikim vektörü
$c_1(t)$	Hücre dışı metabolit birikim vektörü
$c_2(t)$	Hücreiçi metabolit birikim vektörü
E	Artma faktörü ($=K_{La} / K_{La_0}$)
K_{La}	Sıvı faz hacimsel kütle aktarım katsayısı, s^{-1}
N	Karıştırma hızı, dk^{-1}
N_A	A bileşeni için molar kütle aktarım akısı (OTR), $\text{mol m}^{-3} \text{s}^{-1}$
OTR_{\max}	Maksimum kütle aktarım akısı, $\text{mol m}^{-3} \text{s}^{-1}$
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
q_p	Spesifik hGH üretim hızı, $\text{kg kg}^{-1} \text{st}^{-1}$
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, $\text{kg/m}^3 \text{st}$
$r(t)$	Tepkime hız (akı) vektörü
t	Kalma süresi, s veya st
T	Sıcaklık, °C
V_R	Biyodönüşüm ortamı hacmi, cm^3
Z	Amaç fonksiyon

$Y_{X/S}$	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
α_i	Stokiyometrik katsayılar
λ	Dalga boyu, nm
μ	Spesifik çoğalma hızı, s^{-1}
μ_{max}	Maksimum spesifik çoğalma hızı, s^{-1}
η	Etkinlik katsayısı

Kısaltmalar

AcCoA	Asetil koenzim A
ADP	Adenozin 5'-difosfat
ATP	Adenozin 5'-trifosfat
DAHP	3-deoksi-D-arabino-heptulozonat 7-fosfat
E4P	Eritroz 4-fosfat
F6P	Fruktoz 6- fosfat
FTS	Fosfotransferaz sistemi
G6P	Glukoz 6- fosfat
hGH	İnsan Büyüme Hormonu
α KG	Alfa ketoglutarik asit
OA	Okzaloasetik asit
PEP	Fosfoenol piruvat
Phe	L-fenilalanin
PFY	Pentoz fosfat yolizi
R#	Reaksiyon numarası
R5P	Ribuloz 5-fosfat
TCA	Trikarboksilik asit
T3P	Trioz 3-fosfat

Metabolik tepkime sistemi ile ilgili kısaltmalar

AacAc	L-Amino-Aseto-Asetate
AcAc	Asetoasetat
Ac	Asetat
Ac-AK	N-asetil-L-2-amino-6-ketopimelat
Aclac	Asetolaktat
AcCoA	Asetil koenzim A
Ac-DAP	N-asetil-L,L-diaminopimelat
AcGlu	N-asetil glutamate
AcGluP	N-asetil glutamil-P
AcGluSa	N-asetil-glutamat-semialdehid
AcHbut	2-aseto-2-hidroksi bitürat
AcHser	O-asetil-L-homoserin
AcrCoA	Akrilil koenzim A
AcOrn	Asetil ornitin
Adip	Adipat
AdipCoA	3-okzo Adipil koenzim A
ADP	Adenozin 5'-difosfat
ADPHep	ADP-D-gliserol-D-mannoheptoz
AEL	3-okzo Adipat- enol-lakton
Ala	L-Alanin
AMP	Adenozin 5'-monofosfat
AMY	α -Amilaz
Anth	Antranilat
Arg	L-Arginin
Asn	L-Asparajin
Asp	L-Aspartik asit
AspgP	4-asperjil-P
AspSa	Aspartat semialdehid
ATP	Adenozin 5'-trifosfat
C14:0	Miristik asit
C14:1	Hidroksimiristik asit

CaP	Karbamoil-fosfat
Cat	Katekol
CDP	Sitidin 5'-difosfat
CDPEtN	CDP-etanolamin
Chor	Korizmat
Cit	Sitrate
Citr	Sitrulin
ChisoCap	3-karboksi, 3-hidroksi izocaproat
CMP	Sitidin 5'-monofosfat
CMPKDO	CMP-3-deoksi-D-manno-oktulozonik asit
CO ₂	Karbondioksid
CPADRib	1-(2-karboksifenilamino)-1'-dehidroksiribuloz-5'-P
CrotCoA	Krotonil koenzim A
CTP	Sitidin 5'-trifosfat
Cys	L-Sistein
Cysn	L-Sistationin
CV3Pshik	O-(1-karboksivinil)-3-P-şikimat
DAP	diaminopimelat
DATP	2'-Deoksi-ATP
DCTP	2'-Deoksi-CTP
DGTP	2'-Deoksi-GTP
DTTP	2'-Deoksi-TTP
DShik	3-dehidroşikimat
DQui	3-dehidrokinat
DC	L-2,3 dihidrodipikolinat
DDD7P	7P-2 dehidro-3-deoksi-D-arabinoheptonat
DHF	7,8-Dihidrofolat
Disoval	2,3- Dihidroksiizovalerat
DMV	2,3-dihidroksi-3-metilvalerat
E4P	Erithroz 4-fosfat
FacAc	Fumarilasetoasetat
F10THF	N ¹⁰ -Formil-THF

F6P	Fruktoz 6-fosfat
FA	Yağ asitleri
FADH	Flavin adenindinükleotid (indirgenmiş)
Fglu	N-forminyl-glutamat
FKV	N-Formil-kinurenin
Fum	Fumarat
G1P	Glukoz 1-fosfat
G6P	Glukoz 6- fosfat
GDP	Guanozin 5'-difosfat
GL3P	Gliserol 5- fosfat
Glc	Glukoz
Gln	L-Glutamin
Glu	L-Glutamat
Gluc	Glukonat
Gluc6P	Glukonat 6-fosfat
GluCoA	Glutaril koenzim A
GlucCoA	Glutakonil koenzim A
GluP	L-Glutamil-P
GluSa	Glu-5-semialdehid
Glx	Gliokzalat
Gly	L-Glisin
GMP	Guanozin 5'-monofosfat
GTP	Guanozin 5'-trifosfat
HBCoA	3-hidroksibutiril koenzim A
Hcys	L-homosistein
Hgen	Homojentsat
H ₂ S	Hidrojen sülfid
HIBCoA	β-hidroksiisobutiril koenzim A
Hibut	Hidroksiisobutirat
His	L-Histidin
HMGCoA	Hidroksimetil glutakonil koenzim A
HPP	4-hidroksifenil pirüvat

Hprop	3-hidroksipropiyonat
HpropCoA	3-hidroksipropiyonil koenzim A
Hpyr3P	3-P-Hidroksipruvat
HPPyr	4-hidroksifenilpiruvat
HSer	Homoserin
HserP	O-fosfo-L-homoserin
IbutCoA	Izobutiril koenzim A
Icit	Izositrat
IGP	Indolegliserolfosfat
Ile	L-Izolözin
IMP	Inozinmonofosfat
Iprop	4-imidazolon-5-propiyonat
IpropMal	3-izopropilmalat
IvalCoA	İzovalerat koenzim A
α KG	α -ketoglutarat
KisoAsp	Ketoizo Aspartat
Kval	Ketovalin
KV	L-Kinurenin
Lac	Laktat
Leu	L-Lözin
Lys	L-Lizin
MACoA	metil Akril koenzim A
MAcAc	4-maleil AsetoAsetat
MacCoA	2-metil-aseto-asetil koenzim A
Mal	Malat
MalSa	Malonat semialdehid
MCCoA	β -metilcrotonil koenzim A
mDAP	mezo-Diaminopimelat
Met	L-Metionin
MetBCoA	2-metil-butiril koenzim A
MeTHF	N^5 - N^{10} -metenil-THF
MetTHF	N^5 - N^{10} -methilen-THF

MGCCoA	Metil glutakonil koenzim A
MhbCoA	2-metil-3-hidroksibutiril koenzim A
mMalSa	metilmalonat semialdehid
MTHF	N ⁵ - metil-THF
Muc	sis Mukonat
NADH	Nikotinamid-adenindinükleotid (indirgenmiş)
NADPH	Nikotinamid-adenindinükleotid fosfat (indirgenmiş)
NH ₃	Amonyak
OA	Okzaloasetat
OacSer	o-asetilserin
Obut	2-okzobitürat
Orn	Ornitin
Oval	2-okzo-3-metilvalerat
OisoCap	2-okzoizocaproat
PEP	Fosfoenolpirüvat
PG3	Gliserat 3-fosfat
Phe	L-fenilalanin
PhePyr	Fenilpiruvat
Pi	Inorganik ortofosfat
PPi	Inorganik pirofosfat
PRAIC	5'-fosforibozil-4-karboksamid-5-aminoimidazol
PRAnth	N-5'-fosforibozilantranilat
Prep	Prefenat
Pro	L-Prolin
PropCoA	Propiyonil koenzim A
PRPP	5-fosfo-D-ribozil pirofosfat
3Pser	3-fosfo serin
Pyr	Pirüvat
R5P	Ribuloz 5-fosfat
Rib5P	Riboz 5- fosfat
S7P	Sedoheptuloz-7- fosfat
Ser	L-Serin

Shik	Şikimat
Shik5P	Shikimat-5-P
Suc	Suksinat
SucCoA	Suksinat koenzim A
Xyl5P	Ksiloz 5- fosfat
Tet	L-2,3,4,5 Tetrahidrodipikolinat
T3P	Trioz 3- fosfat
THF	Tetrahidrofolat
Thr	L-Treonin
Trp	L-Triptofan
Tyr	L-Tirozin
Ucar	Urokarat
UDP	Uridin 5'-difosfat
UDPGlc	UDP-glucoz
UDPNAG	UDP-N-Asetil-glukozamin
UDPNAM	UDP-N-Asetil-murami asit
UMP	Uridin 5'-monofosfat
UTP	Uridin 5'-tri fosfat
Val	L-Valin

Oksijen aktarım koşulları ile ilgili kısaltmalar

HOT	Yüksek oksijen aktarım koşulu ($Q_o/V_R = 0.7$ vvm hava giriş hızı, $N = 800 \text{ dk}^{-1}$ karıştırma hızı)
LOT	Düşük oksijen aktarım koşulu ($Q_o/V_R = 0.5$ vvm hava giriş hızı, $N = 500 \text{ dk}^{-1}$ karıştırma hızı)
MOT1	Orta oksijen aktarım koşulu-1 ($Q_o/V_R = 0.5$ vvm hava giriş hızı, $N = 700 \text{ dk}^{-1}$ karıştırma hızı)
MOT2	Orta oksijen aktarım koşulu-2 ($Q_o/V_R = 0.5$ vvm hava giriş hızı, $N = 800 \text{ dk}^{-1}$ karıştırma hızı)
OA	Oksijen aktarımı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Hücrelerin sınıflandırılması.....	10
Şekil 2.2 Bakteri hücresi.....	13
Şekil 2.3 Bakterilerin üç farklı formu.....	13
Şekil 2.4 Serbest yayınma	20
Şekil 2.5 Kolaylaştırılmış yayınma	21
Şekil 2.6 Aktif taşınım	21
Şekil 2.7 Hücre içindeki SAP'ın şematik gösterimi	27
Şekil 2.8 Serin alkali proteaz enziminin hücre dışına taşınımı	28
Şekil 2.9 Nükleotit biriminin yapısı.....	30
Şekil 2.10 Pürin ve pirimidin bazları	31
Şekil 2.11 DNA'nın birincil yapısı	32
Şekil 2.12 DNA'nın ikincil yapısı	32
Şekil 2.13 DNA'nın üç boyutlu yapısı	33
Şekil 2.14 PCR tepkimesiyle gen derişiminin arttırılması.....	40
Şekil 2.15 SOE genel mekanizması	42
Şekil 2.16 Restriksiyon enzimleri ile küt/yapışkan uçlu kesme tepkimesi	44
Şekil 2.17 Plasmidlerin genel yapıları	45
Şekil 2.18 Hücrede bulunan plasmid şekilleri.....	46
Şekil 2.19 Ligasyon tepkimesi	48
Şekil 2.20 İndüklenmiş transformasyon sırasında hücre ve plasmidin durumu	50
Şekil 2.21 pUC19 plasmid vektörü.....	52
Şekil 2.22 Protein oluşum mekanizması.....	53
Şekil 2.23 22kDa'luk hGH'nin amino asit dizini.....	57
Şekil 2.24 İki film tabakasına göre bir gaz kabarcığından mikroorganizmaya oksijenin aktarım mekanizması	65
Şekil 2.25 Dinamik Yöntem uygulamasında çözünmüş oksijen derişiminin kalma süresi ile derişimi	70
Şekil 2.26 Dinamik Yöntem ile sıvı faz hacımsal kütle aktarım katsayısının belirlenmesi	70
Şekil 3.1 pUC19 ve pMK4 plasmidlerinin şekilleri	101
Şekil 3.2 Pilot ölçek biyoreaktör sistemi	115

Şekil 3.3 SDS-PAGE modülüne yerleştirilmiş jele örnek yüklenmesi	120
Şekil 3.4 Proteinlerin poliakrilamid jelden membrana aktarımı	121
Şekil 3.5 Dinamik yöntem ile sıvı faz hacımsal kütle aktarım katsayısının belirlenmesi	127
Şekil 3.6 <i>r-Bacillus subtilis</i> 'in metabolik yolizi haritası	129
Şekil 4.1.a <i>-pre(subC)</i> geninin nükleik asit dizinimi	132
Şekil 4.1.b <i>hGH</i> geninin nükleik asit dizini	132
Şekil 4.2 Tasarlanan alternatif <i>hGH</i> geri primerler II ve III	136
Şekil 4.3 a-PCR ile <i>-pre (subC)</i> dizininin sentez sonucu, b-PCR ile <i>hGH</i> mature peptit dizininin sentez sonucu	137
Şekil 4.4 SOE yöntemiyle hibrit gen oluşumunun şematik gösterimi.....	138
Şekil 4.5 SOE reaksiyonu ile hibrit gen elde edilmesi sonuçları	139
Şekil 4.6 r-pUC19 plasmidi tasarım şeması.....	142
Şekil 4.7.a Muhtemel r-pUC19 izolasyon görüntüleri.....	143
Şekil 4.7.b Muhtemel r-pUC19'un kontrolü	143
Şekil 4.8 r-pUC19 kesme tepkimesi sonucu	144
Şekil 4.9 Jelden ekstrakte edilmiş hibrit gen.....	144
Şekil 4.10 r-pMK4 plasmidinin tasarım şeması.....	146
Şekil 4.11 <i>Bam</i> HI ve <i>Sal</i> I enzimleriyle kesilmiş pMK4	147
Şekil 4.12 İzole muhtemel r-pMK4 plasmidleri	147
Şekil 4.13 a-Muhtemel r-pMK4 plasmidlerin PCR tepkime sonuçları b-Kesilmiş muhtemel r-pMK4 plasmidleri	147
Şekil 4.14 İzole muhtemel r-pMK4'ler	148
Şekil 4.15 Kesik muhtemel r-pMK4'ler	148
Şekil 4.16 Hibrit genin PCR görüntüsü	149
Şekil 4.17 <i>r-B.subtilis</i> BGSC-1A751 ve <i>r-B.subtilis</i> BGSC-1A197 için mikroorganizma derişiminin ve glukoz derişiminin t ile değişimi. $C_{GO}= 8 \text{ kg/m}^3$; $V_R= 110 \text{ cm}^3$; $T= 37 \text{ }^\circ\text{C}$; $N= 200 \text{ dk}^{-1}$; $\text{pH}_0= 7.25$	150
Şekil 4.18 <i>r-B.subtilis</i> BGSC-1A751 ve <i>r-B.subtilis</i> BGSC- 1A197 için SAP aktivitesi ve <i>hGH</i> derişiminin t ile değişimi. $C_{GO}= 8 \text{ kg/m}^3$; $V_R= 110 \text{ cm}^3$; $T= 37 \text{ }^\circ\text{C}$; $N= 200 \text{ dk}^{-1}$; $\text{pH}_0= 7.25$	151
Şekil 4.19 <i>r-B.subtilis</i> BGSC-1A751 derişiminin t ile değişimine eklene	

	inhibitör derişiminin etkisi: $V_R= 110 \text{ cm}^3$; $T= 37 \text{ }^\circ\text{C}$; $N= 200 \text{ dk}^{-1}$; $C_{G_0}= 8 \text{ kg/m}^3$; $\text{pH}_0= 7.25$	152
Şekil 4.20	<i>r-B.subtilis</i> BGSC-1A751 ile glukoz derişiminin t ile değişimine eklenen inhibitör derişiminin etkisi: $V_R= 110 \text{ cm}^3$; $T= 37 \text{ }^\circ\text{C}$; $N= 200 \text{ dk}^{-1}$; $C_{G_0}= 8 \text{ kg/m}^3$; $\text{pH}_0= 7.25$	153
Şekil 4.21	<i>r-B.subtilis</i> BGSC-1A751 ile hGH derişiminin t ile değişimine eklenen inhibitör derişiminin etkisi: $V_R= 110 \text{ cm}^3$; $T= 37 \text{ }^\circ\text{C}$; $N= 200 \text{ dk}^{-1}$; $C_{G_0}= 8 \text{ kg/m}^3$; $\text{pH}_0= 7.25$	154
Şekil 4.22	<i>r-B.subtilis</i> BGSC-1A197 derişiminin t ile değişimine eklenen inhibitör derişiminin etkisi: $V_R= 110 \text{ cm}^3$; $T= 37 \text{ }^\circ\text{C}$; $N= 200 \text{ dk}^{-1}$; $C_{G_0}= 8 \text{ kg/m}^3$; $\text{pH}_0= 7.25$	155
Şekil 4.23	<i>r-B.subtilis</i> BGSC-1A197 ile glukoz derişiminin t ile değişimine eklenen inhibitör derişiminin etkisi: $V_R= 110 \text{ cm}^3$; $T= 37 \text{ }^\circ\text{C}$; $N= 200 \text{ dk}^{-1}$; $C_{G_0}= 8 \text{ kg/m}^3$; $\text{pH}_0= 7.25$	156
Şekil 4.24	<i>r-B.subtilis</i> BGSC-1A197 ile hGH derişiminin t ile değişimine eklenen inhibitör derişiminin etkisi: $V_R= 110 \text{ cm}^3$; $T= 37 \text{ }^\circ\text{C}$; $N= 200 \text{ dk}^{-1}$; $C_{G_0}= 8 \text{ kg/m}^3$; $\text{pH}_0= 7.25$	157
Şekil 4.25	Mikroorganizma derişiminin t ile değişimine başlangıç glukoz derişiminin etkisi: $V_R= 110 \text{ cm}^3$; $T= 37 \text{ }^\circ\text{C}$; $N= 200 \text{ dk}^{-1}$; $\text{pH}_0= 7.25$	159
Şekil 4.26	Glukoz derişiminin t ile değişimi: $V_R= 110 \text{ cm}^3$; $T= 37 \text{ }^\circ\text{C}$; $N= 200 \text{ dk}^{-1}$; $\text{pH}_0= 7.25$	160
Şekil 4.27	hGH derişiminin t ile değişimine başlangıç glukoz derişiminin etkisi: $V_R= 110 \text{ cm}^3$; $T= 37 \text{ }^\circ\text{C}$; $N= 200 \text{ dk}^{-1}$; $\text{pH}_0= 7.25$	161
Şekil 4.28	a- Laboratuvar ölçek üretim deneyi sonucunda SDS-PAGE analizi b- Laboratuvar ölçekte üretilen hGH'nin Western Blot analiz sonucu	162
Şekil 4.29	<i>r-B.subtilis</i> BGSC-1A751 ile hGH üretiminde pH'ın oksijen aktarımı ve t ile değişimi: $C_{G_0}=8 \text{ kgm}^{-3}$, $\text{pH}_0=7.25$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=550 \text{ cm}^3$	166
Şekil 4.30	<i>r-B.subtilis</i> BGSC-1A751 ile hGH üretiminde çözünmüş oksijen derişiminin oksijen aktarımı ve t ile değişimi: $C_{G_0}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH}_0=7.25$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=550 \text{ cm}^3$	167
Şekil 4.31	<i>r-B.subtilis</i> BGSC 1A751 ile hGH üretiminde hücre derişiminin oksijen aktarımı ve t ile değişimi: $C_{G_0}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH}_0=7.25$, $T=37^\circ\text{C}$,	

	$V_R=550 \text{ cm}^3$	168
Şekil 4.32	<i>r-B.subtilis</i> BGSC 1A751 ile hGH üretiminde glukoz derişiminin oksijen aktarımı ve t ile değişimi: $C_{Go}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $pH_o=7.25$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=550 \text{ cm}^3$	169
Şekil 4.33	<i>r-B.subtilis</i> BGSC 1A751 ile hGH üretiminde hGH derişiminin oksijen aktarımı ve t ile değişimi: $C_{Go}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $pH_o=7.25$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=550 \text{ cm}^3$	170
Şekil 4.34	$Q_o/V_R=0.5$ vvm hava giriş hızında karıştırma hızının hGH üretime etkisini gösteren Western Blott analiz.	171
Şekil 4.35	$N= 800 \text{ dk}^{-1}$ karıştırma hızında hava giriş hızının hGH üretime etkisinin incelendiği deneydeki Western Blott sonucu.	171
Şekil 4.36	MOT2 koşulunda hGH derişiminin kalma süresiyle değişimini gösteren Dot-Blott analizi.	171
Şekil 4.37	$Q_o/V_R = 0.5$ vvm, $N= 500 \text{ dk}^{-1}$ (LOT) OA- koşulunda ortama aktarılan amino asit derişimlerinin t ile değişimi: $C_{Go}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $pH_o=7.25$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=550 \text{ cm}^3$	175
Şekil 4.38	$Q_o/V_R = 0.5$ vvm, $N= 700 \text{ dk}^{-1}$ (MOT1) OA- koşulunda ortama aktarılan amino asit derişimlerinin t ile değişimi: $C_{Go}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $pH_o=7.25$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=550 \text{ cm}^3$	176
Şekil 4.39	$Q_o/V_R = 0.5$ vvm, $N= 800 \text{ dk}^{-1}$ (MOT2) OA- koşulunda ortama aktarılan amino asit derişimlerinin t ile değişimi: $C_{Go}=8 \text{ kgm}^{-3}$, $pH_o=7,25$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=550\text{cm}^3$	177
Şekil 4.40	$Q_o/V_R = 0.7$ vvm, $N= 800 \text{ dk}^{-1}$ (HOT) OA- koşulunda ortama aktarılan amino asit derişimlerinin t ile değişimi: $C_{Go}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $pH_o=7.25$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=550 \text{ cm}^3$	178
Şekil 4.41	$Q_o/V_R = 0.5$ vvm , $N= 500 \text{ dk}^{-1}$ (LOT) OA- koşulunda ortama aktarılan organik asit derişimlerinin t ile değişimi: $C_{Go}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $pH_o=7.25$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=550 \text{ cm}^3$	179
Şekil 4.42	$Q_o/V_R = 0.5$ vvm, $N= 700 \text{ dk}^{-1}$ (MOT1) OA- koşulunda ortama aktarılan organik asit derişimlerinin t ile değişimi: $C_{Go}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $pH_o=7.25$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=550 \text{ cm}^3$	180
Şekil 4.43	$Q_o/V_R = 0.5$ vvm, $N= 800 \text{ dk}^{-1}$ (MOT2) OA- koşulunda ortama	

aktarılan organik asit derişimlerinin t ile değişimi: $C_{Go}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH}_0=7.25$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=550 \text{ cm}^3$	181
Şekil 4.44 $Q_O/V_R = 0.7 \text{ vvm}$, $N= 800 \text{ dk}^{-1}$ (HOT) OA- koşulunda ortama aktarılan organik asit derişimlerinin t ile değişimi: $C_{Go}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH}_0=7.25$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=550 \text{ cm}^3$	182
Şekil 4.45 P1 ve P2 proseslerinde çözünmüş oksijen derişiminin ve pH'ın t ile değişimi: $C_{Go}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH}_0=7.25$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=550 \text{ cm}^3$	209
Şekil 4.46 P1 ve P2 proseslerinde glukoz, hücre ve hGH derişimlerinin t ile değişimi: $C_{Go}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH}_0=7.25$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=550 \text{ cm}^3$	210
Şekil 4.47 P1 'de ortama aktarılan amino asit derişimlerinin t ile değişimi: $C_{Go}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH}_0=7.25$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=550 \text{ cm}^3$	211
Şekil 4.48 P2 'de ortama aktarılan amino asit derişimlerinin t ile değişimi: $C_{Go}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH}_0=7.25$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=550 \text{ cm}^3$	212
Şekil 4.49 P1 'de ortama aktarılan organik asit derişimlerin t ile değişimi: $C_{Go}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH}_0=7.25$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=550 \text{ cm}^3$	213
Şekil 4.50 P2 'de ortama aktarılan organik asit derişiminin t ile değişimi: $C_{Go}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH}_0=7.25$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=550 \text{ cm}^3$	214
Şekil 4.51 $t_e=0$ 'da amino asit eklenmesi ile pH'ın t ile değişimi: $C_{Go}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH}_0=7.25$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=550 \text{ cm}^3$, $Q_O/V_R=0.5 \text{ vvm}$, $N=800 \text{ dk}^{-1}$	228
Şekil 4.52 $t_e=0$ 'da amino asit eklenmesi ile çözünmüş oksijen derişiminin t ile değişimi: $C_{Go}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH}_0=7.25$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=550 \text{ cm}^3$, $Q_O/V_R=0.5 \text{ vvm}$, $N=800 \text{ dk}^{-1}$	229
Şekil 4.53 $t_e=0$ 'da amino asit eklenmesi ile hücre derişiminin t ile değişimi: $C_{Go}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH}_0=7.25$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=550 \text{ cm}^3$, $Q_O/V_R=0.5 \text{ vvm}$, $N=800 \text{ dk}^{-1}$	230
Şekil 4.54 $t_e=0$ 'da amino asit eklenmesi ile glukoz derişiminin t ile değişimi: $C_{Go}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH}_0=7.25$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=550 \text{ cm}^3$, $Q_O/V_R=0.5 \text{ vvm}$, $N=800 \text{ dk}^{-1}$	231
Şekil 4.55.a $t_e=0$ 'da amino asit eklenmesi ile hGH derişiminin t ile değişimi: $C_{Go}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH}_0=7.25$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=550 \text{ cm}^3$, $Q_O/V_R=0.5 \text{ vvm}$, $N=800 \text{ dk}^{-1}$	232
Şekil 4.55.b hGH üretim hızının t ile değişimi. $C_{Go}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH}_0=7.25$,	

	$T=37^{\circ}\text{C}$, $V_R=550\text{ cm}^3$, $Q_O/V_R=0.5\text{vvm}$, $N=800\text{ dk}^{-1}$	233
Şekil 4.55.c	q_p 'nin t değişimi. $C_{G_0}=8\text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH}_0=7.25$, $T=37^{\circ}\text{C}$, $V_R=550\text{ cm}^3$, $Q_O/V_R=0.5\text{vvm}$, $N=800\text{ dk}^{-1}$	234
Şekil 4.56	$t_e=0$ st'te aspartik asit eklendiğinde aktarılan amino asitlerin derişimlerinin t ile değişimi. $C_{G_0}=8\text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH}_0=7.25$, $T=37^{\circ}\text{C}$, $V_R=550\text{ cm}^3$, $N=800\text{ dk}^{-1}$, $Q_O/V_R=0.5\text{vvm}$	237
Şekil 4.57	$t_e=0$ st'te glutamik asit eklendiğinde aktarılan amino asitlerin derişimlerinin t ile değişimi. $C_{G_0}=8\text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH}_0=7.25$, $T=37^{\circ}\text{C}$, $V_R=550\text{ cm}^3$, $N=800\text{ dk}^{-1}$, $Q_O/V_R=0.5\text{vvm}$	238
Şekil 4.58	$t_e=0$ st'te serin eklendiğinde aktarılan amino asitlerin derişimlerinin t ile değişimi. $C_{G_0}=8\text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH}_0=7.25$, $T=37^{\circ}\text{C}$, $V_R=550\text{ cm}^3$, $N=800\text{ dk}^{-1}$, $Q_O/V_R=0.5\text{vvm}$	239
Şekil 4.59	$t_e=0$ st'te lözin+valin eklendiğinde aktarılan amino asitlerin derişimlerinin t ile değişimi. $C_{G_0}=8\text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH}_0=7.25$, $T=37^{\circ}\text{C}$, $V_R=550\text{ cm}^3$, $N=800\text{ dk}^{-1}$, $Q_O/V_R=0.5\text{vvm}$	240
Şekil 4.60	$t_e=0$ st'te aspartik asit eklendiğinde aktarılan organik asitlerin derişimlerinin t ile değişimi. $C_{G_0}=8\text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH}_0=7.25$, $T=37^{\circ}\text{C}$, $V_R=550\text{ cm}^3$, $N=800\text{ dk}^{-1}$, $Q_O/V_R=0.5\text{vvm}$	241
Şekil 4.61	$t_e=0$ st'te glutamik asit eklendiğinde aktarılan organik asitlerin derişimlerinin t ile değişimi. $C_{G_0}=8\text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH}_0=7.25$, $T=37^{\circ}\text{C}$, $V_R=550\text{ cm}^3$, $N=800\text{ dk}^{-1}$, $Q_O/V_R=0.5\text{vvm}$	242
Şekil 4.62	$t_e=0$ st'te serin eklendiğinde aktarılan organik asitlerin derişimlerinin t ile değişimi. $C_{G_0}=8\text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH}_0=7.25$, $T=37^{\circ}\text{C}$, $V_R=550\text{ cm}^3$, $N=800\text{ dk}^{-1}$, $Q_O/V_R=0.5\text{vvm}$	243
Şekil 4.63	$t_e=0$ st'te lözin+valinin eklendiğinde aktarılan organik asitlerin derişimlerinin t ile değişimi. $C_{G_0}=8\text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH}_0=7.25$, $T=37^{\circ}\text{C}$, $V_R=550\text{ cm}^3$, $N=800\text{ dk}^{-1}$, $Q_O/V_R=0.5\text{vvm}$	244
Şekil 4.64	$t_e=24$ st'te amino asit eklenmesi ile pH 'ın t ile değişimi. $C_{G_0}=8\text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH}_0=7.25$, $T=37^{\circ}\text{C}$, $V_R=550\text{ cm}^3$, $N=800\text{ dk}^{-1}$, $Q_O/V_R=0.5\text{vvm}$	250
Şekil 4.65	$t_e=24$ st'te amino asit eklenmesi ile çözünmüş oksijen derişiminin t ile değişimi. $C_{G_0}=8\text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH}_0=7.25$, $T=37^{\circ}\text{C}$, $V_R=550\text{ cm}^3$, $N=800\text{ dk}^{-1}$, $Q_O/V_R=0.5\text{vvm}$	251

- Şekil 4.66 $t_e=24$ st'te amino asit eklenmesi ile hücre derişiminin t ile değişimi.
 $C_{G_0}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $pH_0=7.25$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=550 \text{ cm}^3$, $N=800 \text{ dk}^{-1}$,
 $Q_O/V_R= 0.5 \text{vvm}$ 252
- Şekil 4.67 $t_e=24$ st'te amino asit eklenmesi ile glukoz derişiminin t ile değişimi.
 $C_{G_0}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $pH_0=7.25$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=550 \text{ cm}^3$, $N=800 \text{ dk}^{-1}$,
 $Q_O/V_R= 0.5 \text{vvm}$ 253
- Şekil 4.68 $t_e=24$ st'te amino asit eklenmesi ile hGH derişiminin t ile değişimi.
 $C_{G_0}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $pH_0=7.25$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=550 \text{ cm}^3$, $N=800 \text{ dk}^{-1}$,
 $Q_O/V_R= 0.5 \text{vvm}$ 254
- Şekil 4.69 $t_e=24$ st'te amino asit karışımının eklenmesi ile ortama aktarılan amino asit derişimlerinin t ile değişimi. $C_{G_0}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $pH_0=7.25$, $T=37^\circ\text{C}$,
 $V_R=550 \text{ cm}^3$, $N=800 \text{ dk}^{-1}$, $Q_O/V_R= 0.5 \text{vvm}$ 256
- Şekil 4.70 $t_e=24$ st'te lözin+valin eklenmesi ile ortama aktarılan amino asit derişimlerinin t ile değişimi. $C_{G_0}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $pH_0=7.25$, $T=37^\circ\text{C}$,
 $V_R=550 \text{ cm}^3$, $N=800 \text{ dk}^{-1}$, $Q_O/V_R= 0.5 \text{vvm}$ 257
- Şekil 4.71 $t_e=24$ st'te amino asit karışımının eklenmesi ile aktarılan organik asit derişimlerinin t ile değişimi. $C_{G_0}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $pH_0=7.25$, $T=37^\circ\text{C}$,
 $V_R=550 \text{ cm}^3$, $N=800 \text{ dk}^{-1}$, $Q_O/V_R= 0.5 \text{vvm}$ 258
- Şekil 4.72 $t_e=24$ st'te lözin+valin eklenmesi ile aktarılan organik asit derişimlerinin t ile değişimi. $C_{G_0}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $pH_0=7.25$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=550 \text{ cm}^3$,
 $N=800 \text{ dk}^{-1}$, $Q_O/V_R= 0.5 \text{vvm}$ 259

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 Rekombinant farmasötik proteinler ve kullanım alanları.....	4
Çizelge 1.2 hGH üreten kuruluşlar ve ilaç sanayindeki ürün adları.....	5
Çizelge 1.3 <i>Bacillus sp.</i> tarafından üretilip hücre-dışına salgılanan rekombinant proteinler	5
Çizelge 2.1 <i>Bacillus</i> türlerinin fenotip benzerliklerine göre sınıflandırılması	16
Çizelge 2.2 Bazı <i>Bacillus</i> türlerinin karakteristikleri	17
Çizelge 2.3 Bakterilerde bazı metabolitlerin taşınım mekanizmaları	19
Çizelge 2.4 DNA molekül büyüklükleri	34
Çizelge 2.5 <i>E. coli</i> 'deki RNA molekülleri	36
Çizelge 2.6 Restriksiyon enzimlerinden bazılarının izole edildikleri mikroorganizmalar, hedef dizinler ve kesim biçimi	44
Çizelge 2.7 Proteinlerin metabolizmadaki bazı fonksiyonları	55
Çizelge 2.8 Farklı verim katsayılarının tanımları	61
Çizelge 2.9 Farklı substratlar için bakterilerin verim katsayıları	62
Çizelge 2.10 <i>Bacillus licheniformis</i> 'in metabolik yolizi tepkimeleri	79
Çizelge 2.11.a Rekombinant hGH üretimi ile ilgili kaynaklar: Konak-mikroorganizma: <i>E. coli</i> , rekombinant plasmid ve özellikleri, hGH üretim tipi ve ölçüm metodu	94
Çizelge 2.11.b Rekombinant hGH üretimi ile ilgili kaynaklar: Konak-mikroorganizma: <i>Bacillus</i> , rekombinant plasmid ve özellikleri, hGH üretim tipi ve ölçüm metodu	95
Çizelge 2.12 hGH üretimiyle ilgili kaynaklar : Üretim ortamı bileşenleri ve ölçülen parametreler	96
Çizelge 2.13.a hGH üretimi ile ilgili kaynak araştırması; Biyoreaktör işletim parametreleri: rekombinant <i>E. coli</i>	97
Çizelge 2.13.b hGH üretimi ile ilgili kaynak araştırması; Biyoreaktör işletim parametreleri: rekombinant <i>Bacillus</i>	98
Çizelge 3.1 Araştırmada kullanılmış olan mikroorganizma ve plasmidler	99
Çizelge 3.2 Tasarlanmış olan primer dizinleri ve işletim koşulları	103

Çizelge 3.3 Rekombinant <i>Bacillus</i> türleri için katı çoğalma ortamı	110
Çizelge 3.4 Rekombinant <i>Bacillus</i> türleri için ön sıvı çoğalma ortamı.....	111
Çizelge 3.5 Rekombinant <i>Bacillus</i> türleri için üretim ortamı	112
Çizelge 3.6 PAGE sisteminde proteinler için uygulama sınırları	119
Çizelge 3.7 New-Pico yöntemi gradyen tablosu	124
Çizelge 4.1 Tasarlanmış olan primer dizinleri	132
Çizelge 4.2 Tasarlanan primer dizinlerinin termodinamik özellikleri.....	133
Çizelge 4.3 PCR Tepkimeleriyle <i>-pre(subC)</i> genini çoğaltmada incelenen parametreler ve elde edilen sonuçlar	135
Çizelge 4.4 PCR tepkimeleriyle hGH genini çoğaltmada incelenen parametreler ve elde edilen sonuçlar.....	137
Çizelge 4.5 Oksijen aktarım koşulları ve kısaltmaları	163
Çizelge 4.6.a Toplam amino asit derişimlerinin t ile değişimi. $C_{Go}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $pH_o=7.25$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=550 \text{ cm}^3$	183
Çizelge 4.6.b Farklı oksijen aktarım koşullarında toplam organik asit derişimlerinin t ile değişimi. $C_{Go}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $pH_o=7.25$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=550 \text{ cm}^3$	184
Çizelge 4.7 Salgılanan amino- ve organik- asitler ile maksimum toplam derişimleri	185
Çizelge 4.8 Oksijen aktrım karakteristiklerinin biyoproses süresince değişimi: $C_{Go}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $pH_o=7.25$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=550 \text{ cm}^3$	189
Çizelge 4.9 Verim katsayılarının biyoproses süresince değişimi.....	190
Çizelge 4.10 Hücre derişimi ve spesifik çoğalma hızının biyoproses süresiyle değişimi	191
Çizelge 4.11 LOT'ta metabolik akılar	195
Çizelge 4.12 MOT1'ta metabolik akılar	198
Çizelge 4.13 MOT2'de (P1) metabolik akılar	201
Çizelge 4.14 HOT'ta metabolik akılar.....	204
Çizelge 4.15 İki farklı plasmid taşıyan <i>B.subtilis</i> ile MOT2 koşulunda gerçekleştirilen pilot-ölçek biyoreaktör deneyleri	207
Çizelge 4.16 P1 ve P2 proseslerinde toplam amino asit derişimlerinin t ile değişimi. $C_{Go}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $pH_o=7.25$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=550 \text{ cm}^3$, $N=800 \text{ dk}^{-1}$, $Q_o/V_R= 0.5 \text{vvm}$	216

Çizelge 4.17 P1 ve P2 proseslerinde toplam organik asit derişimlerinin t ile değişimi. C _{G0} =8 kg m ⁻³ , pH ₀ =7.25, T=37°C, V _R =550 cm ³ , N=800 dk ⁻¹ , Q ₀ /V _R = 0.5vvm	217
Çizelge 4.18 P1 ve P2 plasmidleri içeren <i>B.subtilis</i> ile oksijen aktarım karakteristiklerinin biyoproses süresince değişimi: C _{G0} =8 kg m ⁻³ , pH ₀ =7.25, T=37°C, V _R =550 cm ³	219
Çizelge 4.19 P2 prosesinde metabolik akılar	223
Çizelge 4.20 t _e = 0 st'te serin eklenen proste metabolik akılar	246

1. GİRİŞ

‘Reaksiyon mühendisliği prensipleriyle rekombinant insan büyüme hormonu üretimi için biyoproses geliştirilmesi’ konulu yüksek lisans araştırma programı kapsamında terapatik protein insan büyüme hormonunun (hGH) hücre-dışı üretimi için metabolik mühendislik tekniklerini kullanarak rekombinant mikroorganizma geliştirilmesi, üretim ortamı tasarımı ve biyoreaktör işletim parametrelerinin araştırılması amaçlanmıştır.

OECD tanımına (*Biotechnology: International Trends and Perspectives*, OECD, 1982) göre biyoteknoloji, “Biyolojik organizmaların, biyolojik sistemlerin ve biyolojik proseslerin üretim ve servis endüstrilerine uygulanması” olarak tanımlanmaktadır. Biyoteknolojik ürünler olan biyomoleküller –mikrobiyal, bitki doku veya hayvan doku-hücreleri, enzimler veya diğer biyolojik sistemler biyokatalizör olarak kullanılarak, hücre- içinde veya dışında biyokimyasal tepkimelerle üretilirler. 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 endüstrilerindeki gelişmelerin temel kaynağını oluşturmuştur. Biyoteknolojik proseslerle biyomolekülleri üreten sektörler ürünü kullanan sektör temel alınarak aşağıdaki gibi gruplanırlar:

1. Farmasötik Hammaddeler Sektörü
2. Biyokimyasal Temel Maddeler Sektörler Grubu
3. Enzim Üretim Sektörü
4. Klasik Fermantasyon Ürünleri Sektörler Grubu
5. Hayvancılık. Ormancılık.Tarım Sektörleri İçin Biyoteknolojik Ürünler Üreten Sektörler
6. Biyoteknolojik Prosesler ile Atık Arıtımı ve Enerji Üretimi şeklinde gruplanmaktadır.

Hormonlar iç salgı bezleri ve bazı organların hücrelerinde üretilen ve kan yoluyla hedef hücrelere varan, hücrelerdeki çeşitli metabolik olayları düzenleyerek vücutta önemli işler yapan kimyasal maddelerdir. hGH, doğal olarak beyinin ön lobundaki hipofiz bezlerinden salgılanan, 191 amino asit içeren 22 kDa molekül ağırlığında küresel bir proteindir. Kromozom 17 üzerinde hGH 'nu kodlayan gen bulunmaktadır. Terapatik protein hGH'nin yapısında 4 sistein ve 2 disülfid bağı bulunmaktadır. İzoelektrik noktası $pI=5.1$ 'dir. Gelişme çağında yüksek seviyede salgılanan hormonun vücuttaki derişimi yaş ilerledikçe azalmaktadır. hGH'nun en yoğun sentezlendiği periyot derin uykunun başlamasından hemen sonradır. Başta büyüme geriliği olmak üzere kemik kırıkları, yanık tedavisi, mide kanamaları, yaraların iyileştirilmesi, beslenme yetersizliğinden dolayı adelelerin gelişmemesi, vd pek çok terapatik kullanımı mevcuttur. Çocuklarda az salgılanması durumunda büyüme gecikmesi (cücelik-dwarfism) görülmektedir. Kalp-damar hastalıkları, şişmanlık, saçların beyazlaması ve ciltte kırışıklıklar gibi yaşlanma belirtilerinin çoğu yaşlanmayla birlikte hGH'deki azalmayla ilgilidir. Fazla salgılanması durumunda genç yaştakilerde dev hastalığı (gigantizm) yaşlılarda ise el ve ayak kemiklerini, çene, alın gibi çıkıntı kısımların fazla büyümesi olarak ortaya çıkan akromegaliye neden olmaktadır. hGH'nin biyolojik ve fizyolojik aktiviteleri ile protein, yağ ve karbonhidrat mekanizması üzerindeki etkileri nedeniyle terapatik protein olarak tedavide önemli bir yere sahiptir.

1980'li yılların başından itibaren Rekombinant DNA teknolojisinin gelişimi ile birlikte sağlık sektöründe önemli gelişmeler elde edilmeye başlanmıştır. Farmasötik ürünlerin başında terapatik biyomoleküller (hormonlar, antibiyotikler, monoklonal antikolar, aşılarda), hastalıkların tanımlanmasında kullanılan immunodiagnostik testler için gerekli proteinler ve DNA probları, doğum öncesi kalıtsal hastalıkların tanısında kullanılan kitler dikkati çekmektedir. Kimyasal-biyokimyasal, fizikokimyasal ve fiziksel yöntemleri kapsayan genetik mühendisliği veya moleküler biyoteknoloji ile doğal olarak elde edilmesi güç ve pahalı olan, insan sağlığı açısından önemli pek çok terapatik protein büyük miktarlarda, yüksek bilgi birikimi ve düşük ilk yatırım ve işletme koşullarında üretilebilmektedir.

Biyoteknolojik ürünlerin üretiminde ürün verimi ve seçimliliği, her ne kadar ortam bileşimi ve biyoreaktör işletim koşullarının geliştirilmesiyle artırılabilir de, mikroorganizmanın üretim kapasitesi ile sınırlıdır. Bu nedenle istenilen ürünün verim ve seçimliliğinin artırılabilmesi için o ürünü üretecek mikroorganizmanın geliştirilmesi gerekir. Bunun için insan genomundan biyomolekülün üretiminden sorumlu gen izole edilir, sonra bu gen taşıyıcı DNA moleküllerine (plasmidlere) bağlanır. Uygun bir konak hücreye transfer edilip orada çoğaltıldıktan sonra rekombinant DNA mikroorganizma içine transfer edilerek geni taşıyan uygun tasarlanmış rekombinant mikroorganizma elde edilir. Çizelge 1.1’de rekombinant DNA teknolojisi ile üretilen farmasötik proteinler verilmiştir.

Biyoteknolojik ürünler üretiminde ilk sıralarda ABD, Japonya ve AB ülkeleri yer almaktadır. Farmasötik maddeler içinde farmasötik proteinler sektörlerinde ABD yeni ürünlerle liderdir ve 2000 yılı toplam satışı yaklaşık \$ 10 Milyar değerindedir.

İlk olarak 1985’te Genentech (ABD) tarafından *Protropin* ürün-adıyla N-ucunda metiyonin bulunan ve 192 amino asit içeren rekombinant hGH üretimine başlanmıştır. 1986’da Eli Lilly 191 amino asitten oluşan rekombinant hGH’u *Humatrope* ürün-adıyla üretilmiş ve farklı bir kimyasal yapıya, sonuç olarak farklı etkilere sahip olduğu için FDA tarafından lisans verilmiştir. hGH üreticileri ve ürün adları Çizelge 1.2’de verilmiştir.

İnsan proteinlerinin doğal, çözülebilir ve biyolojik olarak aktif yapıda üretilebilmesi için mikro-biyoreaktör olarak görev yapan rekombinant mikroorganizmadan doğrudan biyoreaktör üretim ortamına salgılanması önemlidir. *E. coli* genetik yapısı önce aydınlatılmış olması nedeniyle farmasötik proteinlerin üretim uygulamalarında en yaygın kullanılmış mikroorganizmadır. *E. coli*’de protein üretiminde karşılaşılan protein degradasyonu problemi sebebiyle ürettikleri proteinleri hücre-dışına salgılama yeteneğine sahip *Bacillus* türleri geliştirilmektedir.

Çizelge 1.1 Rekombinant farmasötik proteinler ve kullanım alanları

Farmasötik Protein	Kullanım Alanı
α_1 – Antitripsin	Emphysema tedavisi
Adrenokortikotrofik hormon	Romatizmal hastalıklar tedavisi
B-hücre çoğalma faktörleri	Bağışıklık düzensizlikleri tedavisi
Kalsitonin	Osteomalacia tedavisi
Koloni uyarıcı faktörler	Kan düzensizlikleri tedavisi
Chorionic gonadotropin	Anovulation tedavisi
Endorphins ve ankephalins	Analjezik ajan
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	Kanser terapi; bağışıklık düzensizlikleri tedavisi
Limfotoksin	Antitümör ajan
Makrofaj aktive edici faktör	Antitümör ajan
Sinir çoğalma faktörü	Onarım hızlandırıcı
Platelet-derived çoğalma faktörü	Atherosclerosis tedavisi
Relaxin	Doğum kolaylaştırıcı
Serum albümin	Plazma destekleyici
Somatomedin C	Büyüme hızlandırıcı
Doku plasminogen aktivatör	Trombolitik ajan
Tümör necroz faktörü	Antitümör ajan
Urogastron	Antiülser ajan
Ürokinaz	Trombolitik ajan

Çizelge 1.2 hGH üreten kuruluşlar ve ilaç sanayindeki ürün adları

Kuruluş	Ürün adı
Eli Lilly	Humatrope
Genentech	Nutropin & Protropin
Pharmacia & Upjohn Company	Genotropin
Novo Nordisk	Norditropin
Serono Laboratories	Saizen & Serostim

Bacillus türü bakteri toksik olmayan hücre duvarına sahip, tek membranı olan, patojen olmayan mikroorganizmalardır (Frost 1987). *Bacillus* türleri endüstriyel enzimler, antibiyotikler ve insektisidlerin üretimi için kullanılmaktadırlar. *Bacillus* türlerinin kullanıldığı, hızla gelişen özgün başka bir alan da moleküler genetik araştırmalarıdır; genlerin ekspres edilmelerinde konak hücre olarak kullanılmaktadır. Çizelge 1.3'de *Bacillus* türlerini genetik teknikler kullanılarak ürettikleri ve hücre-dışına salgıladıkları proteinler gösterilmiştir.

Çizelge 1.3 *Bacillus sp.* tarafından üretilip hücre-dışına salgılanan rekombinant proteinler

Bileşik
Pertussis toksin alt-birimi
B-laktamaz
İnsan öninsülini (proinsulin)
α -galaktosidaz
İnsan epidermal çoğalma faktörü
İnsan atrial α -faktörü
İnsan serum albümini
α_2 -interferon
Makrofaj plasminojen aktivatörü

İnsan büyüme hormonunu kodlayan gen ilk olarak Goeddel *et al.* (1979) tarafından *E. coli*'ye başarıyla klonlamıştır. Fakat elde edilen rekombinant hGH başlama kodonu olan metiyonin ve 191 amino asitten meydana gelen mature hGH'a sahiptir. Doğal hGH

ile benzer biyolojik aktiviteye ve temel özellikler sahip olan rekombinant hGH'nin sentezi *E. coli* kullanılarak Ikehara *et al.* (1984) tarafından gerçekleştirilmiştir. Gray *et al.* (1985) doğal ve bakteriyel iki sinyal peptit kullanarak hGH'nin *E. coli*'de periplazmik üretimini ile bu sinyal peptitleri periplazmik boşluğa salgılama açısından karşılaştırmışlardır. Chang *et al.* (1987) hGH'nin yüksek seviyede verimi için *E. coli* ısı- kararlı enterotoxin II (STII) sinyal peptit dizini ile mature hGH dizinini birleştirerek *E. coli* alkali fosfataz (*phoA*) promoter kontrolünde ekspres etmişlerdir. Yamakawa vd. (1989) gen miktarının *E. coli*'de hGH üretimine etkisini; Jensen and Carlsen (1990) 3-4 amino asitlik farklı N-precursor'lara sahip hGH'nin *E. coli*'de periplazmik ekspresyonu ile glukoz, asetat, ve tuzların üretime fizyolojik etkilerini araştırmışlardır. İnsan proteinlerinin doğal, çözünebilir ve biyolojik olarak aktif yapıda üretilmesi için doğrudan biyoreaktör üretim ortamına salgılanması önemlidir. Hücre-dışı salgılama yeteneğine sahip olan *Bacillus* türleri bu özelliklerinden dolayı terapötik proteinlerin endüstriyel üretiminde konak hücre olarak önem kazanmışlardır. Breitling *et al.* (1989) kültür ortamına salgılanma yeteneği olmayan *E. coli* hücreleri ile *Bacillus* türlerini kıyasladıklarında *E. coli*'nin hem veriminin daha düşük hem de rekombinant mikroorganizmalarının kararsız olduğunu görmüşlerdir. Franchi *et al.* (1991) uygun olarak tasarlanmış olan N- ucunun uzaklaştırılmasıyla doğal hGH'nun salgılanmasını; Kajino *et al.* (1997) *B. brevis* ile biyolojik olarak aktif ve aynı yapıya sahip hGH'nun hücre dışı üretimini; Bylund *et al.* (2000) *E. coli* tarafından yarı-kesikli sistemde aerobik olarak rekombinant hGH üretimini araştırmışlardır. Sonuç olarak süreli yayın literatüründe, *Bacillus* türleri ile hücre-dışı hGH üretimi için ortam bileşen ve derişimlerinin, sıcaklık, pH koşullarının, hava giriş hızı ve karıştırma hızı gibi biyoreaktör işletim koşullarının ürün- ve yan ürün- derişimlerine ve biyoproses oksijen aktarımı karakteristiklerine etkisini inceleyen sistematik bir çalışma henüz bulunmamaktadır.

Bu çerçevede, '**Reaksiyon mühendisliği prensipleriyle rekombinant insan büyüme hormonu üretimi için biyoproses geliştirilmesi**' konulu yüksek lisans araştırma programı kapsamı:

1. Oluşturulan metabolik mühendislik araştırma programı doğrultusunda; hücre içinde üretilen hGH'nun hücre dışına aktarılabilmesi için, *Bacillus* hücre dışı

enzimlerinden serin alkali proteaz (SAP) geninin (*subC*) salgılamada görev yapan sinyal dizini (*pre-*) hGH gen dizininin önüne SOE (gene splicing by overlap extension) yöntemi ile entegrasyonu sonucunda oluşturulan *-pre(subC)::hGH* hibrit genini içeren pMK4 plasmidini taşıyan rekombinant *Bacillus* türlerinin geliştirilmesi,

2. Geliştirilen rekombinant *Bacillus*'lardan hGH üretim kapasitesi en iyi olanın seçilmesi ve üretim ortam tasarımının yapılması,
3. Laboratuvar ölçekte belirlenen en uygun koşullarda farklı hava giriş ve karıştırma hızlarında pilot ölçek biyoreaktörde ürün ve yan-ürün oluşumuna oksijen aktarım etkileri incelenerek biyoproses ve oksijen aktarım karakteristiklerinin belirlenmesi,
4. Pilot ölçekte belirlenen en iyi oksijen aktarım koşulunda hibrit gen içeren (*-pre(subC)::hGH::pMK4*) ve içermeyen (pMK4) plasmidli *Bacillus* ile üretim deneyi tasarlanarak hibrit genin etkisinin incelenmesi,
5. Pilot ölçekte belirlenen en iyi oksijen aktarım koşulunda üretim ortamına $t_e=0$ ve $t_e=24$.st ayrı ayrı ve karışım olarak eklenen aspartik asit, glutamik asit, serin, valin ve lözin amino asitlerinin hücre derişimi ve hGH üretimi üzerindeki etkisi incelenmesi,
6. Metabolik akı analiziyle hücre-içi tepkime hızlarının (akıların) bulunması ve farklı oksijen aktarım koşullarının akı dağılımlarına etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAKLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ

Biyoteknolojik proseslerde iki gruba ayrılır:

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 avantajlardır. 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 yan ürün oluşmamakta, verim 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. Bu nedenle bundan sonraki bölümlerde biyoproseslerle üretimde verim ve seçimliliğin artırılması üzerinde durulacaktır.

2.1 Mikro-biyoreaktörler: Mikroorganizmalar

Biyoteknolojik proseslerde istenen nitelikte ve nicelikte ürün üretmenin birinci koşulu onu üretebilen uygun mikroorganizmayı seçmektir. Mikroorganizmalar farklı ürün üretebildikleri gibi, aynı ürünü ürebilen farklı mikroorganizmalar da bulunmaktadır. Biyoteknolojik ürünlerin üretiminde verim ve seçimliliğin 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 seçimliliği yüksek mikroorganizma geliştirilmektedir.

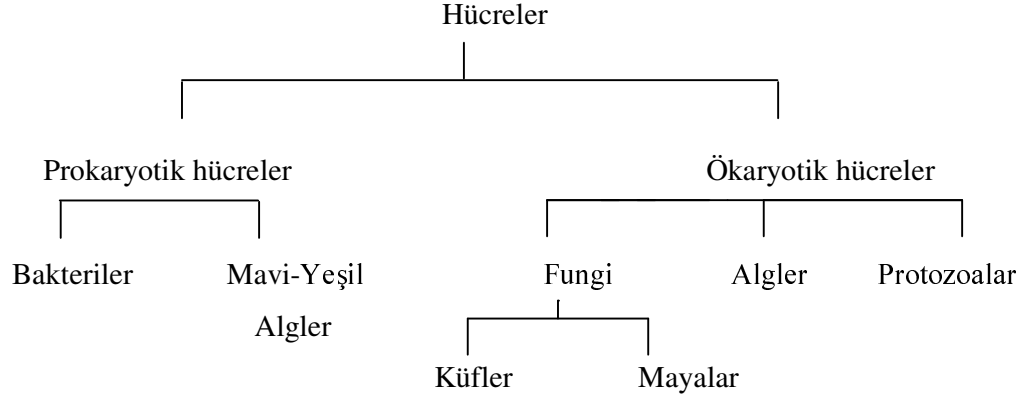
2.1.1 Mikrobiyolojik yapı

Hücreler biyolojik aktivite gösteren en küçük birimdir. Hücreler; önce gelişme, sonra bölünerek kendi özelliğine benzeyen yeni hücre oluşturma ve bölünmeden sonra kısa süreli dinlenme, eksik metabolik maddelerini tamamlama gibi süreçlerden geçerler. Organizmalar fiziksel şekil ve yapı, enerji ve besin ihtiyaçları, çoğalma ve üretme-salgılama hızları, üreme yöntemleri ve hareket etme vasıtaları ve kabiliyetleri arasındaki farklılıklara göre prokaryotlar ve ökaryotlar olmak üzere iki ana gruba ayrılır. Şekil 2.1'de hücrelerin sınıflandırılması gösterilmiştir (Bailey and Ollis 1986). Hücreler üç fonksiyonel temel birimden oluşur:

1. hücre zarı
2. sitoplazma
3. çekirdek

Ökaryotik hücreler organelleriyle basit olmayan yapısal özellikler gösteren, çekirdeği bir zarla sitoplazmadan ayrılmış hücreler olduğu halde; prokaryotik hücreler çekirdeği belirgin bir zarla çevrili olmayan daha basit yapıları hücrelerdir. Prokaryotik hücrelerin

yaşamsal olayları için farklılaşmış organelleri yoktur. Canlılığı belirleyen metabolik olaylar hücre zarı ve ondan oluşan yapılarla yürütülür. Ökaryotik hücreler prokaryotik hücrelerden 1000-10000 kez daha büyüktürler. Ökaryotik hücrelerde hücre içi yaşamsal etkinlikler farklılaşmış organeller tarafından ayrı ayrı yapılır.



Şekil 2.1 Hücrelerin sınıflandırılması (Bailey and Ollis 1986)

2.1.1.1 Prokaryotik hücreler

Prokaryotik hücreler küçük ve basit hücrelerdir; zarla çevrili çekirdek içermezler. Prokaryotik hücreler genellikle yalnız bulunurlar ve diğer hücreler ile birleşmezler. Bu gruptaki hücreler küresel, spiral ve çubuk biçiminde olabilirler. Boyutları 0.5-3 μm mertebesinde; hacimleri ise yaklaşık 10^{-12} cm^3 'dür ve bunun %50-80'i sudur; bir prokaryotun kütlesi ise yaklaşık 10^{-12} g ' dır.

Prokaryotik hücreler yaklaşık 20 dakikada bir bölünerek iki yavru hücre oluştururlar; biyokimyasal olarak zenginirler ve birçok karbon kaynağını kullanabilirler. Bu ve diğer özellikleri prokaryotik hücrelerin geniş bir çevreye adapte olmalarını sağlar. Prokaryotik bir hücre yaklaşık 200 Å kalınlıkta gözenekli hücre duvarı tarafından sarılmıştır. Bu duvar hücrenin bütünlüğünü korur ve ona yapısal dayanıklılık verir. Hücre duvarının altında yaklaşık 70 Å kalınlığında hücre zarı vardır. Plazma zarı olarak da adlandırılan bu zar tüm hücrelerde bulunur. Hücre zarı karbon ve enerji kaynaklarının hücreye taşınımını, sitoplazmaya geçmesini ve hücre içinde oluşan

metabolik ürünlerinin de hücre dışına aktarımını sağlar. Hücrelerin temel kontrol birimi çekirdek (nükleus) tüm genetik bilgiyi taşımaktadır. Prokaryotik hücrelerin sitoplazmalarında protein ve RNA lardan oluşan ribozomlar bulunur. Bu birimde proteinlerin/enzimlerin sentezini gerçekleştirir. Sitoplazma, çekirdek ile zar arasını dolduran ve hücre organellerini tutan sıvı maddedir. Bazı prokaryotlarda plazma zarı belli yerlerden hücre içine doğru uzayıp katlanarak zar yüzeyini artırır. Bu katlanmalara mezozom (mesosome) denir. Mezozomun solunum ve hücre bölünmesi gibi hücresel etkinliklere katıldığı düşünülmektedir (Bailey and Ollis 1986).

2.1.1.2 Ökaryotik hücreler

Ökaryotik hücreler prokaryotik hücrelere kıyasla daha komplekstir. Tüm yüksek organizmaların hücreleri bu sınıfa girer. Bunun yanında tek hücreli mikroorganizmaların da önemli bir grubu ökaryotik hücrelerdir. Ökaryotik hücre stoplazması, hücrenin aktivitelerini yürütmek için özel yapılara ve fonksiyonlara sahip olan çok sayıda organelle sahiptir. Ökaryotik hücreler, prokaryotik hücrelerde de bulunabilene benzer bir zar ile çevrilmiştir. Bu zarın dış yüzeyinde hücre duvarı olabilir. Bu dış örtünün yapısı hücre türüne bağlıdır. Örneğin yüksek organizmalar olan hayvan hücreleri ince bir hücre duvarına sahiptir. Bu duvarın özel yapışkan özellikleri, karaciğer gibi özel amaç için kullanılan dokuları ve organları oluşturmak için benzer hücreleri tutucu olması önemlidir. Diğer taraftan bitki hücreleri çok dayanıklı, kalın bir hücre duvarı ile kaplanmıştır. Ökaryotik hücrelerin organellerinin işlevleri açısından hücre içi membranların varlığı önemlidir. Hücre zarından başlayıp hücre içinde çekirdek zarına kadar uzanan kompleks ince membran kanallar sistemi olan endoplazmik retikulum besin maddelerinin hücre içine alınmasında işlev yapar. Golgi kompleksinin görevi ise oluşan metabolik ürünleri hücre dışına transfer etmektir. Bu hücrelerde çekirdek gözenekli bir membran ile sarılmıştır. Proteinlerin/enzimlerin sentezinin gerçekleştiği biyokimyasal tepkime konumları olan ribozomlar, çoğunlukla endoplazmik retikulum yüzeyine gömülmüş olarak bulunurlar. Ökaryotik hücrelerde bulunan ribozomlar prokaryotik hücrelerdekilere göre daha büyüktür (Bailey and Ollis 1986).

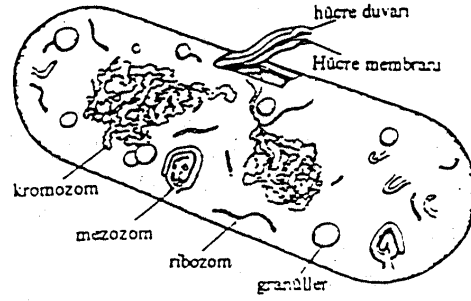
Çekirdeğin temel işlevlerinden biri ribozomlardaki katalitik aktivitelerin denetimidir. Hücrenin temel aktivitesini ve kalıtımını sağlayan “kromatin”(chromatin) maddesidir. Bunun içerisinde çeşitli proteinler, DNA ve kalıtsal moleküller yani genler bulunur. Her hücre için özgün karakterler DNA molekülünde şifrelenmiştir. Çekirdeğin içerisinde ayrıca küre şeklinde bir çekirdekçik kısım bulunmaktadır. Bunun içerisinde vakuoller (vacuole) ve birçok granül biçiminde parçacık vardır. Bunlar, RNA içerdikleri halde genellikle DNA içermezler.

Çekirdek membranlar tarafından sarılmış birkaç iç bölgeden biridir. Bu membran kaplı bölgeler organeller olarak bilinir. Mitokondri hücrenin aktiviteleri için gerekli enerjiyi üretir. Bunlar, enerji üretme prosesinde oksijen kullanan bütün ökaryotik hücrelerde bulunurlar. Lizozomlar ve vakuoller ise kimyasal reaksiyonları ya da belirli kimyasal bileşenleri sitoplazmadan izole etmede görev yaparlar (Bailey and Ollis 1986).

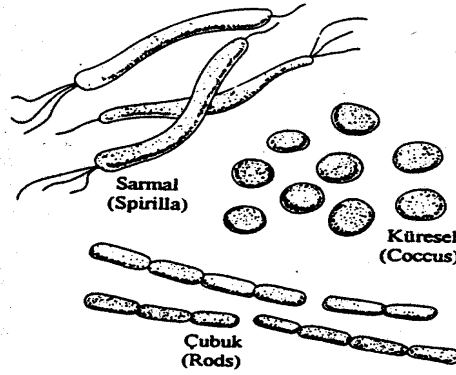
2.1.2 Bakteriler

Bakterilerin tam olarak tanımlanması güçtür; prokaryotlar grubunda, tek hücreli ve bölünen mikroorganizmalar şeklinde tanımlanabilirler. Bakteriler dış taraftan sert bir hücre duvarı ile çevrilirler; türlerinin çoğunun hücre duvarının dış yüzeyi *kapsül* veya *slime-layer* olarak adlandırılan yapışkan, jelatinimsi bir tabaka ile kaplanmıştır. Tipik bir bakteri hücresi Şekil 2.2’de gösterilmiştir. Basit bakteriler spor, kamçı ve kapsül içermezler. 0.5-2.0 mikron uzunluk ve 0.2-4.0 mikron çapındadırlar. İnce ipliksi bir ağ şeklinde görünen çekirdeği doğrudan doğruya sitoplazma ile sınırlanmış olan bakteriler Şekil 2.3’de görülen üç temel morfolojik şekilde bulunabilirler (Bailey and Ollis 1986):

- a) Çubuk (rod) : Genel olarak 0.5-4.0 μm uzunluk ve 0.5-4.0 μm genişliktedirler. *Bacillus* bu gruba girmektedir.
- b) Küresel (coccus) : Çapları 0.5-4 μm arasında değişmektedir.
- c) Sarmal (spirilli) : Yaklaşık 1 μm uzunluk ve 0.5 μm genişliktedir.



Şekil 2.2 Bakteri hücresi



Şekil 2.3 Bakterilerin üç farklı formu

Bakteriler tür ve çevresel koşullara göre tek, ikili, kümeli ya da uzun zincirli gruplar halinde bulunabilirler. Hücre zarı besinlere karşı yarı geçirgen özellikte olup, kuru hücre ağırlığının yaklaşık %5-10'unu oluşturur. Bu zar başlıca %50 protein, %28 yağ, %15-20 karbonhidrat içeren çift katmanlı bir yapı gösterir. Gram-pozitif bakterilerin hücre zarında aromatik ve kükürt içeren amino asitler, arginin ve prolin bulunmaz. Gram-negatif hücrelerin zarları ise lipidece daha zengindir. Hücre zarında elektron aktaran ve oksidatif fosfatlanmayı sağlayan enzimler bulunmaktadır.

Bakteri hücrelerinde; endoplazmik retikulum, mitokondria, golgi kompleksi bulunmaz. Çubuk ve sarmal yapıda olanların bir ya da her iki ucunda bazen de tüm yüzeyinde

hareket etmeye yarayan kamçı bulunur. Bu kamçıların boyları genellikle bakteri boyunun bir kaç katına ulaşır. Bakterilerin çoğu, DNA kromozomuna ek olarak, bazı özelliklerini genetik kontrol altında tutan, sitoplazma içerisinde serbest olarak bulunan, kendi kendini replike edebilen 1-100kb büyüklüğünde *plasmid* adı verilen dairesel DNA moleküllerini içerir.

Bazı bakteriler stoplazmalarında spor yapma ve bulundurma potansiyeline sahiptirler. Bu tip bakteriler yüksek ve düşük sıcaklık, kuraklık, osmoz ve kimyasal etkilere karşı dirençlidirler. Çevre koşullarının uygun olmadığı durumlarda spor yapabilen bakteriler güç dış etkenlere karşı türünü koruyabilmek için “spor” oluştururlar. Spor, uygun besi yerinde ve çevre koşullarında bulunduğu zaman kendini koruyan korteksinden kurtularak yaşamsal faaliyetlerine geri döner. *Bacillus*, spor yapan bakterilerdendir. Bu bakterilerin sporları havada ve toprakta bulunmaktadır (Lehninger 1979).

2.2 *Bacillus* Türü ve Özellikleri

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 vegetative 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 turleri patojeniktir ve toksinler ureterek 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 uretebilmektedirler. Diğer mikroorganizmalara kıyasla moleküler genetik tekniklerle daha kolay manipüle edilebilirler; metabolitleri ve proteinleri hücre dışına transfer etme kapasiteleri yüksektir ve endüstriyel üretim için seğimli olmalarının bir diğer nedeni de kolaylıkla çoğalabilmeleridir. Bu grubun urettiği ana ürünler; (i) hidrolitik enzimler, (ii) antibiyotikler, (iii) haşarat ilaçları, (iv) nükleosidler, (v) vitaminler ve (vi) diğer biyomoleküllerdir (Arbige *et al.* 1993).

2.2.1 *Bacillus*'ların sınıflandırılması

Bugün, *Bacillus* cinsinde 65 tane tür tanımlanmıştır (Çizelge 2.1). Bu genetik ve fizyolojik çeşitlilik olarak azdır fakat sürekli olarak yeni türler izole edilmekte ve tanımlanmaktadır. Bu türler çeşitli şekilde sınıflandırılabilirler. Bunlar morfolojik olarak, (i) ana hücreyi büyütmeyen oval sporlar ureten türler, (ii) ana hücreyi büyüten oval sporlar ureten türler ve (iii) küresel sporlar ureten türler, olarak basit bir şekilde sınıflandırılabilir.

Sınıflandırmada esas özellik, yeni cinslerin fenotipik özellikleri ile kolaylıkla ayırt edilebilmesi olmalıdır. *Bacillus*'lar fenotipik benzerliklerine göre 6 sınıfta toplanmışlardır (Çizelge 2.1) (Priest 1993). Endüstriyel olarak önemli olan bazı *Bacillus* türlerinin özellikleri tablo halinde verilmiştir (Çizelge 2.2) (Buchanan and Gibbons 1974).

Çizelge 2.1 *Bacillus* türlerinin fenotip benzerliklerine göre sınıflandırılması (Priest 1993)

<i>Grup I</i>	
<i>B. alvei</i>	
<i>B. amylolyticus</i>	
<i>B. apiarius</i>	<i>Grup II</i>
<i>B. azotofixans</i>	<i>B. alcolophilus</i>
<i>B. circulans</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i>
<i>B. glucanolyticus</i>	<i>B. anthracis</i>
<i>B. larvae</i>	<i>B. atrophaeus</i>
<i>B. lautus</i>	<i>B. carotorum</i>
<i>B. lentimorbus</i>	<i>b. firmus</i>
<i>B. macerans</i>	<i>B. flexus</i>
<i>b. macquariensis</i>	<i>B. laterosporus</i>
<i>B. pabuli</i>	<i>B. lentus</i>
<i>B. polymyxa</i>	<i>B. licheniformis</i>
<i>B. popilliae</i>	<i>B. niacini</i>
<i>B. psychrosaccharolyticus</i>	<i>B. pantothenicus</i>
<i>B. pulvifaciens</i>	<i>B. pumilus</i>
<i>B. thiaminolyticus</i>	<i>B. simplex</i>
<i>B. validus</i>	<i>B. subtilis</i>
	<i>B. thuringiensis</i>
<i>Grup III</i>	<i>Grup IV</i>
<i>B. alginolyticus</i>	<i>B. aminovorans</i>
<i>B. aneurinolyticus</i>	<i>B. fusiformis</i>
<i>B. azotoformans</i>	<i>B. globisporus</i>
<i>B. badius</i>	<i>B. insolitus</i>
<i>B. brevis</i>	<i>B. marinus</i>
<i>B. chondroitinus</i>	<i>B. pasteurii</i>
<i>B. frudenreichii</i>	<i>B. psychrophilus</i>
<i>B. gordonae</i>	<i>B. sphaericus</i>
<i>Grup V</i>	<i>Grup VI</i>
<i>B. coagulans</i>	<i>A. acidocaldarius</i>
<i>B. flovothermus</i>	<i>A. acidoterrestiris</i>
<i>B. kaustophilus</i>	<i>A. sikloheptanius</i>
<i>B. pallidus</i>	
<i>B. schlegelii</i>	<i>Diğer</i>
<i>B. smithii</i>	<i>B. benzoovorans</i>
<i>b. stearothermophilus</i>	<i>B. fastidiosus</i>
<i>B. thermocloacae</i>	<i>B. nagonoensis</i>
<i>B. thermodenitrificans</i>	
<i>B. thermoglucosidasius</i>	
<i>B. thermoleovrans</i>	
<i>B. thermoruber</i>	

Çizelge 2.2 Bazı *Bacillus* türlerinin karakteristikleri (Buchanan and Gibbons 1974)

	<i>B.</i> <i>Subtilis</i>	<i>B.</i> <i>licheniformis</i>	<i>B.</i> <i>cereus</i>	<i>B.</i> <i>polymyxa</i>	<i>B.</i> <i>macerans</i>	<i>B.</i> <i>firmus</i>	<i>B.</i> <i>brevis</i>	<i>B.</i> <i>alvei</i>
Çubuklar								
genişlik, µm	0.7-0.8	0.6-0.8	1.0-1.2	0.6-0.8	0.5-0.7	0.6-0.9	0.6-0.9	0.5-0.8
uzunluk, µm	2-3	1.5-3	3-5	2-5	2.5-5	1.2-4	1.5-4	2-5
Çoğalma								
Anaerobik agar	-	+	+	+	+	-	-	+
%0.001 lizozim	d	d	+	d	-	-	d	+
%7 NaCl	+	+	+	-	-	+	-	-
Sabouraud dextrose broth ve/veya agar	+	+	+	+	+	-	d	-
Çoğalma için sıcaklık								
Maksimum °C	45-55	50-55	35-45	35-45	40-50	40-45	40-60	35-45
Minimum °C	5-20	15	10-20	5-10	5-20	5-20	10-35	15-20
Hidrolizi								
Nişasta	+	+	+	+	+	+	-	+
Kazein	+	+	+	+	-	+	+	+
Tirozin	-	-	+	-	-	d	+	d
Hareketlilik	+	+	d	+	+	d	+	d
NO ₃ ⁻ NO ₂ ⁻	+	+	+	+	+	+	d	-
Asit üretimi								
arabinoz,ksiloz ve mannitolden	+	+	-	+	+	d	-	-
Katalaz	+	+	+	+	+	+	+	+

• d: değişken

2.2.2 *Bacillus subtilis* ve özellikleri

Bacillus türleri endüstriyel olarak önemli olan çeşitli enzimleri, haşarat öldürücü endotoksinler ve rekombinant proteinleri salgılayan organizmalardır. *Bacillus* araştırmaları için *Bacillus subtilis* kullanılır; genetik, biyokimyasal ve fizyolojik seviyede en iyi tanımlanmış prokaryotik organizmadır.

B. subtilis üzerinde en fazla çalışma yapılmış gram-pozitif prokaryottur ve *B. subtilis* için birçok plasmid geliştirilmiş ve uygun plasmid-vektör sistemleri geliştirmenin farklı

evrelerinde farklı problemlerle karşılaşmıştır. Doğal olarak transformasyonla plasmidleri alma potansiyeli olan *B. subtilis* endogenous plasmidler içermezler. Diğer bazı *Bacillus* suşları da konakçıları üzerinde kolaylıkla seçilebilir fenotipler vermeyen gizli plasmidler içerirler. *B. subtilis* plasmid vektörleri ilk olarak *Staphylococcus aureus* kökenli plasmidler kullanılarak elde edilmiştir. Bunların birkaçı *B. subtilis*'de replike olur ve antibiyotik direnç sağlayan proteinleri üretir. *B. subtilis* için bugünkü plasmid vektörlerinin çoğu yine *S. aureus* plasmidlerine dayanır. Başarılı klonlama kaydedilmesine rağmen, düşük klonlama verimleri ve plasmid kararsızlığı nedeniyle bu plasmidlerin *B. subtilis* için uygun olmadığı bulunmuştur. Gram-pozitif bakterilerden küçük plasmidlerin tek zincir bir DNA araürünü yoluyla, muhtemelen rolling-circle replikasyon ile replike olmaları önemli bir bulgudur (Bron 1990).

2.3 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 ise 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:

- 1) Serbest yayınma
- 2) Kolaylaştırılmış yayınma
- 3) 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 2.3’de verilmiştir (Erincin 1998, Nielsen and Viladsen 1994).

Çizelge 2.3 Bakterilerde bazı matabolitlerin 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

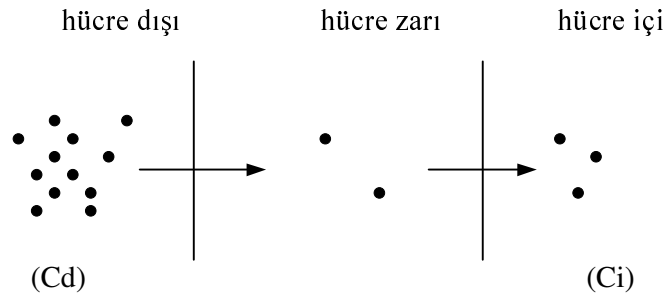
2.3.1 Serbest yayınma

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.

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 yayınmada o denli fazla olacaktır. Ayrıca membranın her iki tarafındaki sıvıların farklı hidrostatik basınçları, sıvının yüksek basınçtan düŐüęüne pasif hareketi için yürütücü bir kuvvet sağlayabilir. Yürütücü kuvvete aldırıŐ etmeksizin geçirgen membranlar boyunca pasif yayınma sadece, taşınım prosesi için serbest enerjideki deęiŐiminin (ΔG) negatif olduğu ynde kendiliğinden meydana gelir. Serbest yayınma Şekil 2.4'de gösterilmiştir (Erincin 1998, Bailey and Ollis 1986).



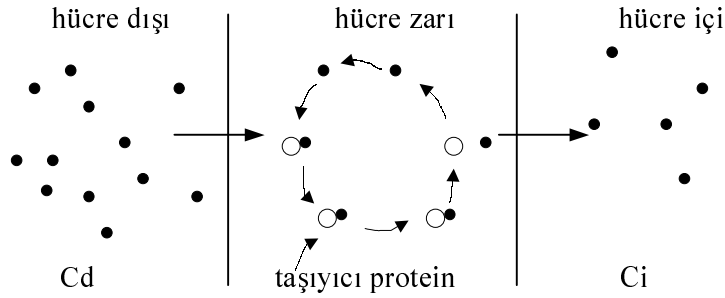
Şekil 2.4 Serbest yayınma

2.3.2 Kolaylaştırılmış yayınma

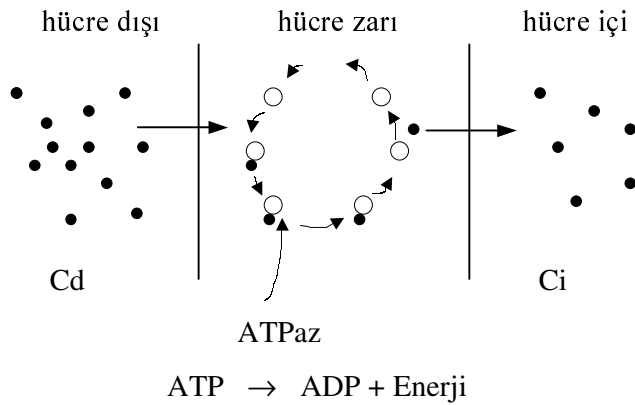
Hücre zarının yapısından dolayı her kimyasal ve biyokimyasal madde aynı kolaylıkla difzlenememektedir. Genellikle zardaki gözeneklerden ötürü, kk moleküllerin yayınması kolay olduğu halde daha büyük molekllerinki daha güç olmaktadır. Ancak pek çok metabolit kolaylaştırılmış yayınma ile hücre zarından daha kolay ve hızlı difzlenebilmektedir.

Kolaylaştırılmış yayınma, enerji gerektirmeyen mekanizmalarla bir bileşiğin, taşıyıcı proteinler yardımıyla membrandan geçiŐinin yer aldığđ proseslerdir. Kolaylaştırılmış yayınmada, difüzlenen madde hücre zarından bir taşıyıcı molekül ile birleşir ve zarın içinde kolaylıkla taŐınarak öteki uçta taŐıyıcıdan ayrılır. Sitoplazmik membranda çok sayıda bulunan, permeazlar ve taşıyıcı proteinler olarak bilinen bu moleküller, substratlarına membranların dış yüzeyinde bağlanır ve membrandan taşıyıcı-substrat kompleksinin ayrıldığđ i yüzeye geçiŐlerini 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 taşınım mekanizmasıdır. Fungide/ökaryotlarda bu mekanizmayla taşınan en önemli maddeler glukoz ve diğer şekerlerdir. Prokaryotlarda ise bu maddeler diğer mekanizmalarla -aktif taşınım veya grup transfer sistemi ile- taşınırlar. Şekil 2.5'de kolaylaştırılmış yayınma görülmektedir (Erincin 1998, Nielsen and Viladsen 1994).



Şekil 2.5 Kolaylaştırılmış yayınma



Şekil 2.6 Aktif taşınım

2.3.3 Aktif taşınım

Aktif taşınım, moleküllerin derişim gradyenleri veya iyonların elektrokimyasal gradyenler oluşturarak membrandan taşınımının gerçekleştiği proseslerdir.

Aktif taşınım, taşınım prosesinde taşıyıcı proteinlerin rol oynaması açısından kolaylaştırılmış difüzyona benzer. Ancak kolaylaştırılmış difüzyonun tersine, taşınım derişim gradyeninin artan yönünde olabilir. Aktif taşınım serbest enerji tüketimi gerektiren bir prosesdir. Taşınım prosesi için gereken enerji, ATP molekülündeki yüksek enerjili fosfat bağlarının parçalanması ile veya proteinin yüzeyindeki taşıyıcı olarak görev yapan diğer bir yüksek enerjili bileşimin hidrolizi ile sağlanabilir (birincil aktif taşınım) veya proses, tersinmez olarak kendiliğinden yürüyen ($-\Delta G > 0$), azalan derişim gradyenine göre hareket eden ikinci bir maddenin eşanlı taşınımına bağlanabilir (ikincil aktif taşınım). İkincil aktif taşınım sistemleri, glukoz ve diğer şekerler için ve nötral amino asitler için belli dokularda bulunurlar. Glukoz, serbest ve kolaylaştırılmış yayınma dışında Na^+ iyonları yardımı ile aktif taşınmaya da uğramaktadırlar. Bakterilerde ise glukoz, enzimler yardımı ile glukoz-6 fosfata dönüştürülerek aktif taşınması gerçekleştirilir. Bu taşınma için gerekli enerji $\text{ATP} \rightarrow \text{ADP}$ dönüşmesinden sağlanır. Şekil 2.6'de aktif taşınmanın bir şeması görülmektedir (Erincin 1998).

2.4 *Bacillus* Hücre Zarfı ve Enzimin Hücre İçinden Biyoreaktöre Taşınımı ve Mekanizması

Hücrelerin yaşam sürecinde değişik maddeler sitoplazmaya girer ve içerde oluşan metabolitler dışarı çıkar. Bu geçişler, her maddeye özgü olarak meydana gelir. Bu maddelerin geçişinde hücre duvarı, hücre zarfı ve diğer kısımlardan oluşan hücre zarfının rolü büyüktür.

2.4.1 *Bacillus* hücre zarfının yapısı ve fonksiyonu

Bacillus hücresi yapısal olarak çok basit bir organizmadır. *Bacillus*'ların hücre zarfı (cell envelope), sitoplazmik membrandan, hücre duvarından 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 transferi ve coccal şeklinde olanlarından daha yüksek hızda çoğalmalarını sağlar. Fakat, çubuk şekilli olanlar coccal şekillilerden daha az kararlıdır (Bailey and Ollis 1986).

2.4.1.1 Sitoplazmik membran

Bacillus türlerinin sitoplazmik zarı, sitoplazmayı sarar ve hücre metabolizmasında önemli bir yer tutar. Membran, bir sentez (hücre duvarı polimerlerinin), 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 fosfolipidler ve proteinlerce zengindir. *B. subtilis* ve diğer çoğu *Bacillus* türlerinde, fosfotidil ethanolamin esas fosfolipiddir ve toplam lipid ağırlığının %20-40'ını oluşturur. Diğer fosfolipidler, 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 izoprenoid lipidler, peptidoglikan ve teikoik asit gibi duvar polimerlerinin sentezi için lipid 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* hücrelerine çözünenlerin salgılama kinetiğini belirlemek için önemlidir (Harwood *et al.* 1990).

2.4.1.2 *Bacillus* hücre duvarı

Bacillus türlerinin hücre duvarları, sitoplazmik membranları koruyan ve çevreleyen, dinamik olarak değişken ve esnek yapılardır. Hücre duvarları hücrelerin çoğalmasında, morfogenez de, 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 peptidoglikan ve teikoik ve teikuronik asitler gibi anyonik polimerlerden oluşur. Bu anyonik polimerler duvara ampifilik özellikler kazandırır. Bunun yanında peptidoglikan-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 hücresel 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 (bozan) eden ve normal çoğalma ve hücre bölünmesi için gerekli olan otolitik enzimlerdir. Çeşitli *Bacillus* türleri –*B. subtilis* dışında- peptidoglikanın 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).

a) Peptidoglikanların molekül yapıları: Adından da anlaşılacağı gibi peptidoglikanlar iki kısımdan oluşmuşlardır: 1.Peptit kısmı, 2.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 peptidin 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 peptidoglikan 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. Çeşitli farklı teikoik asitler bulunur fakat 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).

2.4.2 *Bacillus* türlerinde proteinlerin salgılanması

Bir proteinin salgılanması, onun sentez konumu olan sitoplazmadan hücre dışına transfer edilmesidir. Salgılanan proteinler ilk olarak sinyal peptidli preproteinler olarak sentezlenir. Bu sinyal peptid, salgılanacak proteinleri sitoplazmik olanlardan ayırt eder ve proteinlerin salgılanma yoluna yönelmeleri için gereklidir (proteinlerin salgılanması için gereklidir). Bu yönlendirme, sinyal peptidin membrana ya direk olarak yada

sitoplazmik protein bileşenlerinin içinde çözünerek bağlanmasıyla meydana gelir (Harwood *et al.* 1990).

Salgılanan proteinler, sitoplazmada genellikle son üçüncül şekillerini alamazlar. Çünkü chaperonlar olarak adlandırılan çözülebilir proteinler, onların katlanmasını etkiler ve preproteini kısmen katlanmamış, translokasyon için yeterli konformasyonda muhafaza ederler. Translokasyon, proteinin sitoplazmadan ya membrana yada 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 çok salgılanmaz. Sinyal peptid, chaperone yada herikisi yoluyla, precursor onun spesifik membranına yönelir. Bundan sonra, membrandan öbür tarafa translokasyon bilinmeyen bir stille meydana gelir. Translokaz olarak adlandırılan membran protein kompleksi, salgılanan proteinlerin sitoplazmik membran ve endoplazmik retikulum membranından öbür tarafa transferine aracılık eder. Sinyal peptid, translokasyon prosesi sırasında spesifik bir proteaz, sinyal peptidaz tarafından uzaklaştırılır. Translokasyondan ve sinyal peptidin ayrılmasından sonra, salgılanan proteinler onların katlanması tamamlanana kadar membrana birleşmiş olarak kalır. Bu katlanmanın spesifik chaperonlar tarafından desteklendiği ortaya çıkar. Bu chaperonlardan bazıları başarılı translokasyon içinde gereklidir (Harwood *et al.* 1990, Simonen and Palva 1993).

2.4.2.1 Salgılama çalışmalarında *Bacillus* türleri

Bacillus'lar gram pozitif olduğundan dolayı, bu türler salgılama çalışmaları için *E. coli*, *S. cerevisiae* ve memeli hücrelerinden farklı bir model gösterirler. *Bacillus* salgılanması çalışılan ilk bakteriyel salgılama sistemi olduğu halde, onun mekanizması hakkında çok fazla şey bilinmiyor.

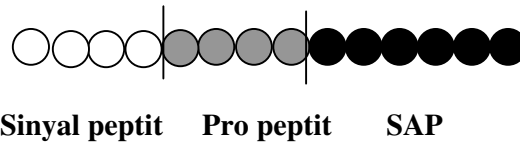
Bacillus türleri hücre dışına büyük miktarlarda protein salgılayabilme potansiyeline sahip olduğundan, alkali proteaz ve α -amilaz gibi endüstriyel enzimlerin üretimi için kullanılmaktadır. *Bacillus* türlerinde homojen ve heterojen proteinlerin salgılanması hakkında çeşitli makaleler yayınlanmıştır. Çeşitli salgılama vektörleri yapılmıştır ve

çoğu proteinlerin üretimi ve salgılanmasına yardım edilmiştir. Fakat sadece birkaç makale *Bacillus* türlerinde protein salgılamanın moleküler mekanizmasından bahsetmiştir (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* exoenzimleri, örneğin amilazlar ve alkali ve nötral proteazlar endüstriyel ölçekte üretilir (Simonen and Palva 1993) .

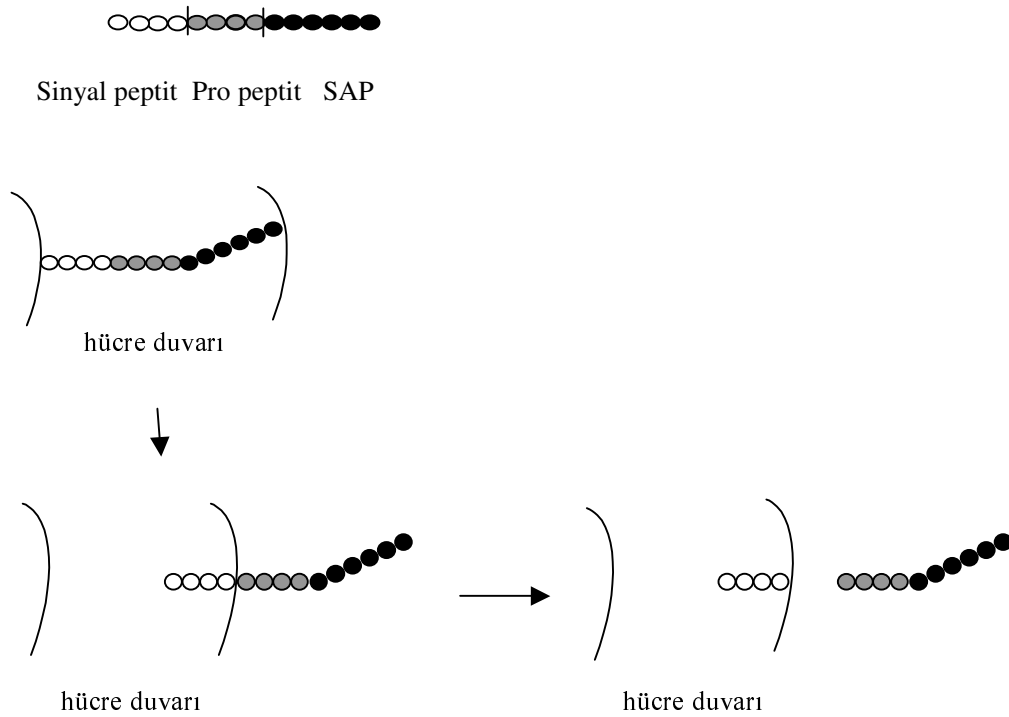
2.4.2.2 Alkali proteaz enziminin hücre dışına taşınımı



Şekil 2.7 Hücre içindeki SAP'ın şematik gösterimi

Hücre dışı proteinlerin hücre içinden hücre dışına taşınmaları kompleks bir süreçtir. Hücre içinde serin alkali proteaz sinyal peptit, propeptit ve protein (serin alkali proteaz) olmak üzere üç kısımdan oluşur. 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 fosfolipid 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 2.8). 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 peptidazlar tarafından ayrılır; propeptitin ayrılmasını sağlayan enzim üzerinde araştırmalar sürmektedir (Erincin 1998).



Şekil 2.8 Serin alkali proteaz enziminin hücre dışına taşınımı

2.4.2.3 Salgilama için hücre duvarı engeli

B. subtilis, peptidoglikan 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, şekilleri yada yüklerinden dolayı hücre duvarına yakalanmış olabilirler. Onlar sitoplazmik membrandan dışarıya doğru meydana gelen hücre duvarı büyümesi ile sitoplazmik membrandan dışarı itilebilirler. Bu gecikmiş proteinlerin başlıca hücre duvarı proteinlerinden (örneğin otoliziner) oluşup oluşmadığı henüz bilinmiyor (Simonen and Palva 1993).

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 ve işletilir, ancak bu, hücre duvarının peptidoglikan tabakası uzaklaştırılmadıkça kültür ortamına salgılanmaz. *Bacillus* hücre duvarının, *S. aureus* protein A ve *Streptococcus* protein G'nin salgılanmasında geciktirdiği ortaya çıkar. *B. subtilis*'den başka *Bacillus* türleri yada farklı zayıf hücre duvarına sahip olan diğer strainler, hücre duvarına yakalanmış proteinlerin salgılanması için daha uygun konak hücre olabilirler. Örneğin; *B. brevis*, *B. subtilis*'den daha ince bir peptidoglikan 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 wild-type strainlerden daha fazla miktarda exoenzimler salgıladığı kaydedilmiştir (Simonen and Palva 1993).

2.5 Genetik Mühendisliği Teknikleri ve Moleküler Tasarım

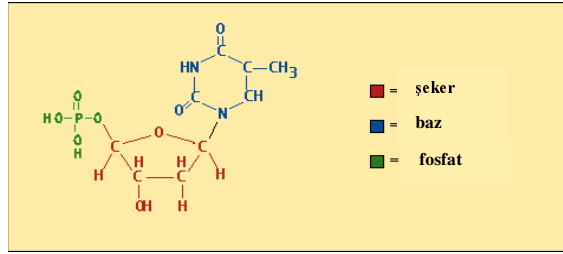
Endüstriyel biyoteknolojik ürünlerin üretiminde darboğaz oluşturan ve kritik bir basamak olan mikroorganizma geliştirilmesinde Genetik Mühendisliği ve rekombinant DNA teknolojisi uygulanması ve gelişimi için;

1° DNA yapısının ve fonksiyonlarının bilinmesi

2° Biyokimyasal reaksiyon mühendisliği temellerinin bilinmesi, gerekmektedir (Çalık 1998).

2.5.1 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 2.9'da bir nükleotit biriminin yapısı gösterilmiştir (Lehninger 1979).



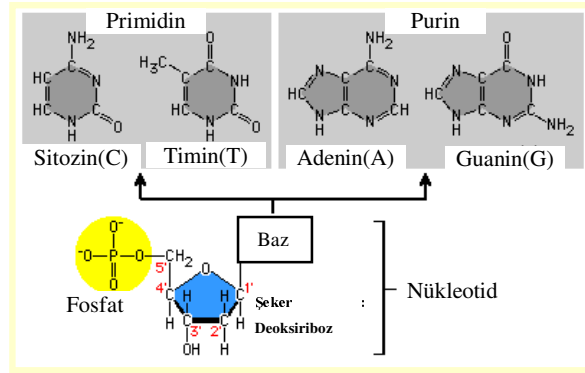
Şekil 2.9 Nükleotit biriminin yapısı

1) Azotlu bazlar; N içeren halka şeklindeki bazlardır. Nükleotidlerde bulunan azotlu bazlar pürin ve pirimidin bazları olarak iki gruba ayrılırlar.

a) 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) dir. Şekil 2.10'da pirimidin bazlarının formülleri gösterilmiştir.

b) Pürin bazları: Pürin halkası, imidazol ve pirimidin halkalarının kaynaşmasıyla oluşmuştur. Bunun türevleri adenin (A) ve guanin (G) dir. Şekil 2.10'da 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).



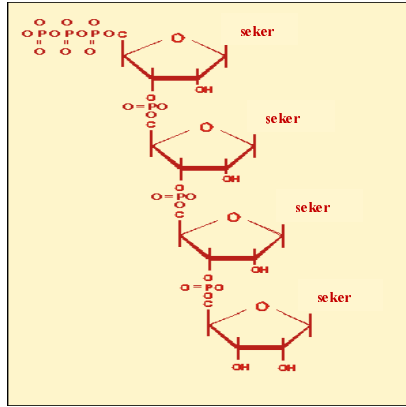
Şekil 2.10 Pürin ve pirimidin bazları

2) 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 deoksiribonükleosit 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).

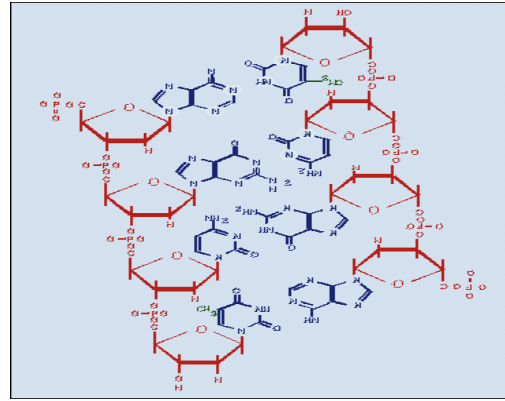
3) Fosfat iyonu: Nükleik asitlerin fosfat kısmı, fosforik asidin diesteri şeklindedir. Bu nükleik asitlerin, uzun zincirlerini 3'-5' yerlerinden birbirine bağlar. Fosfodiester kısmında fosfora bağlı serbest bir -OH grubu bulunduğu pH ~2 olan güçlü bir asittir (Lewin 1994).

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 2.11).

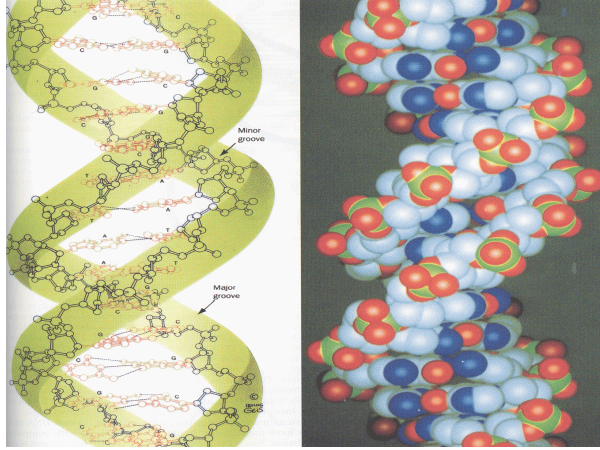
DNA ikincil yapısı primidin ve pürin bazları arasında gerçekleşen düzlemsel hidrojen bağlarıyla oluşur. A ile T iki hidrojen bağı ile, G ile C üç hidrojen bağıyla birbirlerine bağlanırlar (A=T, G=C). İki zincirin birbirlerine hidrojen bağıyla bağlanmaları sonucunda ortaya çıkan yapıya ise DNA'nın sekonder (ikincil) yapısı denir (Şekil 2.12). DNA'nın tersiyer yapısı sarmal yapının ortaya çıkmasıdır. Bu yapıda DNA molekülü sağa ve sola kıvrılarak üç boyutlu yapısını oluşturur (Şekil 2.13) (Stryer 1995).



Şekil 2.11 DNA'nın birincil yapısı



Şekil 2.12 DNA'nın ikincil yapısı



Şekil 2.13 DNA'nın üç boyutlu yapısı

2.5.2 DNA yapısı ve fonksiyonu

Çift helis DNA, çift sarmal iplik helis yapıda polimerik bir makromoleküldür. DNA ipliksi molekülün temel birimi bir organik baz-adenin(A), sitozin (C), guanin (G) veya timin (T)-içeren nükleottittir. 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 yönlere (antiparalel) oriente olur; 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 2.4'de verilmiştir. Bakterilerde ve yüksek organizmalarda genetik bilgiyi bir jenerasyondan diğer bir jenerasyona çift-sarmal yapıdaki DNA taşır (dsDNA). Bazı bakteriyel virüslerde ise genetik bilgi tek DNA (ssDNA) dizini ile taşınır (Lewin 1994).

Çizelge 2.4 DNA molekül büyüklükleri

Polimer	Molekül çapı, D
DNA(Mikroorganizma)	20 Å
DNA(Yüksek mikroorganizma)*	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.

2.5.3 RNA ve yapısı

RNA'nın primer yapısı temelde DNA'ya çok benzer, aralarındaki fark RNA'da timin yerine urasil bulunması ve şeker grubunda riboz olmasıdır. Tek zincir halinde bulunan RNA molekülleri, yer yer kendi üzerlerinde kıvrılarak çift heliks bölgeler meydana getirebilirler. Bu bölgeler de DNA'da olduğu gibi A=U ve G≡C baz çiftleri arasında yer alan hidrojen bağları tarafından oluşturulmuştur (Lehninger 1979).

Protein sentezinde görev yapan nükleik asitler RNA'lar hücrede, DNA'dan aldıkları genetik bilgi ile protein sentezinde görev yaparlar. RNA molekülleri genellikle tek zincir halindedir. Hücrede protein sentezinde görev yapan üç farklı RNA vardır. Bunlar ribozomal RNA (rRNA), mesajcı RNA (mRNA) ve transfer RNA (tRNA) 'dır. *E. coli*'den izole edilen RNA moleküllerinin büyüklükleri Çizelge 2.5'da verilmiştir (Lehninger 1979).

rRNA'lar üç farklı boyutta olurlar. 5S, 16S ve 23S. Bunlar çok sayıda protein ile kendiliğinden birleşerek ve kompleksleşerek proteinlerin sentezlendiği ribozomları oluştururlar.

mRNA'lar sentezlenecek proteinin büyüklüğüne bağlı olarak değişik büyüklüklerde olurlar. mRNA'lar DNA'dan genin dizini ile ilgili bilgiyi üzerlerine aldıklarından genin nükleik asit dizinine analog büyüklükte olurlar. Moleküllerinde baz etkileşmeleri yoktur. Bunların fonksiyonları DNA'daki genetik bilgiyi alarak protein sentez merkezleri olan ribozomlara taşımaktır (Lehninger 1979).

tRNA'lar amino asitleri protein dizininde yerlerini almaları için taşırlar. Her bir amino asite ait spesifik tRNA hücrede mevcuttur. tRNA'lar 73-93 nükleik asitten meydana gelmişlerdir. Molekül ağırlıkları 25.000 Da'dur (Lehninger 1979).

Çizelge 2.5 *E. coli*'deki RNA molekülleri

RNA çeşidi	Yüzde	Molekül ağırlığı
Ribozomal RNA (rRNA)	80	1.2*10 ⁶ Da 5.5*10 ⁵ Da 3.6*10 ⁴ Da
Transfer RNA (tRNA)	15	2.5*10 ⁴ Da
Haberci RNA (mRNA)	5	**

** Büyüklükleri protein molekülünün büyüklüğüne göre değişir.

2.5.4 Mikro-Reaksiyon Mühendisliği ve Mikro-Ayrırma İşlemleri

Genetik mühendisliği ile ilgili tekniklerde, tepkimeler ng mertebesinde DNA ve girdiler V=20-50µL 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).

2.5.4.1 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 kontrollu 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, spacer (ara molekül) 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).

2.5.4.2 Gen dizininin belirlenmesi

DNA dizini iki yöntemle belirlenebilir;

1. DNA dizini 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. Dizini analiz yapmak 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 ise 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 yapılarak agaroz jelde elektroforetik ayırma ile ayrıldıktan 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).

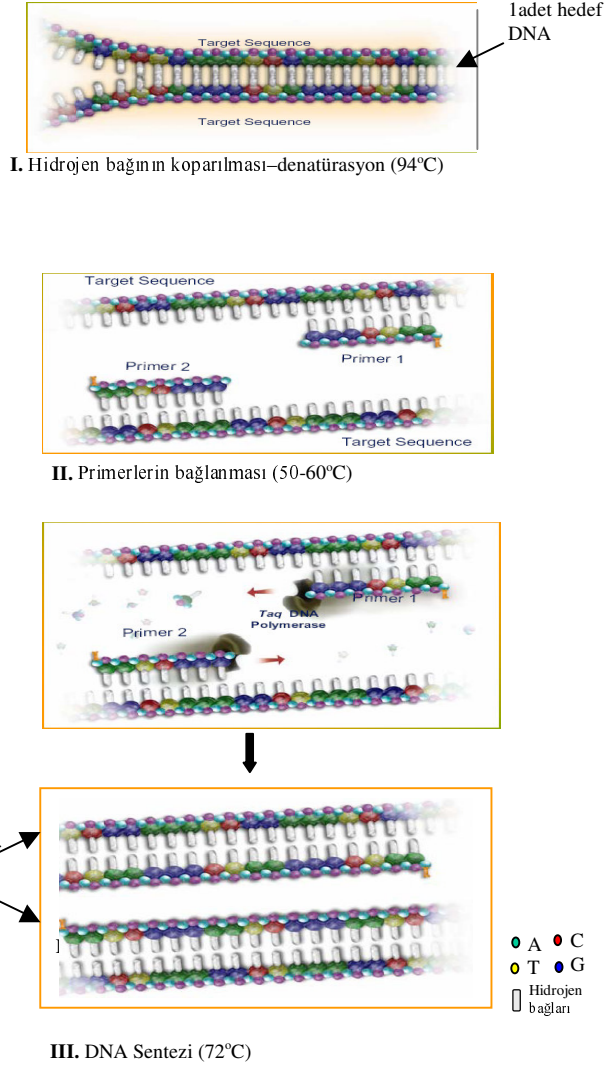
2.5.4.3 Polimeraz zincir tepkimesiyle (PCR) gen derişiminin artırılması

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 2.14). 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).



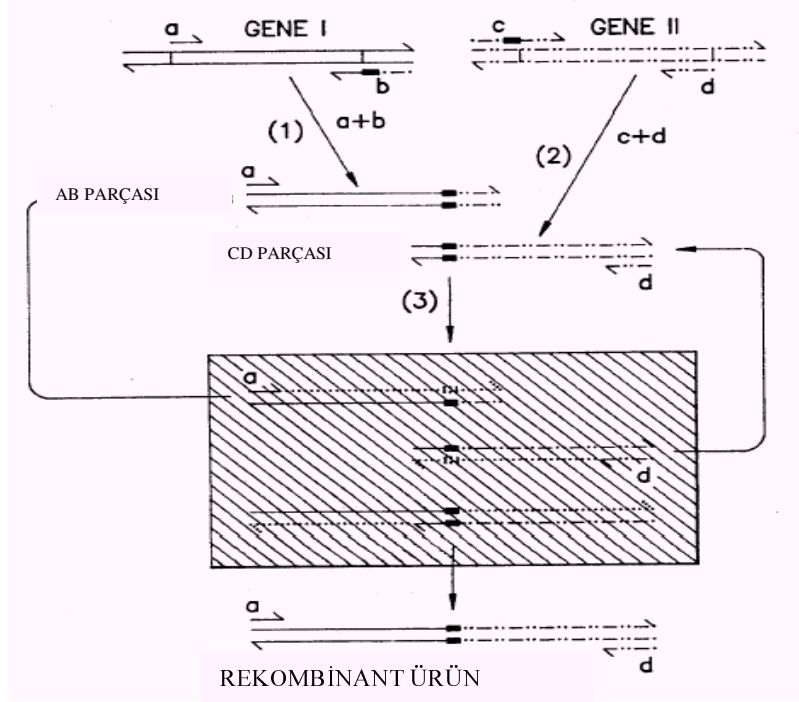
Şekil 2.14 PCR tepkimesiyle gen derişiminin arttırılması

2.5.4.4 PCR tekniği kullanılarak hibrit gen oluşturulması: SOE yöntemi

İlk kez 1985'te Polimeraz zincir reaksiyonları bilim dünyasına duyurulmasından sonra rekombinant molekül oluşturmak amacıyla DNA'yı restriksiyon enzimleriyle spesifik parçalara ayırma ve bu parçaları yeni bir dizin oluşturmak için DNA ligaz enzimiyle birleştirme temeline dayanan standart teknikler geliştirilmiştir. "Gene-splicing by overlap extension (SOE)" yöntemi, rekombine edilecek gen parçalarının uçlarında birbirlerine tamamlayıcı dizinler içermesi için, tasarlanmış olan primerler ile gen parçalarının ayrı

ayrı PCR tepkimesiyle ile çoğaltılıp sonra bu PCR ürünlerinin üçüncü PCR reaksiyonunda biraraya getirilip genlerin birleşecek uçlarının tamamlayıcı dizinlerinin primer görevi yapması ile hibrit genin oluşturulması temeline dayanmaktadır (Ho *et al.* 1989, Horton *et al.* 1989). İlk olarak 1989'da Horton vd tarafından tanımlanmış SOE yöntemi rekombinasyon konumunda restriksiyon enzimi konumlarının varlığına bağlı olmadan DNA moleküllerini birleştirmek ve ayrıca gen dizininde araya dizin sokmak, dizin silme gibi konuma yönelik mutasyonlar yapmak için uygundur.

SOE'nin genel mekanizması Şekil 2.15'te gösterilmiştir. Buna göre öncelikle, birleştirilecek parçalar yani gen I'den AB parçası ve gen II'den CD parçası ayrı ayrı PCR'larda ("1" ve "2") çoğaltılmıştır. Üst üste gelerek birleşimi sağlayacak uçlarda kullanılacak primerler ("b" ve "c"), 5' uçlarında diğer primerlerin 3' kısmına tamamlayıcı nükleotitler içermektedir. Böylece (1) ve (2) PCR ürünlerinin bu uçlarından üst üste gelerek birleşmesi sağlanabilir. Bunun için bu iki PCR ürünü yeni bir reaksiyonda ("3") karıştırılarak denatürasyon, primerlerin yapışması ve DNA polimerazla sentez basamaklarını içeren döngüye maruz bırakılır. Karıştırılan iki DNA parçasından, 3' ucunda bir diğer parçaya tamamlayıcı dizin içeren strandler, bu uçlarından birleşirler ve bunlar birbirleri için primer olarak görev yaparak DNA polimeraz aracılığıyla rekombinant ürün elde edilir. 5' uçlarında tamamlayıcı dizinlere sahip olan diğer strandler birbirleri için primer olarak görev yapamazlar fakat bunlar "a" ve "d" primerleri için kalıp olarak davranabilirler ve daha fazla orijinal PCR ürünleri meydana getirebilirler. "3" reaksiyonunda iki parça ("AB" ve "CD") arasındaki birleşme düşük sıklıkta olsa bile uygun primerlerin varlığı ("a" ve "d") rekombinant ürün oluşur oluşmaz onun çoğaltılmasını sağlar (Horton *et al.* 1993).



Şekil 2.15 SOE genel mekanizması (Horton *et al.* 1993)

2.5.4.5 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 aşmamalıdır. Bu değerin üzerinde jelin yapısı bozulur ve elektroforez çözeltisinde buharlaşma meydana gelir. Jel elektroforez cihazında jelin örnek haznelerinden 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).

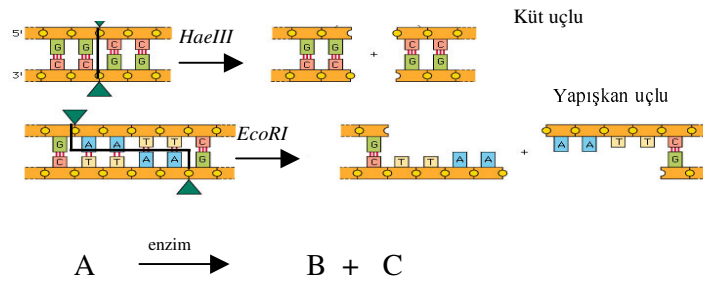
2.5.4.6 Restriksiyon enzimleri ve seçimi

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 (Şekil 2.16). Bazı restriksiyon enzimleri ve kesme biçimleri Çizelge 2.6'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.6 Restriksiyon enzimlerinden bazılarının izole edildikleri mikroorganizmalar, hedef dizinler ve kesim biçimi

Enzim	Hedef dizin	Mikroorganizma
TaqI	5' T CGA 3' 3' AGCT 5'	<i>Thermus aquaticus</i> YTI
RsaI	5' G TAC 3' 3' CATG 5'	<i>Rhodospseudomonas sphaeroides</i>
Sau3AI	5' G ATC 3' 3' CTAG 5'	<i>Staphylococcus aureus</i> 3A
EcoRI	5' G AATTC 3' 3' CTTAA 5'	<i>Escherichia coli</i>
BamHI	5' G GATCC 3' 3' CCTAGC 5'	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H.
HindIII	5' A AGCTT 3' 3' TTAGCA 5'	<i>Haemophilus influenzae</i>
KpnI	5' G GTACC 3' 3' CCAATG 5'	<i>Klebsiella pneumoniae</i> OK8
ClaI	5' A TCCAT 3' 3' TAGCTA 5'	<i>Caryophanon latum</i>
BssHII	5' C CCGCG 3' 3' GCGGCC 5'	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
NotI	5' C CGCGCGC 3' 3' GCGGCCGC 5'	<i>Nocardia otitidiscaviarum</i>

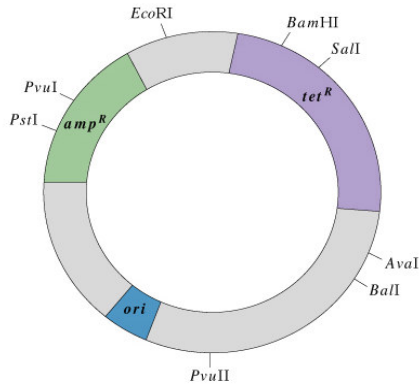
Restriksiyon enzimleri spesifik olarak bir nükleotit şekerinin 3'-karbonunun oksijeni ile, komşu nükleotit şekerinin 5'-karbonuna bağlı fosfat grubu arasındaki internükleotit bağı koparır. Restriksiyon enzimleri ile DNA molekülünü kesme işlemi Şekil 2.15'da gösterilmiştir. DNA'nın kesiminde kullanılan restriksiyon enzimlerinin seçimi klonlama prosesinin tasarımında önemli bir basamaktır.



Şekil 2.16 Restriksiyon enzimleri ile küt/yapışkan uçlu kesme tepkimesi

2.5.4.7 Plasmidler ve özellikleri

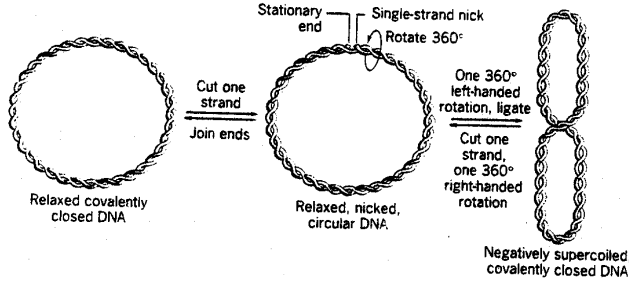
Bakterilerdeki temel genetik bilgiler kromozomda bulunur. Bakterilerin çoğu büyük DNA kromozomuna ek olarak, bazı özelliklerini genetik kontrol altında tutan, sitoplazma içinde serbest olarak bulunan, kendi kendilerini replike edebilen 1-100kb büyüklüğünde plasmid adı verilen dairesel DNA molekülleri içerir (Şekil 2.17). Plasmidler, içinde buldukları konakçı hücre ile uyum içinde yaşarlar. Plasmidlerin en önemli özelliği, bakteri kromozomundan bağımsız olarak replike olabilmeleri ve kendi replikasyonlarını kontrol edebilmeleridir (Kalender 2000). Plasmidlerin büyüklüğü idealde 10kb'ı geçmemelidir. Çünkü büyük DNA moleküllerinin saflaştırma sırasında kırılma olasılığı vardır, ayrıca büyük plasmid molekülleri çok zor manipüle olurlar. Plasmidler 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 plasmidlerin taşıdığı antibiyotik direnç genleri ile sağlanmaktadır. Plasmidler hücrede sabit ve karakteristik bir kopyalama sayısında muhafaza edilirler. Yani bu sayı nesilden nesile sabit olarak kalır. Kopyalama sayısı plasmidlerde bulunan genler tarafından belirlenir fakat konakçı hücre ve çoğalma koşullarından etkilenir (Kalender 2000).



Şekil 2.17 Plasmidlerin genel yapıları

Genellikle bakteriyel plasmidler hücre içinde dairesel DNA molekülleri olarak bulunurlar. Plasmidler kopyalama sayısına göre düşük (low) kopyalama sayılı ve yüksek (high) kopyalama sayılı olarak iki gruba ayrılır. Bu sınıflandırma oldukça

geniştir. Plasmidlerin transfer şekli, sıklığı, antibiyotik dirençliliği gibi bazı özelliklerine göre daha detaylı bir sınıflandırma yapmak mümkündür.



Şekil 2.18 Hücrede bulunan plasmid şekilleri

En önemli plasmid tipleri

Aşağıda verilen 4 grup plasmid diğerlerine oranla daha iyi incelenmiştir (Kalender 2000).

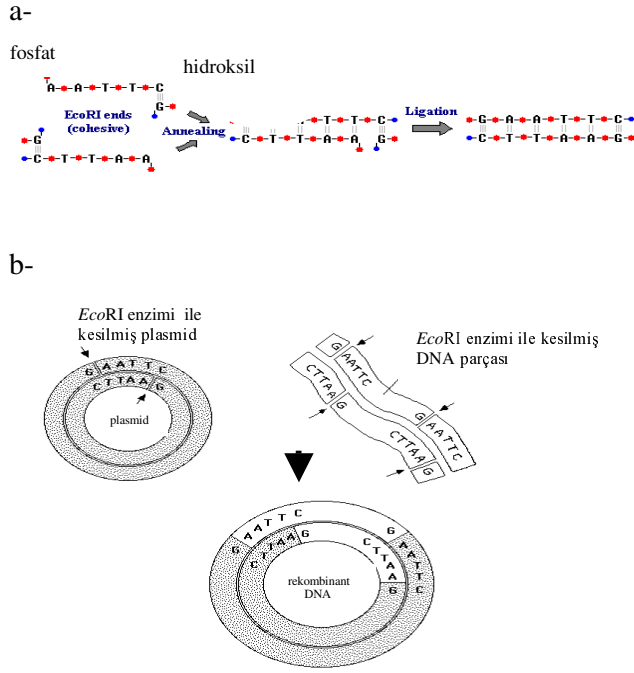
- a) F plasmidi: F plasmid ilk keşfedilen plasmiddir ve çok geniş olarak çalışmıştır. Bu plasmidler konjugasyon ile bir mikroorganizmadan diğer bir mikroorganizmaya kendilerini transfer edebilmeleri nedeniyle önemlidir.
- b) R plasmidleri: Antibiyotiklere karşı direnç özelliğini yöneten genleri içeren plasmidlerdir. Bunu taşıyan bir bakteri hangi antibiyotiğe karşı dirençli ise o ortamda rahatlıkla yaşayabilir. Bir plasmid birden fazla antibiyotiğe karşı dirençli olabilir.
- c) Col plasmidleri: Col plasmidleri bakterilerde "colicin" yapımını yöneten genetik bilgiyi taşıyan plasmidlerdir. 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.

d) Rekombinant plasmidler: Bu plasmidler, doğal olarak iki veya daha fazla plasmidden türetilen parçaların yeniden birleştirilmesi ile yapılan hibrid plasmidlerdir. Bunlar yaygın olarak klonlama vektörleri olarak kullanılır (Kalender 2000).

2.5.4.8 Klonlama : Ligasyon tepkimesi

Klonlama işlemi, mikro-reaktörlerde sıvı ortamda Taq DNA polimeraz enzimi ile DNA molekülleri arasında fosfodiester bağı oluşturularak gerçekleştirilir (Şekil 2.19). Bu tepkimenin oluşması için ortamda aynı restriksiyon enzimleri ile kesilmiş -aynı uçlara sahip- plasmid 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) plasmid oldukları için bunların transformasyonu süperhelis (supercoiled) plasmide kıyasla daha zor olur. Ligasyon tepkimesi sonunda elde edilen ürünler gen transfer teknikleri ile uygun konak hücrelere transfer edilirler (Çalık 1998, Bloom *et al.* 1996).

Optimum tepkime koşullarının bulunması: 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 değıştığından bunların uygun derişimleri optimize edilmelidir (Bloom *et al.* 1996).



Şekil 2.19 Ligasyon tepkimesi

2.5.4.9 Genin hücreye transferi

Bakteriler sadece laboratuvar koşullarında değil, doğada da genetik yapılarını değiştirirler. Bakterilere gen transferi aşağıdaki üç mekanizma ile gerçekleşmektedir. Bunlar;

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

Bakterilerin tümüne yukarıdaki her üç mekanizma ile de gen 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.

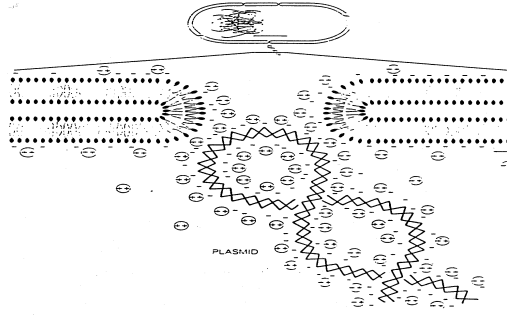
Transformasyon

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

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

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 2.20). Bu yöntem ile ilgili birçok yöntem (protokol) bulunmaktadır. Bunlardan en uygunu ve en çok kullanılanı, *E.coli* hücrelerinin CaCl₂ ile yıkanması ve +4°C'da bekletildikten sonra plasmid DNA ile aynı ortama konulup, 42°C'da 1-2 dakika bekletilerek ısı şokuyla plasmid DNA'nın hücreye transferidir. Transfer yapıldıktan sonra hücreler katı ortamda uygun bir işaretleyici antibiyotik kullanılarak çoğaltılırlar. Bu yöntemde hücrenin, istenen DNA molekülünü hangi mekanizma ile içine aldığı halen bilinmemektedir.



Şekil 2.20 İndüklenmiş transformasyon sırasında hücre ve plasmidin 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).

2.5.4.10 Geni taşıyan plasmidlerin 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 plasmidlerin klonlamada kullanılmasıdır. *E.coli* ile yapılan çalışmalarda genellikle ampisilini etkisiz hale getirecek geni -amp^r- taşıyan plasmidler tercih edilmektedir. Transformasyon işleminden sonra koloniler seçici işaretleyici görevini yapacak antibiyotiği içeren ortamda çoğaltılırlar. Plasmidi taşıyan hücrelerin hepsi bu ortamda yaşama kapasitesine sahiptir. Antibiyotik içeren ortamda yaşayabilen hücrelerin hepsi klonlamada kullanılan plasmidi taşımalarına rağmen

klonlanması amaçlanan geni taşıma olasılıkları çok düşüktür. Kontrol amacı ile her bir hücre tekrar çoğaltılır ve hücrelerden plasmid izolasyonu yapıldıktan sonra plasmidler uygun restriksiyon enzimleri ile kesilerek istenen geni taşıyıp taşımadıkları kontrol edilir.

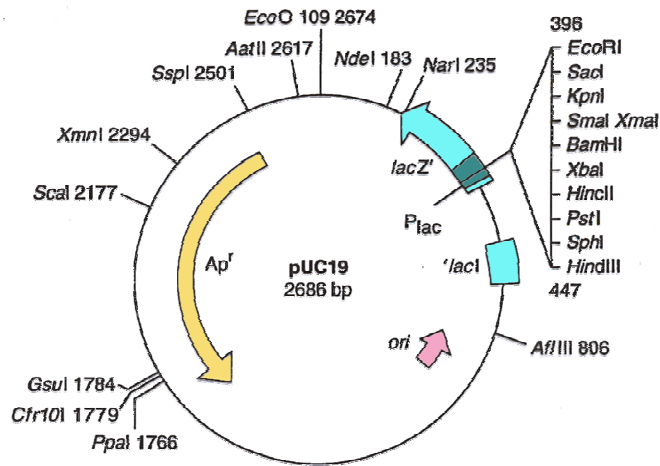
Plasmidin özelliklerine bağlı olarak geni taşıyan plasmidi seçme yöntemleri de değişir. Diğer bir yöntem de iki antibiyotiğe karşı direnç sağlayan plasmid kullanımımıdır. Bu yöntemde klonlanmak istenen gen, antibiyotiğe karşı direnç sağlayan genlerden birini pertürbe edecek şekilde klonlanır. İstenen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

- a) Transformasyondan sonra hücreler, klonlamadan etkilenmemiş antibiyotiği içeren ortamda çoğaltılırlar.
- b) İkinci aşamada, bu hücreler iki ayrı ortamda çoğaltılırlar. Birinci ortam geni pertürbe edilen antibiyotiği içerir, ikinci ortam ise klonlamadan etkilenmemiş genin antibiyotiğini içerir.
- c) Birinci ortamda çoğalmayan, ikinci ortamda çoğalabilen hücrelere klonlama gerçekleşmiştir. Çünkü birinci ortamda 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 plasmid izolasyonu yapıldıktan sonra plasmidler uygun restriksiyon enzimleri ile kesilerek istenen geni taşıyıp-taşımadıkları kontrol edilir.

Klonlanmış plasmidi taşıyan koloninin seçiminde en çok kullanılan yöntemlerden biri, *lacZ* genini taşıyan plasmidlerin kullanımımıdır. 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. Plasmid 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 plasmidlerde *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 2.21'de pUC19 plasmid vektörü gösterilmiştir. Bu vektör, hem ampisilin direnç genini taşımakta hem de *lacZ* genini taşımaktadır. Bu vektöre benzer çok sayıda vektör temin edilebilir.

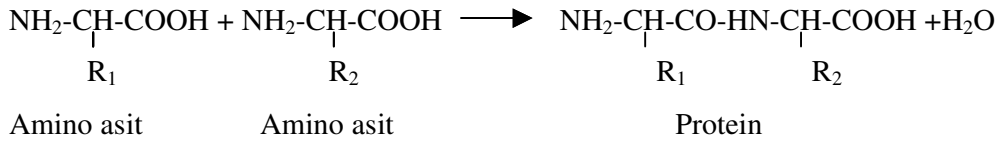
Verimi en yüksek olan yöntem ise koloni hibridizasyon (hybridisation) yöntemidir. Bu yöntemde radyoaktif izotop içeren dNTP'ler kullanılarak, klonlanması istenen gen radyoaktif olarak işaretlenerek probe hazırlanır. Probe hazırlamak için ssDNA kalıp olarak kullanılır. ssDNA'nın karşılık gelen zinciri klenow enzimi ile oluşturulur. Ortamdaki nükleik asitlerden birisi radyoaktif izotop taşır. Geni taşıyan plasmidi 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 plasmidin aktarıldığı mikroorganizma seçilir (Sambrook *et al.* 1995).



Şekil 2.21 pUC19 plasmid vektörü

2.6 Proteinler

Proteinler yaşamın en önemli biyopolimerleridir. Molekül ağırlıkları birkaç binden milyona kadar ulaşabilmektedir. Molekülünde hem amino grubu (- NH₂) hemde karboksilik asit grubu (-COOH) bulunduran bileşiklere amino asit denir. Proteinler bir yada daha fazla amino asit zincirinden oluşmuş polimerlerdir. Canlı vücudunda 20 çeşit amino asit bulunmaktadır. Amino asitler birbirleriyle peptit bağları ile birleşirler. Hücrede ribozomda sentezlenirler. Hücrenin en önemli bileşiklerindedir. Yapısında C, H, O, N ve bazılarında buna ek olarak P, S bulunabilir. Protein molekülü her canlı türüne hatta bireye özgü olup antijen özelliği gösterir. Günümüzde doku ve organ nakillerinin başarısızlıkla sonuçlanmasının nedeni bu özelliklerinden dolayıdır. Farklı özelliğe sahip canlıya aktarıldıklarında antikor oluşumuna neden olurlar. Amino asitler R gruplarının farklılığı nedeniyle büyüklük, suda çözünürlük, elektriksel yük gibi fiziksel ve kimyasal özellikler bakımından farklıdırlar. Yapıcı ve onarıcı molekülüdür. Az miktarda enerji verici olarak kullanılırlar (Bailey and Ollis 1986).



Şekil 2.22 Protein oluşum mekanizması

Peptit bağı, bir amino asidin karboksil grubu ile diğer amino asidin amin grubu arasında bir molekül suyun çıkmasıyla meydana gelir.

2.6.1 Proteinlerin sınıflandırılması

Pek çok şekilde sınıflandırılabilir. 1907 yılında Amerikan Biyokimyagerler toplantısında genel olarak şu şekilde sınıflandırılmışlardır (Stryer 1995);

1. Basit proteinler: Hidrolizlenince sadece amino asit karışımı verirler.

2. Konjuge proteinler: Hidrolizlenince amino asit karışımının yanında başka bir madde daha verirler ki buna da prostetik grup denir.

2.6.2 Proteinlerin yapısı

Başlıca 4 alt yapı gösterirler (Lehninger 1979):

- a – Primer yapı: Amino asitlerin belirli bir sıraya göre bağlanmasıyla oluşan yapıdır. Bu yapıda peptit bağları etkindir. Gerçekte proteinler değişik bir çok polipeptit zincirinden meydana gelmiştir.
- b- Sekonder yapı: Primer yapıdaki polipeptik zincirlerin değişik konfigürasyon göstermesiyle oluşan yapıdır. Dört türü vardır:
 - i - α - heliks yapısı: Primer yapıdaki polipeptit zincirinin bir eksen etrafında helezon şeklinde kıvrılmasıyla meydana gelir. Bu yapıya yünde, saçlarda ve kasların miyozininde vb. rastlanır.
 - ii - β - yaprak yapısı: İpliksi proteinlerde sarmal bozucu amino asit kalıntıları çok fazla ise doğal olarak α - heliks yapısı oluşmaz . Bunun yerine düz polipeptit zincirleri hidrojen bağları ile yandan çapraz olarak birbirine bağlanarak yeni bir sekonder yapı olan β - yaprak yapısını oluştururlar . Bu yapı keratin , ipek ve kallojende vb. bulunmaktadır.
- c – Tersiyer yapı: Proteinlerin α - heliks yapısındaki uzun protein molekülünün kıvrılıp kangallaşmasıyla oluşan yapıdır. Bu yapıda proteinin veya enzimin bütün molekülleri aynı tersiyer yapıyı alırlar ve katalitik etkinliklerde ve de yapısal geometride gereklidir.
- d – Dördüncü yapı: Diğer üç yapıyı bozunması sonucu oluşan yapıdır. Bu proteinlerin denatürasyonudur.

Çizelge 2.7 Proteinlerin metabolizmadaki bazı fonksiyonları

Fonksiyon	Örnek
Yapı	Deride kallojen;saçta tırnakta boynuzda keratin
Hareket	Kasta aktin ve miyozin
Savunma	Kanda antibadiler
Depo	Mısır tohumlarında zeotin
Sinyaller	Kanda büyüme hormonu
Kataliz	Enzimler ; pepsin, amilaz, ATP sentaz

2.7 Hormonlar

İnsan vücudunun düzenleyici birimleridir. hGH Anterior hipofiz hormonlarından biridir. 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. hGH özellikle uzun kemiklerin ve kasların büyü-mesini kontrol eder. Bu hormon 191 amino asitten meydana gelmiş bir polipeptiddir. Büyüme hormonu, vücudun tüm olarak büyümesini doğrudan değil, dolaylı olarak etkiler (Pekin 1980).

2.7.1 İnsan Büyüme Hormonu (hGH - Human Growth Hormone)

Somatotropin olarak da bilinen insan büyüme hormonu (hGH), beynin ön lobunda bulunan hipofiz bezlerindeki somatotropik hücreler tarafından sentezlenir.

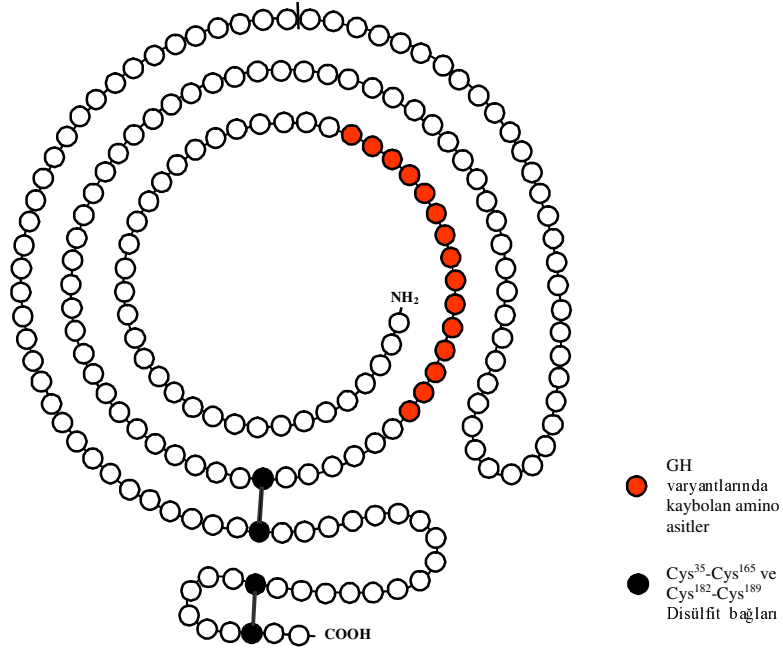
2.7.1.1 Yapısı ve doğal sentezi

191 amino asitten oluşan (molekül ağırlığı= 22 kDa) küresel bir protein olan hGH'nu kodlayan gen DNA'da kromozom 17 üzerinde bulunmaktadır. Makromolekülün polimerik yapısında 35, 165, 182 ve 189 numaralı konumlarda bulunan dört tane sistein

molekölü hGH'nun aktif molekül konformasyonundaki iki disülfid bağı oluşturumaktadırlar (Cys³⁵-Cys¹⁶⁵ ve Cys¹⁸²-Cys¹⁸⁹). Tek bir polipeptit zincirden oluşan hGH'nun 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'luk iki izoformu vardır. Çocuklarda ve yetişkinlerde hGH'nun sirküle eden formu hipofiz bezlerinde üretilen hGH-N gen ürünüdür. Hipofizdeki toplam hGH'nin yaklaşık %90'nı 22kDa'luk, %10'nu 20kDa'luk formu oluşturumaktadır. 22kDa'luk formundaki 32-46 arası amino asitler 20kDa'luk formunda yoktur. Sağlıklı büyümenin gerçekleşebilmesi için metabolik ve fizyolojik açıdan 22kDa'luk hGH formu gereklidir. 20kDa'luk 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.



Şekil 2.23 22kDa'luk hGH'nin amino asit dizini

2.7.1.2 Fizyolojik ve metabolik etkileri

hGH'nun 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 prosestir ve çeşitli hormonların koordineli olarak çalışmasını gerektirir. hGH dokular üzerinde direk ve indirek olmak üzere iki ayrı etki mekanizmasına sahiptir. Direk etkileri hGH'nun hedef hücreleri üzerinde bulunan reseptörüne bağlanarak gerçekleştirilmektedir. İndirek etkileri ise karaciğer ve diğer bazı dokulardan hGH'a 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.

Büyüme hormonu, amino asit katabolizmasını geciktirip bunların vücut proteinlerine çevrilmesini hızlandırarak protein metabolizmasını; trigliseritlerin parçalanmasını ve oksidasyonunu stimüle ederek yağ kullanımının arttırılmasıyla yağ metabolizmasını; anti-insülin aktiviteye sahip olması sayesinde de karbonhidrat metabolizmasını etkilemektedir. Gelişme çağında yüksek seviyede salgılanan hormonun vücuttaki miktarı yaşlanma ile azalmaktadır. hGH'nun 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-dwarfism) görülmektedir. hGH'nin metabolizma üzerindeki etkilerinden dolayı yaşlanma sürecini yavaşlatılabileceği belirlenmiştir. Bu amaçla 'Anti-aging' adı altındaki çalışma hız kazanmıştır.

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

2.7.1.3 hGH'nin terapatik protein için kullanım onayı: Tarihçesi ve üretimi

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'nu kodlayan genin klonlanmasıyla elde edilen rekombinant hGH'nun 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'nun, 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'ya 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-adıyla 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* mikroorganizmasının kullanımı ile gerçekleştirilmiştir (Gray *et al.* 1985, Becker *et al.* 1986, Chang *et al.* 1987, Kato *et al.* 1987). Fakat hücre dışına salgılanan hGH'nin ancak doğayla aynı özellikler göstermesi nedeniyle bu özelliğe sahip *Bacillus* hücrelerinin kullanıldığı çalışmaların hız kazanmasına neden olmuştur (Franch *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; ayrı 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, $-r_s$ 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,

$$Y_{x/o} = \frac{r_x}{-r_o} \quad (2.6)$$

şeklinde tanımlanmıştır.

Farklı verim katsayılarının tanımları ve birimleri ile birlikte Çizelge 2.8'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 2.9'de farklı substratlar için bakterilerin verim katsayıları yer almaktadır.

Çizelge 2.8 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 2.9 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, selüloz)	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

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 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 gereksinme olacağı için karbon ve enerji kaynağının verimi de düşer. Ayrıca sıcaklık azaldıkça çoğalma sırasındaki

magnezyum, potasyum ve fosfat verimleri üzerinde de düşmeler gözlenmiştir. Bazı hallerde biyoproses ortamının sıcaklığı ile birlikte mikroorganizmalardaki yolizlerinde 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 çalışmalıdır. *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 37 °C'de sıcaklık etkisini incelemeyen 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 bağıli 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 (Neilsen and Vallidsen 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, amino asitlerin ortama salgılanmasıyla birlikte ortam pH'ında düşme, ortama salgılanan metabolitlerin tekrar hücreye transferi ve kullanımıyla da artış gözlenir. Ortam pH'ına bağıli 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.

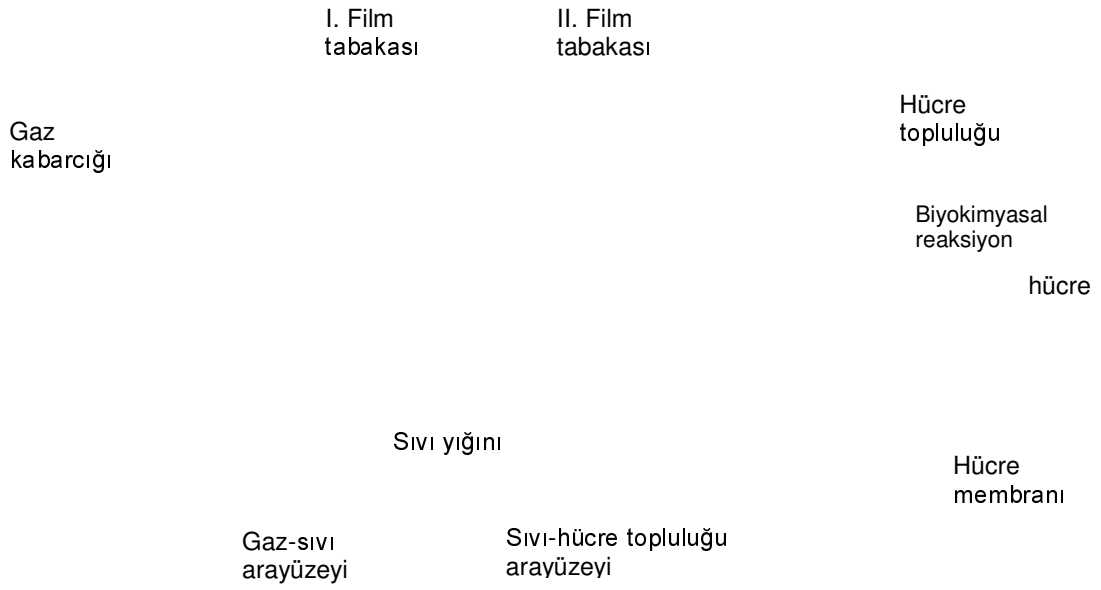
E.coli ve *Bacillus* türü mikroorganizmalar ile hGH üretiminde, Nakayama *et al.* (1988), Jensen and Carlsen (1990), Byund *et al.* (2000) ve Caston *et al.* (2002), Shin *et al.* (1998a-b), Tabandeh *et al.* (2004) pH etkisini incelemeyen çalışmışlardır.

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 çözünmüş oksijen derişimi ve oksijenin aktarım hızı önemlidir. Oksijenin aktarımının eksikliği ya da fazlalığı ürün verimi ve seçimliliğini etkiler. Bir biyoteknolojik proste 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 2.24'te görüldüğü gibi sekiz basamakta gerçekleşir (Bailey and Ollis 1986).



Şekil 2.24 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 filmde aktarımı
4. Çözünmüş gazın iyi karışan sıvı yığında aktarımı
5. Çözünmüş gazın mikrobiyal hücre yığına bitişik durgun sıvı filmde 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 kümeleri oluşurmuyorsa 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 girişı 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:

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

Oksijenin sudaki çözünürlüğü düşük olduğundan toplam kütle aktarım katsayısı $K_L a$ sıvı tarafı kütle aktarım katsayısı $k_L a$ 'ya eşit olacaktır.

b. Oksijen aktarım karakteristikleri

Aerobik fermentasyon proseslerinde mikrobiyal hücreye oksijen aktarımı, metabolik akıların değişmesi ve metabolik yoluzinin 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_A değeridir ($N_{Amax}=k_L a C_o^*$). Oksijenin maksimum tüketim hızı ise Denklem (2.1) ve (2.6)'dan $-r_{Omax}=C_x \mu_{max}/Y_{x/o}$ olarak bulunur. Burada C_x hücre derişimini, $Y_{x/o}$ tüketilen 1 g oksijene karşılık oluşan hücreyi gösterir.

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. Sıva 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 prosenin hızını kısıtlayacaktır (Bailey and Ollis 1986).

Pek çok faktör mikroorganizmanın oksijen ihtiyacını etkileyebilir. Biyoprosesdeki 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 $dm^{-3} st^{-1}$ 'dir. 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 stokiometri 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. Biyoproseste 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_{La}) 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. Sülfite Oksidasyon Yöntemi*
- iv. Glukoz-Oksidaz Yöntemi*
- v. CO₂ Yöntemi*

1) i. Dinamik yöntem

Dinamik Yöntem biyoreaktörlerde sıvı faz kütle/oksijen aktarım katsayısının (K_{La}) 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:

$$K_{La}(C_o^* - C_o) + r_o''' C_x = \frac{dC_o}{dt} \quad (2.8)$$

Yöntem biyoreaktöre gönderilen havanın kısa süreli olarak kesilmesi ve bir oksijen elektrodu ile çözülmüş oksijen derişiminde önce azalmanın; havanın tekrar sisteme verilmesi ile de artışın incelenmesi prensibine dayanmaktadır (Rainer 1990) (Şekil 2.25). Havanın kesildiği t_0 anına kadar biyoreaktörde çözülmüş oksijen derişimi yatışkın koşulda C gibi bir değerdedir ve t_1 anında hava yeniden verilmektedir. t_0 Anından t_1 anına kadar zamanla çözülmüş oksijen derişimindeki azalma gözlenir. Burada oksijen aktarımı gerçekleşmediğinden $K_{La}(C_o^* - C_o)$ 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.

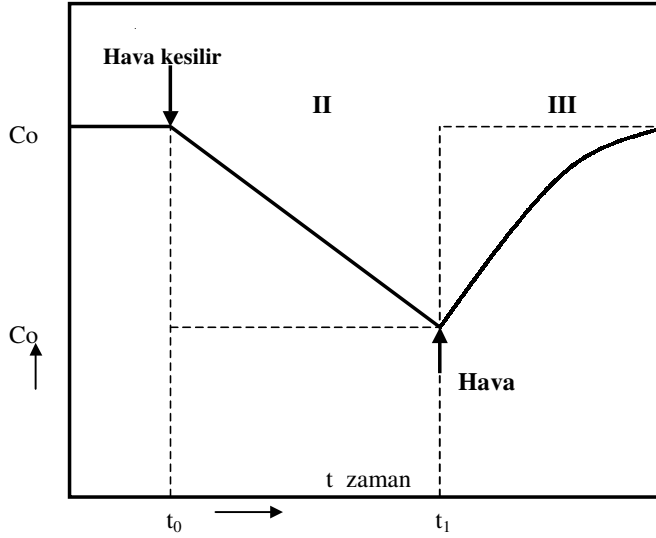
$$r_o = r_o''' C_x \quad (2.10)$$

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

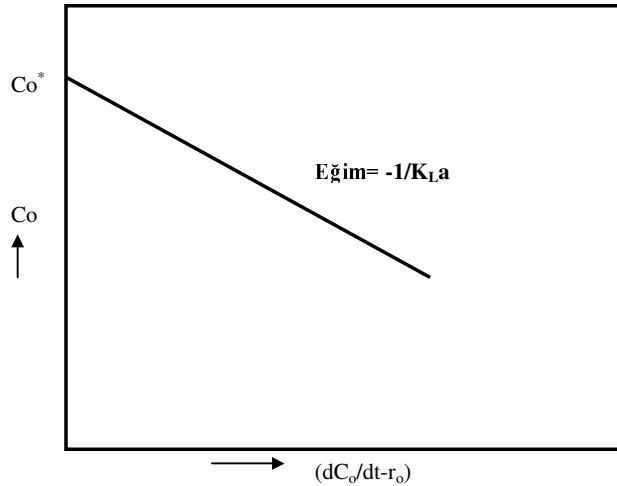
$$\left\{ \left(\frac{dC_o}{dt} - r_o \right); C_o \right\}$$

grafiği elde edilir (Şekil 2.26); grafiğin eğiminden K_{La} hesaplanır.

Biyoreaktörde havanın kesilmesi ile çözünmüş 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.



Şekil 2.25 Dinamik Yöntem uygulamasında çözünmüş oksijen derişiminin kalma süresi ile derişimi



Şekil 2.26 Dinamik Yöntem ile sıvı faz hacimsal kütle aktarım katsayısının belirlenmesi

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).

Biyotepkime 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 biyotepkime yozizlerine *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 yollarının 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 biyomolekülü (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 poliketid ve 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).

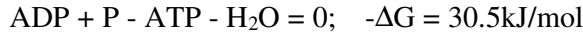
2.10.1 Hücre-içi tepkimeler

Hücreler, içerisinde çok sayıda farklı enzim tarafından katalizlenen yaklaşık 1000 kimyasal tepkimenin gerçekleştiği kompleks kimyasal reaktörler olduğu için mikrobiyoreaktörler olarak düşünülmelidirler (Çalık *et al.* 1999). Hücre-içinde meydana gelen tepkimelerin tümüne metabolizma denir (Bailey and Ollis 1986). Hücre metabolizmasının dört spesifik fonksiyonu vardır: 1) yüksek kimyasal enerjili girdiler kullanarak veya fotosentezle hücre-içi enerji oluşumunu sağlamak ve farklı enerji türlerini gerekli forma dönüştürmek, 2) girdi moleküllerini hücrenel makromoleküllerin öncülü (girdileri) olan moleküllere dönüştürmek, 3) öncülleri birleştirerek protein, nükleik asit gibi diğer makromolekülleri sentezlemek, 4) hücre fonksiyonları için önemli olan biyomolekülleri sentezlemek veya parçalamaktır (Lehninger 1979). Bu tepkimelerin hız, yön ve oranları birbiri ile bağlantılı olarak, hücrenin gereksinimine göre düzenlenir. Hücre metabolizması birbirine bağlı ardışık tepkimelerden oluşur ve bir tepkime yolizinde yer alan bir ürün diğer bir zincirin başında yer alan substrat olabilir. Örneğin, glukozun parçalanma tepkimeleri sırasında oluşan AcCoA, yağ asitlerinin sentezini başlatan moleküldür.

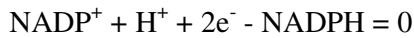
Metabolizma, "katabolizma" ve "anabolizma" olmak üzere iki faza ayrılır. Hücrenin çevresinde veya besin deposunda bulunan karbonhidratlar, lipidler ve proteinler gibi büyük ve kompleks girdi moleküllerini parçalayarak, amino asitler, organik asitler, CO₂, amonyak veya üre gibi daha küçük ve basit moleküllere dönüştürdüğü ve bunlara paralel olarak hücrenin diğer fonksiyonları (anabolizma) için gerekli olan serbest enerjiyi (ATP) ürettiği faza metabolizmanın indirgen fazı olan "katabolizma" denir. "Anabolizma" ise katabolizma sonucu oluşan küçük moleküllerden nükleik asitler, proteinler, polisakkaritler ve lipidler gibi hücre bileşenlerinin katabolizma sırasında üretilen enerji kullanılarak sentezlendiği faz olan metabolizmanın biyosentetik fazına denir. Hücre-içinde meydana gelen katabolizma ve anabolizma tepkimelerinin tümüne metabolizma ve bu tepkimelerde yer alan bileşiklere metabolit denir. Hücre-içinde

meydana gelen tepkimelerin oluşturdukları tepkime yozizlerine ise metabolik yozizi denir. Katabolizma ve anabolizma birbirlerini tamamlayan olaylardır. Bunlar hücrede aynı zamanda meydana gelebilir, ve hem ayrı ayrı hem de birlikte kontrol edilebilirler. Temel metabolik yozizleri; glikoliz yozizi, glikoneogenesis yozizi, TCA (trikarboksilik asit) döngüsü ve pentoz fosfat yozizidir.

Substratlar, sitoplazmaya transfer edildikten sonra, çok sayıda biyokimyasal tepkimeyle hücre-içi bileşiklere ve metabolik ürünlere dönüştürülür. Oluşan hücre-içi bileşenler moleköl ağırlıkları ve fonksiyonları ağıından birbirinden çok farklıdır. Genellikle hücrenin %90'ı protein, RNA, lipid ve karbonhidratlar gibi makromoleküllerden oluşmaktadır. Substratlardan makromoleküllerin oluşumu anabolik tepkimelerle gerçekteşir. Substratlar önce amino asit ve nükleotitler gibi ana yapı taşlarına dönüşür; polimerizasyon tepkimeleriyle amino asitlerden proteinler ve nükleotitlerdende DNA ve RNA sentezlenir. Anabolik tepkimeler dışardan enerji gereksinimi duyan tepkimelerdir. Bu enerji ATP'deki yüksek enerjili fosfat bağıının kopmasıyla veya NADPH koenziminin indirgenmesiyle sağlanır. ATP 'deki yüksek enerjili fosfat bağıının indirgenmesiyle büyük miktarda enerji ağığa çıkar (Nielsen and Villadsen 1994).



NADPH, NADP⁺ 'ya oksitlendiğinde iki elektron ağığa çıkar; bu elektronlar hücre içinde diğer bileşiklere transfer edilerek bu bileşikler indirgenir.



ATP ve NADPH substratın daha düşük enerjili diğer maddelere dönüştüğü katabolik tepkimelerle oluşur (Nielsen and Villadsen 1994).

a. Katabolik tepkimeler

Hücre çoğalmasında en çok kullanılan enerji kaynağı şekerlerdir. şekerler CO₂, laktik asit, asetik asit ve etanol gibi metabolik ürünlere dönüşür ve bu dönüşüm sırasında ATP,

NADPH ve NADH oluşumu gerçekleşir. NADH da NADPH gibi bir kofaktördür; ancak NADH oksidatif fosforilasyon gibi katabolik tepkimelerde kullanılırken, NADPH anabolik tepkimelerde kullanılır. Şekerlerin çoğunun hücreye transferiyle G6P veya F6P 'ta oluşur ve sırasıyla glikoliz yolizine, pentoz fosfat yolizine (PFY) ve TCA döngüsüne girerek katabolize olurlar.

Glikoliz yolizi glukozun bir seri tepkime ile pirüvata dönüştüğü ve paralel olarak bir miktar ATP 'nin de üretildiği karbon katabolizmasının ilk temel tepkime sistemidir. Bunların yanısıra glikoliz yolizinde TCA döngüsünün, pentoz fosfat yolizinin ve bazı amino asitlerin ilk girdisi olan metabolitler üretilir.

Aerobik proseslerde, glikoliz yolizinden sonraki basamak; pirüvatin oksidatif dekarboksilasyonu ile asetilkoenzimA (AcCoA) oluşum tepkimesidir ve AcCoA sonraki basamakta karbon katabolizmasının temel tepkimelerinden biri olan TCA döngüsüne girer ve tamamen CO₂ ve H₂O'ya dönüşebilir. Her bir mol pirüvat oksidasyonuna karşılık TCA döngüsünde bir mol ATP, dört mol NADH ve bir mol de FADH₂ oluşur. Pirüvatin oksidasyonu sırasında kullanılan NAD⁺ ve FAD⁺, NADH ve FADH₂ 'den rejenere edilir. NADH ve FADH₂ –elektron taşıyıcıları- solunum zincirinde oluşur ve serbest oksijen içeren bu oksidasyon prosesi bu nedenle sadece aerobik mikroorganizmalarda gerçekleşir (Nielsen and Villadsen 1994). TCA döngüsünde enerjinin yanısıra aspartik asit grubu ve glutamik asit grubu amino asitlerin sentezi için gerekli başlatıcı metabolitler de üretilir.

Karbon katabolizmasının temel tepkimelerinden bir diğeri olan pentoz fosfat yolizinin en önemli fonksiyonu biyokimyasal tepkimelerde elektron taşıyıcısı olan NADPH'ın üretimini gerçekleştirmektir. Bununla birlikte pentoz fosfat yolizinde purin ve primidin nükleotidlerinin biyosentezi için temel başlangıç girdileri olan riboz 5-fosfat ve eritroz 4-fosfat üretilir (Nielsen and Villadsen 1994).

b. Anabolik tepkimeler

Hücrenin büyük bir bölümünü oluşturan makromoleküllerin oluşumu için amino asitlerin ve nükleik asitlerin sentezi ile ardışık polimerizasyon tepkimelerinin gerçekleşmesi gerekir. Biyosentez ve polimerizasyon tepkimeleri anabolik tepkimeler olarak bilinir. Hücrede üretilen toplam enerjinin yaklaşık %70'i protein sentezi için kullanılmaktadır. Protein sentezi yüksek miktarda serbest enerjiye gereksinim duyar (Nielsen and Villadsen 1994). Mikroorganizmalar bu enerjiyi, ortamda bulunan bileşiklerin kimyasal bağlarında depolanmış enerjiyi kullanarak sağlar. Karbon kaynağı olarak seçilen bileşiğin -örneğin glukoz, sakkaroz, organik asit vb- metabolizmaya özgün bir biyokimyasal yoldan girerek katabolik tepkimelerle küçük molekülü ara ürünlere veya yan ürünlere dönüştürülmesiyle eşanlı olarak enerji, ATP, NADH, NADPH üretilir. Kullanılan karbon kaynağının özelliklerine ve biyoreaktör işletim koşullarına bağlı olarak hücre-içi merkezi döngü ve metabolik yoldaki katabolizma tepkimeleri, enerji üretim tepkimeleri ve hızları belirlenir.

2.10.2 Hücre-içi tepkime hızlarının belirlenmesi ve analizi : Metabolik Akı Analizi (MAA)

Biyoreaktörde çoğalma, ürün ve yan-ürün oluşumu sürecindeki ürün dağılımının araştırılması, biyoprosesin geliştirilebilmesi için hücreiçinde oluşan tepkimelerin ve hızlarının bulunması ve bilinmesi gerekmektedir. Verimi ve seçimliliği etkileyen biyoreaktör işletim parametreleri araştırılırken, metabolik yolizi mühendisliği teknikleriyle metabolik yolizi üzerinde bulunan hız kısıtlayıcı basamaklar belirlenmelidir. Hücre-içi tepkime hızlarının bulunması, hücrenin fizyolojisi hakkında da bilgi sağlar ve aşağıda belirtilen gelişmeler için önemli araçtır (Çalık and Özdamar 2002):

- 1. Hücreiçi tepkime yollarındaki ayrılma noktalarının belirlenmesi : İşletim koşulları değiştirilerek farklı akı dağılımlarının ayrılma/dallanma noktasındaki değişimlerin karşılaştırılmasıyla ayrılma noktasının esnek ya da kesin olduğu tespit edilebilir. Genel olarak kesin ayrılma noktaları akı split oranlarının değişimine direnç*

gösterirken esnek ayrılma noktaları daha çok birbirine uyum sağlar. Metabolik proseslerin karakterlerinin bilinmesi, bu tip değişikliklerin farkına varılması için önemlidir. Bu değişiklikler ürün verimlerinin değişimlerinde etkin rol oynar.

2. *Alternatif yollarının belirlenmesi,*
3. *Ölçülmemiş hücre dışı akılarının hesaplanması,*
4. *Maksimum teorik veriminin hesaplanması,*
5. *Üretim ortamının geliştirilebilmesi,*
6. *Biyoreaktör işletim parametrelerinin geliştirilebilmesi,*

metabolik akı analizi yardımı ile başarılabılır. *B. licheniformis* mikroorganizma çoğalması, mikroorganizmanın yaşamı, ara-ürünler, ürün ve yan-ürünlerin oluşumu için Çizelge 2.10'de verilmiştir.

Hücre-içi tepkime hızlarının belirlenmesi

Hücre içinde meydana gelen tepkimeler belirlendikten sonra, hücre yarı-kesikli mikro-biyoreaktör olarak düşünülerek, her bir bileşen için kütle-korunum temelli stokiyometrik denklemler kurulur (Çalık 1998, Çalık and Özdamar 2002). Tepkime ağındaki *i*- bileşiği birikim hızı, bileşiği üreten tüm tepkimeler ile bileşiği tüketen tepkimelerin cebirsel toplamı ile bileşiğin aktarım hızının cebirsel toplamına eşitlenir:

$$r_{Ri}V + r_{Ti}V = d(C_iV)/dt \quad (2.11)$$

burada, r_{Ri} *i*-bileşiğine göre net tepkime hızı ve r_{Ti} *i*-bileşiğinin net aktarım hızıdır. Bu şekilde kurulan diferansiyel denklem sistemi :

$$A * r(t) = c(t) \quad (2.12)$$

vektör diferansiyel denkleminde tanımlanır. Burada; *A*, metabolik tepkime sisteminin $m \times n$ stokiyometrik katsayılar matrisi, $r(t)$, $n \times 1$ tepkime hız (akı) vektörü ve, $c(t)$ ise metabolik bileşikler için $n \times 1$ birikim hız vektörüdür.

$$c(t)=c_1(t)+c_2(t) \quad (2.13)$$

$$c(t)=c_1(t) \quad (2.14)$$

$c_1(t)$ ve $c_2(t)$ sırayla, hücre dışı ve hücre içi metabolit birikim vektörleridir. Hücre dışı metabolitlerin birikim ve tüketim hızı, kalma süresi ile derişimin değişim eğrilerinden, iki derişim arasındaki eğimden bulunur. Metabolik akı analizinin yapıldığı evrede, hücre içinde yaklaşık yatışkın koşul varsayımı yapıldığında; $c_2(t)=0$ olduğundan, denklem (2.13) denklem (2.14)'ya indirgenir.

Matematik modelin çözümü

Tepkime sisteminin $m \times n$ stokiyometrik katsayılar matrisinde (Çalık 1998, Çalık and Özdamar 2002):

- $m=n$ ise matematik modelin tek bir çözümü vardır.
- $m>n$ ise matematik modelin yine tek bir çözümü vardır ve yaklaşık kesin çözüm elde edilir. 2.12-denkleminin çözümü sınırlandırılmış en küçük kareler yaklaşımıyla kütle korunum denklemlerinde kalanların karelerinin toplamının minimize edilmesi amaç fonksiyonu olarak kullanılarak yapılabilir.
- $m<n$ ise matematik model optimizasyon yaklaşımıyla çözülebilir. Bunun için amaç fonksiyonu Z:

$$Z=\sum \alpha_i r_i \quad (2.15)$$

denklemleriyle tanımlanır. Burada, i -bileşimi için α_i stokiyometrik katsayıları ile r_i hızlarının çarpımının lineer toplamı olarak tanımlanan denklem (2.15)'in amaca göre minimize edilmesiyle ya da maksimize edilmesiyle denklem sistemi çözülmektedir. Matematik modelin değişkenleri olan tepkime akıları $\text{mmol g-DW}^{-1} \text{st}^{-1}$ olarak tanımlanmıştır. Hücre oluşum hızı, r_X ($\text{gKHgKH}^{-1} \text{st}^{-1}$); birim reaktör hacmi başına hücre oluşum hızının C_X değerine bölünmesiyle $r_X=m$ olarak elde edilir (Çalık 1998).

Çizelge 2.10 *Bacillus licheniformis*'in metabolik yolizi tepkimeleri (Çalık 1998, Çalık and Özdamar 2002):

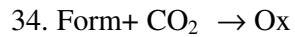
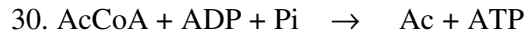
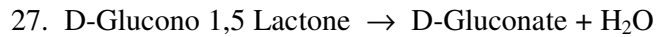
A. Glukoliz ve Glukoneogenesisiz Yolizi

1. Glc + PEP \rightarrow G6P + Pyr
2. Fruktoz + PEP \rightarrow F6P + Pyr
3. G6P \rightarrow F6P
4. F6P \rightarrow G6P
5. F6P + ATP \rightarrow 2T3P + ADP
6. 2T3P \rightarrow F6P + Pi
7. T3P + ADP + Pi \rightarrow PG3 + ATP + NADH
8. PG3 + ATP + NADH \rightarrow T3P + ADP + Pi
9. PG3 \rightarrow PEP
10. PEP \rightarrow PG3
11. PEP + ADP \rightarrow Pyr + ATP
12. Pyr + 2 ATP \rightarrow PEP + 2 ADP
13. Pyr \rightarrow AcCoA + NADH + CO₂

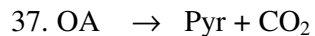
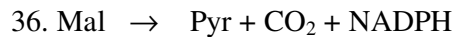
B. Pentoz Fosfat Yolizi

14. G6P \rightarrow Gluc6P + NADPH
15. Gluc6P \rightarrow R5P + NADPH + CO₂
16. R5P \rightarrow Xyl5P
17. Xyl5P \rightarrow R5P
18. R5P \rightarrow Rib5P
19. Rib5P \rightarrow R5P
20. Xyl5P + Rib5P \rightarrow S7P + T3P
21. S7P + T3P \rightarrow Xyl5P + Rib5P
22. Xyl5P + E4P \rightarrow F6P + T3P
23. F6P + T3P \rightarrow Xyl5P + E4P
24. T3P + S7P \rightarrow F6P + E4P
25. F6P + E4P \rightarrow T3P + S7P

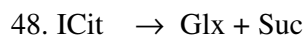
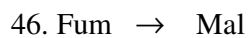
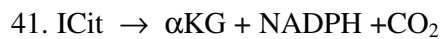
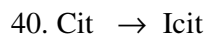
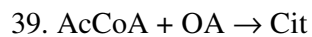
C. Glikoliz yolizinden ayrılan tepkimeler



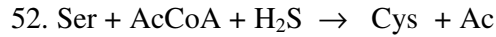
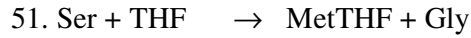
D. Anapleoritik Tepkimeler



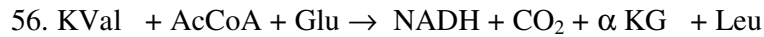
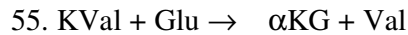
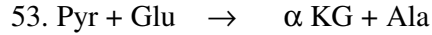
E. TCA Döngüsü



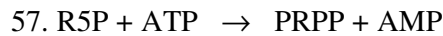
F. Serin Grubu Amino Asitlerin Biyosentezi



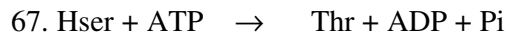
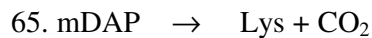
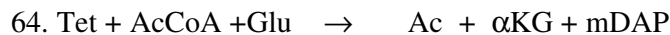
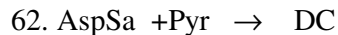
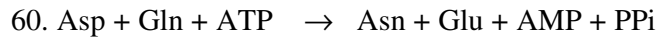
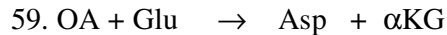
G. Alanin Grubu Amino Asitlerin Biyosentezi



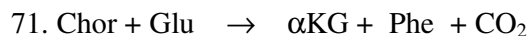
H. Histidin Biyosentezi



I. Aspartik Asit Grubu Amino Asitlerin Biyosentezi



J. Aromatik Amino Asitlerin Biyosentezi



72. Chor + Glu \rightarrow Tyr + α KG + NADH + CO₂
 73. Chor + NH₃ + PRPP \rightarrow Pyr + IGP + CO₂ + PPI
 74. IGP + Ser \rightarrow Trp + T3P

K. Glutamik Asit Grubu Amino Asitlerin Biyosentezi

75. α KG + NH₃ + NADPH \rightarrow Glu
 76. Glu + ATP + NH₃ \rightarrow Gln + ADP + Pi
 77. Glu + ATP + 2 NADPH \rightarrow Pro + ADP + Pi
 78. 2Glu + AcCoA + ATP + NADPH \rightarrow Orn + Ac + ADP + Pi + α KG
 79. Orn + CaP \rightarrow Citr + Pi
 80. Citr + Asp + ATP \rightarrow Arg + Fum + AMP + PPI

L. Amino Asitlerin Katabolizması

81. α KG + Ala \rightarrow Pyr + Glu
 82. Arg + α KG \rightarrow 2Glu + NH₃ + NADPH + CO₂
 83. Asn \rightarrow Asp + NH₃
 84. Asp \rightarrow Fum + NH₃
 85. Cys \rightarrow Pyr + NH₃ + H₂S
 86. Gln + α KG + NADPH \rightarrow 2Glu
 87. Gly + MetTHF \rightarrow Ser + THF
 88. His + THF \rightarrow Glu + MeTHF
 89. Ile + α KG \rightarrow Glu + FADH₂ + 2NADH + CO₂ + SucCoA + AcCoA
 90. Leu + α KG + ATP \rightarrow Glu + FADH₂ + NADH + 2AcCoA + ADP + Pi
 91. Phe \rightarrow Tyr + NADPH
 92. Pro \rightarrow Glu + NADPH
 93. Ser \rightarrow Pyr + NH₃
 94. Thr \rightarrow Gly + NADH + AcCoA
 95. Trp + NADPH \rightarrow AcCoA + Ala
 96. Tyr + α KG + SucCoA \rightarrow Glu + Fum + AcCoA + Succ + CO₂
 97. Val + α KG \rightarrow Glu + FADH₂ + 3NADH + 2CO₂ + SucCoA

M. Nükleotitlerin Biosentezi

98. $\text{PRPP} + 2\text{Gln} + \text{Asp} + 2\text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2 + \text{Gly} + 4\text{ATP} + \text{F10THF} \rightarrow$
 $2\text{Glu} + \text{PPi} + 4\text{ADP} + 4\text{Pi} + \text{THF} + \text{PRAIC} + \text{Fum}$
99. $\text{PRAIC} + \text{F10THF} \rightarrow \text{IMP} + \text{THF}$
100. $\text{IMP} + \text{Gln} + \text{ATP} \rightarrow \text{NADH} + \text{GMP} + \text{Glu} + \text{AMP} + \text{PPi}$
101. $\text{GMP} + \text{ATP} \rightarrow \text{GDP} + \text{ADP}$
102. $\text{ATP} + \text{GDP} \rightarrow \text{ADP} + \text{GTP}$
103. $\text{GTP} + \text{ADP} \rightarrow \text{ATP} + \text{GDP}$
104. $\text{NADPH} + \text{ATP} \rightarrow \text{dATP}$
105. $\text{NADPH} + \text{GTP} + \text{ATP} \rightarrow \text{ADP} + \text{dGTP}$
106. $\text{IMP} + \text{GTP} + \text{Asp} \rightarrow \text{GDP} + \text{Pi} + \text{Fum} + \text{AMP}$
107. $\text{AMP} + \text{ATP} \rightarrow 2\text{ADP}$
108. $\text{PRPP} + \text{Asp} + \text{CaP} \rightarrow \text{UMP} + \text{NADH} + \text{PPi} + \text{Pi} + \text{CO}_2$
109. $\text{UMP} + \text{ATP} \rightarrow \text{UDP} + \text{ADP}$
110. $\text{UDP} + \text{ATP} \rightarrow \text{ADP} + \text{UTP}$
111. $\text{UTP} + \text{NH}_3 + \text{ATP} \rightarrow \text{CTP} + \text{ADP} + \text{Pi}$
112. $\text{ATP} + \text{NADPH} + \text{CDP} \rightarrow \text{dCTP} + \text{ADP}$
113. $\text{CDP} + \text{ATP} \rightarrow \text{CTP} + \text{ADP}$
114. $\text{CTP} + \text{ADP} \rightarrow \text{CDP} + \text{ATP}$
115. $\text{UDP} + \text{MetTHF} + 2\text{ATP} + \text{NADPH} \rightarrow \text{dTTP} + \text{DHF} + 2\text{ADP} + \text{Ppi}$

N. Kofaktörlerin Biosentezi

116. $\text{DHF} + \text{NADPH} \rightarrow \text{THF}$
117. $\text{MetTHF} + \text{CO}_2 + \text{NH}_3 + \text{NADH} \rightarrow \text{Gly} + \text{THF}$
118. $\text{MetTHF} + \text{NADPH} \rightarrow \text{MTHF}$
119. $\text{MetTHF} \rightarrow \text{MeTHF} + \text{NADPH}$
120. $\text{MeTHF} \rightarrow \text{F10THF}$
121. $\text{Gly} + \text{THF} \rightarrow \text{MetTHF} + \text{NH}_3 + \text{NADH} + \text{CO}_2$

O. Hidrojen Transfer Reaksiyonları

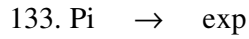
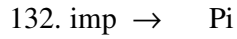
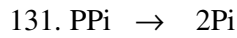
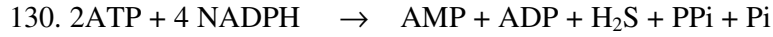
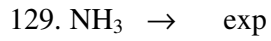
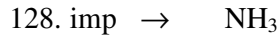
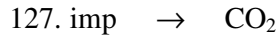
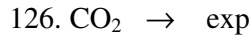
122. $\text{NADH} \rightarrow \text{NADPH}$



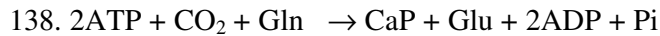
P. Elektron Taşınım Sistemi



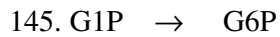
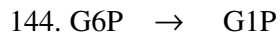
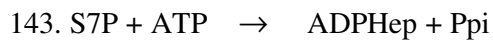
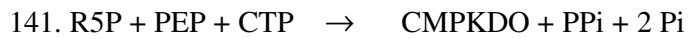
R. Taşınım Tepkimeleri

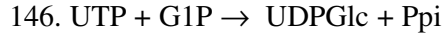


S. Yağ Asitlerinin ve Fosfolipidlerin Biyosentezi

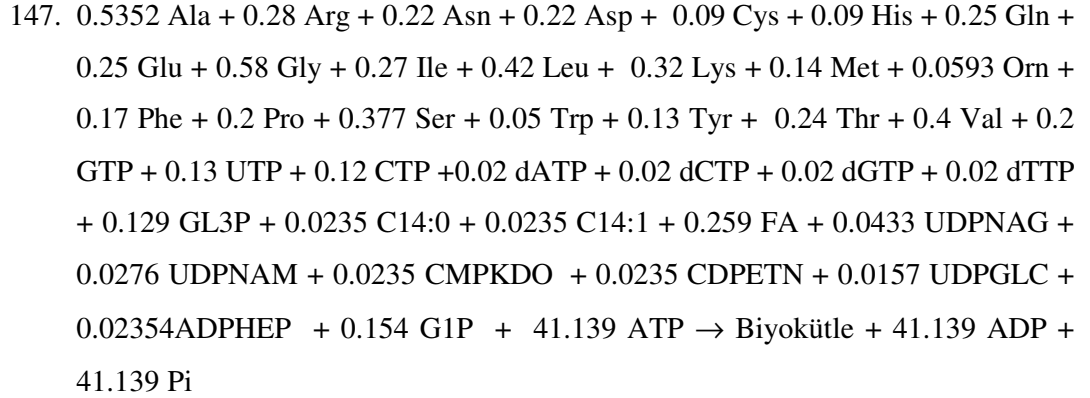


T. Biyokütle Bileşenleri

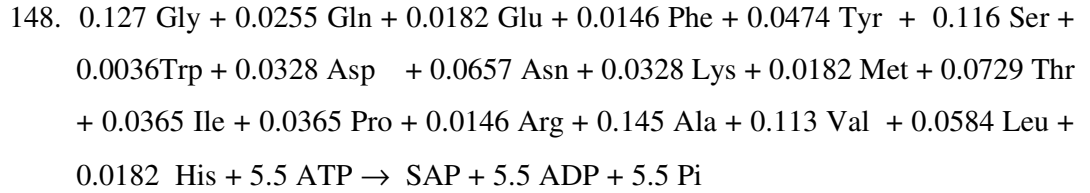




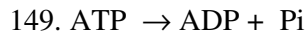
U. Biyokütle sentezi



V. Serin Alkali Proteaz sentezi



Y. Yaşam



2.11 Süreli Yayınlarda İnsan Büyüme Hormonu (hGH) Üretimi

Doğal olarak sadece insan metabolizması tarafından üretilen ve diğer mikroorganizmalarca üretilmeyen hGH'nin genetik mühendisliği teknikleri kullanılarak geliştirilen mikroorganizmalarca üretilmesi mümkündür. hGH üretimi ile ilgili ilk çalışmalar genetik yapısı ilk aydınlatılan mikroorganizma *E. coli*'de gerçekleştirilmiştir (Çizelge 2.11.a). Doğala özdeş, çözünebilir ve biyolojik olarak aktif yapıda insan büyüme hormonu üretilmesi için hücre içinde sentezlenen hGH'nin biyoreaktör üretim ortamına salgılanması önemlidir. Bu nedenle genom analizi tamamlanmış bulunan (Sonenshein *et al.* 2002), hücre dışı protein üretme yeteneğine sahip *Bacillus*

subtilis -veya diğeri *Bacillus* türleri- konak hücre olarak kullanılarak hGH üretimi alternatif yaklaşım olarak önemlidir.

Sürekli yayın literatüründe hGH üretimi ile ilgili çalışmalar Çizelge 2.11'de geliştirilen rekombinant mikroorganizma, Çizelge 2.12'de üretim ortam bileşenleri ve incelenen parametreler, Çizelge 2.13'de ise biyoreaktör işletim parametrelerine göre özetlenmiştir.

İnsan büyüme hormonunu kodlayan hGH geni ilk kez 1979 yılında başarılı olarak klonlanmıştır (Goeddel *et al.* 1979). Bu çalışmada başlama kodonunu gösteren metiyonin ve genin ilk 23 amino asitini kodlayan DNA parçasının kimyasal olarak sentezlenmesi, bunun 24-191 amino asitlerini kodlayan enzimatik olarak hazırlanmış cDNA parçasıyla birleştirilmesi sonucu hGH'nu kodlayan hibrit gen elde edilmiştir. Hibrit gen *E. coli*'de *lac* promoteri kontrolünde ekspres edilmiştir. Sonuçta N-ucunda başlama kodonunu içeren ve 191 amino asitten oluşan doğal hGH ile aynı immünolojik özelliklere sahip bir polipeptit (fMet-hGH) üretilmiştir.

Ikehara *et al.* (1984) *E. coli*'de çok kullanılan amino asit kodonlarını kullanarak metiyonin ve 191 amino asitten oluşan hGH'nu kodlayan geni kimyasal olarak sentezlemişler ve *E. coli* triptofan (*trp*) promoterinin kontrolünde *E. coli*'de ekspres etmişlerdir. Başlangıç kodonunun önünde 9 baz içeren pGH-L9 plasmidiyle en verimli met-hGH elde edilmiştir. Radioimmunoassay (RIA) analizi sonucunda met-hGH derişimi 169mg/L veya $2.9 \cdot 10^6$ molekül/hücre olarak ölçülmüştür. Sonuç olarak, biyolojik aktivite ve immünolojik özellikler açısından doğal hGH ile aynı özelliklere sahip rekombinant hGH elde edilmiştir.

Gray *et al.* (1985) iki sinyal peptit kullanarak oluşturdukları iki plasmidi *E. coli*'de hGH üretimi ve periplazmik boşluğa salgılanma açısından karşılaştırmışlardır. Bunun için doğal sinyal peptit taşıyan hGH geni *E. coli trp* promoterinin kontrolünde; *E. coli* fosfotaz sinyal peptidi birleştirilmiş hGH geni ise alkali fosfotaz (*phoA*) promoteri kontrolünde ekspresleri sonucunda sırasıyla pPrehGH207-2 ve pAPH-1 plasmidleri elde edilmiştir. Osmotik şok uygulanarak her iki ekspresyon sonucunda hGH'nin *E.*

coli periplazmik boşluğuna salgılanabildiği gösterilmiştir. Buna göre pPrehGH207-2 ve pAPH-1 plasmidleri kullanılarak üretilen hGH'nin sırasıyla %76 ve %82'si periplazmik boşluğa salgılanmıştır. rnlerin N-ucu dizini belirlenerek her ikisinin de aynı yapıda oldukları ve doğal hGH gibi iki disülfit bağı içerdikleri belirtilmiştir. Bu sonuçlar periplazmik olarak üretilen ürünün doğal konformasyonunda oluşması ve doğru disülfit bağlarını oluşturması için yeniden katlanıp kıvrılmasına gerek kalmadığını göstermiştir.

Becker and Hsiung (1986) ile Becker *et al.* (1986)'da rekombinant hGH'nin *E. coli*'de periplazmik olarak üretimini araştırmışlardır. Bunun için *E. coli* OmpA sinyal peptit dizinini hGH mature peptit dizini ile birleştirerek *E.coli lpp^p-lac^{po}* promoteri kontrolünde ekspres etmişlerdir. Ekspresyon sonunda periplazmik boşluğa 10-15 g hGH salgılanmıştır. *E. coli*'de üretilen toplam hGH'nin %78'i periplazmik boşluğa salgılanmıştır. Bunun % 72'lik kısmı mature hGH ile aynı, %6'lık kısmı ise mature hGH'den düşük molekül ağırlığına sahiptir. Saflaştırılmış olan rekombinant hGH'nin SDS-PAGE analizi, N-ucu analizi ile doğru olarak katlandığı, doğru disülfit bağları oluşturduğu ve doğal hGH ile aynı N-ucu dizinine sahip olduğu gösterilmiştir. Böylece hGH'nin sitoplazmik üretimi ile ortaya çıkan yanlış katlanma, N-ucunda metiyonin içerme, çözünmezlik gibi problemler periplazmik üretim ile giderilmiştir.

Chang *et al.* (1987)'da *E. coli*'de hGH'nin sentezi için *E. coli* heat-stable enterotoxin II (STII) sinyal peptit dizinini mature hGH dizini ile birleştirerek elde edilen hibrit geni *E.coli* alkali fosfataz (*phoA*) promoterinin kontrolü altında ekspres etmişlerdir. phGH4L ve phGH4R şeklinde sadece ekspresyonda DNA yönelimleri farklı iki plasmid oluşturmuşlardır. Bu plasmidler hGH üretimi açısından karşılaştırıldığında phGH4L içeren *E. coli* ile daha verimli üretim gerçekleştirilmiştir. Ortamdaki fosfat derişiminin üretime etkisi incelenmiş ve hGH miktarı düşük fosfat derişimli ortamda 15-20 g/ml/A₅₅₀ hücre olarak llmştr. Bu değer hücre proteinlerinin %6-10'nu oluşturmaktadır. Periplazmik olarak üretilen hGH'nin doğalıyla aynı yapıda olduğu belirlenmiştir.

Kato *et al.* (1987) periplazmik boşluğa salgılanabilme özelliğine sahip *E. coli* hücrelerinin hGH'nu doğrudan olarak kültür ortamına salgılayabilmesi için alkalofilik

Bacillus sp. penisilinaz promoter, sinyal peptit bölgesi, pMB9 plasmidinden kil geni ve hGH genini taşıyan bir plasmid geliştirmişlerdir. Geliştirilen plasmid *E. coli*'ye transfer edilmiştir. Plasmidin *E. coli*'de ekspresyonu sonunda elde edilen hGH, penisilinaz sinyal dizini yardımıyla önce *E. coli* iç-membranından geçerek ve sonra da kil geninin kodladığı protein tarafından geçirgen hale getirilen dış-membranı geçerek üretim ortamına salgılanmıştır. kil geni içeren p8hGH1 ve içermeyen pPSHhGH11 plasmidleri üretim şekli açısından karşılaştırılmıştır. Buna göre pPSHhGH11 plasmidi taşıyan *E. coli* ile üretimde toplam hGH'nin %80'i (6.7mg hGH/ml kültür) periplazmik boşluğa salgılanmıştır. p8hGH1 plasmidi taşıyan *E. coli* ile üretimde ise toplam hGH'nin %55' (11.2mg hGH/ml kültür) kültür ortamına, %42'i (8.6mg hGH/ml kültür) ise periplazmik boşluğa salgılanmıştır. Üretilmiş olan hGH'nin belirlenmesinde SDS-PAGE ve Immunoblot analizleri kullanılmıştır. Üretilen hücre dışı hGH biyolojik aktivite ve N-ucu amino asit dizini belirlenmesi sonucunda doğal hGH ile uyumlu olduğu görülmüştür.

Nakayama *et al.* (1988)'da *Bacillus amiloliquefaciens* nötral proteaz genini ve mature hGH genini içeren bir plasmid geliştirmişlerdir. Bu plasmid *Bacillus subtilis* konak hücresine aktarılarak hGH üretme potansiyeli ölçülmüştür. Elde edilen rekombinant plasmid ile nötral proteaz terminator (sonlandırıcı) içermeyen plasmidin üretimleri karşılaştırılmıştır. Sonuçta nötral proteaz terminatorunu içeren pHGH526 plasmidi ile 10 kat daha fazla hGH üretilmiştir. Kesikli fermentasyon ile 6mg hGH /L, yüksek hücre yoğunluğu içeren yarı-kesikli fermentasyonla ise 40mg hGH /L üretilmiştir. Sonuçta biyolojik olarak aktif ve doğalıyla aynı yapıda hGH verimli olarak üretilmiştir.

Hsiung *et al.* (1989)'da *E. coli*'de hGH'nin kültür ortamına salgılanmasını araştırmışlardır. Bunun için *E. coli* pOmpA sinyal dizini ve hGH geni içeren pOmpA-hGH2 plasmidi ile bakteriocin released protein (BRP) geni içeren pJL3 plasmidini *E. coli* hücresine transfer etmişler. Her iki plasmitte de *lpp-lac* promoter-operon sistemi bulunmaktadır. *E. coli* dış-membranının geçirgenliğini arttıran BRP proteini sayesinde IPTG ile indüklenmiş koşullarda kültür ortamına salgılanan hGH 4.5µg/ml/A₅₅₀ hücre'dir. Oysaki aynı koşullarda sadece pOmpA-hGH2 plasmidiyle *E. coli*'de periplazmik olarak üretilen rekombinant hGH miktarı ise 10-15µg/ml/A₆₀₀'dür

(Hsiung *et al.* 1986). BRP indüklemesi ve hGH geçişi için optimum IPTG derişimi 20 μ M olarak belirlenmiştir. IPTG indüklemesinin olmadığı zengin kültür ortamında hücre çoğalması olmuştur fakat kültür ortamına hGH salgılanmamıştır. Büyük ölçek kültürlemelerde üretim ortamına 69.6mg hGH/L salgılanmıştır. Tek basamak saflaştırma işlemiyle %98 saflıkta salgılanmış hGH elde edilmiştir. Saflaştırılmış olan hGH'nin N-ucundaki amino asit dizinimi doğal hGH ile aynıdır.

Yamakawa *et al.* (1989) *E. coli*'de hGH üretimine gen miktarının etkisini araştırmışlardır. Bunun için birbiri ardına dizilmiş bir, iki ve dört tane hGH genini ve *tac* promoterını taşıyan sırasıyla pKK::*hGH*, pKK::*hGH*::*hGH*, pKK::*4(hGH)* ekspresyon vektörlerini geliştirerek bunların *E. coli*'de çeşitli kültür koşullarında hGH üretim verimlerini karşılaştırmışlardır. Maksimum üretilen hGH plasmid pKK::*4(hGH)* içeren *E.coli* ile toplam hücre proteinlerinin % 11.1 olarak ölçülmüştür. Kısıtlı sentetik kültür ortamında, vektördeki gen sayısı ile üretilen hGH miktarı arasında orantılı bir ilişki gözlenirken, zengin kültür ortamında bu ilişki gözlenmemiştir. Zengin kültür ortamında pKK::*hGH* plasmidi ile daha verimli üretim gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak kısıtlı kültür koşullarında ardışık dizilmiş gen sayısının artırılmasıyla yüksek seviyede protein ekspresyonunun elde edilebileceğini göstermiştir.

Jensen and Carlsen (1990) 3-4 amino asitlik farklı N-ucu uzantılarına sahip hGH'nun *E. coli*'de sitoplazmik ekspresyonunu ve glukoz, asetat ve tuzların bunlara fizyolojik etkilerini incelemişlerdir. N-ucunda bulunan bu kısımlar, doğal ile aynı hGH elde etmek amacıyla hücre dışında proteolitik kesim için kullanılmıştır. Bu amino asit uzantılarındaki küçük değişiklikler ekspresyon hızlarını 3 kat değiştirmektedir. Bu hGH'ların spesifik ekspresyon hızları plasmid içeren ve içermeyen hücrelerin spesifik çoğalma hızlarının birbirine oranı (μ^+/μ^-) ile ters orantılıdır. N-ucu uzantılarından %85 kararlıkta olan met-ala-glu-hGH (MAE-hGH) seçilmiştir. Ortam bileşimi ve çoğalma koşulları çalışmaları sonucunda kompleks ortamın kullanıldığı glukoz açısından yarı kesikli fermentasyon ile 2000mg/l MAE-hGH elde edilmiştir. Fermentasyon prosesi, glukoz-kısıtlı çoğalma fazı ve bunu takip eden artmış glukoz beslemeli ikinci fazdan oluşmuştur. İkinci faz MAE-hGH 'nun üretildiği fazdır, bu fazda hücre oluşumu durmuştur. Glukozun yüksek derişimleri MAE-hGH ekspresyonunu azaltmıştır. Glukoz

açısından kesikli fermentasyondaki MAE-hGH'nin verimi yarı-kesikli fermentasyondakinin %30'dur. Glukoz kesikli fermentasyonda ekspresyon verimindeki azalmanın, asetik asitin inhibe edici etkisinin sonucu olduğu ispatlanmıştır. Bu inhibe edici etki, pH kontrolü için kullanılan asit ve bazın artan tüketiminin neden olduğu tuz etkisi ile artmıştır. Gerçekleştirilmiş olan kemostat deneyleri, glukoz konsantrasyonunun yüksek verimde MAE-hGH elde etmek için kritik olmadığını göstermiştir. Sonuç olarak, *E.coli* ile heterojen proteinlerin üretiminde glukoz açısından yarı-kesikli proseslerin kesikli proseslere göre daha üstün olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

E. coli'de çok kullanılan sinyal dizinleri (Ikahara *et al.* 1984, Gray *et al.* 1985, Becker and Hsiung 1986) ve *Bacillus* sinyal dizinleri (Breitling *et al.* 1989) kullanarak gerçekleştirilen çalışmalar neticesinde doğal, çözülebilir ve biyolojik olarak aktif insan proteinlerinin hücre dışı üretiminin önemli olduğu görülmüştür. Bu nedenle hücre dışı üretim özelliğine sahip *Bacillus* mikroorganizmalarının konak hücre olarak kullanıldığı çalışmalar hız kazanmıştır.

Franchi *et al.* (1991) değişik hGH polipeptit dizinleri tasarlayarak doğayla aynı formda, kolay saflaştırılabilen, yüksek çözünürlükte hGH'nin verimli olarak üretilmesini amaçlamışlardır. Bu amaç doğrultusunda 191 amino asitten oluşan hGH dizinine ek olarak N-ucuna hGH'nin hücre proteinlerinden ve spesifik proteaz Faktör Xa'yı gösteren Ile-Glu-Gly-Arg (IEGR)'den kolayca saflaştırılmasının sağlayacak farklı hGH precursor dizinlerini tasarlamışlardır. Bunları *Bacillus subtilis*'e ekspres ederek elde edilen ürünleri çözünürlükleri ve saflaştırma kolaylıkları açısından karşılaştırmışlardır. Metiyonin ve IEGR tetrapeptiti arasındaki dizin her uzantıya göre spesifiktir. Bu durum yüklü amino asitler nedeniyle moleküllere farklı özellikler kazandırmıştır. Uzun homopolimerik kuyruk içeren uzantıların çözünmez, kısa kuyruk içeren uzantıların ise met-hGH'ye göre çözünürlüklerinin arttığı belirlenmiştir. Kısa kuyruklu uzantıların bir diğer üstünlüğü de hormonun pI'sını değiştirmesi nedeniyle saflaştırmanın daha kolay ve verimli yapılabilmesidir. Saflaştırma işleminden sonra uzantılar IEGR tetrapeptinin arginin amino asidinden kesme yapan proteaz Faktör Xa enzimi ile muamele edilerek doğayla aynı formda hGH elde edilmiştir. Protein analizi SDS-PAGE ve Western Blott yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Saflaştırma yönteminin

basitliği, Faktör Xa'nın spesifikliği ve yüksek verimde doğal hGH elde edilmesi nedeniyle bu prosesin önemi artmıştır.

Kajino *et al.* (1997) yüksek verimle heterojen protein üretme ve çok düşük hücre dışı proteaz aktivitesine sahip olan *Bacillus brevis* hücreleri ile doğallıyla aynı yapıda, biyolojik olarak aktif hGH'nin hücre dışı üretimini araştırmışlardır. Salgılanan proteazın hGH üretim verimini düşürmesini önlemek için proteazı ekspres eden mutantlar kullanmışlar ve ortama proteaz inhibitörleri ilave etmişlerdir. Hücre çoğalması ve hGH verimini inhibe etmeyen EDTA(proteaz inhibitörü) değeri belirlenmiştir. Sinyal peptid modifikasyonu ile hGH üretimini arttırmaya çalışmışlardır. Buna göre sinyal peptidin amino uç bölgesinin bazikliğinin, orta bölgesinin de hidrofobikliğinin artmasıyla hGH üretiminin 12 kat(148mg/l'ye) arttı belirlenmiştir. Üretim ortamı optimizasyonu ile hGH üretimi 240mg/l'ye yükselmiştir. Sonuçta biyolojik olarak aktif ve doğallıyla aynı formda hücre dışı hGH verimli olarak üretilmiştir.

Shin *et al.* (1998a)'de rekombinant *E. coli* ile yarı-kesikli kültürlerde yüksek hücre derişimlerinde rekombinant proteinlerin (hGH ve insan glukagonu) sentezini araştırmışlardır. Glukoz kısıtlı çoğalma yan ürün oluşmadan gerçekteşmiştir. Bundan dolayı çoğalma ve rekombinant protein sentezi esnasında hücre ortamının değişmediği varsayılmıştır. İki fazlı yarı-kesikli işletimdeki sürekli:dinamik besleme ve spesifik çoğalma hızları istenilen değerlerde kontrol edilmiştir. Spesifik çoğalma hızı ve *E. coli* türlerinden verimli rekombinant ürün oluşumu arasındaki korelasyonların karşılaştırılması için yarı-kesikli işletimin kullanımı uygundur. Granül protein olarak iki rekombinant protein ekspres edilmiştir, yüksek hücre çoğalma hızında yarı-kesikli kültürlerdeki derişimleri 15g granül büyüme hormonu l⁻¹ ve 7g granül glukagon l⁻¹'ye artmıştır. Yarı-kesikli fermentasyonda hGH üretim fazında asetat oluşmamıştır.

Shin *et al.* (1998b)'de saflaştırılması kolay, çözülebilen, yüksek verimde hGH üretimi için yeni bir granül protein sistemi geliştirmişlerdir. Human tumor necrosis factor-alpha (hTNF- α)'nın N-ucu beş amino asiti, on histidin amino asiti ve enterokinaz kesme konumu (Asp- Asp- Asp- Asp-Lys)'dan oluşan partneri kullanarak, hGH'nu granül protein olarak *E. coli*'de üretmişlerdir. Gen ekspresyonu T7 promoterının kontrolünde

gerçekleştirilmiştir. Gen ekspresyonunun başında çözülebilir bir protein olarak üretilen granül protein, ilerledikçe *E. coli* sitoplazmasında çözülemez olmuştur. Ancak basit alkali pH değişimi ile çözülebilir hale getirilen granül protein, afinite kromatografi ile saflaştırılmıştır. Yüksek hücre yoğunluklu yarı-kesikli fermentasyonda hücre çoğalması ve hGH üretimi farklı fazlarda gerçekleşmiştir. Fermentasyon süresince maksimum hücre derişimi 90g/l, maksimum granül protein derişimi 9g/l olarak ölçülmüş ve asetat oluşumu gözlenmemiştir. Kolaylığı, hızı ve yüksek verimliliğinden dolayı bu rekombinant proses, hGH'nun büyük ölçek üretimine uygulanabilir.

Byund *et al.* (2000)'de aerobik yarı-kesikli fermentasyon ile *E. coli*'de rekombinant hGH üretimini araştırmışlardır. Bu doğrultuda amaç rekombinant hGH'nin yarı-kesikli fermentasyon sırasında üretim ve protein degradasyon modelini belirlemek ve ölçek büyütmenin bu modeli değiştirip değiştirmediğini, glukozun yarı kesikli beslenmesiyle oluşan gradyenlerin, ölçeklendirme sırasında ürün kalitesinde meydana gelen değişikliğin nedeni olup olmayacağını belirlemektir. Laboratory bench-scale, scale-down (SDR) ve industrial pilot-scale (3m³) reaktörlerde üretim verimi ve kalitesi, hücre verimi, karışık asit fermentasyonu, glukoz derişimi, hücre lizizi incelenmiş ve karşılaştırılmıştır. Glukozun tek olarak değil de oksijen kısıtlaması ile kritik parametre teşkil ettiği, formik asitin asetik asite göre baskın olduğu yan ürün oluşum modeli ile kanıtlanmıştır. Asetik asit ve formik asit oluşumu bütün kültürlemelerde farklı hız ve zamanlarda gözlenmiştir. Ürün kalitesi ve miktarı hariç bütün parametreler için üretim modeli, SDR reaktörde benzer olarak yapılabilmüş ve %80 yüksek toplam verim elde edilmiştir.

Caston *et al.* (2002)'de oksijence zenginleştirilmiş fermentasyonun hücre derişimi ve hGH üretimi üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Bu doğrultuda sadece hücre çoğalması ve sadece rekombinant hGH üretiminin incelendiği iki yarı-kesikli fermentasyon gerçekleştirmişlerdir. Hücre çoğalması prosesinde; üstel çoğalma fazı uzun sürmektedir, ortamdaki oksijen derişiminin artmasıyla $Y_{O/S}$ artmış ve yaşam katsayısı yükselmiştir. Formik asit ve asetik asit oluşumu ise oksijen derişimi artırılıncaya kadar çok düşüktür sonra ise sırasıyla 0.35g/l ve 0.43g/l'ye artmışlardır. Hücre derişimi oksijence zenginleştirme ile hızlı olarak artmış ve prosesin sonunda

aniden düşmüştür. Dolayısıyla üretim ortamına salgılanan formik asit ve asetik asit derişimindeki artma hücre lizizindeki artmadan kaynaklandığı düşünölmüştür. Rekombinant hGH üretim prosesinde; glukoz besleme hızı ve üretim ortam derişimi iki katına çıkarılmıştır. Oksijence zenginleştirme ile formik asit oluşumu 1g/l'ye artmıştır. Proses sonunda 37au r-hGH üretilmiştir.

Tabandeh *et al.* (2004)'de ısı indükleme yöntemini kullanılarak *E. coli*'de hGH ekspresyonu ile farklı karbon kaynakları ve üretim ortamı bileşimlerinde hGH üretimini araştırmışlardır. Sonuçta pH-stat beslemeli yarı-kesikli fermentasyonda tanımlı ve kompleks ortam için hücre derişimleri sırasıyla 25 ve 60g/l olarak ölçölmüştür. Kompleks üretim ortamının kullanıldığı yarı-kesikli fermentasyon ile 2g/l rekombinant hGH üretilmiştir. Kompleks ortam içeren sürekli beslemeli yarı-kesikli fermentasyon karbon kaynağının hGH üretimine etkisi incelenmiştir. Karbon kaynağı olarak glukoz yerine gliserol kullanıldığında hücre derişimi 100g/l'ye ve hGH derişimi de 2.7g/l'ye artmış, yan-ürün olan asetik asit oluşumu azalmıştır.

hGH üretimi ile ilgili süreli yayın literatüründe üretim ortamındaki bileşenlerin etkisinin incelendiğı *Bacillus* türleri ile ilgili bir çalışma olmadığı halde, *E. coli* (Tabandeh *et al.* 2004) ile ilgili çalışmada uygun karbon kaynağı belirlenmiştir. hGH üretimi ile ilgili çalışmalarda pH ve sıcaklık etkisi araştırılmadan çalışılmıştır. Karıştırmalı biyoreaktörlerde oksijen aktarımı karıştırma hızı ve oksijen/hava giriş hızının bir fonksiyonu olup önemli biyoreaktör işletim parametrelerindedir. Çizelge 2.13'de belirtilen çalışmalarda hava giriş hızı ve karıştırma hızının etkisini incelenmeden çalışmışlardır.

Çizelge 2.11.a Rekombinant hGH üretimi ile ilgili kaynaklar: Konak-mikroorganizma: *E. coli*, rekombinant plasmid ve özellikleri, hGH üretim tipi ve ölçüm metodu

Mikroorganizma	Başlatıcı (Promoter)	Sinyal-peptid:	Geliştirilen Plasmid (ler)	hGH üretim tipi	C _{hGH} ölçüm metodu	Sonuçlar	Kaynak
<i>E. coli</i> 294	<i>lac</i>	-	pHGH107	sitoplazmik	RIA	Genentech'te geliştirilen plasmid pHGH107 kullanılarak C _{hGH} =1.0 mg/L hGH üretilmiştir.	Goeddel vd. 1979
<i>E. coli</i>	<i>trp</i>	-	pGH-L9 pGH-L11 pGH-L13	sitoplazmik	RIA	Maksimum hGH üretimi pGH-L9 plasmidi ile C _{hGH} =169 mg/L elde edilmiştir.	İkehara vd. 1984
<i>E. coli</i> 294	<i>trp</i> <i>phoA</i>	pre-hGH pho-hGH	pPreHGH207-2 pAPH-1	periplazmik	RIA	pAPH-1 plasmidi ile 230ng/ml/A ₅₅₀ Met-hGH üretilmiştir. Üretilen hGH'un biyolojik aktivite ve immünojenik özellikler açısından doğal hGH ile aynı özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir.	Gray vd. 1985
<i>E. coli</i> K12RV308 (<i>su</i> , <i>ΔlacX74</i> , <i>galISII::OP308</i> , <i>rpsL</i>)	<i>Lpp-lac</i>	OmpA	pOmpA-hGH2	periplazmik	RIA/ELİSA	Eli Lilly'de geliştirilen plasmid pOmpA-hGH2 ile 10-15 µg hGH/A ₆₀₀ =1.6 hücre verimle hGH periplazmik olarak üretilmiştir. <i>E. coli</i> 'de üretilen toplam hGH'nin %72'i periplazmik boşluğa salgılanmış ve doğal hGH ile aynıdır.	Becker ve Hsuung 1986; Hsiung vd. 1986
<i>E. coli</i> W3110 (<i>tonA</i> ; ATCC27325)	<i>phoA</i>	STII	phGH4R phGH4L	periplazmik	RIA	Genentech 'de tasarlanan plasmidlerden phGH4L ile daha yüksek verimde hGH üretilmiştir. Toplam hGH'nin (15.4µg /ml/A ₅₅₀) %90'ı periplazmik olarak üretilmiştir.	Chang vd. 1987
<i>E. coli</i> HB101 (<i>F proA2 leuB thi lacY1 hsdR hsdM ala-14 galK2 xyl-5 mtl-1 supE44 endA recA13 rpsL20</i>)	<i>Ex-K</i> (penisilinaz promotörü ve <i>kil</i> geni) <i>Ex</i>	<i>Bacillus</i> penisilinaz <i>Bacillus</i> penisilinaz	p8hGH1 pPShGH11	Hücre-dışı Periplazmik	RIA	<i>kil</i> geni içeren plasmid p8hGH1 ile geçirgenliği artırmış ve hGH'nin %55'i (11.2 mg/L) hücre dışı, %42'si (8.6 mg/L) periplazmik olarak üretilmiştir. <i>kil</i> geni içermeyen plasmid pPShGH11 ile ise hGH'nin %80'ni (6.7 mg/l) periplazmik olarak üretilmiştir.	Kato vd. 1987
<i>E. coli</i> K12RV308 (<i>su</i> , <i>ΔlacX74</i> , <i>galISII::OP308</i> , <i>rpsL</i>)	<i>Lpp^p-lac^{po}</i> <i>Lpp^p-lac^{po}</i>	OmpA -	pOmpA-hGH2 pJL3	Hücre-dışı	RIA/ELİSA	Eli Lilly'de pOmpA-hGH2 ve pJL3 plasmidlerini içeren <i>E. coli</i> ile 4.5 µg hGH/ml/A ₅₅₀ =0.4 hücre-dışı olarak üretilmiştir.	Hsuung vd. 1989
<i>E. coli</i> K-12 JM109 (<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>GyrA96</i> , <i>thi</i> , <i>tsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , (<i>lac-pro</i>), <i>F (traD36, probAB, lacI, lacZ M15)</i>)	<i>tac</i>	hGH	pKK::hGH pKK::hGH::hGH pKK::4(hGH)	periplazmik	Western Blott	Rekombinant pKK::hGH, pKK::hGH::hGH, pKK::4(hGH) ile üretilen hGH <i>E. coli</i> proteinlerinin sırasıyla %1.8, %4.4 ve %11.1'ni oluşturmuştur.	Yamakawa vd. 1989
<i>E. coli</i> B21(DE3) (<i>F. ompT rB^{mB}</i>)	T7	-	pT2GH (<i>amp^r, Cht^r, hGH^r</i>)	sitoplazmik	Western Blott	Plasmidi pT2GH kullanılarak üretilen hGH hücre proteininin %30'dur.	Shin vd. 1998b
<i>E. coli</i> A6-5	T7 λP _L (<i>kan^r</i> , T7 RNA polimeraz ^r)	-	pET21- <i>hgh</i> pGP1-2	sitoplazmik	ELISA	İki-plasmid sistemi kullanılarak, ısı-İndükleme ile üretilen hGH'nin üretim koşullarını araştırmışlardır. hGH toplam hücre proteininin %20'ni oluşturmuştur.	Tabandeh vd. 2004

Çizelge 2.11.b Rekombinant hGH üretimi ile ilgili kaynaklar: Konak-mikroorganizma: *Bacillus* , rekombinant plasmid ve özellikleri, hGH üretim tipi ve ölçüm metodu

Mikroorganizma	Başlatıcı (Promoter)	Sinyal-peptid:	Geliştirilen Plasmid (ler)	hGH üretim tipi	C _{hGH} ölçüm metodu	Sonuçlar	Kaynak
<i>B. subtilis</i> MT500 (<i>apr npr sacQ(BamF)</i>)	pNPA84 pNPA84	pNPA84 pNPA84	phGH526 phGH324	Hücre-dışı	Western Blott	Nötral proteaz sonlandırıcı içeren plasmid phGH526 ile hGH üretimi 10-kat artmıştır (C _{hGH} = 40mg/L).	Nakayama vd. 1988
<i>B. subtilis</i> SMS118 (<i>leu, PyrDI, npr, spr</i>)	-	pSM212	pSM215 (alternatif aa uçlar: MRRRRRIILM-IEGR MRR-IEGR MEELM-IEGR)	sitoplazmik	Western Blott	Uzun peptid uçların çözünmez, kısa uçların ise Met-hGH'ye göre çözünürlüğünün fazla olduğu belirlenerek, kısa uçların proteinin pl'sını değiştirerek saflaştırmayı kolaylaştırdığı bildirilmiştir.	Franchi vd. 1991
<i>B. brevis</i> HPD31	pNU211hGH	MWP L4 R2L4 L15	pNU211hGH pNU211L4hGH pNU211R2L4hGH pNU211L15hGH	Hücre-dışı	Western Blott	R2L4 sinyal dizini hGH'yi üretim ortamına salgılamada en etkin bulunmuş, R2L4 sinyal dizini ile hGH üretimi 12-kat (C _{hGH} = 148 mg/L) artmıştır. Ortam optimizasyonu ile hGH üretimi 240mg/L'ye artırılmıştır.	Kajino vd. 1997

Çizelge 2.12 hGH üretimiyle ilgili kaynaklar : Üretim ortamı bileşenleri ve ölçülen parametreler

Mikroorganizma	Araştırılan etki				Ortam	Ölçümler						Kaynaklar
	C	N	P	YE		C _x	C _{hGH}	C _{AA}	C _{OA}	C _{Ac}	C _{FA}	
<i>r-E. coli</i> 294	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	Goeddel vd 1979
<i>r-E. coli</i> HB101	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	İkehara vd 1984
<i>r-E. coli</i> 294	-	-	-	-	Kompleks	-	+	-	-	-	-	Gray vd 1985
<i>r-E. coli</i> K-12RV308	-	-	-	-	Kompleks	-	+	-	-	-	-	Becker ve Hsiung 1986
<i>r-E. coli</i> W3110	-	-	-	-	Kompleks	-	+	-	-	-	-	Chang vd 1987
<i>r-E. coli</i> HB101	-	-	-	-	Kompleks	-	+	-	-	-	-	Kato vd 1987
<i>r-E. coli</i> K-12RV308	-	-	-	-	Kompleks	-	+	-	-	-	-	Hsiung vd 1989
<i>r-E. coli</i> K-12 JM109	-	-	-	-	Kompleks	-	+	-	-	-	-	Yamakawa vd 1989
<i>r-E. coli</i> MC1061	+	-	-	-	Kompleks	+	+	-	-	+	-	Jensen ve Carlsen 1990
<i>r-E. coli</i> BL21(DE3)	-	-	-	-	Kompleks	+	+	-	-	+	-	Shin vd 1998a
<i>r-E. coli</i> BL21(DE3)	-	-	-	-	Kompleks	+	+	-	-	+	-	Shin vd 1998b
<i>r-E. coli</i> K-12 W3110	-	-	-	-	Tanımlı	+	+	-	-	+	+	Byund vd 2000
<i>r-E. coli</i> W3110	-	-	-	-	Tanımlı	+	+	-	-	+	+	Caston vd 2002
<i>r-E. coli</i> A6-5	+	-	-	-	Kompleks	+	+	-	-	+	-	Tabandeh vd 2004
<i>r-B subtilis</i> MT500	-	-	-	-	Kompleks	+	+	-	-	-	-	Nakayama vd 1988
<i>r-B. subtilis</i> SMS118	-	-	-	-	Kompleks	-	+	-	-	-	-	Franchi vd 1991
<i>r-B. brevis</i> HPD31	-	-	-	-	Kompleks	-	+	-	-	-	-	Kajino vd 1997

Çizelge 2.13.a hGH üretimi ile ilgili kaynak araştırması; Biyoreaktör işletim parametreleri: rekombinant *E. coli*

Mikroorganizma	Biyoreaktör İşletim Koşulları							Besleme türü	Üretim ortamı: Karbon kaynağı	Sonuçlar					Kaynak
	Biyoreaktör / İşletim türü	T °C	pH	V _R dm ³	N dk ⁻¹	Q ₀ /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; G	sitoplazmik	ELISA	0.4	30	10	Jensen ve 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	G-besleme stratejisi				2.0	40	0	
<i>E. coli</i> BL21(DE3) (<i>F</i> , <i>ompT rBmB</i>)	Yarı-kesikli	37	6.75	-	-	-	40	Sürekli: dinamik	Kompleks; G	sitoplazmik	SDS-PAGE	15 ^a	70	0	Shin vd. 1998a
<i>E. coli</i> BL21(DE3) (<i>F</i> , <i>ompT rBmB</i>)	Yarı-kesikli	37	6.75	-	-	-	40	pH-stat	Kompleks; G	sitoplazmik: Western Blott	SDS-PAGE	9 ^a	90	0	Shin vd. 1998b
<i>E. coli</i> W3110	Kesikli	30	7.0	-	205	1.4	-	sürekli	Kompleks; G	sitoplazmik	HPLC	64.6	90	0	Byund vd. 2000
	Yarı-kesikli			-								1000	75.8	80	
<i>E. coli</i> K-12 W3110	Yarı-kesikli: Hücre üretimi	37	7.0	4	≤1000	1	20	Sürekli	Tanımlanmış; G	sitoplazmik	HPLC	-	75	0.5	Caston vd. 2002
	Yarı-kesikli: r-hGH üretimi	37	7.0	6	≤1000	1	20	Sürekli				37au ^b	-	0.7	
<i>E. coli</i> A6-5	Yarı-kesikli	-37	7.0	-	400-900	1	40	pH-stat	Tanımlanmış; G	sitoplazmik	SDS-PAGE	-	25	-	Tabandeh vd. 2004
								pH-stat	Kompleks; G			2	60	2	
								Sürekli: dinamik	Kompleks; gliserol			2.7	100	1	

Çizelge 2.13.b hGH üretimi ile ilgili kaynak araştırması; Biyoreaktör işletim parametreleri: rekombinant *Bacillus*

Mikroorganizma	Biyoreaktör İşletim Koşulları							Besleme türü	Üretim ortamı: Karbon kaynağı	Sonuçlar					Kaynak
	Biyoreaktör / İşletim türü	T °C	pH	V _R dm ³	N dk ⁻¹	Q ₀ /V vvm	DO %			hGH üretim tipi	hGH ölçüm metodu	C _{hGH} g/L	C _X g/L	C _A g/L	
B subtilis MT500 (apr npr sacQ(BamF) spoOA)	Kesikli	30	6.0-7.0	1	-	-	0-70	-	Tanımlanmış; G	hücre dışı	Western Blott	0.006	-	-	Nakayama vd. 198 8
	Yarı-kesikli	30	6.5-7	4	-	-	0-10	-				0.04	35	-	

c: kontrollü

A_C: Asetik asit

^a: füzyon hGH

^b: Hücre başına ürün (au)

G: Glukoz

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Mikroorganizmalar

Aşağıda tür adları ve numaraları verilen mikroorganizmalar United States Department of Agriculture Northern Regional Research Laboratory (NRRL, ABD), American Type Culture Collection (ATCC, ABD), Deutsche Sammlung Von 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).

Çizelge 3.1 Araştırmada kullanılmış olan mikroorganizma ve plasmidler

Mikroorganizma	Kaynak/Referans
<i>E.coli</i> XL1Blue	ATCC 31538, Bullock <i>et al.</i> (1987)
<i>B. licheniformis</i>	DSM 1969
<i>B. subtilis</i>	
1A751	BGSC
1A179	BGSC
Plasmid	Kaynak/Referans
pHGH107	Goeddel <i>et al.</i> (1979)
pUC19	Yanisch-Peron <i>et al.</i> (1985)
pMK4	Brücknet <i>et al.</i> 1992
- <i>pre(subC)::hGH::pUC19</i>	Bu çalışmada
- <i>pre(subC)::hGH::pMK4</i>	Bu çalışmada

Mikroorganizmalar, % 0.5 pepton, %1.5 soytripton, 0.001 kg/m³ MnSO₄.2H₂O bileşimindeki -su içinde hazırlanan ve 121°C ve 1.2 atm'de doygun 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:

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

Yukarıdaki gibi 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 aktararak -20°C 'da saklanmıştır.

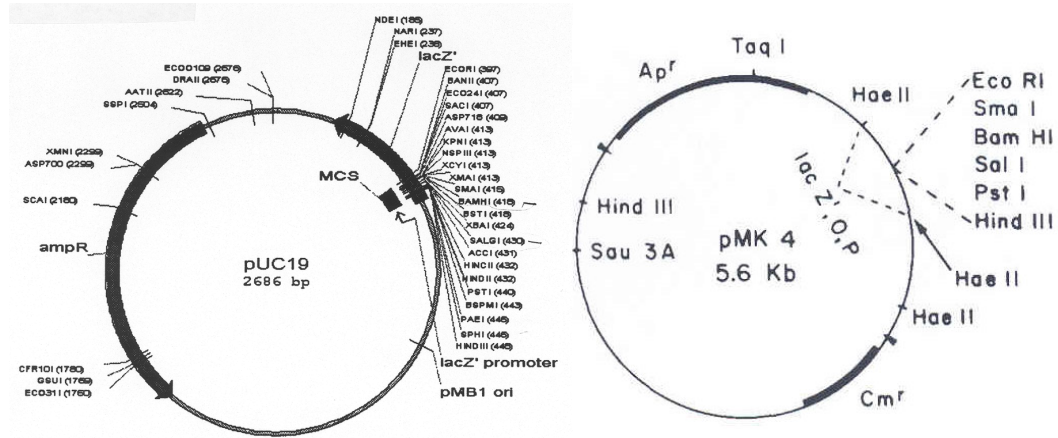
3.2 Rekombinant *Bacillus* Türleri Geliştirmede Kullanılan Genetik Mühendisliği Teknikleri

Bacillus türleri ile insan büyüme hormonunun (hGH) hücre dışı üretimi için biyoproses geliştirilmesinin amaçlandığından, genetik mühendisliği teknikleriyle hGH üretebilen ve ürettiği ürünü hücre dışına salgılayabilen rekombinant *Bacillus* türleri geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda hGH'nun *Bacillus* türlerinde üretilip hücre dışına aktarılabilmesi için *Bacillus* hücre dışı enzimlerinden serin alkali proteaz (SAP) geninin *-pre(subC)* dizininin *hGH* gen dizininin önüne entegre edilmesi tasarlanmıştır.

3.2.1 Kullanılan bakteriler, çoğalma ortamı ve plasmidler

- a. PCR'a dayanan SOE yönteminde tasarlanan primerler yardımıyla önce ayrı-ayrı çoğaltılacak *-pre(subC)* dizini ve hGH mature peptit dizini için kalıp DNA olarak, SAP üretme potansiyeli olan *Bacillus* türü mikroorganizmanın kromozomal DNA'sı ve *hGH* genini kodlayan cDNA'yı taşıyan plasmid DNA kullanılacaktır. Bu amaç doğrultusunda *B.licheniformis* (DSM 1969) SAP geni için kaynak ve *E.coli* XL1-Blue (ATCC 31538) hGH cDNA'sını taşıyan pHGH107 plasmidi için kaynak mikroorganizmalar olarak kullanılmıştır (Çizelge 3.1).

b. Genetik mühendisliği araştırma programında *B.licheniformis* katı ortamda 37°C'da %1 tripton, %0.5 maya özütü, %1 NaCl, %1.5 agar içeren pH=7.5 LBA ortamında; sıvı ortamda ise yukarıdaki bileşimde -agarsız- LB ortamında, *E.coli* ise bunlara ilaveten %0.01 DL-Diaminopimelik asit, %0.002 timidin ve %0.08 α-D-glukoz içeren sıvı ve katı ortamlarda 200 dk⁻¹ karıştırma hızında çoğaltılmışlardır. *E. coli* 'nin plasmidi koruyabilmesi için ortama ampisilin (50µg/ml) eklenmiştir.



Şekil 3.1 pUC19 ve pMK4 plasmidlerinin şekilleri

3.2.2 Kromozomal DNA izolasyonu

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

1. Katı ortamdan 30 ml hacimli LB ortamına (EK 1) aktarılan hücreler 30°C 'da 12 st (bir gece) çoğaltılmıştır.
2. Hücrelerin çoğaldıkları ortam 3000 g 'de 10 dk santrifüjlenmiş, sıvı alındıktan sonra hücreler 5 ml SET tamponu (EK 1) içinde tekrar süspansiyon haline getirilmiştir.
3. Son derişimi 1 mg/ml olacak şekilde ortama lizozim enzimi eklenmiş ve 37°C 'da 60 dk süreyle tepkime gerçekleştirilerek hücre duvarı parçalanmıştır.
4. 1/10 hacim oranında ortama %10 'luk SDS eklenmiş ve hemen ardından derişimi 0.5 mg/ml olacak şekilde proteinaz-K eklenmiş ve iki saat süreyle -arasıra çalkalayarak- 4°C 'da tepkime gerçekleştirilmiştir.

5. Çözelti hacminin 1/3'ü kadar 5M NaCl; sonra çözelti hacmi kadar kloroform eklenmiş ve tepkime oda sıcaklığında 30 dk süreyle karıştırılarak gerçekleştirilmiştir.
6. İki fazlı karışım 4500g 'de 15dk santrifüjlenmiş ve sulu faz Pasteur pipetiyle tüpe alınmıştır.
7. Sulu fazdaki kromozomal DNA üzerine hacmi kadar izopropanol eklenmiş; süspansiyon 4500g 'de 15dk santrifüjlenmiştir. DNA %70 'lik EtOH ile yıkanmış ve vakum altında kurutulmuştur. DNA uygun miktarda TE tamponu (EK 1) içinde çözülmüş ve -20°C 'da saklanmıştır (Posprech and Neumann 1995).

3.2.3 DNA derişiminin belirlenmesi

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

3.2.4 PCR cihazıyla gen derişimlerinin artırılması

Polimeraz zincir tepkimeleriyle (PCR) termal-döngü cihazında gen derişiminin artırılabilmesi için ilk olarak gerekli primer tasarımları yapılmıştır ve bilgisayar programı NAR ile primerlerin yapıları kontrol edilmiştir. hGH'nun hücre dışı üretimi için rekombinant *Bacillus* geliştirilmesi amacıyla hücre içinde üretilen hGH'nun hücre dışına aktarılmasını sağlayacak *Bacillus* hücre dışı enzimlerinden serin alkali proteaz geninin *-pre* dizini için iki ve *hGH* gen dizini için de iki primer tasarlanmıştır. Primerlerin tasarımında, *-pre(subC)* dizininin ileri primerlerine *XbaI*, *hGH* gen dizininin geri primerine *BamHI* restriksiyon konumları plasmide klonlanabilmesi için eklenmiştir. Tasarlanan primer dizinleri Çizelge 3.2'de verilmiştir. PCR-tepkimleri için girdi derişimleri ve PCR sistemi işletme koşulları aşağıda verilmiştir :

Çizelge 3.2 Tasarlanmış olan primer dizinleri ve işletim koşulları

Gen	Primer	Dizin	PCR İşletim Koşulları	PCR Bileşimi
<i>-pre(subC)</i>	<i>-pre(subC)</i> dizini ileri primeri	5' _GCTCTAGAGCGCAATCTCCTGTCATTCG _3'	<ul style="list-style-type: none"> • T₁=94°C, 2dk • T₁=94°C, 1dk T₂=50°C, 1dk T₃=72°C, 23s • T₃=72°C, 5dk T₄=4°C, 5dk 	10X PCR Tamponu 5µl MgCl ₂ (25mM) 4µl dNTPler (1mM) 10µl İleri Primer (FP) (10µM) 1µl Geri Primer (RP) (10µM) 1µl Template DNA 2.5µl dH ₂ O 25µl <i>pfu</i> DNA polimeraz (2.5U/µL) 1µl
	<i>-pre(subC)</i> dizini geri primeri	5' _GGTATAGTTGGGAAAGCAGAAGCGGAATCG _3'		
<i>hGH</i>	<i>hGH</i> peptit dizini ileri primeri	5' _GCTTCTGCTTTCCCAACTATAACCACTATCTC _3'	<ul style="list-style-type: none"> • T₁=94°C, 2dk • T₁=94°C, 1dk T₂=57°C, 1dk T₃=72°C, 39s • T₃=72°C, 5dk T₄=4°C, 5dk 	10X PCR Tamponu 5µl MgCl ₂ (25mM) 4µl dNTPler (1mM) 10µl İleri Primer (FP) (10µM) 1µl Geri Primer (RP) (10µM) 1µl Template DNA 2.5µl dH ₂ O 25µl <i>pfu</i> DNA polimeraz (2.5U/µL) 1µl
	<i>hGH</i> peptit dizini geri primeri	5' _GCGGATCCGCACTGGGGAGGGGTCAC _3'		
<i>-pre(subC)::hGH</i> (hibrit)	<i>-pre(subC)</i> dizini ileri primeri	5' _GCTCTAGAGCGCAATCTCCTGTCATTCG _3'	<ul style="list-style-type: none"> • T₁=94°C, 2dk • T₁=94°C, 1dk T₂=50°C, 1dk T₃=72°C, 23s • T₃=72°C, 5dk T₄=4°C, 5dk 	10X PCR Tamponu 5µl MgCl ₂ (25mM) 4µl dNTPler (1mM) 10µl İleri Primer (FP) (10µM) 1µl Geri Primer (RP) (10µM) 1µl Template DNA 2.5µl dH ₂ O 25µl <i>pfu</i> DNA polimeraz (2.5U/µL) 1µl
	<i>hGH</i> peptit dizini geri primeri	5' _GCGGATCCGCACTGGGGAGGGGTCAC _3'		

Polimeraz zincir tepkimesi (PCR) için tepkime bileşimi :

10X PCR Tamponu	5µl	
MgCl ₂ (25mM)	4µl	
dNTPler (1mM)	10µl	
İleri Primer (FP) (10µM)	1µl	} <i>ileri ve geri primer ve kalıp-DNA derişimleri</i>
Geri Primer (RP) (10µM)	1µl	
Template DNA	2.5µl	
dH ₂ O	25µl	
<i>pfu</i> DNA polimeraz (2.5U/µL)	1µl	

PCR cihazı çalışma programı:

T ₁ =94°C, 2dk	}	1 döngü
T ₁ =94°C, 1dk		
T ₂ =54°C, 1dk	}	30 döngü
T ₃ =72°C, 22s		
T ₃ =72°C, 5dk		
T ₄ =4°C, 5dk	}	1 döngü

3.2.5 Ligasyon tepkimesiyle klonlama

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

Gen (Insert) DNA	~60-200 ng
Vektör DNA	~10-60 ng
Ligasyon tamponu (ATP içeren)	2µl
T4 DNA ligaz	0.5-2U
dH ₂ O	Gen + vektör sulu çözeltisi V _R = 20 µl'ye tamamlanır.
Mikroreaktör hacmi	V _R = 20 µl

Mikroreaktör sıcaklığı	T=15°C
Kalma süresi	t= 16 st

3.2.6 DNA dizin analizi

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

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

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

CaCl₂ Yöntemi (Competent cell transformasyonu) :

1. *E.coli* LBA katı ortamında, 37°C de bir gece (~ 12 saat) çoğaltılır.
2. Katı ortamdan 5 ml hacimli LB ortamına aktarılır ve 37°C'da bir gece daha inkübe edilir.
3. LB ortamında çoğaltılan hücrelerden 1 ml alınarak 100 ml'lik yeni LB ortamına aktarılır ve 37°C sıcaklıkta 4 st 250 dk⁻¹'da üstel çoğalma fazı başına kadar tekrar çoğaltılır.
4. Çoğalan hücreler steril, soğuk 100 ml'lik santrifüj tüplerine 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 tüpünün kağıt havlu üzerinde ters çevrilerek 1 dk kurutulur.
7. Hücreler 10 ml, 0,1M CaCl₂ ile süspansiyon haline getirilir ve buzda bekletilir.
8. Süspansiyon 4000 g'de, 4°C'da 10 dk santrifüjlenerek hücreler tekrar çöktürülür.
9. Sıvı kısım dökülür ve hücreler santrifüj tüpünün kağıt havlu üzerinde ters çevrilerek 1 dk kurutulur.

10. Çöken hücreler 4 ml, 0,1M CaCl₂ içinde tekrar süspansiyon haline getirilir ve buzda bekletilir.
11. Mikropipetle 200 µl süspansiyon eppendorf tüpüne alınır ve tüpe DNA (10 ml hacminde 50 ng'dan fazla olmayacak şekilde) eklenir, yavaş yavaş aşağı yukarı çevrilerek karıştırılır ve 30 dk buzda bekletilir.
12. Daha sonra tüpler 42°C'daki su banyosuna alınarak 90 saniye bekletilir ve ısı şokuyla plasmid DNA'nın hücreye transferi sağlanır. Bundan sonra tüpler hızlı bir şekilde buz banyosuna alınır ve 1-2 dk hücrelerin çökmesi için beklenir.
13. Her tüpe 800 µl LB çözeltilisi 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).

3.2.8 *E. coli*'den plasmid DNA izolasyonu

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

11. Kuruyan pellet amaca göre ya 100 µl TE tamponu (EK 1) (pH=8) veya dH₂O ile çözülmüş ve -20°C 'da saklanmıştır (Sambrook 1995).

3.2.9 DNA'nın agaroz jelden ekstraksiyonu

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

Fermentas DNA Ekstraksiyon Kit ile Ekstraksiyon Yöntemi:

İstenen DNA molekülünü içeren jel parçası uygun çözeltilerle karıştırılarak 55°C 'de çözülür. Sonra çözeltiliye geçen DNA molekülü ortama eklenen toz halindeki silika partiküllere adsorplanır. DNA moleküllerini taşıyan silika tozları yıkanır ve sonra da elüasyon tamponu ile elüasyon işlemi gerçekleştirildiğinde klonlama tepkimesinde kullanılacak DNA molekülleri saf olarak elde edilir.

3.2.10 Elektroporasyonla plasmid DNA'nın *Bacillus* türlerine transferi

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

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

Elektrokompotent hücrelerin hazırlanması :

1. Hücreler 5ml'lik LB sıvıda 37°C ve 180rpm koşullarında 1 gece çoğaltılırlar.
2. 5 ml'lik LB sıvıda çoğaltılan mikroorganizmanın 250 µl 'si 50 ml'lik LB sıvı içeren yeni ortamlara aktarılır ve 1.basamaktaki ile aynı koşullarda 3 st çoğaltılır.
3. 4000rpm ve +4°C'de 15 dk santrifüjlenerek ayrılan hücreler 1 mM HEPES (pH=7.0) tamponu ile iki kez yıkandıktan sonra soğuk elektroporasyon tamponu

(%25 PEG ve 0.1M mannitol) ile de iki kez yıkanır. Yöntemin uygulandığı süreçte hücrelerin soğuk olması gerekir.

4. Hücreler başlangıç çoğalma ortamı hacminin 1/200'ü kadar hacımlı soğuk elektroporasyon tamponu ile süspansiyon haline getirilir ve +4°C'de 10 dk bekletilir.

Elektroporasyonla DNA'nın hücrelere aktarılması :

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

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

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

1. Deney tüpü veya 25ml'lik erlenlerde bulunan, seçici antibiyotik içeren 2.5ml'lik LB sıvı-ortama plasmid DNA'nın izole edileceği mikroorganizmadan tek koloni aktarılır.
2. Mikroorganizma 37°C ve 200rpm koşullarında bir gece çoğaltılır.
3. Çoğalan hücrelerin 1.2ml'si 10000rpm ve oda sıcaklığında 1dk santrifüjlenir. Sıvı kısım dökülür ve kalan sıvının tamamı bir mikropipet yardımıyla uzaklaştırılır.
4. Hücreler 1.2ml TSE tamponu (EK 1) ile tekrar süspansiyon haline getirilerek yıkanır.

5. 3.basamak tekrarlanır.
6. Hücre pelleti 2mg/ml egg-white lizozim içeren (kullanmadan hemen önce toz olarak eklenmiş) 500 µl Çözelti A (EK 1) ile süspansiyon haline getirilir.
7. 10s vorteks işlemi ile homojenizasyondan sonra T=37°C'de hücreler parçalanıncaya kadar (10-20 dk) inkübe edilir. Bu basamak kritiktir ve süspansiyon viskoz olmalıdır.
8. Karışım buz üzerine konur ve oda sıcaklığında bekletilen Çözelti-B'den (EK 1) 400 µl eklenir, 10s vorteks işlemi ile homojenizasyondan sonra 4 dk buz üzerinde bekletilir. Süspansiyon gerçekte berrak olmalıdır; eğer berrak değilse vorteks işlem basamağı tekrarlanır.
9. 300 µl Çözelti-C (EK 1) eklenir ve 10s vorteks işleminden sonra buz üzerinde 5 dk bekletilir.
10. 16000 rpm ve +4°C koşullarında 6 dk santrifüjlenir. Çökeltinin büyük kısmı dibе çöker, bir kısmı çözeltide kalır.
11. Sıvı kısmın ~ 600 µl'si 1ml'lik mikropipetle yeni ependorf tüpüne alınır.
12. 600 µl fenol/kloroform/izoamilalkol (25/24/1) karışımı eklenir, 10s vorteks işlemi uygulanır ve 1 dk sonra işlem tekrarlanır.
13. Fazları ayırmak için 16000 rpm ve +4°C koşullarında 6 dk santrifüjlenir.
14. ~ 500 µl sulu (üst) faz 1 ml'lik mikropipetle yeni tüpe alınır. Ara-faz ve alt-fazdan çekilmemesine dikkat edilir.
15. 500 µl kloroform/izoamilalkol (24/1) eklenir, 5 s vorteks işleminden sonra 16000 rpm ve +4°C koşullarında 2 dk santrifüjlenerek fazlar ayrılır.
16. 14. basamaktaki gibi yaklaşık 450 µl'lik üst-faz yeni tüpe alınır.
17. 1 ml %96'lık etanol (oda sıcaklığında) eklenir, karıştırılır ve buz üzerinde 10 dk bekletilir.
18. 16000 rpm ve +4°C koşullarında 10 dk santrifüjlenerek DNA pellet haline getirilir.
19. Sıvı kısım 4. basamaktaki gibi uzaklaştırılır; pellete dokunulmamalıdır.
20. 1 ml %80'lik etanol eklenir. Genellikle DNA pelleti tüpün bir tarafında sabit kalır. Eğer kalmazsa, ya da herhangi bir şüphe olursa, 1dk tekrar santrifüjlenir. Sıvı kısım 19. basamaktaki gibi uzaklaştırılır.
21. 20.basamak tekrarlanır.
22. Pellet vakumda kurutulur ve 25µl TE tamponunda çözülür.

23. 1 µl RNaz eklenir ve 37°C'de 20 dk inkübe edilir. DNA -20°'de saklanır.

3.3 Rekombinant *Bacillus* Türleri ile hGH Üretimi

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 3.3'de verilmiştir (Çalık 1998). Rekombinant *Bacillus* mikroorganizmaların aktarılacağı katı çoğalma ortamlarına sterilizasyon işleminden sonra plasmidin korunması için ortamdaki derişimi 7µg/cm³ olacak şekilde kloramfenikol eklenmiş; 30 cm³ 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.

Çizelge 3.3 Rekombinant *Bacillus* türleri için katı çoğalma ortamı

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

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, $V_R=150 \text{ cm}^3$ hacımlı mikrobiyolojik hava filtreli kesikli biyoreaktörde bulunan bileşimi Çizelge 3.4 'de verilen $V=30 \text{ cm}^3$ hacımlı 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 3.4 Rekombinant *Bacillus* türleri için ön sıvı çoğalma ortamı

Bileşen	Derişim, kg/m^3
Soyton	15.0
Pepton	5
CaCl_2	0.1
Na_2HPO_4	0.25
$\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.01

3.3.4 Üretim ortamı

Ön-sıvı ortamda çoğalan mikroorganizmalar pipet yardımıyla steril koşullarda bileşimi Çizelge 3.5'de (Çalık 1998) verilen $V=500 \text{ cm}^3$ hacımlı mikrobiyolojik hava filtreli biyoreaktörde bulunan $V_R=100 \text{ cm}^3$ hacımlı ve $7\mu\text{g}/\text{cm}^3$ kloramfenikol içeren sıvı ortamlara 1:10 ölçek büyütme oranında aktarılmıştır. Aktarma yapıldıktan sonra hücreler karıştırma hızı $N=200 \text{ dk}^{-1}$ olan orbital karışmalı inkübatörde 37°C sıcaklıkta çoğaltılmış ve araştırılan parametrelerin etkisi incelenmiştir.

Çizelge 3.5 Rekombinant *Bacillus* türleri için üretim 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, çözülmüş 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

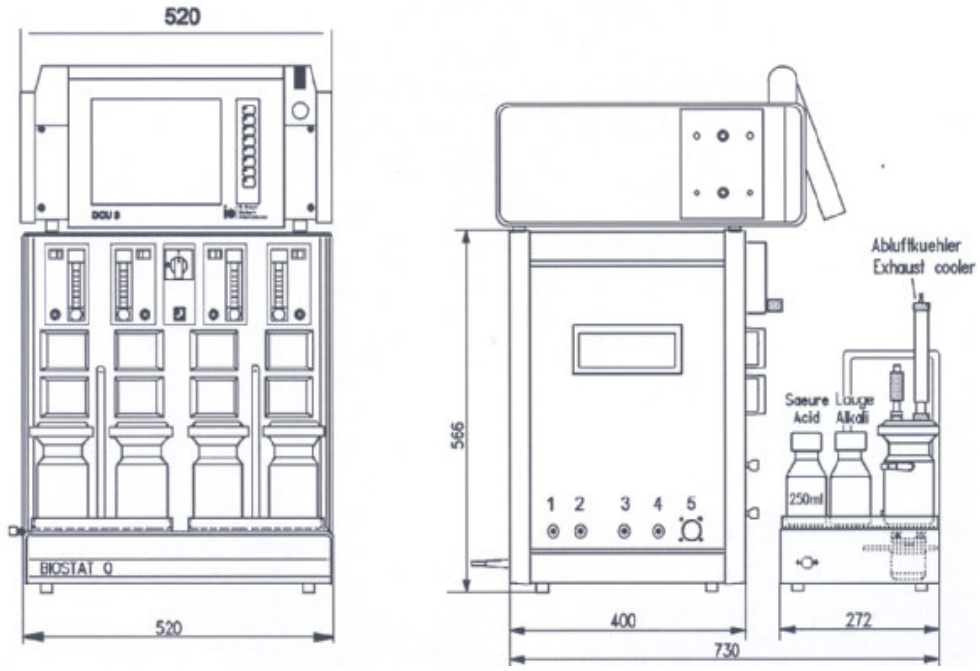
ayarlanabilen soğutmalı su sirkülatörü (Eyela CA 111, Japonya) ile; reaktöre beslenen hava ise Larfon (İtalya) yapımı yağsız-hava kompresörü ile pompalanmıştır.

3.3.5.1 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 biyoreaktör boşaltılır.
2. Her reaktörün pH elektrodları 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 kıskaçlanır. 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) steril edilir.
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 steril edilmiş 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 elektrodlarının kalibrasyonu için biyoreaktör ortamına, önce N₂ gazı gönderilerek oksijen uzaklaştırılır ve çözülmüş 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 elektrodları kalibre edildikten sonra ön sıvı ortamda çoğaltılan mikroorganizma biyoreaktöre aşılır.
9. 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

3.3.6 Analitik yöntemler

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

3.3.6.1 Mikroorganizma derişimi

Mikroorganizma derişimi UV-spektrofotometrede (Shimadzu UV 160A) türbidimetrik olarak absorbans ölçümüyle belirlenmiştir. Belli derişimde mikroorganizma içeren ortamlar için 400-600 nm arasında dalga boyu taraması yapılmış ve bu dalga boyu aralığında mikroorganizma derişiminin belirlenmesi için kalibrasyon eğrileri hazırlanmıştır. 600 nm dalga boyu için oluşturulan kalibrasyon eğrisinin diğerlerine göre daha hassas olduğu bulunmuş ve daha sonraki aşamalarda hücre derişiminin 600 nm dalga boyunda belirlenmesine karar verilmiştir (EK 2).

3.3.6.2 hGH derişimi

hGH derişimi tanımlanan bir elektrik alan içinde iyon veya yüklenmiş kolloidlerin farklı göç hızlarına bağı ayırma yapan kapiler elektroforez cihazıyla (CE; Quanta 4000E, Waters) belirlenmiştir (Çalık *et al.* 1995). 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 adsorpsiyonu azaltmak için kullanılmıştır. 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 sürdürölmüş ve elektroferogramlar alınmıştır. CE'de analizlere başlamadan önce standart verilerek,

derişimleri bulunacak enzimlerin kalma süresi ve cihazın performansı kontrol edilmiştir. Örnek elektroferogram Ek 5 'de gösterilmiştir.

Protein derişim kalibrasyonu, derişimleri bilinen hGH (Humatrope, Elli Lilly, Fransa) örnekleri standart olarak CE'de analiz edilmesi ve derişim-alan eğrisi oluşturulması ile hazırlanmıştır. Çizilen grafik, protein derişimi ölçümü için kalibrasyon eğrisi olarak kullanılmıştır (EK 6).

Kapiler elektroforezde enzim analiz koşulları:

- 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 : 30dk.

3.3.6.3 hGH tayini : WESTERN-BLOT yöntemi

Bir hücre ve dokudan istenilen bir proteinin saf halde izole edilmesi oldukça güç bir olaydır. Bu proteinin konsantrasyonu düşük ise çok sayıda (binlerce) farklı protein arasından ayırmak ve saf halde elde etmek için bu proteine uygun olan saflaştırma tekniklerinin seçilmesi gerekir. Proteinleri birbirinden molekül ağırlıkları, optimum pH, sıcaklık aralığı gibi özelliklerine göre ayırmak mümkündür.

Proteinlerin Ayrılması ile ilgili Yöntemler:

1. Kromatografik Yöntemler

- a. Jel Filtrasyonu
 - b. İyon -Exchange (İyon Değişirici) Kromatografisi
 - c. Affinite Kromatografisi
2. Elektroforetik Yöntemler
 - a. Elektroforez
 - b. İzoelektrik Fokuslama
 3. Santrifüstasyon Yöntemleri
 - a. Densiti Gradient (Zonal) Santrifüstasyon
 - b. Differansiyel Santrifüstasyon
 4. Dializ ve Ultrafiltrasyon

Metabolik mühendislik araştırma programının sonunda geliştirilmiş olan *Bacillus* türlerini kullanarak biyoreaktör üretim ortamına sentezlenecek hGH'nin aktif yapıda olup olmadığını belirlemek ve derişimini ölçmek için Western-Blott yönteminin kullanılmasına karar verilmiştir. Western-Blott yönteminin uygulanabilmesi için ilk aşamada üretim ortamına salgılanan tüm proteinlerin belirlendiği SDS-PAGE yönteminin gerçekleştirilmesi gerekmektedir.

Elektroforez yüklü moleküllerin bir elektrik alanda farklı davranmalarından yararlanarak yapılan ayırma işlemidir. Matris kağıt veya jeldir. Jel matrisi agaroz, nişasta ve poliakrilamid olabilir. Poliakrilamid jelin kullanıldığı yöntem Poliakrilamid Jel Elektroforez (PAGE) yöntemi denir.

Poliakrilamid jel elektroforezi:

1. SDS-PAGE (denatüre edici page)
 2. ND-PAGE(non denatüre edici page) olarak ikiye ayrılır.
- Proteinleri ayırmak ve saflaştırmak amacıyla yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biri de SDS-PAGE Elektroforez yöntemidir. Proteinlerin jel üzerindeki göç hızları:

- Molekül ağırlığına
- Amino asit kompozisyonuna

- Yan gruplarında, amino ve karboksil gruplarında farklı elektrik yükleri içermelerine dayanır.

3.3.6.3.1 SDS-PAGE elektroforez yöntemi

En yaygın kullanım alanı olan elektroforez tipidir. Proteinler için çok uygun olduğu gibi DNA ve RNA elektroforezleri için de kullanılabilir. SDS-PAGE elektroforezin PAGE elektroforezden farkı SDS (sodyum dodesil sülfat) kullanılmasıdır. Anyonik yapıda bir deterjan olan SDS moleküllerin primer yapıya dönüşmesini ve taşıdığı (-) yük ile primer yapıdaki proteinlerin (-) yük kazanmasını sağlar. Böylece (-) yük kazanmış olan protein moleküllerinin molekül ağırlıklarına göre ayrılması gerçekleştirilebilir. Matris olarak poliakrilamid jel kullanılır. Poliakrilamid jel, sentetik bir madde olan akrilamid ve akrilamid türevi olan N-N'-metilen bis-akrilamidin polimerleşmesiyle oluşturulur. Akrilamid moleküllerinin yan-yana bağlanarak oluşturduğu düz zincirlerin arasına bis-akrilamid moleküllerinin çapraz bağlanmasıyla polimerleşme reaksiyonu gerçekleşmektedir. Bu reaksiyonun gerçekleşmesi için katalizör olarak TEMED (tetrametil etilen diamin), katalizörün iş görmesi için serbest radikal kaynağı olarak APS (amonyum persülfat) çözeltisi kullanılır. Akrilamid miktarı ve akrilamid/bisakrilamid oranı jelin ayrıştırma kapasitesini belirler. Akrilamid/ bisakrilamid oranı yükseldikçe jellerde ısınma fazlalaşır, kırılabilirlik artar, daha kolay yıkanır (Leammi 1970). Çizelge 3.6'de PAGE sisteminin proteinler için uygulama sınırları verilmiştir.

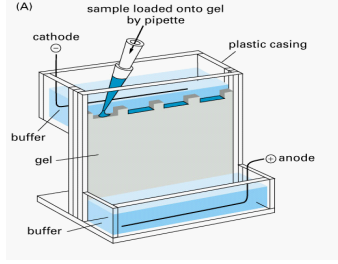
Çizelge 3.6 PAGE sisteminde proteinler için uygulama sınırları

Jel yüzdesi	Ayrıştırma Kapasitesi (Dalton)
% 5	60.000 - 212.000
% 10	18.000 - 75.000
% 15	15.000 - 45.000

Yöntem:

1. Analizlenecek olan protein çözeltisi eşit hacimde örnek yükleme tamponu (EK 7) ile karıştırılarak kaynar-su banyosunda 2-3 dakika inkübe edilir. Örnek yükleme tamponunda bulunan merkaptotanol protein moleküllerinin üç boyutlu yapısında bulunan disülfid bağlarını redükte edici etkisiyle koparır. Protein moleküllerinin üç boyutlu yapısındaki diğer kuvvetler ise ısıtılarak yok edilir ve böylece protein molekülleri düz zincir haline geçerler. Örnek yükleme tamponundaki gliserol, yüklenecek protein çözeltisinin yoğunluğunu arttırarak 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 7) bir enjektör yardımıyla dökülür. Jeli dökerken hava kabarcığının oluşturulmamasına dikkat edilmelidir. Polimerizasyon havadaki oksijenden etkileneceği için jel polimerleşmek üzere iki cam arasına doldurulduktan sonra üzerine pipet yardımıyla su ile doyurulmuş bütanol konur. Polimerleşmeden sonra jel üzerindeki bütanol saf su ile yıkanarak uzaklaştırılır. Sonra polimerleşmiş olan resolving jelin üzerine stacking jelin (EK 7) 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 25mA sabit akım(250 V) verilerek proteinlerin koşturulması sağlanır. Jelde yürütülen protein bantlarının moleküler ağırlıklarının belirlenebilmesi için jelle moleküler ağırlığı bilinen standart protein bantları yüklenir. Şekil 3.3'de poliakrilamid jelle örneklerin yüklenmesi gösterilmiştir.

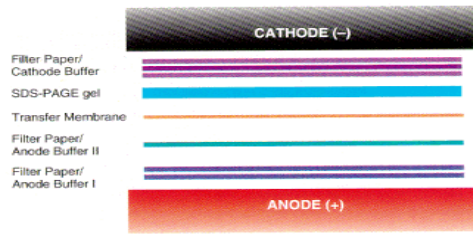
Böylece SDS-PAGE Elektroferez ile proteinler jelle birbirinden ayrılmış olur. Fakat hedef proteinin varlığı tam olarak belirlenememiştir.



Şekil 3.3 SDS-PAGE modülüne yerleştirilmiş jele örnek yüklenmesi

İlk kez 1979'da Towbin *et al.* 1981'de Burnette tarafından yayınlanmış olan Western Blotting yöntemi proteinlerin poliakrilamid jelden elektroforez ile ayrılması ve ayrılan proteinlerin otoradyografi, ultraviyole ışığı ya da peroksidaz reaksiyon ürünü ile gösterimine dayanmaktadır. Bu yöntemle aranan spesifik proteinin derişimi de belirlenebilmektedir (Towbin *et al.* 1979, Sambrook *et al.* 2001, Burnette 1981):

1. SDS-PAGE Elektroforez yöntemiyle koşturulmuş olan jel transfer tamponunda (EK 7) ~15dk. bekletilir. Nitroselüloz membran, sünger ve filtre kağıdı jel ile aynı büyüklükte olacak şekilde kesilir ve bir kapta transfer tamponu ile ıslatılır. Bu işlemden sonra Western-Blot kasedinin içine sırasıyla bir kat sünger, filtre kağıdı, poliakrilamid jel, membran, filtre kağıdı, sünger olacak şekilde yerleştirilir (Şekil 3.4).
2. Hazırlanmış olan Western-Blot 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 yıkanıp PBS çözeltisinde (EK 7) birkaç dakika bekletilerek boya silinir.



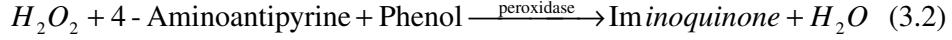
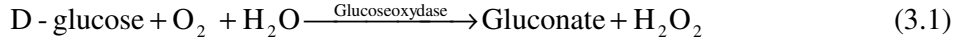
Şekil 3.4 Proteinlerin poliakrilamid jelden membrana aktarımı

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 7) bekletilir. Sonra süt dökülür ve tween20 içeren PBS ile yıkanır. Yıkamak için hazırlanan PBS üçe 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. 1st. bekletildikten sonra proteine bağlanmamış olan primer antikorları ortamdaki uzaklaştırmak amacıyla tween20 içeren PBS 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 sulandırımı PBST (EK 7) ile yapılır. Sulandırım için 10 ml hacim yeterlidir. Sulandırım antikorun yoğunluğuna göre yapılır (1/1000- 1/10000 gibi). Bir saatlik bekletme sonunda primer antikora bağlanmamış olan sekonder antikorların ortamdaki uzaklaştırılması için tween2'li PBS 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 boyası) 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.

3.3.6.4 Glukoz derişimleri

İndirgenmiş şeker -glukoz- derişimi $\lambda=505\text{nm}$ UV spektrofotometrede glukoz oksidasyon metoduyla ölçülmüştür (Boyacı *et al.* 2005). Denklem 3.1'deki gibi D-glukoz glukoz oksidaz enzimi katalizörlüğünde oksidasyonundan peroksidaz oluşumu

verilmiştir. Denklem 3.2’de ise oluşan peroksidazın 4-aminoantipürin ve fenol ile peroksidaz katalizörlüğünde tepkimesi gösterilmiştir. Tepkime sonucunda kırmızı renk gözlenmektedir.



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

1. Örnekler derişimleri 0.1 g/l veya daha düşük olacak şekilde seyreltilir.
2. 2 ml analiz çözeltisine 0.05 ml örnek çözeltisi eklenir.
3. Oda sıcaklığında 20 dk veya 37 °C 10 dk inkübe edilerek tepkime gerçekleştirilir ve 505nm dalga boyunda UV-spektrofotometrede gözeltiniin absorbansı ölçülür.

3.3.6.5 Amino asit derişimleri

hGH üretiminde üretim ortamına mikroorganizma tarafından salgılanan amino asitlerin derişimlerinin belirlenmesi için ters-faz yüksek basınç sıvı kromatografi temelli amino asit Analiz Sistemi (Waters, ABD) kullanılmıştır.

Amino asit analizi için kolon öncesi türevlendirme gerektiren PICO-TAG yöntemi (Cohen 1983) kullanılmıştır. 32 amino asitten oluşan karışımın analizine yönelik olan “Waters Picofree Gradient Yöntemi” nin modifiye edilmesi ile geliştirilen “New-Pico Gradient Yöntemi” ile amino asit analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemde serbest amino asitler birinci basamakta fenilzotiyosiyanat (PITC) ile tepkimeye sokularak feniltiyokarbomil amino asit (PTC-AA) türevleri elde edilmiştir. İkinci basamakta elde edilen amino asit türevleri sisteme enjekte edilmiştir. Amino asit analizinde iki farklı çözücü bir gradyen oluşturarak kolondan geçmektedir. Çizelge 3.7’da çözücülerin

oluşturduğu gradyen tablosu verilmiştir. Elde edilen kromatogramlardan amino asit derişimleri, derişimi bilinen amino asit standartlarıyla elde edilen alanlar yardımı ile bulunmuştur. Amino asitlerin analizlenmesi için belirlenen analiz koşulları aşağıda verilmiştir.

Kolon : Amino asit analiz kolonu (Nova-Pak C18, Millipore)

Kolon boyutları : 3.9 mm x 30 cm

Sistem : Ters faz kromatografi

Hareketli faz akış hızı : 1 cm³/dk

Kolon sıcaklığı : 38 °C

Dedektör, dalga boyu ve duyarlılık : UV/VIS, 254 nm, 0.05AUFS

Enjeksiyon hacmi : 4 µl

Analiz süresi : 18 dk

Hareketli faz A bileşimi (h/h): % 6 Asetonitril, % 94 Deiyonize su, % 1.79 (a/h) Sodyum asetat trihidrat, % 0.05 Trietil Amin

Hareketli faz B bileşimi (h/h): % 66.6 Asetonitril, %33.3 Deiyonize su

Çizelge 3.7 New-Pico yöntemi gradyen tablosu

t; dk	Akış hızı; cm ³ /dk	% A	% B
0.0	1.0	100.0	0.0
10.0	1.0	54.0	46.0
10.5	1.0	0.0	100.0
11.5	1.0	0.0	100.0
12.0	1.0	0.0	100.0
12.5	1.0	100.0	0.00
18.0	1.0	100.0	0.00

3.3.6.6 Organik asit derişimleri

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

Kolon	: Capital Optimal ODS, 5 µm
Kolon boyutları	: 4.6 mm x 250 mm
Sistem	: Ters faz kromatografi
Hareketli faz akış hızı	: 0.8 cm ³ /dk
Kolon sıcaklığı	: 30 °C
Dedektör, dalga boyu ve duyarlılık	: Waters 2487 Dual absorbans dedektör, 254 nm
Enjeksiyon hacmi	: 5 µl
Analiz süresi	: 15 dk
Hareketli faz bileşimi	: % 3.6 (NH ₄) ₂ HPO ₄ (a/h), % 96.4 Deiyonize su

3.3.6.7 Serin alkali proteaz enziminin aktivitesi

Üretilen enzimin aktivitesi, kazeinin enzimatik hidrolizi sonunda açığa çıkan hidrolizatların absorbansının spektrofotometrik olarak ölçülmesiyle belirlenmiştir. Enzimatik aktivitenin birimi 'U/cm³' olarak tanımlanmıştır. Moon and Parulekar (1991) tarafından 1U(=1 unite) birim zamanda açığa çıkan 4 nmol tirozin miktarı olarak tanımlanmıştır.

Enzim aktivitesini belirlemek amacıyla, borat tamponunda (pH=10) hazırlanmış % 0.50 derişimdeki kazein çözeltisinden 1 cm³ alınarak, 1cm³ mikroorganizması ayrılmış üretim ortamı 37°C 'da, 105dk⁻¹ karıştırma hızında 20dk süreyle tepkimeye sokulmuş-

tur. Tepkime 2 cm^3 %10 (a/h) trikloroasetik asit (TCA) eklenmesiyle durdurulmuştur. Çözelti 15 dk tuz-buz banyosunda bekletildikten sonra 4°C 'da, 28700 g'de 10 dk süreyle santrifujlenmiş ve üstte kalan sıvının absorbanı 275 nm dalga boyunda UV-spektrofotometrede ölçülmüştür. Çalık (1998) tarafından SAP aktivitesinin hesaplanması için hazırlanan absorban-aktivite kalibrasyon eğrisi ile enzim aktivitesi hesaplanmış (EK8).

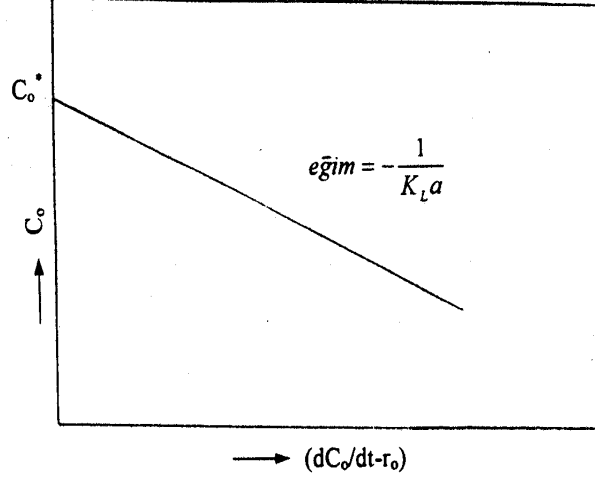
3.3.6.8 Sıvı faz kütle aktarım katsayısının ve oksijen tüketim hızının belirlenmesi

Pilot ölçekte hGH üretim prosesi boyunca sıvı faz hacımsal kütle aktarım katsayısı ve oksijen tüketim hızı Bölüm 2.9.3'te 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 çözülmüş oksijen derişimindeki azalmanın, daha sonra havanın sisteme tekrar verilmesi ile oksijen derişimindeki artışın zamanla ölçülmesi prensibine dayanmaktadır.

Üretim ortamına aşı yapılmadan önce fiziksel oksijen aktarım katsayısı; aşılama yapıldıktan sonra ise kimyasal tepkimeli oksijen aktarım katsayısı belirlenmiştir. Farklı oksijen aktarım koşulları ve kalma sürelerinde biyoteknolojik prosesin oksijen aktarım dinamiğini etkilemeyecek şekilde, 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 çözülmüş oksijen derişiminin doğrusal azalmasından yararlanılarak mikroorganizmanın oksijen tüketim hızı, r_o hesaplanmıştır (Denklemler 3.3). Sıvı tarafı hacımsal kütle aktarım katsayısının belirlenmesi için incelenen oksijen aktarım koşullarında sisteme tekrar hava verilerek çözülmüş oksijen derişimindeki doğrusal olmayan artış ölçülmüştür. Denklem 3.4'nin düzenlenmesi ile Şekil 3.5'te gösterildiği şekilde $((dC_o/dt-r_o), C_o)$ grafiğinin eğiminden $K_L a$ değeri hesaplanmıştır. Örnek grafikler ve örnek bir hesap Ek 9'de görülmektedir.

$$\frac{dC_o}{dt} = r_o \quad (3.3)$$

$$K_L a(C_o^* - C_o) + r_o''' C_X = \frac{dC_o}{dt} \quad (3.4)$$

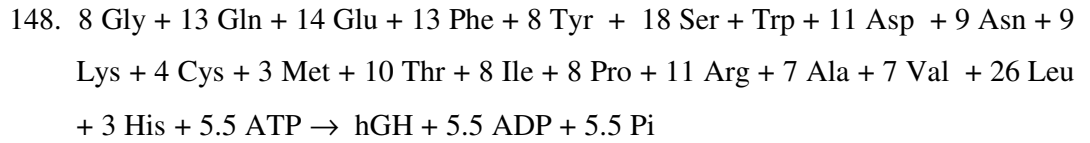


Şekil 3.5 Dinamik yöntem ile sıvı faz hacimsal kütle aktarım katsayısının belirlenmesi

3.4 Hücre-içi Tepkime Hızlarının Hesaplanması

Karbon bileşiklerinin *B. subtilis*'te biyokimyasal tepkime-ağı üzerindeki akışını tanımlamak için hücre-içi tepkimeler ve biyokimyası araştırılmış; metabolik yollarının kesişme ve dallanma noktalarındaki bileşikler dikkate alınarak biyokimyasal tepkime sistemi belirlenmiştir (Çalık 1998, Çalık and Özdamar 1999). *B. licheniformis* için Çizelge 2.10'te verilen 149 denklemden oluşan, metabolik bileşikler toplamı 109 olan biyokimyasal tepkime sistemi, *B. subtilis*'te biyokimyasal yollarının farklı olmadığı varsayımı yapılarak 148 numaralı serin alkali proteaz oluşum tepkimesi yerine hGH oluşum tepkimesi yazılarak modifiye edilmiştir. Buna göre *r-B. subtilis*'in metabolik yoluzi haritası Şekil 3.6'da verilmiştir.

İnsan Büyüme Hormonu oluşum tepkimesi:



Biyokimyasal tepkime sistemi için kurulan model Çalık (1998) ve Çalık and Özdamar (2002) tarafından açıklandığı gibi çözülür:

$$A \cdot r(t) = c(t) \quad (3.5)$$

vektör diferansiyel denklem ile tanımlanarak amaç fonksiyon Z:

$$Z = \sum \alpha_i r_i \quad (3.6)$$

şeklinde ifade edilir. Burada α_i , hızların (r_i) stokiyometrik katsayılarıdır. Denklem 3.5'ün çözümü GAMS 2.25 (General Algebraic Modelling System, GAMS Development Corp., Washington DC) paket programıyla yapılmıştır. r_i ($\text{mmol g}^{-1} \text{KH st}^{-1}$) hızlarının lineer kombinasyonu olan Denklem-3.6 minimize edilerek 3.5-denklemin sistemi çözülür. Matematik modelin değişkenleri olan tepkime akıları $\text{mmol g}^{-1} \text{KH st}^{-1}$ olarak tanımlanmıştır. Hücre oluşum akısı r_x ($\text{gKH.g}^{-1} \text{KH st}^{-1}$), birim reaktör hacimi başına hücre oluşum hızının C_x 'e bölünmesiyle $r_x = \mu$ olarak elde edilir. Denklem sisteminin çözümsüzlüğü (singularity) bazı tepkimelerin birleştirilmesi veya çıkarılmasıyla yok edilmiştir.

4. DENEY VE BULGULAR

Doğal olarak yaşam süresince insan metabolizmasınca üretilen hGH'nin, uygun metabolik mühendislik tasarımıyla, genetik mühendisliği teknikleri kullanılarak geliştirilen mikroorganizmalarca üretilmesi mümkündür. Doğala özdeş, çözünebilir ve biyolojik olarak aktif yapıda hGH üretilebilmesi için hücre içinde sentezlenen hGH'nin biyoreaktör üretim ortamına salgılanması önemlidir. Bu nedenle genom analizi tamamlanmış bulunan, hücre dışı protein üretme yeteneğine sahip *Bacillus subtilis* - veya diğer *Bacillus* türleri- konak hücre olarak kullanılarak hGH üretimi amaçlanmıştır.

“ Rekombinant insan büyüme hormonu (hGH) üretimi için biyoproses geliştirilmesi ” konulu yüksek lisans çalışmasında metabolik mühendislik araştırma programı doğrultusunda 1. araştırma programında rekombinant mikroorganizma geliştirilmesi amaçlanmıştır. 2. araştırma programında mikrobiyolojik hava filtreli kesikli laboratuvar ölçekli biyoreaktörlerde $V_R=110 \text{ cm}^3$, $T=37^\circ\text{C}$, $N=200 \text{ dk}^{-1}$ işletme koşullarında ortama eklenen proteaz inhibitörünün ve karbon kaynağı olarak kullanılan glukoz derişiminin hücre çoğalması ve hGH üretimi üzerindeki etkisi incelenmiştir. 3. araştırma programında laboratuvar ölçekte bulunan en uygun koşullarda farklı hava giriş ve karıştırma hızları ile oluşturulan oksijen aktarım koşullarında $V_R=0.550 \text{ dm}^3$ hacimli pilot ölçek biyoreaktörde oksijen aktarım etkileri incelenmiş, oksijen aktarım karakteristikleri belirlenmiş ve bu oksijen aktarım koşullarında hücre-içi metabolik yozizleri ve akıların dağılımı incelenmiştir. 4. araştırma programında, bulunan en iyi oksijen aktarım koşulunda hibrit gen içeren (*-pre(subC)::hGH::pMK4*) ve içermeyen (*pMK4*) plasmid taşıyan *Bacillus subtilis* ile üretim deneyi tasarlanarak hibrit genin etkisi incelenmiş ve hücre-içi metabolik yozizleri ve akıların dağılımı bulunmuştur. 5. araştırma programında ise bulunan en iyi oksijen aktarım koşulunda üretim ortamına $t_e=0$ ve $t_e=24 \text{ st}$ 'te ayrı-ayrı ve karışım olarak eklenen aspartik asit, glutamik asit, serin, valin ve lözinin hücre derişimi ve hGH üretimi üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

4.1 hGH Üretimi için Rekombinant Mikroorganizma Geliştirilmesi

Hücre-dışı hGH üretilebilmesi için uygun bir metabolik mühendislik tasarımı ile geliştirilecek rekombinant plasmidi taşıyacak rekombinant mikroorganizmanın geliştirilmesi gerekmektedir. Bu nedenle üretilmesi amaçlanan ürünü kodlayan hGH geni ile hücre içinde sentezlenecek hGH molekülünü hücre dışına taşıyacak sistemin uygun bir tasarımla seçilecek plasmide entegre edilmesi gerekmektedir. Hücre içinde üretilen hGH'nun hücre dışına aktarılabilmesi için, *Bacillus* hücre-dışı enzimlerinden serin alkali proteaz (SAP) geninin (*subC*) hücre dışına taşınımı için sinyal peptidi salgılayan sinyal dizini (*pre-*) *hGH* gen dizininin önüne entegre edilerek elde edilmiş olan hibrit-gen önce *E. coli* plasmidi pUC19'a klonlanmıştır. İkinci aşamada da pMK4 *Bacillus-E. coli* shuttle plasmidine sub-klonlaması gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen rekombinant pMK4 plasmidi konak *Bacillus* türlerine transfer edilerek rekombinant *Bacillus* türleri geliştirilmiştir.

4.1.1 Primer tasarımı ve PCR ile gen derişiminin artırılması

SOE yöntemine (Ho *et al.* 1989, Horton *et al.* 1993) göre *-pre (subC)* (Jacobs 1995) ve *hGH* dizinlerinin (Goeddel *et al.* 1979, Goeddel and Heyneker 1982) (Şekil 4.1.a-4.1.b) birleştirilmesi ve sonra da çoğaltılabilmesi için, her dizin için bir ileri bir de geri olmak üzere dört primer tasarlanmıştır (Çizelge 4.1). Tasarlanan primer dizinlerinin termodinamik özellikleri Çizelge 4.2'de verilmiştir. Tasarlanan primerlerin birleştirilmesi sonucunda oluşacak hibrit-genin plasmide klonlanmasında görev yapacak olan *-pre (subC)* ileri primerine *XbaI* (5'_TCTAGA_3') ve hGH geri primerlerine de *BamHI* (5'_GGATCC_3') restriksiyon enzim konumları eklenmiştir. Bu restriksiyon enzim konumlarının seçiminde klonlama çalışmalarında kullanılacak pUC19 ve pMK4 plasmidlerinin klonlama bölgelerinde bulunup, *-pre (subC)* ve hGH dizinlerinde bulunmamasına dikkat edilmiştir.

5' _gat cga caa gac cgc aac ctc ctt cga caa aaa atg atc tct taa aat aaa tga ata gta ttt tca taa aat gaa tca gat gga gca atc tcc tgt cat tgc cgg ccc tgc gga cct ctt tcc ctgccag gct gaa geg gtc tat tca tac ttt cga act gaa cat ttt tct aaa aca gtt att aat aac caa aaa att tta aat tgg tcc tcc aaa aaa ata ggc cta cca tat aat tca ttt ttt ttc tat aat aaa tta aca gaa taa ttg gaa tag att ata tta tcc ttc tat tta aat tat tct gaa taa aga gga gga gag tga gta atg atg agg aaa aag agt ttt tgg ctt ggg atg ctg acg gcc ttc atg ctc gtg ttc acg atg gca ttc agc gat tcc gct tct gct gct caa ccg gcg aaa aat gtt gaa aag gat tat att gtc gga ttt aag tca gga gtg aaa acc gca tct gtc aaa aag gac atc atc aaa gag agc ggc gga aaa gtg gac aag cag ttt aga atc atc aac gcg gca aaa gcg aag cta gac aaa gaa gcg ctt aag gaa gtc aaa aat gat ccg gat gtc gct tat gtg gaa gag gat cat gtg gcc cat gcc ttg gcg caa acc gtt cct tac ggc att cct ctc att aaa gcg gac aaa gtg cag gct caa ggc ttt aag gga gcg aat gta aaa gta gcc gtc ctg gat aca gga atc caa gct tct cat ccg gac ttg aac gta gtc ggc gga gca agc ttt gtg gct ggc gaa gct tat aac acc gac ggc aac gga cac ggc aca cat gtt gcc ggt aca gta gct gcg ctt gac aat aca acg ggt gta tta ggc gtt gcg cca agc gta tcc ttg tac gcg gtt aaa gta ctg aat tca agc gga agc gga act tac agc ggc att gta agc gga atc gag tgg gcg acg aca aac ggc atg gat gtt atc aac atg ag tct tgg agg acc atc agg ctc aac agc gat gaa aca ggc ggt tga caa tgc ata tgc aag agg ggt tgt cgt tgt ggc ggc tgc tgg gaa cag cgg atc ttc agg aaa cac gaa tac aat ccg cta tcc tgc gaa ata cga ctc tgt cat cgc agt tgg cgc ggt aga ctc taa cag caa cag agc ttc att ttc cag cgt ccg agc aga gct tga agt cat ggc tcc tgg cgc agg cgt gta cag cac tta ccc aac cag cac tta tgc aac att gaa cgg aac gtc aat ggc ttc tcc tca tgt agc ggg agc agc agc ttt gat ctt gtc aaa aca tcc gaa cct ttc agc ttc aca agt ccg caa ccg tct ctc cag tac ggc gac tta ttt ggg aag ctc ctt cta cta tgg aaa agg tct gat caa tgt cga agc tgc cgc tca ata aca tat tct aac aaa tgg cat ata gaa aaa gct agt gtt ttt agc act agc ttt ttc ttc att cag ttg aag act gtt caa tat ttt gaa tcc gtt cca tta tgg tgc gat ggc c _3'

Şekil 4.1.a *-pre(subC)* geninin nükleik asit dizinimi (Jacobs 1995)

5' _ttc cca act ata cca cta tct cgt cta ttc gat aac gct atg ctt cgt gct cat cgt ctt cat cag ctg gcc ttt gac acc tac cag gag ttt gaa gaa gcc tat atc cca aag gaa cag aag tat tca ttc ctg cag aac ccc cag acc tcc ctc tgt ttc tca gag tct att ccg aca ccc tcc aac agg gag gaa aca caa cag aaa tcc aac cta gag ctg ctc cgc atc tcc ctg ctg ctc atc cag tgc tgg ctg gag ccc gtg cag ttc ctc agg agt gtc ttc gcc aac agc cta gtg tac ggc gcc tct gac agc aac gtc tat gac ctc cta aag gac cta gag gaa ggc atc caa acg ctg atg ggg agg ctg gaa gat ggc agc ccc ccg act ggg cag atc ttc aag cag acc tac agc aag ttc gac aca aac tca cac aac gat gac gca cta ctc aag aac tac ggg ctg ctc tac tgc ttc agg aag gac atg gac aag gtc gag aca ttc ctg cgc atc gtg cag tgc cgc tct gtg gag ggc agc tgt ggc ttc tag ctg ccc ggg tgg cat ccc tgt gac ccc tcc cca gtc cct ctc ctg gcc _3'

Şekil 4.1.b *hGH* geninin nükleik asit dizini (Goeddel *et al.* 1979, Goeddel and Heyneker 1982)

Çizelge 4.1 Tasarlanmış olan primer dizinleri

Primer	Nükleotit dizini
<i>-pre (subC)</i> dizini ileri primeri	5' _GCT CTA GAG CGC AAT CTC CTG TCA TTC G _3'
<i>-pre (subC)</i> dizini geri primeri	5' _GGT ATA GTT GGG AAA GCA GAA GCG GAA TCG _3'
<i>hGH</i> peptid dizini ileri primeri	5' _GCT TCT GCT TTC CCA ACT ATA CCA CTA TCT C _3'
<i>hGH</i> peptid dizini geri primeri	5' _GCG GAT CCG CAC TGG GGA GGG GTC AC _3'

Çizelge 4.2 Tasarlanan primer dizinlerinin termodinamik özellikleri

Primer	T _d [*] °C	T _d °C	Dimer	Self complementarity	ΔG kcal/mol	ΔH kcal/mol	ΔS eu
-pre (subC) ileri	58.2	78.3	18	18	-48.5	-213.8	-547.6
-pre (subC) geri	58.8	80.0	24	10	-54.3	-242.9	-625.4
hGH ileri	57.9	74.4	10	3	-49.4	-232.9	-607.9
hGH geri	62.6	87.5	16	16	-53.9	-217.5	-542.7

4.1.1.1 PCR ile gen derişimi artırılması için kalıp seçimi

PCR tepkimesine dayanan SOE yönteminde tasarlanan primerler yardımıyla önce ayrı-ayrı çoğaltılacak olan *-pre (subC)* dizini ve hGH mature peptit dizini için kalıp DNA olarak, SAP üretme potansiyeli olan *Bacillus* kromozomal DNA'sı ve *hGH* genini kodlayan cDNA'yı taşıyan plasmid DNA kullanılmıştır. SAP geni için kaynak olarak *B. licheniformis* (DSM 1969) kromozomal DNA'sı izole edilmiş ve derişimi 1618.95 µg/ml olarak bulunmuştur. *hGH* geni için kaynak olarak ise *E. coli* XL1-Blue (ATCC 31538) cDNA'sını taşıyan pHGH107 plasmidi izole edilmiş ve adsorbsiyon temelli ayırma işlemine dayanan QIAGEN Midi Kiti ile saflaştırılmıştır. Saflaştırma işlemi sonucunda saf pHGH107 plasmidi elde edilmiştir.

4.1.1.2 PCR ile gen derişiminin artırılması

Kalıp DNA olarak izole edilmiş olan hGH cDNA'sını içeren pHGH107 plasmidi (Goeddel *et al.* 1979) ve *B. licheniformis* kromozomal DNA'sı ile tasarlanan primerler iki ayrı PCR reaksiyonuyla belirlenen PCR bileşim ve işletim koşullarında çoğaltılmıştır. Sonra bu iki PCR ürünü üçüncü bir PCR'da birleştirilerek hibrit gen elde edilmiştir. DNA'nın uzama (elongation) süresi *-pre (subC)* dizini 360bp içerdiğinden 23s, *hGH* dizini 639bp olduğundan 39s olarak belirlenmiştir. Genin nükleotitlerden polimerizasyon tepkimeleriyle doğru sentezlenebilmesi için primerlerin DNA'ya yapışma sıcaklığı (annealing temperature), T_d erime sıcaklığından 5°C daha düşük veya 12°C daha yüksek olan bir sıcaklık aralığında olabileceğinden [(T_d-5)<T_d<(T_d+12)], yapışma sıcaklığı 54°C olarak belirlenmiştir. DNA'nın uzama sıcaklığı (elongation temperature) *pfu* DNA polimeraz enziminin optimum sıcaklığı olan 72°C olarak seçilmiştir.

4.1.1.2.1 – *pre(subC)* dizininin PCR tekimesiyle çoğaltılması

B. licheniformis kromozomal DNA'sı tasarlanmış olan *-pre (subC)* geri ve *XbaI* restriksiyon konumu içeren *-pre (subC)* ileri primerlerini kullanılarak *-pre (subC)* dizini çoğaltılmıştır. Bu doğrultuda PCR tepkimesi farklı DNA yapışma sıcaklığı, uzama süresi ve enzim derişimi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Parametreler ve sonuçlar Çizelge 4.3'de verilmiştir.

Polimeraz zincir tepkimesi (PCR) için tepkime bileşimi

10X PCR Tamponu (MgSO ₄ 'lü)	5µl
dNTPler (1mM)	10µl
İleri Primer (FP) (10µM)	1µl
Geri Primer (RP) (10µM)	1µl
Template DNA	2.5µl (25µg/ml <i>B.licheniformis</i> kromozomal DNA'sı için)
dH ₂ O	29.5µ
pfu DNA Polimeraz (2.5U/µL)	1µl

PCR sisteminde mikroreaktörlerin işletim programı:

T ₁ =	94°C, 2dk }	1 döngü	} 30 döngü
T ₁ (denatürasyon) =	94°C, 1dk		
T ₂ (yapışma) =	50°C, 1dk		
T ₃ (sentez) =	72°C, 23s <i>subC pre-</i> dizini için		
T ₃ =	72°C, 5dk }	1 döngü	
T ₄ =	4°C, 5dk }		

Çizelge 4.3 PCR tepkimeleriyle *-pre (subC)* genini çoğaltmada incelenen parametreler ve elde edilen sonuçlar

<i>Enzim</i>	Enzim miktarı, µl	T(annealing), °C	Zaman, s	Sonuç
<i>pfu</i> DNA polimeraz	1.0	54	22	Yok
<i>pfu</i> DNA polimeraz	1.0	54	44	Yok
<i>pfu</i> DNA polimeraz	1.0	57	44	Yok
<i>Taq</i> DNA polimeraz	0.5	54	44	Bant
<i>pfu</i> DNA polimeraz	1.0	52	44	Yok
<i>pfu</i> DNA polimeraz	1.0	50	44	Bant
<i>pfu</i> DNA polimeraz	3.0	57	23	Yok
<i>pfu</i> DNA polimeraz	3.0	50	46	Yok
<i>pfu</i> DNA polimeraz	3.0	54	23	Yok
<i>pfu</i> DNA polimeraz	3.0	64	23	Yok
<i>pfu</i> DNA polimeraz	3.0	57	23	Yok
<i>pfu</i> DNA polimeraz	3.0	67	23	Yok
<i>pfu</i> DNA polimeraz	1.0	50	46	Yok
<i>pfu</i> DNA polimeraz	3.0	50	46	Bant

4.1.1.2.2 *hGH* geninin PCR tepkimesiyle çoğaltılması

Saf pGH107 plasmidi, tasarlanmış olan hGH ileri ve *Bam*HI restriksiyon konumu içeren hGH geri primerleri kullanılarak PCR tepkimesiyle *hGH* geni çoğaltılma koşulları araştırılmıştır. Bunu gerçekleştirmek için farklı yapışma sıcaklıkları ve uzama süreleri incelenmiştir (Çizelge 4.4). Fakat başarılı olunamaması üzerine aynı restriksiyon enzim konumunu içeren tasarlanmış geri primer II kullanılmıştır (Şekil 4.2). hGH geri primer II kullanılarak hGH dizini sentezlenmiş ve çoğaltılmıştır. Her iki primer incelendiğinde; hGH geri primer II mature dizinine daha yakın olduğundan pGH107 plasmidindeki *hGH* genine kolaylıkla bağlanıp sentezinin gerçekleştiği, ilk primerin ise hGH mature dizinine uzak konumu nedeniyle pGH107 plasmidindeki konumu bulamadığına karar verilmiştir. Bilgisayar programı NAR kullanılarak uygun termodinamik özelliklere sahip ve hGH mature dizinine yakın alternatif hGH geri primeri III de tasarlanmış ve dizini Şekil 4.2’te verilmiştir.

a. hGH geri primer II : 5'...GCG GAT CCG CCC CGG GCA GCT AGA AGC....3'
CGC CTA GGC GGG GCC CGT CGA TCT TCG

b. hGH geri primer III : 5'....GCG GAT CCG CTA GAA GCC ACA GCT GC3'
CGC CTA GGC GAT CTT CGG TGT CGA CG

Şekil 4.2 Tasarlanan alternatif hGH geri primerler II ve III

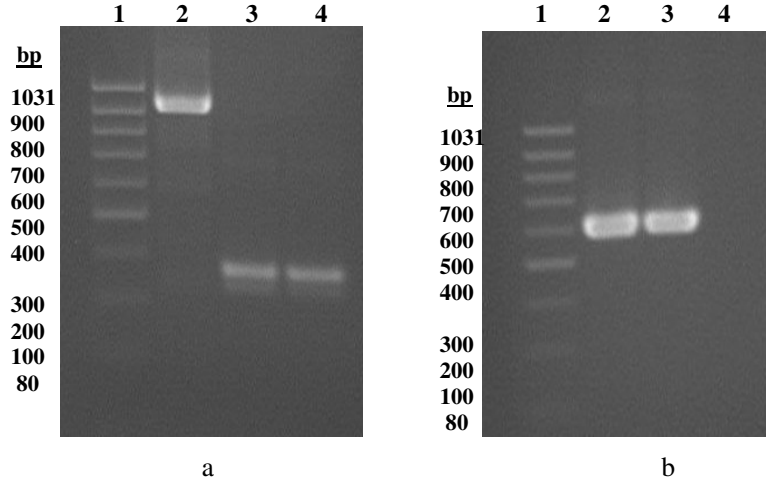
Polimeraz zincir tepkimesi (PCR) için tepkime bileşimi

10X PCR Tamponu (MgSO ₄ 'lü)	5µl
dNTPler (1mM)	10µl
İleri Primer (FP) (10µM)	1µl
Geri Primer (RP) (10µM)	1µl
Template DNA	2µ (8µg/ml pHGH107 plasmidi için)
dH ₂ O	28µ
<i>pfu</i> DNA polimeraz (2.5U/µL)	3µl

PCR sisteminde mikoreaktörlerin işletim programı:

T ₁ =	94°C, 2dk }	1 döngü	
T ₁ (denatürasyon)=	94°C, 1dk		} 30 döngü
T ₂ (yapışma) =	57°C, 1dk		
T ₃ (sentez) =	72°C, 39s	hGH mature peptit dizini için	
T ₃ =	72°C, 5dk }	1 döngü	
T ₄ =	4°C, 5dk }		

Ayrı PCR tepkimesiyle çoğaltılan *-pre (subC)* ve *hGH* gen dizinlerine ait agaroz jel görüntüleri Şekil 4.3'de gösterilmiştir.



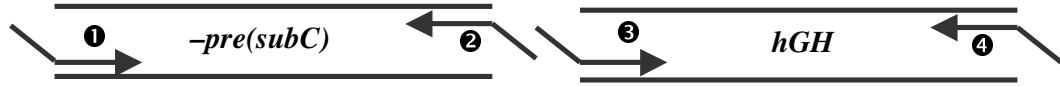
Şekil 4.3 a: PCR ile *-pre (subC)* dizininin sentez sonucu: 1.Marker (DNA Ladder, Low Range); 2. hibrit gen, 3-4. *-pre (subC)* dizini b: PCR ile hGH mature peptid dizininin sentez sonucu: 1. Marker (DNA Ladder, Low Range); 2-3. hGH mature peptid dizini; 4. Kontrol

Çizelge 4.4 PCR tepkimeleriyle hGH genini çoğaltmada incelenen parametreler ve elde edilen sonuçlar

Enzim	Enzim miktarı, µl	T (annealing), °C	Zaman,s	Sonuç
<i>pfu</i> DNA polimeraz	1.0	54	39	Yok
<i>pfu</i> DNA polimeraz	1.0	50	76	Yok
<i>pfu</i> DNA polimeraz	1.0	45	76	Yok
<i>pfu</i> DNA polimeraz	2.0	54	39	Yok
<i>pfu</i> DNA polimeraz	3.0	54	39	Yok
<i>Taq</i> DNA polimeraz	0.5	54	39	Farklı bant
<i>pfu</i> DNA polimeraz	1.0	59	39	Yok
<i>Taq</i> DNA polimeraz	0.5	54	39	Farklı Bant
<i>pfu</i> DNA polimeraz	1.0	50	78	Yok
<i>Taq</i> DNA polimeraz	0.5	59	39	Yok
<i>Taq</i> DNA polimeraz	0.5	54	39	Yok
<i>pfu</i> DNA polimeraz	1.0	50	39	Yok
<i>pfu</i> DNA polimeraz	1.0	57	39	Yok
<i>pfu</i> DNA polimeraz	2.0	62	39	Yok
<i>Taq</i> DNA polimeraz	0.5	62	39	Yok
<i>pfu</i> DNA polimeraz	2.0	65	39	Yok
<i>Taq</i> DNA polimeraz	0.5	65	39	Yok
<i>Taq</i> DNA polimeraz	0.5	67	39	Yok
<i>Taq</i> DNA polimeraz	0.5	57	39	Bant
<i>pfu</i> DNA polimeraz	3.0	57	39	Bant

4.1.1.2.3 *-pre(subC)* dizini ile hGH mature peptit dizininin birleştirilmesi: Hibrit-gen sentezi

Ayrı PCR reaksiyonlarıyla sentezlenen *-pre(subC)* dizininin *hGH* gen dizininin önüne PCR temelli SOE (Ho vd. 1989, Horton vd. 1989, Horton vd. 1993) yöntemiyle entegre edilebilmesi için, PCR ürünleri üçüncü bir PCR tepkimesinde kalıp DNA molekülleri olarak bir araya getirilmiştir. Tasarlanan primerler sayesinde ayrı-ayrı çoğaltılmaları sırasında birleşecekleri uçlarına birbirlerinin tamamlayıcısı olan uzantılar eklenen bu iki PCR ürünü, bu uzantılardan eşleşerek birleşmiş ve bunların birbirleri için primer olarak görev yapmasıyla DNA polimeraz enziminin katalizlediği tepkimeyle hibrit-gen “*-pre(subC)* dizini + *hGH*'nun mature peptit dizini” elde edilmiştir (Şekil 4.4). Ortamda hibrit-gen için uygun ileri- ve geri- primerin bulunmasıyla hibrit genin çoğaltılması sağlanmıştır. Sentezlenen hibrit-gen büyüklüğünün 990bp(=360bp+ 630bp) olması nedeniyle uzama süresi 62s'dir. SOE tepkimeleri sonunda elde edilen hibrit-gen “*-pre(subC)::hGH*” jel görüntüsü Şekil 4.5'de gösterilmiştir.



- ❶ restriksiyon enzim konumu (*Xba*I (^{5'}TCTAGA^{3'})) + *-pre(subC)* ileri primeri

5' _GCT CTA GAG CGC AAT CTC CTG TCA TTC G _3'

- ❷ *hGH*'a tamamlayıcı uzantı + *-pre(subC)* geri primeri

5' _GGT ATA GTT GGG AAA GCA GAA GCG GAA TCG _3'

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

5' _GCT TCT GCT TTC CCA ACT ATA CCA CTA TCT C _3'

- ❹ restriksiyon enzim konumu (*Bam*HI (^{5'}GGATCC^{3'})) + *hGH* geri primeri

5' _GCG GAT CCG CAC TGG GGA GGG GTC AC _3'

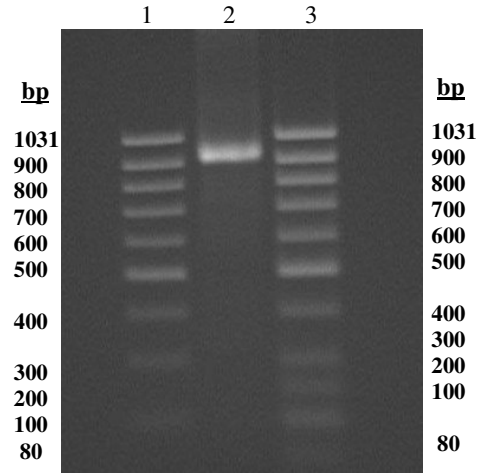
Şekil 4.4 SOE yöntemiyle hibrit gen oluşumunun şematik gösterimi

Polimeraz zincir tepkimesi (PCR) için tepkime bileşimi

10X PCR Tamponu (MgSO ₄ 'lü)	5µl	
dNTPler (1mM)	10µl	
İleri Primer (FP) (10µM)	1µl	
Geri Primer (RP) (10µM)	1µl	
Template DNA	2.5µl	=25µg/ml <i>B.licheniformis</i> kromozomal DNA'sı için ve =8µg/ml pHGH107 plasmidi için
dH ₂ O	27.5µl	
<i>pfu</i> DNA polimeraz (5U/µL)	3µl	

PCR sisteminde mikroreaktörlerin işletim programı:

T ₁ =	94°C, 2dk	} 1 döngü	} 30 döngü
T _{1(denatürasyon)}	= 94°C, 1dk		
T _{2(yapışma)}	= 55°C, 1dk		
T _{3(sentez)}	= 72°C, 75s hibrit gen için		
T ₃ =	72°C, 5dk	} 1 döngü	
T ₄ =	4°C, 5dk		



Şekil 4.5 SOE reaksiyonu ile hibritgen elde edilmesi sonuçları: 1.Marker (DNA Ladder, Low Range); 2. Hibrit gen (-*pre* (*subC*) dizini+hGH mature peptit dizini); 3. Marker (DNA Ladder, Low Range)

4.1.2 Hibrit-genin pUC19 klonlanması, *E. coli* 'ye transformasyonu ve derişiminin artırılması

Moleküler genetiğin birçok önemli problemi *E. coli* veya onun fajlarının kullanılmasıyla yapılan çalışmalarla doğrudan çözüldüğünden, genetik yapısı ve fonksiyonları çok iyi incelenen *E. coli* klonlama-plasmidleri için konak-hücre olarak öncelikle seçilmektedir. *E. coli*'ye plasmid DNA transferinin kolay olması ve bunun da ötesinde *E. coli*'den plasmid DNA izolasyonunun kolaylığı nedeniyle, bu araştırmanın 1. alt-programında ön klonlama işlemlerinin *E. coli* plasmidlerine yapılmasına ve *E. coli*'ye transformasyonuna karar verilmiştir. Bir *E. coli* plasmidi olan pUC19, klonlama için ortak özellikleri olan poliklonlama bölgelerinde bulunan restriksiyon enzim kesim konumlarının çok sayıda olması nedeniyle seçilmiştir.

SOE yöntemine göre *-pre (subC)* dizininin *hGH* mature dizininin önüne entegre edilmesiyle elde edilmiş olan hibrit-gen agaroz jelden Fermentas DNA ekstraksiyon Kit'i ile saflaştırıldıktan sonra tasarlanan primerlerin uçlarında bulunan *XbaI* ve *BamHI* restriksiyon enzimleriyle eşanlı ve aynı restriksiyon enzimleriyle pUC19 *E. coli* plasmidi de ardışık olarak kesilmiştir.

Tepkime 1. pUC19 plasmidinin *XbaI* enzimiyle yapışkan uçlu kesimi için tepkime koşulları:

pUC19 plasmidi (100ng)	10 µl
Tampon Y ⁺	2 µl
<i>XbaI</i> (10U/µl)	2 µl
dH ₂ O	6 µl
T=37°C, t= 2 st	V _T = 20 µl

Tepkime 2. pUC19 plasmidinin *Bam*HI enzimiyle yapışkan-uç kesimi için tepkime koşulları:

pUC19 plasmidi (100ng)	10 µl
Tampon A	2 µl
<i>Bam</i> HI (10U/µl)	2.5 µl
dH ₂ O	5.5 µl
T=37°C, t= 2 st	V _T = 20 µl

Tepkime 3. Hibrit-genin *Xba*I ve *Bam*HI enzimleriyle eşanlı yapışkan-uç kesimi için tepkime koşulları:

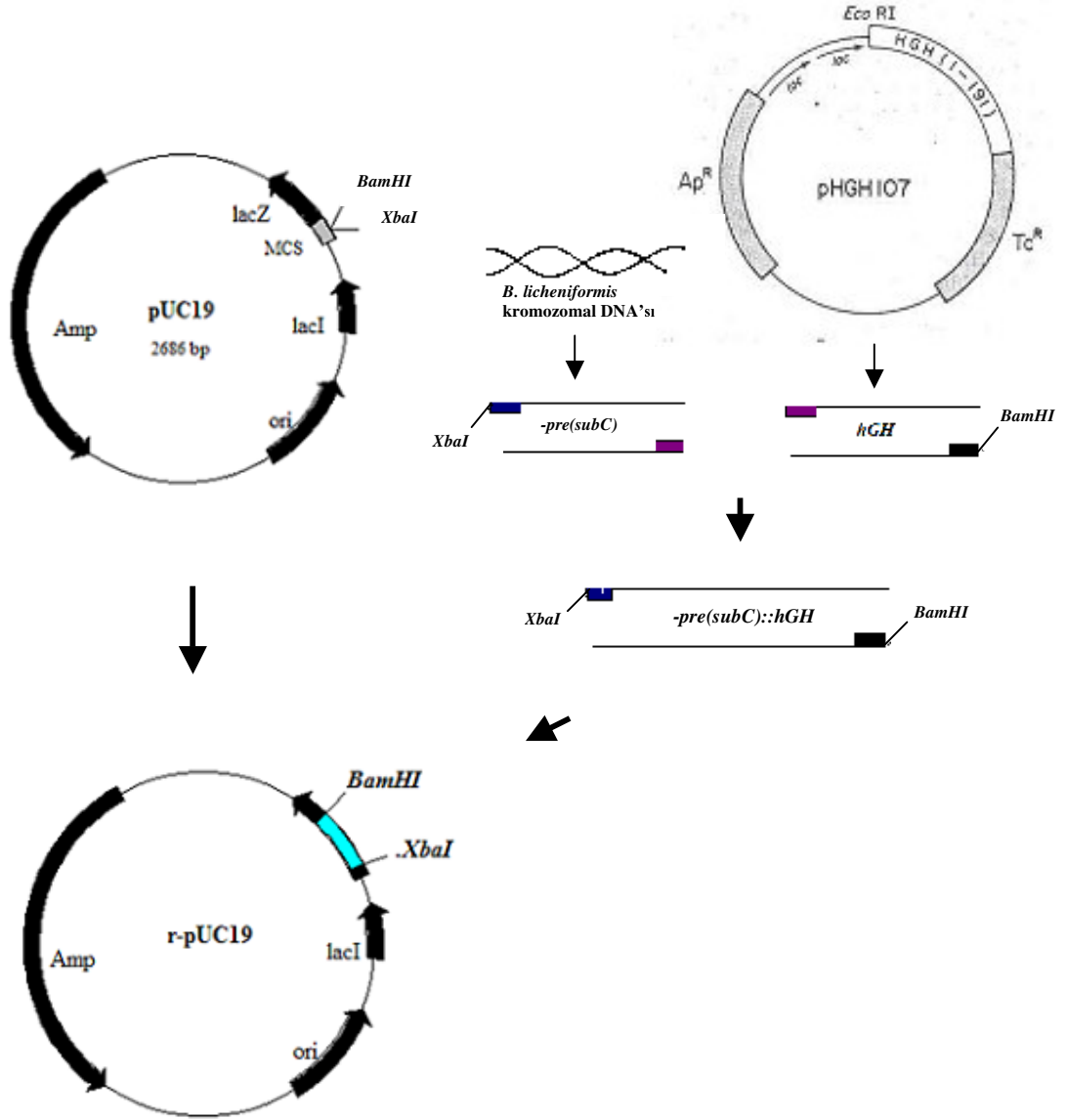
Hibrit gen	10 µl
Tampon Y ⁺	2 µl
<i>Bam</i> HI (10U/µl)	2.5 µl
<i>Xba</i> I (10U/µl)	2 µl
dH ₂ O	3.5 µl
T=37°C, t= 2 st	V _T = 20 µl

Tüm kesimlerde tepkime tamamlandıktan sonra tepkime karışımı T=65°C'de 20dk. tutularak, restriksiyon enzimleri denatüre edilerek katalitik olarak etkisiz hale getirilmiştir.

Tasarlanan primerlerin uçlarına eklenmiş olan *Xba*I ve *Bam*HI restriksiyon enzim konumlarından eşanlı olarak kesilmiş olan hibrit genin aynı restriksiyon enzimleriyle ardışık olarak kesilen pUC19 *E. coli* plasmidine iki farklı gen/vektör oranında ve T4 DNA ligaz enzimi katalizörlüğünde aşağıdaki koşullarda ligasyon tepkimesi gerçekleştirilmiştir. r-pUC19 plasmidi geliştirilmesi şematik olarak Şekil 4.6'de verilmiştir.

Tepkime 4. Hibrit-genin pUC19 'a klonlanması için ligasyon tepkime koşulları:

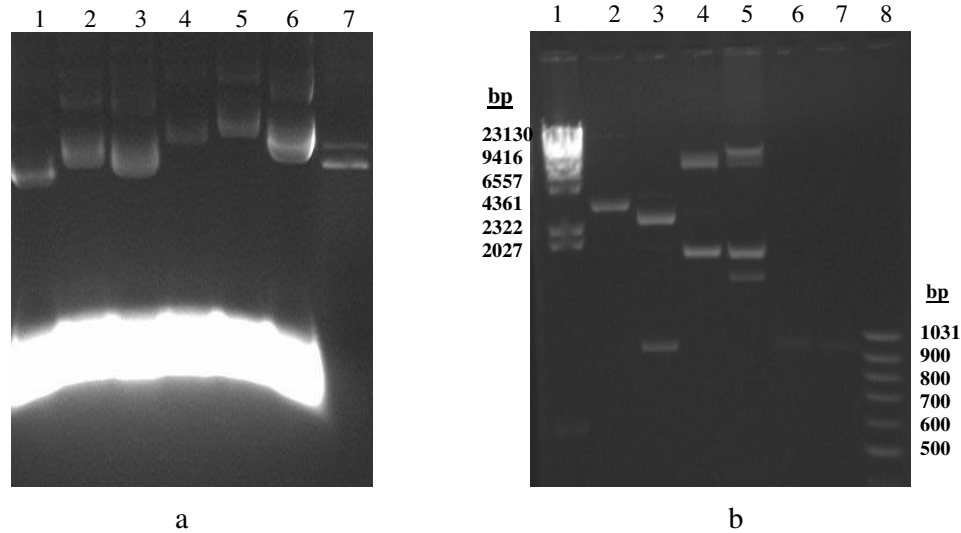
	<u>G/V=3</u>	<u>G/V=5</u>
Hibrit gen	~72 ng	~120 ng
pUC19 plasmidi	~24 ng	~24 ng
Ligasyon tamponu (10X)	2 µl	2 µl
ATP (10mM)	1 µl	1 µl
T4 DNA ligaz (5U/µl)	0.8 µl	0.8 µl
dH ₂ O	$V_R=20 \mu\text{l}$ olacak şekilde belirlenmiştir.	
T=22 °C, t=16 st		



Şekil 4.6 r-pUC19 plasmidi tasarım şeması

Klonlamanın gerçekleşip-gerçekleşmediğini belirlemek için ligasyon karışımı plasmid taşımayan *E. coli* XLI-blue'ya CaCl₂ yöntemiyle aktarıldıktan sonra hücreler 100mg/ml ampisilin ve IPTG ile Xgal içeren katı ortama yayılmış ve 37°C'de mavi/beyaz koloniler oluşana kadar (36-48st.) inkübe edilmiştir.

Katı ortamda oluşan altı adet koloninin r-pUC19 taşıyıp taşımadığını kontrol etmek için paralel olarak plasmid DNA izolasyonu yapılmıştır. İzolasyon ürünlerinin jel elektroforez görüntülerine bakıldığında (Şekil 4.7) tüm kolonilerde pUC19'dan daha büyük DNA molekülleri taşıdığı görülmüş ve bu muhtemel r-pUC19'ların hibrit-gen taşıyıp-taşımadığı bu plasmidlerin, hibrit genin iki ucunda bulunan *Xba*I ve *Bam*HI restriksiyon enzimleriyle kesilmesiyle kontrol edilmiştir. Şekil 4.7'den görüldüğü gibi tüm kolonilerin kesilme tepkimesi sonucunda sadece bir tanesinde hibrit-gen büyüklüğüne yakın büyüklükte DNA büyüklüğü gözlenmiştir. Sonuç olarak klonlamanın başarılıyla gerçekleştiğine karar verilmiştir.

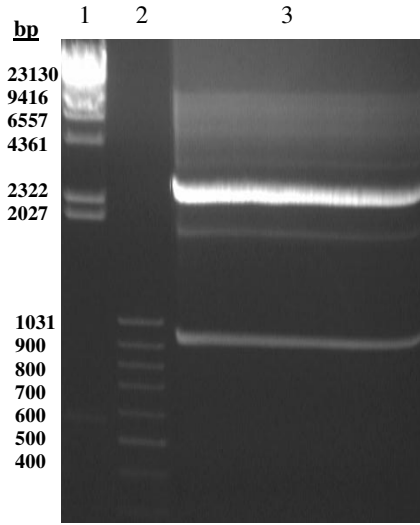


Şekil 4.7 a- Muhtemel r-pUC19 izolasyon görüntüleri; 1-6. İzole muhtemel r-pUC19, 7. Kesik pUC19, b- Muhtemel r-pUC19 un kontrolü: 1. Marker (λ DNA/*Hind*III), 2-3. muhtemel r-pUC19+*Bam*HI+*Xba*I, 4-5. saf pUC19, 6-7. Hibrit gen, 8. Marker (DNA ladder Low Range)

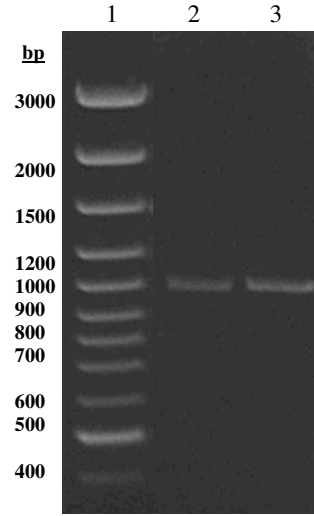
4.1.3 Hibrit-genin pMK4 *E. coli*-*Bacillus* shuttle vektörüne klonlanması

Hibrit-genin *E. coli*-*Bacillus* shuttle plasmidlerine klonlanabilmesi için *E. coli*'de derişimi arttırılmış olan r-pUC19 *E. coli* plasmidi öncelikle *Bam*HI restriksiyon

enzimiyle Tepkime 5.'de verilen koşullarda beş paralel işleme kesilmiş ve kesme işleminden sonra 65°C'de 15dk bekletilerek *Bam*HI enzimi inaktif hale getirilmiştir. *Bam*HI enzimi ile kesilen r-pUC19 NaAc+EtOH ile öktürölerek ayrılmış ve uygun miktarda su ile çözöldükten sonra *Sal*I restriksiyon enzimiyle Tepkime 6.'da verilen koşullarda kesilmiştir. Kesme işleminden sonra 65°C'de 15dk bekletilerek *Sal*I enzimi inaktif hale getirilmiş ve karışımın tamamı jelde koşturulmuştur (şekil 4.8). Koşturmadan sonra Fermentas DNA Ekstraksiyon Kit'i ile agaroz jelden hibrit-gen ekstrakte edilmiştir (şekil 4.9). Bu işlemler klonlama basamağında kullanmak için yeterli derişime sahip hibrit-gen elde edilinceye kadar tekrarlanmıştır.



şekil 4.8 r-pUC19 kesme tepkimesi sonucu; 1. Marker (λ DNA Hind III), 2. Marker (DNA Ladder, Low Range), 3. Kesik r-pUC19



şekil 4.9 Jelden ekstrakte edilmiş hibrit gen; 1. Marker (100 bp DNA Ladder), 2. Hibritgen, 3. Ekstrakte hibrit gen

Tepkime 5. r-pUC19 'un *Bam*HI ile yapışkan-uç kesimi için tepkime koşulları:

r-pUC19 plasmidi (100ng)	10 μ l
Tampon A	2 μ l
<i>Bam</i> HI enzimi (10U/ μ l)	2.5 μ l
dH ₂ O	5.5 μ l
T=37°C, t= 2 st	V _T = 20 μ l

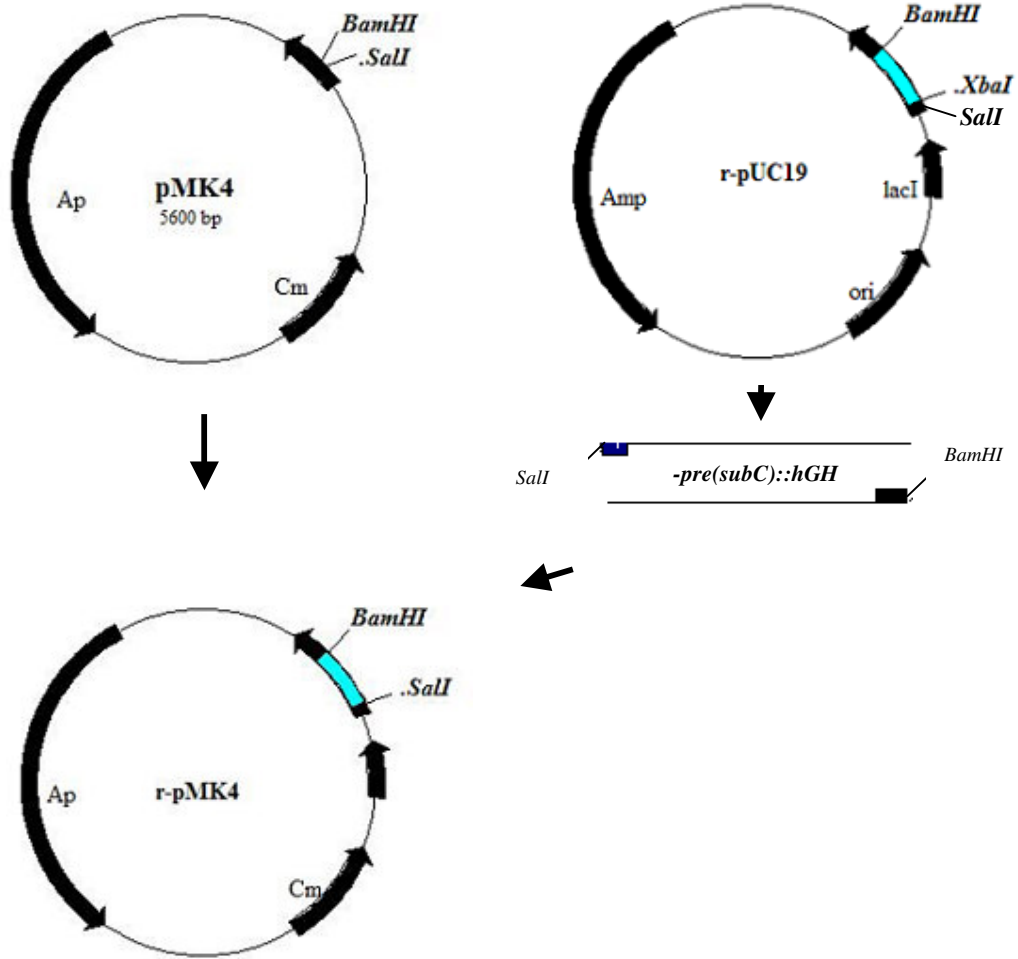
Tepkime 6. *Bam*HI enzimiyle kesilmiş r-pUC19 plasmidinin *Sal*I enzimiyle yapışkan-uç kesimi için tepkime koşulları:

r-pUC19 plasmidi (<i>Bam</i> HI ile kesilmiş)(100ng)	10 µl
Tampon A	2 µl
<i>Sal</i> I (10U/µl)	2 µl
dH ₂ O	6 µl
T=37°C, t= 2 st	V _T = 20 µl

Klonlamada kullanılacak olan pMK4 *E. coli-Bacillus* shuttle plasmidi öncelikle *E. coli*'den izole edilmiştir. İzole edilen pMK4 Fenol:Kloroform:İzoamilalkol (FKI) yöntemine göre saflaştırılarak klonlama için yeterli derişime sahip pMK4 elde edilmiştir. Saflaştırılmış olan pMK4 önce *Bam*HI restriksiyon enzimi ile Tepkime 5.'de verilen koşullarda beş paralel işleme kesilmiş ve kesme işleminden sonra 65°C'de 15dk bekletilerek *Bam*HI enzimi inaktif hale getirilmiştir. *Bam*HI enzimi ile kesilen pMK4 NaAc+EtOH ile çöktürülerek ayrılmış ve uygun miktarda su ile çözüldükten sonra *Sal*I restriksiyon enzimiyle Tepkime 6.'da verilen koşullarda kesilmiştir. Kesme işleminden sonra 65°C'de 15dk bekletilerek *Sal*I enzimi inaktif hale getirilmiş ve FKI ile saflaştırıldıktan sonra klonlama tepkimelerinde kullanılmıştır (Şekil 4.11). Kesik r-pUC19'den ekstrakte edilen hibrit-genin klonlama tepkimesi için uygun moleküler yapıya getirilen pMK4 plasmidine Tepkime 7.'de belirtilen koşullarda sub-klonlanması için deneysel çalışmalar paralel olarak yürütülmüştür.

Tepkime 7. Hibrit-genin pMK4 'e klonlanması için ligasyon tepkime koşulları:

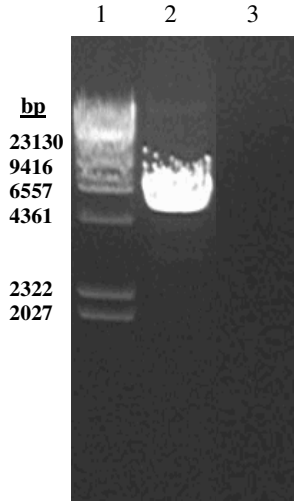
	<u>G/V=5</u>	<u>G/V=7</u>
Hibrit gen	~120 ng	~140 ng
PMK4 plasmidi	~24 ng	~20 ng
Ligasyon tamponu (10X)	2 µl	2 µl
ATP (10mM)	1,5 µl	1,5 µl
T4 DNA ligaz (5U/µl)	0.8 µl	0.8 µl
dH ₂ O	V _R =20 µl olacak şekilde belirlenmiştir.	
T=22 °C, t=16 st		



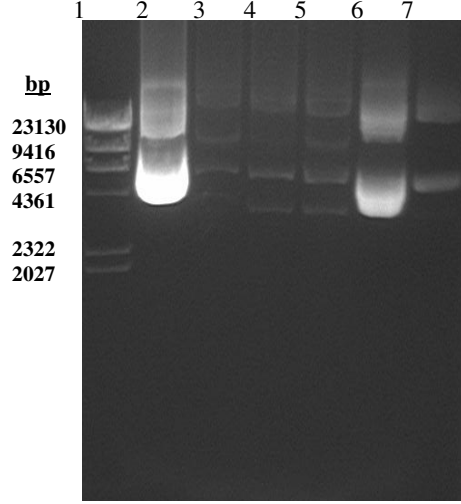
Şekil 4.10 r-pMK4 plasmidinin tasarım şeması

Tasarlanan, hibrit-gen taşıyan r-pMK4 şematik olarak Şekil 4.10’da verilmiştir. Klonlama sonucu elde edilen, hibrit-gen taşıyan r-pMK4 içermesi gereken ligasyon tepkime karışımı plasmid taşımayan *E. coli XLI-Blue*’ye $CaCl_2$ yöntemine göre aktarılmıştır. pMK4’e klonlama pUC19’de olduğu gibi *lacZ* geni içindeki poliklonlama bölgesine gerçekleştirilir. Böylece, pMK4’e klonlamanın gerçekleşip/gerçekleşmediği mavi/beyaz koloni oluşumu ile kontrol edilmiştir. Oluşan beş beyaz koloninin paralel izolasyonu yapılmış ve bunların jel-elektroforez görüntülerine (Şekil 4.12) göre hepsinin hibrit-gen taşıdıkları düşünülmüştür. Beş adet izole muhtemel r-pMK4 plasmidinin kalıp DNA olarak kullanılmasıyla gerçekleştirilen PCR tepkimeleri sonucundaki jel-elektroforez görüntülerinde tüm PCR ürünlerinde hibrit-gen bantı

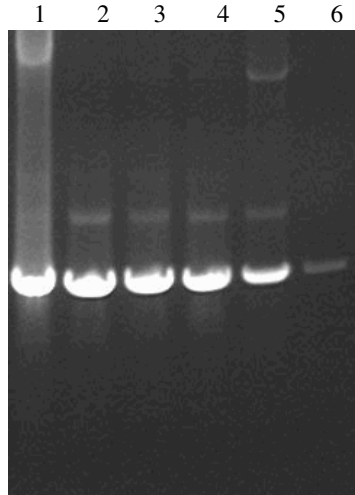
gözlendi (Şekil 4.13). Bundan sonra PCR ürünlerinden hibrit-gen bantı olan muhtemel r-pMK4'ler Tepkime 5 ve 6 'da verilmiş olan koşullarda *Bam*HI ve *Sal*I restriksiyon enzimleri ile ardışık olarak kesilmiştir. Kesme işlemiyle kontrolden sonra jel-elektroforez görüntüsünde sadece bir koloninin (G/V=5) hibrit-gen taşıdığı görülmüştür (Şekil 4.13).



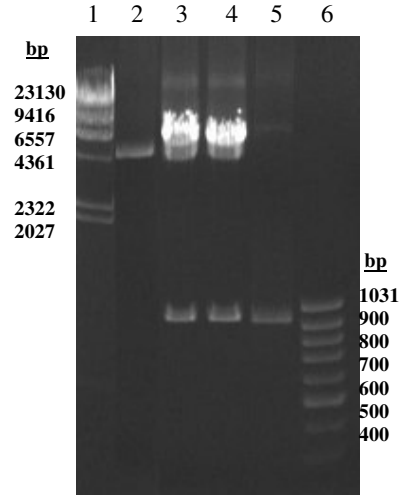
Şekil 4.11 *Bam*HI ve *Sal*I enzimleriyle kesilmiş pMK4; 1.Marker (λ DNA Hind III), 2. Kesik pMK4, 3. Kontrol



Şekil 4.12 İzole muhtemel r-pMK4 plasmidleri 1. Marker (λ DNA HindIII), 2-6. İzole muhtemel r-pMK4+*Sal*I+*Bam*HI, 7. Kesik pMK4



a

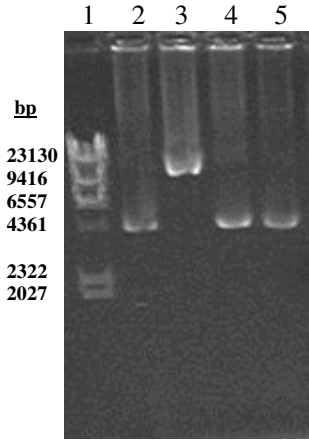


b

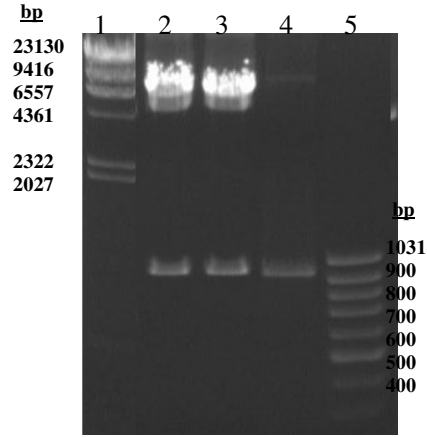
Şekil 4.13 a- Muhtemel r-pMK4 plasmidlerin PCR tepkime sonuçları; 1-5. PCR ürünleri , 6. Hibrit gen, b- Kesilmiş muhtemel r-pMK4 plasmidleri 1. Marker (λ DNA Hind III), 2. Kesik pMK4, 3-4. Muhtemel r-pMK4+ *Sal*I+*Bam*HI, 5. Hibrit gen,6. Marker (DNA ladder Low Range)

4.1.4 Geliştirilen r-pMK4'ün *Bacillus subtilis*'e transformasyonu

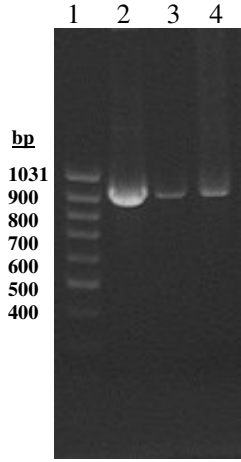
Hibrit-gen taşıyan *Bacillus-E. coli* shuttle plasmidi r-pMK4 *E. coli*'de çoğaltılıp izole edildikten sonra seçilen farklı *Bacillus* türü konak hücrelere elektroporasyon ile $C=25\mu F$, $R=200\Omega$ ve $V/L=10$ kV/cm koşullarında ve doğal transformasyon yöntemleriyle paralel olarak aktarılmıştır. Elde edilen kolonilerin rekombinant plasmidi taşıyıp taşımadıklarını kontrol etmek amacıyla plasmid izolasyonu yapılmış ve izolasyon ürünleri kalıp olarak kullanılarak PCR'da hibrit gen sentezlenmiştir. r-pMK4'ün transfer edildiği dört *Bacillus subtilis*'ten yapılan plasmid izolasyonuna (Şekil 4.14) ve bu plasmidlerin kontrolü için yapılan PCR'a ait jel görüntülerinden (Şekil 4.16) r-pMK4 transferinin başarılı olduğu belirlenmiştir. Sonuçta hibrit-gen taşıyan rekombinant *B.subtilis* BGSC-1A197 ve *B.subtilis* BGSC-1A751 geliştirilmiştir. Klonlamanın doğruluğunu kontrol için hibrit-gen *-pre(subC)::hGH* nükleotit dizini DNA dizin analiz cihazı ile Microsynth GmbH, İsviçre laboratuvarlarında analizlenmiştir. Analiz sonucunda *-pre(subC)::hGH* hibrit geninin nükleotit dizini elde edilmiş ve gen dizininin doğruluğu kanıtlanmıştır.



Şekil 4.14 İzole muhtemel r-pMK4'ler 1. λ DNA Hind III Marker, 2-5. İzole muhtemel r-pMK4'ler



Şekil 4.15 Kesik muhtemel r-pMK4'ler 1. λ DNA Hind III Marker, 2-3. Kesik r-MK4'ler, 4. Saf Hibrit gen 5. DNA Ladder Low Range



Şekil 4.16 Hibrit-genin PCR görüntüsü 1. DNA Ladder Low Range Marker, 2. Saf Hibrit gen, 3-4. Hibrit gen (r-pMK4)

4.2 *-pre(subC)::hGH::pMK4* Taşıyan Mikroorganizmaların hGH Üretim Performansı (Expression)

Metabolik mühendislik araştırma programı doğrultusunda 1. araştırma programında geliştirilmiş olan rekombinant *Bacillus subtilis* mikroorganizmaları kullanılarak ikinci aşamada mikrobiyolojik hava filtreli laboratuvar-ölçekli kesikli biyoreaktörlerde $V_R=110$ ml, $T=37^\circ\text{C}$, $N=200$ dk⁻¹ işletme koşullarında ortama eklenen proteaz inhibitörünün ve karbon kaynağı olarak kullanılan glukoz derişiminin hücre çoğalması ve hGH üretimi üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

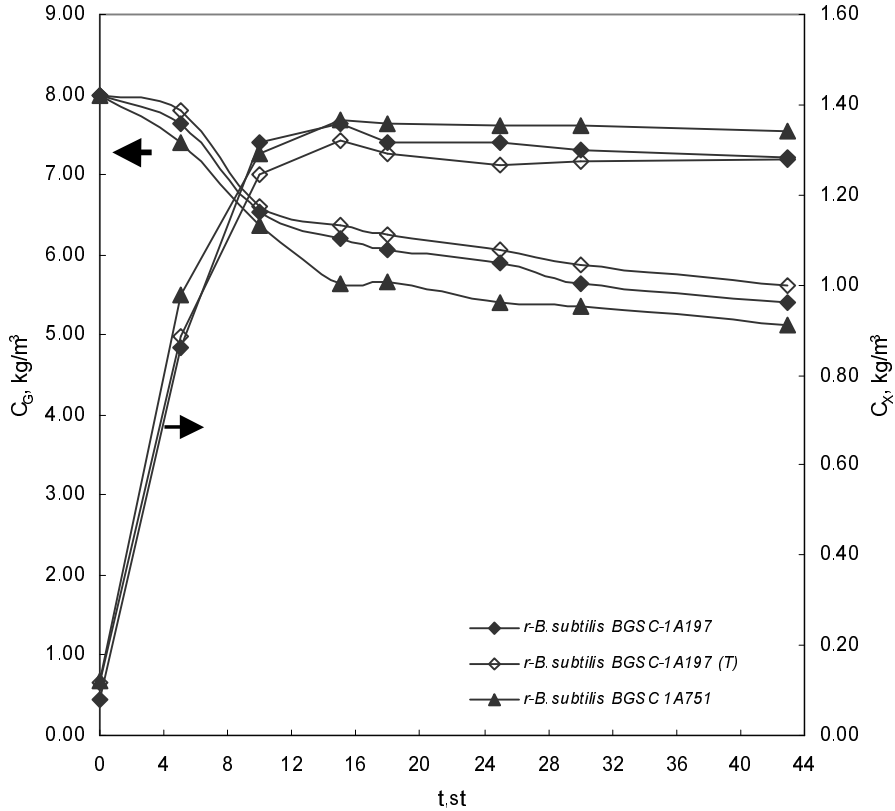
4.2.1 hGH üretimi için ortam tasarımı

Rekombinant *B.subtilis* BGSC-1A751 ve *B.subtilis* BGSC-1A197 'nin taşıdığı rekombinasnt plasmid *-pre(subC)::hGH::pMK4*, *Bacillus licheniformis* hücre-dışı enzimi serin alkali proteaz (SAP) geninin (*subC*) salgılamada görev yapan sinyal dizini *-pre(subC)*'yi taşımaktadır. Hücre içinde sinyal-peptid (*subC*) +hGH olarak üretilecek biyomolekülün sinyal-peptit ile hücre dışına 191 amino asitten oluşan hGH 'nu aktarımını gerçekleştirme tasarlanmıştır. Sonuç olarak r-*B.subtilis* 'in dizinin önündeki sinyal-peptit *-pre(subC)* tanıyarak üretime başladığı, gerideki dizinin *subC* yerine *hGH*

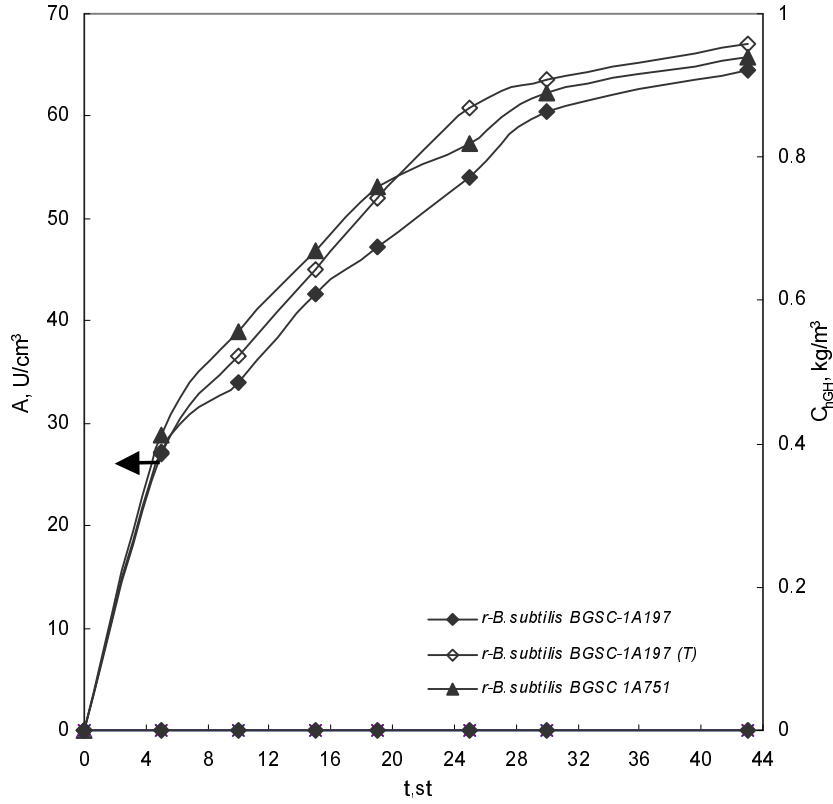
olmasının sentez ve taşınım mekanizmasını etkilememesi gerektiği düşünüldüğünden, ilk üretim deneylerinde temel ortam olarak aynı sinyal peptitle SAP üretimi için Çalık *et al.* (2004)'nin tasarladıkları üretim ortamı hücre-dışı hGH üretiminde kullanılmıştır (Çizelge 3.5).

4.2.1.1 Üretim ortamında tuz çözeltisinin etkisi

Araştırma programı doğrultusunda Çizelge 3.5'teki ortam bileşiminde $V_R=110 \text{ cm}^3$ çalışma hacimli mikrobiyolojik hava filtreli biyoreaktörlerde, $T= 37 \text{ }^\circ\text{C}$, $N= 200 \text{ dk}^{-1}$ işletme koşullarında iki farklı rekombinant mikroorganizma ile hGH üretim deneyi gerçekleştirilmiştir. 43 saat kalma süresince mikroorganizma derişimi, karbon kaynağı derişimi, SAP aktivitesi ve hGH derişimi izlenmiş ve sırasıyla Şekil 4.17 ve 4.18,'te sunulmuştur.



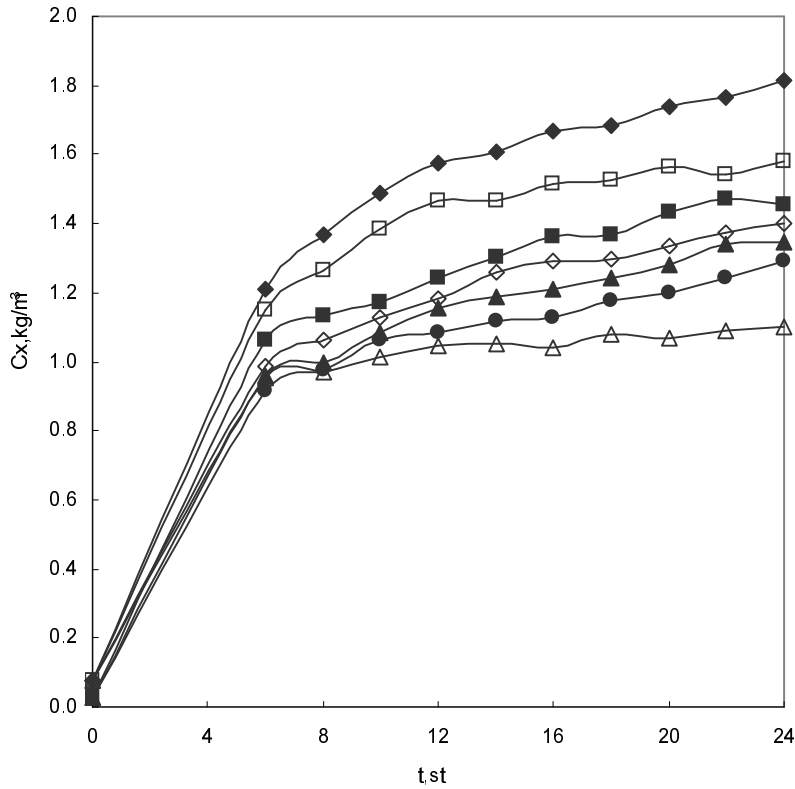
Şekil 4.17 *r-B.subtilis* BGSC-1A751 ve *r-B.subtilis* BGSC-1A197 için mikroorganizma derişiminin ve glukoz derişiminin t ile değişimi. $C_{GO}= 8 \text{ kg/m}^3$; $V_R= 110 \text{ cm}^3$; $T= 37 \text{ }^\circ\text{C}$; $N= 200 \text{ dk}^{-1}$; $\text{pH}_0= 7.25$



Şekil 4.18 *r-B.subtilis* BGSC-1A751 ve *r-B.subtilis* BGSC- 1A197 için SAP aktivitesi ve hGH derişiminin t ile değişimi. $C_{GO}= 8 \text{ kg/m}^3$; $V_R= 110 \text{ cm}^3$; $T= 37 \text{ }^\circ\text{C}$; $N= 200 \text{ dk}^{-1}$; $\text{pH}_0= 7.25$

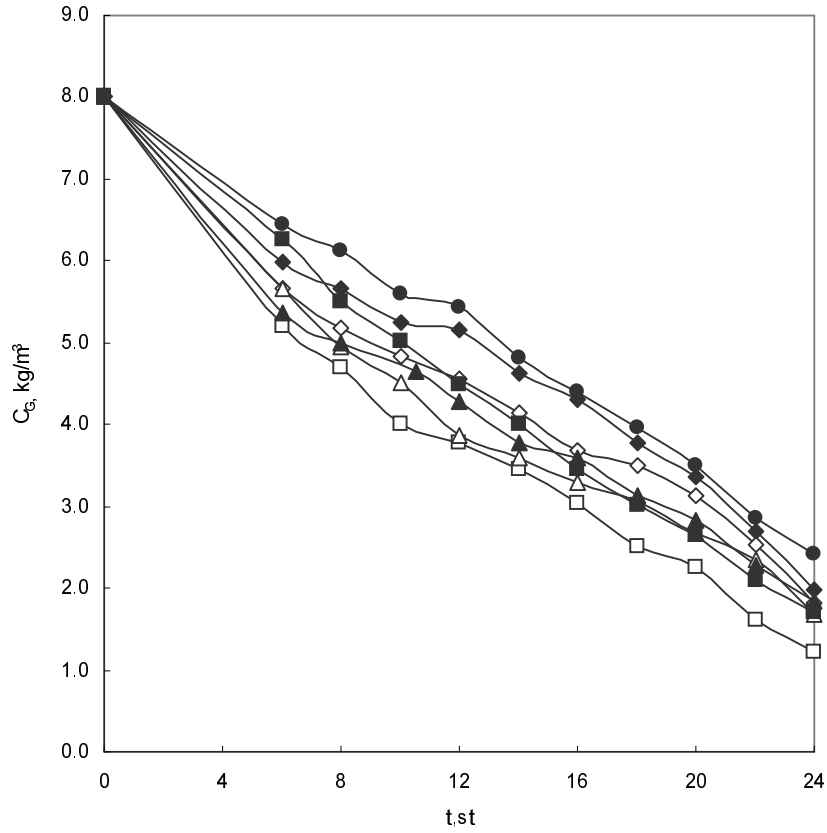
Biyoproses süresince her iki rekombinant mikroorganizma ile Çizelge 3.5'teki ortam bileşiminde hGH derişiminin kalma süresiyle değişimi izlenmiş ancak hGH üretimi gözlenmemiştir. *r-B.subtilis* BGSC-1A751 ve *r-B.subtilis* BGSC-1A197 için $t=15 \text{ st}$ 'te maksimum hücre derişimleri sırasıyla $C_x=1.35 \text{ kg/m}^3$ ve 1.28 kg/m^3 , maksimum SAP aktiviteleri $A=67$ ve 65 U/cm^3 olarak bulunmuştur. Biyoproses sonunda *r-B.subtilis* BGSC-1A751 ve *r-B.subtilis* BGSC-1A197, sırasıyla, glukozun % 43 ve % 40'nı tüketmiştir. İlk üretim deneylerinde SAP 'ın sinyal peptit ve başlatıcısının (promoter) kullanılması nedeniyle referans ortam olarak SAP üretim ortamı (Çalık *et al.* 2004) kullanılmıştır. Sonuç olarak bu referans ortamda biyoproses süresince üretilen proteaz enzimlerinin üretilen proteini parçaladığı düşünülerek ortama proteaz inhibitörünün (P-2714) ve proteaz üretimini inhibe ettiği bilinen tuz çözeltisinin (Pollock 1965) ayrı-ayrı eklenerek etkilerinin araştırılmasına karar verilmiştir.

Üretim ortamlarına $t_e=6$ st'te 0.744, 7.44 ve 74.4 μM derişimlerinde eklenen proteaz inhibitör kokteylinin, ve 25.2 mM tuz çözeltisinin hGH üretimi üzerindeki etkileri incelenmiştir (Şekil 4.19-4.24). Proteaz inhibitörü eklemenin gerektiği bulunmuştur. Üretim ortamına eklenen proteaz inhibitör derişimi etkisiyle *r-B.subtilis* BGSC-1A751 hücre derişiminin, glukoz derişiminin ve hGH derişiminin kalma süresiyle değişimi Şekil 4.19, 4.20 ve 4.21'de verilmiştir. Maksimum hGH derişimi 7.44 μM proteaz inhibitör kokteyli eklenmesiyle gerçekleştirilmiş olan üretim ortamında $t=24$ st'te $C_{\text{hGH}}=0.027 \text{ kg/m}^3$ olarak bulunmuştur (Şekil 4.21). Şekil 4.19'dan da görüldüğü gibi proteaz inhibitör kokteylinin eklendiği $t=6$ st'e kadar hücre derişimindeki artış yüksektir; üretim ortamına proteaz inhibitör kokteylinin ilavesi hücre çoğalmasını etkilemiştir. Tuz çözeltisi ile üretilen proteazların inhibisyonu, inhibitör kokteyline göre daha az etkilidir (Şekil 4.21).

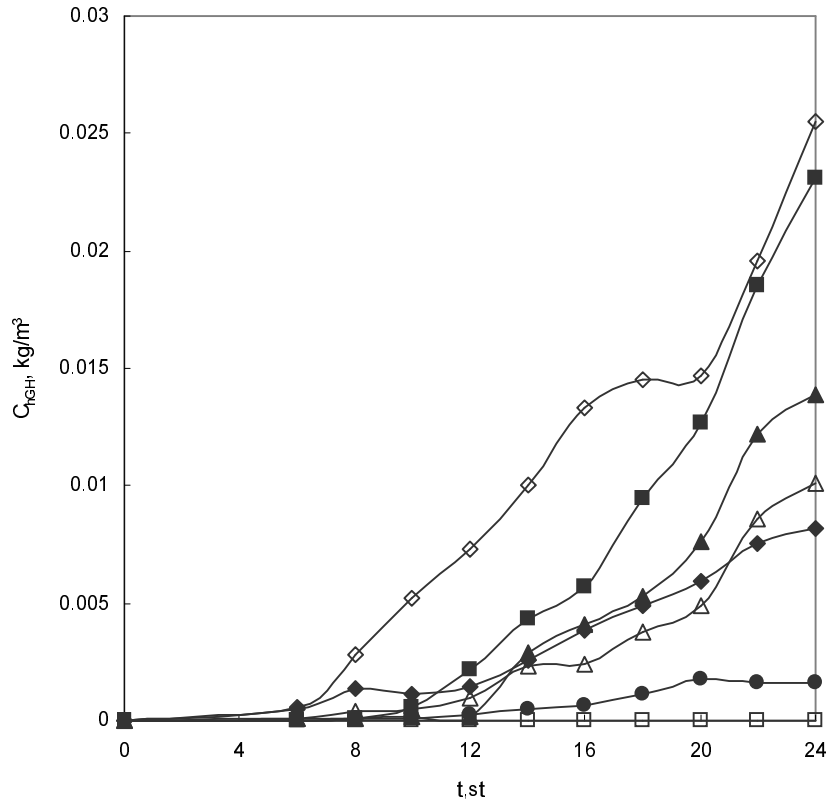


Şekil 4.19 *r-B.subtilis* BGSC-1A751 derişiminin t ile değişimine eklenen inhibitör derişiminin etkisi: $V_R=110 \text{ cm}^3$; $T=37 \text{ }^\circ\text{C}$; $N=200 \text{ dk}^{-1}$; $C_{G_0}=8 \text{ kg/m}^3$; $\text{pH}_0=7.25$. Proteaz inhibitörsüz, (□); tuz çözeltisi, (*); proteaz inhibitörlü (μM): (◆) 0.744; (■) 3.72; (◇) 7.44; (▲) 14.28; (△) 74.4

Biyoproses süresince proteaz inhibitörünün hGH derişimine etkisi incelendiğinde; 0-7.44 μM proteaz derişiminin proteaz inhibisyonu için az, 7.44 - 74.4 μM proteaz derişiminin ise fazla gelmesi nedeniyle ürün inhibisyonuna neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.21). Şekil 4.20'deki glukoz derişiminin kalma süresi ile değişimi incelendiğinde glukoz derişiminin eklenen proteaz derişimine bağlı olarak en az % 69.7'si (tuz çözetisi eklenen koşulda) en fazla da % 84.7'si (proteaz inhibitörsüz koşulda) tüketilmiştir. 7.44 μM derişiminde proteaz inhibitör eklenmesi hücre çoğalmasını dolayısıyla glukoz tüketimini inhibe ederken hGH derişimini arttırmıştır. *r-B.subtilis* BGSC-1A751 ile hGH üretimi açısından optimum proteaz inhibitör derişimi 7.44 μM olarak belirlenmiştir.



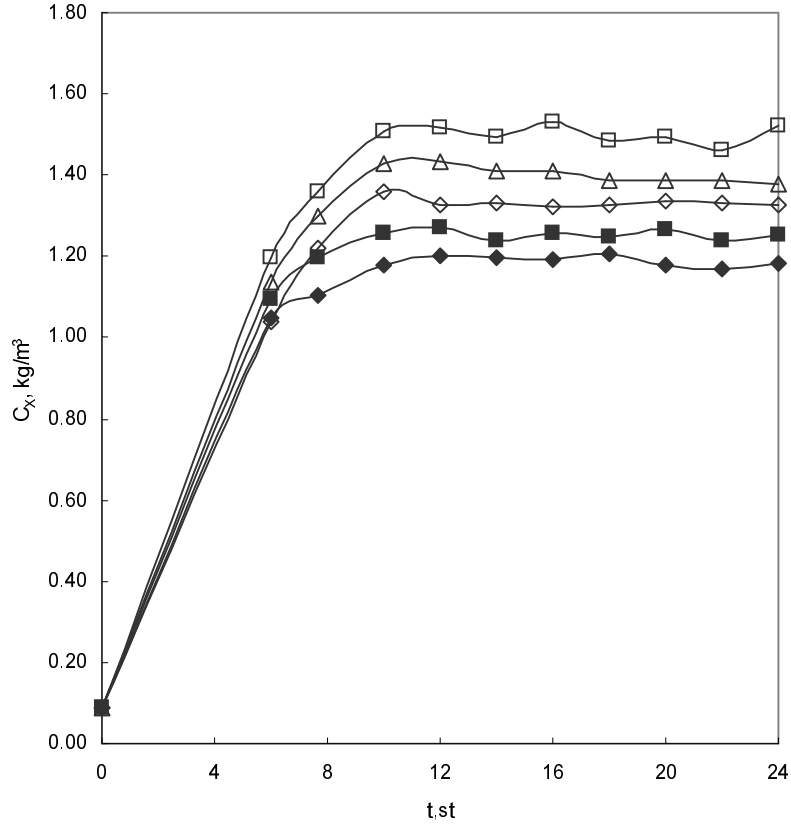
Şekil 4.20 *r-B.subtilis* BGSC-1A751 ile glukoz derişiminin t ile değişimine eklenen inhibitör derişiminin etkisi: $V_R= 110 \text{ cm}^3$; $T= 37 \text{ }^\circ\text{C}$; $N= 200 \text{ dk}^{-1}$; $C_{G0}= 8 \text{ kg/m}^3$; $\text{pH}_0= 7.25$. Proteaz inhibitörsüz, (\square); tuz çözeltili, (\bullet); proteaz inhibitörlü(μM): (\blacklozenge) 0.744; (\blacksquare) 3.72; (\diamond) 7.44; (\blacktriangle) 14.28; (\triangle)74.4



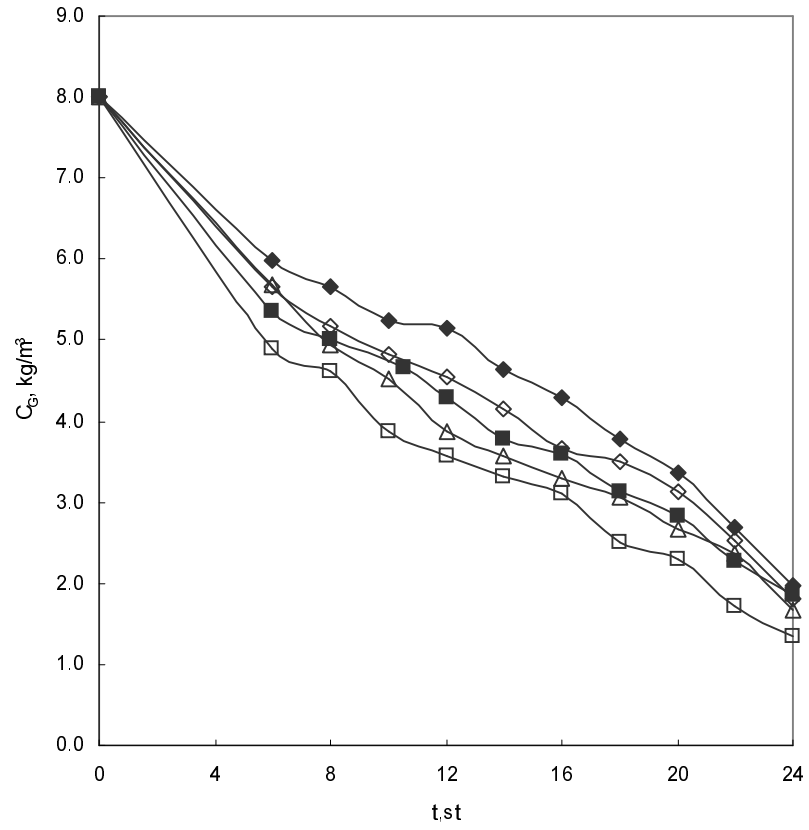
Şekil 4.21 *r-B.subtilis* BGSC-1A751 ile hGH derişiminin t ile değişimine eklenen inhibitör derişiminin etkisi: $V_R = 110 \text{ cm}^3$; $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$; $N = 200 \text{ dk}^{-1}$; $C_{G_0} = 8 \text{ kg/m}^3$; $\text{pH}_0 = 7.25$. Proteaz inhibitörsüz, (□); tuz çözeltili, (✱); proteaz inhibitörlü(μM): (◆) 0.744; (■) 3.72; (◇) 7.44; (▲) 14.28; (△)74.4

r-B.subtilis BGSC-1A197 kullanılarak üretim ortamına eklenen proteaz derişimine göre hücre, glukoz derişiminin ve hGH derişimlerinin kalma süresiyle değişimi sırasıyla Şekil 4.22, 4.23 ve 4.24'de verilmiştir. Biyoproses süresince hGH derişiminin değişimi incelenmiş; maksimum hGH derişimi $7.44 \mu\text{M}$ proteaz inhibitör kokteyli eklenmesiyle gerçekleştirilmiş olan üretim deneyinde $t=24 \text{ st}$ 'te $C_{\text{hGH}}=0.0275 \text{ kg/m}^3$ olarak bulunmuştur (Şekil 4.24.). Şekil 4.22'den de görüldüğü gibi proteaz inhibitör kokteylinin eklendiği zamana ($t=6 \text{ st}$) kadar hücre derişimindeki artış $t=6-12 \text{ st}$ aralığına göre daha fazladır. Biyoproses süresince proteaz inhibitörünün hGH derişimine etkisi incelendiğinde, $0-7.44 \mu\text{M}$ proteaz derişiminin proteaz inhibisyonu için az, $7.44 - 74.4 \mu\text{M}$ proteaz derişiminin ise fazla gelmesi nedeniyle ürün inhibisyonuna neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.24). *r-B.subtilis* BGSC-1A197 ile hGH üretimi için optimum proteaz inhibitör derişimi $7.44 \mu\text{M}$ olarak belirlenmiştir. Biyoproses sonunda glukozun

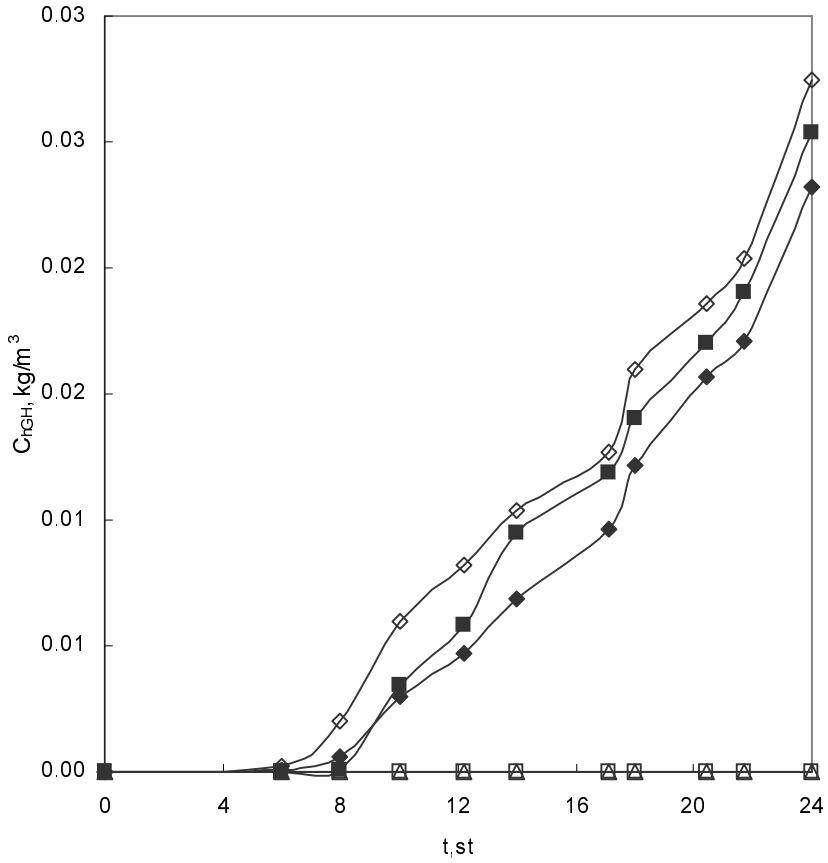
en fazla % 83'ü, en az da % 75'i tüketilmiştir. Her iki *r-Bacillus* için glukoz derişim profilleri benzerdir. Hücre derişimi artarken glukoz derişimleri azalmıştır. Proteaz inhibitörü *r-B.subtilis* BGSC-1A751'de olduğu gibi *r-B.subtilis* BGSC-1A197'de hücre çoğalmasını ve dolayısıyla glukoz tüketimini etkilemiştir. Her iki mikroorganizma için de en uygun proteaz derişim değeri 7.44 μM olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.22 *r-B.subtilis* BGSC-1A197 derişiminin t ile değışimine eklenen inhibitör derişiminin etkisi: $V_R= 110 \text{ cm}^3$; $T= 37 \text{ }^\circ\text{C}$; $N= 200 \text{ dk}^{-1}$; $C_{G_0}= 8 \text{ kg/m}^3$; $\text{pH}_0= 7.25$. Proteaz inhibitsüz, (□); proteaz inhibitörlü (μM): (◆) 0.744; (■) 3.72; (◇) 7.44; (△) 74.4



Şekil 4.23 *r-B.subtilis* BGSC-1A197 ile glukoz derişiminin t ile değişimine eklenen inhibitör derişiminin etkisi: $V_R = 110 \text{ cm}^3$; $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$; $N = 200 \text{ dk}^{-1}$; $C_{G_0} = 8 \text{ kg/m}^3$; $\text{pH}_0 = 7.25$. Proteaz inhibitörsüz, (□); proteaz inhibitörlü (μM): (◆) 0.744; (■) 3.72; (◇) 7.44; (△) 74.4



Şekil 4.24 *r-B.subtilis* BGSC-1A197 ile hGH derişiminin t ile değişimine eklenen inhibitör derişiminin etkisi: $V_R = 110 \text{ cm}^3$; $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$; $N = 200 \text{ dk}^{-1}$; $C_{G_0} = 8 \text{ kg/m}^3$; $\text{pH}_0 = 7.25$. Proteaz inhibitörsüz, (□); proteaz inhibitörlü (μM): (◆) 0.744; (■) 3.72; (◇) 7.44; (△) 74.4

4.2.1.2 Başlangıç glukoz derişiminin etkisi

Mikroorganizmalar gereksinimleri olan enerjiyi, ortamda bulunan bileşiklerin kimyasal bağlarında depolanmış enerjiyi kullanarak sağlar. Karbon kaynağı olarak seçilen bileşik –örneğin, glukoz- metabolizmaya özgün bir yoldan girerek katabolik tepkimelerle küçük molekülü ara-ürünlere veya yan-ürünlere dönüştürülerek eşanlı olarak enerji (ATP, NADH, NADPH) üretilir. Kullanılan karbon kaynağının özelliklerine ve biyoreaktör işletme koşullarına –oksijen aktarımı, pH ve sıcaklık- bağılı olarak hücre içi merkezi döngü ve metabolik yolizindeki katabolizma tepkimeleri, enerji üretim

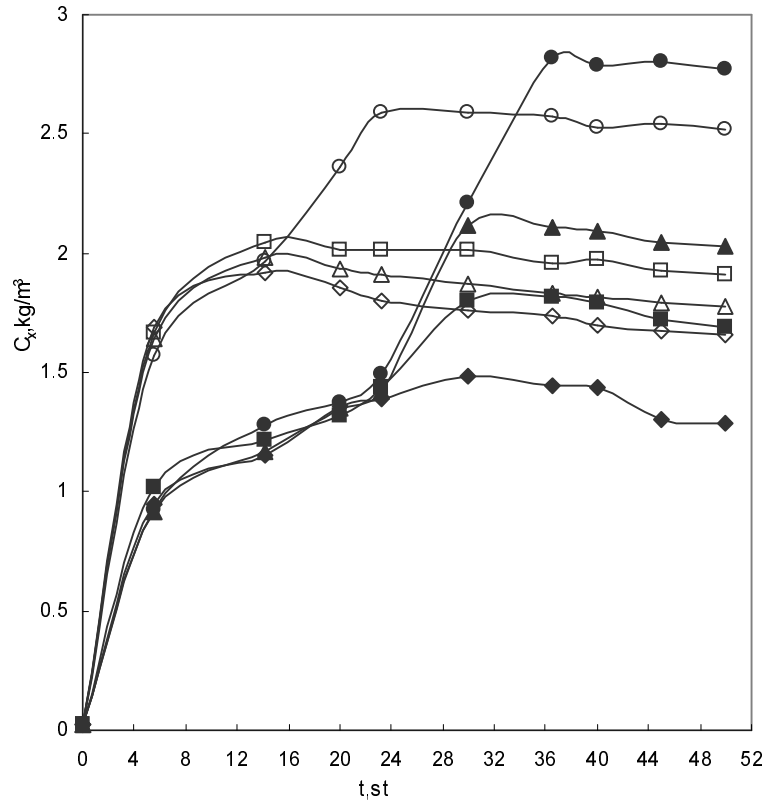
tepkimleri ve hızları belirlenir. Karbon kaynağının (substratın) indirgenme derecesinin (γ_s) mikroorganizma çoğalması üzerine etkisi büyüktür. γ_i i-bileşiğinin oksidasyonu için redoks yarı tepkimesinde verdiği elektron sayısıdır. $\gamma_s > 4$ olması durumunda karbon-kısıtlamalı ancak yeterli enerji varlığında çoğalma gerçekleşirken, $\gamma_s < 4$ ise enerji kısıtlamalı ancak yeterli karbon kaynağı varlığında gerçekleşir. $\gamma_s = 4-4.5$ 'in üzerinde olduğunda substrattan ATP üretim verimi, hücre oluşumu için ATP gereksinimini aşabilir; sonuçta yüksek hücre içi metabolik tepkime hızlarına ulaşmak için enerji fazlası –enerji gerektiren hücre dışı ürünler dahil- enerji tüketen tepkimelerce kullanılır (Çalık 1998).

Hücreye aktif transferle taşınan ve karbon katabolizmasına glikoliz yolizinin başından giren glukoz mikroorganizmaların düşük oksijen derişimlerinde bile kolaylıkla tüketilebilen ve $\gamma (=4)$ değerinin biyoproseslerde kullanılan diğer karbon ve enerji kaynaklarına kıyasla daha yüksek olması nedeniyle biyoteknolojik proseslerde tanımlanmış ortamda öncelikle düşünülen karbon ve enerji kaynağıdır (Çalık 1998).

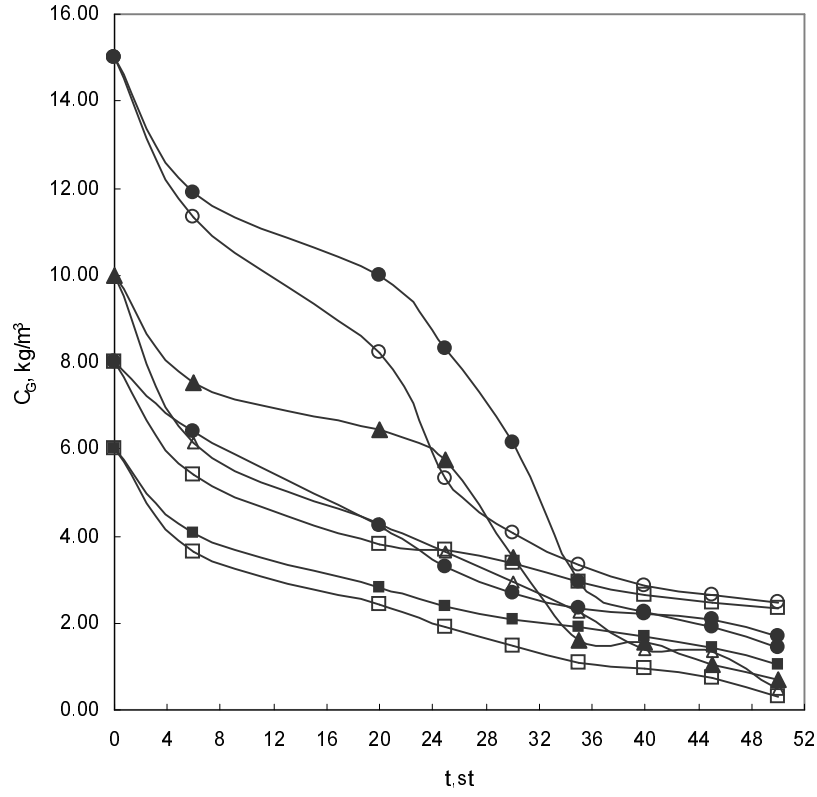
Araştırma programı kapsamında hGH üretimine başlangıç glukoz derişiminin etkisi Çizelge 3.5'teki ortam bileşiminde $V_R = 110 \text{ cm}^3$ çalışma hacimli mikrobiyolojik hava filtreli biyoreaktörlerde, $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$, $N = 200 \text{ dk}^{-1}$ işletme koşullarında $t = 50 \text{ st}$ süreyle gerçekleştirilen deney programı ile incelenmiştir. Başlangıç glukoz derişimleri $C_{G_0} = 6, 8, 10, \text{ ve } 15 \text{ kg/m}^3$ olarak belirlenmiştir. Hücre derişiminin kalma süresi ve başlangıç glukoz derişimi ile değışimi Şekil 4.25, hGH derişiminin kalma süresi ve başlangıç glukoz derişimi ile değışimi Şekil 4.27, ve glukoz derişimlerinin kalma süresi ile değışimi ise Şekil 4.26 'de verilmiştir.

r-B.subtilis BGSC-1A197 için kalma süresiyle hücre derişiminin değışimi incelenmiş; ve maksimum hücre derişimi $C_{G_0} = 15 \text{ kg/m}^3$ başlangıç glukoz derişiminde, $t = 25 \text{ st}$ 'te $C_X = 2.7 \text{ kg/m}^3$ olarak elde edilmiştir (Şekil 4.25). Şekil 4.25'ten görüldüğü gibi prosesin ilk 15 saatinde mikroorganizma derişimi her dört glukoz derişimi ile yaklaşık aynı seviyelerde olurken $t = 15 \text{ st}$ 'ten sonra $C_{G_0} = 6, 8, 10 \text{ kg/m}^3$ başlangıç glukoz derişimlerinde mikroorganizma derişimlerinin yaklaşık olarak sabit kalmış diğer ortamda ise 25. saate kadar çoğalma sürmüş daha sonra ise duraklama fazına

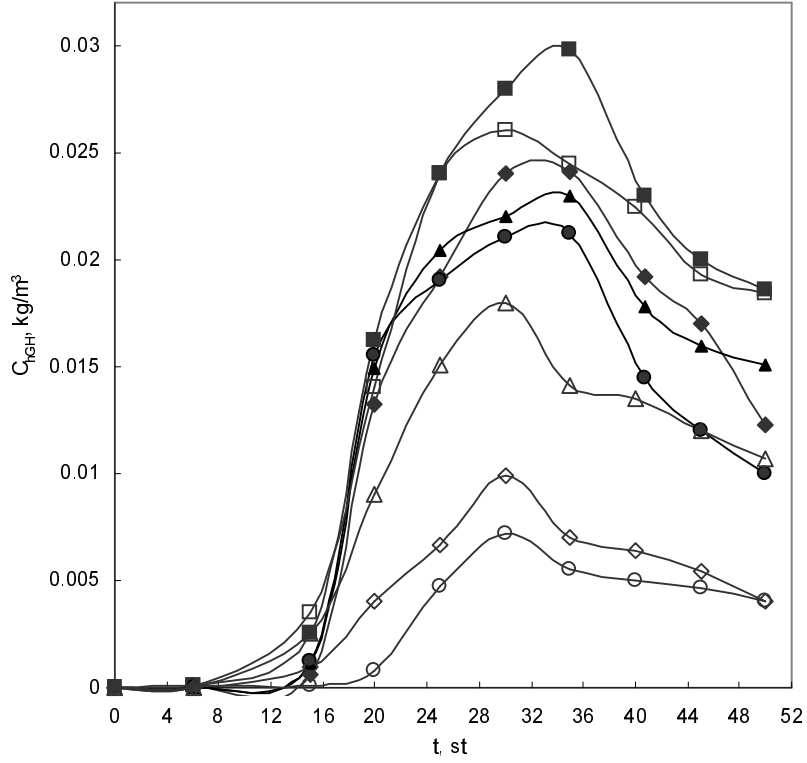
geçilmiştir. *r-B.subtilis* BGSC- 1A197 ile hGH üretiminde glukoz derişimlerinin kalma süresi ve başlangıç glukoz derişimi ile değişimi incelendiğinde (Şekil 4.26), t= 15 st'e kadar başlangıçtaki glukozun %62'nin ve biyoproses sonunda (t=50 st) ise %92'nin tüketildiği bulunmuştur. hGH derişimi üstel çoğalma fazından (t= 15 st'ten) sonra t=30 st'te kadar artmıştır. Biyoproses süresince maksimum hücre derişimi $C_{Go}= 8 \text{ kg/m}^3$ başlangıç glukoz derişiminde t= 30 st'te $C_{hGH}= 0.026 \text{ kg/m}^3$ olarak bulunmuştur.



Şekil 4.25 Mikroorganizma derişiminin t ile değişimine başlangıç glukoz derişiminin etkisi: $V_R= 110 \text{ cm}^3$; $T= 37 \text{ }^\circ\text{C}$; $N= 200 \text{ dk}^{-1}$; $\text{pH}_0= 7.25$
r-B.subtilis BGSC-1A751 için $C_{Go}(\text{kg/m}^3)$: (◆)6,0; (■)8,0; (▲)10,0; (●)15,0
r-B.subtilis BGSC-1A197 için $C_{Go}(\text{kg/m}^3)$: (◇)6,0; (□)8,0; (△)10,0; (⊙)15,0



Şekil 4.26 Glukoz derişiminin t ile değişimi: $V_R= 110 \text{ cm}^3$; $T= 37 \text{ }^\circ\text{C}$; $N= 200 \text{ dk}^{-1}$; $\text{pH}_0= 7.25$
r-B.subtilis BGSC-1A751 için $C_{G0}(\text{kg/m}^3)$: (\blacklozenge)6,0; (\blacksquare)8,0; (\blacktriangle)10,0; (\blackstar)15,0
r-B.subtilis BGSC-1A197 için $C_{G0}(\text{kg/m}^3)$: (\diamond)6,0; (\square)8,0; (\triangle)10,0; (\odot)15,0

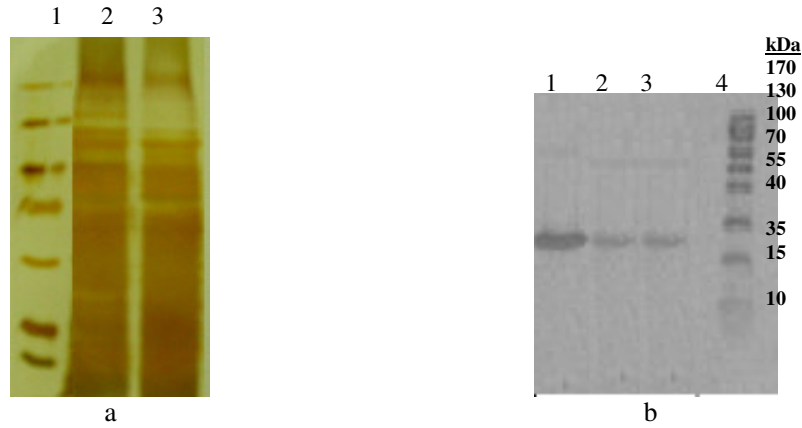


Şekil 4.27 hGH derişiminin t ile değişimine başlangıç glukoz derişiminin etkisi:
 $V_R = 110 \text{ cm}^3$; $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$; $N = 200 \text{ dk}^{-1}$; $\text{pH}_0 = 7.25$
r-B.subtilis BGSC-1A751 için $C_{G_0}(\text{kg/m}^3)$: (◆)6,0;(■)8,0;(▲)10,0;(●)15,0
r-B.subtilis BGSC-1A197 için $C_{G_0}(\text{kg/m}^3)$:(◇)6,0;(□)8,0;(△)10,0;(☆)15,0

r-B.subtilis BGSC-1A751 için biyoproses süresince hücre derişiminin değişimi incelenmiş; ve maksimum hücre derişimi $C_{G_0} = 15 \text{ kg/m}^3$ başlangıç glukoz derişiminde, $t = 36.5 \text{ st}'te$ $C_X = 2.8 \text{ kg/m}^3$ olarak elde edilmiştir (Şekil 4.25). Şekil 4.25'ten görüldüğü gibi prosesin ilk 25 saatinde mikroorganizma derişimi her dört glukoz derişimi için yaklaşık aynı seviyelerde olurken $t = 30 \text{ st}'te$ $C_{G_0} = 6, 8, 10 \text{ kg/m}^3$ başlangıç glukoz derişimlerinde mikroorganizma üstel çoğalma fazını tamamlamış, $C_{G_0} = 15 \text{ kg/m}^3$ derişimli ortamda ise 36.5 saate kadar üstel çoğalma sürmüş daha sonra ise duraklama fazına geçilmiştir. *r-B.subtilis* BGSC-1A751 ile hGH üretiminde glukoz derişimlerinin kalma süresi ve başlangıç glukoz derişimi ile değişimi incelendiğinde (Şekil 4.26), $t = 25 \text{ st}'te$ kadar başlangıçtaki glukozun %45'nin ve biyoproses sonunda ($t = 50 \text{ st}'te$) ise %85'nin tüketildiği bulunmuştur. *r-B.subtilis* BGSC-1A751 ile hGH derişimindeki değişim *r-B.subtilis* BGSC-1A197'nin hGH derişimine benzer şekilde $t = 15 \text{ st}'ten$ sonra

t=35 st'te kadar artmış, t=35-50 st arasında ise azalmıştır. Maksimum hücre derişimi $C_{G_0} = 8 \text{ kg/m}^3$ başlangıç glukoz derişiminde t= 35 st'te $C_{hGH} = 0,0298 \text{ kg/m}^3$ olarak bulunmuştur (Şekil 4.27). Her iki rekombinant mikroorganizma için de $C_{G_0} = 15 \text{ kg/m}^3$ başlangıç glukoz derişimi koşulunda üstel çoğalma fazında tüketilen glukoz derişimi ve buna bağlı olarak hücre çoğalması da daha fazladır. *r-B.subtilis* BGSC-1A197 için glukozun % 40'ü, *r-B.subtilis* BGSC-1A751 için ise % 69.7'si üstel çoğalma fazında tüketilmiştir.

Üretim ortamında bulunan diğer protein bantları SDS-PAGE analizi sonucunda görülmüştür. Poliakrilamid jele yüklenen örnekler dikey jel elektroforezde koşturularak protein bantları elde edilmiştir (Şekil 4.28.a). Üretilen hGH'nin insanda üretilen ile aynı yapı olup-olmadığını belirlemek için Western Blot analizi yapılmıştır. Analiz sonunda blot'ta hGH bantı gözlenmiştir (Şekil 4.28.b). Dolayısıyla *r-B.subtilis* BGSC-1A751 ve *r-B.subtilis* BGSC-1A191 ile aktif yapıda hGH üretilmiştir.



Şekil 4.28 a- Laboratuvar ölçek üretim deneyi sonucunda SDS-PAGE analizi
 1. Marker, 2. Üretilen hGH (*r-B.subtilis* BGSC-1A751 ile),
 3. Üretilen hGH (*r-B.subtilis* BGSC-1A197 ile),
 b- Laboratuvar ölçekte üretilen hGH'nin Western Blot analiz sonucu
 1. saf hGH, 2. Üretilen hGH (*r-B.subtilis* BGSC-1A751 ile),
 3. Üretilen hGH (*r-B.subtilis* BGSC-1A197 ile), 4.Marker

r-B.subtilis BGSC-1A751 ve *r-B.subtilis* BGSC-1A197, hGH üretimi açısından kıyaslandığında her ikisi ile de $C_{G_0} = 8 \text{ kg/m}^3$ başlangıç glukoz derişiminde maksimum hGH üretilmiştir. Fakat *r-B.subtilis* BGSC-1A751 ile *r-B.subtilis* BGSC-1A197'ye göre

% 12.75 daha fazla hGH üretilmiştir. Böylece, alkali proteaz ve nötral proteaz genleri silinmiş olan *r-B.subtilis* BGSC-1A751 ile araştırma programının sürmesine karar verilmiştir.

4.3 Rekombinant hGH Üretimine Oksijen Aktarım Etkileri

4.3.1 Oksijen aktarımının etkileri

r-B.subtilis BGSC-1A751 ile hGH üretiminde oksijen aktarım etkilerinin incelenmesi amacıyla $V=1.0 \text{ dm}^3$ pilot-ölçek biyoreaktörlerde $V_R=0.5 \text{ dm}^3$ tepkime hacmi oluşturularak, $Q_o/V_R=0.5, 0.7 \text{ vvm}$ hava giriş hızlarında ve $N=500, 700$ ve 800 dk^{-1} karıştırma hızları kullanılarak oluşturulan dört farklı oksijen aktarım koşulunda, toplam $t=32 \text{ st}$ kalma süreli yarı-kesikli hGH üretim deneyleri -laboratuvar ölçekte bulunan optimum koşullar kullanılarak- tasarlanmıştır. Pilot ölçek biyoreaktörlerde biyoproses süresince karıştırma hızı, çözülmüş oksijen derişimi ve başlangıç değeri $\text{pH}_o=7.25$ olan pH 'ın değışimi sürekli-ölçümle izlenmiş; sistemden alınan örneklerde girdi, hücre, ürün derişimleri ölçülmüş; Dinamik Yöntem ile de biyoproses süresince sıvı faz hacımsal kütle aktarım katsayısı K_{La} ve mikroorganizma oksijen tüketim hızı $-r_o$ belirlenmiştir. *r-B.subtilis* BGSC-1A751'in üretim performansını sınamak için her oksijen aktarım koşulu için yapılan deneye paralel olarak, 8 kg m^{-3} glukoz içeren ortamla 110 cm^3 çalışma hacımlı laboratuvar ölçek biyoreaktörlerde referans hGH üretimleri gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.5 Oksijen aktarım koşulları ve kısaltmaları

$Q_o/V_R, \text{ vvm}$	$N, \text{ dk}^{-1}$	Kısaltma
0.5	500	LOT
0.5	700	MOT1
0.5	800	MOT2
0.7	800	HOT

Biyoproses süresince pH 'ın oksijen aktarım koşulu ve kalma süresi ile değışimi (Şekil 4.29) incelendiğinde; ortam pH 'ının proteaz inhibitörü eklendiği zamana ($t=4\text{st}$) kadar

hızlı ($t=0-4$ st) sonra daha yavaş ($t=4-22$ st) azaldığı ve bir minimum değere, MOT1'de $pH=6.73$, MOT2'de $pH=6.6$, HOT'ta $pH=6.52$, ulaştıktan sonra arttığı görülmektedir. hGH üretim periyodunda ($t=21-32$ st) da hGH derişiminin artışıyla pH artmıştır. Oksijen aktarımının artışıyla pH'nın $t=0-4$ st arasında daha hızlı azaldığı ve minimum değere ulaştıktan sonra daha hızlı arttığı, minimum pH değerine ulaşıldı kalma süresini oksijen aktarımının artmasıyla ileriye kaydı görülmüştür. Proses sonunda ortamın pH değeri LOT, MOT1, MOT2 ve HOT koşullarında sırasıyla 6.67, 6.8, 6.68 ve 6.52 olarak kalmıştır.

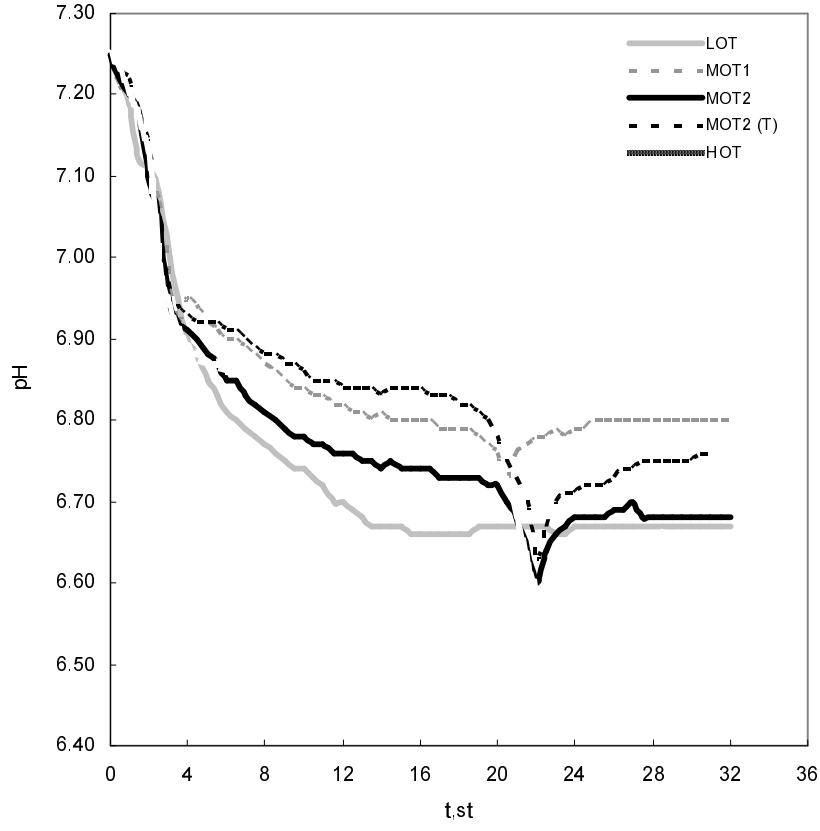
Çözünmüş oksijen derişiminin oksijen aktarım koşulları ve kalma süresi ile değişimi (Şekil 4.30) incelendiğinde; her üç koşul içinde benzer profiller gözlenmiştir. MOT2 koşulu için çözünmüş oksijen derişimi $t=3-4$ st arasında sıfıra inmiş ancak $t=4$ st'te proteaz inhibitörünün eklenmesiyle artmış ve $t=17-18$ st'e kadar sabit kalmış, $t=18-21$ st'leri arasında sıfıra yaklaştıktan sonra proses sonuna kadar bu seviyede kalmıştır. MOT1 ve HOT koşulunda da çözünmüş oksijen derişim profilleri MOT2'ye benzerdir. Ancak HOT'nin pH'da olduğu gibi oksijen aktarım koşulunun artmasıyla da MOT1 ve MOT2'nin minimum değerlere ulaştığı $t=3-4$ st (sırasıyla $C_O=0.022$ ve 0.002 mmol/l) ve $t=18-21$ st (sırasıyla $C_O=0.024$ ve 0.001 mmol/l) zaman aralıklarında çözünmüş oksijen derişim profili geriye çekilmiştir. LOT koşulu için ise çözünmüş oksijen derişimi $t=3$ st'te kadar hızla azaldıktan sonra proses sonuna kadar bu değerde sabit kalmıştır. Her üç karıştırma hızında da oksijen seviyelerinin çok düşük olması, hücre çoğalması ve hGH üretimi için oksijen ihtiyacının yüksek olduğunu göstermiştir.

Mikroorganizma derişiminin oksijen aktarım koşulu ve kalma süresi ile değişimi (Şekil 4.31) incelendiğinde; mikroorganizma derişimlerinin $t=4$ st'e kadar hızla arttığı ancak $t=4$ st'te proteaz inhibitörünün eklenmesiyle $t=18$ st'e kadar sabit kaldıktan sonra, $t=24$ st'e kadar yine hızla arttığı görülmüştür. Çözünmüş oksijen ve hücre derişim profillerinden eklenen proteaz inhibitörünün hücre çoğalması üzerinde geçiçi inhibisyon etkisine neden olduğu görülmüştür. Biyoprosesin $t=24$ st'inden sonra substrat tüketiminin durmasıyla hücre durgunluk fazına ulaşmakta, oksijen aktarım koşuluna göre substrat tüketim hızı ve hücre çoğalma hızı farklılıklar göstermektedir. Mikroorganizma çoğalma hızı ve ulaşılan en yüksek mikroorganizma derişimi

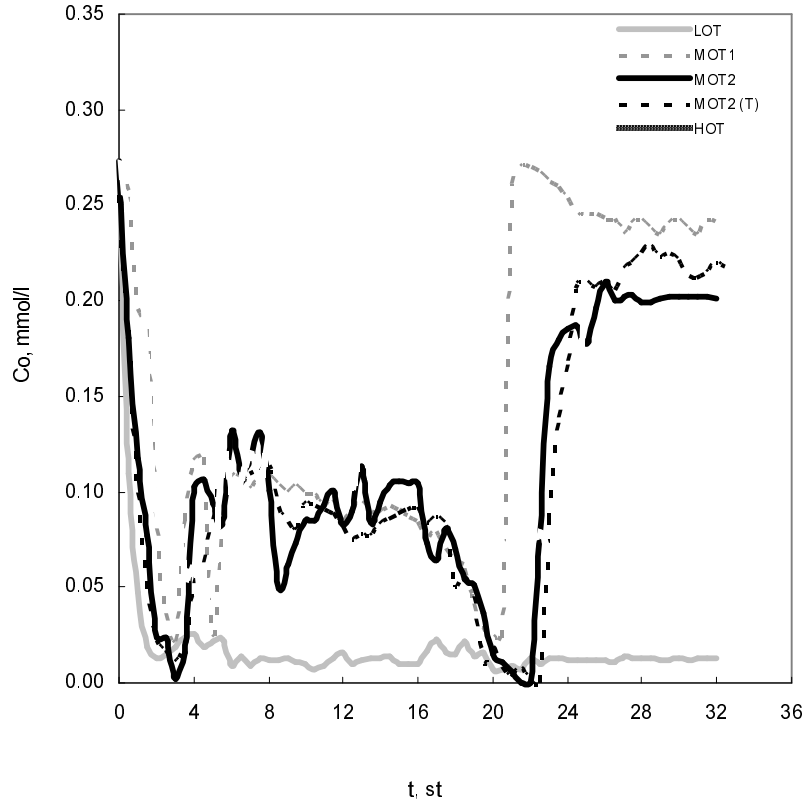
karıştırma hızının artmasıyla artmış (Şekil 4.31), $t=24$ st'ten sonra hücre durgunluk fazına ulaşmış ve en yüksek mikroorganizma derişimi ($C_X=2.1 \text{ kg m}^{-3}$) MOT2 koşulunda, en düşük mikroorganizma derişimi ($C_X=1.3 \text{ kg m}^{-3}$) ise LOT koşulunda elde edilmiştir. MOT2'deki hücre çoğalması HOT'a göre daha fazladır.

Glukoz derişiminin oksijen aktarım koşulu ve kalma süresi ile değişimi (Şekil 4.32) incelendiğinde; karıştırma hızının artmasıyla glukoz tüketim hızları da artmış, hücrenin durgunluk fazına ulaştığı $t=24$ st'e kadar glukoz hızla tüketilmiş sonra glukoz tüketim hızı azalmıştır. Şekil 4.31 ve 4.32 incelendiğinde hücrenin çoğalması için glukoz tükettiği görülmüştür. En fazla hGH üretiminin olduğu hücrenin durgunluk fazında glukoz tüketim hızı çok düşüktür. Proses sonunda başlangıçtaki glukozun en fazla %95'nin (MOT2) tüketilmiştir.

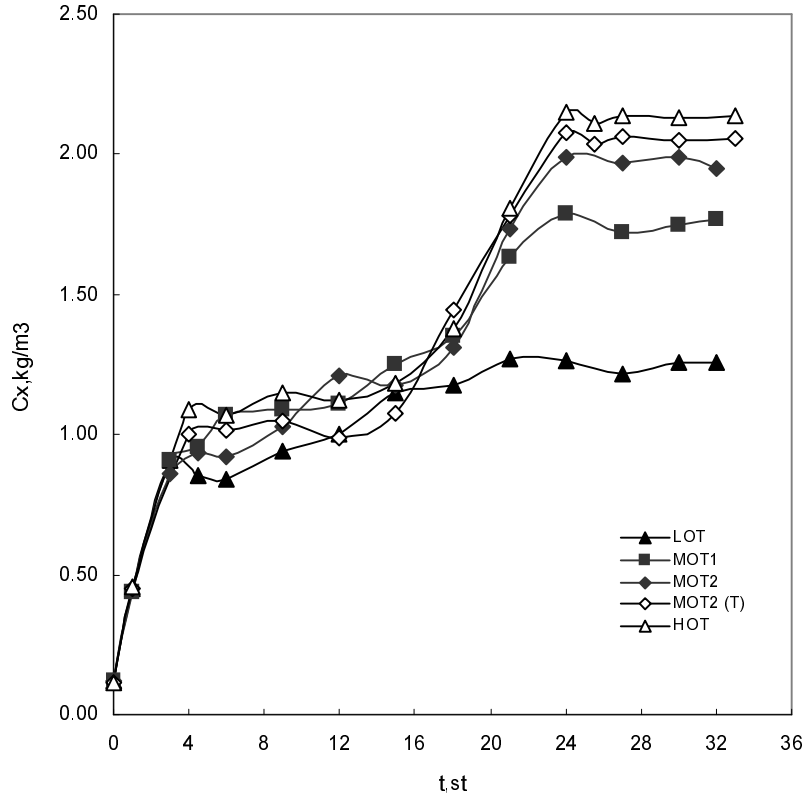
hGH derişiminin kalma süresi ve oksijen aktarım koşulu ile değişimi incelendiğinde, düşük oksijen aktarım koşullarında hGH üretiminin de düşük olduğu ve oksijen aktarım hızının artmasıyla hGH üretim hızının arttığı ve hGH üretiminin daha erken başladığı görülmektedir (Şekil 4.33). Maksimum hGH üretimine ulaştığı anda oksijen derişiminin değişmediği, pH'ın çok düşük bir hızla artmaya devam ettiği, mikroorganizmanın durgunluk fazında olduğu ve belirgin bir substrat tüketiminin olmadığı görülmektedir. hGH üretimi laboratuvar ölçeğe kıyasla daha erken ($t=12$ st) başlamıştır (Şekil 4.33). Sabit hava giriş hızında karıştırma hızının artmasıyla hGH üretimi de artmıştır. Genel olarak tüm koşullarda hGH derişimi $t=12$ st'ten sonra proses sonuna kadar artmış ve en yüksek hGH derişimi ($C_{hGH}=0.07 \text{ kg m}^{-3}$) MOT2 koşulunda, en düşük hGH derişimi ($C_{hGH}=0.036 \text{ kg m}^{-3}$) ise LOT koşulunda elde edilmiştir. Tüm koşullarda hücre çoğalması üstel olarak devam ederken hGH üretimine başlanmıştır.



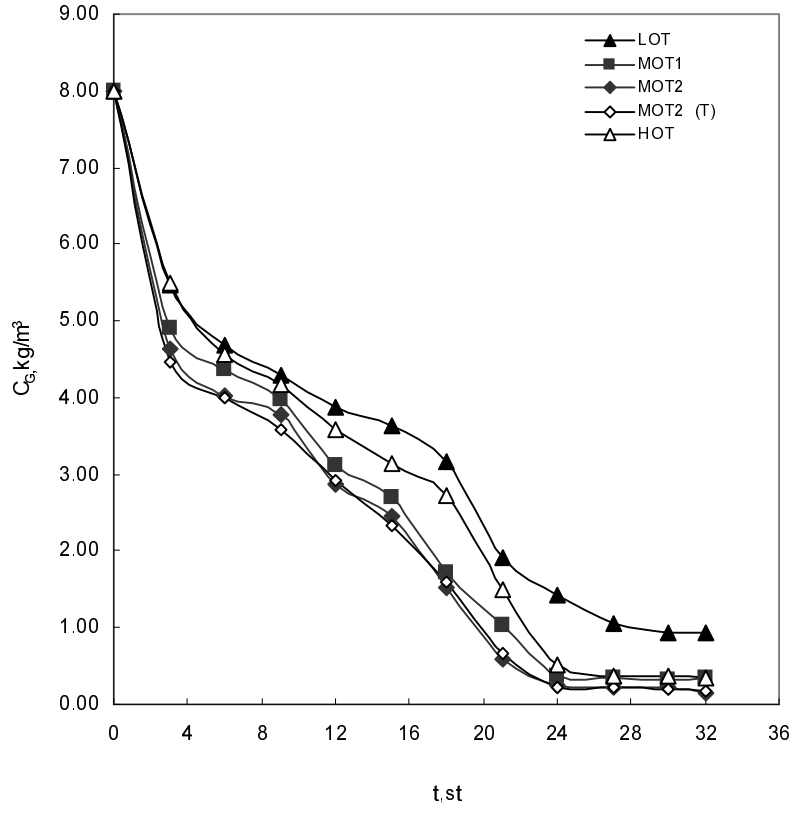
Şekil 4.29 *r-B.subtilis* BGSC-1A751 ile hGH üretiminde pH'ın oksijen aktarımı ve t ile değişimi: $C_{G0}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $pH_0=7,25$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=550 \text{ cm}^3$



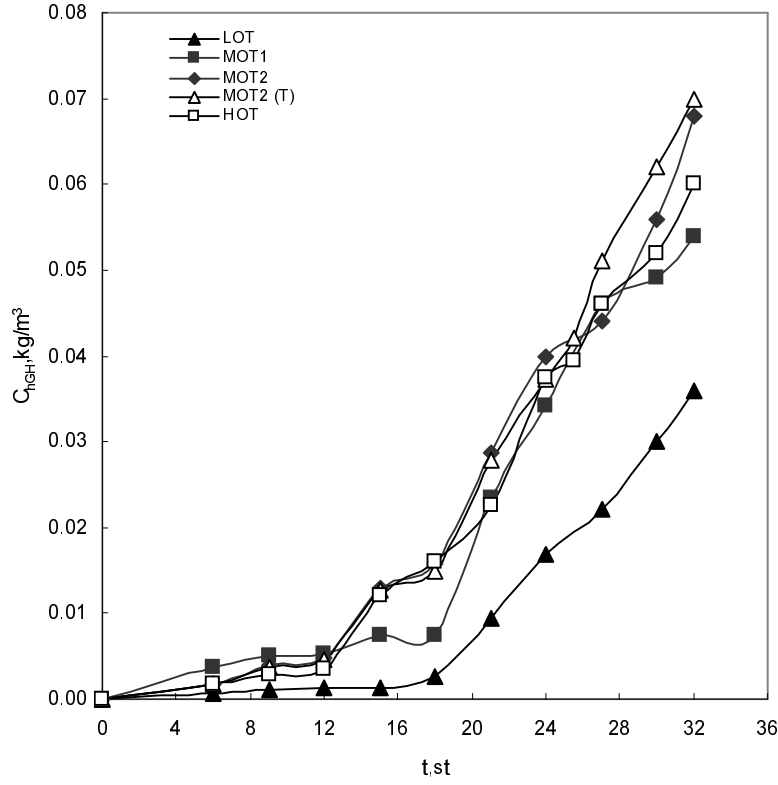
Şekil 4.30 *r-B.subtilis* BGSC-1A751 ile hGH üretiminde çözülmüş oksijen derişiminin oksijen aktarımı ve t ile değişimi: $C_{Go}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $pH_0=7,25$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=550 \text{ cm}^3$



Şekil 4.31 *r-B.subtilis* BGSC 1A751 ile hGH üretiminde hücre derişiminin oksijen aktarımı ve t ile değişimi: $C_{Go}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $pH_o=7,25$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=550 \text{ cm}^3$

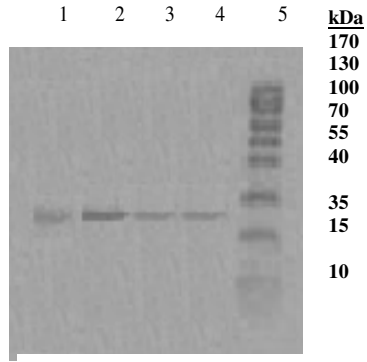


Şekil 4.32 *r-B.subtilis* BGSC 1A751 ile hGH üretiminde glukoz derişiminin oksijen aktarımı ve t ile değişimi: $C_{G0}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $pH_0=7,25$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=550 \text{ cm}^3$

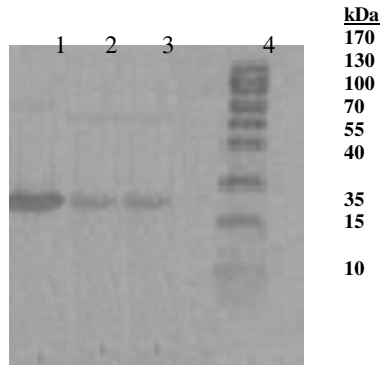


Şekil 4.33 *r-B.subtilis* BGSC 1A751 ile hGH üretiminde hGH derişiminin oksijen aktarımı ve t ile değişimi: $C_{G_0}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $pH_0=7,25$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=550 \text{ cm}^3$

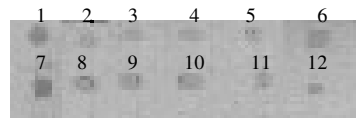
LOT, MOT1, MOT2 ve HOT koşullarında üretilen hGH'nin aktif olup olmadığını belirlemek amacıyla Western Blott analizi yapılmıştır. Analiz sonucunda elde edilen blot'ın görüntüsü Şekil 4.34 ve 4.35'da verilmiştir. Blot üzerinde hGH bantı görölmüştür. Western Blott ile kapiler elektroforez analizleri sonucunda ölçölen hGH derişim değerleri birbirine yakındır. En yüksek hGH üretiminin ($C_{hGH}= 0.07 \text{ kg m}^{-3}$) olduğu MOT2 koşulu için proses süresince hGH derişiminin kalma süresiyle değişimi Dot-Blot (noktasal Western Blott'la aynı prensibe dayanan) analizi ile Şekil 4.36'de gösterilmiştir.



Şekil 4.34 $Q_O/V_R=0.5$ vvm hava giriş hızında karıştırma hızının hGH üretimine etkisini gösteren Western Blott analiz. 1. LOT, 2.saf hGH, 3. MOT2, 4. MOT1, 5.Marker



Şekil 4.35 $N= 800 \text{ dk}^{-1}$ karıştırma hızında hava giriş hızının hGH üretimine etkisinin incelendiği deneydeki Western Blott sonucu. 1. saf hGH, 2. MOT2, 3. HOT, 4.Marker



Şekil 4.36 MOT2 koşulunda hGH derişiminin kalma süresiyle değişimini gösteren Dot-Blott analizi. 1,7,11,12. Saf hGH; 2. t=12 st; 3. t=15 st; 4. t=18 st; 5. t=21 st; 6. t=24 st; 8. t=27 st; 9. t=30 st; 10. t=32 st

Oksijen aktarım hızına bağlı olarak biyoreaktörde kalma süresiyle hücre dışına aktarılan amino asitler ile organik asitler ve derişimleri yan-ürün dağılımının ve hücreiçi tepkimelerin ve yolizlerinin ayrıntılı incelenmesi için araştırılmıştır. $Q_O/V_R =0.5$ vvm, $N=500 \text{ dk}^{-1}$ (LOT) işletim koşulunda amino asit ve organik asitlerin derişimlerinin

kalma süresiyle değişimleri Şekil 4.37 ve Şekil 4.41'de verilmiştir. Biyoproses süresince ortamda gözlenen amino asitler serin, lözin, isolözin ve fenilalanindir. Ortamdaki amino asitlerin derişimlerinin kalma süresiyle salınım gösterdikleri belirlenmiştir (Şekil 4.37). Yan-ürün olarak biyoreaktörde en yüksek derişimde bulunan amino asitler sırasıyla serin (0.186 kg m^{-3}), lözin (0.184 kg m^{-3}), fenilalanin (0.162 kg m^{-3}) ve isolözindir (0.088 kg m^{-3}). Glutamin derişimi sıfıra yakındır. Alanin, arjinin, glutamik asit, aspartik, glisin, histidin, triptofan, metionin, lizin, valin, treonin ve asparajin ise proses süresince üretim ortamında bulunmamaktadır. Biyoproses süresince ortamda belirgin bir şekilde gözlenen organik asitler ise glukonik, süksinik, sitrik, laktik, okzalik ve asetik asittir. Şekil 4.41'de LOT koşulunda kalma süresiyle asetik, formik, fumarik, glukonik, α -ketoglutarik, laktik, maleik, malik, okzalik, okzaloasetik, sitrik, pirüvik ve süksinik asit derişimlerinin değişimleri gösterilmiştir. Laktik ve sitrik asit derişimleri kalma süresiyle önce artmış sonra da azalmıştır. Ortamdaki diğer organik asitlerin derişimlerinin ise kalma süresiyle salınım gösterdikleri belirlenmiştir. Bu oksijen aktarım koşulunda üretim ortamında en yüksek derişimli organik asit süksinik asit (0.394 kg/m^3) olmuş, bunu glukonik asit (0.36 kg/m^3), sitrik asit (0.131 kg/m^3), laktik asit (0.128 kg/m^3), okzalik asit (0.091 kg/m^3) ve asetik asit (0.077 kg/m^3) takip etmiştir. Pirüvik, fumarik, α -ketoglutarik ve malik asit derişimleri ortamda $0-0.05 \text{ kg/m}^3$ derişim aralığında bulunmuştur. Maleik, okzaloasetik ve formik asit ise proses süresince üretim ortamında bulunmamaktadır.

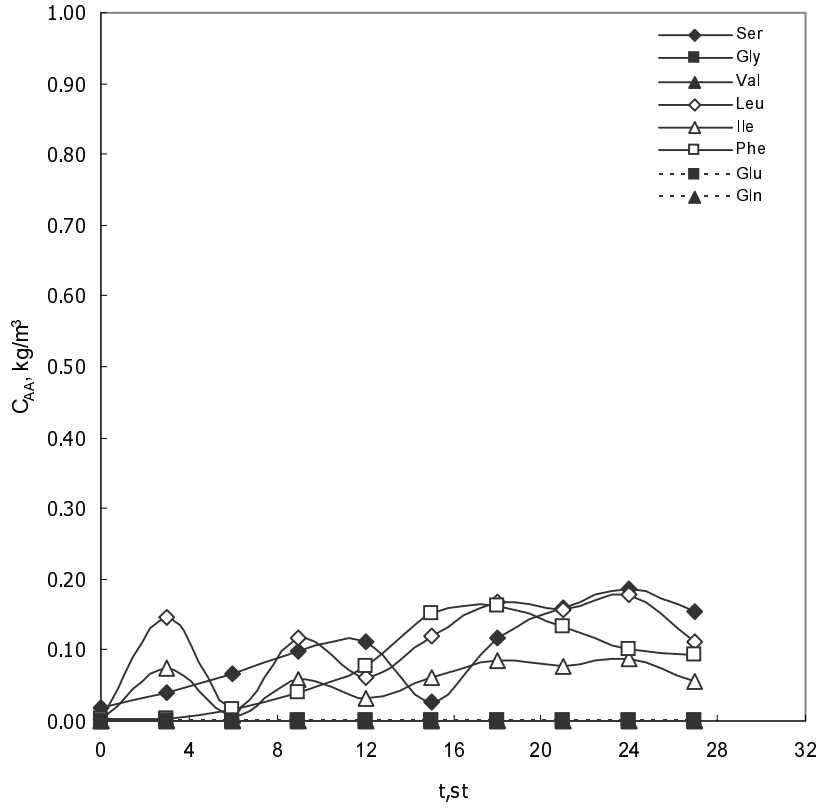
$Q_0/V_R = 0.5 \text{ vvm}$, $N=700 \text{ dk}^{-1}$ (MOT1) işletim koşulunda amino asit ve organik asitlerin derişimlerinin kalma süresiyle değişimleri Şekil 4.38 ve Şekil 4.42'de verilmiştir. Biyoproses süresince ortamda gözlenen amino asitler serin, lözin, glisin, isolözin ve fenilalanindir. Üretim ortamında gözlenen amino asitlerin derişimlerinin kalma süresi ile değişimi incelendiğinde; bu koşulda da LOT'taki gibi amino asitlerin salınım gösterdikleri bulunmuştur (Şekil 4.38). Yan-ürün olarak biyoreaktörde en yüksek derişimde bulunan amino asitler sırasıyla lözin (0.210 kg m^{-3}), serin (0.143 kg m^{-3}), fenilalanin (0.140 kg m^{-3}) ve isolözindir (0.105 kg m^{-3}). Glutamin derişimi sıfıra yakındır. Alanin, arjinin, aspartik asit, glutamik asit, histidin, triptofan, metionin, lizin, valin, treonin ve asparajin ise proses süresince üretim ortamında bulunmamaktadır. Biyoproses süresince ortamda belirgin bir şekilde gözlenen organik asitler ise glukonik,

süksinik, formik ve okzalik asittir. Ortamdaki organik asitlerin derişimlerinin kalma süresiyle salınım gösterdikleri belirlenmiştir (Şekil 4.42). Yan-ürün olarak biyoreaktörde en yüksek derişimde bulunan organik asitler sırasıyla süksinik asit (0.56 kg m^{-3}), glukonik asit (0.47 kg m^{-3}), okzalik asit (0.186 kg m^{-3}) ve formik asittir (0.126 kg m^{-3}). Üretim ortamındaki diğer organik asitlerden laktik, sitrik, fumarik, α -ketoglutarik asit $0.1-0.001 \text{ kg/m}^3$ derişim aralığında; pirüvik ve malik asit ise sifıra yakın derişimde bulunmuştur. Asetik, maleik ve okzaloasetik asit ise proses süresince üretim ortamında bulunmamaktadır.

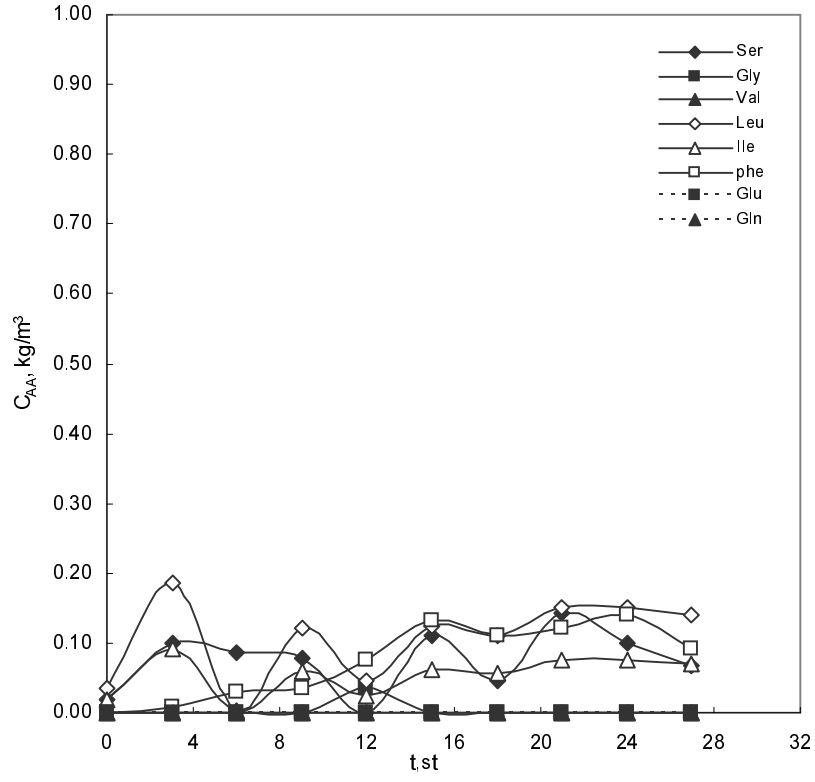
$Q_o/V_R = 0.5 \text{ vvm}$, $N=800 \text{ dk}^{-1}$ (MOT2) işletim koşulunda amino asit ve organik asitlerin derişimlerinin kalma süresiyle derişimleri Şekil 4.39 ve Şekil 4.43'de verilmiştir. LOT koşulundaki gibi biyoproses süresince ortamda gözlenen amino asitler serin, lözin, isolözin ve fenilalanindir. Üretim ortamında gözlenen amino asitlerin derişimlerinin kalma süresi ile salınım gösterdikleri bulunmuştur. Yan-ürün olarak biyoreaktörde en yüksek derişimde bulunan amino asitler sırasıyla lözin (0.191 kg m^{-3}), fenilalanin (0.172 kg m^{-3}), serin (0.120 kg m^{-3}), isolözindir (0.096 kg m^{-3}). Glutamin derişimi sifıra yakındır. Alanin, arjinin, glutamik asit, histidin, triptofan, metionin, lizin, aspartik asit, valin, glisin, treonin ve asparağın ise proses süresince üretim ortamında bulunmamaktadır. Biyoproses süresince ortamda belirgin bir şekilde gözlenen organik asitler ise glukonik, süksinik, laktik ve sitrik asittir. Ortamdaki organik asitlerin derişimlerinin kalma süresiyle salınım gösterdikleri belirlenmiştir (Şekil 4.43). Süksinik asit LOT ve MOT1 koşullarında olduğu gibi burada da üretim ortamına diğer organik asitlerden daha fazla salgılanma özelliğı göstermiş ve en yüksek derişimine $t=9 \text{ st}$ 'de (0.5 kg m^{-3}) ulaşmıştır. Yan-ürün olarak biyoreaktörde en yüksek derişimde bulunan diğer organik asitler sırasıyla glukonik asit (0.359 kg m^{-3}), sitrik asit (0.190 kg m^{-3}), laktik asit (0.111 kg m^{-3}) ve formik asittir (0.100 kg m^{-3}). Üretim ortamındaki diğer organik asitlerden malik, pirüvik, fumarik, okzalik ve α -ketoglutarik asit $0.1-0.001 \text{ kg/m}^3$ derişim aralığında; asetik asit ise sifıra yakın derişimde bulunmuştur. Maleik ve okzaloasetik asit ise proses süresince üretim ortamında bulunmamaktadır.

Oksijen aktarım hızına bağılı olarak biyoreaktörde kalma süresiyle hücre dışına aktarılan amino asitler ile organik asitler ve derişimleri yan-ürün dağılımının ve hücreiçi

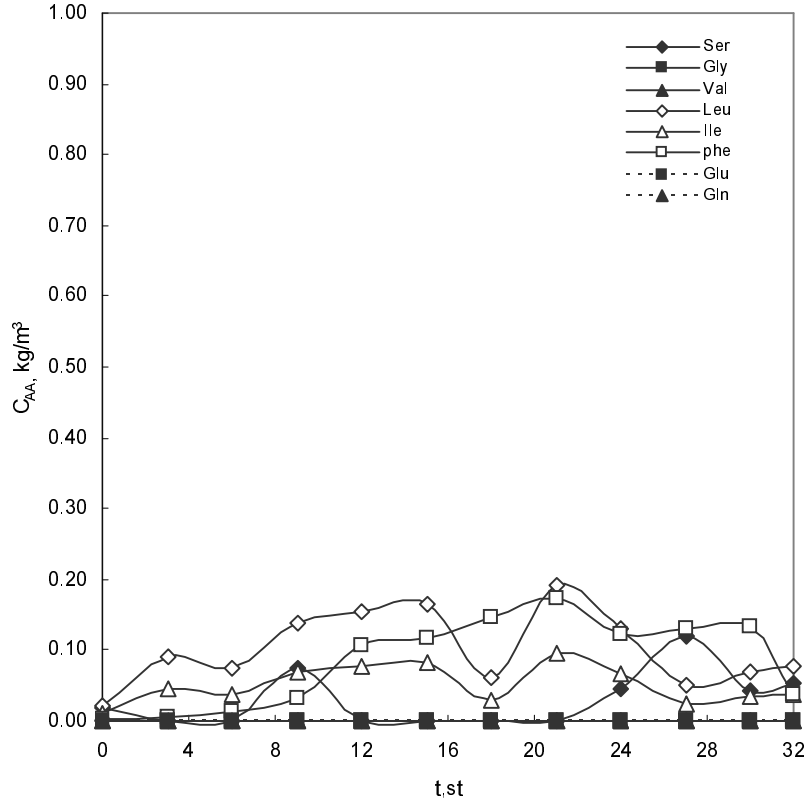
tepkimelerin ve yolizlerinin ayrıntılı incelenmesi için araştırılmıştır. $Q_0/V_R = 0.7$ vvm, $N=800$ dk⁻¹ (HOT) işletim koşulunda amino asit ve organik asitlerin derişimlerinin kalma süresiyle değişimleri Şekil 4.40 ve Şekil 4.44'de verilmiştir. Lözün MOT2 koşulunda olduğu gibi üretim ortamına diğer amino asitlerden daha fazla salgılanmış ve en yüksek derişimine $t=21$ st'de (0.191 kg m⁻³) ulaşmıştır. Biyoproses süresince ortamda gözlenen diğer amino asitler serin, izolözin, glisin ve fenilalanindir. Üretim ortamında gözlenen amino asitlerin derişimlerinin kalma süresi ile salınım gösterdikleri bulunmuştur. Yan-ürün olarak biyoreaktörde en yüksek derişimde bulunan diğer amino asitler sırasıyla fenilalanin (0.179 kg m⁻³), serin (0.169 kg m⁻³), izolözindir (0.096 kg m⁻³) ve glisindir (0.075 kg m⁻³). Aspartik asit ise sıfıra yakın derişimde bulunmuştur. Alanin, arjinin, glutamik asit, histidin, triptofan, metionin, lizin, glutamin, valin, treonin ve asparajin ise proses süresince üretim ortamında bulunmamaktadır. Biyoproses süresince ortamda belirgin bir şekilde gözlenen organik asitler ise glukonik, süksinik, okzalik, formik ve asetik asittir. HOT koşulunda da MOT2'teki gibi ortamdaki organik asitlerin derişimlerinin kalma süresiyle salınım gösterdikleri belirlenmiştir (Şekil 4.44). Yan-ürün olarak biyoreaktörde en yüksek derişimde bulunan organik asitler sırasıyla süksinik asit (0.294 kg m⁻³), glukonik asit (0.243 kg m⁻³), asetik asit (0.197 kg m⁻³), formik asit (0.167 kg m⁻³) ve sitrik asittir (0.09 kg m⁻³). Üretim ortamındaki diğer organik asitlerden malik, pirüvik, fumarik, okzalik, fumarik, laktik ve α -ketoglutarik asit $0.1-0.001$ kg m⁻³ derişim aralığında bulunmuştur. Maleik ve okzaloasetik asit ise proses süresince üretim ortamında bulunmamaktadır.



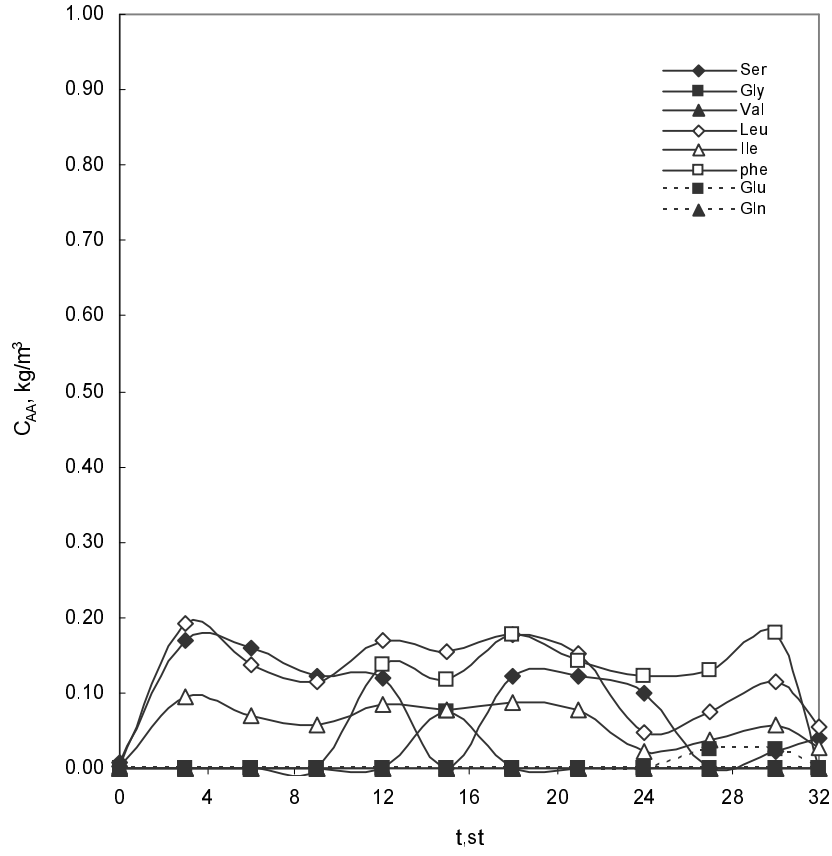
Şekil 4.37 $Q_0/V_R = 0.5$ vvm, $N = 500$ dk⁻¹ (LOT) OA- koşulunda ortama aktarılan amino asit derişimlerinin t değişimi: $C_{G_0} = 8$ kg m⁻³, $pH_0 = 7.25$, $T = 37^\circ\text{C}$, $V_R = 550$ cm³



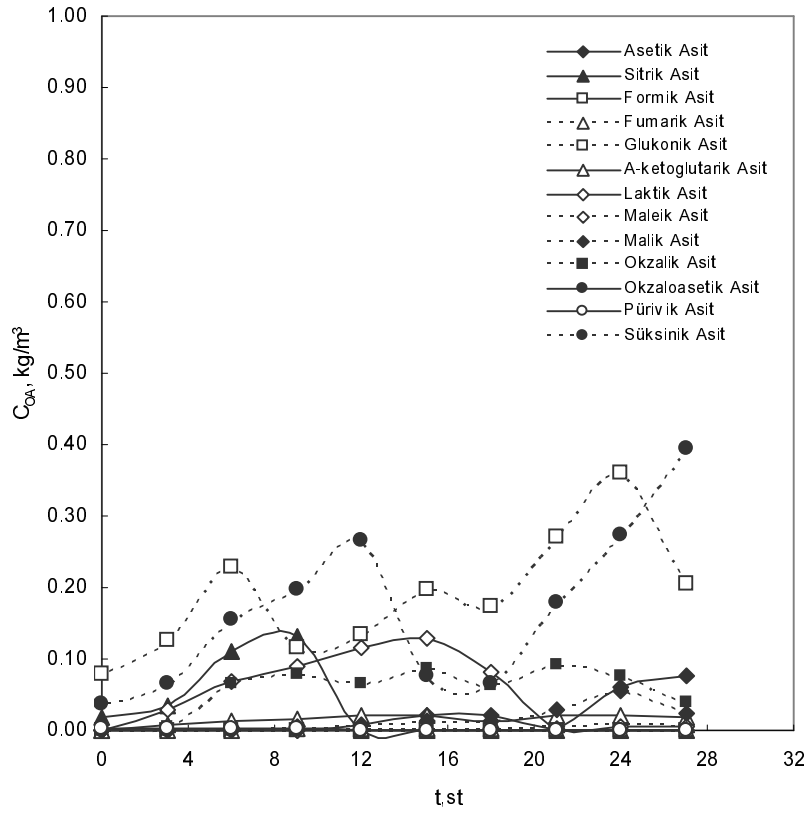
Şekil 4.38 $Q_o/V_R = 0.5$ vvm, $N = 700$ dk⁻¹ (MOT1) OA- koşulunda ortama aktarılan amino asit derişimlerinin t değışımi: $C_{G_0} = 8$ kg m⁻³, $pH_0 = 7.25$, $T = 37^\circ C$, $V_R = 550$ cm³



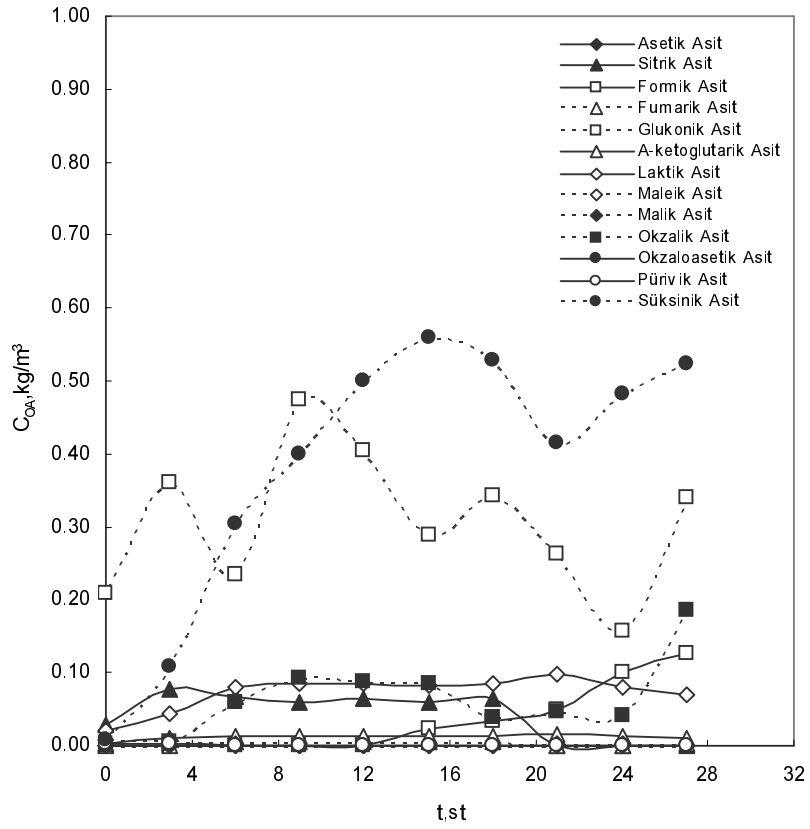
Şekil 4.39 $Q_o/V_R = 0.5\text{vvm}$, $N = 800\text{ dk}^{-1}$ (MOT2) OA- koşulunda ortama aktarılan amino asit derişimlerinin t değışimi: $C_{G_0} = 8\text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH}_0 = 7.25$, $T = 37^\circ\text{C}$, $V_R = 550\text{ cm}^3$



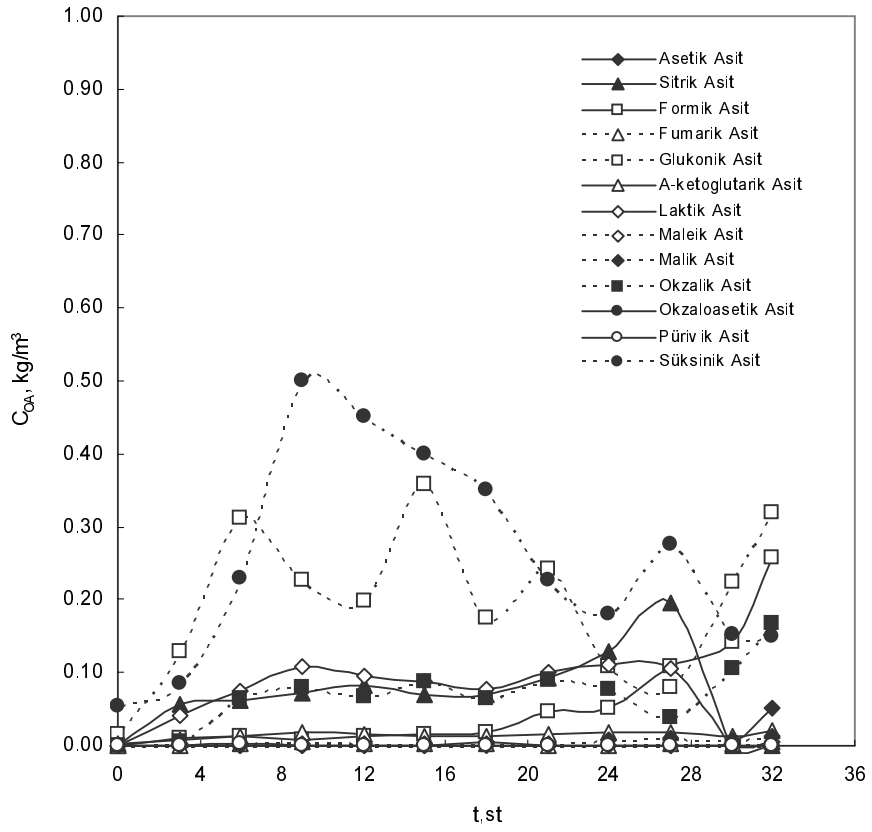
Şekil 4.40 $Q_o/V_R = 0.7$ vvm, $N = 800 \text{ dk}^{-1}$ (HOT) OA- koşulunda ortama aktarılan amino asit derişimlerinin t ile değişimi: $C_{G_0} = 8 \text{ kg m}^{-3}$, $pH_0 = 7.25$, $T = 37^\circ\text{C}$, $V_R = 550 \text{ cm}^3$



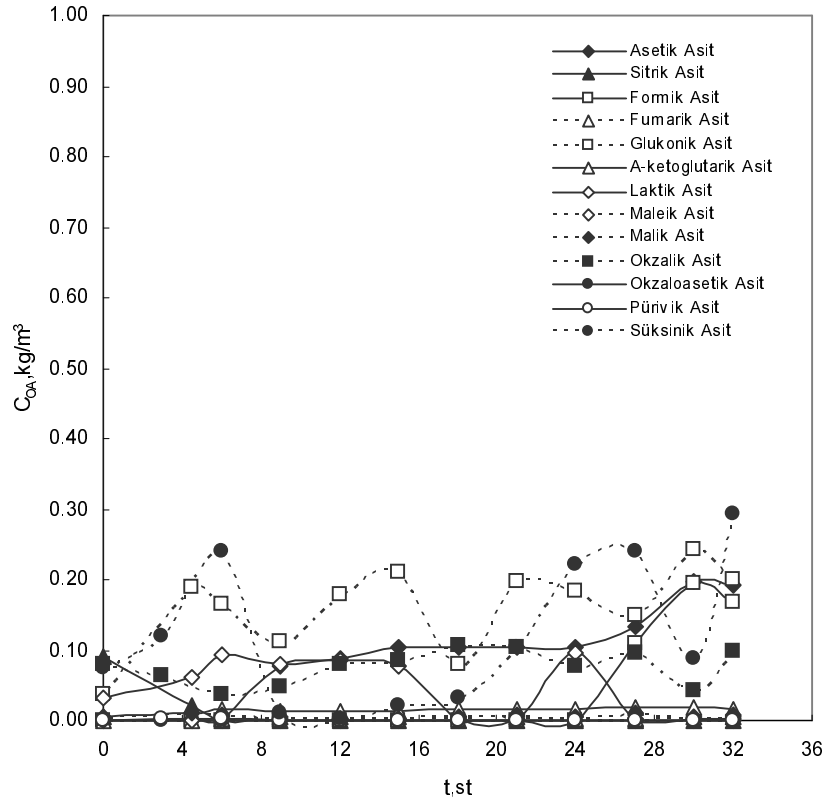
Şekil 4.41 $Q_o/V_R = 0.5$ vvm, $N = 500 \text{ dk}^{-1}$ (LOT) OA- koşulunda ortama aktarılan organik asit derişimlerinin t ile değişimi: $C_{G_0} = 8 \text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH}_0 = 7.25$, $T = 37^\circ\text{C}$, $V_R = 550 \text{ cm}^3$



Şekil 4.42 $Q_o/V_R = 0.5$ vvm, $N = 700$ dk⁻¹ (MOT1) OA- koşulunda ortama aktarılan organik asit derişimlerinin t ile değişimi: $C_{G0} = 8$ kg m⁻³, $pH_0 = 7.25$, $T = 37^\circ\text{C}$, $V_R = 550$ cm³



Şekil 4.43 $Q_o/V_R = 0.5 \text{vvm}$, $N = 800 \text{ dk}^{-1}$ (MOT2) OA- koşulunda ortama aktarılan organik asit derişimlerinin t ile değişimi: $C_{G0} = 8 \text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH}_0 = 7.25$, $T = 37^\circ\text{C}$, $V_R = 550 \text{ cm}^3$



Şekil 4.44 $Q_o/V_R = 0.7$ vvm, $N = 800 \text{ dk}^{-1}$ (HOT) OA- koşulunda ortama aktarılan organik asit derişimlerinin t ile değışimi: $C_{G_0} = 8 \text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH}_0 = 7.25$, $T = 37^\circ\text{C}$, $V_R = 550 \text{ cm}^3$

Oksijen aktarımının artırılmasıyla ortamda gözlenen amino asitlerden serin derişimi azalırken, lözin, fenilalanin ve izolözin derişimleri artmıştır. Ortama salgılan toplam amino asit derişimleri açısından karşılaştırıldığında (Çizelge 4.6.a) prosesin genelinde LOT koşulunda ortama daha yüksek miktarda; MOT2 koşulunda ise daha düşük miktarda amino asitin yan-ürün olarak aktarıldığı görülmüştür. Bu sonuç, 0.5 vvm hava giriş hızında karıştırma hızındaki artışın üretim ortamına yan-ürün olarak amino asit aktarımını düşürdüğünü dolayısıyla ürün seçimliliğinde artış beklenebileceğini göstermektedir. MOT2 ve HOT koşulu ortama salgılan toplam amino asit derişimleri açısından karşılaştırıldığında (Çizelge 4.6.a) HOT koşulunda MOT2 koşuluna göre daha yüksek olduğu görülmüştür. 800 dk^{-1} sabit karıştırma hızında hava giriş hızının artmasıyla ortamda gözlenen amino asitlerden fenilalanin, serin ve glisin derişimleri

artmıştır. HOT koşulunda oksijen aktarımının daha da artmasıyla ortama salgılanan toplam amino asit derişimleri $t=27$ st'da en düşük olmuştur.

Çizelge 4.6.a Toplam amino asit derişimlerinin t ile değişimi. $C_{Go}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $pH_o=7.25$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=550\text{cm}^3$

t; st	$C_{AA}; \text{kg/m}^3$			
	LOT	MOT1	MOT2	HOT
0	0.026	0.074	0.053	0.013
3	0.265	0.383	0.140	0.457
6	0.107	0.119	0.127	0.367
9	0.311	0.296	0.316	0.292
12	0.280	0.180	0.340	0.512
15	0.360	0.428	0.364	0.424
18	0.530	0.321	0.238	0.566
21	0.524	0.491	0.460	0.493
24	0.553	0.465	0.364	0.292
27	0.414	0.373	0.324	0.266

Sabit hava giriş hızında karıştırma hızının artmasıyla ortamda gözlenen organik asitlerden süksinik, sitrik ve formik asit derişimleri artarken; α -ketoglutarik, malik, fumarik, laktik, glukonik asit derişimleri de azalmıştır. HOT koşulunda MOT2'ye göre ortama salgılanan toplam organik asit derişimleri karşılaştırıldığında süksinik, sitrik, laktik, glukonik asit derişimleri azalırken formik ve okzalik asit derişimleri artmıştır. MOT1 ve MOT2'de ortama aktarılan toplam organik asit derişimleri incelendiğinde (Çizelge 4.6.b), prosesin farklı evrelerinde farklı durumların gözleendiği fakat hücre çoğalmaları dikkate alındığında genelde MOT2 koşulunda ortama MOT1 koşuluna kıyasla daha düşük miktarlarda organik asit aktarıldığı; en yüksek toplam organik asit derişimine ise MOT1 koşulunda (1.137 kg/m^3) $t=27$ st'de ulaşıldığı görülmüştür. Ortama salgılanan toplam organik asit derişimleri incelendiğinde; MOT1, MOT2 ve HOT koşulları için prosesin genelinde MOT2 koşulunda ortama daha düşük miktarda miktarda organik asitin aktarıldığı, sonuçta ise bu koşulda hGH üretiminin arttığı görülmüştür (Çizelge 4.6.b). Biyoproses süresince ortama aktarılan maksimum toplam amino asit derişimi HOT'ta $C_{AA}=0.56 \text{ kg m}^{-3}$, minimum toplam amino asit derişimi ise MOT2'de $C_{AA}=0.46 \text{ kg m}^{-3}$ 'dir. Ortama aktarılan amino asit derişiminin az ve ürün derişiminin fazla olması bunların hGH'nin üretiminde kullanıldığını göstermektedir.

Biyoproses süresince ortama aktarılan toplam organik asit derişimi incelendiğinde; en yüksek derişim MOT1’de ($C_{OA}= 1.14 \text{ kg m}^{-3}$), en düşük derişim ise HOT’ta ($C_{OA}= 0.56 \text{ kg m}^{-3}$) elde edilmiştir (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.6.b Farklı oksijen aktarım koşullarında toplam organik asit derişimlerinin t ile değişimi. $C_{Go}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $pH_0=7.25$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=550\text{cm}^3$

t; st	$C_{OA}; \text{kg/m}^3$			
	LOT	MOT1	MOT2	HOT
0	0.137	0.114	0.073	0.325
3	0.271	0.476	0.337	0.482
6	0.645	0.764	0.779	0.571
9	0.637	0.786	0.723	0.349
12	0.621	1.002	0.932	0.459
15	0.549	0.958	1.039	0.521
18	0.439	0.943	0.777	0.358
21	0.609	0.889	0.822	0.541
24	0.864	0.815	0.685	0.704
27	0.772	1.137	0.835	0.766

r-B.subtilis BGSC-1A751 ile gerçekteştirilen pilot ölçek deneylerin sonucunda hGH üretimi açısından en uygun oksijen aktarım koşulu MOT2, yani $Q_o/V_R = 0.5 \text{ vvm}$, $N= 800 \text{ dk}^{-1}$ olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.7 Salgılanan amino- ve organik- asitler ile maksimum toplam derişimleri

Koşul	$C_{AA, max}$ (kg m ⁻³)	Salgılanan amino asitler	$C_{OA, max}$ (kg m ⁻³)	Salgılanan organik asitler
LOT	0.55	Leu, Ile, Phe, Ser, Asn, Gln	0.86	Glukonik, laktik, sitrik, süksinik
MOT1	0.49	Leu, Ile, Phe, Ser, Asn, Gln, Gly	1.14	Formik, glukonik, okzalik, süksinik
MOT2	0.46	Leu, Ile, Phe, Ser, Asn, Gln	1.04	Formik, glukonik, laktik, okzalik, sitrik, süksinik
HOT	0.56	Leu, Ile, Phe, Ser, Asn, Gln, Gly	0.56	Asetik, formik, glukonik, okzalik, süksinik

4.3.2 hGH üretiminde oksijen aktarım karakteristikleri

r-B.subtilis BGSC-1A751 ile hGH üretiminde oksijen aktarım koşullarının verim ve seçimliliğe etkisinin incelenmesi ve en uygun oksijen aktarım koşulunun bulunması amacıyla pilot ölçekte dinamik yöntem kullanılarak oksijen aktarım deneyleri gerçekleştirilmiştir. Dört oksijen aktarım koşulundaki hücre ve hGH derişim profilleri dikkate alındığında biyoproses beş periyoda ayrılmıştır. Periyot I ($0 < t < 4$) hücrenin birinci çoğalma fazı, Periyot II ($4 < t < 12$) çoğalmanın durdurulduğu faz, Periyot III ($12 < t < 16$) Periyot II sonrası gecikme ve hGH üretiminin başladığı faz, Periyot IV ($16 < t < 24$) hücrenin ikinci çoğalma ve hGH sentezinin arttığı faz, Periyot V ($24 < t < 32$) çoğalmanın sonlandığı ve hGH sentezinin en yüksek olduğu faz olarak belirlenmiştir. Proses süresince belirlenen karakteristik kalma sürelerinde ($t=0.5, 7, 15, 21$ ve 27 st) sıvı faz kütle aktarım katsayısı K_{La} ve mikroorganizmanın oksijen tüketim hızı r_o bulunmuştur. Belirlenen karakteristik kalma sürelerinin her biri yer aldıkları periyotlar ile Çizelge 4.8’de verilmiştir. Aşılardan önce ($t < 0$ st’te) bulunan fiziksel kütle aktarım katsayısı K_{La_0} yardımıyla artma faktörü $E (=K_{La}/K_{La_0})$ değerleri de belirlenerek sonuçlar Çizelge 4.8’de verilmiştir. LOT oksijen aktarım koşulunda proses süresince çözünmüş oksijen derişimi çok düşük olduğu için K_{La} değerleri sadece prosesin başında ($t=0$ ve 0.5 st’te) belirlenebilmiştir.

4.3.2.1 Oksijen aktarım katsayısı

Pilot ölçek biyoreaktör sisteminde araştırma programının ikinci aşamasında hGH üretimi için optimize edilmiş olan ortamda en uygun oksijen aktarım stratejisinin belirlenmesi amacıyla farklı karıştırma ve hava giriş hızlarında biyoproses ortamında dinamik yöntem ile deneysel olarak belirlenen sıvı faz hacımsal kütle aktarım katsayısı K_{La} ’nın karıştırma hızı, hava giriş hızı ve kalma süresiyle değişimi incelenmiştir.

Çizelge 4.8’den görüldüğü gibi $Q_o/V_R=0.5$ vvm hava giriş hızında $N=500, 700$ ve 800 dk^{-1} karıştırma hızı koşullarında sıvı faz kütle aktarım katsayısı K_{La} kalma süresiyle değişimi salınım göstermiştir. MOT1 ve MOT2 koşullarında proteaz inhibitörünün eklendiği $t=4$ st’e kadar biyoreaktöre gönderilen oksijen mikroorganizma tarafından

hızla kullanılmaktadır. LOT koşulunda ise biyoreaktördeki çözünmüş oksijen derişiminin $t=2st$ 'te çok düşük değerlere ($C_O=0.013$ mmol/l) ulaşmış ve proses sonuna kadar bu duruma devam etmiştir. Sonuçta, LOT koşulu için $t=2-32$ st arasında K_{La} belirlenememiştir. Üretim ortamına eklenen proteaz inhibitörü mikroorganizmayı ve hücrelerin oksijen tüketimini etkilemiştir. Mikroorganizmanın ortama uyum sağlamaya çalıştığı $t=4-21$ st arasında çözünmüş oksijen derişimi 0.08-0.153 mmol/l arasında değiştiğinden, MOT1, MOT2 ve HOT koşullarında K_{La} ölçülmüştür. hGH üretim prosesinde $Q_0/V_R=0.5$ vvm hava giriş hızında Periyot II, III ve IV'te karıştırma hızının $N=700$ dk⁻¹'den 800 dk⁻¹'e artması ile sıvı faz oksijen aktarım katsayısı K_{La} sırasıyla % 5.5, 7.14 ve 6.7 artmış, Periyot V'te ise % 9.1 azalmıştır. $N=800$ dk⁻¹ karıştırma hızında Periyot II ve IV'te hava giriş hızının $Q_0/V_R=0.5$ vvm'den 0.7 vvm'e çıkmasıyla K_{La} sırasıyla % 16.67 ve 6.25 azalmış, Periyot III'te sabit kalmış ve Periyot V'te ise % 9.1 artmıştır. Buna göre MOT1, MOT2 ve HOT koşulları arasından biyoproses süresince en yüksek K_{La} değerine MOT2 'de Periyot II 'de ($K_{La}=0.018$ s⁻¹) ulaşılmıştır. Artma faktörü (E) genellikle kalma süresi ile artmış ve ilk dört periyotta değeri 1.0-2.3 arasında değişmiştir; MOT2 ve HOT koşullarında Periyot V 'te ise değeri birden küçüktür; $E<1$ olması ortamın reolojik özelliklerinin değiştiğini ve belirtilen iki koşulda oksijen aktarımının artışıyla son periyotta $K_{La}<K_{La_0}$ olduğunu göstermektedir.

Çalık *et al.* (2000) tarafından, maksimum tepkime hızının maksimum kütle aktarım hızına oranı olarak tanımlanan Damköhler sayısı (Da) ve oksijen tüketim hızının maksimum oksijen aktarım hızına oranı olan etkinlik sayısının (η) kalma süresi ile değişimi Çizelge 4.8'de verilmiştir. Periyot I'de biyoproses biyokimyasal reaksiyon kısıtlanmalıdır ($Da<1$); Periyot II'de ise kütle aktarım kısıtlaması başlamaktadır ($Da>>1$). En yüksek Da değeri MOT1 ve HOT koşullarında Periyot II'de bulunmuştur. MOT2 koşulundaki Periyot III'ün Da değeri daha düşüktür. MOT1, MOT2 ve HOT koşullarında Periyot IV'te hem oksijen hemde biyokimyasal reaksiyon kısıtlaması etkilidir. Etkinlik katsayısı biyoproses süresince azalmaktadır ve değeri 1.0'den düşüktür. Bu da *r-B.subtilis* hücrelerinin kullanabilecekleri oksijenden daha azını tükettiklerini göstermektedir.

4.3.2.2 Oksijen tüketim hızı

hGH üretimi için pilot ölçek biyoreaktör sisteminde dört farklı oksijen aktarım koşulunda -sıvı hacmi başına- oksijen tüketim hızının ($-r_O$) değişimi araştırılmıştır. hGH üretiminde $Q_O/V_R = 0.5$ vvm hava giriş hızında oksijen tüketim hızının $N = 500, 700$ ve 800 dk^{-1} olmak üzere üç farklı karıştırma hızında kalma süresi ile değişimi Çizelge 4.8'de verilmiştir. LOT koşulunda ortama gönderilen oksijenin yetersiz olması nedeniyle $t=2-32$ aralığında oksijen tüketim hızı dinamik yöntemle belirlenememiştir. Beklendiği gibi oksijen tüketim hızı önce artmakta sonra azalmaktadır. Oksijen tüketim hızındaki artış $t=4 \text{ st}$ 'te proteaz inhibitörü eklenmesinden etkilenmiştir.

$N=800 \text{ dk}^{-1}$ sabit karıştırma hızında oksijen tüketim hızının farklı hava giriş hızlarında biyoproses süresince değişimi incelendiğinde; beklendiği gibi önce arttığı sonra azaldığı görülmüştür. Tüm koşullarda oksijen tüketim hızı ilk saatlerde arttıktan sonra kalma süresiyle azalmış ve oksijen aktarım koşullarına bağlı olarak en yüksek değerine ($-r_O = 1.6 \text{ mol m}^{-3} \text{ s}^{-1}$) MOT2 koşulunda Periyot II'de ulaşmıştır.

hGH üretim prosesinde farklı oksijen aktarım koşullarında gerçekleştirilen deney verileri kullanılarak sırasıyla Denklem (2.4), (2.5), (2.6), (E.5) ve (E.6) ile tüketilen substrat başına üretilen hücre ve hGH verimi ($Y_{X/S}, Y_{P/S}$), tüketilen oksijen başına üretilen hGH verimi ($Y_{P/O}$) ve üretilen hücre başına üretilen hGH verimi ($Y_{P/X}$) hesaplanmış; sonuçlar Çizelge 4.9'da verilmiştir. Verim katsayıları her bir periyotta yer alan beş noktada ($t=3, 9, 12, 15, 21$ ve 27 st 'te) hesaplanmıştır. Verim katsayıları proses süresince salınım göstermiştir ve en yüksek değerlerine $Y_{X/S} = 1.004 \text{ kg kg}^{-1}$ (Periyot IV'te) ve $Y_{P/S} = 0.647 \text{ kg kg}^{-1}$ (Periyot V'te) MOT2 koşulunda ulaşılmıştır. Tüm proses için toplam $Y_{X/S}$ verim katsayısı oksijen aktarımının artışıyla artmıştır ve ulaşılan minimum ve maksimum değerler, sırasıyla, LOT'ta 0.18 ve HOT 'ta 0.28'dir. Genel olarak, tüketilen oksijen başına hücre verim katsayısı $Y_{X/O}$ kalma süresiyle artmıştır. Biyoproses süresince hücre derişimi ve spesifik çoğalma hızının değişimi de Çizelge 4.10'te verilmiştir. Maksimum spesifik çoğalma hızının en yüksek değerine $\mu_{\max} = 0.94 \text{ st}^{-1}$ MOT1'de $t = 0.5 \text{ st}$ 'te, en düşük değerine ise $\mu_{\max} = 0.87 \text{ st}^{-1}$ MOT2'de $t = 0.5 \text{ st}$ 'te ulaşılmıştır.

Çizelge 4.8 Oksijen aktarım karakteristiklerinin biyoproses süresince değişimi: $C_{G0}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH}_0=7.25$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=0.550 \text{ dm}^3$

Koşul	Periyot	$K_L a$ (s^{-1})	$E=K_L a/K_L a_0$	$ro*10^3$ ($\text{mol m}^{-3} \text{ s}^{-1}$)	$OTR*10^3$ ($\text{mol m}^{-3} \text{ s}^{-1}$)	$OTR_{max}*10^3$ ($\text{mol m}^{-3} \text{ s}^{-1}$)	$OD*10^3$ ($\text{mol m}^{-3} \text{ s}^{-1}$)	Da OD/ OTR_{max}	η ro/OD
0.5 vvm, 500 rpm Low-Oxygen-Transfer (LOT)	t<0	$K_L a_0=0.01$	1.00	-	-	-	-	-	-
	I	0.023	2.30	1.3	1.27	6.28	1.31	0.21	0.997
	II	-	-	-	-	-	-	-	-
	III	-	-	-	-	-	-	-	-
	IV	-	-	-	-	-	-	-	-
	V	-	-	-	-	-	-	-	-
0.5 vvm, 700 rpm Medium-Oxygen- Transfer (MOT1)	t<0	$K_L a_0=0.011$	1.00	-	-	-	-	-	-
	I	0.016	1.45	0.6	0.31	4.37	1.00	0.23	0.602
	II	0.017	1.55	1.4	2.91	4.64	205.60	44.30	0.007
	III	0.013	1.18	1.0	2.37	3.55	28.55	8.04	0.035
	IV	0.014	1.27	0.3	0.17	3.82	10.47	2.74	0.029
	V	0.011	1.00	0.3	0.42	3.00	-	-	-
0.5 vvm, 800 rpm Medium-Oxygen- Transfer (MOT2)	t<0	$K_L a_0=0.013$	1.00	-	-	-	-	-	-
	I	0.017	1.31	0.6	0.55	4.64	1.11	0.24	0.541
	II	0.018	1.38	1.6	2.79	4.91	19.98	4.07	0.080
	III	0.014	1.08	1.0	2.35	3.82	63.54	16.62	0.016
	IV	0.015	1.15	0.6	4.01	4.10	8.11	1.98	0.074
	V	0.01	0.77	0.4	0.71	2.73	-	-	-
0.7 vvm, 800 rpm High-Oxygen-Transfer (HOT)	t<0	$K_L a_0=0.014$	1.00	-	-	-	-	-	-
	I	0.017	1.21	0.5	0.46	4.64	0.77	0.17	0.649
	II	0.015	1.07	0.9	2.30	4.10	186.29	45.49	0.005
	III	0.014	1.00	1.0	2.13	3.82	8.46	2.21	0.118
	IV	0.016	1.14	0.3	3.30	4.37	15.81	3.62	0.019
	V	0.011	0.79	0.2	0.04	3.00	-	-	-

Çizelge 4.9 Verim katsayılarının biyoproses süresince değişimi

Koşul	Periyot	$Y_{x/s}$	$Y_{x/o}$	$Y_{p/s}$	$Y_{p/x}$
		kg kg^{-1}	kg kg^{-1}	kg kg^{-1}	kg kg^{-1}
LOT	I	0.20	-	0.00	0.00
	II	0.13	-	0.00	0.000
	III	0.13	-	0.00	0.01
	IV	0.07	-	0.01	0.16
	V	0.00	-	0.14	0.00
	Toplam	0.18	-	0.01	0.03
MOT1	I	0.26	-	0.00	0.00
	II	0.03	0.04	0.00	0.04
	III	0.18	0.36	0.00	0.01
	IV	0.32	2.11	0.02	0.06
	V	0.00	0.00	0.31	-
	Toplam	0.23	-	0.01	0.03
MOT2	I	0.12	-	0.00	0.00
	II	0.16	0.27	0.00	0.01
	III	0.05	0.14	0.01	0.17
	IV	1.00	1.61	0.04	0.04
	V	0.00	0.00	0.65	-
	Toplam	0.26	-	0.01	0.03
HOT	I	0.27	-	0.00	0.00
	II	0.03	0.05	0.00	0.06
	III	0.56	0.91	0.01	0.02
	IV	0.18	1.45	0.01	0.07
	V	0.00	0.00	0.03	-
	Toplam	0.28	-	0.01	0.03

Çizelge 4.10 Hücre derişimi ve spesifik çoğalma hızının biyoproses süresince değişimi

Koşul	t,st	Cx	μ, st^{-1}	μ_{max}, st^{-1}
LOT	0.5	0.29	0.92	0.92
	3	0.91	0.13	
	9	0.94	0.03	
	15	1.15	0.03	
	21	1.27	0.01	
	27	1.22	0.00	
MOT1	0.5	0.28	0.94	0.94
	3	0.91	0.17	
	9	1.10	0.01	
	15	1.25	0.03	
	21	1.63	0.05	
	27	1.72	0.01	
MOT2	0.5	0.29	0.87	0.87
	3	0.86	0.16	
	9	1.03	0.05	
	15	1.17	0.01	
	21	1.73	0.06	
	27	1.97	0.00	
HOT	0.5	0.29	0.92	0.92
	3	1.09	0.16	
	9	1.13	0.01	
	15	1.38	0.08	
	21	2.15	0.02	
	27	2.14	0.00	

4.3.3 Metabolik akı analizi: Hücreiçi tepkime hızları

Hücreiçi tepkime hızlarının biyoreaktörde çoğalma, ürün ve yan-ürün oluşumu sürecindeki dağılımı hGH üretim prosesinin geliştirilmesi için tepkime yolizindeki önemli özelliklerin ve muhtemel darboğazların belirlenmesi amacıyla incelenmiştir. Oksijen aktarımının etkilerini ayrıntılı olarak incelenebilmesi amacıyla LOT, MOT1, MOT2 ve HOT koşulları için metabolik akı analizi (MAA) yapılmıştır. Hücre ve hGH derişim profilleri dikkate alındığında proses beş periyoda ayrılmıştır. Periyot I ($0 < t < 4$) hücrenin birinci çoğalma fazı, Periyot II ($4 < t < 12$) çoğalmanın durdurulduğu, Periyot III ($12 < t < 16$) Periyot II sonrası geçikme ve hGH üretiminin başladığı faz, Periyot IV ($16 < t < 24$) hücrenin ikinci çoğalma ve hGH sentezinin arttığı faz, Periyot V ($24 < t < 32$) çoğalmanın sona erdiği ve hGH sentezinin en yüksek olduğu faz olarak belirlenmiştir.

Bu beş periyot için sırasıyla t= 3, 9, 15, 21 ve 27 st MAA için seçilmiştir (Çizelge 4.11-14).

Periyot I'de (t=3 st'te) tüm koşullardaki hücre içi tepkimelerin (metabolik) akı dağılımları incelendiğinde; tüm koşullarda amino asitlerin ve hücre bileşenlerinin girdileri olan G6P, F6P, T3P PG3 ve PEP üretiminin gerçekleştiği glikoliz yolizinin aktif olduğu görülmüştür. Glikoliz yolizinde G6P ve F6P iki ayrı tepkime grubuyla üretilen R5P ve pentoz fosfat yolizi (PFY) için dallanma noktası olarak görev yapmaktadır. Nükleik asitlerin ve hücre bileşenlerinin girdisi olan R5P, ya doğrudan F6P'tan üretilmekte ya da G6P'tan Gluc6P oluşumunu takiben üretilmektedir. R5P, HOT koşulunda sadece G6P'tan, MOT2 ve MOT1 koşullarında sadece F6P'tan, LOT koşulunda ise hem G6P hem de F6P'tan üretilmiştir. Tüm koşullarda PFY aktiftir. Glikoliz yolizinden ayrılan Pyr'tan Lac'ın oluş tepkimesi R28 tüm koşullarda aktiftir ve karıştırma hızı azaldıkça artmıştır. Periyot I'de AcCoA'dan Ac'nın oluş tepkimesi R30 ise inaktiftir. TCA döngüsü MOT2 ve LOT koşullarında tamamlanmıştır. HOT ve MOT1 koşullarında ise Mal sentezine kadar gerçekleşmiş, sonra da anaplerotik reaksiyonlardan (R36, R37 ve R38) OA sentezlenmiştir. Anaplerotik reaksiyonlardan Periyot I'de OA'dan Pyr'ın sentezlendiği tepkime R37 tüm koşullarda pasif, Mal'dan Pyr'ın sentezlendiği tepkime R36 ise MOT1 ve HOT koşullarında aktiftir. Glikolat şöntü LOT, MOT2 ve MOT1 koşulları dışında gerçekleşmemiştir. Pilot ölçek biyoreaktör deneylerinde amino asit derişimlerinde genellikle salınım görülmüştür. Tepkime sisteminde amino asitler hücre ve hGH sentezinde kullanılmaktadır. Bu nedenle amino asit akıları amino asit üretim ve tüketim hızlarına, hGH ve hücre sentez hızına bağlıdır. Periyot I'de glutamik asit ve aspartik asit amino asit grubundaki amino asitlerin oluşumu tüm koşullarda vardır ve oluşum akıları sırasıyla MOT2, LOT, HOT ve MOT1 şeklinde azalmıştır. Alanin grubu amino asitlerden alanin oluşumu LOT ve HOT koşullarında yoktur. Serin grubu amino asitlerinden glisin oluşumu R51 MOT1 ve HOT koşullarında inaktiftir. Oksijen aktarımı arttıkça serin grubu amino asitlerin oluşum akıları azalmıştır. Toplam ATP üretim akıları, LOT, MOT1, MOT2 ve HOT koşullarında sırasıyla 18.908, 49.994, 41.221 ve 17.612 mol g⁻¹ KH st⁻¹ olmuştur.

Periyot II'de ($t=9$ st'te) tüm koşullardaki metabolik akı dağılımları incelendiğinde; glikoliz yolizinin aktif olduğu görülmüştür. Pentoz fosfat yolizi (PFY) için dallanma noktası olan R5P, LOT, MOT1 ve HOT koşullarında sadece F6P'tan, MOT2 koşulunda ise hem G6P hem de F6P'tan üretilmiştir. Tüm koşullarda PFY aktiftir. Glikoliz yolizinden ayrılan Pyr'tan Lac'ın oluşum tepkimesi R28 tüm koşullarda vardır. AcCoA'dan Ac'nin oluşumu R30 ise sadece HOT koşulunda vardır. TCA döngüsü MOT1, MOT2 ve HOT koşullarında tamamlanmıştır. LOT'de ise TCA döngüsü Mal sentezine kadar gerçekleşip sonraki adımlarda ise anaplerotik tepkimeler R36, R37, R38 gerçekleşmiştir. Gliksolat şöntü sadece MOT1'de gerçekleşmiştir. Periyot II'de anaplerotik reaksiyonlardan OA'dan Pyr'ın sentezlendiği tepkime R37 sadece MOT1'de, Mal'dan Pyr'ın sentezlendiği tepkime R36 ise sadece LOT koşulunda gerçekleşmiştir. Glutamik asit ve aspartik asit amino asit grubundaki amino asitlerin oluşumu tüm koşullarda vardır ve oluşum akıları MOT1, LOT, MOT2 ve HOT sırasıyla azalmıştır. Alanin grubu amino asitlerden alanin oluşumu MOT2'ta, serin grubu amino asitlerden glisin oluşumu ise LOT ve MOT1'ta inaktiftir. Diğer serin ve alanin grubu amino asitlerin oluşumu tüm koşullarda vardır ve karıştırma hızının azalmasıyla akıları da azalmaktadır. Toplam ATP üretim akıları, LOT, MOT1, MOT2 ve HOT koşullarında sırasıyla 26.173, 25.469, 26.173 ve 9.39 mol g^{-1} KH st^{-1} olmuştur.

Periyot III'te ($t=15$ st'te) tüm koşullardaki metabolik akı dağılımları incelendiğinde; glikoliz yolizinin aktif olduğu görülmüştür. Pentoz fosfat yolizi için dallanma noktası olan R5P, MOT1 koşulunda sadece G6P'tan; LOT, MOT2 ve HOT koşullarında ise sadece F6P'tan üretilmiştir. Tüm koşullarda PFY aktiftir. Glikoliz yolizinden ayrılan Pyr'tan Lac'ın oluşum tepkimesi R28 tüm koşullarda vardır. AcCoA'dan Ac'nin oluşumu R30 ise yoktur. Periyot III'te anaplerotik reaksiyonlardan OA'dan Pyr'ın sentezlendiği tepkime R37 inaktiftir. Mal'dan Pyr'ın sentezlendiği tepkime R36 ise Periyot III 'teki hiçbir koşulda gerçekleşmemiştir. Gliksolat şöntü sadece LOT ve MOT2'de gerçekleşmiştir. TCA döngüsü LOT, MOT1, MOT2 ve HOT koşullarında tamamlanmıştır. Periyot III 'te MOT2 'de sadece alanin (R53), MOT1'de sadece glisin (R51) oluşumu yoktur. Tüm koşullarda aspartik asit ve glutamik asit oluşumu (R59 ve R75) gerçekleşmektedir. Toplam ATP üretim akıları, LOT, MOT1, MOT2 ve HOT koşullarında sırasıyla 1.139, 19.062, 13.41 ve 10.305 mol g^{-1} KH st^{-1} olmuştur.

Periyot IV'te (t=21 st'te) tüm koşullardaki metabolik akı dağılımları incelendiğinde; glikoliz yolizinin tüm koşullarda aktiftir. Glikoliz yolizinden ayrılan Pyr'tan Lac'ın oluşumu (R28) tüm koşullarda, AcCoA'tan Ac'nin oluşumu R30 ise sadece LOT'ta aktiftir. Pentoz fosfat yolizi için dallanma noktası olan R5P, LOT koşullarında sadece G6P'tan, HOT koşulunda sadece F6P'tan, MOT2 koşulunda ise hem G6P hem de F6P'den üretilmiştir. MOT1 koşulunda PFY pasiftir. Periyot IV 'te anaplerotik reaksiyonlardan OA'dan Pyr'ın sentez tepkimesi R37 MOT1 ve HOT koşullarda aktif iken Mal'dan Pyr'ın sentezlendiği tepkime R36 ise tüm koşullar için pasiftir. MOT2 ve LOT'de TCA döngüsü tamamlanmaktadır. HOT koşulunda α -ketoglutarik asit oluşumuna (R41) kadar döngü çalışmaktadır; ancak, bu basamaktan sonra glikolat şöntü ile Suc oluşup, anaplerotik reaksiyonlarla da OA oluşmaktadır. Glikolat şöntü sadece HOT koşulunda pasiftir. Tüm koşullarda aspartik asit ve glutamik asit oluşumu aktiftir. LOT ve HOT koşullarında glisin (R51) oluşumu gözlenmemiştir. Toplam ATP üretim akıları, LOT, MOT1, MOT2 ve HOT koşullarında sırasıyla 11.233, 16.572, 13.264 ve 11.979 mol g⁻¹ KH st⁻¹ olmuştur.

Periyot V'te (t=27 st'te) koşullardaki metabolik akı dağılımları incelendiğinde; glikoliz yolizinin aktif olduğu görülmüştür. Glikoliz yolizinden ayrılan Pyr'tan Lac'ın oluşumu (R28) tüm koşullarda aktiftir. AcCoA'dan Ac'nin oluşumu (R30) ise HOT 'da aktiftir. Pentoz fosfat yolizi için dallanma noktası olan R5P, MOT2 koşulunda sadece G6P'tan, LOT, MOT1 ve HOT koşullarında ise sadece F6P'tan üretilmiştir. Tüm koşullarda PFY aktiftir. Periyot V'te anaplerotik reaksiyonlardan R37 ile OA'dan Pyr 'ın sentezi tüm koşullarda pasif iken, Mal 'dan Pyr'ın sentezlendiği tepkime R36 sadece MOT1'de aktiftir. TCA döngüsü LOT ve HOT 'ta tamamlanmıştır. Döngü MOT2'de Suc oluşumuna kadar, MOT1'de Mal oluşumuna kadar gerçekleşmiştir. MOT1'de Mal oluşumundan sonra anaplerotik tepkimelerle OA oluşmuştur. Tüm koşullarda aspartik asit (R59) ve glutamik asit (R75) oluşumu görülmüştür. MOT1 koşulunda alanin ve glisin, MOT2 koşulunda glisin, alanin, tirozin ve fenilalanin, HOT koşulunda ise glisin oluşumu gözlenmemiştir. Toplam ATP üretim akıları, LOT, MOT1, MOT2 ve HOT koşullarında sırasıyla 12.080, 12.535, 22.502 ve 15.543 mol g⁻¹ KH st⁻¹ olmuştur.

Çizelge 4.11 LOT ' ta metabolik akılar

R#	LOT				
	Periyot I	Periyot II	Periyot III	Periyot IV	Periyot V
1	6.608	2.166	0.634	3.452	0.517
3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
4	6.371	2.161	0.63	2.964	0.517
5	5.226	1.740	0.513	2.963	0.513
6	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
7	10.419	3.065	0.909	5.562	1.024
8	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
9	8.852	3.002	0.864	5.485	0.525
10	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
11	5.364	1.987	1.230	0.574	2.658
13	3.900	0.653	0.137	0.271	1.487
14	0.195	0.000	0.000	0.486	0.000
15	0.195	0.000	0.000	0.486	0.000
16	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
17	1.121	0.418	0.115	0.000	0.004
18	0.000	0.000	0.000	0.365	0.000
19	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
20	0.000	0.000	0.000	0.365	0.000
21	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
22	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
23	1.121	0.418	0.115	0.365	0.004
24	0.000	0.000	0.000	0.364	0.000
25	0.006	0.001	0.001	0.000	0.000
26	0.265	0.085	0.029	0.130	0.000
27	0.265	0.085	0.029	0.130	0.000
28	0.526	0.096	0.058	0.117	0.001
29	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
30	0.000	0.000	0.000	0.044	0.000
31	3.073	0.015	0.438	0.000	0.000
32	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
33	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
34	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
35	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
36	0.000	2.697	0.000	2.617	0.597
37	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
38	4.461	1.108	0.000	0.000	0.000
39	3.754	0.595	0.367	4.150	1.228
40	3.416	0.700	0.367	4.150	1.228
41	3.177	0.700	0.195	4.159	1.228
42	2.757	1.009	0.259	3.009	1.241
43	2.674	2.469	0.205	1.009	0.419
44	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
45	2.636	2.298	0.693	2.765	1.101
46	2.883	2.706	0.855	2.886	1.949
47	3.115	0.000	1.021	0.225	1.385
48	0.239	0.000	0.172	0.000	0.000

Çizelge 4.11 LOT ' ta metabolik akılar (devam)

49	0.239	0.000	0.172	0.000	0.000
50	1.568	0.063	0.045	0.077	0.499
51	0.195	0.000	0.021	0.000	0.313
52	0.058	0.007	0.007	0.009	0.005
53	0.000	0.012	0.015	0.013	0.005
54	0.232	1.494	0.044	3.225	0.697
55	0.101	1.472	0.011	3.020	0.005
56	0.131	0.022	0.033	0.205	0.691
57	1.310	0.417	0.114	0.121	0.004
58	0.023	0.392	0.094	0.111	0.002
59	3.821	0.513	0.654	0.225	0.157
60	0.056	0.007	0.007	0.011	0.006
61	3.430	0.078	0.518	0.07	0.117
62	2.858	0.01	0.454	0.012	0.006
63	2.858	0.01	0.454	0.012	0.006
64	2.858	0.01	0.454	0.012	0.006
65	2.858	0.01	0.454	0.012	0.006
66	0.572	0.068	0.064	0.058	0.11
67	0.536	0.064	0.06	0.054	0.108
68	0.068	0.008	0.008	0.01	0.006
69	0.035	0.004	0.004	0.004	0.002
70	1.116	0.417	0.114	0.729	0.004
71	0.000	0.408	0.055	0.719	0.000
72	0.000	0.004	0.058	0.009	0.003
73	1.116	0.006	0.001	0.001	0.001
74	1.116	0.006	0.001	0.001	0.001
75	7.968	1.134	1.327	1.396	0.009
76	0.621	0.489	0.154	0.21	0.000
77	0.051	0.006	0.006	0.009	0.006
78	0.086	0.01	0.01	0.014	0.023
79	0.071	0.009	0.009	0.013	0.023
80	0.071	0.009	0.009	0.013	0.023
81	0.968	0.000	0.000	0.000	0.000
82	0.000	0.000	0.000	0.000	0.016
83	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
84	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
85	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
86	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
87	0.000	0.000	0.000	0.000	0.042
88	0.000	0.389	0.092	0.107	0.000
89	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
90	0.000	0.000	0.000	0.000	0.541
91	0.116	0.000	0.000	0.000	0.824
92	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
93	0.000	0.000	0.000	0.000	0.252
94	0.407	0.048	0.045	0.032	0.095
95	0.103	0.004	0.000	0.000	0.000
96	0.083	0.000	0.054	0.000	0.822
97	0.000	1.460	0.000	3.009	0.000
98	0.066	0.008	0.007	0.003	0.000

Çizelge 4.11 LOT ' ta metabolik akılar (devam)

99	0.089	0.399	0.101	0.114	0.002
100	0.055	0.006	0.006	0.003	0.000
101	0.055	0.006	0.006	0.003	0.000
102	0.084	0.399	0.101	0.114	0.002
103	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
104	0.005	0.001	0.001	0.000	0.000
105	0.005	0.001	0.001	0.000	0.000
106	0.034	0.393	0.095	0.111	0.002
107	1.620	0.843	0.242	0.272	0.043
108	0.106	0.012	0.011	0.005	0.001
109	0.106	0.012	0.011	0.005	0.001
110	0.101	0.012	0.011	0.005	0.000
111	0.047	0.005	0.005	0.002	0.000
112	0.005	0.001	0.001	0.000	0.000
113	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000
114	0.005	0.001	0.001	0.000	0.000
115	0.005	0.001	0.001	0.000	0.000
116	0.005	0.001	0.001	0.000	0.000
117	0.000	0.000	0.000	0.000	0.266
118	0.035	0.004	0.004	0.004	0.002
119	0.155	0.018	0.017	0.01	0.003
120	0.155	0.407	0.108	0.117	0.003
121	0.000	0.023	0.000	0.015	0.000
122	15.445	0.000	2.505	2.043	0.000
123	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
124	5.409	9.973	0.71	3.725	5.219
125	5.414	3.758	1.137	2.774	1.642
126	5.442	7.334	1.243	10.331	4.361
127	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
128	9.647	1.599	1.475	1.581	0.000
130	0.094	0.011	0.011	0.013	0.007
131	1.653	0.847	0.245	0.273	0.043
132	0.537	0.063	0.058	0.03	0.006
133	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
134	0.032	0.004	0.003	0.002	0.000
135	0.006	0.001	0.001	0.000	0.000
136	0.006	0.001	0.001	0.000	0.000
137	0.065	0.008	0.007	0.003	0.000
138	0.177	0.021	0.02	0.018	0.024
139	0.018	0.002	0.002	0.001	0.000
140	0.007	0.001	0.001	0.000	0.000
141	0.006	0.001	0.001	0.000	0.000
142	0.006	0.001	0.001	0.000	0.000
143	0.006	0.001	0.001	0.000	0.000
144	0.042	0.005	0.005	0.002	0.000
145	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
146	0.004	0.000	0.000	0.000	0.000
147	0.250	0.029	0.027	0.012	0.001
148	0.0001	0.0000	0.0001	0.0009	0.0007
149	0.000	22.941	0.000	37.111	12.009

Çizelge 4.12 MOT1’de metabolik akılar

R#	MOT1				
	Periyot I	Periyot II	Periyot III	Periyot IV	Periyot V
1	9.078	7.134	1.840	3.607	0.414
3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
4	9.021	7.077	0.000	3.550	0.414
5	7.969	6.216	0.908	3.200	0.349
6	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
7	14.162	11.081	2.281	6.025	0.651
8	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
9	14.070	10.894	1.996	5.529	0.636
10	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
11	6.98	3.258	3.654	1.138	2.569
13	4.304	1.267	1.018	3.865	0.405
14	0.000	0.000	1.783	0.000	0.000
15	0.000	0.000	1.783	0.000	0.000
16	0.000	0.000	0.939	0.000	0.000
17	1.021	0.83	0.000	0.32	0.065
18	0.737	0.524	0.508	0.036	0.023
19	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
20	0.737	0.524	0.508	0.036	0.023
21	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
22	0.000	0.000	0.431	0.000	0.000
23	1.758	1.355	0.000	0.355	0.088
24	0.73	0.517	0.5	0.028	0.023
25	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
26	0.078	0.134	0.04	0.107	0.097
27	0.078	0.134	0.04	0.107	0.097
28	0.13	0.01	0.04	0.013	0.03
29	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
30	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
31	0.391	1.370	0.39	0.394	0.114
32	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
33	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
34	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
35	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
36	2.740	0.000	0.000	0.000	0.700
37	0.000	0.302	0.000	0.198	0.000
38	6.360	0.000	0.024	0.000	0.476
39	4.530	0.462	2.101	1.990	0.357
40	4.416	0.463	2.103	1.990	0.357
41	4.416	0.285	2.103	0.384	0.357
42	3.936	0.987	1.750	0.025	0.026
43	3.936	2.798	0.302	0.000	0.326
44	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
45	2.496	2.717	1.716	1.676	0.344
46	2.713	2.942	3.389	1.932	0.343
47	0.000	3.121	3.390	3.574	0.000
48	0.000	0.178	0.000	1.606	0.000
49	0.000	0.178	0.000	0.000	0.357
50	0.092	0.187	0.077	0.497	0.015

Çizelge 4.12 MOT1'de metabolik akılar (devam)

51	0.000	0.000	0.000	0.26	0.000
52	0.077	0.077	0.077	0.078	0.001
53	0.179	0.156	0.126	0.179	0.000
54	0.284	3.074	0.276	0.305	0.026
55	0.134	2.932	0.133	0.134	0.001
56	0.151	0.142	0.143	0.171	0.025
57	0.276	0.298	0.328	0.276	0.042
58	0.03	0.03	0.03	0.03	0.000
59	1.831	2.356	1.313	1.386	0.12
60	0.074	0.073	0.073	0.075	0.867
61	1.314	1.843	0.8	0.869	0.115
62	0.107	1.087	0.107	0.108	0.111
63	0.107	1.087	0.107	0.108	0.111
64	0.107	1.087	0.107	0.108	0.111
65	0.107	1.087	0.107	0.108	0.111
66	1.207	0.756	0.693	0.761	0.005
67	1.160	0.71	0.646	0.714	0.004
68	0.090	0.090	0.090	0.091	0.001
69	0.047	0.047	0.047	0.047	0.004
70	2.488	1.871	0.069	0.383	0.111
71	2.427	1.789	0.000	0.297	0.069
72	0.044	0.043	0.000	0.069	0.001
73	0.017	0.039	0.069	0.017	0.042
74	0.017	0.039	0.069	0.017	0.042
75	5.634	0.000	1.244	3.413	0.000
76	0.783	7.042	0.699	0.705	1.119
77	0.067	0.067	0.067	0.068	0.001
78	0.114	0.113	0.113	0.115	0.001
79	0.094	0.093	0.093	0.095	0.001
80	0.094	0.093	0.093	0.095	0.001
81	0.000	0.000	0.000	0.000	0.04
82	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
83	0.000	0.000	0.000	0.000	0.866
84	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
85	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
86	0.000	0.411	0.000	0.000	0.279
87	0.225	0.000	0.000	0.000	0.000
88	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
89	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
90	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
91	0.000	0.000	0.491	0.000	0.000
92	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
93	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
94	0.99	0.54	0.476	0.542	0.002
95	0.000	0.023	0.053	0.000	0.041
96	0.000	0.000	0.448	0.025	0.000
97	0.000	2.798	0.000	0.000	0.000
98	0.088	0.088	0.088	0.088	0.0001
99	0.118	0.118	0.118	0.118	0.0005
100	0.073	0.073	0.073	0.073	0.0001

Çizelge 4.12 MOT1'de metabolik akılar (devam)

101	0.073	0.073	0.073	0.073	0.0001
102	0.111	0.111	0.111	0.111	0.0005
103	0.000	0.000	0.000	0.000	0.0000
104	0.007	0.007	0.007	0.007	0.0000
105	0.007	0.007	0.007	0.007	0.0000
106	0.045	0.044	0.044	0.045	0.0004
107	0.685	0.706	0.736	0.688	0.9120
108	0.141	0.141	0.141	0.141	0.0002
109	0.141	0.141	0.141	0.141	0.0002
110	0.134	0.134	0.134	0.134	0.0002
111	0.062	0.062	0.062	0.062	0.0001
112	0.007	0.007	0.007	0.007	0.0000
113	0.000	0.000	0.000	0.000	0.0000
114	0.007	0.007	0.007	0.007	0.0000
115	0.007	0.007	0.007	0.007	0.0840
116	0.007	0.007	0.007	0.007	0.0000
117	0.000	0.000	0.000	0.000	0.0000
118	0.047	0.047	0.047	0.047	0.0004
119	0.206	0.205	0.205	0.206	0.0004
120	0.206	0.205	0.205	0.206	0.0006
121	0.484	0.259	0.259	0.000	0.0006
122	6.025	16.925	1.207	7.608	0.000
123	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
124	18.281	8.088	8.673	7.448	6.267
125	2.496	6.495	1.716	1.676	0.454
126	12.062	9.426	8.625	5.072	0.782
127	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
128	5.876	6.748	1.679	4.059	0.293
130	0.124	0.123	0.123	0.125	0.001
131	0.729	0.75	0.781	0.732	0.912
132	0.714	0.714	0.714	0.715	0.002
133	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
134	0.043	0.043	0.043	0.043	0.0001
135	0.008	0.008	0.008	0.008	0.0000
136	0.008	0.008	0.008	0.008	0.0000
137	0.086	0.086	0.086	0.086	0.0001
138	0.235	0.234	0.234	0.236	0.0020
139	0.024	0.024	0.024	0.024	0.0000
140	0.009	0.009	0.009	0.009	0.0000
141	0.008	0.008	0.008	0.008	0.0000
142	0.008	0.008	0.008	0.008	0.0000
143	0.008	0.008	0.008	0.008	0.0000
144	0.057	0.057	0.057	0.057	0.0001
145	0.000	0.000	0.000	0.000	0.0000
146	0.005	0.005	0.005	0.005	0.0000
147	0.333	0.333	0.333	0.333	0.0004
148	0.48270	0.00001	0.00001	0.00014	0.00011
149	25.592	0.000	0.574	0.000	0.000

Çizelge 4.13 MOT2’de (P1) metabolik akılar

R#	MOT2 (P1)				
	Periyot I	Periyot II	Periyot III	Periyot IV	Periyot V
1	11.145	1.935	1.400	2.347	6.870
3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
4	11.091	1.904	1.394	1.642	6.837
5	8.962	1.854	1.127	1.557	6.836
6	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
7	15.808	3.687	2.218	3.084	13.643
8	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
9	15.344	2.025	1.930	2.505	13.643
10	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
11	6.75	0.87	2.152	1.56	6.654
13	3.59	0.297	1.345	0.523	3.648
14	0.000	0.023	0.000	0.694	0.033
15	0.000	0.023	0.000	0.694	0.033
16	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
17	2.099	0.045	0.263	0.079	0.000
18	0.000	0.000	0.001	0.000	0.03
19	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
20	0.000	0.000	0.001	0.000	0.03
21	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
22	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
23	2.099	0.045	0.264	0.079	0.03
24	0.000	0.000	0.000	0.000	0.03
25	0.007	0.001	0.000	0.002	0.000
26	0.216	0.263	0.000	0.000	0.67
27	0.216	0.263	0.51	0.291	0.67
28	0.003	0.023	0.03	0.127	0.278
29	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
30	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
31	7.978	0.058	1.204	0.079	0.007
32	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
33	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
34	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
35	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
36	0.000	3.146	0.000	0.000	0.000
37	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
38	2.030	0.000	0.534	0.444	10.987
39	6.263	0.09	0.98	0.021	6.930
40	6.263	0.054	0.983	0.21	6.062
41	3.235	0.054	0.57	0.21	6.057
42	4.729	3.254	0.529	0.531	0.023
43	2.750	2.387	1.51	1.327	0.023
44	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
45	8.345	2.974	1.177	0.704	0.000
46	12.366	3.244	1.223	0.706	0.000
47	15.388	0.09	1.636	0.704	0.000
48	3.028	0.000	0.413	0.000	0.005
49	3.028	0.000	0.413	0.000	0.005
50	0.464	1.662	0.288	0.579	0.001

Çizelge 4.13 MOT2’de (P1) metabolik akılar (devam)

51	0.247	1.602	0.03	0.428	0.000
52	0.073	0.011	0.009	0.016	0.001
53	0.17	0.000	0.000	0.000	0.002
54	0.267	2.503	0.054	0.875	0.022
55	0.127	2.407	0.016	0.822	0.002
56	0.139	0.096	0.039	0.052	0.020
57	2.091	0.067	0.261	0.772	0.003
58	1.857	0.004	0.004	0.672	0.001
59	11.155	0.38	1.190	1.127	4.057
60	0.07	0.011	0.009	0.015	0.002
61	9.017	0.127	1.259	0.172	3.203
62	8.294	0.016	1.170	0.022	0.002
63	8.294	0.016	1.170	0.022	0.002
64	8.294	0.016	1.170	0.022	0.002
65	8.294	0.016	1.170	0.022	0.002
66	0.723	0.111	0.088	0.15	3.201
67	0.678	0.105	0.083	0.141	3.201
68	0.086	0.013	0.011	0.018	0.025
69	0.045	0.007	0.006	0.009	0.001
70	2.091	0.044	0.264	0.077	0.059
71	0.054	0.009	0.008	0.012	0.058
72	2.021	0.007	0.024	0.009	0.001
73	0.016	0.029	0.232	0.056	0.000
74	0.016	0.029	0.232	0.056	0.000
75	18.001	1.827	2.578	1.982	6.034
76	2.491	0.102	0.081	0.855	6.033
77	0.064	0.01	0.008	0.014	0.001
78	0.108	0.017	0.014	0.023	0.002
79	0.089	0.014	0.012	0.019	0.002
80	0.089	0.014	0.012	0.019	0.002
81	0.000	0.000	0.21	0.017	0.000
82	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
83	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
84	0.000	0.235	0.000	0.000	0.000
85	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
86	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
87	0.000	0.000	0.000	0.000	0.584
88	0.83	0.000	0.000	0.666	0.000
89	0.000	0.000	0.000	0.000	0.023
90	0.000	0.069	0.000	0.000	0.000
91	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
92	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
93	0.000	0.000	0.000	0.000	0.579
94	0.516	0.079	0.062	0.106	0.174
95	0.000	0.026	0.23	0.052	0.000
96	0.979	0.000	0.019	0.000	0.000
97	0.000	2.387	0.000	0.796	0.000
98	0.084	0.013	0.010	0.017	0.001
99	1.941	0.017	0.013	0.689	0.001
100	0.070	0.011	0.008	0.014	0.001

Çizelge 4.13 MOT2’de (P1) metabolik akılar (devam)

101	0.07	0.011	0.008	0.014	0.001
102	1.934	0.016	0.013	0.687	0.001
103	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
104	0.006	0.001	0.001	0.001	0.000
105	0.006	0.001	0.001	0.001	0.000
106	1.871	0.007	0.005	0.674	0.001
107	4.309	0.127	0.310	1.520	0.010
108	0.135	0.021	0.016	0.027	0.001
109	0.135	0.021	0.016	0.027	0.001
110	0.128	0.020	0.015	0.026	0.001
111	0.059	0.009	0.007	0.012	0.001
112	0.006	0.001	0.001	0.001	0.000
113	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
114	0.006	0.001	0.001	0.001	0.000
115	0.006	0.001	0.001	0.001	0.000
116	0.006	0.001	0.001	0.001	0.000
117	0.000	1.564	0.000	0.378	0.000
118	0.045	0.007	0.006	0.009	0.001
119	0.196	0.03	0.023	0.04	0.002
120	2.024	0.03	0.023	0.706	0.002
121	0.000	0.000	0.000	0.000	1.587
122	40.206	1.724	5.322	2.365	10.594
123	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
124	10.967	9.581	3.692	5.968	11.251
125	16.537	5.430	2.334	0.796	0.046
126	18.274	6.535	2.016	2.097	0.464
127	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
128	23.436	3.276	2.882	3.255	13.020
130	0.118	0.018	0.015	0.025	0.002
131	4.352	0.133	0.315	1.528	0.011
132	0.682	0.104	0.081	0.139	0.008
133	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
134	0.041	0.006	0.005	0.008	0.000
135	0.007	0.001	0.001	0.002	0.000
136	0.007	0.001	0.001	0.002	0.000
137	0.082	0.013	0.010	0.017	0.001
138	0.224	0.035	0.027	0.047	0.003
139	0.023	0.003	0.003	0.005	0.000
140	0.009	0.001	0.001	0.002	0.000
141	0.007	0.001	0.001	0.002	0.000
142	0.007	0.001	0.001	0.002	0.000
143	0.007	0.001	0.001	0.002	0.000
144	0.054	0.008	0.006	0.011	0.001
145	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
146	0.005	0.001	0.001	0.001	0.000
147	0.318	0.049	0.037	0.064	0.003
148	0.0000	0.3028	0.0001	1.1200	0.0001
149	0.000	25.704	0.000	7.441	23.337

Çizelge 4.14 HOT'ta metabolik akılar

R#	HOT				
	Periyot I	Periyot II	Periyot III	Periyot IV	Periyot V
1	5.570	0.769	0.892	1.505	2.213
3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
4	4.271	0.768	0.887	1.492	2.207
5	4.246	0.683	0.863	1.275	1.973
6	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
7	8.410	1.282	1.713	2.268	3.512
8	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
9	7.747	1.272	0.898	2.196	3.484
10	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
11	2.123	0.335	0.228	2.456	2.896
13	0.568	0.231	0.198	1.408	1.981
14	1.253	0.000	0.000	0.000	0.000
15	1.253	0.000	0.000	0.000	0.000
16	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
17	0.000	0.084	0.020	0.210	0.231
18	0.544	0.000	0.000	0.068	0.202
19	0.000	0.000	0.009	0.000	0.000
20	0.544	0.000	0.000	0.068	0.202
21	0.000	0.000	0.009	0.000	0.000
22	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
23	0.544	0.084	0.011	0.278	0.433
24	0.537	0.000	0.000	0.066	0.202
25	0.000	0.000	0.01	0.000	0.000
26	0.170	0.009	0.067	0.05	0.013
27	0.170	0.009	0.067	0.05	0.013
28	0.036	0.013	0.123	0.097	0.080
29	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
30	0.000	0.201	0.000	0.000	0.474
31	1.957	0.000	0.007	0.090	0.000
32	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
33	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
34	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
35	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
36	1.570	0.347	0.000	0.000	0.000
37	0.000	0.000	0.000	0.212	0.000
38	4.964	0.000	0.864	0.000	0.000
39	2.181	0.528	1.766	0.651	1.379
40	2.427	0.528	1.766	0.651	1.379
41	2.427	0.528	1.766	0.018	1.043
42	2.145	0.600	1.725	0.000	0.947
43	2.145	0.600	1.140	0.000	0.947
44	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
45	1.408	0.898	1.689	0.481	1.270
46	1.579	0.978	2.296	0.617	1.293
47	0.000	0.634	2.294	1.251	1.627
48	0.000	0.000	0.000	0.633	0.337
49	0.000	0.000	0.000	0.633	0.337
50	0.663	0.010	0.815	0.072	0.028

Çizelge 4.14 H0T'ta metabolik akılar (devam)

51	0.000	0.005	1.413	0.000	0.000
52	0.063	0.002	0.008	0.017	0.008
53	0.000	0.004	0.019	0.039	0.018
54	0.229	0.707	0.045	0.081	0.041
55	0.109	0.003	0.014	0.030	0.014
56	0.120	0.704	0.031	0.051	0.028
57	0.702	0.083	0.028	0.141	0.028
58	0.025	0.079	0.003	0.088	0.003
59	2.783	0.106	1.391	0.388	0.248
60	0.060	0.002	0.008	0.017	0.008
61	2.361	0.017	1.337	0.192	0.194
62	1.742	0.002	0.012	0.024	0.011
63	1.742	0.002	0.012	0.024	0.011
64	1.742	0.002	0.012	0.024	0.011
65	1.742	0.002	0.012	0.024	0.011
66	0.619	0.015	1.325	0.168	0.183
67	0.581	0.014	1.320	0.158	0.178
68	0.074	0.002	0.010	0.020	0.009
69	0.038	0.001	0.005	0.010	0.005
70	1.081	0.084	0.002	0.344	0.635
71	0.555	0.083	0.000	0.330	0.628
72	0.036	0.001	0.000	0.010	0.005
73	0.491	0.000	0.002	0.004	0.002
74	0.491	0.000	0.002	0.004	0.002
75	6.152	0.226	0.000	1.096	1.098
76	0.568	0.092	1.835	0.255	0.128
77	0.055	0.001	0.007	0.015	0.007
78	0.093	0.002	0.012	0.026	0.012
79	0.077	0.002	0.010	0.021	0.010
80	0.077	0.002	0.010	0.021	0.010
81	0.331	0.000	0.000	0.000	0.000
82	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
83	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
84	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
85	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
86	0.000	0.000	0.762	0.000	0.000
87	0.000	0.000	0.623	0.000	0.053
88	0.000	0.078	0.000	0.081	0.000
89	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
90	0.000	0.699	0.000	0.000	0.000
91	0.000	0.000	0.59	0.000	0.000
92	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
93	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
94	0.442	0.011	0.301	0.119	0.16
95	0.477	0.000	0.000	0.000	0.000
96	0.000	0.000	0.585	0.000	0.000
97	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
98	0.072	0.002	0.009	0.019	0.009
99	0.096	0.08	0.012	0.107	0.012
100	0.06	0.001	0.007	0.016	0.007

Çizelge 4.14 HÖT'ta metabolik akılar (devam)

101	0.060	0.001	0.007	0.016	0.007
102	0.091	0.08	0.012	0.105	0.011
103	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
104	0.005	0.000	0.001	0.001	0.001
105	0.005	0.000	0.001	0.001	0.001
106	0.036	0.079	0.005	0.091	0.005
107	1.036	0.170	0.072	0.314	0.07
108	0.115	0.003	0.014	0.031	0.014
109	0.115	0.003	0.014	0.031	0.014
110	0.11	0.003	0.014	0.029	0.013
111	0.051	0.001	0.006	0.014	0.006
112	0.005	0.000	0.001	0.001	0.001
113	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
114	0.005	0.000	0.001	0.001	0.001
115	0.005	0.000	0.001	0.001	0.001
116	0.005	0.000	0.001	0.001	0.001
117	0.000	0.000	0.764	0.000	0.000
118	0.038	0.001	0.005	0.010	0.005
119	0.168	0.004	0.021	0.045	0.021
120	0.168	0.082	0.021	0.126	0.021
121	0.212	0.000	0.000	0.057	0.079
122	7.913	0.219	3.529	2.361	1.338
123	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
124	6.202	3.896	3.738	4.999	7.136
125	3.063	1.597	1.689	1.981	1.270
126	0.000	2.215	2.457	2.117	4.703
127	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
128	6.937	0.316	2.592	1.281	1.140
130	0.101	0.003	0.013	0.028	0.013
131	1.073	0.171	0.077	0.323	0.075
132	0.584	0.014	0.073	0.156	0.072
133	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
134	0.035	0.001	0.004	0.009	0.004
135	0.006	0.002	0.001	0.002	0.001
136	0.006	0.000	0.001	0.002	0.001
137	0.071	0.002	0.009	0.019	0.009
138	0.192	0.005	0.025	0.052	0.024
139	0.019	0.000	0.002	0.005	0.002
140	0.008	0.000	0.001	0.002	0.001
141	0.006	0.000	0.001	0.002	0.001
142	0.006	0.000	0.001	0.002	0.001
143	0.006	0.000	0.001	0.002	0.001
144	0.046	0.001	0.006	0.012	0.006
145	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
146	0.004	0.000	0.001	0.001	0.001
147	0.272	0.007	0.034	0.073	0.033
148	0.237	0.121	0.752	0.919	0.611
149	0.000	9.484	4.867	2.216	15.620

4.4 Hibrit-gen İçeren ve İçermeyen pMK4 Taşıyan *B.subtilis* ile hGH Üretim ve Biyoproses Karakteristiklerinin Kıyaslanması

4.4.1 Ürün ve yan-ürün dağılımına etkileri

hGH üretimi için belirlenmiş olan en uygun oksijen aktarım koşulu MOT2, yani $Q_o/V_R = 0.5 \text{vvm}$ ve $N=800 \text{ dk}^{-1}$ 'dir. MOT2 oksijen aktarım koşulunda hibrit-genin *B.subtilis* üzerindeki etkilerini kıyaslamak amacıyla, hibrit-gen içeren r-pMK4 taşıyan *B.subtilis* ve pMK4 taşıyan *B.subtilis* ile, $V_R=0.5 \text{ dm}^3$, $C_{Go}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH}_o=7.25$, $T=37^\circ\text{C}$ tepkime koşullarında, pilot-ölçek biyoreaktörlerde iki paralel deney gerçekleştirilmiştir. Biyoproses süresince karıştırma hızı, çözülmüş oksijen derişimi ve başlangıç değeri $\text{pH}_o=7.25$ olan pH'ın değışimi sürekli-ölçümle izlenmiş; sistemden kalma süresine karşı belirlenen aralıklarla alınan örneklerde girdi, hücre, ürün derişimleri ölçülmüş; Dinamik Yöntem ile proses süresince K_{La} belirlenmiştir. Tasarlanan deney koşulları Çizelge 4.15'deki kısaltmalarla gösterilmiştir.

Çizelge 4.15 İki farklı plasmid taşıyan *B.subtilis* ile MOT2 koşulunda gerçekleştirilen pilot-ölçek biyoreaktör deneyleri

Plasmid	Hibrit-gen	Biyoreaktör Deneyi: Proses
r- pMK4	<i>-pre(subC)::hGH</i>	P1
pMK4	-	P2

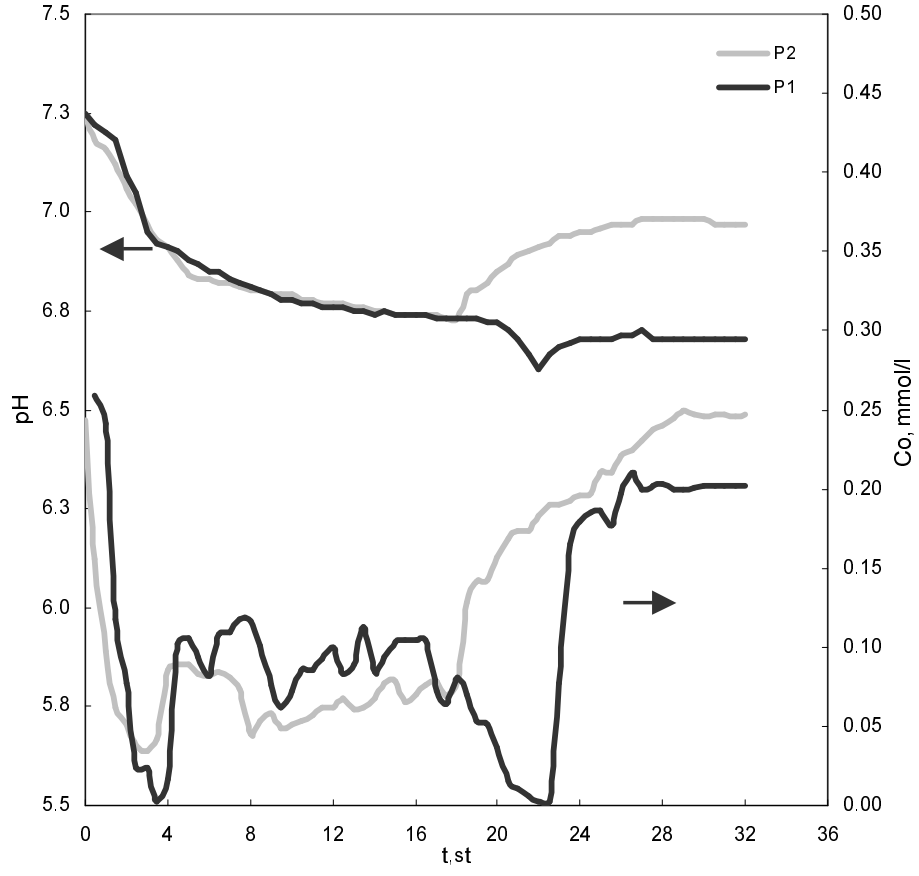
Biyoproses süresince pH'ın kalma süresi ile değışimi (Şekil 4.45) incelendiğinde; her iki proseste ortam pH'nın proteaz inhibitörünün eklendiği zamana ($t=4 \text{ st}$) kadar hızlı ($t=0-4 \text{ st}$) sonra daha yavaş ($t=4-22 \text{ st}$) azaldığı ve bir minimum değere ulaştıktan sonra arttığı görülmektedir. Proses süresince P1 prosesinde $t=21 \text{ st}$ 'te $\text{pH}=6.6$ minimum değerine ulaşırken P2 işletiminde daha erken $t=18 \text{ st}$ 'te $\text{pH}=6.73$ 'te ulaşılmıştır. $t=4 \text{ st}$ 'te üretim ortamlarına eklenen proteaz inhibitörünün her iki proses üzerindeki etkisi Şekil 4.45'da da görüldüğü gibi benzerdir. hGH üretim periyodunda ($t=21-32 \text{ st}$) da pH

artışı gözlenmiştir. Proses sonunda ortamın pH değeri P1 ve P2 proseslerinde, sırasıyla, 6.68 ve 6.98 olarak kalmıştır.

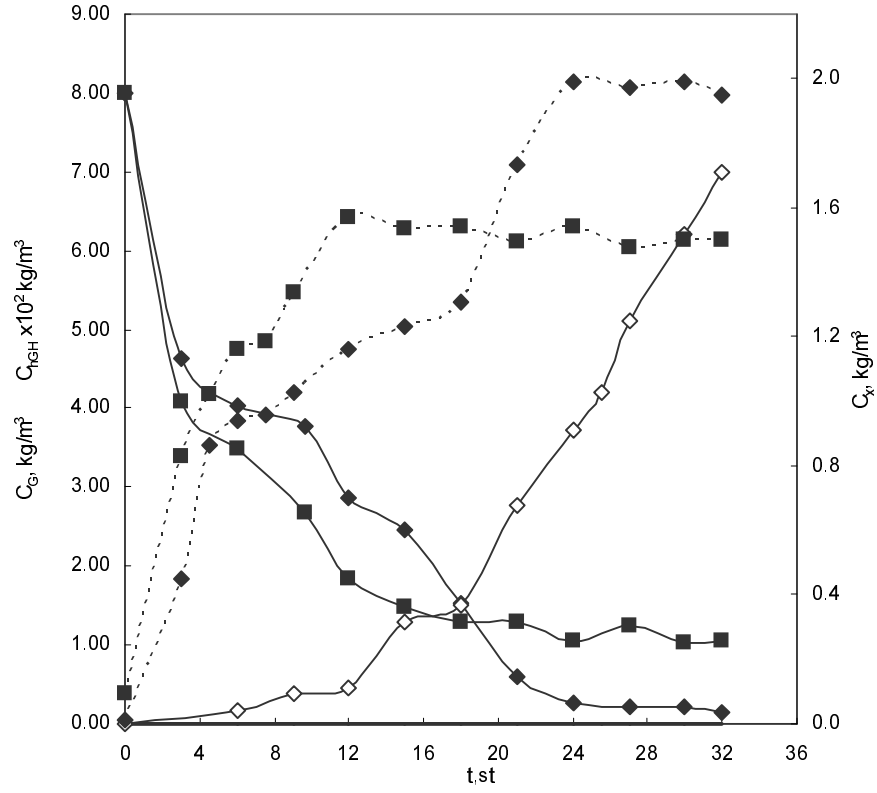
Çözünmüş oksijen derişiminin kalma süresi ile değişimi (Şekil 4.45) incelendiğinde $t=18$ st'e kadar benzer profiller gözlenmiştir. Şekil 4.45'deki profiller incelendiğinde; her iki proseste de çözünmüş oksijen derişimi $t=0-4$ st zaman aralığında hızla azaldığı, $t=4$ st'te 25.2 mM proteaz inhibitörünün eklenmesiyle aniden $C_o=0.089$ mmol/l 'ye kadar artış gözlenmiştir. Bu durum proteaz inhibitörünün hücre çoğalmasını ve sonuçta ortamdaki çözünmüş oksijen derişimini etkilediğinin göstermiştir. P2 prosesinde çözünmüş oksijen derişimi $t=18$ st'e kadar $C_o=0.094-0.045$ mmol/l aralığında kaldıktan sonra artmış ve proses sonuna dek bu değerde kalmıştır. Hibrit gen içeren P1 prosesinde ise çözünmüş oksijen derişimi $t=18$ st'e kadar $C_o=0.12-0.064$ mmol/l aralığında kaldıktan sıfıra çok yaklaşmış ve üstel çoğalma fazının bitmesiyle artarak proses sonuna dek bu değerde kalmıştır. Her iki proses karşılaştırıldığında hGH üretim fazında P1'teki çözünmüş oksijen derişiminin daha düşük olması hücre çoğalması ve hGH üretimi için oksijen ihtiyacının yüksek olduğunu göstermiştir.

Mikroorganizma derişiminin kalma süresi ile değişimi (Şekil 4.46) incelendiğinde; P1 ve P2 proseslerinde maksimum hücre derişimleri sırasıyla $t=24$ st 'te $C_x= 2.0$ kg m^{-3} ve $t=12$ st'te $C_x= 1.2$ kg m^{-3} olarak elde edilmiştir. Şekil 4.46'den de görüldüğü gibi r-pMK4 taşıyan mikroorganizma ulaşılan en yüksek hücre derişimi daha fazladır. P2'de ikinci hücre çoğalma fazı yoktur. Bu durum hibrit genin hücre çoğalmasını arttırdığını ve dolayısıyla ikinci çoğalma fazını oluşturduğunu göstermektedir.

Glukoz derişiminin kalma süresi ile değişimi (Şekil 4.46) incelendiğinde; hücrenin durgunluk fazına ulaşana kadar glukoz hızla tüketilmiş sonra glukoz tüketim hızı yavaşlamıştır. P1 ve P2 prosesleri sonunda, sırasıyla, başlangıçtaki glukozun %95'i ve %85'i tüketilmiştir. Şekil 4.46'den de görüldüğü gibi glukoz, hücre ve hGH derişim grafikleri paralellik göstermiştir. Üstel çoğalma fazında glukoz tüketimi artmış, duraklama fazında ise azalmıştır. Hibrit gen içeren pMK4 ile üretimde ikili çoğalma görülmekte ve glukoz tüketimi de buna paralel olarak artmıştır. Doğal olarak sadece insanda üretildiğinden beklendiği gibi P2'de hGH üretimi yoktur.



Şekil 4.45 P1 ve P2 proseslerinde çözülmüş oksijen derişiminin ve pH'ın t ile değişimi:
 $C_{G0}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH}_0=7.25$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=550 \text{ cm}^3$



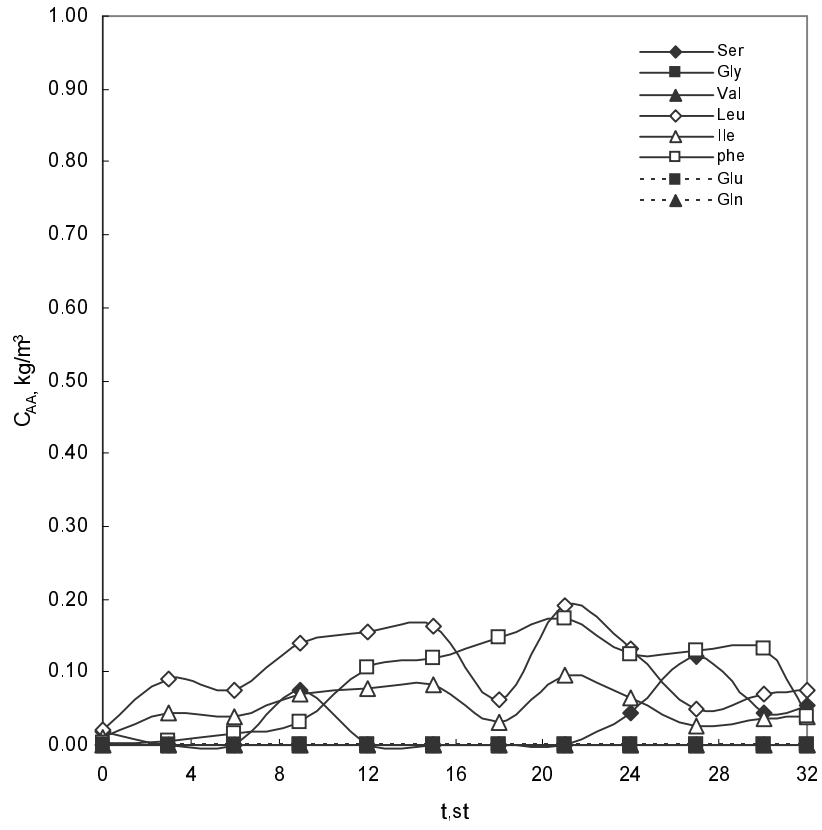
Şekil 4.46 P1 ve P2 proseslerinde glukoz, hücre ve hGH derişimlerinin t ile değişimi:

$C_{G0}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH}_0=7.25$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=550 \text{ cm}^3$

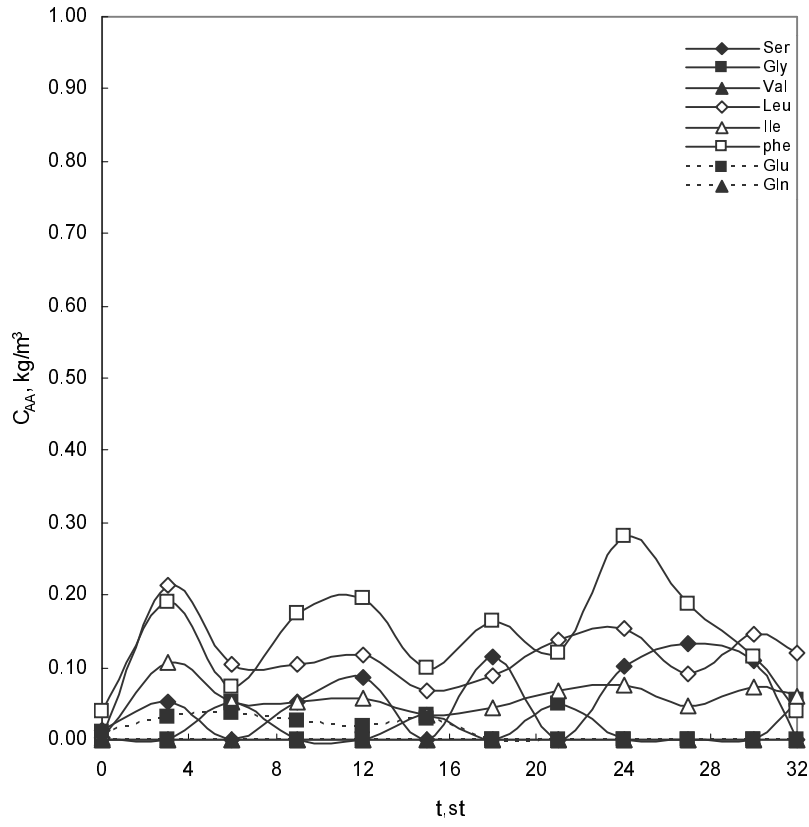
Glukoz derişimi: (■) pMK4; (◆) r-pMK4

Hücre derişimi: (- -■- -) pMK4; (- -◆- -) r-pMK4

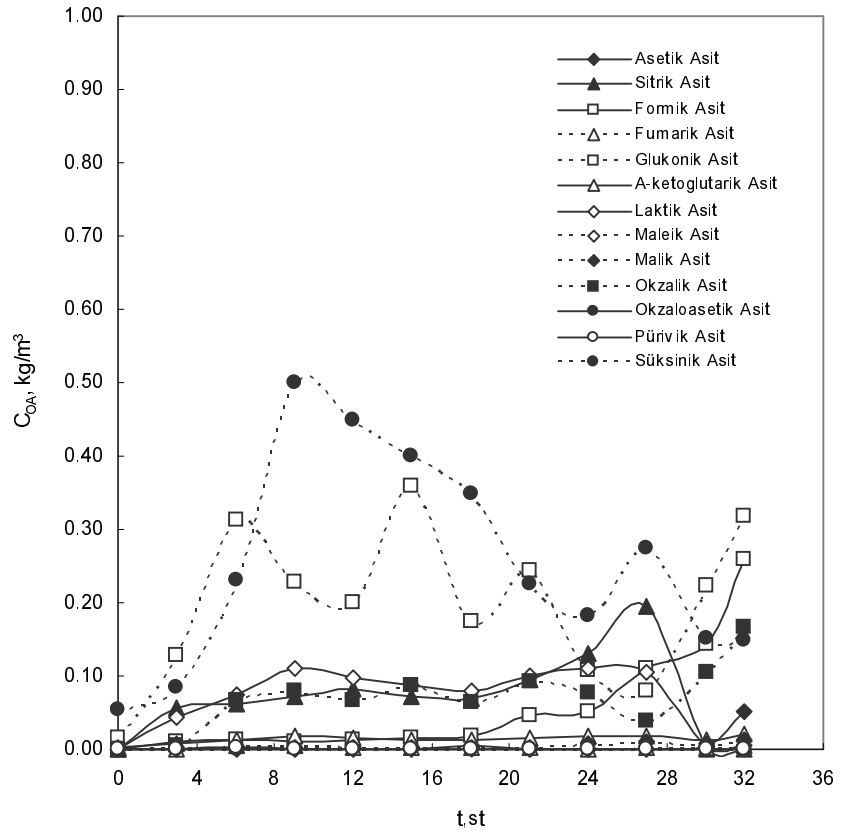
hGH derişimi: (-) pMK4; (◇) r-pMK4



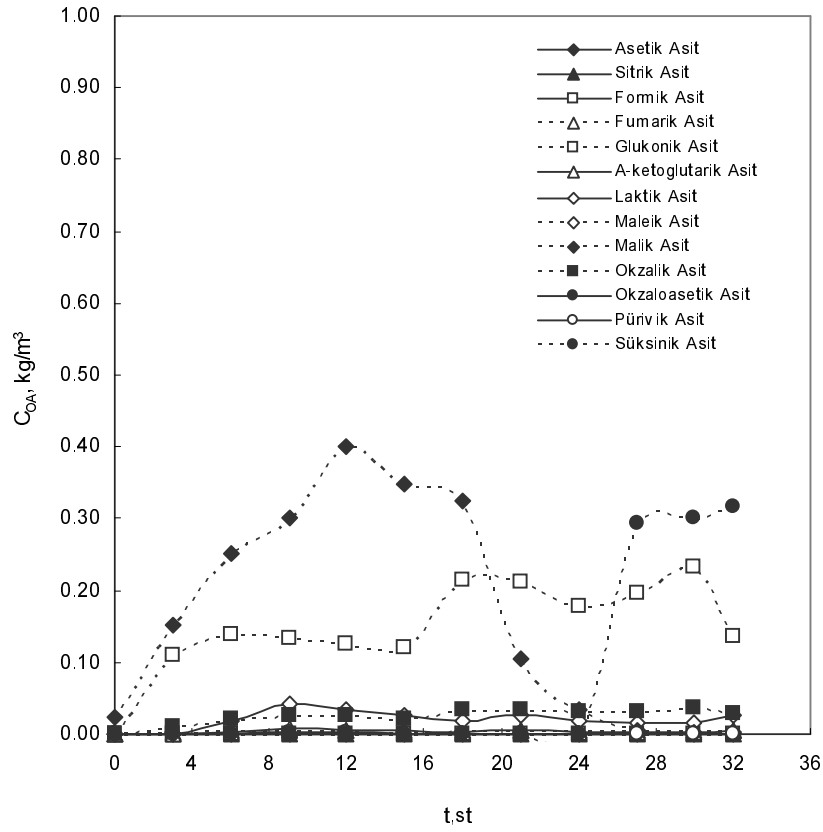
Şekil 4.47 P1'de ortama aktarılan amino asit derişimlerinin t ile değişimi:
 $C_{G_0}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $pH_0=7,25$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=550 \text{ cm}^3$



Şekil 4.48 P2'de ortama aktarılan amino asit derişimlerinin t ile değişimi:
 $C_{G_0}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH}_0=7,25$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=550 \text{ cm}^3$



Şekil 4.49 P1’de ortama aktarılan organik asit derişimlerin t ile değişimi: $C_{G0}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH}_0=7,25$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=550 \text{ cm}^3$



Şekil 4.50 P2'de ortama aktarılan organik asit derişiminin t ile değişimi:
 $C_{G_0}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $pH_0=7,25$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=550 \text{ cm}^3$

Hibrit-gen içeren ve içermeyen pMK4 taşıyan *B.subtilis* ile tasarlanan P1 ve P2 deneyleri, hücre dışına aktarılan amino asitler ile organik asitlerin ve derişimlerinin, araştırılmıştır. hücreiçi tepkimelerin ve yolizlerinin biyoproses sürence değişiminin incelenmesi için

P1 ve P2 proseslerinde amino asit ve organik asitlerin derişimlerinin kalma süresiyle değişimleri Şekil 4.47 ve Şekil 4.49'de verilmiştir. Biyoproses süresince ortamda gözlenen amino asitler serin, lözin, isolözin ve fenilalanindir. Üretim ortamında gözlenen amino asitlerin derişimlerinin kalma süresi ile salınım gösterdikleri bulunmuştur. Yan-ürün olarak biyoreaktörde en yüksek derişimde bulunan amino asitler sırasıyla lözin (0.191 kg m^{-3}), fenilalanin (0.172 kg m^{-3}), serin (0.120 kg m^{-3}), isolözindir (0.096 kg m^{-3}). Glutamin derişimi sıfıra yakındır. Alanin, arjinin, glutamik asit, histidin, triptofan, metionin, lizin, aspartik asit, valin, glisin, treonin ve asparajin

ise proses süresince üretim ortamında bulunmamaktadır. Biyoproses süresince ortamda gözlenen organik asitler ise glukonik, süksinik, laktik ve sitrik asittir. Organik asitlerin derişimlerinin kalma süresiyle salınım gösterdikleri belirlenmiştir (Şekil 4.49). Süksinik asit üretim ortamına diğer organik asitlerden daha fazla salgılanma özelliği göstermiş ve en yüksek derişimine $t=9$ st'de (0.45 kg/m^3) ulaşmıştır. Yan-ürün olarak biyoreaktörde en yüksek derişimde bulunan diğer organik asitler sırasıyla glukonik asit (0.359 kg m^{-3}), sitrik asit (0.190 kg m^{-3}), laktik asit (0.111 kg m^{-3}) ve formik asittir (0.100 kg m^{-3}). Üretim ortamındaki diğer organik asitlerden malik, pirüvik, fumarik, okzalik ve α -ketoglutarik asit $0.1-0.001 \text{ kg/m}^3$ derişim aralığında; asetik asit ise sıfıra yakın derişimde bulunmuştur. Maleik ve okzaloasetik asit ise proses süresince üretim ortamında bulunmamaktadır.

Hibrit-gen içermeyen pMK4 taşıyan *B.subtilis* ile P2 prosesinde amino asit ve organik asitlerin derişimlerinin kalma süresiyle derişimleri Şekil 4.48 ve Şekil 4.50'de verilmiştir. Biyoproses süresince ortamda belirgin bir şekilde gözlenen amino asitler serin, lözin, isolözin, glisin ve fenilalanindir. P1 koşulunda olduğu gibi P2 koşulunda da üretim ortamında gözlenen amino asitlerin derişimlerinin kalma süresi ile salınım gösterdikleri bulunmuştur (Şekil 4.48). Yan-ürün olarak biyoreaktörde en yüksek derişimde bulunan amino asitler sırasıyla fenilalanin (0.281 kg m^{-3}), lözin (0.214 kg m^{-3}), serin (0.132 kg m^{-3}), isolözindir (0.107 kg m^{-3}). P2 koşulunda ortamda en yüksek derişimde bulunan amino asit fenilalanin iken P1'te lözindir. P2'de serin derişimi proses süresince salınım göstermiş, P1'de ise sadece Periyot II, IV ve V'te ve daha düşük derişimlerde salgılanmaktadır. Glisin derişimi P2'de proses süresince düşük derişimlerde salgılanmış, hGH üretiminin olduğu P1 koşulunda ise salgılanmamıştır. Bu P2'deki amino asitlerin P1'de az yada hiç salgılanmaması hGH üretiminde kullanıldığını göstermektedir. P1'de hGH üretimi arttıkça süksinik asit derişimininde kalma süresiyle azaldığı görülmüştür. P2'de ise süksinik asit $t=24$ st'ten sonra salgılanmış olduğu görülmüştür. Üretim ortamına aktarılan amino asit derişimleri açısından P2'de lözin, isolözin, glisin, fenilalanin derişimlerinin P1'e göre daha fazla olduğu görülmüştür. Hücre derişimleri de dikkate alındığında P1 prosesinde amino asit derişimlerindeki azalma ürün üretiminin gerçekleştiğini göstermektedir. Alanin, arjinin, histidin, triptofan, metiyonin, lizin, glutamin, valin, treonin ve asparajin ise proses

süresince üretim ortamında bulunmamaktadır. Biyoproses süresince ortamda belirgin bir şekilde gözlenen organik asitler ise malik, glukonik, süksinik asittir. P2 ile karşılaştırıldığında P1’de hibrit-gen varlığı nedeniyle hücre çoğalması daha fazladır ve salgılanan organik asit derişimleri de daha fazladır. Ortamdaki organik asitlerin derişimlerinin kalma süresiyle salınım gösterdikleri belirlenmiştir (Şekil 4.50). Yan-ürün olarak biyoreaktörde en yüksek derişimde bulunan organik asitler sırasıyla malik asit (0.4 kg m^{-3}), süksinik asit (0.318 kg m^{-3}) ve glukonik asittir (0.233 kg m^{-3}). Üretim ortamındaki diğer organik asitlerden pirüvik, fumarik, okzalik, fumarik, maleik, laktik ve α -ketoglutarik asit 0.1 - 0.001 kg/m^3 derişim aralığında bulunmuştur. Sitrik, asetik ve okzaloasetik asit ise proses süresince üretim ortamında bulunmamaktadır.

Çizelge 4.16’da toplam amino asit derişimleri incelendiğinde genel olarak P1 prosesinde ortama P2’ye kıyasla daha düşük miktarda aktarıldığı görülmüştür. Ortama aktarılan toplam organik asit derişimleri incelendiğinde ise (Çizelge 4.17); prosesin farklı evrelerinde farklı durumların gözlendiği, fakat hücre çoğalmaları dikkate alındığında genelde proses P1 ’de ortama daha fazla miktarlarda organik asit aktarıldığı; en yüksek toplam organik asit derişimine de $t= 15 \text{ st}$ ’te (1.039 kg/m^3) ulaşıldığı görülmüştür.

Çizelge 4.16 P1 ve P2 proseslerinde toplam amino asit derişiminin t ile değişimi: $C_{G_0}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH}_0=7,25$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=550 \text{ cm}^3$, $N=800 \text{ dk}^{-1}$, $Q_0/V_R= 0.5 \text{vvm}$

t; st	$C_{AA}; \text{kg/m}^3$	
	P1 r-pMK4	P2 pMK4
0	0.053	0.068
3	0.140	0.596
6	0.127	0.318
9	0.316	0.409
12	0.340	0.473
15	0.364	0.262
18	0.238	0.412
21	0.460	0.376
24	0.364	0.613
27	0.324	0.456
30	0.281	0.443
32	0.207	0.273

Çizelge 4.17 P1 ve P2 proseslerinde toplam organik asit derişiminin t ile değişimi:
 $C_{Go}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $pH_o=7,25$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=550 \text{ cm}^3$, $N=800 \text{ dk}^{-1}$,
 $Q_o/V_R= 0.5 \text{vvm}$

t; st	$C_{OA}; \text{kg/m}^3$	
	P1 r-pMK4	P2 pMK4
0	0.073	0.026
3	0.337	0.277
6	0.779	0.439
9	0.723	0.522
12	0.932	0.599
15	1.039	0.520
18	0.777	0.598
21	0.822	0.385
24	0.685	0.268
27	0.835	0.553
30	0.655	0.597
32	0.988	0.519

4.4.2 Oksijen aktarım karakteristikleri

Çizelge 4.18 incelendiğinde P2’de de P1’deki gibi genel olarak K_{La} ’nın kalma süresiyle arttığı görülmüştür. P2’de Periyot II ve III’te ortamdaki çözünmüş oksijen derişiminin çok düşük olması sebebiyle K_{La} belirlenememiştir. $t=4 \text{ st}$ ’te ortama eklenen proteaz inhibitörü P1’de olduğu gibi P2’de de mikroorganizmayı dolayısıyla oksijen tüketimini etkilemiştir. Biyoproses süresince en yüksek K_{La} değerine P2’deki Periyot I’de ($t=0.5 \text{ st}$ ’te $K_{La}= 0.028 \text{ s}^{-1}$) ölçülebilmıştır. Artma faktörünün (E) değeri her iki koşul için ilk dört periyotta 1.00-2.15 arasında değişmiş, Periyot V ise 0.77 olarak bulunmuştur. $E < 1$ olması üretim ortamının reolojik özelliklerinin değiştiğini göstermektedir. Dolayısıyla K_{La} değeri de değişmiştir. Biyoproses Periyot I’de biyokimyasal reaksiyon kısıtlamalı ($Da \ll 1$); Periyot II,III, IV ve V’te ise hücre duraklama fazında olduğunda Da hesaplanamamıştır. P1’de oksijen tüketim hızı kalma süresiyle artmıştır. İki koşul karşılaştırıldığında Periyot I’de oksijen tüketim hızı P2’de ($-r_o= 1.3 \text{ mol m}^{-3} \text{ s}^{-1}$) daha büyüktür. Bu periyotta P2’deki hücre çoğalması olduğundan (Şekil 4.46) oksijen tüketimi de fazla olmuştur (Şekil 4.45). P2’de etkinlik katsayısı biyoproses süresince sadece Periyot I’de hesaplanabilmiştir ve değeri 1.0’dır. Bu da P2

koşulunda hücrelerinin kullanabilecekleri maksimum oksijeni neredeyse tükttüklerini göstermektedir.

Çizelge 4.18 P1 ve P2 plasmidleri içeren *B.subtilis* ile oksijen aktarım karakteristiklerinin biyoproses süresince değişimi:
 $C_{G_0}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $pH_0=7.25$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=0.550 \text{ dm}^3$

Koşul	Periyot	$K_{L,a}$ (s^{-1})	$E=K_{L,a}/K_{L,a_0}$	$r_o \cdot 10^3$ ($\text{mol m}^{-3} s^{-1}$)	$OTR \cdot 10^3$ ($\text{mol m}^{-3} s^{-1}$)	$OTR_{\max} \cdot 10^3$ ($\text{mol m}^{-3} s^{-1}$)	$OD \cdot 10^3$ ($\text{mol m}^{-3} s^{-1}$)	Da OD/OTR_{\max}	η r_o/OD
<i>-pre(subC)::hGH::pMK4</i> (P1)	t<0	$K_{L,a_0}=0.013$	1.00	-	-	-	-	-	-
	I	0.017	1.31	0.6	0.55	4.64	1.1	0.24	0.54
	II	0.018	1.38	1.6	2.79	4.91	19.9	4.07	0.08
	III	0.014	1.08	1.0	2.35	3.82	63.5	16.62	0.02
	IV	0.015	1.15	0.6	4.01	4.10	8.1	1.98	0.07
	V	0.010	0.77	0.4	0.71	2.73	-	-	-
<i>pMK4</i> (P2)	t<0	$K_{L,a_0}=0.013$	1.00	-	-	-	-	-	-
	I	0.028	2.15	1.3	1.17	5.58	1.3	0.23	1.00
	II	-	-	-	-	-	-	-	-
	III	-	-	-	-	-	-	-	-
	IV	0.013	1.00	0.4	2.33	2.40	-	-	-
	V	0.010	0.77	0.3	0.99	2.00	-	-	-

4.4.3 Metabolik yolizi analizi ile hücreiçi akıların bulunması

Metabolik hızların biyoreaktörlerde çoğalma, ürün ve yan-ürün oluşumu sürecindeki dağılımı hGH üretim prosesinin geliştirilmesi için tepkime yolizindeki önemli özelliklerin ve muhtemel darboğazların belirlenmesi amacıyla incelenmiştir. Hibrit-geninin metabolik yolizlerine etkisi ayrıntılı olarak incelenebilmesi amacıyla P1 ve P2 prosesleri için metabolik akı analizi (MAA) analizi yapılmıştır. Hücre ve hGH derişim profilleri dikkate alındığında proses beş periyoda ayrılmıştır. P1 ve P2 proseslerinde t=3, 9, 15, 21 ve 27 st için metabolik akıların dağılımı Çizelge 4.13 (Bölüm 4.3.3) ve Çizelge 4.19'da verilmiştir.

Periyot I'de (t=3 st'te) tüm koşullardaki metabolik akı dağılımları incelendiğinde; tüm koşullarda amino asitlerin ve hücre bileşenlerinin girdileri olan G6P, F6P, T3P, PG3 ve PEP üretiminin gerçekleştiği glikoliz yolizinin aktif olduğu görülmüştür. Glikoliz yolizinde G6P ve F6P iki ayrı tepkime grubuyla üretilebilen R5P ve pentoz fosfat yolizi (PFY) için dallanma noktası olarak görev yapmaktadır. Nükleik asitlerin ve hücre bileşenlerinin girdisi olan R5P, P1 ve P2 proseslerinde sadece F6P'dan üretilmiştir. Tüm koşullarda PFY aktiftir. Glikoliz yolizinden ayrılan Pyr'tan Lac'ın oluş tepkimesi (R28) tüm koşullarda aktiftir. P2 koşulundaki R28 akısı P1'ye göre daha fazladır. Periyot I'de AcCoAd'an Ac'nın oluşumun (R30) ise yoktur. TCA döngüsü P1 prosesinde tamamlanmıştır. P2 'de ise Mal sentezine kadar gerçekleşmiş, sonra da anaplerotik reaksiyonlardan OA (R36, R37 ve R38) sentezlenmiştir. Anaplerotik reaksiyonlardan Periyot I'de OA'dan Pyr'ın sentezlendiği tepkime R37 tüm koşullarda pasif, Mal'dan Pyr'ın sentezlendiği tepkime R36 ise P2 'de aktiftir. Glikolat şöntü P2'de inaktiftir. Periyot I'de glutamik asit (R75) ve aspartik asit (R59) gruplarındaki amino asitlerin oluşumu her iki proseste de vardır ve P1'deki akılar P2'den büyüktür. Serin grubu amino asitlerinden de glisin oluşumu P2 koşulunda inaktiftir. Toplam ATP üretim akıları P1 ve P2 koşullarında sırasıyla 41.221 ve 22.664 mol g⁻¹ KH st⁻¹ olmuştur.

Periyot II'de (t=9 st'te) tüm koşullardaki metabolik akı dağılımları incelendiğinde; glikoliz yolizinin aktif olduğu görülmüştür. Pentoz fosfat yolizi için dallanma noktası olan R5P, P2 koşulunda sadece G6P'tan, P1 koşulunda ise hem G6P hem de F6P'tan

üretimiştir. Tüm koşullarda PFY aktiftir. Glikoliz yolizinden ayrılan Pyr'tan Lac'ın oluşum tepkimesi (R28) tüm koşullarda vardır. AcCoA'dan Ac'nın oluşumu (R30) ise inaktiftir. TCA döngüsü P1 prosesinde tamamlanmıştır. P2'de ise TCA döngüsü Mal sentezine (R46) kadar gerçekleşip sonraki adımlarda ise anaplerotik tepkimeler gerçekleşmiştir. Gliksolat şöntü sadece P2'de gerçekleşmiştir. Mal'dan Pyr'ın sentezlendiği tepkime (R36) sadece P2'da gerçekleşmiştir. Glutamik asit (R75) ve aspartik asit (R59) amino asit grubundaki amino asitlerin oluşumu tüm koşullarda vardır ve P2'deki akılar P1'den büyüktür. Alanin grubu amino asitlerden alanin oluşumu P1 ve P2 koşullarında, serin grubu amino asitlerden glisin oluşumu ise P2'de yoktur. Diğer serin ve alanin grubu amino asitlerin oluşumu tüm koşullarda vardır. Toplam ATP üretim akıları, P1 ve P2 koşullarında sırasıyla 26.173 ve 3.513 mol g⁻¹ KH st⁻¹ olmuştur.

Periyot III'te (t=21 st'te) koşullardaki metabolik akı dağılımları incelendiğinde; glikoliz yolizinin aktif olduğu görölmüştür. Pentoz fosfat yolizi için dallanma noktası olan R5P, P1 ve P2 proseslerinde sadece F6P'tan üretilmiştir. Tüm koşullarda PFY aktiftir. Glikoliz yolizinden ayrılan Pyr'tan Lac'ın oluşumu (R28) tüm koşullarda vardır. AcCoA'dan Ac oluşumu her iki koşulda da inaktiftir. Periyot III'te anaplerotik reaksiyonlardan OA'dan Pyr'ın sentez tepkimesi R37 sadece P2'de gerçekleşmiştir. Mal'dan Pyr'ın sentezlendiği tepkime R36 ise Periyot III'teki hiçbir koşulda gerçekleşmemiştir. Gliksolat şöntü hem P1 hem de P2'de gerçekleşmiştir. TCA döngüsü sadece P1'de tamamlanmıştır. P2 'de ise TCA döngüsü Suc sentezine (R43) kadar gerçekleşmekte ve bu reaksiyondan sonra anaplerotik reaksiyonlarla OA oluşmaktadır. Periyot III'te P1'de sadece alanin (R53), P2'de ise hem alanin ham de glisin (R51) oluşumu yoktur. Tüm koşullarda aspartik asit (R59) ve glutamik asit (R75) oluşumu gerçekleşmektedir. Toplam ATP üretim akıları, P1 ve P2 proseslerinde sırasıyla 13.41 ve 17.575 mol g⁻¹ KH st⁻¹ olmuştur.

Periyot IV'te (t=21 st'te) koşullardaki metabolik akı dağılımları incelendiğinde; glikoliz yolizinin tüm koşullarda aktiftir. Glikoliz yolizinden ayrılan Pyr'tan Lac'ın oluşumu R28 tüm koşullarda aktiftir, AcCoA'dan Ac'nın oluşumu (R30) ise tüm koşullarda pasiftir. Pentoz fosfat yolizi için dallanma noktası olan R5P, P2'de sadece F6P'tan; P1

prosesinde ise hem G6P hem de F6P'den üretilmiştir. Periyot IV'te anaplerotik reaksiyonlardan OA'dan Pyr'ın sentezlendiği tepkimesi (R37) P2 koşulunda aktif iken Mal'dan Pyr'ın sentezlendiği tepkime (R36) ise tüm koşullar için pasiftir. P1 ve P2'de TCA döngüsü tamamlanmaktadır; glikolat şöntü, aspartik asit ve glutamik asit oluşum tepkimeleri aktiftir. P2'de glisin ve alanin oluşumu (R51 ve R53) gözlenmemiştir. Toplam ATP üretim akıları, P1 ve P2 proseslerinde, sırasıyla, 13.264 ve 13.404 mol g⁻¹ KH st⁻¹ olmuştur.

Periyot V'te (t=27 st'te) koşullardaki metabolik akı dağılımları incelendiğinde; glikoliz yolizinin aktif olduğu görülmüştür. Glikoliz yolizinden ayrılan Pyr'tan Lac'ın oluşumu (R28) tüm koşullarda aktiftir. AcCoA'dan Ac'nın oluşumu (R30) ise inaktiftir. Pentoz fosfat yolizi için dallanma noktası olan R5P, P1 ve P2 proseslerinde sadece G6P'tan üretilmiştir. Tüm koşullarda PFY aktiftir. Periyot V'te anaplerotik reaksiyonlardan OA'dan Pyr'ın sentez tepkimesi R37 tüm koşullarda pasif iken Mal'dan Pyr'ın sentezlendiği tepkime R36 ise sadece P2'de aktiftir. TCA döngüsü her iki proste de tamamlanmamıştır. Döngü P1'de Suc oluşumuna (R43) kadar, P2'de ise izositrat oluşumuna (R40) kadar döngü gerçekleşmiş ve bu basamaktan sonra glikolat şöntü ile Mal oluşup (R49 ve R48) anaplerotik tepkimelerle de OA oluşumu gerçekleşmiştir. Her iki proste de aspartik asit oluşumu, P2 dışında da glutamik asit oluşumu görülmüştür. Toplam ATP üretim akıları, P1 ve P2 proseslerinde, sırasıyla, 22.502 ve 5.438 mol g⁻¹ KH st⁻¹ olmuştur.

Çizelge 4.19 P2 prosesinde metabolik akılar

R#	P2				
	Periyot I	Periyot II	Periyot III	Periyot IV	Periyot V
1	5.693	1.420	1.487	1.522	0.248
3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
4	5.645	0.757	1.487	1.521	0.239
5	4.944	0.989	1.315	1.335	3.416
6	0.000	0.000	0.000	0.000	3.178
7	8.890	2.118	2.336	2.428	0.475
8	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
9	8.519	1.894	2.320	2.369	0.376
10	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
11	2.689	1.698	1.987	2.079	0.127
13	2.554	0.856	1.458	1.115	0.109
14	0.000	0.656	0.000	0.000	0.007
15	0.000	0.656	0.000	0.000	0.007
16	0.000	0.237	0.000	0.000	0.000
17	0.674	0.000	0.172	0.186	0.000
18	0.369	0.237	0.122	0.119	0.0003
19	0.000	0.000	0.000	0.000	0.0000
20	0.369	0.237	0.122	0.119	0.0003
21	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
22	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
23	1.043	0.000	0.294	0.305	0.0003
24	0.363	0.235	0.122	0.119	0.0001
25	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
26	0.369	0.008	0.05	0.022	0.01
27	0.369	0.008	0.05	0.022	0.01
28	0.105	0.023	0.02	0.001	0.022
29	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
30	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
31	1.438	0.769	0.001	0.006	0.01
32	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
33	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
34	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
35	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
36	2.317	0.601	0.000	0.000	2.218
37	0.000	0.000	1.942	0.234	0.000
38	4.651	1.446	0.000	0.000	1.414
39	2.366	0.54	1.281	0.991	0.842
40	2.366	0.54	1.281	0.991	0.842
41	2.366	0.274	0.000	0.991	0.000
42	1.947	0.173	0.034	0.993	0.000
43	1.947	0.173	0.000	0.993	0.000
44	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
45	1.947	0.438	1.848	0.993	0.576
46	3.219	0.471	2.464	0.996	1.353
47	0.000	0.000	3.808	1.246	0.000
48	0.000	0.266	1.281	0.000	0.842
49	0.000	0.266	1.281	0.000	0.842
50	0.371	0.224	0.016	0.058	0.099

Çizelge 4.19 P2 prosesinde metabolik akılar (devam)

51	0.000	0.000	0.000	0.000	0.344
52	0.066	0.011	0.0002	0.001	0.002
53	0.091	0.000	0.000	0.000	0.005
54	0.234	0.038	1.456	0.94	0.596
55	0.114	0.019	0.0004	0.002	0.003
56	0.12	0.02	1.455	0.938	0.592
57	0.298	0.181	0.049	0.067	0.007
58	0.026	0.004	0.048	0.0005	0.0008
59	2.285	0.907	0.585	0.021	0.573
60	0.063	0.010	5.100	0.001	0.017
61	0.74	0.835	0.535	0.013	0.457
62	0.091	0.729	0.0003	0.002	0.003
63	0.091	0.729	0.0003	0.002	0.003
64	0.091	0.729	0.0003	0.002	0.003
65	0.091	0.729	0.0003	0.002	0.003
66	0.648	0.106	0.535	0.011	0.454
67	0.608	0.099	0.535	0.011	0.453
68	0.077	0.013	0.533	0.001	0.002
69	0.04	0.007	0.0001	0.0007	0.001
70	1.406	0.235	0.416	0.423	0.0004
71	1.293	0.084	0.000	0.36	0.0000
72	0.037	0.006	0.416	0.0007	0.0000
73	0.076	0.145	0.0005	0.063	0.0004
74	0.076	0.145	0.0005	0.063	0.0004
75	5.014	2.002	0.468	0.387	0.000
76	1.813	0.147	5.165	0.003	0.000
77	0.057	0.009	0.0002	0.001	0.002
78	1.201	0.016	0.0003	0.002	0.003
79	1.184	0.013	0.0003	0.001	0.002
80	1.184	0.013	0.0003	0.001	0.002
81	0.000	0.118	0.000	0.06	0.000
82	0.104	0.000	0.000	0.000	0.000
83	0.000	0.000	0.099	0.000	0.015
84	0.000	0.000	0.000	0.000	0.103
85	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
86	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
87	0.000	0.000	0.000	0.000	0.217
88	0.000	0.000	0.048	0.000	0.000
89	0.000	0.000	0.533	0.000	0.000
90	0.000	0.000	0.455	0.936	0.589
91	0.000	0.000	0.151	0.000	0.669
92	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
93	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
94	0.463	0.076	0.001	0.008	0.449
95	0.062	0.143	0.000	0.063	0.000
96	0.000	0.000	0.567	0.000	0.668
97	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
98	0.075	0.012	0.000	0.001	0.002
99	0.101	0.016	0.048	0.002	0.003
100	0.063	0.010	0.000	0.001	0.002

Çizelge 4.19 P2 prosesinde metabolik akılar (devam)

101	0.063	0.010	0.000	0.001	0.002
102	0.095	0.016	0.048	0.002	0.003
103	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
104	0.006	0.001	0.000	0.000	0.000
105	0.006	0.001	0.000	0.000	0.000
106	0.038	0.006	0.048	0.000	0.001
107	1.751	0.239	5.198	0.073	0.032
108	0.121	0.020	0.000	0.002	0.004
109	0.121	0.020	0.000	0.002	0.004
110	0.115	0.019	0.000	0.002	0.003
111	0.053	0.009	0.000	0.001	0.002
112	0.006	0.001	0.000	0.000	0.000
113	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
114	0.006	0.001	0.000	0.000	0.000
115	0.006	0.001	0.000	0.000	0.000
116	0.006	0.001	0.000	0.000	0.000
117	0.000	0.000	0.000	0.001	0.120
118	0.04	0.007	0.000	0.001	0.001
119	0.176	0.029	0.001	0.003	0.005
120	0.176	0.029	0.049	0.003	0.005
121	0.222	0.036	0.001	0.004	0.000
122	5.349	2.202	4.102	0.88	0.000
123	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
124	9.385	1.180	6.603	5.737	2.137
125	1.947	1.153	4.369	1.929	1.164
126	6.213	1.263	5.475	3.586	1.976
127	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
128	5.514	2.247	0.000	0.447	0.000
130	0.106	0.017	0.000	0.002	0.003
131	1.789	0.245	5.198	0.074	0.033
132	0.612	0.100	0.002	0.011	0.018
133	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
134	0.037	0.006	0.000	0.000	0.001
135	0.007	0.001	0.000	0.000	0.000
136	0.007	0.001	0.000	0.000	0.000
137	0.074	0.012	0.000	0.001	0.002
138	1.305	0.033	0.001	0.004	0.006
139	0.020	0.003	0.000	0.000	0.001
140	0.008	0.001	0.000	0.000	0.000
141	0.007	0.001	0.000	0.000	0.000
142	0.007	0.001	0.000	0.000	0.000
143	0.007	0.001	0.000	0.000	0.000
144	0.048	0.008	0.000	0.001	0.001
145	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
146	0.004	0.001	0.000	0.001	0.000
147	0.285	0.047	0.001	0.005	0.008
148	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
149	0.000	0.000	0.000	13.709	0.000

4.5 Amino Asit Eklenmesinin hGH Üretimine Etkisi

Araştırma programının beşinci alt-programında, en iyi oksijen aktarım koşulu MOT2 'de, mikrobiyolojik hava filtreli kesikli pilot-ölçekli biyoreaktörlerde $C_{Go}=8 \text{ kg/m}^3$, $pH_o=7,25$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=0.550\text{dm}^3$ 'de hGH'nin yapısında önemli bir yere sahip olan aspartik asit, glutamik asit, serin, valin ve lözinin kısıtlayıcı birer amino asit olup olmadığını belirlemek amacıyla üretim ortamına $t_e=0$ ve $t_e=24$.st ayrı-ayrı ve karışım olarak eklenerek hGH üretimine etkileri araştırılmıştır. Bu amaç doğrultusunda ortama eklenecek olan amino asit derişimleri belirlenirken araştırma grubumuzun (Bayram 2002) serin alkali proteaz ile gerçekleştirdikleri araştırma sonuçları dikkate alınmış ve eklenecek amino asitin ortamdaki derişimi $C_{AA}= 2.5 \text{ mM}$ olarak belirlenmiştir. Amino asit içermeyen ortam referans ortamdır.

4.5.1 $t_e=0$ st'te amino asit eklenmesinin hGH üretimine etkisi

Yapısındaki önemli amino asitlerden bir kısmını oluşturan aspartik asit, glutamik asit, serin, lözin + valinin hGH üretimine etkisi araştırmak amacıyla, $t_e=0$ st'te $C_{AA}= 2.5 \text{ mM}$ derişimlerinde bu amino asitler ayrı-ayrı eklenerek $C_{Go}=8 \text{ kg/m}^3$, $pH_o=7,25$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=0.550 \text{ dm}^3$, $Q_o/V_R=0.5 \text{ vvm}$, $N=800 \text{ dk}^{-1}$ işletim koşullarında deneyler gerçekleştirilmiştir.

Şekil 4.51'de pH'ın eklenen amino asite ve kalma süresine göre derişimi verilmiştir. Biyoreaktöre $t= 3$ st inkübe edilmiş ön-sıvı ortamı ve amino asit eklemesiyle ($t=0$ st) pH değerinde proteaz inhibitörün eklendiği ana kadar ($t=4$ st) hızlı ve $t=4-18$ st arasında yavaş bir düşüş görülmüştür. Hücre çoğalmasındaki ani artışa bağlı olarak $t=18-22$ st arasında ise pH değerinde yine hızlı bir düşüşten sonra proses sonuna kadar daha yavaş bir artış ve düşüş görülmüştür. Eklenen amino asite göre benzer pH profilleri elde edilmiştir. Biyoproses süresince minimum pH değerine aspartik asitli, lözin+valinli ve referans ortamlarda için $t=22$ st'te (sırasıyla $pH=6.36$, 6.54 ve 6.6); glutamik asitlide $t= 20$ st'te ($pH=6.54$) ve serinli de ise $t= 24.5$ st'te ($pH=6.53$) ulaşılmıştır.

Çözünmüş oksijen derişiminin eklenen amino asite ve kalma süresine göre derişimi Şekil 4.52'te verilmiştir. Şekil 4.52 incelendiğinde; amino asit eklenenler ile referans

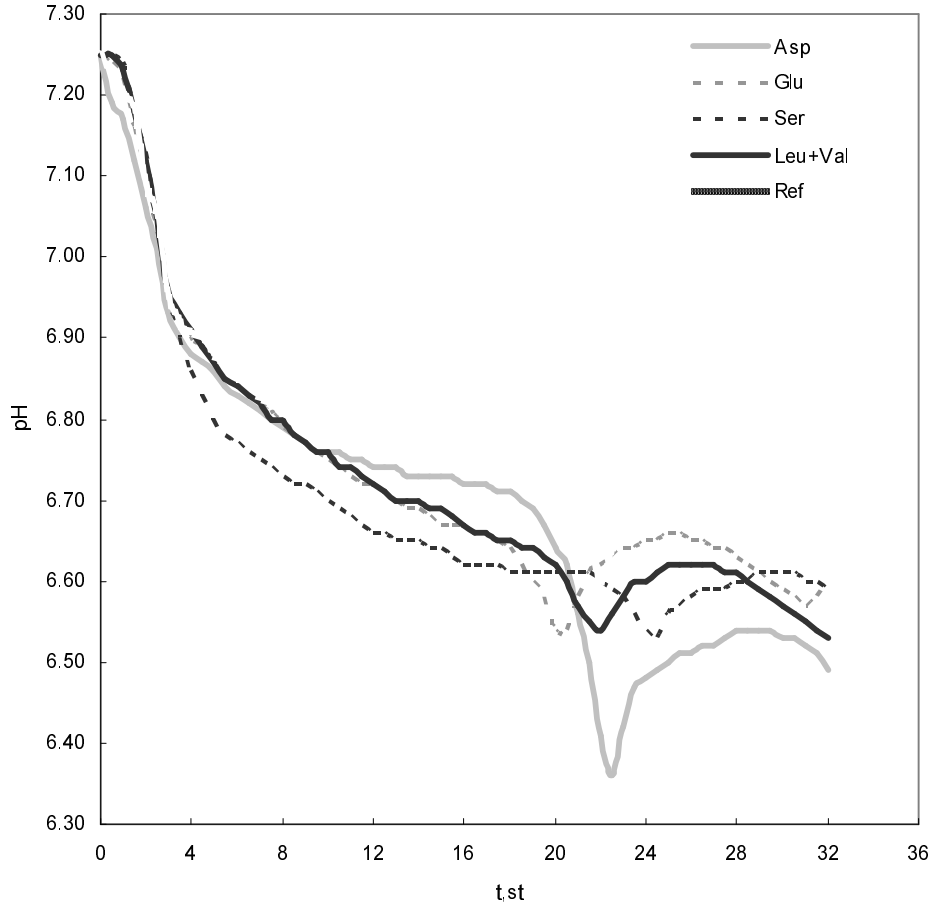
ortam profillerinin benzerlik gösterdiği görülmüştür. Bütün koşullarda referanstaki gibi proteaz inhibitörünün eklendiği ana kadar çözünmüş oksijen derişiminde ani bir düşüş, belli bir değere (Glu, $C_o=0.09$ mmol/l; Ser, $C_o=0.13$ mmol/l; Asp, $C_o=0.11$ mmol/l; Leu+Val, $C_o=0.12$ mmol/l) artış ve bu değerlerin yakınında sabit kaldıktan sonra yine düşüş ve artış görülmüştür.

Mikroorganizma derişiminin kalma süresi ile değişimi (Şekil 4.53) incelendiğinde; hücre derişimini $t=21$ st'e kadar artığı $t=24$ st'te durgunluk fazına geçtiği görülmüştür. Bütün koşullar için hücre derişim profilleri benzerdir. Şekil 4.53'tan da görüldüğü gibi $C_{AA}=2.5$ mM'lik serin ve lözin+valin derişimleri hücre çoğalmasını inhibe etmiştir.

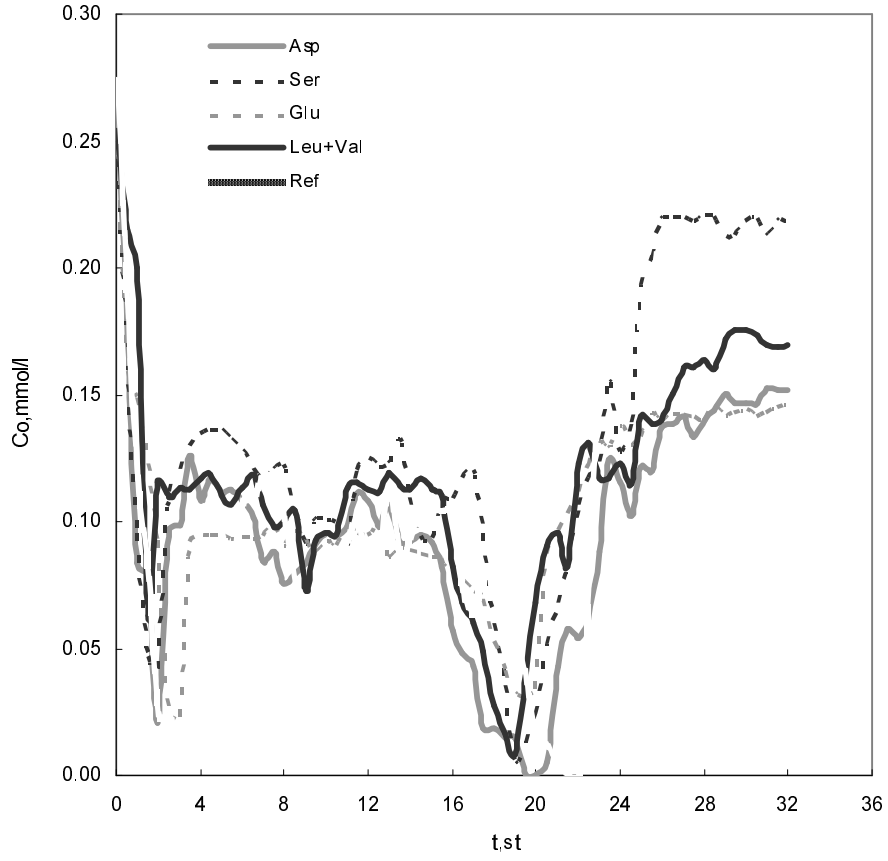
Glukoz derişiminin kalma süresi ile değişimi (Şekil 4.54) incelendiğinde; hücrenin durgunluk fazına ulaşana kadar glukoz hızla tüketilmiş sonra glukoz tüketim hızı yavaşlamıştır. Proses sonunda başlangıçtaki glukozun yaklaşık olarak %85-99'ı tüketilmiştir.

hGH derişiminin eklenen amino asit ve kalma süresi ile değişimi Şekil 4.55.a'da verilmiştir. Üretim ortamına $t_e=0$ st'te eklenen $C_{AA}=2.5$ mM derişimindeki aspartik asit, glutamik asit, lözin+valin karışımı ve serin hGH derişimini arttırmamıştır. Amino asit eklenen ortamlar birbiri ile kıyaslandığında en yüksek hGH derişimine $C_{Ser}=2.5$ mM serin eklenen ile ulaşılmıştır. Şekil 4.55.b'de hGH üretim hızının kalma süresi ile değişimi incelendiğinde; hGH üretim profilleri ile paralel olduğu görülmüştür. $t=18$ st'e kadar referans ve serin eklenen ortamlardaki artış birbirine paralel, $t=18-24$ st arasında serin eklenende artış az iken referansınki daha fazladır. $t=24-27$ st arasında referansta hGH üretim hızı maksimum değerindeyken serin içerende artış devam etmektedir; $t=27-30$ st arasında referansta azalma başlarken serin eklenende ise artış devam etmektedir. Sonuç olarak Periyot V'te serin eklenen ortamdaki hGH üretim hızı referanstan daha fazladır. q_p değişimini gösteren Şekil 4.55.c incelendiğinde, q_p değeri referans ortamda bir maksimum oluşturarak $q_p=0.0023$ kg kg^{-1} st⁻¹ ($t=24$ st) değerine kadar artmış, sonra $t=29$ st'ta $q_p=0.002$ kg kg^{-1} st⁻¹ değerine düşmüştür. Serin eklenen ortamda ise referansa göre q_p $t=18$ st'e kadar daha yavaş artış, $t=18-24$ st arasında yavaş azalma ve $t=24-27$ st arasında hızlı bir artış gözlenmiştir. Leu+Val eklenen ortam proses süresince salınım

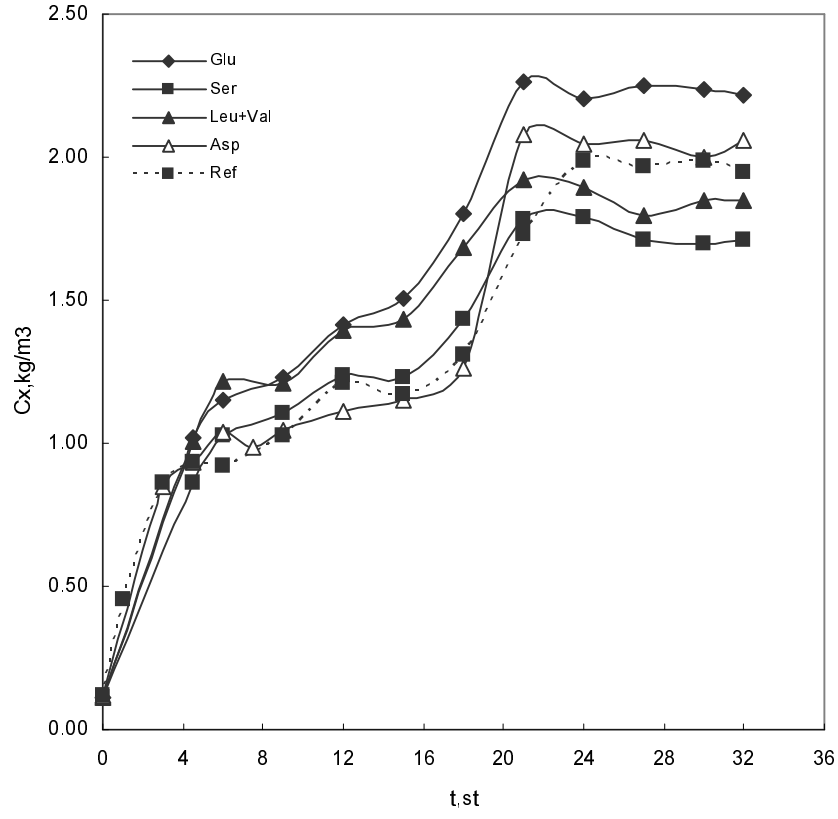
(Şekil 4.55.b), aspartik asit eklenen ortam t=24 st'e kadar artış ve sonra azalma, glutamik asit eklenende ise artış gözlenmiştir. te=0 st'te ortama eklenen serin, eklenen diğer amino asitlere göre daha az ürün inhibisyonuna neden olmuştur.



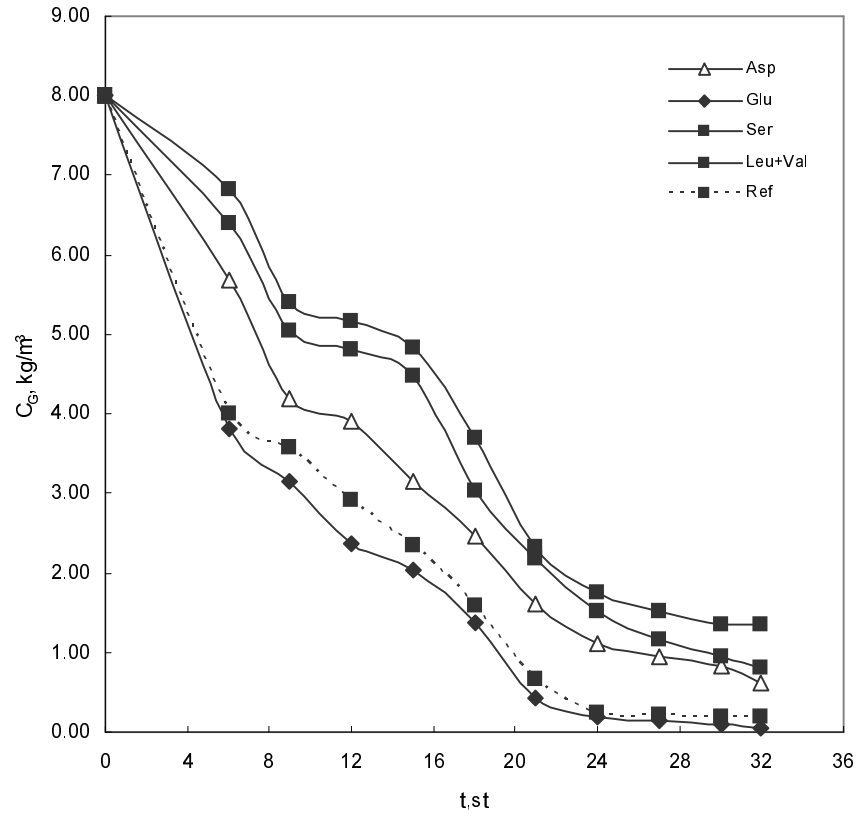
Şekil 4.51 te=0'da amino asit eklenmesi ile pH'ın t ile değişimi: $C_{G_0}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $pH_0=7,25$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=550 \text{ cm}^3$, $Q_0/V_R=0.5 \text{ vvm}$, $N=800 \text{ dk}^{-1}$



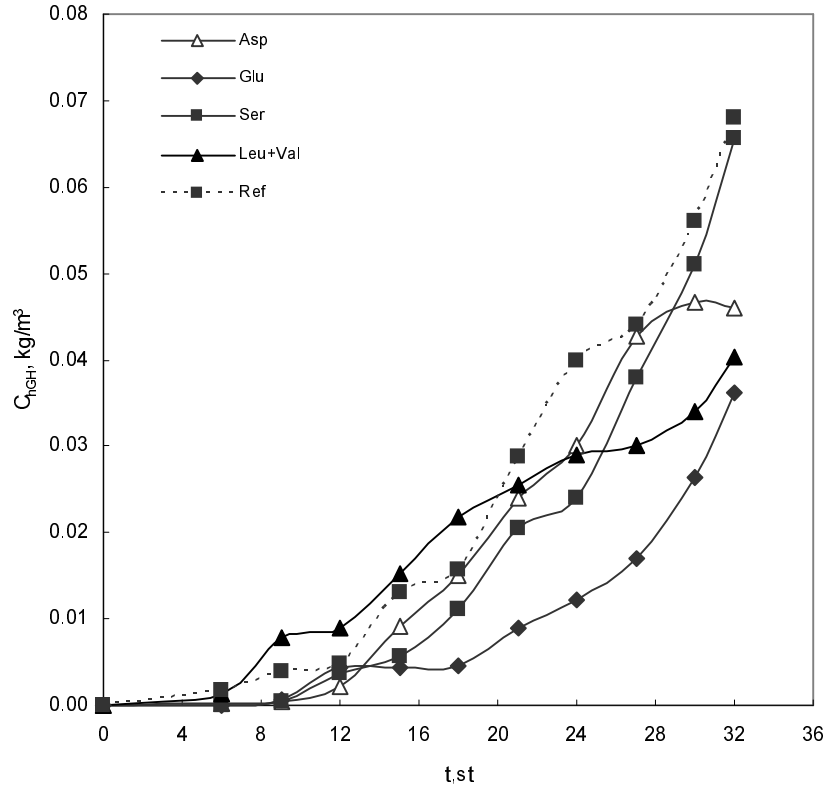
Şekil 4.52 $t_e=0$ 'da amino asit eklenmesi ile çözülmüş oksijen derişiminin t ile değişimi: $C_{G0}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $pH_0=7,25$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=550 \text{ cm}^3$, $Q_O/V_R=0.5 \text{ vvm}$, $N=800 \text{ dk}^{-1}$



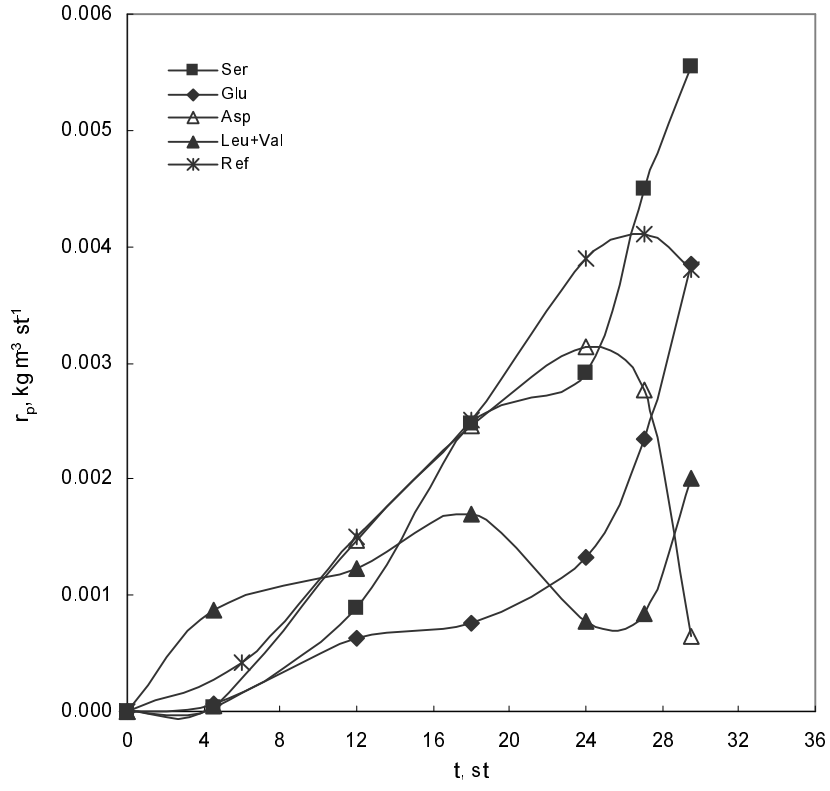
Şekil 4.53 $t_e=0$ 'da amino asit eklenmesi ile hücre derişiminin t ile değişimi: $C_{G0}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $pH_0=7,25$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=550 \text{ cm}^3$, $Q_0/V_R=0.5 \text{ vvm}$, $N=800 \text{ dk}^{-1}$



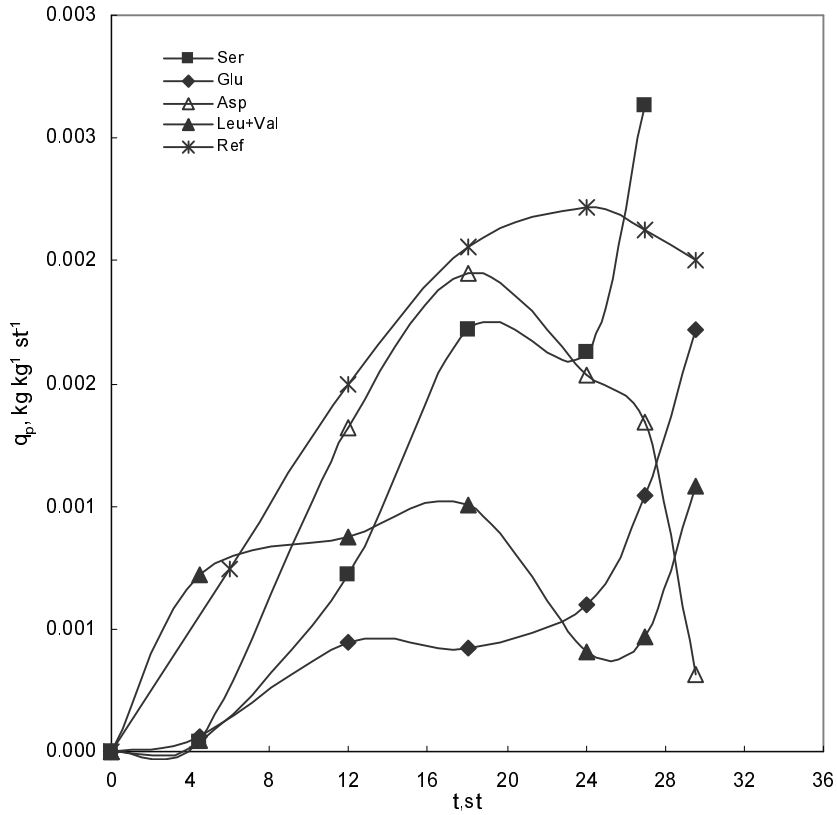
Şekil 4.54 $t_e=0$ 'da amino asit eklenmesi ile glukoz derişiminin t ile değişimi: $C_{G_0}=8$ kg m^{-3} , $\text{pH}_0=7,25$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=550\text{cm}^3$, $Q_0/V_R=0.5\text{vvm}$, $N=800\text{dk}^{-1}$



Şekil 4.55.a $t_e=0$ 'da amino asit eklenmesi ile hGH derişiminin t ile değişimi: $C_{G_0}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH}_0=7,25$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=550 \text{ cm}^3$, $Q_0/V_R=0.5 \text{ vvm}$, $N=800 \text{ dk}^{-1}$



Şekil 4.55.b hGH üretim hızının t ile değişimi. $C_{G_0}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $pH_0=7,25$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=550 \text{ cm}^3$, $Q_0/V_R=0.5 \text{ vvm}$, $N=800 \text{ dk}^{-1}$



Şekil 4.55.c q_p 'nin t değişimi. $C_{G_0}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $pH_0=7,25$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=550 \text{ cm}^3$, $Q_O/V_R=0.5 \text{vvm}$, $N=800 \text{ dk}^{-1}$

Amino asit içermeyen ($C_{AA}=0 \text{ mM}$) referans ortam için hücre dışı amino asit ve organik asit derişimlerinin kalma süresi t ile değişimi sırasıyla Şekil 4.47 ve Şekil 4.49'da verilmiştir.

$C_{Asp}=2.5 \text{ mM}$ derişiminde aspartik asit eklenen üretim ortamı için hücre dışına aktarılan amino asit ve organik asitlerin kalma süresi ile değişimi sırasıyla Şekil 4.56 ve Şekil 4.60'da verilmiştir. Aspartik asit derişiminin kalma süresiyle azaldığı görülmüştür. Üretim ortamında gözlenen diğer amino asit derişimlerinin kalma süresi ile salınım gösterdikleri bulunmuştur. Proses süresince referans ortamda glisin üretimi yok iken bu koşulda $t=30 \text{ st}$ 'te $C_{Gly}=0.033 \text{ kg m}^{-3}$ olarak bulunmuştur. Ortama aktarılan fenilalanin derişimi ($t=32 \text{ st}$ 'te $C_{Phe}=0.221 \text{ kg m}^{-3}$) referans ortama göre artmıştır. Yan-ürün olarak

biyoreaktörde en yüksek derişimde bulunan diğer amino asitler sırasıyla aspartik asit (0.332 kg m^{-3}), serin (0.116 kg m^{-3}), lözin (0.113 kg m^{-3}) ve izolözindir (0.056 kg m^{-3}). Referansta olduğu gibi burada da alanin, arjinin, histidin, triptofan, metionin, lizin, glutamin, valin, treonin ve asparajin ise proses süresince üretim ortamında bulunmamaktadır. Şekil 4.60'tan da görüldüğü gibi ortama aktarılan organik asitlerin derişim profilleri salınım göstermektedir. Biyoproses süresince biyoreaktörde ölçülen organik asitler ise glukonik, süksinik, formik, asetik ve sitrik asittir. Glukonik asit (0.392 kg/m^3) derişimi referans ortamdakine göre % 8.4 kat artmıştır. Biyoreaktörde en yüksek derişimde bulunan diğer organik asitler sırasıyla süksinik asit (0.235 kg m^{-3}), formik asit (0.128 kg m^{-3}), sitrik asit (0.109 kg m^{-3}) ve asetik asittir (0.108 kg m^{-3}). Maleik ve okzaloasetik asit ise proses süresince üretim ortamında bulunmamıştır. Ortamdaki diğer amino asitlerin derişimi ise 0.1 kg m^{-3} 'ten daha düşüktür.

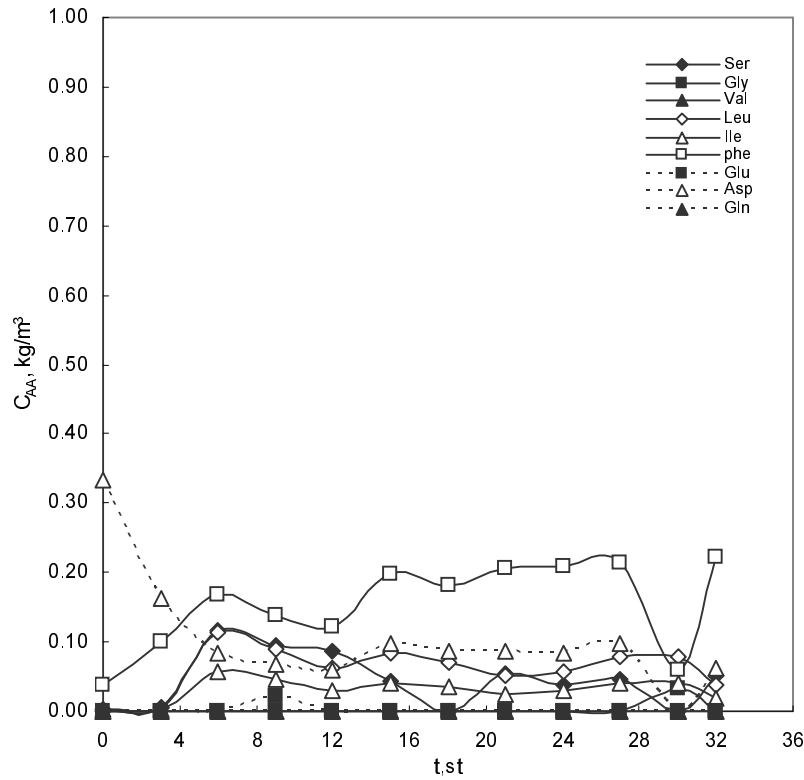
$C_{\text{Glu}}=2.5 \text{ mM}$ derişimde glutamik asit eklenen üretim ortamı için hücre dışına aktarılan amino asit ve organik asitlerin kalma süresi ile değişimi sırasıyla Şekil 4.57 ve Şekil 4.61'da verilmiştir. Glutamik asit derişimi prosesin ilk saatlerin sıfıra ulaşmıştır. Üretim ortamında gözlenen diğer amino asitlerin derişimlerinin kalma süresi ile salınım gösterdikleri bulunmuştur. Ortama aktarılan fenilalanin derişimi ($t=15 \text{ st'te } C_{\text{Phe}}= 0.220 \text{ kg m}^{-3}$) referans ortama (0.132 kg m^{-3}) göre artmıştır. Biyoreaktörde en yüksek derişimde bulunan diğer amino asitler sırasıyla aspartik asit (0.132 kg m^{-3}), lözin (0.102 kg m^{-3}), izolözin (0.051 kg m^{-3}) ve serindir (0.056 kg m^{-3}). Referans ortamda olduğu gibi alanin, arjinin, histidin, triptofan, metionin, lizin, glutamin, valin, treonin, asparajin ve glisin proses süresince üretim ortamında bulunmamıştır. Şekil 4.61'de organik asit derişimlerinin kalma süresi ile değişimi verilmiştir. Ortama aktarılan organik asitlerin derişim profilleri salınım göstermektedir. Biyoproses süresince ortamda belirgin bir şekilde gözlenen organik asitler ise glukonik, süksinik, laktik, asetik, formik, okzalik ve α - ketoglutarik asittir. Referans ortama (0.36 kg/m^3) göre bu koşullardaki glukonik asit (0.27 kg/m^3) derişiminde % 25 kat düşüş görülmüştür. Maleik, sitrik ve okzaloasetik asit ise proses süresince üretim ortamında bulunmamaktadır. Biyoreaktörde en yüksek derişimde bulunan diğer organik asitler sırasıyla süksinik asit (0.20 kg m^{-3}), α -ketoglutarik asit(0.246 kg m^{-3}), okzalik asit (0.169 kg m^{-3}), asetik asit (0.157 kg m^{-3}), laktik asit (0.149 kg m^{-3}) ve formik asittir

(0.104 kg m⁻³). Ortamdaki diğer amino asitlerin derişimi ise 0.1 kg m⁻³'ten daha düşüktür.

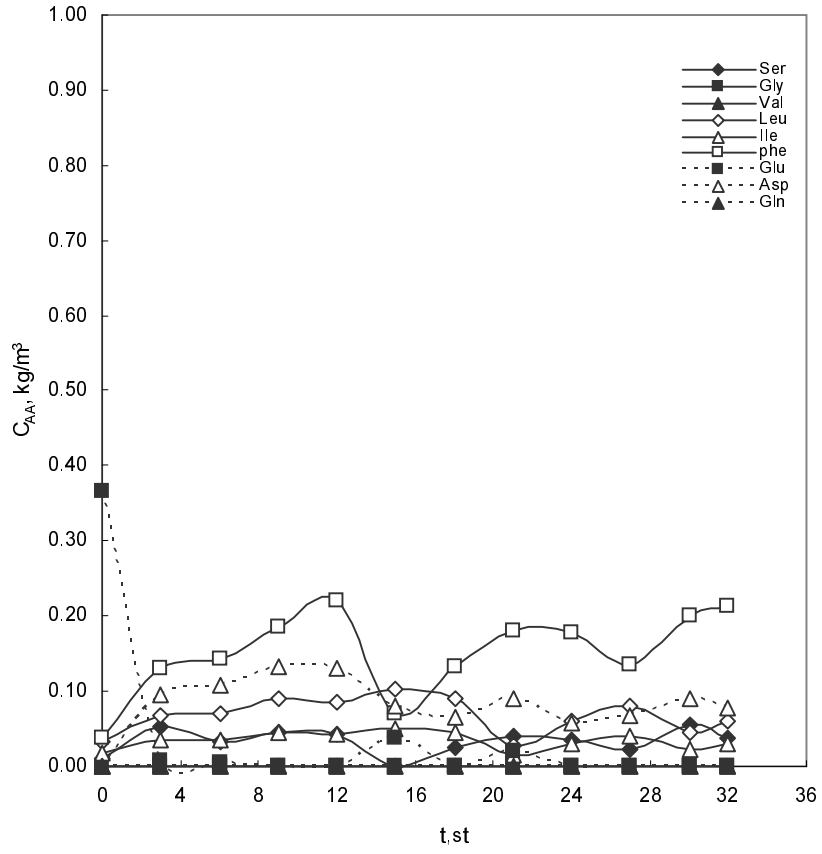
C_{Ser}=2.5 mM derişiminde serin eklenen üretim ortamı için hücre dışına aktarılan amino asit ve organik asitlerin kalma süresi ile değişimi sırasıyla Şekil 4.58 ve Şekil 4.62'da verilmiştir. Serin derişimi ilk saatlerden itibaren hızla azalmış ve t=21 st'ten itibaren proses sonuna kadar sıfır olmuştur. Üretim ortamında gözlenen diğer amino asitlerin derişimlerinin kalma süresi ile salınım gösterdikleri bulunmuştur. Biyoreaktörde en yüksek derişimde bulunan amino asitler sırasıyla serin (0.263 kg m⁻³), lözin (0.217 kg m⁻³), fenilalanin (0.203 kg m⁻³), aspartik asittir (0.154 kg m⁻³) ve isolözindir (0.109 kg m⁻³). Bu sonuçlarla referans ortam sonuçları kıyaslandığında lözin, fenilalanin ve isolözün derişimlerinde artış görülmüştür. Referans ortamda olduğu gibi alanin, arjinin, glutamik asit, histidin, triptofan, metionin, lizin, glutamin, valin, treonin, asparajin ve glisin proses süresince üretim ortamında bulunmamıştır. Organik asit derişimlerinin kalma süresi ile değişimi Şekil 4.62'de verilmiştir. Ortama aktarılan organik asitlerin derişim profilleri salınım göstermektedir. Biyoproses süresince ortamda gözlenen organik asitler glukonik, süksinik, sitrik ve formik asittir. Maleik ve okzaloasetik asit proses süresince üretim ortamında bulunmamaktadır. Biyoreaktörde en yüksek derişimde bulunan organik asitler sırasıyla glukonik asit (0.307 kg m⁻³), süksinik asit (0.176 kg m⁻³), sitrik asit(0.137 kg m⁻³) ve formik asittir (0.125 kg m⁻³). Ortamdaki diğer amino asitlerin derişimi değeri ise 0.1 -0.001 kg m⁻³ aralığındadır.

C_{Leu+Val}=2.5 mM derişiminde lözin+valin amino asit karışımının eklendiği üretim ortamı için hücre-dışına aktarılan amino asit ve organik asitlerin kalma süresi ile değişimi sırasıyla Şekil 4.59 ve Şekil 4.63'da verilmiştir. Valin ortama eklendikten sonra kısa sürede tüketilmiştir. Lözin derişim profili ise ortama aktarılan diğer amino asit profilleri gibi salınım göstermiştir. Biyoreaktörde en yüksek derişimde bulunan amino asitler sırasıyla fenilalanin (0.255 kg m⁻³), lözin (0.219 kg m⁻³), aspartik asittir (0.156 kg m⁻³), serin (0.113 kg m⁻³) ve isolözindir (0.110 kg m⁻³). t_e=0 st'te C_{Leu+Val}=2.5 mM derişiminde lözin+valin amino asit karışımının eklendiği koşulda referansa göre fenilalanin üretimi % 32.5 fazladır. Referansta olduğu gibi burada da alanin, arjinin, glutamik asit, histidin, triptofan, metionin, lizin, glutamin, valin, treonin ve asparajin proses süresince üretim ortamında bulunmamaktadır. Şekil 4.63'tan da görüldüğü gibi

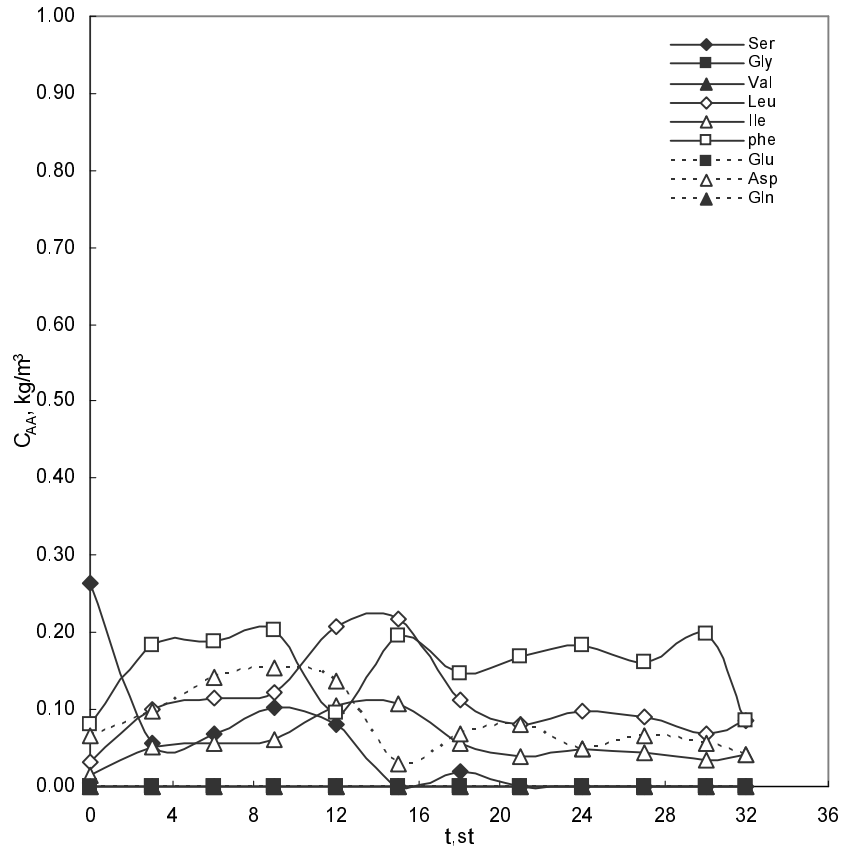
ortama aktarılan organik asitlerin derişim profilleri salınım göstermektedir. Biyoproses süresince ortamda gözlenen organik asitler ise laktik ve glukonik asittir. Biyoreaktörde en yüksek derişimde bulunan organik asit glukonik asit (0.257 kg m^{-3}) ve laktik asittir (0.138 kg m^{-3}). Malik, maleik ve okzaloasetik asit ise proses süresince üretim ortamında bulunmamaktadır. Ortama aktarılan diğer amino asitlerin derişim değeri ise $0.1-0.001 \text{ kg m}^{-3}$ derişim aralığında bulunmaktadır.



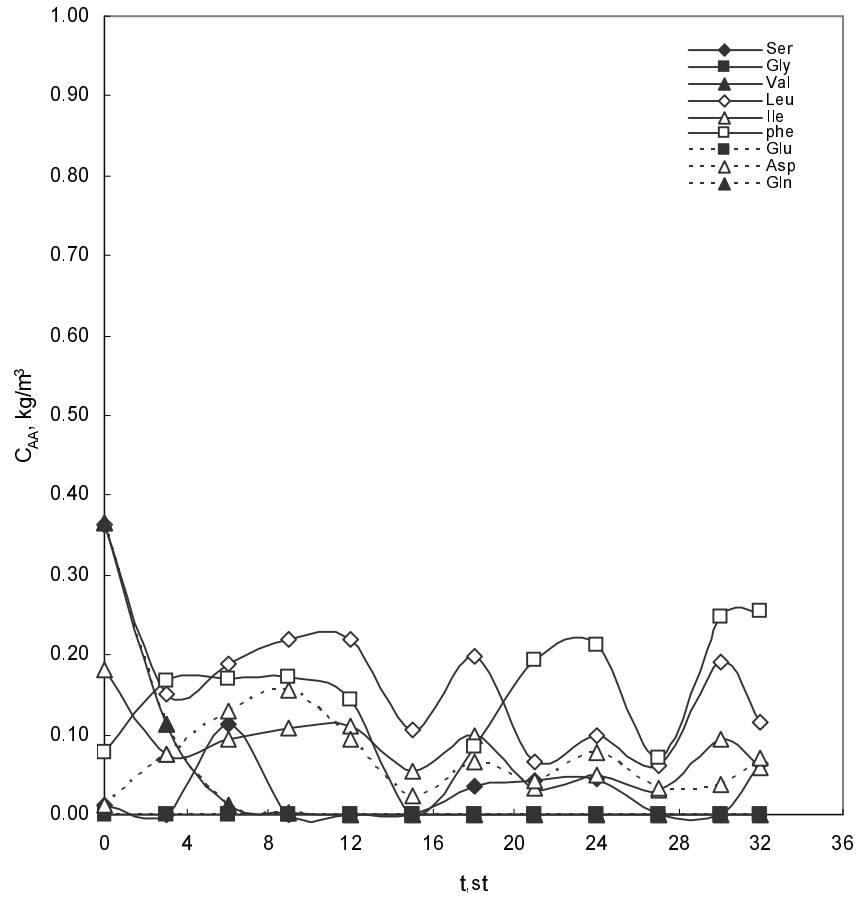
Şekil 4.56 $t_e=0$ st'te aspartik asit eklendiğinde aktarılan amino asitlerin derişimlerinin t ile değışimi. $C_{Go}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $pH_0=7,25$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=550 \text{ cm}^3$, $N=800 \text{ dk}^{-1}$, $Q_O/V_R=0.5 \text{ vvm}$



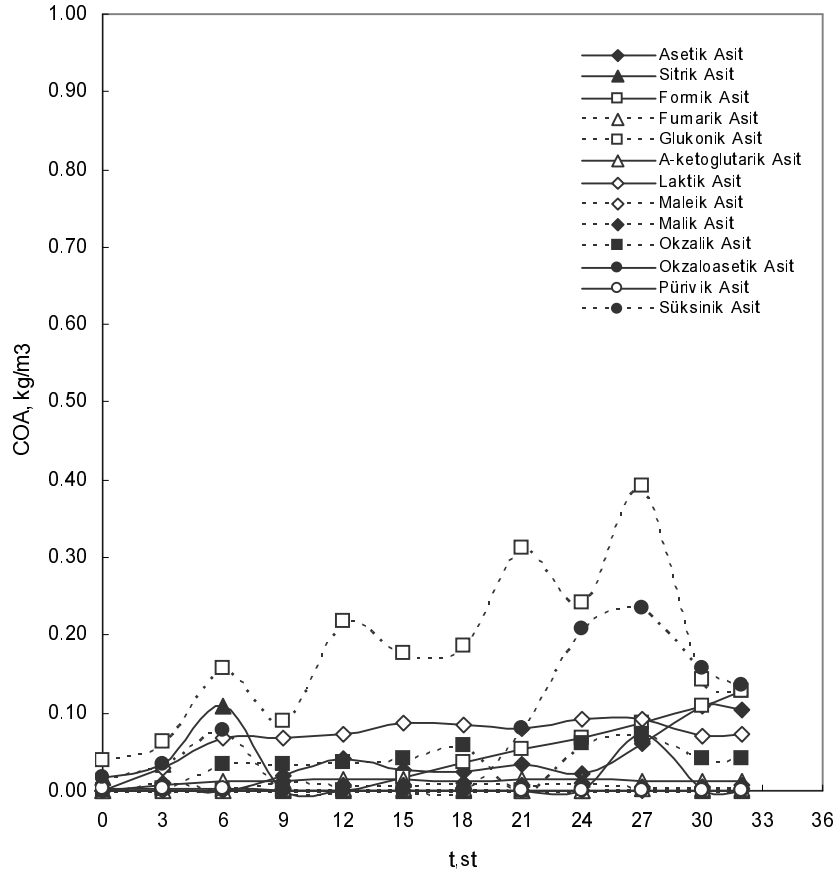
Şekil 4.57 $t_e=0$ st'te glutamik asit eklendiğinde aktarılan amino asitlerin derişimlerinin t ile değişimi. $C_{G_0}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH}_0=7,25$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=550 \text{ cm}^3$, $N=800 \text{ dk}^{-1}$, $Q_0/V_R=0.5 \text{ vvm}$



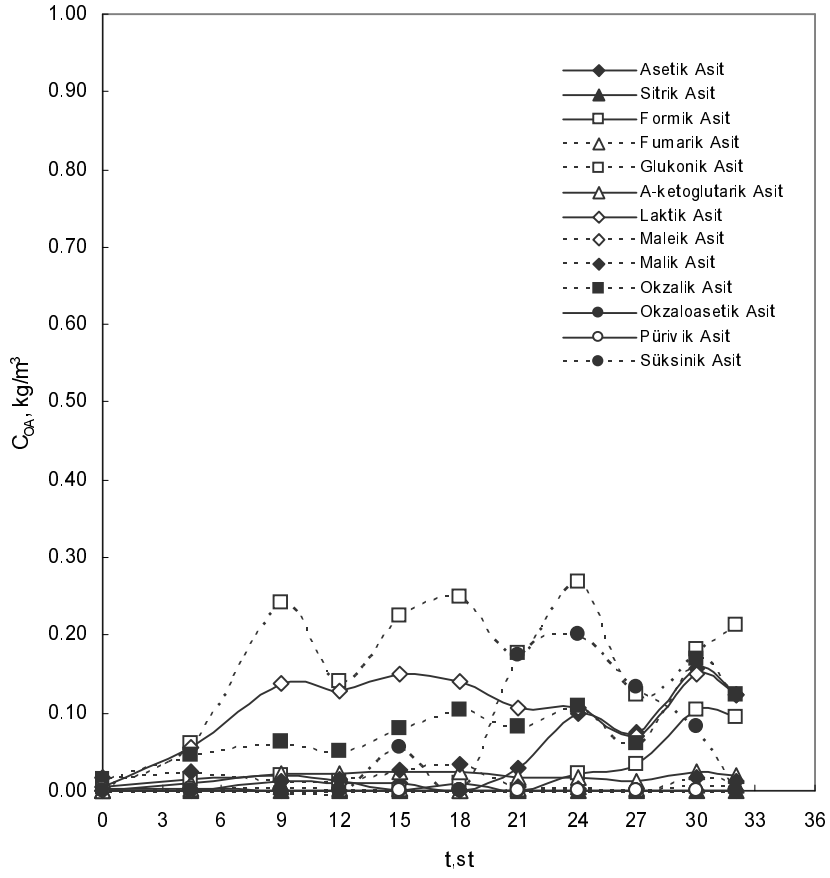
Şekil 4.58 $t_e=0$ st'te serin eklendiğinde aktarılan amino asitlerin derişimlerinin t ile değişimi. $C_{G_0}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH}_0=7,25$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=550 \text{ cm}^3$, $N=800 \text{ dk}^{-1}$, $Q_0/V_R=0.5 \text{ vvm}$



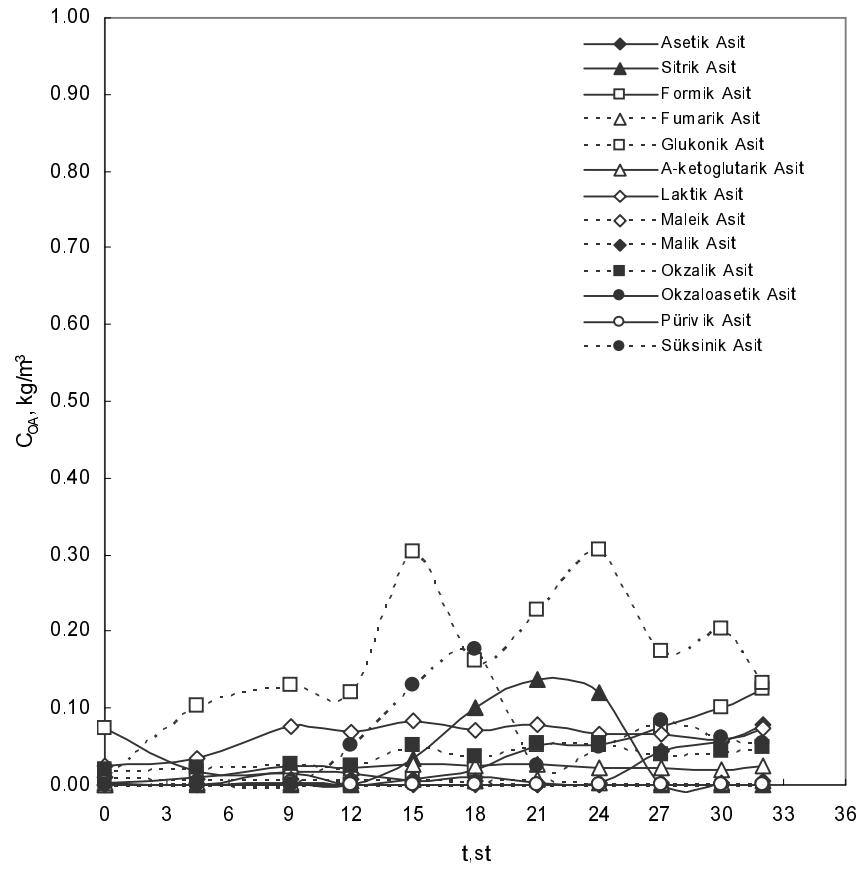
Şekil 4.59 $t_e=0$ st'te lözin+valin eklendiğinde aktarılan amino asitlerin derişimlerinin t ile değişimi. $C_{G_0}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH}_0=7,25$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=550 \text{ cm}^3$, $N=800 \text{ dk}^{-1}$, $Q_0/V_R=0.5 \text{ vvm}$



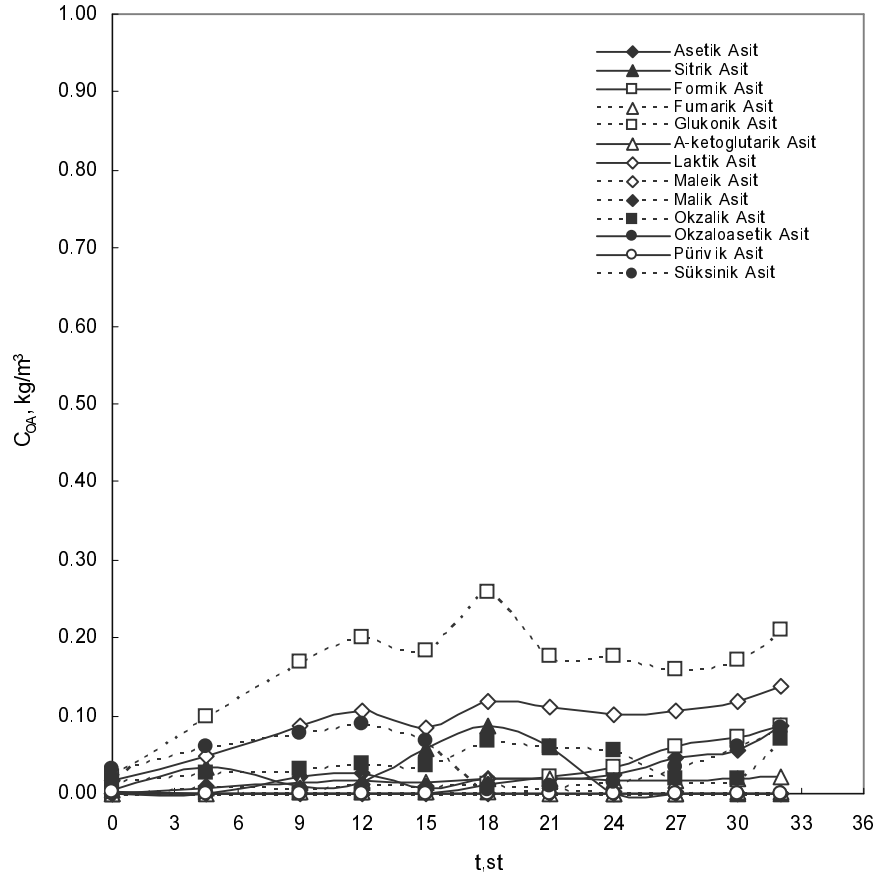
Şekil 4.60 $t_e=0$ st'te aspartik asit eklendiğinde aktarılan organik asitlerin derişimlerinin t ile değişimi. $C_{G0}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH}_0=7,25$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=550 \text{ cm}^3$, $N=800 \text{ dk}^{-1}$, $Q_0/V_R=0.5 \text{ vvm}$



Şekil 4.61 $t_e=0$ st'te glutamik asit eklendiğinde aktarılan organik asitlerin derişimlerinin t ile değişimi. $C_{G_0}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH}_0=7,25$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=550 \text{ cm}^3$, $N=800 \text{ dk}^{-1}$, $Q_0/V_R=0.5 \text{ vvm}$



Şekil 4.62 $t_c=0$ st'te serin eklendiğinde aktarılan organik asitlerin derişimlerinin t ile değişimi. $C_{G0}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH}_0=7,25$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=550 \text{ cm}^3$, $N=800 \text{ dk}^{-1}$, $Q_O/V_R=0.5 \text{ vvm}$



Şekil 4.63 $t_e=0$ st'te lözin+valinin eklendiğinde aktarılan organik asitlerin derişimlerinin t ile değişimi. $C_{Go}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH}_0=7,25$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=550 \text{ cm}^3$, $N=800 \text{ dk}^{-1}$, $Q_0/V_R=0.5 \text{ vvm}$

4.5.1.1 Metabolik akı analizi

$t_e=0$ st'te $C_{Ser}=2.5 \text{ mM}$ derişiminde serin eklenmiş ortam referans ortam ile kıyaslandığında; hGH derişiminde % 5.7'lik azalma görülmüştür (Şekil 4.55.a). hGH üretim hızının kalma süresiyle değişimini gösteren Şekil 4.55.b incelendiğinde; serin eklenen ortamda hGH üretim hızı Periyot I-IV arasında daha az olmasına rağmen Periyot V'te ise daha fazladır. Şekil 4.55.c'den de görüldüğü gibi Periyot V'te q_p değeri serin eklenen ortamda daha yüksektir. Bu nedenle hücreiçi tepkime akılarının ayrıntılı olarak incelenebilmesi için bu koşulda metabolik akı analizi gerçekleştirilmiştir. Diğer

amino asitlerin eklendiği ortamlarda hGH üretim hızında artış gözlenmediğinden bu koşullar için metabolik akı analizine gerek duyulmamıştır.

Serin eklenen ve referans (P1) koşullardaki metabolik akı dağılımları incelendiğinde; glikoliz yolunun her iki koşulda da aktif olduğu görülmüştür. Pentoz fosfat yolunu için dallanma noktası olan R5P, Ser eklenende Periyot III, IV'te ve P1'de I, III'te sadece F6P'tan, Ser eklenende Periyot I'de ve P1'de Periyot V'te sadece G6P'den, Ser eklenende Periyot II, V'te ve P1'de II, IV'te ise her ikisinden de üretilmiştir. Tüm koşullarda PFY aktiftir. Glikoliz yolundan ayrılan Pyr'tan Lac'ın oluşumu (R28) P1'de tüm periyotlarda, Ser eklenende ise Periyot I, II ve III'te vardır. AcCoA'dan Ac oluşumu (R30) sadece Ser eklenende Periyot III ve V'te aktiftir. Anaplerotik reaksiyonlardan OA'dan Pyr'ın sentezlendiği tepkimesi (R37) sadece Ser eklenendeki Periyot I, III ve IV'te gerçekleşmiştir. Mal'dan Pyr'ın sentezlendiği tepkime (R36) ise hiçbir koşulda gerçekleşmemiştir. Glikolat şöntü P1'de Periyot II ve IV dışında aktiftir. TCA döngüsü sadece P1'deki Periyot V'te Suc oluş tepkimesine kadar gerçekleşmekte diğer koşullarda ise aktiftir. Aromatik amino asit yoluna dallanma noktası olan R70 tepkimesi ve serin oluşum tepkimesi Ser eklenen koşulun tüm periyotlarında, alanin oluş tepkimesi (R53) ise sadece Periyot I ve III'te aktiftir. Tüm koşullarda aspartik asit (R59) ve glutamik asit (R75) oluşumu gerçekleşmektedir. Ser eklenen koşul için toplam ATP üretim akıları, Periyot I, II, III, IV ve V'de sırasıyla 12.69, 3.20, 18.654, 2.41 ve 1.40 mol g⁻¹ KH st⁻¹ olmuştur.

Çizelge 4.20 $t_e = 0$ st'te serin eklenen proseste metabolik akılar

R#	$t_e = 0$ st'te 2.5 mM Ser eklenmiş				
	Periyot I	Periyot II	Periyot III	Periyot IV	Periyot V
1	3.3080	1.3400	1.3570	0.8960	0.1460
3	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
4	2.6840	1.3080	1.3530	0.8900	0.1370
5	2.6620	1.0630	0.8480	0.8100	0.1130
6	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
7	4.9300	2.1220	1.4290	1.5730	0.2090
8	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
9	4.8340	1.8270	1.4200	0.9910	0.1950
10	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
11	4.0770	1.5850	1.3390	0.9440	0.1700
13	2.5840	1.4550	1.3390	0.7210	0.1280
14	0.5840	0.0270	0.0000	0.0000	0.0080
15	0.5840	0.0270	0.0000	0.0000	0.0080
16	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
17	0.0000	0.2420	0.5020	0.0770	0.0250
18	0.3810	0.0008	0.0000	0.0000	0.0000
19	0.0000	0.0000	0.2350	0.0150	0.0000
20	0.3810	0.0008	0.0000	0.0000	0.0000
21	0.0000	0.0000	0.2350	0.0150	0.0000
22	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
23	0.3810	0.2420	0.2670	0.0630	0.0250
24	0.3760	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
25	0.0000	0.0000	0.2360	0.0160	0.0000
26	0.0460	0.0080	0.0290	0.1110	0.1360
27	0.0460	0.0080	0.0290	0.1110	0.1360
28	0.0090	0.0380	0.0030	0.0000	0.0000
29	0.0000	0.0000	0.0000	0.0070	0.0260
30	0.0000	0.0000	0.0180	0.0000	0.1710
31	0.1220	0.7570	0.0000	0.4120	0.0000
36	0.2640	0.0365	0.0303	0.0386	0.2750
37	0.0770	0.0000	1.2420	0.0970	0.0000
38	0.0000	0.2850	0.0000	0.0000	0.0000
39	1.0440	0.7860	2.6420	0.5610	0.2160
40	1.0440	0.7860	2.6420	0.5610	0.2160
41	0.9730	0.3500	1.4710	0.3360	0.0540
42	0.6000	0.2580	0.7160	0.1900	0.0210
43	0.6000	0.2580	0.7160	0.1900	0.0210
44	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
45	1.2390	0.6830	1.7420	0.5800	0.1560
46	1.9690	0.7330	2.4730	0.6540	0.1790
47	2.0340	1.1430	3.6430	0.8840	0.0830
48	0.0710	0.4360	1.1710	0.2250	0.1620
49	0.0710	0.4360	1.1710	0.2250	0.1620
50	0.0970	0.2960	0.0080	0.5820	0.0140
51	0.1810	0.0250	0.0210	0.5290	0.0020
52	0.0540	0.0070	0.0060	0.0080	0.0010
53	0.1250	0.0000	0.0150	0.0000	0.0000
54	1.3590	0.3160	0.0320	0.2300	0.0750

Çizelge 4.20 $t_e = 0$ st'te serin eklenmesi koşulundaki metabolik dağılımları(devam)

55	1.2610	0.3010	0.0110	0.2040	0.0010
56	0.0980	0.0140	0.0210	0.0260	0.0740
57	0.1980	0.2670	0.7360	0.0920	0.0330
58	0.0260	0.0030	0.7170	0.0490	0.0230
59	1.8860	0.9430	1.1590	0.5460	0.0830
60	0.0510	0.0070	0.0060	0.0080	0.0010
61	1.0400	0.9530	0.0710	0.5070	0.0090
62	0.5110	0.8790	0.0090	0.4290	0.0010
63	0.5110	0.8790	0.0090	0.4290	0.0010
64	0.5110	0.8790	0.0090	0.4290	0.0010
65	0.5110	0.8790	0.0090	0.4290	0.0010
66	0.5290	0.0730	0.0620	0.0770	0.0070
67	0.4960	0.0690	0.0580	0.0720	0.0070
68	0.0630	0.0090	0.0080	0.0090	0.0010
69	0.0330	0.0050	0.0040	0.0050	0.0005
70	0.7570	0.2420	0.0310	0.0470	0.0250
71	0.1470	0.0000	0.0260	0.0220	0.0160
72	0.5990	0.0000	0.0040	0.0050	0.0000
73	0.0120	0.2420	0.0010	0.0200	0.0090
74	0.0120	0.2420	0.0010	0.0200	0.0090
75	0.3730	0.0920	0.7550	0.1460	0.0330
76	0.2470	0.0750	0.7390	0.1270	0.0300
77	0.0470	0.0060	0.0060	0.0070	0.0010
78	0.0790	0.0110	0.0100	0.0120	0.0020
79	0.0650	0.0090	0.0080	0.0100	0.0020
80	0.0650	0.0090	0.0080	0.0100	0.0020
81	0.0000	0.2240	0.0000	0.0000	0.0070
82	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
83	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
84	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
85	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
86	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
87	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
88	0.0050	0.0000	0.7140	0.0460	0.0230
89	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
90	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0460
91	0.0000	0.0340	0.0000	0.0000	0.0010
92	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
93	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
94	0.3780	0.0520	0.0440	0.0540	0.0040
95	0.0000	0.2410	0.0000	0.0180	0.0090
96	0.5680	0.0300	0.0000	0.0000	0.0000
97	1.1680	0.2890	0.0000	0.1900	0.0000
98	0.0610	0.0080	0.0070	0.0090	0.0003
99	0.0870	0.0110	0.7240	0.0580	0.0240
100	0.0510	0.0070	0.0060	0.0070	0.0003
101	0.0510	0.0070	0.0060	0.0070	0.0003
102	0.0830	0.0110	0.7230	0.0570	0.0240
103	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
104	0.0050	0.0006	0.0005	0.0006	0.0000

Çizelge 4.20 $t_e = 0$ st'te serin eklenmesi koşulundaki metabolik akı dağılımları
(devam)

105	0.0050	0.0006	0.0005	0.0006	0.0000
106	0.0360	0.0040	0.7180	0.0510	0.0230
107	0.4880	0.3070	1.4850	0.1800	0.0610
108	0.0990	0.0140	0.0110	0.0140	0.0005
109	0.0990	0.0140	0.0110	0.0140	0.0005
110	0.0940	0.0130	0.0110	0.0130	0.0005
111	0.0440	0.0060	0.0050	0.0060	0.0002
112	0.0050	0.0006	0.0005	0.0006	0.0000
113	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
114	0.0050	0.0006	0.0005	0.0006	0.0000
115	0.0050	0.0006	0.0005	0.0006	0.0000
116	0.0050	0.0006	0.0005	0.0007	0.0000
117	0.0000	0.0000	0.0000	0.5030	0.0000
118	0.0330	0.0050	0.0040	0.0050	0.0005
119	0.1440	0.0200	0.0170	0.0210	0.0010
120	0.1490	0.0200	0.7310	0.0670	0.0240
121	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
122	7.6750	4.7980	1.6490	3.2220	0.0000
123	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
124	4.5930	0.5530	8.0980	0.5150	0.5870
125	2.8430	1.8410	1.7420	1.1890	0.2030
126	4.8720	1.5240	4.4340	0.4500	0.4860
127	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
128	3.3550	2.2650	2.0040	2.3390	0.1840
130	0.0860	0.0120	0.0100	0.0130	0.0020
131	0.5190	0.3110	1.4880	0.1840	0.0610
132	0.4990	0.0690	0.0570	0.0710	0.0030
133	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
134	0.0300	0.0040	0.0030	0.0040	0.0002
135	0.0050	0.0008	0.0006	0.0008	0.0000
136	0.0050	0.0008	0.0006	0.0008	0.0000
137	0.0600	0.0080	0.0070	0.0090	0.0003
138	0.1640	0.0230	0.0190	0.0240	0.0020
139	0.0170	0.0020	0.0020	0.0020	0.0001
140	0.0060	0.0009	0.0007	0.0009	0.0000
141	0.0050	0.0008	0.0006	0.0008	0.0000
142	0.0050	0.0008	0.0006	0.0008	0.0000
143	0.0050	0.0008	0.0006	0.0008	0.0000
144	0.0400	0.0050	0.0050	0.0060	0.0002
145	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
146	0.0040	0.0005	0.0004	0.0005	0.0000
147	0.2330	0.0320	0.0270	0.0330	0.0010
148	0.0000	2.4650E-6	4.5420E-5	5.4870E-5	1.1960E-4
149	0.0000	0.0000	13.3830	0.0000	1.3350

4.5.2 $t_e=24$ st'te amino asit eklenmesinin hGH üretimine etkisi

Biyoprosesin başlangıcında üretim ortamına eklenen amino asitlerin hGH üretimini inhibe etmesi sonucunda üstel çoğalma fazının sona erdiği -hGH üretim fazının ortasında- $t_e=24$ st'te $C_{AA}=2.5\text{mM}$ derişiminde amino asit karışımı (Glu+Asp+Leu+Val+Lys) ve lözin+valin eklenmesinin etkisi $C_{G_0}=8 \text{ kg/m}^3$, $\text{pH}_0=7,25$, $T=37 \text{ }^\circ\text{C}$, $V_R=550 \text{ cm}^3$, MOT2 ($Q_0/V_R=0.5 \text{ vvm}$, $N=800 \text{ dk}^{-1}$) işletim koşullarında araştırılmıştır.

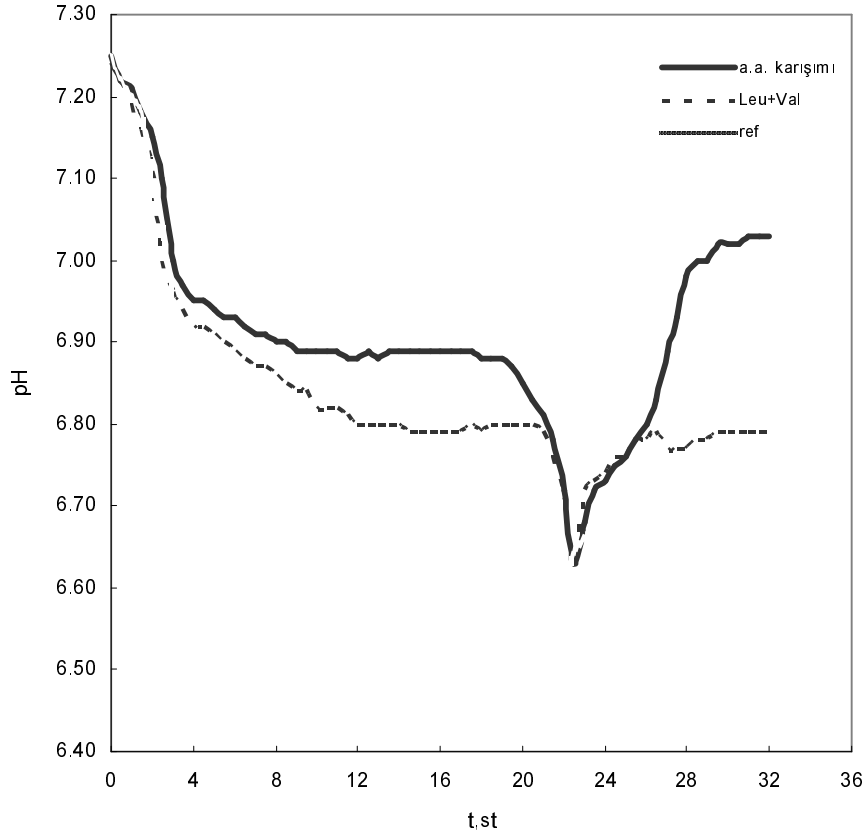
Şekil 4.64'te pH'ın eklenen amino asit ve kalma süresine göre değişimi verilmiştir. Benzer pH profilleri elde edilmiştir. Şekil 4.64'ten de görüldüğü gibi inhibitörün eklendiği $t=3$ st'e kadar pH değerinde hızlı, $t=4-20$ st arasında ise yavaş bir düşüş görülmüştür. Proses sonunda ortam pH'ı amino asit karışımı, lözin+valin eklenmesi ve referansa göre, sırasıyla 7.03, 6.79 ve 6.6 olarak ölçülmüştür. Lözin+valinin ortama eklenme zamanına göre proses sonundaki pH değeri $t_e=0$ st için 6.54 iken $t_e=24$ st için 6.79 olarak belirlenmiştir.

Çözünmüş oksijen derişiminin eklenen amino asit ve kalma süresine göre değişimi Şekil 4.65'te verilmiştir. Şekil 4.65 incelendiğinde; amino asit eklenenler ile referans ortam profillerinin benzerlik gösterdiği görülmüştür. Tüm koşullarda referanstaki gibi proteaz inhibitörünün eklendiği zamana kadar çözünmüş oksijen derişiminde ani bir düşüş, belli bir değere artış ve bu değerde sabit kaldıktan sonra yine düşüş ve artış görülmüştür.

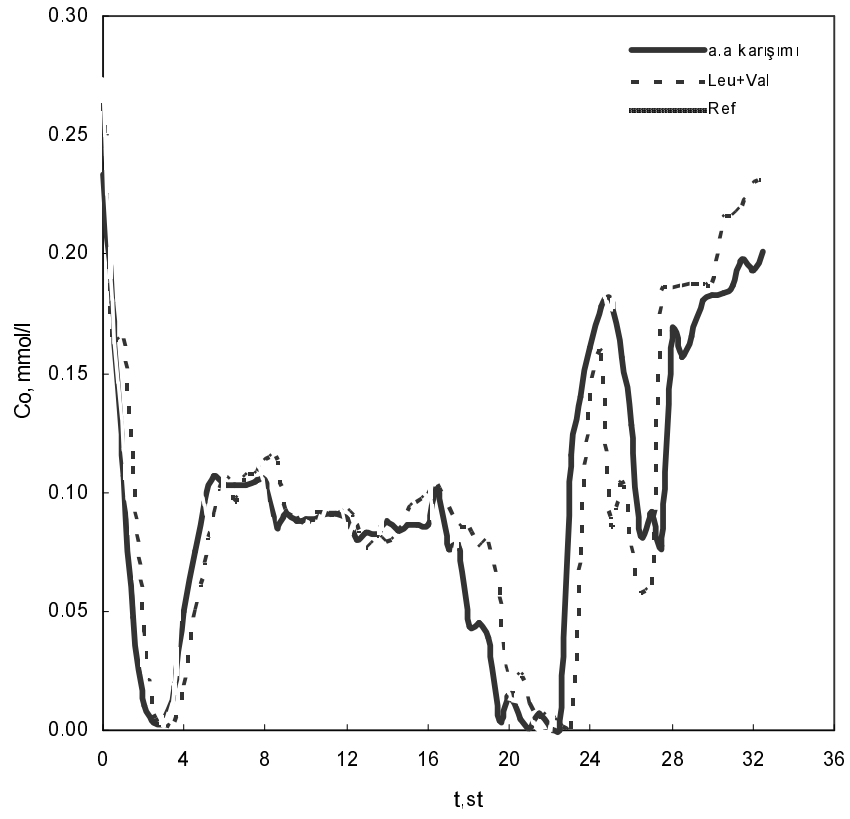
Mikroorganizma derişiminin kalma süresi ile değişimi (Şekil 4.66) incelendiğinde; hücre derişimini $t=21$ st'e kadar artığı $t=24$ st'te durgunluk fazına geçtiği görülmüştür. Bütün koşullar için hücre derişim profilleri referans ile benzerdir. En yüksek hücre derişimine amino asit karışımının eklendiği koşulda $C_x= 2.14 \text{ kg/m}^3$ ulaşılmıştır. Lözin+valin eklenme zamanına göre karşılaştırıldığında proses süresince ulaşılan maksimum hücre derişimi birbirine yakındır. Bu da lözin+valin eklenme zamanının hücre derişimini etkilemediğini göstermektedir.

Glukoz derişiminin kalma süresi ile değişimi incelendiğinde (Şekil 4.67); hücre durgunluk fazına ulaşıncaya kadar glukoz hızla tüketilmiş sonra glukoz tüketim hızı yavaşlamıştır. Proses sonunda başlangıçtaki glukozun yaklaşık olarak %99'u tüketilmiştir.

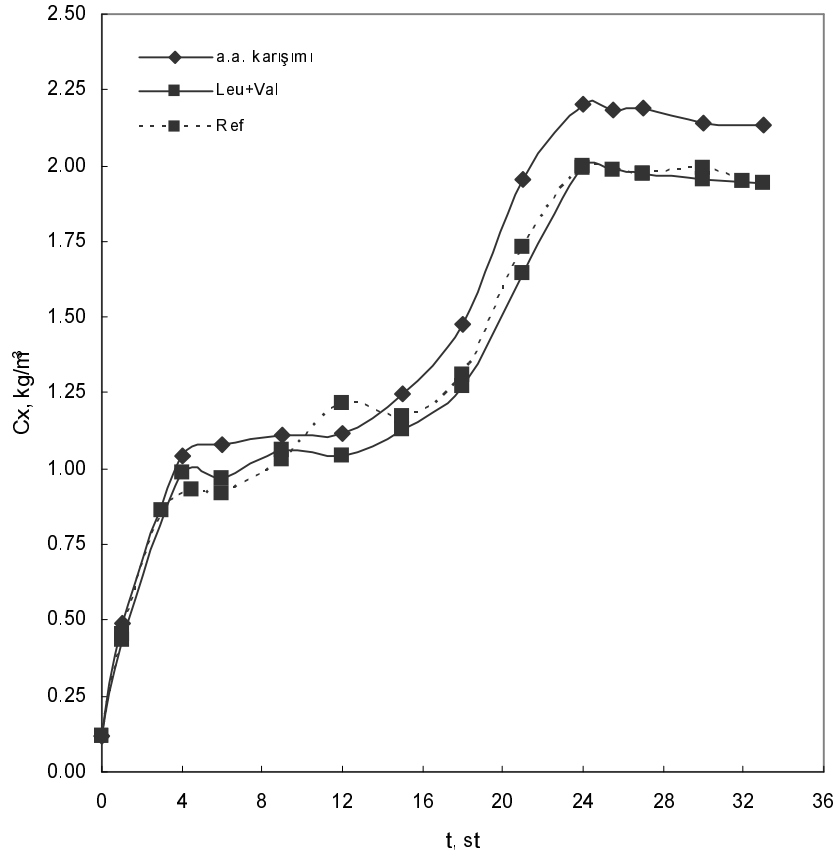
hGH derişiminin eklenen amino asit ve kalma süresi ile değişimi Şekil 4.68'te verilmiştir. Üretim ortamına $t_e=24$ st'te eklenen $C_{AA}=2.5$ mM derişimindeki amino asit karışımı ve lözin+valinin hGH üretiminde inhibisyona neden olduğu görülmüştür. hGH derişimi eklenen amino asit karışımı ve lözin+valine göre sırasıyla % 25.7 ve 31.4 kat azalmıştır. Halbuki $t_e=0$ st'te eklenen lözin+valinde ise % 42.8 kat azalma görülmüştür. Bu da $t_e=0$ st'te eklenen lözin+valinin inhibisyonunun daha fazla olduğunu göstermiştir.



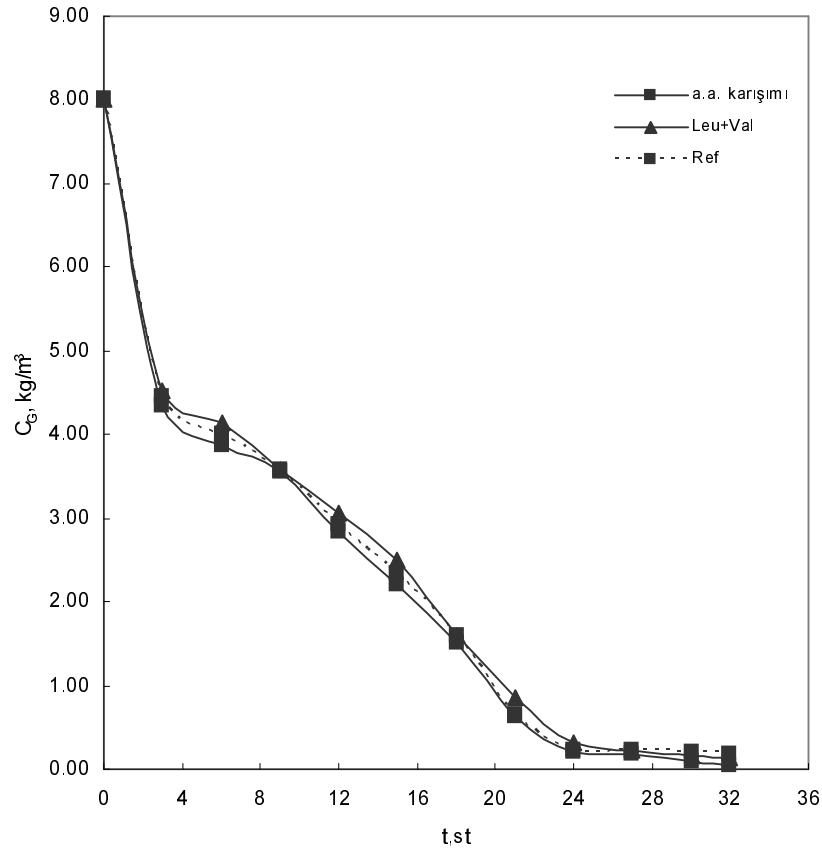
Şekil 4.64 $t_e=24$ st'te amino asit eklenmesi ile pH'ın t ile değişimi. $C_{G_0}=8$ kg m⁻³, $pH_0=7,25$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=550$ cm³, $N=800$ dk⁻¹, $Q_0/V_R= 0.5$ vvm



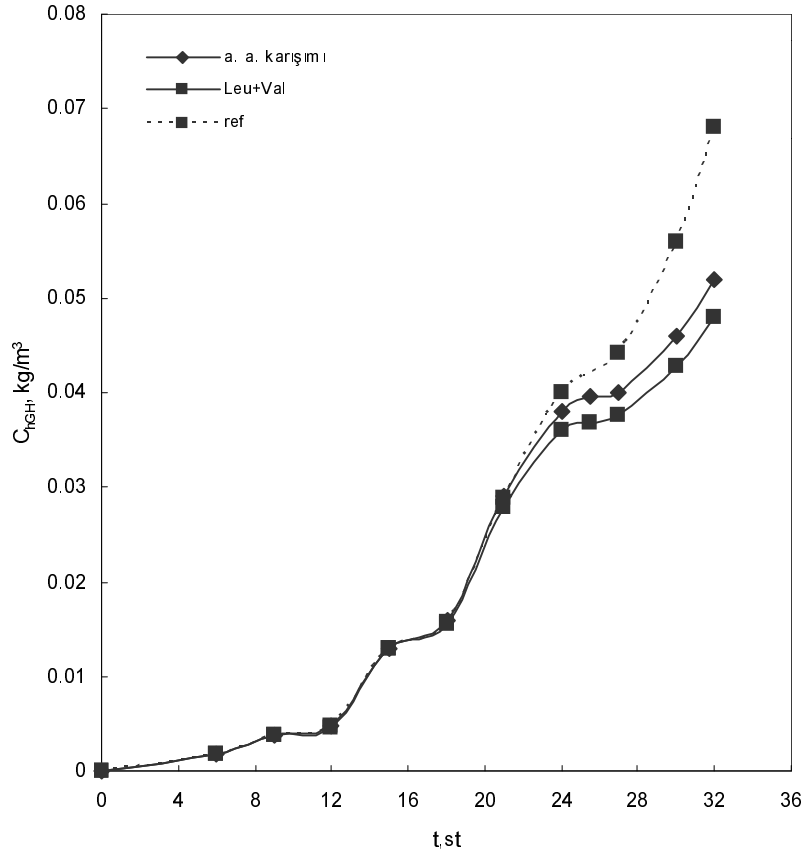
Şekil 4.65 $t_e=24$ st'te amino asit eklenmesi ile çözülmüş oksijen derişiminin t ile değişimi. $C_{G0}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH}_0=7,25$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=550 \text{ cm}^3$, $N=800 \text{ dk}^{-1}$, $Q_0/V_R=0.5 \text{ vvm}$



Şekil 4.66 $t_e=24$ st'te amino asit eklenmesi ile hücre derişiminin t ile değişimi.
 $C_{G0}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $pH_0=7,25$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=550 \text{ cm}^3$, $N=800 \text{ dk}^{-1}$, $Q_O/V_R=0.5 \text{ vvm}$



Şekil 4.67 $t_e=24$ st'te amino asit eklenmesi ile glukoz derişiminin t ile değişimi.
 $C_{G0}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH}_0=7,25$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=550 \text{ cm}^3$, $N=800 \text{ dk}^{-1}$, $Q_O/V_R=0.5 \text{vvm}$

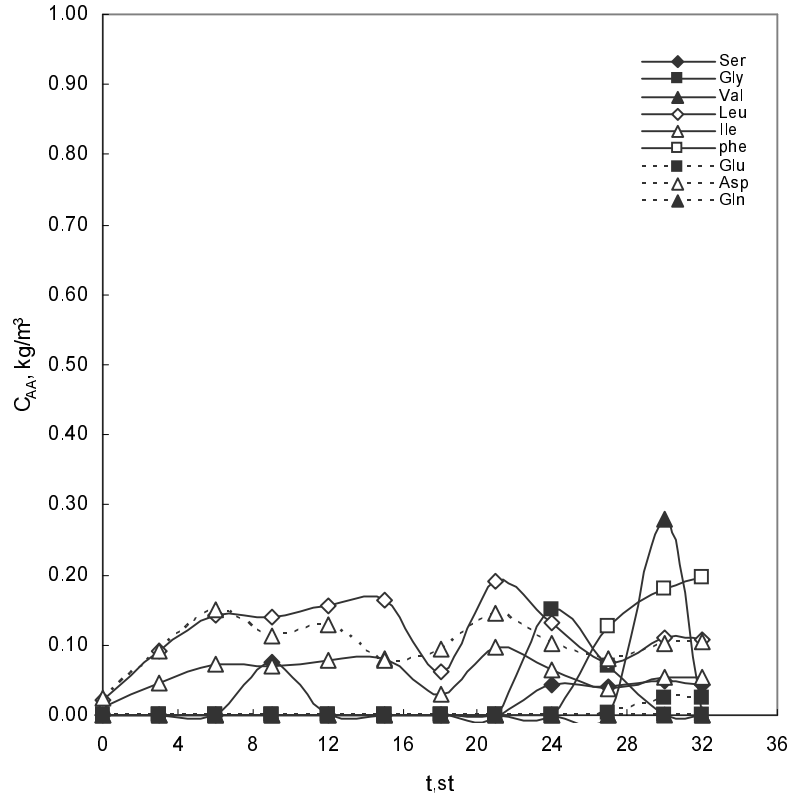


Şekil 4.68 $t_e=24$ st'te amino asit eklenmesi ile hGH derişiminin t ile değişimi.
 $C_{G_0}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $pH_0=7,25$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=550 \text{ cm}^3$, $N=800 \text{ dk}^{-1}$, $Q_0/V_R=0.5 \text{ vvm}$

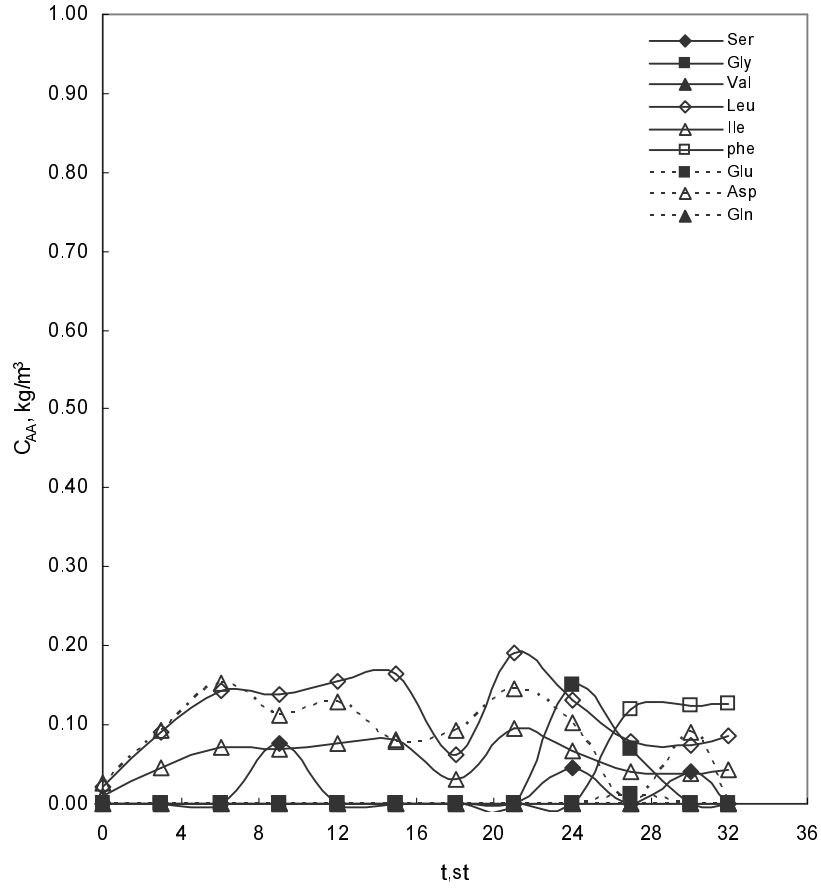
$C_{AA}=2.5 \text{ mM}$ derişiminde amino asit karışımının (Glu+Asp+Ser+Leu+Val) eklendiği $t_e=24$ st'e kadar ortama salgılanan amino asit derişimleri referans ile benzerdir. Salgılanan amino ve organik asit derişimleri incelenirken $t_e=24$ st'ten sonrası dikkate alınmıştır. Şekil 4.69'te ortama aktarılan amino asit derişimlerinin kalma süresi ile değişimi verilmiştir. Buna göre amino asit eklenmesinden sonra ortama serin, valin, lözin, aspartik asit, glutamik asit, izolözin ve fenilalanin aktarılmıştır. Derişimi en yüksek olan valindir (0.28 kg m^{-3}). Yan-ürün olarak biyoreaktörde en yüksek derişimde bulunan diğer amino asitler sırasıyla fenilalanin (0.195 kg m^{-3}), lözin (0.106 kg m^{-3}), aspartik asit (0.104 kg m^{-3}), izolözin (0.053 kg m^{-3}), serin (0.043 kg m^{-3}) ve glutamik asittir (0.024 kg m^{-3}). Referansta olduğu gibi burada da alanin, arjinin, histidin, triptofan, metionin, lizin, glutamin, treonin ve asparajin ise proses süresince üretim ortamında bulunmamaktadır. Üretim ortamına aktarılan organik asit derişilerinin kalma

süresi ile değişimi Şekil 4.71’de verilmiştir. Şekil 4.71’den de görüldüğü gibi ortama aktarılan organik asitlerin derişim profilleri salınım göstermektedir. Biyoproses süresince ortamda belirgin bir şekilde gözlenen organik asitler ise asetik, süksinik, formik, sitrik ve glukonik asittir. Biyoreaktörde en yüksek derişimde bulunan organik asitler sırasıyla süksinik asit (0.307 kg m^{-3}), glukonik asit (0.30 kg m^{-3}), asetik asit (0.251 kg m^{-3}), sitrik asit (0.158 kg m^{-3}), formik asittir (0.15 kg m^{-3}). Ortama aktarılan diğer amino asitlerin derişim değeri ise $0.1-0.001 \text{ kg m}^{-3}$ derişim aralığında bulunmaktadır. Malik ve okzaloasetik asit ise proses süresince üretim ortamında bulunmamaktadır. Bu koşul ile referans ortam karşılaştırıldığında süksinik, asetik, formik asit derişimlerinde artma; pürivik ve laktik asit derişimlerinde ise azalma olduğu görülmüştür.

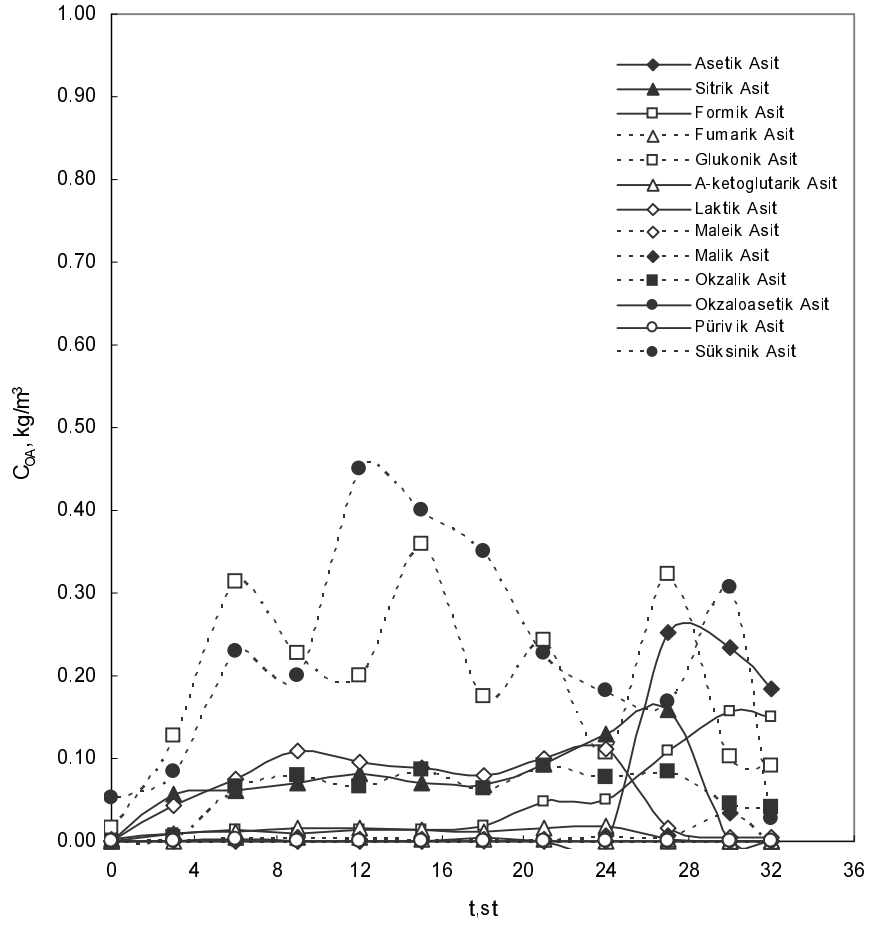
$C_{\text{Leu+Val}}=2.5 \text{ mM}$ derişiminde lözin+valin amino asit karışımının eklendiği üretim ortamı için hücre dışına aktarılan amino asit ve organik asitlerin kalma süresi ile değişimi sırasıyla Şekil 4.70 ve Şekil 4.72’de verilmiştir. Bu koşulla diğer koşullar karşılaştırılırken $t_e=24 \text{ st}$ ’ten sonraki amino asit ve organik asit derişimleri önemlidir. Lözin derişim profili ortama aktarılan diğer amino asit profilleri gibi salınım göstermiştir (Şekil 4.70). Valin ise ortama eklendikten sonra kısa sürede tüketilmiştir. Biyoreaktörde en yüksek derişimde bulunan diğer amino asitler sırasıyla lözin (0.085 kg m^{-3}), aspartik asit (0.09 kg m^{-3}), fenilalanin (0.126 kg m^{-3}), serin (0.041 kg m^{-3}) ve isolözindir (0.041 kg m^{-3}). $t_e=24 \text{ st}$ ’te $C_{\text{Leu+Val}}=2.5 \text{ mM}$ derişiminde lözin+valin amino asit karışımının eklendiği koşulda referansa ve $t_e=0 \text{ st}$ ’te eklenene göre fenilalanin üretimi sırasıyla % 4.7 ve 50.6 kat daha azdır. Referansta olduğu gibi burada da alanin, arjinin, glutamik asit, histidin, triptofan, metionin, lizin, glutamin, treonin ve asparajin proses süresince üretim ortamında bulunmamaktadır. Şekil 4.72’ten de görüldüğü gibi ortama aktarılan organik asitlerin derişim profilleri salınım göstermektedir. Biyoproses süresince ortamda belirgin bir şekilde gözlenen organik asitler ise glukonik asit (0.231 kg m^{-3}), süksinik (0.207 kg m^{-3}), asetik (0.161 kg m^{-3}) ve formik asittir (0.1 kg m^{-3}). Sitrik, maleik, pürivik ve okzaloasetik asit proses süresince üretim ortamında bulunmamaktadır. Ortama aktarılan diğer amino asitlerin derişim değeri ise $0.1-0.001 \text{ kg m}^{-3}$ derişim aralığında bulunmaktadır. Bu koşul $t_e=0 \text{ st}$ koşulu ile kıyaslandığında glukonik asit derişiminin % 10 kat azaldığı görülmüştür.



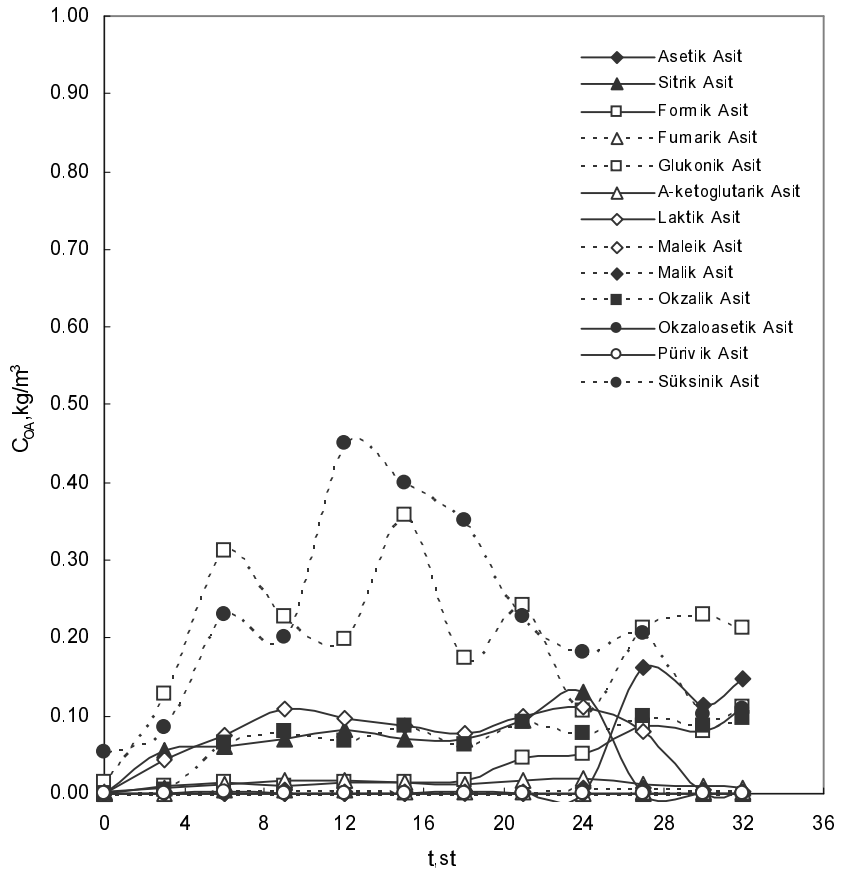
Şekil 4.69 $t_e=24$ st'te amino asit karışımının eklenmesi ile ortama aktarılan amino asit derişimlerinin t ile değişimi. $C_{G0}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $pH_0=7,25$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=550 \text{ cm}^3$, $N=800 \text{ dk}^{-1}$, $Q_0/V_R=0.5 \text{vvm}$



Şekil 4.70 $t_e=24$ st'te lözin+valin eklenmesi ile ortama aktarılan amino asit derişimlerinin t ile değişimi. $C_{G_0}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH}_0=7,25$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=550 \text{ cm}^3$, $N=800 \text{ dk}^{-1}$, $Q_O/V_R=0.5 \text{ vvm}$



Şekil 4.71 $t_e=24$ st'te amino asit karışımının eklenmesi ile aktarılan organik asit derişimlerinin t ile değişimi. $C_{Go}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH}_0=7,25$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=550 \text{ cm}^3$, $N=800 \text{ dk}^{-1}$, $Q_O/V_R=0.5 \text{vvm}$



Şekil 4.72 $t_e=24$ st'te lözin+valin eklemesi ile aktarılan organik asit derişimlerinin t ile değişimi. $C_{G0}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH}_0=7,25$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=550 \text{ cm}^3$, $N=800 \text{ dk}^{-1}$, $Q_O/V_R=0.5 \text{ vvm}$

5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

“Genetik mühendisliği teknikleri ile rekombinant insan büyüme hormonu üretimi için biyoproses geliştirilmesi” konulu yüksek lisans araştırma programı kapsamında ilk aşamada sadece insanda doğala özdeş, çözünebilir ve biyolojik olarak aktif yapıda üretilen insan büyüme hormonunun (hGH) mikroorganizmalarca hücre-dışı üretilmesi için *Bacillus* hücre-dışı enzimi serin alkali proteaz (SAP) geninin (*subC*) *pre-* sinyal dizini hGH gen dizininin önüne SOE yöntemiyle entegre edilerek oluşturulan hibrit gen genetik mühendisliği teknikleri ile seçilen plasmide iki aşamalı proses ile klonlanmış ve geni taşıyan plasmidin *Bacillus subtilis* türlerine aktarılmasıyla rekombinant mikroorganizmalar geliştirilmiştir. İkinci aşamada bu rekombinant mikroorganizmalar ile mikrobiyolojik hava filtreli, kesikli, $V_R=110 \text{ cm}^3$ çalışma hacimli laboratuvar ölçekli biyoreaktörlerde, $T=37 \text{ }^\circ\text{C}$, $N=200 \text{ dk}^{-1}$ ve $\text{pH}_0=7.25$ işletme koşullarında üretim ortamına eklenen proteaz inhibitörünün ve karbon kaynağı glukozun derişimi belirlenmiştir. Araştırmanın üçüncü aşamasında laboratuvar ölçekte bulunan en uygun koşullarda farklı hava giriş ve karıştırma hızlarında oluşturulan dört farklı oksijen aktarım koşulunda pilot ölçek biyoreaktörde oksijen aktarım etkileri araştırılmıştır. Oksijen aktarım koşullarındaki deney verileri kullanılarak hücre-içi tepkime akılarının bulunması; üretimde muhtemel metabolik darboğazların belirlenmesi amacıyla metabolik akı analizleri yapılmıştır. Dördüncü aşamada, belirlenen en iyi oksijen aktarım koşulunda hibrit-gen içeren (*-pre(subC)::hGH::pMK4*) ve içermeyen (*pMK4*) plasmid taşıyan *Bacillus subtilis* BGSC-1A751 ile iki koşulda deney gerçekleştirilerek *-pre(subC)::hGH* hibrit-genin biyoproses etkisi kıyaslanmış ve muhtemel metabolik darboğazların belirlenmesi amacıyla metabolik akı analizleri yapılmıştır. Beşinci ve son aşamada, belirlenen en iyi oksijen aktarım koşulunda üretim ortamına farklı zamanlarda ($t_e= 0$ ve $24 \text{ st}'te$) $C= 2.5 \text{ mM}$ derişimde eklenen serin, aspartik asit, lözin+ valin ve glutamik asitin üretime etkisi araştırılmıştır.

5.1 Rekombinant Mikroorganizma Geliştirilmesi

Yüksek lisans araştırma programının ilk programında, istenilen ürün hGH üretimi için metabolik mühendislik tasarımı yapılmıştır. Bu amaç doğrultusunda öncelikle hGH'nin

hücre-dışına aktarılabilmesi için, *Bacillus* hücre-dışı enzimi serin alkali proteaz (SAP) geninin (*subC*) salgılamada görev yapan sinyal dizininin (*pre-*) hGH gen dizininin önüne SOE yöntemi (Horton *et al.*1993) ile entegre edilerek hibrit gen oluşumu tasarlanmıştır. Hibrit gen oluşturulabilmesi için öncelikle bir bilgisayar programı ile her bir gen için birer ileri ve geri olmak üzere toplam 4 adet primer tasarımı gerçekleştirilmiştir. SAP üretme potansiyeli olan *B. licheniformis* DSM 1969'ten (Çalık *et al.* 2003b) izole edilen kromozomal DNA ve *E. coli* XL1-Blue ATCC 31538 'dan izole edilen hGH cDNA'sını taşıyan pHGH107 (Goeddel *et al.* 1979) plasmidi kalıp olarak kullanılarak *-pre(subC)* ve hGH mature-peptit dizinleri iki ayrı PCR tepkimesiyle çoğaltılmıştır. Tasarlanan primerler ile her iki genin birleştirilecek uçlarına birbirlerinin tamamlayıcı dizinler eklenmiştir. Üçüncü bir PCR tepkimesiyle de *-pre(subC)* dizini hGH mature dizininin önüne SOE yaklaşımıyla entegre edilerek hibrit-gen elde edilmiştir. *E. coli*'ye plasmid DNA transferinin ve *E. coli*'den plasmid DNA izolasyonunun kolaylığı nedeniyle ön klonlama işlemlerinin *E. coli* plasmidine yapılmasına ve *E. coli*'ye transformasyonuna karar verilmiştir. Klonlanacak hedef genin molekül büyüklüğü ne kadar küçük ise klonlama tepkimesinin gerçekleşme olasılığını artırmak için bu tepkimenin girdileri olan gen ve vektörün miktarları gen/vektör oranı artırılarak değiştirilmelidir. Bu doğrultuda farklı gen/vektör oranlarının (G/V=3 ve 5) klonlama tepkimesine verimi araştırılmıştır. PCR ile sentezlenen *-pre(subC)::hGH* hibrit geni pUC19 plasmidine yapışkan-uç kesim yapılarak gen/vektör=5'te T4 DNA ligaz enzimi katalizörlüğünde T=22°C 'de t=16 st süren ligasyon tepkime ile başarılı bir şekilde klonlanmış ve CaCl₂ yöntemiyle *E. coli*'ye transforme edilmiştir. *E. coli* transformasyonu sonra *-pre(subC)::hGH::pUC19* plasmidinin ilk kontrolü PCR tepkimesi, ikinci kontrolü ise tasarlanan primerlerde konumları bulunan *Bam*HI ve *Xba*I restriksiyon enzimleriyle kesme tepkimeleri sonunda, *-pre(subC)::hGH* hibrit gen bandının gözlenmesi şeklinde gerçekleştirilmiştir. Son aşamada, hibrit-gen *-pre(subC)::hGH::pUC19* plasmidinden kesilip ayrılarak izole edildikten sonra kopyalama sayısı yüksek olan pMK4 *Bacillus-E. coli* shuttle vektörüne sub-klonlama yapılmış ve *E. coli*'ye transfer edilmiş; hibrit genin doğru klonlandığı saptandıktan sonra elektroporasyon yöntemiyle *B.subtilis* BGSC-1A197 (*spo-*) ve *B.subtilis* BGSC-1A751 (*npr-*, *abr-*) mikroorganizmalarına aktarılarak iki rekombinat *Bacillus subtilis*

elde edilmiştir. Yüksek lisans araştırmasının bundan sonraki aşamalarında geliştirilmiş olan bu iki r-*B. subtilis* kullanılmıştır.

Sürelî yayın literatüründe hGH üretimi için rekombinant *E. coli* (Goeddel *et al.* 1979, Ikehara *et al.* 1984, Gray *et al.* 1985, Becker and Hsuing 1986, Chang *et al.* 1987, Kato *et al.* 1987, Hsuing *et al.* 1989, Yamakawa *et al.* 1998b, Shin *et al.* 1998b, Tabandeh *et al.* 2004) ve *Bacillus* türleri (Nakayama *et al.* 1988 ve Kajino *et al.* 1997) geliştirilmesi ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır. *E. coli* ile gerçekleştirilen çalışmalarda hGH periplazmik, sitoplazmik ve hücre-dışı olarak üretilmiştir. Gray *et al.* (1985), Becker and Hsuing (1986), Chang *et al.* (1987), Yamakawa *et al.* (1998b) araştırmalarında sırasıyla hGH, OmpA, *STII*, hGH sinyal peptidlerini ve *trp*, *Lpp-lac*, *phoA*, *tac* promoter(başlatıcı)'larını kullanarak hGH'yi periplazmik olarak üretmişlerdir. Kato *et al.* (1987) gerçekleştirdikleri çalışmada ise *Bacillus penicillinaz* sinyal peptidini ve *Ex-K*, *Ex* olmak üzere iki farklı başlatıcı (promoter) kullanarak *E. coli*'de hGH'nin sırasıyla hem hücre-dışı hem de periplazmik üretimini gerçekleştirmişlerdir. Goeddel *et al.* 1979, Ikehara *et al.* (1984), Shin *et al.* (1998b) ve Tabandeh *et al.* (2004) hGH'yi periplazmik olarak üretmişlerdir.

Nakayama *et al.* (1988) *Bacillus subtilis*'ı kullanarak geliştirilmiş olan farklı iki plasmidin (pNPA225 ve pHGH526) hGH üretimine etkilerini araştırmışlar ve maksimum 0.04 kg/m³ hGH derişimini elde etmişlerdir. Kajino *et al.* (1997) pNPA84 promoter ve sinyal peptidini kullanarak geliştirilen plasmid ile *Bacillus brevis* 31-OK'te hücre-dışı olarak 0.148 kg/m³ hGH üretmişlerdir. Kajino *et al.* (1997) hücre-dışı proteazın ürünü parçalamasını engellemek için hücre-dışı proteaz üretimi çok düşük olan *Bacillus brevis* 31-OK'yi (*Bacillus brevis* HPD31'in mutantıdır) kullanmışlardır. Araştırmalarını karbon kaynağı olarak glukozun kullanıldığı polipepton ve maya özütü içeren kompleks ortamda gerçekleştirmişlerdir. Üretim ortamındaki polipepton derişimini optimize ederek hGH üretimini 0.24 kg/m³'e arttırmışlardır. Bu yüksek lisans çalışması ise karbon kaynağı olarak glukozun kullanıldığı tanımlanmış ortamda gerçekleştirilmiştir.

Sürekli yayın literatüründe bu araştırmada tasarlanan ve oluşturulan *-pre(subC)::hGH* hibrit geni ile hGH üretim çalışması bulunmamaktadır. *Bacillus subtilis*'in kullanıldığı Nakayama *et al.* 1988 yılındaki çalışması ile bu yüksek lisans araştırması karşılaştırıldığında; farklı promoter ve sinyal peptidler kullanılarak geliştirilen farklı rekombinant plasmidlerle sırasıyla 0.04 ve 0.03 kg/m³ derişiminde hGH üretilmiştir. Bu yüksek lisans çalışmasında tanımlanmış ortamda geliştirilen oksijen aktarım koşullarında hGH derişimi 0.07 kg/m³ olmuştur.

5.2 *r-Bacillus subtilis* ile hGH Üretiminde Ortam Optimizasyonu

Araştırma programının ilk aşamasında geliştirilmiş olan *r-Bacillus subtilis* BGSC-1A197 ve *r-Bacillus subtilis* BGSC-1A751'nin üretim performansları karşılaştırılmıştır. hGH'nin hücre-dışına salgılanması için *-pre(subC)* sinyal dizini kullanıldığında ilk üretim deneyinde referans ortam olarak SAP için belirlenmiş tanımlanmış üretim ortamı (Çalık *et al.* 2004) kullanılmıştır. Bu ortam kullanılarak biyoproses sonunda hGH üretimi gözlenememiştir. Kullanılan ortamın SAP üretimine neden olduğu ve üretilen proteazların da ürünü parçaladığına karar verilmiştir. Bu nedenle proteaz üretiminin başladığı anda üretim ortamına proteaz inhibitör kokteylinin (Sigma, P-2714) eklenmesine karar verilmiştir. Protezları inhibe ettiği belirlenen tuz çözeltisi (Pollock 1965) ile protez inhibitör kokteyli hGH üretimi açısından karşılaştırılmış ve inhibitör kokteyli ile yaklaşık % 93.6 artış belirlenmiştir. Eklenen inhibitör derişiminin etkisi araştırılmış ve 7.44 µM eklenerek *r-Bacillus subtilis* BGSC-1A197 ve *r-Bacillus subtilis* BGSC-1A751 için sırasıyla 0.025 ve 0.027 kg/m³ derişiminde hGH üretilmiştir. 0-7.44 µM aralığındaki inhibitör derişiminin protez üretimini inhibe etmek için yeterli olmadığı, 7.44-74.4 µM aralığındakinin ise fazla olması nedeniyle ürün inhibisyonuna neden olduğu belirlenmiştir.

Başlangıç glukoz derişimlerinin C_{G0}=6, 8, 10, ve 15 kg/m³ üretime etkisi araştırılmış ve her iki *r-Bacillus subtilis* içinde maksimum hGH derişimine 8 kg/m³ başlangıç glukoz derişiminde ulaşılmıştır. Çalık *et al.* (2004) çalışmasında da *-pre(subC)* sinyal peptit kullanılarak 8 kg/m³ başlangıç glukoz derişiminde maksimum SAP üretilmiştir.

Ortam optimizasyonu sonunda *r-Bacillus subtilis* BGSC-1A197 ve *r-Bacillus subtilis* BGSC-1A751 ile sırasıyla 0.026 kg/m³ ve 0.030 kg/m³ derişimlerinde hGH üretilmiştir. Bu nedenle hGH üretim potansiyeli %13.3 daha fazla olan *r-Bacillus subtilis* BGSC-1A751 ile araştırma programına devam edilmesine karar verilmiştir.

Literatürde *Bacillus* türleri kullanarak hGH üretimi ile ilgili yapılan iki çalışmada (Nakayama *et al.* 1988, Kajino *et al.* 1997) karbon kaynağı olarak glukoz içeren kompleks ortam kullanılmıştır. Üretilen hGH'nin proteazlar tarafından parçalanmasını engellemek için proteaz aktivitesi düşürülmüş *B. brevis* 31-OK (Kajino *et al.* 1997) kullanılmıştır. 30 g/l polipepton P1, 2 g/l maya özütü, 30g/l glukoz, 0.1 g/l CaCl₂.2H₂O, 0.1 g/l MgSO₄.7H₂O, 0.01 g/l FeSO₄.7H₂O, 0.01 g/l MnSO₄.4H₂O ve 0.01 g/l ZnSO₄.7H₂O içeren kompleks üretim ortamında 0.148 kg/m³ hGH, bu ortamdaki polipepton P1'i %3'ten %2'ye düşürülerek hGH derişimi 0.24 kg/m³'ye artmıştır. Nakayama *et al.* (1988) ise *B.subtilis* MT500 ile 10 g/l soytripton, 5 g/l maya özütü ve 10 g/l NaCl içeren LB ortamda 0.04 kg/m³ derişiminde hGH elde etmişlerdir.

Literatürde *r-Bacillus* ile hGH üretiminde en uygun karbon kaynağının ve derişiminin belirlenmesi ile ilgili çalışma bulunmamaktadır. Süreli yayın literatüründe *r-Bacillus* ile hGH üretiminde tanımlanmış ortam optimizasyonu ile ilgili çalışma da bulunmamaktadır.

5.3 Oksijen Aktarım Karakteristikleri

Araştırma programının üçüncü aşamasında laboratuvar ölçekte bulunan en uygun koşullarda, V_R=550 cm³ hacımlı, mekanik karıştırılmalı, pH, sıcaklık, çözülmüş oksijen ve karıştırma hızı kontrollü pilot ölçekli kesikli biyoreaktörlerde farklı hava giriş ve karıştırma hızlarında oksijen aktarım etkileri incelenmiş, oksijen aktarımı ve biyoproses karakteristikleri belirlenmiştir. Oksijen aktarımının etkisinin incelendiği deneylerde dinamik-yöntem ile proses süresince sıvı faz hacımsal kütle aktarım katsayısı K_La ve mikroorganizma oksijen tüketim hızı -r_O'da belirlenmiştir. Ortama mikroorganizma aşılardan önce (t<0 st'te) bulunan fiziksel kütle aktarım katsayısı K_La₀ yardımıyla

artma faktörü $E (=K_{La}/K_{La_0})$, Da , η değerleri de belirlenerek sonuçlar Çizelge 4.8'de sunulmuştur.

pH ve çözülmüş oksijen derişiminin kalma süresi ile değişimi genel olarak paralellik göstermekte oksijen aktarım koşuluna da bağlı olarak pH önce belli bir kalma süresine kadar farklı hızlarda azalmakta ve sonra da artmaktadır, çözülmüş oksijen derişimi de önce azalmakta, bir süre sabit kaldıktan sonra artmaktadır. hGH üretim prosesi sonunda pH değeri düşmüştür. Her hücrenin belli bir hücre-içi pH değeri vardır ve hücreler yaşamlarının tüm evrelerinde hücre-içi pH değerini sabit tutmaya çalışırlar. Bu nedenle biyoproses ortam bileşimine ve buna paralel olarak hücre-içi tepkimelere ve mikroorganizmaların buldukları evreye bağlı olarak, mikroorganizmalar ya ortama H^+ iyonu salgırlar, üretim ortam pH 'ı düşer veya ortamdaki H^+ iyonu transfer ederler ve ortam pH 'ı yükselir. Karbon kaynağı olarak glukoz kullanılan üretim ortamında ortam pH'ı kalma süresiyle azalmış, bir başka deyişle hücre-içi tepkimelerin oluşumuyla hücreden ortama H^+ iyonu taşınmıştır.

Tüm oksijen aktarım koşullarında $t=4$ st'ten sonra çözülmüş oksijen derişimindeki artışın ortama eklenen proteaz inhibitöründen kaynaklandığı görülmüştür. $Q_O/V_R= 0.5$ vvm hava giriş hızında, hücre derişimi karıştırma hızının $N= 500 \text{ dk}^{-1}$ 'den 700 ve 800 dk^{-1} 'e artmasıyla artmıştır. Sabit karıştırma hızında ($N= 800 \text{ dk}^{-1}$) ise hava giriş hızının $Q_O/V_R= 0.5$ vvm'den 0.7 vvm'e artmasıyla hücre derişiminde belirgin bir artış gözlenmemiştir. Üretim ortamına salgılanacak proteazların ürünü parçalamasını önlemek için $t=4$ st'te eklenen proteaz inhibitörünün hücre çoğalmasını etkilediğı görülmüştür. $t=4$ st'e kadar hızla artan hücre derişimi proteaz inhibitörünün eklenmesiyle durgunluk fazına geçmiştir. Biyoprosesin $t=24$ st'inden sonra substrat tüketiminin azalmasıyla hücre durgunluk fazına ulaşmış, oksijen aktarım koşuluna göre substrat tüketim hızı ve hücre çoğalma hızı farklılıklar göstermiştir. Biyoproses sonunda oksijen aktarım koşullarına göre başlangıç glukoz derişiminin en fazla %98'i en az da % 88.2'si tüketilmiştir. Düşük oksijen aktarım koşulunda hGH üretiminin de düşük olduğu görülmüştür. LOT koşulundaki ile karşılaştırıldığında hGH derişimi MOT1'de %33 ve MOT2'de % 48.6 artmıştır. $N= 800 \text{ dk}^{-1}$ sabit karıştırma hızında ise hava giriş hızı 0.5 vvm'den 0.7 vvm'e arttığında hGH derişimi % 14.3 azalmıştır. Sonuç olarak en

yüksek hGH derişimine ($C_{hGH} = 0.07 \text{ kg/m}^3$) $Q_O/V_R = 0.5$ vvm hava giriş hızında ve $N = 800 \text{ dk}^{-1}$ karıştırma hızında MOT2 'de ulaşılmıştır. Hücre çoğalması ile glukoz tüketimi paralellik göstermiştir. Tüm koşullarda hGH üretimi hücrenin üstel çoğalma fazında başlamış ve durgunluk fazında maksimuma ulaşmıştır.

Sürelî yayın literatüründe hGH'nin *r-E. coli* ile yarı-kesikli biyoreaktörlerde üretimi ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır (Jensen and Carlsen 1990, Shin *et al.* 1998a, Shin *et al.* 1998b, Byund *et al.* 2000, Caston *et al.* 2002, Tabandeh *et al.* 2004). Bu araştırmalarda $T = 30-37 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 6.75-7.2$, $N \geq 500 \text{ dk}^{-1}$ ve $Q_O/V_R = 1-1.4$ vvm işletim koşullarında karbon kaynağı olarak glukoz/gliserol kullanılarak sitoplazmik olarak hGH üretilmiştir. *r-E. coli* ile hücre-dışı hGH üretiminde oksijen aktarım koşullarının incelendiği bir çalışma bulunmamaktadır.

Sürelî yayın literatüründe *r-B.subtilis* ile pilot ölçekte hücre-dışı hGH üretimiyle ilgili bir çalışma bulunmaktadır (Nakayama *et al.* 1988). Fakat bu çalışma tek bir işletim koşulunda gerçekleştirilmiştir. Nakayama *et al.* (1988), temel aldıkları pNPA225 plasmidinin sinyal peptidini de kullanarak geliştirdikleri phGH526 plasmidi ile tek bir işletim koşulunda karbon kaynağı olarak glukozun kullanıldığı tanımlanmış ortamda kesikli ($V_R = 1 \text{ dm}^3$) ve yarı-kesikli biyoreaktörlerde ($V_R = 4 \text{ dm}^3$) hücre-dışı hGH üretimini araştırmışlardır. Bu çalışmada işletim koşulları belirtilmemiştir. Biyoproses sonunda $V_R = 1 \text{ dm}^3$ hacımlı kesikli biyoreaktörlerde 0.006 kg/m^3 , $V_R = 1 \text{ dm}^3$ hacımlı yarı-kesikli biyoreaktörlerde ise 0.04 kg/m^3 hGH derişimine ulaşılmıştır. Bu yüksek lisans araştırmasında ise $V_R = 0.55 \text{ dm}^3$ hacımlı kesikli biyoreaktörde $C_{hGH} = 0.07 \text{ kg/m}^3$ hGH derişimi elde edilmiştir. Literatürde daha çok rekombinant plasmid geliştirilmesi ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır fakat oksijen aktarımının hGH üretimine etkileri ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır.

Çalık *et al.* (2000) aynı *subC* sinyal peptidini kullanarak SAP üretimini amaçladıkları çalışma ile bu çalışma kıyaslandığında her iki biyomolekülünde hücrenin durgunluk fazında sentezinin arttığı görülmüştür. $V_R = 2.2 \text{ dm}^3$ hacımlı kesikli biyoreaktörlerde $Q_O/V_R = 0.5$ vvm hava giriş hızı ve $N = 750 \text{ dk}^{-1}$ karıştırma hızı oksijen aktarım koşullarında maksimum SAP üretilmiştir. Ölçek büyütme yönteminin sabit güç

kriterlerinden (Rose 1981) yararlanılarak $V_R = 0.55 \text{ dm}^3$ hacimli kesikli biyoreaktörde $N = 800 \text{ dk}^{-1}$ karıştırma hızındaki maksimum hGH derişimine $V_R = 2.2 \text{ dm}^3$ hacimli kesikli biyoreaktörde $N = 577 \text{ dk}^{-1}$ karıştırma hızıyla ulaşılacağı hesaplanmıştır. Bu değer aynı sinyal peptit ve üretim ortam kullanarak (proteaz inhibitörü hariç) SAP üretmiş olan Çalık *et al.* (2000)'in araştırmalarında belirledikleri optimum karıştırma hızından daha düşüktür. $N = 750 \text{ dk}^{-1}$ karıştırma hızında $V_R = 2.2 \text{ dm}^3$ hacimli biyoreaktörde üretilen SAP'ın derişimi $C_{SAP} = 0.25-0.5 \text{ kg/m}^3$ arasındadır. Bu yüksek lisans araştırmasında pilot-ölçek biyoreaktör sistemiyle maksimum $N_{max} = 800 \text{ dk}^{-1}$ karıştırma hızı sağlanabilmiştir. Karıştırma hızının artmasıyla hGH üretimi arttığından aynı hava giriş hızında SAP üretiminin maksimum olduğu $N = 750 \text{ dk}^{-1}$ karıştırma hızı sağlanırsa hGH üretiminde artış beklenmektedir. SAP üretim profilleri incelendiğinde (Çalık *et al.* 2000) hGH'de olduğu gibi üstel çoğalma fazında üretime başlandığı ve maksimum üretime duraklama fazında ulaşıldığı görülmüştür. hGH ve SAP üretim profilleri benzerdir.

Oksijen aktarım koşuluna bağlı olarak biyoreaktörde kalma süresiyle hücre-dışına aktarılan amino asitler ile organik asitler ve maksimum derişimleri Çizelge 5.1'de verilmiştir. Dört oksijen aktarım koşulunda da aromatik grubu amino asitlerden olan fenilalanin, serin grubu amino asitlerden serin, alanin grubu amino asitlerden lözin ve aspartik asit grubu amino asitlerden aspartik asit ve izolözinin ortama aktarıldığı belirlenmiştir. Biyoproses süresince ortama aktarılan maksimum toplam amino asit derişimi HOT'ta $C_{AA} = 0.56 \text{ kg m}^{-3}$, minimum toplam amino asit derişimi ise MOT2'de $C_{AA} = 0.46 \text{ kg m}^{-3}$ 'dir. Ortama aktarılan amino asit derişiminin az ve ürün derişiminin fazla olması bunların hGH'nin üretiminde kullanıldığını göstermektedir. Biyoproses süresince ortama aktarılan toplam organik asit derişimi incelendiğinde; en yüksek derişim MOT1'de ($C_{OA} = 1.14 \text{ kg m}^{-3}$), en düşük derişim ise HOT'ta ($C_{OA} = 0.56 \text{ kg m}^{-3}$) elde edilmiştir. MOT2'de aktarılan maksimum toplam organik asit derişimi MOT1'den azdır. Ortama salgılanan organik asitlerden biri de TCA döngüsü organik asitlerinden süksinik asittir. Tüm oksijen aktarım koşullarında ortama aktarılması TCA döngünün iyi çalışmamasından dolayıdır. MOT1 ve MOT2 koşulları ortama aktarılan süksinik asit derişimi açısından karşılaştırıldığında; MOT1'de MOT2'den daha fazla derişimde salgılanması TCA döngüsünün daha az etkinlikte çalıştığını ve hGH'nin yapısında

bulunan ve hücre sentezi için kullanılan amino asitlerin üretiminin etkilendiğinin göstermektedir. Üretim ortamına yüksek derişimde salgılanan diğeri bir organik asit glukonik asittir. Orta oksijen aktarım koşulunda glukonik asit derişimi karıştırma hızının artmasıyla azalmış ve $Q_o/V_R = 0.5$ vvm, $N = 700$ dk⁻¹ oksijen aktarım koşulunda 0.47 kg/m³ derişimde en yüksek değerine ulaşmıştır (Şekil 4.42). Süreli yayın literatüründe hGH üretiminde yan-ürün olarak amino ve organik asitlerin incelendiği bir çalışma bulunmamaktadır.

Oksijen aktarım karakteristikleri

hGH üretimi için farklı oksijen aktarım koşullarında sıvı faz hacımsal kütle aktarım katsayısı K_{La} ve oksijen tüketim hızı $-r_o$ dinamik yöntem ile deneysel olarak belirlenmiştir. Dört oksijen aktarım koşulundaki hücre ve hGH derişim profilleri dikkate alındığında biyoproses beş periyoda ayrılmıştır. İncelenen koşullardan $Q_o/V_R = 0.5$ vvm hava giriş hızında $N = 500$ dk⁻¹ karıştırma hızında $t > 0.5$ st kalma süresinde biyoproses ortamına gönderilen oksijenin mikroorganizma tarafından tamamına yakınının tüketilmesi nedeniyle sıvı faz hacımsal kütle aktarım katsayısı ve oksijen tüketim hızı Periyot II, III, IV ve V'te belirlenememiştir. Ortama $t = 4$ st'te eklenen proteaz inhibitörü oksijen tüketimini dolayısıyla ortamdaki çözünmüş oksijen derişimini etkilemiştir. Genel olarak K_{La} kalma süresiyle artmıştır ve MOT1, MOT2 ve HOT koşullarında en yüksek değerine $K_{La} = 0.018$ s⁻¹'e, $t = 7.0$ st'te MOT2'de ulaşılmıştır. Her periyottaki hız kısıtlayıcı basamağı belirleyebilmek için OD ve OTR_{max} değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 4.8). Sabit hava giriş hızında beklendiği gibi oksijen tüketim hızı önce artmakta sonra azalmaktadır. Oksijen tüketim hızındaki artış $t = 4$ st'te proteaz inhibitörü eklenmesinden etkilenmiştir. Tüm oksijen aktarım koşullarında oksijen tüketim hızı ilk saatlerde arttıktan sonra kalma süresiyle azalmış ve oksijen aktarım koşullarına bağlı olarak en yüksek değerine ($-r_o = 1.6$ mol m⁻³ s⁻¹) MOT2 koşulunda Periyot II'de ($t = 7.0$ st'te) ulaşmıştır.

Kimyasal tepkimeli kütle aktarım hızının maksimum fiziksel kütle aktarım hızına oranı olarak tanımlanan artma faktörü $E (=K_{La}/K_{La_0})$, incelenen farklı oksijen aktarım koşullarında çoğunlukla yavaş tepkimeler için beklendiği gibi bir mertebesinde; kalma

süresi ile değişimi ise kütle aktarım katsayısının değişimine paralel ve oksijen tüketim hızının artmasıyla da artacak şekilde olmaktadır. Artma faktörü (E) değeri MOT2 ve HOT'un Periyot V'i dışında 1.0-2.3 arasında değişmiştir. Bu durum, biyoreaktörde gerçekleşen oksijen tüketim hızının fiziksel kütle aktarım hızında artmaya neden olduğunu göstermektedir. Boyutları film tabakası mertebesinde olan mikroorganizma partikülleri de kimyasal tepkimeli kütle aktarım hızının fiziksel kütle aktarım hızından büyük olmasına neden olabilmektedir (Beenackers 1993). MOT2 ve HOT'da Periyot V'te, $E < 1$ bulunmasının nedeni üretim ortamının biyoproses sürecinde reolojik özelliklerinin değişiminden ve K_{La} 'nın bu nedenle düşmesindedir.

Maksimum tepkime hızının maksimum kütle aktarım hızına oranı olan Damköhler sayısı (Da) ve oksijen tüketim hızının maksimum oksijen aktarım hızına oranı olan etkinlik sayısının (η) kalma süresi ile değişimi Çizelge 4.10'de verilmiştir. Biyoproses Periyot I'de biyokimyasal reaksiyon kısıtlanmalı ($Da < 1$), Periyot II'de kütle aktarım kısıtlaması başlamaktadır ($Da \gg 1$). En yüksek Da değeri MOT1 ve HOT koşullarında Periyot II'de bulunmuştur. MOT2 koşulundaki Periyot III'ün Da değeri daha düşüktür. MOT1, MOT2 ve HOT koşullarında Periyot IV'de hem oksijen hem de biyokimyasal reaksiyon kısıtlaması etkilidir. LOT koşulunda prosesin diğer kalma sürelerinde Damköhler sayısı ve etkinlik faktörünün hesaplanamamasının nedeni ortamdaki çözünmüş oksijen değerinin çok düşük olmasından dolayı oksijen tüketim hızının ölçülememesidir. Etkinlik sayısı biyoproses süresince azalmaktadır ve değeri 1.0'den düşüktür. Bu da *r-B.subtilis* hücrelerinin kullanabilecekleri oksijenden daha azının tükettiklerini göstermektedir.

hGH üretim prosesinde farklı oksijen aktarım koşullarında gerçekleştirilen deney verileri kullanılarak sırasıyla Denklem (2.4), (2.5), (2.6), (E.5) ve (E.6) ile tüketilen substrat başına üretilen hücre ve hGH verimi ($Y_{X/S}$, $Y_{P/S}$), tüketilen oksijen başına üretilen hGH verimi ($Y_{P/O}$) ve üretilen hücre başına üretilen hGH verimi ($Y_{P/X}$) hesaplanmıştır; sonuçlar Çizelge 4.9'da verilmiştir. Verim katsayıları her bir periyotta yer alan beş noktada ($t=3, 9, 12, 15, 21$ ve 27 st'te) hesaplanmıştır. Verim katsayıları proses süresince salınım göstermiştir ve en yüksek değerlerine $Y_{X/S}= 1.004 \text{ kg kg}^{-1}$ (Periyot IV'te) ve $Y_{P/S}=0.647 \text{ kg kg}^{-1}$ (Periyot V'te) MOT2 koşulunda ulaşılmıştır. Tüm

proses için toplam $Y_{X/S}$ verim katsayısı oksijen aktarımının artmasıyla artmıştır ve ulaşılan minimum ve maksimum değerler, sırasıyla LOT'ta 0.18 ve HOT'ta 0.28'dir. Genel olarak tüketilen oksijen başına hücre verimi kalma süresiyle artmıştır. Biyoproses süresince hücre derişimi ve spesifik çoğalma hızının değişimi de Çizelge 4.10'da verilmiştir. Maksimum spesifik çoğalma hızının en yüksek değerine $\mu_{max} = 0.94 \text{ st}^{-1}$ MOT1'de $t = 0.5 \text{ st}$ 'te, en düşük değerine ise $\mu_{max} = 0.87 \text{ st}^{-1}$ MOT2'de $t = 0.5 \text{ st}$ 'te ulaşılmıştır.

Araştırma grubumuzda *Bacillus* türü mikroorganizmalarla yapılan diğer araştırmalar (Çalık *et al.* 2000) için bulunan verim katsayıları ile hGH prosesi sonuçları merteye olarak uyumludur.

Üretilen hGH'nin aktif yapıda olup olmadığını tespit etmek için literatürdeki hGH araştırmalarında da kullanılmış olan güvenilir bir yöntem olan Western Blot ile gerçekleştirilmiştir. Poliklonal Rabbit Anti-Human Growth Hormone primer ve Horseradish Peroxidase Label Goat-Anti Rabbit IgG (H+L) sekonder antibodi'leri kullanarak gerçekleştirilen Western Blot analizi sonucunda hGH bandı gözlemlenmiştir. Bu sonuç doğala özdeş yapıda hGH hücre-dışı üretiminin gerçekleştiğini göstermiştir.

Metabolik akı analizi

Bu yüksek lisans çalışması hGH üretimiyle ilgili yapılmış olan ilk metabolik akı analizi çalışmasıdır. Çalık (1998) tarafından serin alkali proteaz üretimi için geliştirilen *Bacillus licheniformis* için 105 metabolit ve 147 tepkimeden oluşan matematik model, *Bacillus subtilis* için modifiye edilerek kullanılmıştır. LOT, MOT1, MOT2 ve HOT koşulları için metabolik yolizi analizi yapılmış ve kalma süresiyle metabolik yolizi tepkimelerinin hızlarının değişimi ve dağılımları belirlenmiştir. Hücre ve hGH derişim profilleri dikkate alınarak proses beş periyotta ayrılmıştır. Her bir periyotta yer alan $t=3, 9, 15, 21, 27 \text{ st}$ kalma sürelerinde analiz gerçekleştirilmiştir. Glukoz karbon katabolizmasına glikoliz yolizinden girmektedir. Glikoliz yolizi amino asitlerin ve hücre bileşenlerinin girdileri olan G6P, F6P, T3P, PG3 ve PEP üretimi için önemlidir.

Glikoliz yolizi tüm koşullarda gerçekteşmiştir. TCA dđngüsünün hızı hücrelerin enerji, dolayısıyla ATP gereksinimine bağlıdır; ATP üretiminde oksijen yürütücü kuvvet olarak görev yapmaktadır. Hücreler enerjiye gereksinim duydıklarında TCA dđngüsü tamamlanmakta; İcit, α KG'e oksidatif olarak dekarboksile olmaktadır. Hücreler enerjiye gereksinim duymuyorlar ise gliksolat şöntü aktif olarak çalışmakta; İcit, Suc ve Glx'a dđnüşmektedir. LOT'ta Periyot IV'te, MOT'ta Periyot III'te, MOT2'de Periyot II ve IV'te, HOT'ta Periyot II ve III'te sadece TCA dđngüsü; MOT2'de Periyot V'te sadece gliksolat şöntünde; LOT'ta Periyot I ve III'te, MOT1'de Periyot II'de, MOT2'de Periyot I ve III'te ve HOT'ta Periyot IV ve V'te ise hem TCA dđngüsü hem de gliksolat şöntü aktiftir. Karbon kaynağı olarak glukoz kullanılmasıyla kalma süresiyle ATP üretim hızı önce artmış sonra azalmış ve en son olarak tekrar artmıştır. ATP üretim hızı oksijen aktarım koşullarındaki hücre ve hGH derişim profilleri ile orantılıdır. Hücre oluşum hızlarının kalma süresi ile değişimi hücre derişim profilleri ile benzerlik göstermiştir.

Tüm koşullarda aspartik asit, glutamik asit ve histidin grubu amino asit ana yolizlerine giden akılar genelde yüksektir; ancak alanin ve serin grubu amino asitlerine giden akılar genelde düşüktür. hGH yapısının % 3.7'sini alanin ve % 4.2'sini glisin oluşturması nedeniyle bu amino asitlerin oluşum tepkimeleri üretim ağıısından muhtemel bir darboğaz oluşturmaktadır. Genel olarak tüm periyotlarda aromatik amino asitlerin oluşum akıları düşüktür. hGH yapısının % 11.51'ni Tyr+Trp+Phe oluşturmaktadır. Dolayısıyla aromatik amino asit oluşum tepkimeleri üretim ağıısından muhtemel bir darboğaz oluşturmaktadır. Toplam aromatik amino asit yolizindeki E4P+PEP'ten DAHP oluş (R70) akısının arttırılabilmesi için bu tepkimeyi katalizleyen DAHP sentetaz enzimini kodlayan *aroA* geni ile serin grubu amino asitlerden Gly oluş (R51) tepkimesini katalizleyen enzimi kodlayan geninin birleştirilmesi sonucunda oluşturulacak ikili gen geliştirilen r-pMK4 plasmidine klonlanarak bu darboğaz aşılabilir.

Metabolik yolizi analizi sonucunda hGH verim ve seğıimliliğinin arttırılabilmesi için hız kısıtlayıcı basamakların (Ala, Gly, Tyr ve Trp üretimi) doğruluğu ispatlandıktan sonra

uygun bir moleküler tasarımın gerçekleşmesi gerekmektedir. Kompleks ortam tasarımı ile hGH verim ve seçimliliğine etkilerinin incelenmesi gerekmektedir.

r-B.subtilis ile hGH üretiminde oksijen aktarım etkilerinin incelendiği, yan-ürün dağılımlarının, verim katsayılarının ve metabolik yolizi akılarının belirlendiği bir çalışma bulunmamaktadır. Bu araştırma terapatik protein üretimi ile ilgili metabolik yolizi mühendisliğinin kullanıldığı ilk çalışmadır. Endüstriyel bir enzim olan serin alkali proteaz üretiminde ilk defa metabolik akı analizi kullanılmıştır (Çalık *et al.* 1999).

5.4 Hibrit-gen *-pre(subC)::hGH* İçeren ve İçermeyen pMK4 Taşıyan *B. subtilis* ile hGH Üretim ve Biyoproses Karakteristiklerinin Kıyaslanması

hGH üretimi için pilot ölçek deneylerin sonucunda belirlenmiş olan en uygun oksijen aktarım koşulunda ($Q_o/V_R = 0.5 \text{vvm}$ ve $N=800 \text{ dk}^{-1}$) hibrit-genin hücre üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla *-pre(subC)::hGH::pMK4* ve *pMK4* plasmidli mikroorganizmalarla $V_R=0.55 \text{ dm}^3$, $C_{G_0}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH}_0=7.25$, $T=37^\circ\text{C}$ tepkime koşullarında deney gerçekleştirilmiştir.

Biyoproses süresince pH'nın kalma süresi ile değişimi (Şekil 4.45) incelendiğinde; her iki proses içinde ortam pH'nın proteaz inhibitörünün eklendiği zamana ($t=4 \text{ st}$) kadar hızlı ($t=0-4 \text{ st}$) sonra daha yavaş ($t=4-22 \text{ st}$) azaldığı ve bir minimum değere ulaştıktan sonra arttığı görülmektedir. pH değerindeki azalma amino asitlerin salgılandığı üstel çoğalma fazının sonuna kadar devam etmiştir. Hücreler durgunluk fazına geçince ortamdaki amino asitlerin hGH üretiminde kullanılması artmış olduğundan yani hGH üretimi arttığından ortam pH'ı artmaya başlamıştır. P1'deki hücre derişiminin P2'den fazla olması nedeniyle pH değerinde daha fazla azalma görülmüştür. Proses sonunda ortamın pH değeri P1 ve P2 koşullarında sırasıyla 6.68 ve 6.98 olarak kalmıştır. pH değerindeki azalma hücreden ortama H^+ iyonunun taşındığını göstermektedir.

Çözünmüş oksijen derişiminin zamanla değişimi incelendiğinde; P2 prosesinde $t=18 \text{ st}$ 'e kadar belli bir değerde kaldıktan sonra arttığı ve proses sonuna dek bu değerde kaldığı, hibrit gen içeren P1 prosesinde ise çözünmüş oksijen derişimi $t=18 \text{ st}$ 'e kadar

$C_o = 0.12-0.064$ mmol/l aralığında kaldıktan sonra sifıra çok yaklaştığı ve üstel çoğalma fazının bitmesiyle artarak proses sonuna dek bu değerde kaldığı görülmüştür. P1 ve P2'nin hücre çoğalmaları karşılaştırıldığında; P1'de ikili çoğalma fazlarında çözünmüş oksijen derişiminin daha düşük olması hücre çoğalması ve hGH üretimi için oksijen ihtiyacının yüksek olduğunu göstermiştir.

Şekil 4.46 incelendiğinde P2'de hücrenin üstel çoğalma fazını daha erken ($t=12$ st'te) tamamladığı ve hücre derişiminin ($C_x = 1.2$ kg m⁻³) daha düşük olduğu görülmüştür. Bu sonuç hibrit genin hücre çoğalmasını arttırdığı fakat proses süresini uzattığını göstermiştir. Biyoproses sonunda P2 prosesinde glukozun % 85'i tüketilmiştir. Üstel çoğalma fazında glukoz tüketimi artmış, duraklama fazında ise azalmıştır. Hibrit gen içeren pMK4 ile üretimde ikili çoğalma görülmekte ve glukoz tüketimi de buna paralel olarak artmıştır.

Biyoproses süresince ortama salgılanan amino asitler serin, lözin, izolözin, glisin ve fenilalanindir. P2 prosesinde ortamda en yüksek derişimde bulunan amino asit fenilalanin iken P1'te lözindir. Genel olarak P2'deki amino asitlerin derişimleri daha düşüktür. Hücre derişimleri de dikkate alındığında P1 prosesinde amino asit derişimlerindeki azalma ürün üretiminin gerçekleştiğini göstermektedir. P2'de üretim ortamına organik asitlerden glukonik ve süksinik asit salgılanmıştır. P2 prosesinde salgılanan süksinik asit derişiminin P1'den fazla olması nedeniyle TCA döngüsünün etkinliği daha da azdır. Hibrit gen ortama aktarılan toplam organik asit derişimleri incelendiğinde (Çizelge 4.13); prosesin farklı evrelerinde farklı durumların gözlendiği fakat hücre çoğalmaları dikkate alındığında genelde hibrit genin bulunduğu P2 prosesinde ortama daha fazla miktarlarda organik asit aktarıldığı; en yüksek toplam organik asit derişimi $t = 15$ st'te $C_{OA} = 1.04$ kg/m³'e olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.14 incelendiğinde sıvı tarafı kütle aktarım katsayısı K_{La} 'nın her iki proseste da Periyot I'de arttığı görülmüştür. Maksimum $K_{La} = 0.028$ s⁻¹ değerine P2'deki Periyot I'de ulaşılmıştır. Da sayısı sadece Periyot I'de hesaplanabilmiştir ve bu periyotta proses biyoreaksiyon kısıtlamalıdır ($Da \ll 1$). Prosesin diğer kalma sürelerinde Da sayısı ve etkinlik faktörünün hesaplanamamasının nedeni hücrenin kısa sürede üstel çoğalma

fazını tamamlayıp durgunluk fazına geçmesinden dolayı tüketilen oksijen başına hücre veriminin bulunamamasıdır. P2’de Periyot I’de etkinlik değeri 1.0 olarak bulunmuştur. Çözünmüş oksijen profillerinde de görüldüğü gibi hibrit gen içeren plasmidle üretimde ortamda bulunan çözünmüş oksijen derişimi daha fazladır. t=4 st’te eklenen proteaz inhibitörünün r-pMK4 üzerindeki etkisi daha fazladır.

Metabolik Yolizi Mühendisliği Analizi

Bu yüksek lisans çalışması hibrit gen *-pre(subC)::hGH* içeren içermeyen pMK4 ile hGH üretimi konusunda yapılmış olan ilk Metabolik Yolizi Mühendisliği çalışmasıdır. Çalık (1998) tarafından serin alkali proteaz üretimi için geliştirilen *Bacillus licheniformis* için 105 metabolit ve 147 tepkimeden oluşan matematik model, *Bacillus subtilis* için modifiye edilerek kullanılmıştır.

P1 ve P2 koşulları için metabolik yolizi analizi yapılmış ve kalma süresiyle metabolik yolizi tepkimelerinin hızlarının değışimi ve dağılımları belirlenmiştir. Glikoliz yolizi amino asitlerin ve hücre bileşenlerinin girdileri olan G6P, F6P, T3P, PG3 ve PEP üretimi için önemlidir. Glikoliz yolizi iki koşulda da beklendiği gibi aktiftir.

Hücreler enerjiye gereksinim duyduklarında TCA döngüsü tamamlanmakta; Icit, α KG'e oksidatif olarak dekarboksile olmaktadır. Hücreler enerjiye gereksinim duymuyorlar ise gliksolat şöntü aktif olarak çalışmakta; Icit, Suc ve Glx'a dönüşmektedir. P1’de Periyot II ve IV’te, P2’de Periyot IV’te sadece TCA döngüsü; P1’de Periyot V’te ve P2’de Periyot II, III ve IV’te sadece gliksolat şöntü; P1’de Periyot I ve III’te ise hem TCA döngüsü hem de gliksolat şöntü aktiftir. Karbon kaynağı olarak glukoz kullanılmasıyla kalma süresiyle ATP üretim hızı önce artmış sonra azalmış ve en son olarak tekrar artmıştır. Hücre oluşum hızlarının kalma süresi ile değışimi hücre derişim profilleri ile benzerlik göstermiştir. Organik asit profillerinden de görüldüğü gibi TCA döngüsünde tepkimeler P2’de Periyot I,II ve III’te Mal oluşumuna, Periyot V ise Suc oluşumuna kadardır. P1’de ise ilk dört periyotta TCA tamamlanıyor, Periyot V’te ise Suc oluşum tepkimesine kadar tepkimeler gerçekleşiyor. P1’de TCA’da Suc oluş tepkime akısı Fum oluş akısından daha fazladır.

P1'de P2'ye göre aspartik asit, glutamik asit, serin ve histidin grubu amino asit yolizlerine giden akılar genelde daha yüksektir; ancak alanin ve aromatik amino asit grubuna giden akılar genelde düşüktür. Hibrit gen hücre derişimini ve aspartik asit , glutamik asit, serin, histidin tepkime akılarını artırmıştır.

5.5 Üretim Ortamına Eklenen Amino Asitlerin hGH Üretimine Etkileri

Beşinci aşamada belirlenen en iyi oksijen aktarım koşulunda üretim ortamına farklı zamanlarda ($t_e = 0$ ve 24 st'te) $C = 2.5$ mM derişimde eklenen serin, aspartik asit, lözin+valin ve glutamik asitin hGH üretimine etkisi incelenmiştir.

$t_e = 0$ ve 24 st'te amino asit eklenen ortamlarla referans ortama benzer pH ve çözünmüş oksijen derişim profilleri elde edilmiştir. Biyoproses süresince minimum pH değerine aspartik asitli, lözin+valinli ve referans ortamlarda için $t = 22$ st'te (sırasıyla pH=6.36, 6.54 ve 6.6); glutamik asitlide $t = 20$ st'te (pH=6.54) ve serin içeren üretim ortamında ise $t = 24.5$ st'te (pH=6.53) ulaşılmıştır. $t_e = 24$ st'te eklemenin gerçekleştirildiği proseslerde ortam pH'ı amino asit karışımı. lözin+valin eklenmesi ve referansa göre sırasıyla 7.03, 6.79 ve 6.6 olarak ölçülmüştür.

$t_e = 0$ ve 24 st'te eklenen amino asite göre elde edilen maksimum hücre derişimi sırasıyla $C_x = 2.3$ kg/m³ ($t_e = 0$ st'te glutamik asit eklenmesinde) ve $C_x = 2.1$ kg/m³ ($t_e = 0$ st'te amino asit karışımı eklenmesinde)'dir. $t_e = 0$ st'te eklenen serin ve lözin+valin amino asitleri hücre çoğalması üzerinde inhibisyon etkisi yapmıştır.

Bütün koşullardaki glukoz derişim profilleri incelendiğinde başlangıç glukoz derişiminin yaklaşık olarak % 85- 99'unun tüketildiği görülmüştür. hGH derişimleri incelendiğinde; tüm koşulların hGH üretimini inhibe ettiği görülmüştür. $t_e = 0$ st'te serin, aspartik asit, lözin+valin, glutamik asitin eklenen koşullarda hGH üretiminde % 5.7, 34.28, 42.86 ve 48.43 kat azalma görülmüştür. hGH derişimi $t_e = 24$ st'te eklenen amino asit karışımı ve lözin+valine göre sırasıyla % 25.7 ve 31.4 kat azalmıştır. Ancak $t_e = 0$ st'te eklenen lözin+valinde ise % 42.8 kat azalma görülmüştür. Bu da $t_e = 0$ st'te eklenen

lözün+valinin inhibisyon etkisinin daha fazla olduğunu göstermiştir. Sonuç olarak en fazla ürün inhibisyonuna $t_e = 0$ st'te eklenen glutamik asit neden olmuştur. Şekil 4.62.b ve 4.62.c'den de görüldüğü gibi Periyot V'te serin eklenen ortamın r_p ve q_p 'si referanstan daha yüksektir. Diğer eklenen amino asitlerle kıyaslandığında da aynı sonuç elde edilmiştir.

$t_e=0$ ve 24 st'te amino asit eklenmesi sonucunda ortama fenilalanin, lözün, izolözün, glisin, serin ve amino asitleri salgılanmıştır. Tüm koşullarda süksinik asit salgılanması gerçekleşmiştir. TCA döngüsündeki organik asitlerden biri olan süksinik asit derişimindeki artış döngünün etkin çalışmadığını göstermektedir. Ortamlardaki derişimi yüksek olan diğer bir organik asitte glukonik asittir. Tüm koşullarda ortama salgılanan organik asit ve amino asit derişim profilleri salınım göstermiştir.

Metabolik Yolizi Mühendisliği Analizi

$t_e=0$ st'te $C_{Ser}=2.5$ mM derişiminde serin eklenmiş ortam referans ortam ile kıyaslandığında; hGH derişiminde % 5.7'lik azalma görülmüştür (Şekil 4.55.a). hGH üretim hızının kalma süresiyle değişimini gösteren Şekil 4.55.b incelendiğinde; serin eklenen ortamda hGH üretim hızı Periyot I-IV arasında daha az olmasına rağmen Periyot V'te ise daha fazladır. Şekil 4.55.c'den de görüldüğü gibi Periyot V'te q_p değeri serin eklenen ortamda daha yüksektir. Bu nedenle hücre-içi tepkime akılarının ayrıntılı olarak incelenebilmesi için bu koşulda metabolik akı analizi gerçekleştirilmiştir. Çalık (1998) tarafından serin alkali proteaz üretimi için geliştirilen *Bacillus licheniformis* için 105 metabolit ve 147 tepkimededen oluşan matematik model, *Bacillus subtilis* için modifiye edilerek kullanılmıştır. Diğer amino asitlerin eklendiği ortamlarda hGH üretim hızında artış gözlenmemiştir. Bu nedenle bu koşullar için metabolik akı analizi gerçekleştirilmemiştir.

Glikoliz yolizi amino asitlerin ve hücre bileşenlerinin girdileri olan G6P, F6P, T3P, PG3 ve PEP üretimi için önemlidir. Glikoliz yolizi iki koşulda da aktiftir. Pentoz fosfat yolizi için dallanma noktası olan R5P, Ser eklenende Periyot III, IV'te ve P1'de I, III'te sadece F6P'tan, Ser eklenende Periyot I'de ve P1'de Periyot V'te sadece G6P'den, Ser

eklenende Periyot II, V'te ve P1'de II, IV'te ise her ikisinden de üretilmiştir. Tüm koşullarda PFY aktiftir. TCA döngüsü sadece P1'deki Periyot V'te Suc oluş tepkimesine kadar gerçekleşmekte diğer koşullarda ise aktiftir. $t_e=0$ st'te serin eklenmesi sonucunda Periyot V'te TCA döngüsü aktif olmuştur. Glikolat şöntü P1'de Periyot II ve IV dışında aktiftir. Karbon kaynağı olarak glukoz kullanılmasıyla kalma süresiyle ATP üretim hızı salınım göstermiştir.

hGH üretim hızının arttığı Periyot V'te Ser eklenen koşuldaki serin grubu amino asitlerin ve lözin+ valin oluş akıları referansa göre artığı görülmüştür. Serin eklenen koşulda ilk dört periyotta glutamik asit, aspartik asit, serin- ve alanin- grubu, aromatik amino asit grubuna giden akıların daha yüksek olduğu görülmüş. hGH oluşum profillerinden de görüldüğü gibi referensta hGH derişimi daha yüksek olduğundan bu beklenen bir durumdur.

5.6 Sonuçlar

Bu yüksek lisans araştırma programı ile elde edilen sonuçlar toplu olarak aşağıda verilmiştir.

1. hGH'nin hücre-dışı üretilebilmesi için *Bacillus* hücre-dışı enzimi serin alkali proteaz (SAP) geninin (*subC*) *pre*- sinyal dizini hGH gen dizininin önüne entegre edilerek oluşturulan hibrit gen önce pUC19 *E. coli* plasmidine klonlanmış, sonra da pMK4 *E. coli*-*Bacillus* shuttle plasmide sub-klonlama yapılmış ve rekombinant DNA *-pre(subC)::hGH::pMK4* farklı *Bacillus* türlerine aktararak rekombinant *Bacillus subtilis* türleri elde edilmiştir.
2. Üretim ortamına eklenen proteaz inhibitörü ve başlangıç glukozun derişimlerinin etkisi incelenmiş; En yüksek $C_{hGH}= 0.03 \text{ kg/m}^3$ hGH derişimine *Bacillus subtilis* BGSC-1A751 ile $C_{Go}= 8.0 \text{ kg/m}^3$ glukoz derişiminde ortama $7.44 \text{ } \mu\text{M}$ proteaz inhibitör derişiminde ulaşılmıştır.

3. Laboratuvar ölçekte bulunan en uygun koşullarda, $V_R=0.550 \text{ dm}^3$ hacımlı, mekanik karıştırılmalı, pH, sıcaklık, çözülmüş oksijen ve karıştırma hızı kontrollü pilot-ölçek kesikli biyoreaktörlerde farklı hava giriş ($Q_0/V_R= 0.5$ ve 0.7 vvm) ve karıştırma hızlarında ($N= 500, 700$ ve 800 dk^{-1}) oksijen aktarım etkileri yan ürün dağılımları ile birlikte incelenmiş, oksijen aktarımı ve biyoproses karakteristikleri belirlenmiştir. En yüksek hGH derişimine ($C_{hGH}= 0.07 \text{ kg/m}^3$) $Q_0/V_R= 0.5 \text{ vvm}$, $N= 800 \text{ dk}^{-1}$ koşulunda ulaşılmıştır. 143 tepkime ve 105 metabolitten oluşan hücre-içi tepkime sistemi için matematik model oluşturulmuş ve reaksiyon mühendisliği prensipleriyle tepkime akıları hesaplanarak sonuçlar yorumlanmıştır. Buna göre metabolik yolizi mühendisliği analizi ile hGH üretiminde yetersiz kısıtlayıcı basamağın aromatik amino asit (Tyr+Trp+Phe) ve Ala üretiminin hız kısıtlayıcı basamak oluşturabileceği bulunmuştur.
4. Belirlenen en iyi oksijen aktarım koşulunda hibrit gen içeren (*-pre(subC)::hGH::pMK4*) ve içermeyen (pMK4) plasmidli *Bacillus* BGSC-1A751 ile üretim deneyi gerçekleştirilerek *-pre(subC)::hGH* hibrit genin etkisi incelenmiştir. hGH'nin hücre çoğalmasını ve buna bağlı olarak glukoz tüketimini artırdığı görülmüştür. 149 tepkime ve 109 metabolitten oluşan hücre-içi tepkime sistemi için matematik model oluşturulmuş ve reaksiyon mühendisliği prensipleriyle tepkime akıları hesaplanarak sonuçlar yorumlanmıştır.
5. Belirlenen en iyi oksijen aktarım koşulunda üretim ortamına farklı zamanlarda ($t_e= 0$ ve 24 st'te) $C= 2.5 \text{ mM}$ derişimde eklenen serin, aspartik asit, lözin+ valin ve glutamik asitin üretime etkisi araştırılmış ve hGH derişimini sırasıyla $t_e= 0 \text{ st'te}$ % 6.1, 34.3, 42.4 ve 48.4, $t_e= 24 \text{ st'te}$ eklenen karışımları ve lözin+valinin ise % 25.7 ve 31.4 azalttığı bulunmuştur.

5.7 Hedeflenen Çalışma

1. Rekombinant hGH üretimine oksijen aktarımının etkileri incelendikten sonra iki basamaklı oksijen aktarım stratejisi önerilmiştir. Periyot I-III arasında düşük glukoz tüketimiyle yüksek hücre çoğalması ve düşük organik asit oluşumunun gerçekleştiği HOT koşulu, Periyot IV ve V'te ise hGH üretiminin yüksek ($Y_{P/X}$ ve $Y_{P/S}$ 'nin yüksek, ortama salgılanan amino asit derişimi düşük) olduğu MOT2 koşulunun uygulanması önerilmiştir.
2. Metabolik yolizi analizi sonucunda hGH verim ve seçimliliğinin artırılabilmesi için hız kısıtlayıcı basamakların (Ala, Gly, Tyr ve Trp üretimi) doğruluğu ispatlandıktan sonra uygun bir moleküler tasarımın gerçekleştirilmesi önerilmektedir.
3. Kompleks ortam tasarımı ile hGH verim ve seçimliliğine etkilerinin incelenmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Alba, 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.
- Erincin, H., 1998. Hidrojen İyonu Derişimi ve Kontrolunun Alkali Protease Üretimine Etkisinin Reaksiyon Mühendisliği Prensipleriyle İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara.
- 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., Baldrige, 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., Cantrill, 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-level 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.
- 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 andctor and extracellular production of human growth hormone from *Escherihia 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 Uniandrsity Press, Oxford.
- Nagarajan, V., 1993. Protein secretaion. 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 Yolizi Mühendisliği Teknikleriyle L-Fenilalanin Üretimi İçin Biyoproses Geliştirilmesi. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara.
- 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 $K_L a$ 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 yield production of human growth hormone in *Escherichia 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 yield 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 relatives: from genes to cells. ASM Press, Washington D.C.
- 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: Principles 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.
- 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.
- Watson, J.D., Gilman, M., Witkowski, J. and Zoller, M., 1992. *Recombinant DNA*. 2nd Edition, Scientific American Books, W.H. Freeman and Co.
- 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.

EKLER

- EK 1** Genetik Mühendisliği Araştırma Programında Kullanılan Çözeltilerin Bileşimi
- EK 2** Mikroorganizma Derişimi İçin Kalibrasyon Eğrisi
- EK 3** Glukoz Derişimi İçin Kalibrasyon Eğrisi
- EK 4** Glukoz Analiz Çözeltisi
- EK 5** CE Enzim Analizi Örnek Elektroferogramı
- EK 6** hGH Derişim Kalibrasyonu
- EK 7** SDS-PAGE ve WESTERN-BLOTT yöntemlerinde kullanılan çözeltileri
- EK 8** Serin Alkali Proteaz (SAP) Aktivitesi Kalibrasyonu
- EK 9** Dinamik Yöntem ile Sıvı Faz Kütle Aktarım Katsayısı ve Mikroorganizma Oksijen Tüketim Hızının Belirlenmesi
- EK 10** Primerlerin Tasarımı
- EK 11** Araştırma Programında Kullanılmış Olan Marker'lar
- EK 12** GAMS Paket Programı ile MYM Analizi İçin Matematik Modelin Çözümünde Kullanılan Program

EK 1 Genetik Mühendisliği Araştırma Programında Kullanılan Çözeltilerin Bileşimi

LB

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

LBA

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

ÇÖZELTİ I

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

ÇÖZELTİ II

NaOH	0.2 N
SDS	1%

ÇÖZELTİ III

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

SET

NaCl	75 mM
EDTA	25 mM

10X TBE

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

EK 1 Genetik Mühendisliği Araştırma Programında Kullanılan Çözeltilerin Bileşimi (devam)

TSE

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

ÇÖZELTİ A

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

ÇÖZELTİ B

SDS	1% (w/v)
NaOH	0.2 M

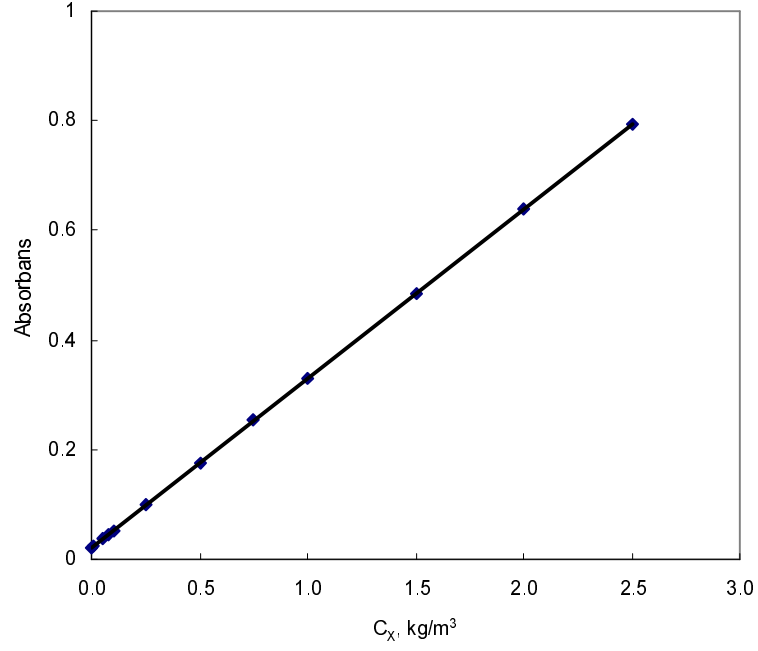
ÇÖZELTİ C

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

10X TE

Tris-HCl	0.1 M
EDTA pH=7.5	0.01 M

EK 2 Mikroorganizma Derişimi İçin Kalibrasyon Eğrisi

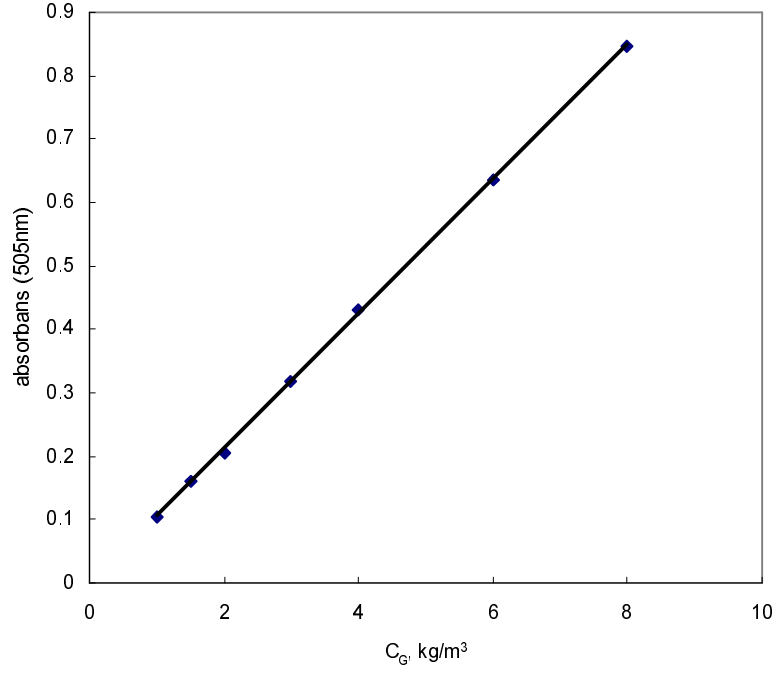


Şekil 1 Mikroorganizma kalibrasyon eğrisi

Kalibrasyon doğrusunun eğimi, $m=0.309 \text{ kg/m}^3$

$$C_x (\text{kg/m}^3) = \frac{\text{Abs}-0.0223}{1.8538} \times (\text{SO})$$

EK 3 Glukoz Derişimi İçin Kalibrasyon Eğrisi



şekil 1 Glukoz kalibrasyon eğrisi

Kalibrasyon doğrusunun eğimi, $m=0.1061 \text{ kg/m}^3$

EK 4 Glukoz Analiz Çözeltisi

Analiz Çözeltisinin Hazırlanması

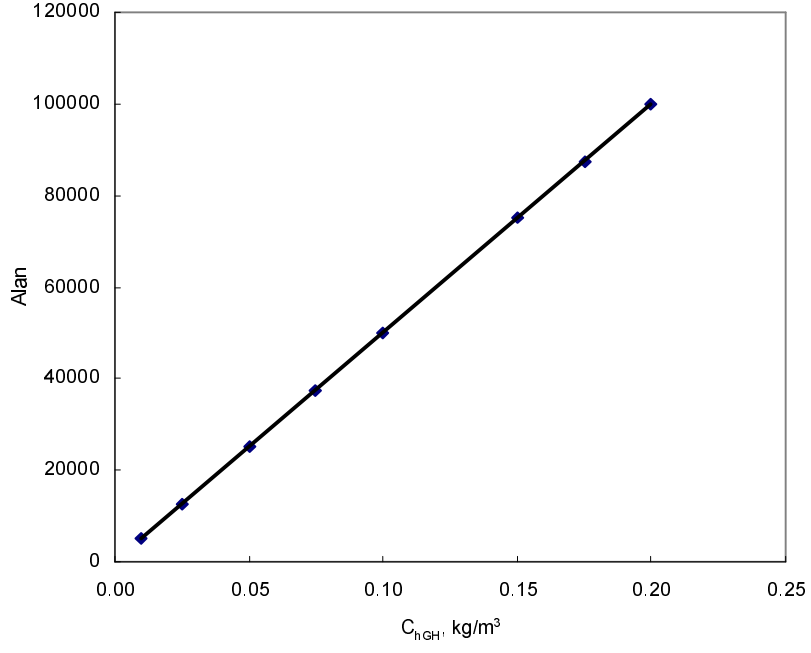
1. Glukoz oksidaz (900U), peroksidaz (500U) ve 4-aminoantipirin (10mM) içeren karışım son hacmi 100 ml olacak şekilde fosfat tamponu (150 mM, pH=7.5) veya fenol (4mM) ile tamamlanır.
2. Hazırlanan çözelti 1 dk. Karıştırılır.

Glukoz Standart Çözeltisinin Hazırlanması

1. 10 ml 10 kg/m³ derişiminde stok glukoz çözeltisi hazırlanır.
2. Bu çözeltiden 0.5, 1, 1.5, 2, 4, 6 ve 8 kg/m³ derişiminde standart glukoz çözeltileri hazırlanır.

EK 5 CE Enzim Analizi Örnek Elektroferogramı

EK 6 hGH Derişim Kalibrasyonu



Şekil 1 hGH derişim kalibrasyonu

Kalibrasyon doğrusunun eğimi, $m=2 \times 10^{-6} \text{ kg/m}^3$

EK 7 SDS-PAGE ve WESTERN-BLOTT yöntemlerinde kullanılan 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 7 SDS-PAGE ve WESTERN-BLOTT yöntemlerinde kullanılan çözeltileri

(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

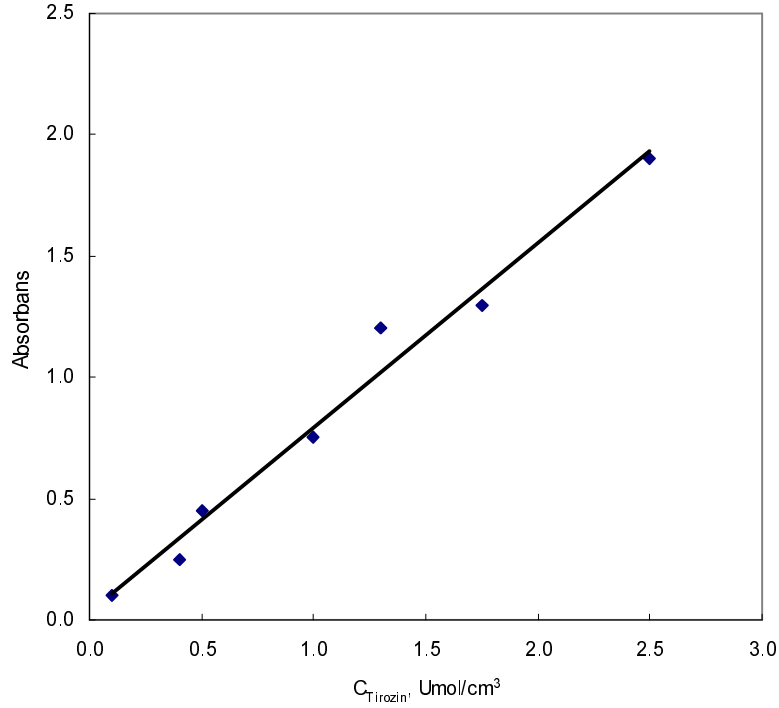
Blocking Çözeltisi: 0.5L

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

PBS-Tween 20 (PBST) 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 8 Serin Alkali Proteaz (SAP) Aktivitesi Kalibrasyonu



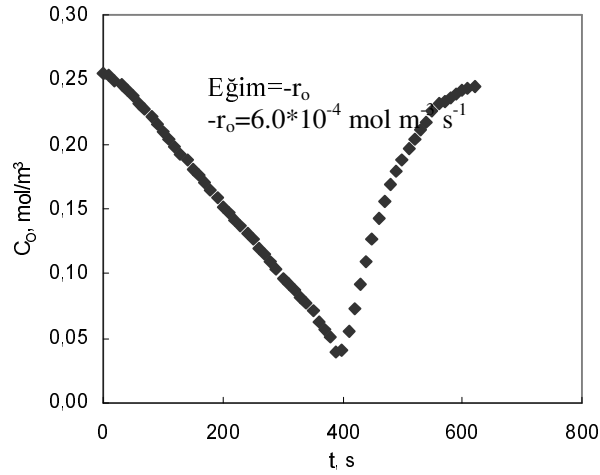
Şekil 1 SAP kalibrasyonu

SAP aktivitesi; enzimin kazein ile enzimatik hidrolizi sonunda açığa çıkan hidrolizatların absorbansının ölçülmesi ile belirlenmektedir. Enzimatik hidroliz sonunda açığa çıkan hidrolizatlar arasında 275 nm'de absorpsiyon yapan amino asit tirozindir. Bu nedenle farklı derişimlerde hazırlanan tirozin derişimlerine karşı 275 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri okunmuştur. Elde edilen verileri ve aktivite denklemini aşağıda verilmiştir.

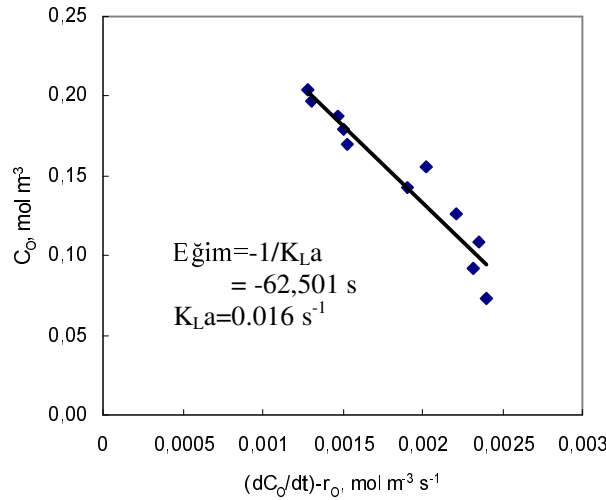
$$A = [(E_{\text{gim}} \times \text{Absorbans}) \times \text{Seyreltme faktörü}] \times (10^{-3} \text{ nmol}/1\mu\text{mol}) \times [1\text{U}/(4\text{nmol}/\text{dk})] \times (1/20\text{dk})$$

EK 9 Dinamik Yöntem ile Sıvı Faz Kütle Aktarım Katsayısı ve Mikroorganizma Oksijen Tüketim Hızının Belirlenmesi

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 $Q_o/V=0.5$ vvm ve $N=700$ dk⁻¹, $V_R=0.55$ dm³, $T=37^\circ\text{C}$ ve $t=0.5$ st koşullarında uygulanan Dinamik Yöntem sonuçları ile ilgili hesaplamalar gösterilmiştir.



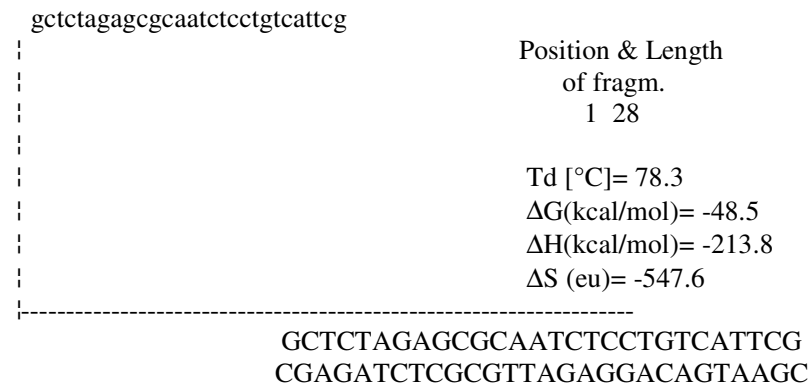
Şekil 1 Çözülmüş oksijen derişiminin t ile değişimi. $C_{G0}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH}_0=7.25$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=550 \text{ cm}^3$, $Q_o/V_R=0.5 \text{ vvm}$, $N=700 \text{ dk}^{-1}$, $t=0.5 \text{ st}$



Şekil 2 Sıvı faz hacımsal kütle aktarım katsayısının belirlenmesi. $C_{G0}=8 \text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH}_0=7.25$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=550 \text{ cm}^3$, $Q_o/V_R=0.5 \text{ vvm}$, $N=700 \text{ dk}^{-1}$, $t=0.5 \text{ st}$

EK 10 Primerlerin Tasarımı

1. *-pre(SubC)* İleri Primeri



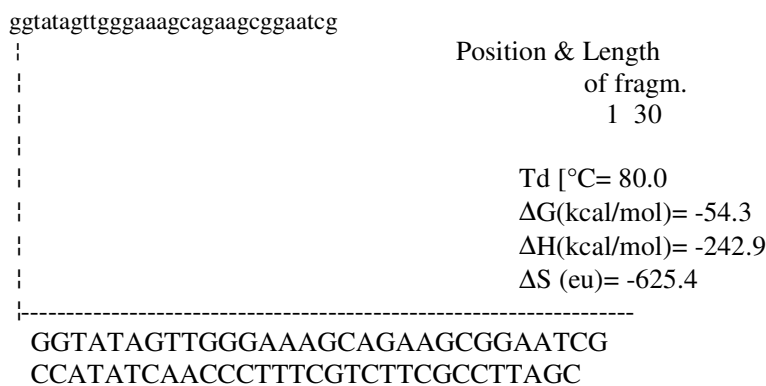
Dimer formation:



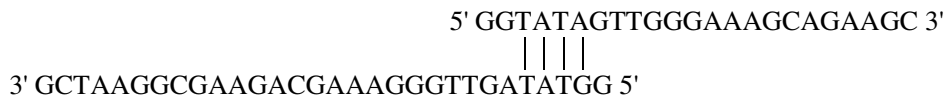
Self-complementarity:



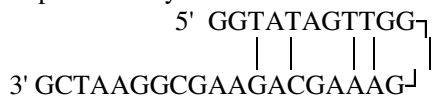
2. *-pre(SubC)* Geri Primeri



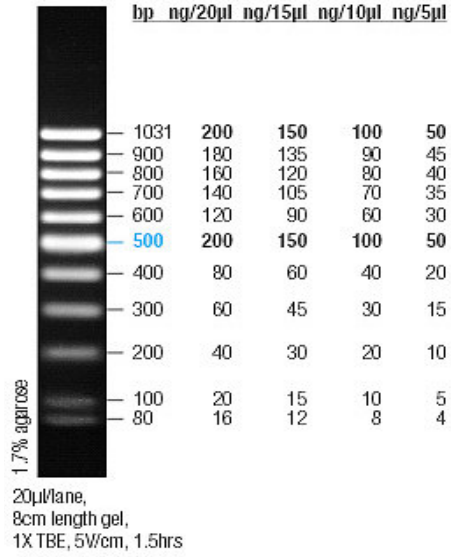
Dimer formation:



Self-complementarity:

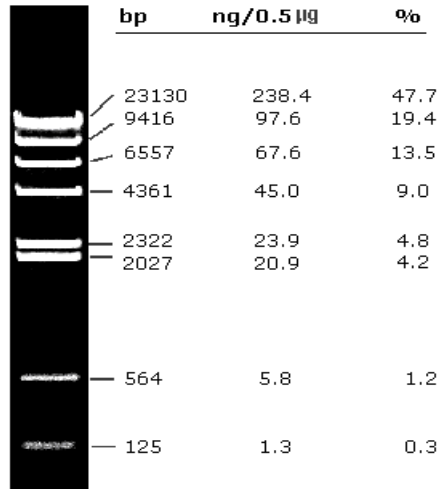


EK 11 Araştırma Programında Kullanılmış Olan Marker'lar



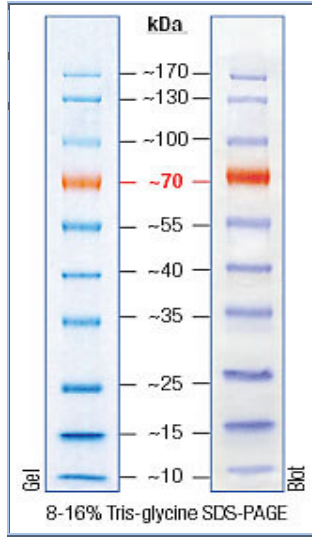
Şekil 1 DNA Ladder Low Range Marker'ındaki DNA büyüklükleri (bp)

Lambda DNA HindIII Marker

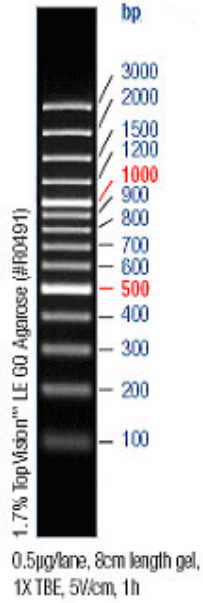


Şekil 2 λ DNA Hind III Marker'ındaki DNA büyüklükleri (bp)

EK 11 Araştırma Programında Kullanılmış Olan Marker'lar (devam)



Şekil 3 PageRuler™ Prestained Protein Ladder Marker'ındaki DNA büyüklükleri (bp)



Şekil 4 100 bp DNA Ladder Plus Marker'ındaki DNA büyüklükleri (bp)

**EK 12 GAMS Paket Programı ile MYM Analizi İçin Matematik Modelin
Çözümünde Kullanılan Program**

SET I / 1 * 5000/;

VARIABLES

J (I)

DD

Z;

POSITIVE VARIABLE J, DD ;

J.UP(I) = 350;

EQUATIONS

SS

PEP

Pyr

G6P

F6P

ATP

CO2

R5P

NADPH

T3P

E4P

PG3

NADH

Lac

AcCoA

Ac

Cit

GLOX

Mal

ICit

AKG

Succ

SuccCoA

FADH2

Fum

OA

DHF

Gly

NH3

MTHF

MeTHF

MetTHF

THF

Gln

Glu

CaP

ADP

Pi

**EK 12 GAMS Paket Programı ile MYM Analizi İçin Matematik Modelin Çözümünde
Kullanılan Program (devam)**

Chor
Phe
Tyr
PRPP
IGP
PPi
Ser
Trp
Asp
Asn
ASPSA
mDAP
Lys
HSer
Cys
Met
Thr
Ile
Pro
Orn
Citr
Arg
AMP
H2S
Ala
Kval
Val
Leu
His
PRAIC
IMP
GTP
GDP
GMP
UMP
UTP
CTP
UDP
CDP
dATP
dGTP
dCTP
dTTP
GL3P
C140
C141
PA
UDPNAG

**EK 12 GAMS Paket Programı ile MYM Analizi İçin Matematik Modelin Çözümünde
Kullanılan Program (devam)**

UDPNAM
CMPKDO
CDPEtN
UDPGlc
ADPHep
G1P
S7P
XYL5P
RIB5P
Gluc6P
Ldihy
Ltet
Proteaz
Glc
F10THF
Amy
IFN
NP
OX
Form
Bla
hGH
DGloc
Gloc

OBJECTIVE;

OBJECTIVE .. Z =E= DD;

SS .. J('179') =E= 0.01188;

Glc .. J('1')- J('804') =E= 3.322;

OA .. + J('550')- J('49') - J('50') + J('61') - J('75') =E= 0;

OX .. + J('802') - J('803') =E= 0.01521;

Form .. + J('800') - J('801') - J('802') + J('803') =E= 0;

PEP .. J('13') - J('14') - J('1') - J('26') - 2*J('91') -J('137') - J('172') =E= 0;

PYR .. - J('800') + J('801') - J('550') + J('14') + J('1') - J('40') + J('41') + J('47') + J('65') -
J('69') - 2*J('70') - J('78') - J('86') + J('90') + J('95') - J('29') + J('49') + J('604') +
J('608')=E= -0.0029;

G6P .. J('1') - J('2') + J('3') - J('4') + J('10') - J('9') =E= 0;

ATP .. + J('14') - J('181') - J('11') + J('22') - J('23')
+ J('42') - J('43') + J('56') - J('57') - J('73') - J('74') - J('76')

EK 12 GAMS Paket Programı ile MYM Analizi İçin Matematik Modelin Çözümünde Kullanılan Program (devam)

$$\begin{aligned}
 & - J('77') - J('85') - J('91') - J('98') - J('100') - J('101') - J('103') \\
 & - 4*J('104') - J('106') - J('107') - J('108') + J('109') \\
 & - J('112') - J('113') - J('115') - J('117') - J('118') \\
 & - J('121') - J('124') - J('126') + J('127') - 2*J('128') \\
 & - 6*J('133') - 6*J('134') - 7.2*J('135') - 2*J('145') \\
 & + 2* J('155') + J('156') - 2*J('165') - J('173') \\
 & - J('176') - 41.139*J('179') - 5.5*J('180') - 5.5*J('190') - 5.5*J('191') - J('607') - \\
 & 5.5*J('700') - 5.5*J('900') =E= 0;
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{CO2 ..} & - J('802') + J('803') - J('550') + J('49') + J('8') + J('47') + J('53') \\
 & + J('55') + J('72') + J('83') + J('93') + J('94') + J('86') + J('95') \\
 & - J('104') + J('116') - J('145') - J('148') + J('184') - J('161') \\
 & + J('162') + J('173') + J('29') + J('602') + J('603') + J('611') + 2*J('612') =E= 0;
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{NADPH ..} & + J('306') + J('4') - J('97') + J('8') + J('47') + J('53') - J('70') - J('77') - J('80') - \\
 & J('84') - J('86') - J('91') - 2*J('100') - J('101') - J('132') - 12*J('133') - 11*J('134') \\
 & - 14*J('135') - J('137') - J('147') - J('149') + J('150') - 4*J('165') - J('112') - J('113') - \\
 & J('124') - J('128') - J('300') + J('301') - J('303') + J('602') - J('605') - J('610') =E= 0;
 \end{aligned}$$

$$\text{PG3 ..} - J('13') + J('22') - J('23') + J('26') - J('64') =E= 0;$$

$$\begin{aligned}
 \text{NADH ..} & + J('22') - J('23') - J('40') + J('41') - J('155') \\
 & + J('55') + J('61') + J('64') + J('72') + 2*J('74') \\
 & + J('94') + J('106') + J('116') - J('148') + J('184') + J('29') + J('300') - J('301') + 2*J('603') \\
 & + J('607') + J('609') + 3*J('612') + J('613') =E= 0;
 \end{aligned}$$

$$\text{Lac ..} J('40') - J('41') =E= -0.1174;$$

$$\begin{aligned}
 \text{AcCoA ..} & + J('800') - J('801') - J('50') - J('42') + J('43') - J('63') - J('68') - J('72') - J('101') - \\
 & 7*J('133') - 7*J('134') - 8.2*J('135') - J('169') + J('29') - J('90') - J('81') + J('603') \\
 & + 2* J('607') + J('609') + J('610') + J('611') + J('613') =E= 0;
 \end{aligned}$$

$$\text{Ac ..} J('42') - J('43') + J('68') + 2*J('90') + J('101') + J('81') =E= 0.0872;$$

$$\text{Cit..} J('50') - J('51') =E= 0;$$

$$\text{GLOX ..} J('62') - J('63') =E= 0;$$

$$\text{Mal ..} - J('47') + J('59') - J('61') + J('63') =E= 0.0441;$$

$$\text{ICit ..} J('51') - J('53') - J('62') =E= 0;$$

$$\begin{aligned}
 \text{AKG ..} & + J('53') - J('97') - J('55') + J('64') - J('65') + J('69') + J('71') + J('72') + J('74') + J('75') \\
 & + J('81') + J('86') + J('93') + J('94') + J('101') - J('602') - J('605') - J('603') - J('607') \\
 & - J('611') - J('612') =E= 0.0082;
 \end{aligned}$$

$$\text{Succ ..} J('56') - J('57') - J('58') + J('62') + J('611') =E= 0.244;$$

EK 12 GAMS Paket Programı ile MYM Analizi İçin Matematik Modelin Çözümünde Kullanılan Program (devam)

$$\text{SuccCoA} \dots J('55') - J('56') + J('57') - J('611') + J('612') + J('603') = E = 0;$$

$$\text{FADH2} \dots J('58') - J('156') + 2*J('603') + J('607') + J('612') + J('613') = E = 0;$$

$$\text{Fum} \dots J('58') - J('59') + J('103') + J('104') + J('114') + J('600') + J('611') = E = 0.0066;$$

$$\text{DHF} \dots - J('147') + J('128') = E = 0;$$

$$\text{Gly} \dots -8*J('900') - J('66') - J('67') - J('104') + J('148') - J('184') - 0.58*J('179') - 35*J('180') - 51*J('190') - 3*J('191') - 48*J('192') + J('609') - 16*J('700') = E = 0;$$

$$\text{NH3} \dots - J('97') - J('121') + J('86') + J('90') - J('98') - J('148') + J('184') + J('163') + J('600') + J('601') + J('602') + J('604') + J('608') - J('95') = E = 0;$$

$$\text{MTHF} \dots - J('90') + J('149') = E = 0;$$

$$\text{MeTHF} \dots - J('183') + J('150') + J('606') = E = 0;$$

$$\text{F10THF} \dots J('183') - J('104') - J('105') = E = 0;$$

$$\text{MetTHF} \dots J('66') - J('67') - J('128') - J('148') + J('184') - J('149') - J('150') = E = 0;$$

$$\text{THF} \dots - J('66') + J('67') + J('90') + J('104') + J('105') + J('147') + J('148') - J('184') - J('606') = E = 0;$$

$$\text{Gln} \dots -13*J('900') - J('74') - J('76') + J('98') - 2*J('104') - J('106') - J('145') - J('169') - 0.25*J('179') - 7*J('180') - 29*J('190') - 10*J('191') - 24*J('192') - J('605') - 8*J('700') = E = 0.0461;$$

$$\text{Glu} \dots J('306') + J('97') + J('106') + J('145') + J('169') - 0.25*J('179') - 5*J('180') - J('64') + J('65') - J('69') - J('71') - J('72') - J('75') + J('76') - J('81') - J('86') - J('93') - J('94') - J('98') - J('100') - 2*J('101') + 2*J('104') - 23*J('190') - 15*J('191') - 40*J('192') + 2*J('602') + 2*J('605') + J('606') + J('603') + J('607') + J('611') + J('612') - 21*J('700') - 14*J('900') = E = 0;$$

$$\text{CaP} \dots - J('102') - J('116') + J('145') = E = 0;$$

$$\text{ADP} \dots - J('14') + J('181') + J('11') - J('22') + J('23') - J('42') + J('43') - J('56') + J('57') + J('77') + J('85') + J('91') + J('98') + J('100') + J('101') + 4*J('104') + J('107') + J('108') - J('109') + J('113') + 2*J('115') + J('117') + J('118') + J('121') + J('124') + J('126') - J('127') + 2*J('128') + 6*J('133') + 6*J('134') + 7.2*J('135') + 2*J('145') - 2*J('155') - J('156') + J('165') + J('173') + 41.139*J('179') + 5.5*J('180') + 5.5*J('190') + 5.5*J('191') + J('607') + 5.5*J('700') + 5.5*J('900') = E = 0;$$

$$\text{Pi} \dots J('64') + J('181') - J('22') + J('23') - J('42') + J('43') - J('56') + J('57') + J('74') + J('77') + J('85') + 4*J('91') + J('98') + J('100') + J('101') + J('102') + 4*J('104') + J('114') + J('116') + J('121') + 6*J('133') + 6*J('134') + 7.2*J('135') + J('145') - 2*J('155') - J('156') + J('167') - J('168') + J('165') + 2*J('166') + J('137') + 2*J('172') + 41.139*J('179') + 5.5*J('180') + 5.5*J('190') + 5.5*J('191') + J('12') + J('607') + 5.5*J('700') = E = 0;$$

**EK 12 GAMS Paket Programı ile MYM Analizi İçin Matematik Modelin Çözümünde
Kullanılan Program (devam)**

$$\text{Chor} \dots J('91') - J('93') - J('94') - J('95') =E= 0;$$

$$\text{Phe} \dots J('93') - 0.17*J('179') - 4*J('180') - J('303') - 20*J('190') - 8*J('191') - 20*J('192') - 7*J('700') - 13*J('900') =E= 0.7055;$$

$$\text{Tyr} \dots J('94') - 0.13*J('179') - 13*J('180') + J('303') - 28*J('190') - 4*J('191') - 32*J('192') - J('611') - 6*J('700') - 8*J('900') =E= 0;$$

$$\text{PRPP} \dots J('73') - J('74') - J('104') - J('95') - J('116') =E= 0;$$

$$\text{IGP} \dots J('95') - J('96') =E= 0;$$

$$\text{PPi} \dots 2*J('74') + J('76') + J('95') + J('103') + J('104') + J('106') + J('116') + J('128') + J('136') + J('165') - J('166') + J('169') + J('172') + J('173') + J('176') =E= 0;$$

$$\text{Ser} \dots J('64') - J('66') + J('67') - J('68') - J('96') - J('173') - 0.377*J('179') - 32*J('180') - 55*J('190') - 13*J('191') - 43*J('192') - J('608') - 11*J('700') - 18*J('900') =E= 0.0461;$$

$$\text{Trp} \dots J('96') - 0.05*J('179') - 1*J('180') - 14*J('190') - 2*J('191') - 4*J('192') - J('610') - 3*J('700') - J('900') =E= 0;$$

$$\text{Asp} \dots J('75') - J('76') - J('77') - J('103') - J('104') - J('114') - J('116') - 0.22*J('179') - 9*J('180') - 44*J('190') - 11*J('191') - 30*J('192') - J('600') + J('601') - 23*J('700') - 11*J('900') =E= -0.000363;$$

$$\text{Asn} \dots J('76') - 0.22*J('179') - 18*J('180') - 54*J('190') - 16*J('191') - 23*J('192') - J('601') - 13*J('700') - 9*J('900') =E= 0;$$

$$\text{ASPSA} \dots J('77') - J('78') - J('84') =E= 0;$$

$$\text{mDAP} \dots J('81') - J('83') =E= 0;$$

$$\text{HSer} \dots J('84') - J('85') - J('90') =E= 0;$$

$$\text{Cys} \dots J('68') - J('90') - 0.09*J('179') - 1*J('190') - 5*J('191') - 1*J('192') - J('604') - 4*J('900') =E= 0;$$

$$\text{Met} \dots J('90') - 0.14*J('179') - 5*J('180') - 10*J('190') - 7*J('191') - 8*J('192') - 4*J('700') - 3*J('900') =E= 0;$$

$$\text{Thr} \dots J('85') - J('86') - 0.24*J('179') - 20*J('180') - 45*J('190') - 9*J('191') - 35*J('192') - J('609') - 23*J('700') - 10*J('900') =E= 0;$$

$$\text{Ile} \dots J('86') - 0.27*J('179') - 10*J('180') - 35*J('190') - 7*J('191') - 32*J('192') - J('603') - 14*J('700') - 8*J('900') =E= 0;$$

$$\text{Pro} \dots J('100') - 0.2*J('179') - 10*J('180') - J('306') - 23*J('190') - 6*J('191') - 17*J('192') - 11*J('700') - 8*J('900') =E= 0;$$

**EK 12 GAMS Paket Programı ile MYM Analizi İçin Matematik Modelin Çözümünde
Kullanılan Program (devam)**

$$\text{Orn} \dots J('101') - J('102') - 0.0593 * J('179') = E = 0;$$

$$\text{Citr} \dots J('102') - J('103') = E = 0;$$

$$\text{Arg} \dots J('103') - 0.28 * J('179') - 4 * J('180') - 24 * J('190') - 12 * J('191') - 14 * J('192') - J('602') - 14 * J('700') - 11 * J('900') = E = 0;$$

$$\text{AMP} \dots J('73') + J('76') + J('103') + J('106') + J('114') - J('115') + J('165') = E = 0;$$

$$\text{H2S} \dots - J('68') - J('90') + J('165') + J('604') = E = 0;$$

$$\text{Ala} \dots - J('65') + J('69') - 0.5352 * J('179') - 40 * J('180') - 49 * J('190') - 10 * J('191') - 47 * J('192') + J('610') - 24 * J('700') - 7 * J('900') = E = 0;$$

$$\text{Kval} \dots J('70') - J('71') - J('72') = E = 0;$$

$$\text{Val} \dots J('71') - 0.4 * J('179') - 31 * J('180') - 32 * J('190') - 6 * J('191') - 32 * J('192') - J('612') - 15 * J('700') - 7 * J('900') = E = 0;$$

$$\text{Leu} \dots J('72') - 0.42 * J('179') - 16 * J('180') - 36 * J('190') - 22 * J('191') - 33 * J('192') - J('607') - 27 * J('700') - 226 * J('900') = E = 0;$$

$$\text{His} \dots J('74') - 0.09 * J('179') - 5 * J('180') - 16 * J('190') - 3 * J('191') - 18 * J('192') - J('606') - 1 * J('700') - 3 * J('900') = E = 0;$$

$$\text{PRAIC} \dots J('74') + J('104') - J('105') = E = 0;$$

$$\text{IMP} \dots J('105') - J('106') - J('114') = E = 0;$$

$$\text{GTP} \dots - J('114') + J('108') - J('109') - 0.2 * J('179') = E = 0;$$

$$\text{GDP} \dots J('107') - J('108') + J('109') + J('114') - J('113') = E = 0;$$

$$\text{GMP} \dots J('106') - J('107') = E = 0;$$

$$\text{UMP} \dots J('116') - J('117') = E = 0;$$

$$\text{UTP} \dots J('118') - J('136') - J('121') - J('169') - 0.13 * J('179') = E = 0;$$

$$\text{CTP} \dots J('121') - J('127') + J('126') - J('172') - J('173') - 0.12 * J('179') = E = 0;$$

$$\text{UDP} \dots J('117') - J('118') - J('128') = E = 0;$$

$$\text{CDP} \dots J('127') - J('126') - J('124') = E = 0;$$

$$\text{dATP} \dots J('112') - 0.02 * J('179') = E = 0;$$

$$\text{dGTP} \dots J('113') - 0.02 * J('179') = E = 0;$$

**EK 12 GAMS Paket Programı ile MYM Analizi İçin Matematik Modelin Çözümünde
Kullanılan Program (devam)**

$$\text{dCTP} \dots J('124') - 0.02 * J('179') = E = 0;$$

$$\text{dTTP} \dots J('128') - 0.02 * J('179') = E = 0;$$

$$\text{Lys} \dots J('83') - 0.32 * J('179') - 9 * J('180') - 30 * J('190') - 8 * J('191') - 37 * J('192') - J('613') - 24 * J('700') - 9 * J('900') = E = 0;$$

$$\text{GL3P} \dots J('132') - 0.129 * J('179') = E = 0;$$

$$\text{C140} \dots J('133') - 0.0235 * J('179') = E = 0;$$

$$\text{C141} \dots J('134') - 0.0235 * J('179') = E = 0;$$

$$\text{PA} \dots J('135') - 0.259 * J('179') = E = 0;$$

$$\text{UDPNAG} \dots J('169') - J('137') - 0.0433 * J('179') = E = 0;$$

$$\text{UDPNAM} \dots J('137') - 0.0276 * J('179') = E = 0;$$

$$\text{CMPKDO} \dots J('172') - 0.0235 * J('179') = E = 0;$$

$$\text{CDPEtN} \dots J('173') - 0.0235 * J('179') = E = 0;$$

$$\text{UDPGLC} \dots J('136') - 0.0157 * J('179') = E = 0;$$

$$\text{ADPHep} \dots J('176') - 0.0235 * J('179') = E = 0;$$

$$\text{G1P} \dots J('2') - J('3') - J('136') - 0.154 * J('179') = E = 0;$$

$$\text{S7P} \dots - J('34') + J('35') + J('38') - J('39') - J('176') = E = 0;$$

$$\text{XYL5P} \dots - J('30') + J('31') + J('34') - J('35') + J('36') - J('37') = E = 0;$$

$$\text{F6P} \dots J('9') - J('10') - J('11') + J('12') - J('36') + J('37') - J('38') + J('39') - J('169') = E = 0;$$

$$\text{T3P} \dots + 2 * J('11') - 2 * J('12') - J('22') + J('23') - J('34') + J('35') - J('36') + J('37') + J('38') - J('39') + J('96') - J('132') = E = 0;$$

$$\text{RIB5P} \dots - J('32') + J('33') + J('34') - J('35') = E = 0;$$

$$\text{R5P} \dots + J('8') + J('30') - J('31') + J('32') - J('33') - J('73') - J('172') = E = 0;$$

$$\text{E4P} \dots + J('36') - J('37') - J('38') + J('39') - J('91') = E = 0;$$

$$\text{Gluc6P} \dots J('4') - J('8') = E = 0;$$

$$\text{Ldihy} \dots J('78') - J('80') = E = 0;$$

$$\text{Ltet} \dots J('80') - J('81') = E = 0;$$

**EK 12 GAMS Paket Programı ile MYM Analizi İçin Matematik Modelin Çözümünde
Kullanılan Program (devam)**

```
Proteaz .. J('180') =E= 0;  
Amy .. J('190') =E= 0;  
IFN .. J('191') =E= 0;  
NP .. J('192') =E= 0;  
Bla .. J('700') =E= 0;  
hGH .. J('900') -DD =E= 0.000883;  
DGloc.. J('804') - J('805') =E=0;  
Gloc.. J('805') =E=0.13;  
MODEL CATABOLIC /ALL/ ;  
OPTION LIMCOL = 5000;  
SOLVE CATABOLIC USING NLP MINIMIZING Z;
```

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Birgül ŞENTÜRK

Doğum Yeri: Varna

Doğum Tarihi: 17.05.1979

Medeni Hali: Bekar

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

- Lise: Yabancı Dil Ağırlıklı Çorlu Mimar Sinan Lisesi (1989)
- Lisans: Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi
Kimya Mühendisliği Bölümü (2003)
- Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı (2003-2006)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

- Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi,
Araştırmacı, 2003

Yayımlar (SCI ve diğer)

- 12th European Congress On Biotechnology, Kopenhag/Danimarka,
Poster Sunuş, 21-24 Ağustos 2005
- 14. Biyoteknoloji Kongresi, Eskişehir, Poster Sunuş, 31 Ağustos-2 Eylül 2005