



TÜRKİYE BİLİMSEL VE
TEKNİK ARAŞTIRMA KURUMU

THE SCIENTIFIC AND TECHNICAL
RESEARCH COUNCIL OF TURKEY

**SERİN ALKALİ PROTEAZ ÜRETİMİNDE
HÜCREİÇİ DARBOĞAZLARIN BELİRLENMESİ
VE PROSESİN GELİŞTİRİLMESİ**

2004-61

PROJE NO:MİSAG 176

**Makina Kimyasal Teknolojiler, Malzeme ve İmalat Sistemleri
Araştırma Grubu**

**Mechanical Engineering, Chemical Technologies, Material
Sciences and Manufacturing Systems Research Grant
Committee**

**SERİN ALKALİ PROTEAZ ÜRETİMİNDE
HÜCREİÇİ DARBOĞAZLARIN BELİRLENMESİ
VE PROSESİN GELİŞTİRİLMESİ**

2004-6L

PROJE NO:MİSAG 176

DOÇ.DR. PINAR ÇALIK

Mart 2001 - Mart 2003

ODTÜ Kimya
Müh. Bl.

$\delta = T - i$

$\delta = 1 - 62$

$R = 53$

AĞUSTOS 2003
ANKARA

İçindekiler

| | Sayfa |
|---|-------|
| Önsöz | i |
| İçindekiler Listesi | ii |
| Şekillerin Liste | iv |
| Tabloların Listeleri | vi |
| Simgeleme | vii |
| Öz | viii |
| Abstract | ix |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. GELİŞME | 3 |
| 2.1. Materyal ve Metot | 3 |
| 2.1.1. Kullanılan bakteriler, çoğalma ortamı ve plasmidler | 3 |
| 2.1.2. DNA manipulasyonu | 3 |
| 2.1.3. SAP Katı ve Ön-sıvı Ortamları | 5 |
| 2.1.4. SAP Üretim Ortamı | 6 |
| 2.1.5 Ölçek Büyütme Adımları ve Biyoreaktör Sistemi | 6 |
| 2.1.6. Melasa Uygulanan Ön İşlem Prosesleri | 6 |
| 2.1.7. Analitik Yöntemler | 8 |
| 2.1.8. Metabolik Yolizi Mühendisliği Analizi İçin Optimizasyon Programı | 9 |
| 2.2. Bulgular | 10 |
| 2.2.1 SAP üretiminin artırılması için SAP sentezinden sorumlu genin klonlanması | 10 |
| 2.2.1.1. Primer tasarımı ve PCR ile gen derişimin artırılması | 10 |
| 2.2.1.2. PCR ile gen derişimi artırılması için kalıp seçimi | 10 |
| 2.2.1.3. SAP geninin <i>E. coli</i> plasmidlerine klonlanması, <i>E.coli</i> 'ye transformasyonu ve <i>E. coli</i> 'de derişiminin artırılması | 12 |
| 2.2.1.4. <i>subC</i> geninin <i>Bacillus-E.coli</i> shuttle vektörüne sub-klonlanması ve <i>E.coli</i> 'ye transformasyonu | 15 |
| 2.2.1.5. <i>subC</i> genini taşıyan <i>Bacillus-E.coli</i> shuttle-plasmidinin <i>E. coli</i> 'den izolasyonu ve <i>Bacillus licheniformis</i> 'e transformasyonu | 18 |
| 2.2.1.6. Rekombinant <i>Bacillus</i> türlerinin geliştirilmesi ve üretim performanslarının tanımlanmış ortamda kıyaslanması | 19 |
| 2.2.2. Hücreiçi Tepkime Hızlarının Bulunması | 22 |

Şekillerin Listesi

Şekil 1. Melasa uygulanan ön-işlem proseslerinin sırası ve simgeleri

Şekil 2. PCR ile *subC* geninin sentezlenmesi

Şekil 3. Restriksiyon enzimleriyle kesilmiş *SubC*+pRS316 'nın DNA parça büyüklüklerin jel elektroforez görüntüleri

Şekil 4. Rekombinant *Bacillus* türleriyle SAP üretiminde glukoz derişiminin zamanla değişimi

Şekil 5. Rekombinant *Bacillus* türleriyle SAP üretiminde mikroorganizma derişiminin zamanla değişimi

Şekil 6. Rekombinant *Bacillus* türleriyle SAP üretiminde SAP aktivitesinin zamanla değişimi

Şekil 7. Hücre derişiminin mikroorganizmaların optimum derişimlerinde zamanla değişimi

Şekil 8. SAP aktivitelerinin optimum glukoz derişimlerinde zamanla değişimi

Şekil 9. Optimum SAP aktivitelerindeki glukoz derişimlerinin zamanla değişimi

Şekil 10. *B.licheniformis*'in metabolik yolizi haritası

Şekil 11. Hücre derişiminin alanin grubu amino asit derişimleri ve zamanla değişimi

Şekil 12. Glukoz derişiminin alanin grubu amino asit derişimleri ve zamanla değişimi

Şekil 13. Amino asit derişimlerinin zamanla değişimi

Şekil 14. SAP aktivitesinin alanin grubu amino asit derişimleri ve zamanla değişimi

Şekil 15. Melas temelli kompleks ortamda rekombinant *Bacillus* türünün sukroz tüketimine etkisi

Şekil 16. Melas temelli kompleks ortamda rekombinant *Bacillus* türünün hücre derişiminin zamanla değişimi

Şekil 17. Melas temelli kompleks ortamda rekombinant *Bacillus* türünün SAP üretimine etkisi etkisi

Şekil 18. Melas temelli kompleks ortamda rekombinant *Bacillus amyloliquefaciens* ile SAP aktivitesinin sukroz derişimi ve zamanla değişimi

Şekil 19. Melas temelli kompleks ortamda rekombinant *Bacillus cereus* ile SAP aktivitesinin sukroz derişimi ve zamanla değişimi

Şekil 20. Melas temelli kompleks ortamda rekombinant *Bacillus licheniformis* ile SAP aktivitesinin sukroz derişimi ve zamanla değişimi

Şekil 21. Melas temelli kompleks ortamda rekombinant *Bacillus subtilis* ile SAP aktivitesinin sukroz derişimi ve zamanla değişimi

Şekil 22. Melas temelli kompleks ortamda rekombinant *Bacillus subtilis* ile sukroz derişiminin oksijen aktarım koşulları ve zamanla değişimi

Şekil 23. Melas temelli kompleks ortamda rekombinant *Bacillus subtilis* ile hücre derişiminin oksijen aktarım koşulları ve zamanla değişimi

Şekil 24. Melas temelli kompleks ortamda rekombinant *Bacillus subtilis* ile çözünmüş oksijen derişiminin oksijen aktarım koşulları ve zamanla değişimi

Şekil 25. Melas temelli kompleks ortamda rekombinant *Bacillus subtilis* ile pH'ın oksijen aktarım koşulları ve zamanla değişimi

Şekil 26. Melas temelli kompleks ortamda rekombinant *Bacillus subtilis* ile SAP aktivitesinin oksijen aktarım koşulları ve zamanla değişimi

Şekil 27. Soya temelli kompleks ortamda rekombinant *Bacillus subtilis* ile fosfat derişiminin SAP üretimine etkisi

Şekil 28. Soya temelli kompleks ortamda rekombinant *Bacillus subtilis* ile sukroz ve hücre derişimlerinin zamanla değişimi

Şekil 29. Soya temelli kompleks ortamda rekombinant *Bacillus subtilis* ile çözünmüş oksijen derişiminin ve pH'ın zamanla değişimi

Şekil 30. Soya temelli kompleks ortamda rekombinant *Bacillus subtilis* ile SAP aktivitesi ve toplam protein derişiminin zamanla değişimi

Tabloların Listesi:

Tablo 1. Rekombinant *Bacillus licheniformis* için katı çoğalma ortamı

Tablo 2. Rekombinant *Bacillus licheniformis* için ön-sıvı çoğalma ortamı

Tablo 3. SAP üretim prosesi için tasarlanan parametreler

Tablo 4. Rekombinant *Bacillus licheniformis* için üretim ortamı: Referans ortam

Tablo 5. Doğal ve rekombinant *Bacillus* türlerinin $C_{G0}=6 \text{ kg m}^{-3}$ başlangıç glukoz derişiminde maksimum hücre derişimleri, maksimum SAP aktiviteleri ve bu değerlere karşılık gelen proses zamanları, birim substrat başına hücre üretimleri, birim substrat başına SAP aktiviteleri

Tablo 6. Çoğalma ve SAP üretimi için optimum glukoz derişimlerinde ulaşılan maksimum hücre derişimleri, SAP aktiviteleri, $Y_{X/G}$, ve $Y_{A/G}$ değerleri

Tablo 7. Rekombinant *Bacillus* türlerinin Monod model sabitleri

Tablo 8. Hücre içi metabolitlerin belirlenmesi için yöntem geliştirilmesinde hücreye uygulanan ön işlemlerin etkisi

Tablo 9. Hücre içi metabolitlerin belirlenmesi için yöntem geliştirilmesinde örnek hacmi ve tepkime süresinin etkisi

Tablo 10. Hücre içi metabolitlerin belirlenmesi için yöntem geliştirilmesinde lizozim

Tablo 11. Alanin grubu amino asitlerin ekleme zamanının SAP üretimine etkisi

Tablo 12. Oksijen aktarım koşulları ve kısaltmaları

Tablo 13. Üretim ortamına eklenen inorganic azot kaynağı $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ SAP üretimine etkisi

Tablo 14. Başlangıç kazein derişiminin SAP üretimine etkisi

Tablo 15. Mg^{+2} bileşiklerinin ve CaCl_2 'ün SAP üretimine etkisi

Simgeleme

C_{AA} toplam amino asit derişimi, kg/m^3

C_G başlangıç glukoz derişimi, kg/m^3

C_S başlangıç sukroz derişimi, kg/m^3

C_{SAP} serin alkali proteaz derişimi, kg/m^3

C_X kuru hücre derişimi, kg/m^3

N çalkalama veya karıştırma hızı, dk^{-1}

Q_0/V_R birim sıvı hacmine birim dakikada beslenen sıvı hacmi, vvm

t işlem, çoğalma veya biyodönüşüm süresi, dk , st

T çoğalma veya biyodönüşüm sıcaklığı, $^{\circ}C$

v çapraz akış hızı, m/s

V reaksiyon karışımı; sistem hacmi, cm^3 , dm^3

μ spesifik çoğalma hızı, st^{-1}

μ_{maks} maksimum spesifik çoğalma hızı, st^{-1}

μ_{maks} maksimum spesifik çoğalma hızı, st^{-1}

μ_{maks} maksimum spesifik çoğalma hızı, st^{-1}

μ_{maks} maksimum spesifik çoğalma hızı, st^{-1}

μ_{maks} maksimum spesifik çoğalma hızı, st^{-1}

μ_{maks} maksimum spesifik çoğalma hızı, st^{-1}

A SAP aktivitesi

AA amino asitler

SAP serin alkali proteaz enzimi

μ_{maks} maksimum spesifik çoğalma hızı, st^{-1}

μ_{maks} maksimum spesifik çoğalma hızı, st^{-1}

μ_{maks} maksimum spesifik çoğalma hızı, st^{-1}

μ_{maks} maksimum spesifik çoğalma hızı, st^{-1}

μ_{maks} maksimum spesifik çoğalma hızı, st^{-1}

μ_{maks} maksimum spesifik çoğalma hızı, st^{-1}

μ_{maks} maksimum spesifik çoğalma hızı, st^{-1}

Öz

Mikrobiyal serin proteazlar içinde serin alkali proteazlar farmasötik sanayinde, gıda endüstrisinde (et, içecek, süt vd.), deri sanayinde, fotoğraf endüstrisinde (filmden gümüşün geri kazanımı), deterjan katkı maddesi olarak büyük öneme sahiptir. Beş alt-programdan oluşan projenin birinci evresinde SAP üretim potansiyelinin, verim ve seçimliliğin artırılması için üç alt programdan oluşan genetik mühendisliği (GM) araştırma programı ile *B.licheniformis*'de SAP üretiminden sorumlu gen *subC* önce pRS316 *E.coli-yeast* shuttle plasmide klonlanmış sonra da pHV1431 *E.coli-Bacillus* shuttle plasmide sub-klonlama yapılmış ve rekombinant DNA *subC*+pHV1431 dokuz *Bacillus* türü hücreye aktararak rekombinant mikroorganizmalar elde edilmiştir. Mikroorganizmaların performansı tanımlanmış ortamda kıyaslanmış ve SAP üretimi için en uygun mikroorganizmanın *B.licheniformis* pHV1431::*subC* olduğu bulunmuştur. İkinci alt-programda Metabolik yolizi mühendisliği (MYM) analizi ile hücreiçi tepkimeler stokiyometrik denklemleriyle birlikte araştırılarak 147 tepkimeden oluşan tepkime yolizleri belirlenmiş, 147 tepkimede yer alan 105 bileşik için kütle korunum denklemlerinden oluşan matematik model kurulmuş, ve rekombinant hücrelerin hücreiçi tepkime hızlarındaki değişimler incelenmiş ve üretim hızı açısından da en uygun konak hücrenin rekombinant *B.licheniformis* olduğu bulunmuştur. Üçüncü alt-programda hücreiçi metabolit derişimlerinin belirlenmesi için yöntem geliştirilmiş ve hücreiçi valin derişiminin SAP üretimini kısıtladığı bulunmuş; dördüncü alt-programda alanin grubu amino asitlerin SAP üretimine etkisi araştırılmıştır. Son alt-programda kompleks ortamda (melas temelli) rekombinant mikroorganizmaların üretim potansiyelleri kıyaslanmış; kompleks ortamda SAP üretimi için en uygun konak hücre *B.subtilis* pHV1431::*subC* olarak bulunmuş ve melas içeren ortamda oksijen aktarımının etkisi incelenmiştir. Son aşamada soya temelli ortam tasarımı yapılarak SAP üretim prosesi geliştirilmiştir.

Anahtar kelimeler: Serin alkali proteaz, metabolik yolizi mühendisliği, hız kısıtlayıcı bileşikler, rekombinant *Bacillus* türleri, kompleks ortam tasarımı

Abstract

The proteolytic enzymes are by far the most important groups of enzymes produced commercially. Due to the alkaline nature, serine alkaline proteases (SAP) are used in pharmaceutical, protein brewing, meat, dairy, photographic, leather, and detergent industries. In the first phase, for developing recombinant *Bacillus* strains, *subC* gene encoding SAP was amplified from the chromosomal DNA of the wild type *B.licheniformis* by using PCR technology. *subC* gene was first cloned in pRS316 *E.coli*-yeast shuttle plasmid, then sub-cloned to pHV1431 *E.coli*-*Bacillus* shuttle vector, and transferred into nine host *Bacillus* species. Thereafter, the influence of the host *Bacillus* species on recombinant SAP production on a defined medium was investigated; among *Bacillus* species overall SAP activity on substrate value was the highest for recombinant *B.licheniformis*. In the second phase, a mass flux-balance based stoichiometric model for *B.licheniformis* for SAP fermentation process has been set up. The model considers 147 reaction fluxes, and there are 105 metabolites that are assumed to be in pseudo-steady state. Thereafter, the variation in intracellular reaction rates of recombinant *Bacillus* species and r-*B.licheniformis* found to be suitable host for SAP production in a defined medium. In the third phase an experimental method was developed to determine the intracellular metabolite concentrations. In the fourth phase, due to the intracellular valine limitation effects of alanine group amino acids on SAP production were investigated and valine supply increased production considerably. In the last phase, in molasses based complex medium SAP production performance of the host *Bacillus* species were investigated and the highest enzyme activity was obtained with *B.subtilis* pHV1431::*subC*; thereafter effects of oxygen transfer conditions were investigated by r-*B.subtilis*. Lastly, complex medium was modified and a protein based complex medium was designed and production was optimised.

Key words: Serine alkaline protease, metabolic pathway engineering, controlling key intermediates, recombinant *Bacillus sp.*, complex medium design

1. GİRİŞ

Ticari önemi olan enzimlerin toplam üretiminin %60'ını proteazlar oluşturur; bunlar içinde bakteriyel proteazların üretimi yaklaşık 500 ton/yıl ve birim fiyatı ise yaklaşık 120 \$/kg'dır. Endüstriyel enzim üretiminin büyük kısmı Avrupa'da yapılmaktadır; üretim kapasitesi açısından önemli kuruluşlar sırasıyla Novo Industri A/S (Danimarka), Gist-brocades (Hollanda), Miles Laboratories (USA), ve Hansen (Danimarka)'dır (Frost ve Moss, 1987, Kalisz, 1988, Mark, 1978).

Proteolitik enzimler peptit bağlarını hidrolize eden enzimlerdir; katalizleme biçimine bağlı olarak peptidazlar ve proteazlar olmak üzere ikiye ayrılırlar. Peptidazlar ancak uç amino asitleri veya dipeptitleri uzaklaştırabildiğinden ikincil öneme sahiptir. Proteazlar ise fizikokimyasal ve katalitik özellikleri dikkate alındığında kompleks enzimlerdir. Proteazları sınıflandırmak ve sistematik olarak adlandırmak zor olduğundan, üretildiği kaynak ve katalitik mekanizma dikkate alınarak adlandırılırlar (Kalisz, 1988).

Proteazlar biyokatalitik mekanizmaları temel alınarak dört gruba ayrılırlar. Bunlar; serin proteazlar (E.C. 3.4.21), sistein (tiyol) proteazlar (E.C. 3.4.22), aspartik (karboksil) proteazlar (3.4.23), ve metallo (nötral) proteazlardır (E.C. 3.4.24), (Frost ve Moss, 1987).

Proteaz enzimleri hücre içi ve hücre dışı olarak üretilirler; bitki, hayvan ve mikroorganizma hücrelerinin metabolik ve regülasyon proseslerinde önemli işlevleri bulunur. Hücre dışı proteazlar hücrenin bulunduğu ortamdaki büyük polipeptit bağlarını -örneğin proteinleri- hidroliz tepkimesi ile parçalayarak hücre içine taşınabilecek küçük molekülü ürünlere dönüştürürler (Frost ve Moss, 1987).

Serin proteaz enzimlerinin aktif konumlarında serin grupları bulunmaktadır. Birçok substrata karşı spesifik olarak aktif olan serin proteaz enzimlerinin genellikle molekül ağırlıkları küçüktür (18.5-35 kDa), (Frost ve Moss, 1987, Kalisz, 1988).

Mikrobiyal serin proteazlar içinde serin alkali proteazlar gıda endüstrisinde (et, içecek, süt vd.), deri sanayinde, fotoğraf endüstrisinde (filmden gümüşün geri kazanımı), deterjan katkı maddesi olarak büyük öneme sahiptir. Yalnız deterjan endüstrisinde kullanılan miktar toplam mikrobiyal enzim üretiminin % 35'ini oluşturmaktadır (Kalisz, 1988 ; Mark, 1978).

Bacilli serin alkali proteaz üretebilen bakteri grubudur. *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, ve *Bacillus amyloliquefaciens* türleri serin alkali proteaz için potansiyel bakterilerdir. *Bacillus* türü

bakteri toksik olmayan hücre duvarına sahip, tek membranlı olan, ürettiği proteinleri (enzimleri) hücre dışına aktaran, patojen olmayan mikroorganizmalardır (Frost, 1987).

Alkali proteaz üretimine ilişkin olarak süreli yayın literatüründe farklı mikroorganizmalar için ortam tasarımı yapılmış ve yarı-tanımlanmış ortamlar verilmiştir. Fakat farklı yayınlarda aynı tür mikroorganizma için yapılan ortam tasarımında dahi üretim ortamı bileşen ve derişimleri birbirinden farklılık göstermektedir. Literatür, ortamda bulunan karbon ve azot kaynaklarının derişiminin yüksek olması durumunda proteaz üretiminin gerilediği (Priest, 1977; Hanlon vd., 1982; Frankena vd., 1986) konusunda hem fikir olmakla beraber, karbon ve azot kaynaklarının prosese etkilerinin detaylı olarak incelendiği sistematik bir çalışmaya rastlanmamaktadır. Alkali proteaz üretimine işletim türlerinin etkisi ile (Frankena vd., 1985; Kole vd, 1988; Moon ve Parulekar, 1991; Moon ve Parulekar, 1993) pH (Moon ve Parulekar, 1991; Çalık vd 2002, Çalık vd 2003a), çözünmüş oksijen (Frankena vd., 1986; Kole vd, 1988; Wright vd., 1992; Çalık vd 1998, Çalık vd 1999, Çalık vd 2000, Çalık vd 2003b), karbon (Hanlon vd., 1982; Frankena vd., 1986), azot (Hanlon vd., 1982; Frankena vd., 1986; Moon ve Parulekar, 1991), fosfat (Frankena vd., 1986) ve maya özütünün (Moon ve Parulekar, 1991), hücre derişimi (Frankena vd., 1986; Hanlon vd., 1981; Moon, ve Parulekar, 1991; Wright vd., 1992), proteaz aktivitesi (Hanlon vd., 1981; Hanlon vd., 1982; Frankena vd., 1986; Moon, S.H., ve Parulekar, S.J., 1991, Çalık vd 1998, Çalık vd 1999, Çalık vd 2002, Çalık vd 2003a,b), toplam protein derişimi (Wright vd., 1992) ve yan ürün olarak asetik asit (Moon ve Parulekar, 1991), ve etanol (Moon ve Parulekar, 1991) oluşumları üzerine etkileri detayları verilmeden bildirilmektedir. TÜBİTAK-MİSAG-61 projesi kapsamında (Çalık vd., 1998) doğal *B.licheniformis* kullanılarak SAP üretimi için ortam tasarımı yapılmış ve bioreaktör işletim parametrelerinin asetik asit ve etanol dışında- yan ürünlerin oluşum ve dağılımlarına, *Bacillus* türleri tarafından üretilen nötral proteaz, amilaz gibi diğer enzimler, amino asitler ve organik asitlerin oluşumuna etkisi incelemiştir (Çalık vd., 1998, 1999, 2000).

Serin alkali proteaz (SAP) enziminin, üretiminde verim ve seçimliliğin artırılması için biyoproses işletme parametreleri yanında, hücrede SAP gen (*subC*) derişimi, geninin transkripsiyonu (DNA'dan *subC*-mRNA sentezi), translasyonu (mRNA kodon olarak kullanılarak amino asitlerin polimerizasyonu ve SAP sentezi) ve hücre içinde üretilen SAP enziminin hücre dışına taşınımı önemlidir. Dolayısıyla, genetik mühendisliği teknikleri ile mikroorganizma geliştirilmesi ve üretiminin artırılabilmesi için metabolik yolizi mühendisliği teknikleri ile SAP sentezinde SAP'ın yapı taşları olan amino asitlerin sentezinde hücreiçinde darboğaz oluşturan tepkimelerin belirlenmesi önemlidir. Bu proje ile, SAP sentezinden sorumlu gen *subC* yüksek kopyalama sayısına sahip bir plasmide klonlanarak hücreiçi gen derişiminin artırılmış ve üretimde ilk kısıtlayıcı basamak aşıldıktan sonra SAP enziminin yapı taşları olan amino asitler ve derişimlerinin hücreiçi metabolit derişimlerine,

hücre içi akı dağılımlarına ve SAP üretimine etkisi incelenmiştir. Hız kısıtlaması yaratan bileşik(ler) belirlendikten sonra tanımlanmış ortamda bileşik(ler) ortama eklenerek bu basamak aşılmıştır. Bulgular ışığı altında melas ve soya temelli kompleks ortam tasarımı yapılmış ve oksijen aktarımının proses üzerine etkisi incelenmiş ve SAP üretim koşulları optimize edilmiştir.

2. GELİŞME

2.1. Materyal ve Metot

2.1.1. Kullanılan bakteriler, çoğalma ortamı ve plasmidler

a. *B.licheniformis* (DSM 1969) SAP geni için kaynak ve SAP geninin plasmide klonlanmasından sonra transforme edileceği konak hücrelerden biri olarak kullanılmıştır. *E. coli* JM 109 (Tet^r, Amp^r) ve *E. coli* XL-1-Blue (Tet^r, Amp^r) (Bullock et al. 1987) klonlama ve plasmidlerin transformasyonunda ve derişimlerinin artırılmasında konak hücre olarak kullanılmıştır.

b. Genetik mühendisliği araştırma programında hücreler (*B.licheniformis* ve *E.coli*) 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 250 dk⁻¹ karıştırma hızında çoğaltılmışlardır. *E. coli* 'nin plasmidi koruyabilmesi için ortama -plasmidin taşıdığı antibiyotik genine bağlı olarak- ampisilin (50µg/ml), veya tetrasiklin (10 µg/ml) eklenmiştir. Plasmid taşıyan *B.licheniformis* 7µg/ml kloramfenikol içeren ortamlarda çoğaltılmışlardır.

c. pUC19 (Yanisch-Perron vd. 1985), pRS316 (Sikorski ve Hieter 1989) ve pHV1431(Jannieré vd. 1990) klonlama araştırmalarında kullanılan plasmidlerdir.

d. Rekombinant *Bacillus* türlerinin geliştirilmesi ve *Bacillus* türlerinin SAP üretim potansiyellerinin kıyaslanması için pHV1431::subC *B.alvei* NRRL B385, *B.amyloliquefaciens* NRRL B11380, *B.firmus* NRRL B1107, *B.cereus* NRRL B569, *B.badius* NRRL NRS 663, *B.sphaericus* NRRL NRS 732, *B.coagulans* NRRL NRS 609 (Northern Regional Research Center), *B.subtilis* BGSC-1A751 (*Bacillus* Genetic Stock Center) hücrelerine klonlanmıştır.

2.1.2. DNA manipulasyonu

B.licheniformis (DSM 1969) kromozomal DNA'sı üstel çoğalma fazındaki hücrelerden izole edilmiş (Posprech ve Neumann 1995) ve PCR'da subC gen (GenBank Acc. No. X03341) kalıbı olarak kullanılmıştır. subC gene (GenBank Acc. No. X03341) geninin çoğaltılabilmesi için primer tasarımı yapılırken plasmide klonlanabilmesi için ileri primere BamHI, geri primere de BamHI restriksiyon

konumları eklenmiştir. Kullanılacak girdilerin derişimleri ve PCR işleme koşulları optimize edilmiş ve optimum koşullar aşağıda verilmiştir:

İleri Primer: GCTCTAGAGCTGATAAAA TGAATCAGATGG
CGAGATCTCGTCTA TTTT ACTTAGTCTACC

Geri Primer: CGCGGATCCGCGATTCAAAAATATTGAACAG
GCGCCTAGGCGCTAAGTTTT ATAACCTGTC

Polimeraz zincir tepkimesi (PCR) için tepkime bileşimi:

| | |
|---------------------------|--------|
| 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 | 27.5µl |
| Taq DNA polimeraz (5U/µL) | 0.5µ |

PCR cihazı çalışma programı:

94°C, 2dk } 1 döngü
94°C, 1dk }
50°C, 1dk } 30 döngü
72°C, 2dk }

72°C, 5dk }
4°C, 5dk } 1 döngü

subC geni ilk olarak pRS316 *E.coli-S.cerevisiae* shuttle vector'üne sonra da then sub-klonlanmıştır. Rekombinant plasmid, Vehmaanpera (xx) methodune göre *B.licheniformis* competent hücrelerine electroporasyon cihazı ile Gene Pulser C=25 µF 'a ve pulse kontrol edicisi de R= 200Ω 'e transforme edilmiştir.

2.1.3. SAP Katı ve Ön-sıvı Ortamları

Rekombinant *Bacillus licheniformis* ile yapılan SAP üretim deneylerinde kullanılan katı çoğalma ortamının bileşimi Tablo 1.'de verilmiştir (Çalık 1998). Kloramfenikol sterilizasyondan sonra eklenmiştir.

Mikroorganizma çoğalması ve enzim üretiminde kullanılan ön-sıvı ortamın bileşimi Tablo 2.'de verilmiştir (Çalık 1998). Katı ortamda çoğalmalarını tamamlayan hücreler, $V=25 \text{ cm}^3$ hacimli ön-sıvı ortamı içeren mikrobiyolojik hava filtreli $V_R=150 \text{ cm}^3$ hacimli kesikli biyoreaktöre steril koşullarda aktarılmış ve sıcaklığı 37°C , karıştırma hızı $N=200 \text{ dk}^{-1}$ olan orbital karışmalı inkübatörde $t=6-8$ st süreyle çoğaltılmışlardır. Pilot ölçekli deneyler için ise $V=100 \text{ cm}^3$ hacimli ($V_R= 500 \text{ cm}^3$) ikinci bir ön-sıvı çoğalma ortamına 1/10 oranında aşılama yapılarak yine 37°C , $N=200 \text{ dk}^{-1}$ koşullarında $t=2-3$ st süreyle çoğaltılmışlardır.

Tablo 1. Rekombinant *Bacillus licheniformis* için katı çoğalma ortamı

| Bileşen | Derişim, kg m^{-3} |
|---|-----------------------------|
| $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0.01 |
| Agar | 15.0 |
| Pepton | 2.5 |
| Azokazein | 2.0 |
| Kloramfenikol | 0.007 |

Tablo 2. Rekombinant *Bacillus licheniformis* için ön-sıvı çoğalma ortamı

| Bileşen | Derişim, kg m^{-3} |
|---|-----------------------------|
| Soyton | 0.01 |
| Pepton | 15.0 |
| CaCl_2 | 0.1 |
| Na_2HPO_4 | 0.25 |
| $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0.01 |
| Kloramfenikol | 0.007 |

2.1.4. SAP Üretim Ortamı

Sıvı çoğalma ortamı tasarımı için araştırma programı kapsamında incelenen parametreler aşağıda Tablo 3 'te verilmiştir. Ön-sıvı çoğalma ortamında/ortamlarında çoğaltılan mikroorganizmalar 1/10 aşılama oranı kullanılarak laboratuvar veya pilot ölçekli sistemlerde yer alan ve referans olarak alınıp kullanılan bileşimi Tablo 4 'te verilen üretim ortamlarına aktarılmıştır.

2.1.5 Ölçek Büyütme Adımları ve Biyoreaktör Sistemi

SAP enzimi üretiminde kullanılan ölçek büyütme adımları: Birinci basamakta mikroorganizma mikrobanktan katı ortama aktarılmış, ikinci basamakta katı ortamdan ön-sıvı I çoğalma ortamına, üçüncü basamakta 1/10 aşılama oranı ile ön-sıvı II çoğalma ortamına; dördüncü basamakta ise 1/10 aşılama oranı ile üretim ortamının yer aldığı pilot ölçek biyoreaktöre aktarılmıştır.

SAP üretim deneyleri, laboratuvar ve pilot ölçek olmak üzere iki farklı ölçekte yapılmıştır. Laboratuvar ölçekte $V=33 \text{ cm}^3$ çalışma hacimli mikrobiyolojik hava filtreli tam karıştırılmalı kesikli biyoreaktörlerde $N=200 \text{ dk}^{-1}$ karıştırma hızı, $T=37^\circ\text{C}$ sıcaklıkta yaklaşık $t=60 \text{ st}$ süreyle SAP üretimi gerçekleştirilmiştir.

Pilot ölçekte yapılan SAP üretim deneylerinde $V=1.65/2.2 \text{ dm}^3$ biyoreaktör üretim ortamına aktarılmıştır. Bu adımda kullanılan BBraun-CT/Chemap FZ3000 biyoreaktörler $V_R=3.0/3.5 \text{ dm}^3$ toplam hacimli, mekanik karıştırılmalı, pH, sıcaklık, çözülmüş oksijen, karıştırma hızı ve kimyasal köpük kontrollü pilot ölçekli kesikli biyoreaktör sistemleridir. Bir buhar jeneratörünün yardımıyla yerinde sterillenebilen biyoreaktörlerde dört engel, iki adet düz bıçaklı türbin tipi karıştırıcı ve delikli bir gaz giriş borusu bulunmaktadır. Sıcaklık kontrolü soğutulmuş-su/buhar akımlarının uygun oranlarda karıştırılmasıyla ceketten yapılmaktadır. Soğutma suyu, sıcaklığı $T=-5-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 'e ayarlanabilen soğutmalı sirkülör ile; reaktöre beslenen hava ise hava kompresörü ile sağlanmıştır.

2.1.6. Melasa Uygulanan Ön İşlem Prosesleri

Karbon kaynağı olarak kullanılan -kompleks ortam bileşiklerinden olan- melasa aşağıda açıklanan seyreltme, santrifüjleme ve hidroliz ön-işlemleri uygulanmıştır (Şekil 1):

i. **Seyreltme:** Tartılan 100 g melas üzerine 80 cm^3 damıtık su eklenerek melas su içerisinde çözülmüştür. Çözelti santrifüjlendikten sonra sıvı fazın tamamı 200 cm^3 hacminde balonjojeye

alınarak damıtık su ile hacim tamamlanmış ve bundan sonraki basamaklar hazırlanan 200 cm³ melas çözeltisine uygulanmıştır.

ii. Santrifüjleme: Seyreltme işleminden sonra melas çözeltisi 6000 dk⁻¹'de 20 dk santrifüjlenmiştir. Yapılan santrifüjleme işlemi ile melas içerisinde bulunan ve suda çözünmeyen safsızlıklar ve şeker üretim prosesi sırasında oluşan köpük uzaklaştırılmıştır. Seyreltme ve santrifüjleme işlemi görmüş melas "PP0 Melası" olarak adlandırılmıştır.

iii. Hidroliz: Hidroliz işlemi melasın içerdiği sukrozu glukoz ve fruktoza dönüştürmek için santrifüjlenerek damıtık su ile 200 cm³ hacme tamamlanan melas çözeltisine uygulanmıştır.

H₂SO₄ ile hidroliz: Melas çözeltisinin pH'ı 6 M H₂SO₄ ile oda sıcaklığında önce pH=3'e ayarlanmış ve T=60 °C sıcaklıktaki çalkalamalı su banyosunda 125 devir dk⁻¹ karıştırma hızında t=1 st hidroliz tepkimesi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra pH, 6 M H₂SO₄ ile oda sıcaklığında pH=1'e ayarlanmış ve T=60 °C sıcaklıktaki çalkalamalı su banyosunda 125 devir dk⁻¹ karıştırma hızında t=2 st daha hidroliz tepkimesi gerçekleştirilmiştir. Tanımlanan fiziksel + kimyasal önışlemi görmüş melas "PP1a Melası" olarak adlandırılmıştır.

HCl ile hidroliz: Melas çözeltisinin pH değeri %37 HCl ile oda sıcaklığında pH=1.80'e ayarlanmış ve T=90°C sıcaklıktaki su banyosunda t=3 st hidroliz tepkimesi gerçekleştirilmiştir (Othmer, 1981). Tanımlanan fiziksel + kimyasal önışlemi görmüş melas "PP1b Melası" olarak adlandırılmıştır.

Tablo 3. SAP üretim prosesi için tasarlanan parametreler

| Ortam bileşenleri | Biyoreaktör Tasarım Parametreleri |
|---|-----------------------------------|
| Glukoz | Oksijen Aktarımı |
| (NH ₄) ₂ PO ₄ | Hava giriş hızı |
| Sukroz | Karıştırma hızı |
| Melas | |
| Soya | |
| Amino asitler | |
| Kazein | |
| Inorganik bileşikler | |

Tablo 4. Rekombinant *Bacillus licheniformis* için üretim ortamı: Referans ortam

| Bileşen | Derişim, kg m ⁻³ |
|---|-----------------------------|
| Glukoz | 8.0 |
| NaH ₂ PO ₄ | 5.63 |
| Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O | 0.055 |
| (NH ₄) ₂ HPO ₄ | 4.71 |
| KH ₂ PO ₄ | 2.0 |
| CaCl ₂ | 0.2 |

2.1.7. Analitik Yöntemler

Mikroorganizma Derişimi

Mikroorganizma derişimi turbidimetrik olarak UV-spektrofotometrede $\lambda=600$ nm'de absorbans ölçümüyle belirlenmiştir (Çalık vd 1998).

SAP Enziminin Aktivitesi

Üretilen enzimin aktivitesi, T=37°C, t=20 dk koşullarında, EDTA çözeltisi ile nötral proteaz aktivitesi inhibe edildikten sonra, azokazeinin enzimatik hidrolizi sonunda açığa çıkan hidrolizatların absorbansının $\lambda=275$ nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmesiyle belirlenmiştir (Çalık, 1998). Birim ünite, bir dakikada açığa çıkan 4 nmol tirozin olarak tanımlanarak aktivite U/cm³ veya U/g olarak bulunmuştur.

Proteaz ve Amilaz Derişimleri

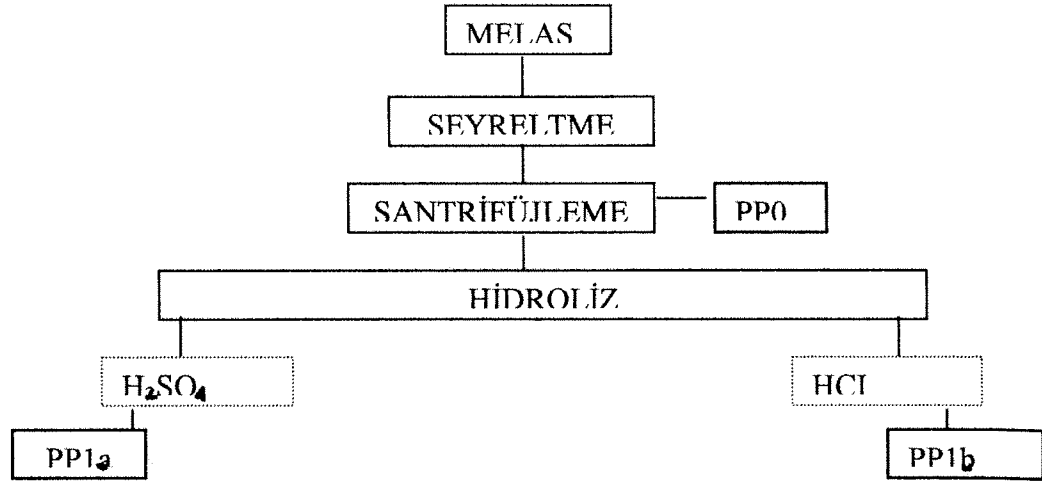
SAP nötral proteaz (NP) ve amilaz (A) derişimleri Quanta 4000E (Waters) kapiler elektroforez cihazıyla belirlenmiş; analiz koşulları, örnek elektroferogram ve kalibrasyon eğrileri Ek-Ç'de verilmiştir. SAP ve NP derişimleri için aynı kalibrasyon eğrisi kullanılmıştır.

Toplam Protein Derişimi

Toplam protein derişimi Lowry yöntemine göre $\lambda=750$ nm dalga boyunda absorbans ölçülerek yapılmıştır.

Organik Asit Derişimleri

Sitrik asit veya yan ürün olarak oluşan organik asitlerin derişimlerini belirlemek amacıyla Quanta 4000E (Waters) kapiler elektroforez cihazında yöntem geliştirilmiş (Çalık vd., 1998).



Şekil 1. Melasa uygulanan ön-işlem proseslerinin sırası ve simgeleri

Amino Asit Derişimleri

Amino asit analizleri ters faz HPLC temelli amino asit analiz sisteminde PICO TAG yöntemi (Cohen, 1983) kullanılarak yapılmıştır (Çalık vd. 1998).

İndirgenmiş Şeker Derişimi

Üretim ortamındaki indirgenmiş şekerlerin -glukoz, fruktoz- analizi DNS (dinitrosalisilikasit) yöntemi kullanılarak (Miller, 1959) $\lambda=550$ nm'de absorbans ölçümü ile yapılmış; kalibrasyon eğrisi Ek-G'de verilmiştir.

2.1.8. Metabolik Yolizi Mühendisliği Analizi İçin Optimizasyon Programı

B.licheniformis için Ek-1 'te verilen 147 denklemden oluşan, metabolik bileşikler toplamı 105 olan biyokimyasal tepkime sistemi için kurulan matematik model:

$$A * r(t) = c(t) \quad (2.1)$$

vektör diferansiyel denklem şeklinde tanımlanarak amaç fonksiyon Z:

$$Z = \alpha_i r_i \quad (2.2)$$

Burada α_i , hızların (r_i) stokiyometrik katsayılarıdır. Denklem-3.6 'nın 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 olarak denklem-2.2 minimize edilerek 2.1-denklemler sistemi çözülür. Matematik modelin değişkenleri olan tepkime akıları $\text{mmol g}^{-1} \text{KH st}^{-1}$ olarak tanımlanmıştır. Hücre oluşum akısı r_x ($\text{g KH.g}^{-1} \text{KH st}^{-1}$), 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.

2.2. Bulgular

Beş alt-araştırma programından oluşan MISAG-176 “serin alkali proteaz (SAP) enziminin, üretiminde verim ve seçiciliğinin artırılması” konulu projenin birinci araştırma programında rekombinat DNA teknolojisi (genetik mühendisliği) kullanılarak, SAP üretiminde verim ve seçiciliğinin artırılması için rekombinant *Bacillus* türü mikroorganizmalar geliştirilmiştir. Bu amaçla SAP genin klonlanabilmesi için önce SAP geni *subC* dizinine (Jacobs 1995) analog –iki ileri ve bir geri- üç primer (oligonükleotit) tasarımı yapılmış; SAP üretme potansiyeli olan *B.licheniformis* genomik DNA molekülü izole edilip kalıp olarak kullanılarak, *subC* geninin derişimi tasarlanan primerlerle PCR cihazında artırılmıştır. DNA dizin analiz cihazıyla PCR ile sentezlenen gen dizini analizlenip kontrol edildikten sonra, *subC* geni önce bir *E.coli-yeast* shuttle plasmidine klonlanmış ve sonra *E.coli* 'ye transfer edilerek birinci klonlama programı tamamlanmıştır. *E.coli-yeast* shuttle plasmidinden izole edilen *subC* geni *E.coli-Bacillus* shuttle plasmidine sub-klonlama yapılmış ve sonra yine *E.coli* 'ye transfer edilmiştir. Genin başarıyla klonladığı belirlendikten sonra r-DNA molekülü dokuz *Bacillus* türüne transfer edilmiş; ve rekombinant mikroorganizmaların üretim kapasiteleri kıyaslanmıştır.

2.2.1. SAP üretiminin artırılması için SAP sentezinden sorumlu genin klonlanması

2.2.1.1. Primer tasarımı ve PCR ile gen derişimin artırılması

Genetik Mühendisliği (GM) programının hazırlık evresinde önce SAP geninin (*subC*) Ek-2 'de verilen *SubC* nükleik asit dizini (Jacobs 1995) kullanılarak, restriksiyon enzim konumları farklı ancak temel dizinleri aynı iki ileri (forward) dizin:

5' GCTCTAGAGCTGATAAAATGAATCAGATGG 3'

ve bir geri (reverse) dizin:

5' CGCGGATCCGCGACCATAATGGAACGATTC 3'

olmak üzere üç oligonükleotit tasarımı ve sentezi (GIBCO BRL Custom Primers, UK) yapılmıştır. PCR 'da çoğaltılan genin klonlanabilmesi için birinci ileri primere eklenen restriksiyon konumu *Bam*HI ikinci ileri primere eklenen restriksiyon konumu da *Xba*I 'dır. Geri primer ucuna ise *Bam*HI restriksiyon konumu eklenmiştir.

2.2.1.2. PCR ile gen derişimi artırılması için kalıp seçimi

Genomik DNA molekülündeki SAP genini taşıyan *B.licheniformis* kalıp olarak kullanılmaya karar verildiğinden iki seçenek çıkmıştır. Bunlar:

1. *B.licheniformis* 'den genomik DNA 'nın izole edilmesi, ve

2. *B.licheniformis* hücre duvarının mikrodalga fırında parçanmasını ve bu hücrenin doğrudan kullanımını temel alan *koloni PCR* yöntemidir.

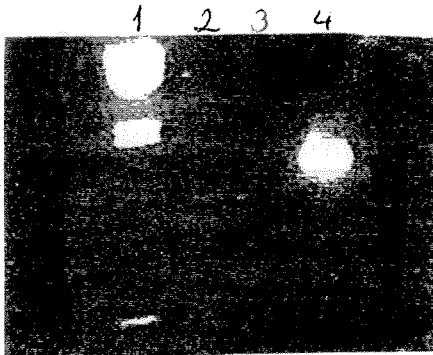
Birinci yöntem kullanılarak önce *B.licheniformis* genomik DNA molekülünün izolasyonu yapılmış ve saflaştırılmış genomik DNA 'nın kalıp olarak kullanılması sonucunda *subC* geni sentezi PCR cihazında tasarlanan primerler kullanılarak yapılmıştır. Genin sentezlenebilmesi için primerin DNA 'ya yapışma sıcaklığı (annealing temperature), 50°C olarak; DNA 'nın uzama (alongation) süresi ise *subC* geni 1588 baz çifti içerdiğinden 2 dk olarak belirlenmiştir. DNA uzama sıcaklığı (alongation temperature) Taq polimeraz enziminin optimum sıcaklığı olan 72°C olarak seçilmiştir.

PCR ile gen derişiminin artırılmasında aşağıdaki sıra, program ve koşullar kullanılmıştır:

1. 1 DÖNGÜ: T= 94°C, t= 2dk
2. 30 DÖNGÜ: T₁= 94°C, t₁= 1dk
T₂= 50°C, t₂= 1dk
T₃= 72°C, t₃= 2dk
3. 1 DÖNGÜ: T₁= 72°C, t₁= 5dk
T₂= 4°C, t₂= 5dk

PCR ile yüksek derişimde *subC* gen sentezi için kalıp DNA derişim etkisi incelenmiş ve en uygun kalıp DNA derişiminin 0.2mM olduğu bulunmuştur. PCR cihazında *subC* gen sentez tepkimesi için bulunan uygun tepkime bileşimi aşağıda verilmiştir:

| | |
|---------------------------|--------|
| 10X PCR Tamponu | 5µl |
| MgCl ₂ (25mM) | 4µl |
| dNTPler (1mM) | 10µl |
| İleri Primer (FP) (10µM) | 1µl |
| Geri Primer (RP) (10µM) | 1µl |
| Template DNA (250 ng) | 2.5µl |
| dH ₂ O | 27.5µl |
| Taq DNA polimeraz (5U/µL) | 0.5µ |



Şekil 2. PCR ile *SubC* geninin sentezlenmesi

1. λ Hind III; 2. hücre; 3. Mikro dalga fırında hücre duvarı parçalanmış hücre; 3. *B.licheniformis* kromozomu

2.2.1.3. SAP geninin *E. coli* plasmidlerine klonlanması, *E. coli* 'ye transformasyonu ve *E. coli* 'de 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. *Bacillus* türleri rekombinant proteinlerin üretiminde yaygın olarak kullanılmasına rağmen, *E. coli* 'ye plasmid DNA transferinin kolay olması ve bunun da ötesinde *E. coli* 'den plasmid DNA izolasyonunun kolaylığı nedeniyle, bu araştırmanın birinci alt-programında ön klonlama işlemlerinin *E. coli* plasmidlerine yapılmış ve *E. coli* 'ye transforme edilmiştir. Böylece *subC* geninin seçilen *E. coli* plasmidleri pRS316 ve pUC19 'a ayrı-ayrı klonlanmaları için araştırmalar paralel olarak başlatılmıştır. Bir *E. coli*-yeast shuttle-plasmidi olan pRS316 ve bir *E. coli* plasmidi olan pUC19 klonlama için ortak özellikleri olan poliklonlama bölgelerinde bulunan restriksiyon enzim kesim konumlarının çok sayıda olması nedeniyle seçilmiştir. *subC* geni ve *E. coli* plasmidleri *Bam*HI ve *Xba*I ile kesilmiş ve T4 DNA ligaz enzimi katalizörlüğünde ligasyon tepkimesinin koşullarının optimizasyonu için insert (gen derişimi), vektör derişimi ve ligaz enzim derişimlerinin etkisi ile ligasyon tepkimesi sırasında çoklu sıcaklık etkisi araştırılmıştır. Ancak PCR cihazında sentezlenen *subC* geninin uçlarını kesmesi gereken restriksiyon enzimleri *Xba*I ve *Bam*HI tarafından etkin kesilememesi nedeniyle, klonlama tepkimesi gerçekleşmemiştir. Olumsuz sonuçlar nedeniyle alternatif yöntem olarak küt uçlu kesim ve ligasyon yapılmasına karar verilmiştir. Bunun için pRS316 plasmidi *Sma*I restriksiyon enzimiyle aşağıda verilen tepkime koşullarında küt uçlu olarak kesilmiştir.

Tepkime 1. pRS316 plasmidinin *Sma*I enzimiyle küt uçlu kesimi için tepkime koşulları:

| | |
|--------------------------|-------|
| pRS316 plasmidi (200 ng) | 1 µl |
| Tampon A | 2 µl |
| <i>Sma</i> I (10U/µl) | 2 µl |
| dH ₂ O | 17 µl |
| T=37°C | |
| t= 2 st | |

*Sma*I ile kesim işlemi tamamlandıktan sonra, vektörün (plasmid) *Sma*I ile kesilen uçlarının ligasyon tepkimesi sırasında birbirine tekrar bağlanmaması için, vektör alkali fosfataz enzimiyle aşağıdaki koşullarda tepkimeye sokulmuş ve vektör ucunda klonlama için ligasyon tepkimesinde (Tepkime 3) gerekli fosfat grupları vektörden uzaklaştırılmış, tepkime tamamlandıktan sonra alkali fosfataz enziminin yapısının bozunması için 85°C'da 15 dk bekletilmiştir.

Tepkime 2. Lineer pRS316 uç fosfat gruplarının vektörden uzaklaştırılması için koşullar:

| | |
|--|-------|
| <i>Sma</i> I + pRS316 tepkime karışımı | 20 µl |
| Alkali fosfataz tamponu (10X) | 5 µl |
| Alkali fosfataz (0.1U/µl) | 1 µl |
| dH ₂ O | 25 µl |
| T=37°C | |
| t= 60 dk | |

Tepkime tamamlandıktan sonra lineer plasmid proteinlerden ve safsızlıklardan arındırılmıştır. *SubC* geni, yukarıda anlatıldığı gibi hazırlanan pRS316 vektörüne aşağıdaki tepkime koşullarında klonlanmıştır.

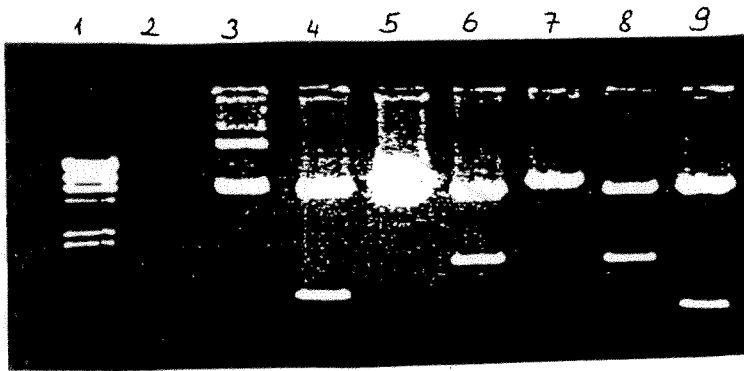
Tepkime 3. *SubC* geninin pRS316 vektörüne klonlanması için ligasyon tepkime koşulları:

| | |
|---------------------------|-------|
| <i>SubC</i> geni (120 ng) | 5 µl |
| pRS316 (20 ng) | 2 µl |
| T4 DNA Ligaz (1U/µl) | 2 µl |
| Ligasyon tamponu | 2 µl |
| T4 DNA polimeraz (5U/µl) | 1 µl |
| dH ₂ O | 10 µl |
| T=16°C | |
| t= 16 st | |

subC geninin küt uçlu vektöre klonlanabilmesi için ligasyon tepkime ortamına T4 polinükleotid kinaz enzimi eklenmiştir. T4 DNA polinükleotid kinaz ile PCR 'da gen sentezi sırasında kullanılan Taq polimeraz enziminin çalışma mekanizması gereği ucunda adenin ile sonlanan *SubC* geninin adenin uçlarının karşısına timin ekleyerek *subC* geni vektöre klonlamaya uygun yapıya getirilmiştir.

Klonlama işleminden sonra ligasyon tepkime karışımı seyreltilmiş ve karışımdan 2 µl alınarak 40 µl transformasyon için hazırlanan *E.coli* 'ye elektrik pulse etkiyle aktarılmış; sonra hücre süspansiyonu 1

ml LB ortamına transfer edilmiş ve t=1 st süreyle T=37°C 'da bekletildikten sonra IPTG + X-Gal + Amp içeren katı ortamlara aktarılmıştır (Sambrook 1995). *SubC* genini taşıma olasılığı olan 153 beyaz koloni elde edilmiş ve bunlar koloni hibridizasyon yöntemiyle kontrol edilmiştir. Koloni hibridizasyon yöntemiyle radyoaktif işaretleme yapılarak *subC* geni **probe** olarak hazırlanmış ve *subC*+pRS316 plasmidini (r-DNA) taşıma olasılığı olan 26 koloni radyoaktif ışına ile oluşan görüntüden yararlanarak saptanmıştır. Doğru genin klonlandığını belirlemek için seçilen 26 koloniden 26 plasmid DNA izolasyonu yapılmıştır. *subC* genini taşıma olasılığı yüksek 26 pRS316 plasmidi *Bam*HI ve *Xba*I enzimleri ile eşanlı kesilmiş ve *subC* gen büyüklüğü olan 1588 bp büyüklüğünde insert içeren rekombinant plasmid (r-DNA) bulunmuş ve *subC* genini taşıyan rekombinant plasmidin elde edildiğinin kesin kanıtlanması için son kontrol çalışmaları yapılmıştır. Rekombinant plasmidi - *SubC* geni içinde ve dışında- spesifik noktalarda kesmesi gereken *Bam*HI, *Xba*I, *Sma*I, *Xho*I, *Eco*RI ve *Bam*HI+*Xba*I restriksiyon enzimleriyle r-DNA ayrı mikroreaktörlerde kesilmiş; herbir restriksiyon enzimiyle kesimden elde edilmesi gereken DNA parça büyüklüğü kontrol edilmiş ve r-DNA 'nın haritası çıkarılmıştır (Şekil 3). DNA parça büyüklükleri ve r-DNA haritası plasmidin *subC* genini içerdiğini göstermiş ve genetik mühendisliği araştırmalarının birinci alt-programı başarılmıştır.



Şekil 3. Restriksiyon enzimleriyle kesilmiş *SubC*+pRS316 'nın DNA parça büyüklüklerin jel elektroforez görüntüleri

Anahtar:

1. λ /HindIII; 2. *SubC*; 3. *Sma*I ile kesim; 4. *Sal*I ile kesim; 5. *Xho*I ile kesim; 6. *Xba* I ile kesim; 7. *Bam* HI ile kesim; 8. *Bam*HI+*Xba*I ile kesim; 9. *Eco* RI

2.2.1.4. *subC* geninin *Bacillus-E.coli* shuttle vektörüne sub-klonlanması ve *E.coli* 'ye transformasyonu

Birinci alt-programda 1588 bp büyüklükteki *subC* geni, 4381 bp büyüklükteki *E.coli-yeast shuttle*-plasmidine klonlanmış; ve ikinci alt programda *subC* geni, pRS316 plasmidine kıyasla daha dar poliklonlama restriksiyon kesim bölgesine sahip ve 10865 bp büyüktaki bir *Bacillus-E.coli* shuttle plasmidi olan pHV1431 'e klonlanmıştır. *subC* geninin ilk olarak pHV1431 yerine pRS316 plasmidine klonlanmasının -daha dar poliklonlama restriksiyon kesim bölgesine sahip olması dışında- ikinci temel nedeni, klonlanması zaten zor olan PCR cihazında sentezlenmiş genin pHV1431 gibi büyük bir plasmide klonlanmasının çok daha zor olmasıdır. *Bacillus-E.coli* shuttle plasmidleri arasından pHV1431 'in seçilmesinin nedenleri, pHV1431 'in yapısal kararlılığının ve plasmid kopyalama sayısının yüksek (200) olmasıdır.

subC genini taşıyan pRS316 *E.coli-yeast* shuttle-plasmidi aşağıdaki tepkime koşullarında, önce *Bam*HI ile kesilerek -*subC* geni birinci ucundan kesik yapışkan yapıda- *subC*+pRS316 rekombinant plasmid lineer formda sub-klonlama prosesinin tasarımı doğrultusunda elde edilmiştir.

Tepkime 4. *SubC*+pRS316 'nin *Bam*HI enzimiyle birinci ucun kesimi için tepkime koşulları:

| | |
|------------------------------------|-------|
| pRS316 plasmidi + <i>SubC</i> geni | 3 µl |
| Tampon B | 2 µl |
| <i>Bam</i> HI (12.5U/µl) | 2 µl |
| dH ₂ O | 15 µl |
| RNAaz (0.4 U/µl) | 1 µl |
| T=37°C | |
| t= 1.5 st | |

Tepkime tamamlandıktan sonra tepkime karışımı EtOH+NaAc ile çöktürülmüş, vakum altında T=20°C 'da kurutulmuştur.

Birinci ucu *SubC* geninden yapışkan yapıda *Bam*HI ile kesilen vektör (Tepkime 4), *subC* geninin pRS316 vektöründen çıkarılması için, genin ikinci ucundan da bir başka yapışkan yapıda *Xho*I ile kesilerek *SubC*+pRS316 vektöründen aşağıdaki tepkime koşullarında ayrılmıştır.

plasmidinin *SaII* enzimiyle kesimi

100 ng

2 μ l

2 μ l

18 μ l

Tepkime 5. pRS316 + *SubC* 'nin ikinci uçtan *XhoI* enzimiyle kesimi için

SubC+pRS316

~60 ng

Tampon H

2 μ l

XhoI (10U/ μ l)

2 μ l

dH₂O

18 μ l

T=37°C

t= 1.5 st

çin uçları uygun şekilde kesik *subC*
86 bp büyüklüğündeki DNA parçası
tezde koşturulmuş; *subC* genine ve pl
subC ile pHV1431 vektörü jelden ekst
(Qiagen). Hazırlama koşulları yukarıd
ağıda verilen tepkime koşullarında kl

Tepkime-4 ile bir ucu *BamHI*, Tepkime-5 ile diğer ucu *XhoI* ile kesil
Bacillus-E.coli shuttle vektörüne sub-klonlamanın yapılabilmesi için pHV
Tepkime-6 ve Tepkime-7 ile aşağıda verilen koşullarda kesilmiştir.

Tepkime 6. pHV1431 'in *BamHI* enzimiyle birinci ucunun kesimi için

pHV1431 plasmidi (50ng/ μ l)

2 μ l

Tampon B

2 μ l

Bam HI (12.5U/ μ l)

2 μ l

dH₂O

16 μ l

T=37°C

t= 1.5 st

inin pHV1431 vektörüne klonlanma

10 μ l

(ng)

4 μ l

2 μ l

0.5 μ l

4 μ l

orjinalinde Amp, Tet, ve Cm antibiyot
n, bu plasmidi taşıyan mikroorganizm
ak pHV1431 plasmidinin *SaII* ve *Ba*

Tepkime tamamlandıktan sonra tepkime karışımı EtOH+NaAc ile
T=20°C 'da kurutulmuştur. Birinci ucu *subC* geninden yapışkan yapı
(Tepkime 6), pHV1431 vektörünün ikinci ucundan da bir başka yapışl
klonlamaya hazırlanmıştır.

sonucunda elde edilen pHV1431 vektörünün Tet 'e karşı direnç sağlayan geni pertürbe edildiğinden, *subC*+pHV1431 plasmidini taşıyan *E.coli* artık Tet 'e karşı direnç gösteremeyeceğinden Tet 'li ortamda çoğalamayacaktır.

Genetik bilgiyi taşıyan yeni vektör elektrik pulse etkiyle *E.coli* 'ye transfer edilmiştir. *subC*+pHV1431 plasmidini de içeren ligasyon-sonu tepkime karışımındaki plasmidler *E.coli* 'ye transfer edildikten sonra, rekombinant *E.coli* Amp içeren katı ortama aktarılmıştır. Çoğalma gerçekleşikten sonra hücreler birisi Amp diğeri de Tet içeren iki farklı katı ortama aktarılmıştır. Amp içeren ortamda yaşayan ancak Tet içeren ortamda yaşayamayan *E.coli* hücreleri çoğaltıldıktan sonra plasmid DNA izolasyonu yapılmış ve tüm potansiyel plasmidler ayrı mikoreaktörlerde *Bam*HI ve *Xba*I ile kesilerek *subC* genini taşıyan plasmid - *subC* gen büyüklüğü jel elektroforez cihazında kontrol edilerek bulunmuştur.

2.2.1.5. *subC* genini taşıyan *Bacillus-E.coli* shuttle-plasmidinin *E. coli* 'den izolasyonu ve *Bacillus licheniformis* 'e transformasyonu

subC+pHV1431 plasmidi rekombinant *E.coli* 'den izole edilmiş; *B.licheniformis* 'e aktarılması için elektroporasyon cihazında en uygun aktarım koşulları bulunmuş ve sonuçlar aşağıda verilmiştir:

B.licheniformis : C=25 μ F, R= 200 Ω , V/L= 12.5kV/cm

subC+pHV1431 plasmidi yukarı verilen koşullarda elektirik pulse etkiyle *B.licheniformis* 'e aktarılmış ve *subC*+pHV1431 plasmidini taşıyan rekombinant *B.licheniformis* elde edilmiştir.

2.2.1.6. Rekombinant *Bacillus* türlerinin geliştirilmesi ve üretim performanslarının tanımlanmış ortamda kıyaslanması

Rekombinant *Bacillus* türlerinin geliştirilmesi ve *Bacillus* türlerinin SAP üretim potansiyellerinin kıyaslanması için için pHV1431::*subC* *B.alvei* NRRL B385, *B.amyloliquefaciens* NRRL B11380, *B.firmus* NRRL B1107, *B.cereus* NRRL B569, *B.badius* NRRL NRS 663, *B.sphaericus* NRRL NRS 732, *B.coagulans* NRRL NRS 609 (Northern Regional Research Center), *B.subtilis* BGSC-1A751 (*Bacillus* Genetic Stock Center) hücrelerine klonlanmıştır. Rekombinant mikroorganizmaların performansları önce doğal *B.licheniformis* için en uygun olarak bulunan $C_{Go}=6$ kg m⁻³ başlangıç glukoz derişiminde incelenmiştir. Başlangıç glukoz derişimin zamanla değişimi Şekil 4'de gösterilmiştir. Rekombinant *Bacillus* türleri çoğalma fazında t=0-20 st glukozu hızlı tüketirken,

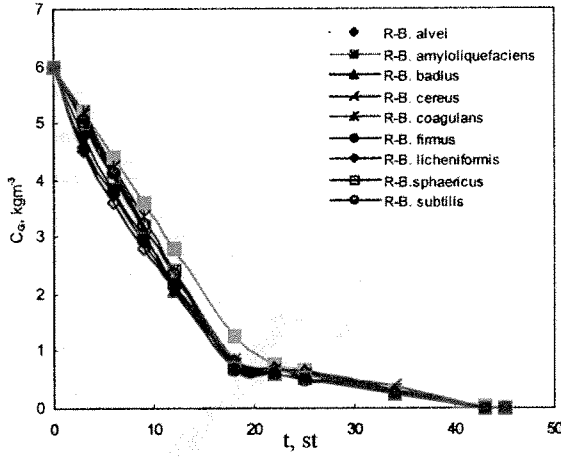
ortamdaki glukoz derişiminin azalması nedeniyle SAP üretim fazında $t > 20$ st glukoz tüketim hızları düşmüştür. Çoğalma fazında glukoz tüketim hızı *r-B.licheniformis*'in en yüksek *r-B. amyloliquefaciens*'inde de en düşüktür; ancak SAP üretim fazında belirgin bir fark yoktur. Hücre derişimlerinin $C_{G0}=6 \text{ kg m}^{-3}$ başlangıç glukoz derişiminde zamanla değişimi Şekil 5'de gösterilmiştir. Rekombinant *Bacillus* türleri üstel çoğalma fazını $t = 20$ st'ye tamamlanmıştır. *Bacillus* türleri içinde en yüksek ve düşük hücre derişimleri (C_X) sırasıyla *r-B.alvei* ($C_X=2.2 \text{ kg m}^{-3}$) ile *r-B.firmus* ($C_X=0.8 \text{ kg m}^{-3}$) ile elde edilmiştir. Buna paralel olarak birim hücre başına tüketilen substrat ($Y_{X/G}$) değerleri en yüksek ve düşük sırasıyla *r-B.alvei* ile *r-B.firmus* ile elde edilmiştir (Tablo 5). SAP aktivitesinin $C_{G0}=6 \text{ kg m}^{-3}$ başlangıç glukoz derişiminde zamanla değişimi Şekil 6'te gösterilmiştir. Doğal ve rekombinant *Bacillus* türleri kıyaslandığında aktivitedeki artış **artma faktörü**, E_A , olarak tanımlanmış ve herbir *Bacillus* için hesaplanan E_A değerleri Tablo 5'te gösterilmiştir. *B.licheniformis* ve *B. amyloliquefaciens* haricinde doğal *Bacillus* türlerinin aktivite değerleri $A=0-23 \text{ U cm}^{-3}$ arasında bulunmuştur. Doğal *B.licheniformis* ve *B. amyloliquefaciens* aktiviteleri sırasıyla $A=300$ ve $A=510 \text{ U cm}^{-3}$ olarak bulunmuştur. $C_{G0}=6 \text{ kg m}^{-3}$ başlangıç glukoz derişiminde en yüksek SAP aktivitesi *r-B. amyloliquefaciens* ($A= 1134 \text{ U cm}^{-3}$) ile elde edilmiştir.

Klonlama sonucu mikroorganizmalarda fizyolojik değişimler meydana geldiğinden ve bununda metabolizmada kaymalara neden olabileceği düşünöldüğünden başlangıç glukoz derişiminin ($C_{G0}=0-35 \text{ kg m}^{-3}$) hücre derişimi ve SAP aktivitesi üzerine etkisi araştırılmıştır. Maksimum hücre derişimleri rekombinant *B. alvei*, *B. amyloliquefaciens*, *B. badius*, *B. cereus*, *B. coagulans*, *B. firmus*, *B. licheniformis*, *B. sphaericus* ile *B. subtilis* sırasıyla $C_{G0}= 10, 20, 15, 35, 20, 7, 20, 7.0,$ and 6.0 kg m^{-3} derişimlerinde $C_X = 3.1, 1.3, 2.2, 2.0, 3.8, 0.9, 2.3, 2.3$ and 1.4 kg m^{-3} olarak bulunmuştur (Tablo 6). Hücre derişiminin en yüksek olarak bulunduğu başlangıç glukoz derişiminde hücre derişimlerinin zamanla değişimi Şekil 7'de, hesaplanan verim katsayıları ($Y_{X/G}$) da Tablo 6'te verilmiştir. En yüksek hücre derişimi *r-B.coagulans* ile bulunurken en yüksek $Y_{X/G}$ *r-B.sphaericus* ile elde edilmiştir.

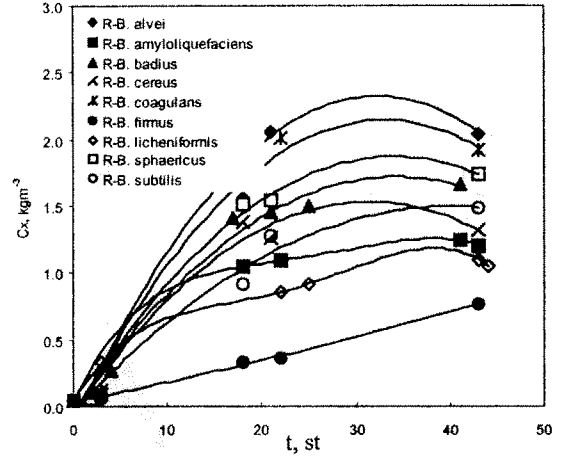
Rekombinant *Bacillus* türlerinin spesifik çoğalma hızları, μ , C_X 'in zamanla değişim eğrilerinden bulunmuştur. İncelenen rekombinant *Bacillus* türlerinin μ 'nün C_G değişimi Monod modeline uymaktadır. Rekombinant *Bacillus* türleri için bulunan model kinetik parametreleri Tablo 7'te verilmiştir.

$$\mu = \mu_{\max} \frac{C_G}{K_G + C_G} \quad (2.4)$$

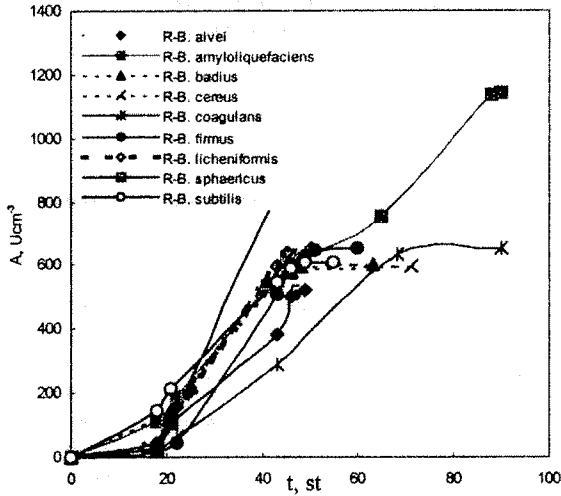
Başlangıç glukoz derişiminin ($C_{G0}=0-35 \text{ kg m}^{-3}$) SAP aktivitesi üzerine etkisi incelenmiş ve maksimum SAP aktivitesi rekombinant *B. alvei*, *B. amyloliquefaciens*, *B. badius*, *B. cereus*, *B. coagulans*, *B. firmus*, *B. licheniformis*, *B. sphaericus* and *B. subtilis* ile sırasıyla $C_{G0}=10.0, 20.0, 7.0,$



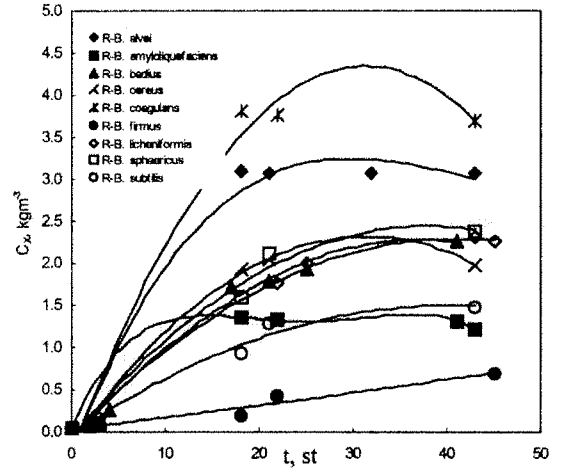
Şekil 4. Rekombinant *Bacillus* türleriyle SAP üretiminde glukoz derişiminin zamanla değişimi ($C_G^0=6 \text{ kg m}^{-3}$)



Şekil 5. Rekombinant *Bacillus* türleriyle SAP üretiminde mikroorganizma derişiminin zamanla değişimi ($C_G^0=6 \text{ kg m}^{-3}$)



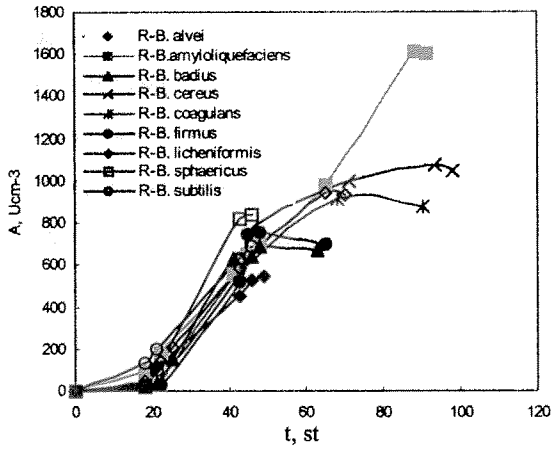
Şekil 6. Rekombinant *Bacillus* türleriyle SAP üretiminde SAP aktivitesinin zamanla değişimi ($C_G^0=6 \text{ kg m}^{-3}$)



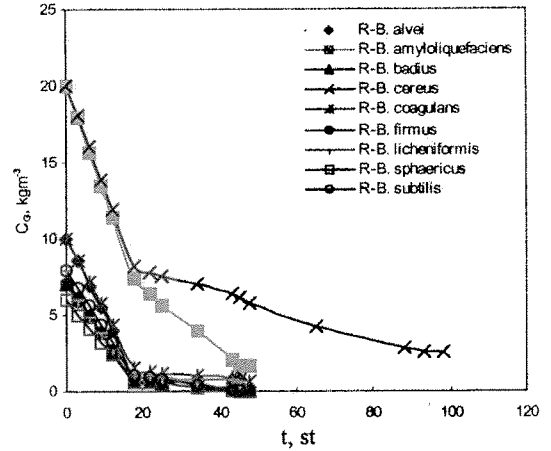
Şekil 7. Hücre derişiminin mikroorganizmaların glukoz optimum derişimlerinde zamanla değişimi

Tablo 5. Doğal ve recombinant *Bacillus* türlerinin $C_{G0}=6 \text{ kg m}^{-3}$ başlangıç glukoz derişiminde maksimum hücre derişimleri, maksimum SAP aktiviteleri ve bu değerlere karşılık gelen proses zamanları, birim substrat başına hücre üretimleri, birim substrat başına SAP aktiviteleri (r-: recombinant; d-: doğal).

| Microorganizma | r- C_{Xmax} | r- $Y_{X/G}$ | d- A_{max} | r- $A (t=43h)$ | r- A_{max} | E_A | d- $Y_{A/G}$ | r- $Y_{A/G}$ | d- $Y_{A/X}$ | r- $Y_{A/X}$ |
|----------------------------|------------------|-----------------|-----------------|-------------------|-----------------|-------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| <i>B.licheniformis</i> | 1.10 | 0.18 | 300 (t=43h) | 640 | 640(t=43h) | 2 | 48 | 107 | 102 | 595 |
| <i>B.amyloliquefaciens</i> | 1.27 | 0.21 | 510 (t=65h) | 620 | 1134(t=88h) | 2 | 85 | 189 | 326 | 900 |
| <i>B.firmus</i> | 0.79 | 0.13 | 18.4(t=45h) | 507 | 647 (t=51h) | 36 | 3 | 108 | 13 | 830 |
| <i>B.alvei</i> | 2.12 | 0.35 | 14.7(t=43h) | 384 | 499 (t=46h) | 33 | 2 | 83 | 12 | 240 |
| <i>B.badius</i> | 1.67 | 0.28 | 8.8 (t=43h) | 620 | 643 (t=41h) | 73 | 1 | 107 | 7 | 380 |
| <i>B.coagulans</i> | 2.01 | 0.34 | 22.9(t=45h) | 498 | 632 (t=68h) | 28 | 4 | 105 | 7 | 310 |
| <i>B.cereus</i> | 1.31 | 0.22 | 14.1(t=45h) | 552 | 595 (t=71h) | 43 | 2 | 99 | 5 | 450 |
| <i>B.subtilis</i> | 1.48 | 0.25 | 18.1(t=45h) | 547 | 606 (t=49h) | 34 | 3 | 101 | 12 | 400 |
| <i>B.sphaericus</i> | 1.75 | 0.29 | 8.1 (t=45h) | 822 | 822 (t=43h) | 103 | 1 | 137 | 11 | 470 |



Şekil 8. SAP aktivitelevlerinin optimum glukoz derişimlerinde zamanla değişimi



Şekil 9. Optimum SAP aktivitelevlerindeki optimum glukoz derişimlerinin zamanla değişimi

Tablo 6. Çoğalma ve SAP üretimi için optimum glukoz derişimlerinde ulaşılan maksimum hücre derişimleri, SAP aktivitelevleri, $Y_{X/G}$, ve $Y_{A/G}$ değerleri

| Microorganizma | Hücre Sentezi | | SAP Üretimi | | | | |
|-------------------------------|---------------|----------------------------|-------------|---------------------------|------------|-----------|-----------|
| | C_{Xmax} | C_{Xmax} için C_{Gopt} | A max | A_{max} için C_{Gopt} | C_{Xmax} | $Y_{A/G}$ | $Y_{X/G}$ |
| <i>r-B. licheniformis</i> | 2.303 | 20 | 940(t=65h) | 8 | 1.754 | 128.1 | 0.239 |
| <i>r-B. amyloliquefaciens</i> | 1.356 | 20 | 1611(t=88h) | 20 | 1.356 | 85.2 | 0.072 |
| <i>r-B. firmus</i> | 0.996 | 7 | 745 (t=45h) | 7 | 0.996 | 106.4 | 0.142 |
| <i>r-B. alvei</i> | 3.103 | 10 | 532 (t=46h) | 10 | 3.103 | 56.6 | 0.330 |
| <i>r-B. badius</i> | 2.263 | 15 | 689 (t=48h) | 7 | 1.713 | 98.4 | 0.245 |
| <i>r-B. coagulans</i> | 3.815 | 20 | 912 (t=68h) | 10 | 2.503 | 102.8 | 0.282 |
| <i>r-B. cereus</i> | 2.051 | 35 | 1073(t=93h) | 20 | 2.035 | 61.6 | 0.117 |
| <i>r-B. subtilis</i> | 1.479 | 6 | 686 (t=46h) | 8 | 1.288 | 85.8 | 0.161 |
| <i>r-B. sphaericus</i> | 2.384 | 7 | 822 (t=43h) | 6 | 1.747 | 137.0 | 0.291 |

Tablo 7. Recombinant *Bacillus* türlerinin Monod model sabitleri

| Microorganizma | μ_{max} (h^{-1}) | K_G ($kg m^{-3}$) | Microorganizma | μ_{max} (h^{-1}) | K_G ($kg m^{-3}$) |
|-------------------------------|--------------------------|-----------------------|------------------------|--------------------------|-----------------------|
| <i>r-B. licheniformis</i> | 0.139 | 0.194 | <i>r-B. subtilis</i> | 0.188 | 2.288 |
| <i>r-B. alvei</i> | 0.234 | 0.621 | <i>r-B. badius</i> | 0.175 | 0.207 |
| <i>r-B. amyloliquefaciens</i> | 0.155 | 0.117 | <i>r-B. sphaericus</i> | 0.196 | 0.401 |
| <i>r-B. firmus</i> | 0.105 | 0.507 | <i>r-B. coagulans</i> | 0.200 | 0.421 |
| <i>r-B. cereus</i> | 0.215 | 0.946 | | | |

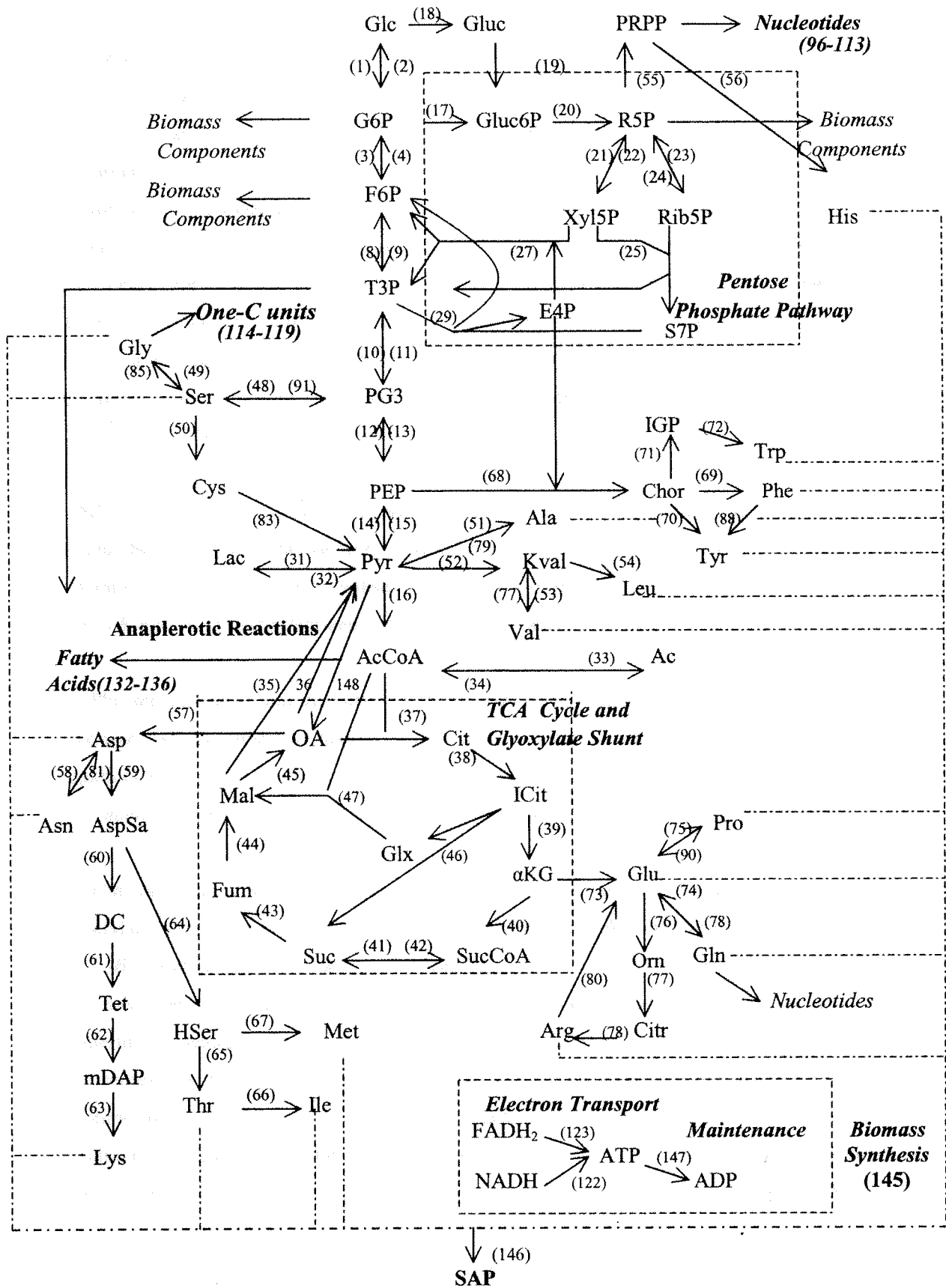
20.0, 10.0, 7.0, 8.0, 6.0 and 8.0 kg m⁻³, başlangıç glukoz derişimlerinde A= 532, 1611, 689, 1073, 912, 745, 940, 822 ve 686 U cm⁻³ olarak bulunmuştur. Rekombinant *Bacillus* türlerinin -optimum glukoz derişiminde- SAP aktivitelerinin zamanla değişimi Şekil 8'de gösterilmiştir. C_{G0}=6.0 kg m⁻³ sonuçlarına benzer olarak glukoz tüketim hızı t=0-20 st yüksektir; t=20 st'ten sonra düşmüştür. t=45 st'te, *r-B.firmus*, *r-B.badius*, *r-B.sphaericus* ve *r-B.subtilis* karbon kaynağının tamamını tüketirken; *r-B.licheniformis*, *r-B.amyloliquefaciens*, *r-B.alvei*, ve *r-B.coagulans* %90'ını; *r-B.cereus* ise % 70'ini tüketmiştir (Şekil 9). Birim hücre başına üretilen SAP, Y_{AX}, değerleri ve tüketilen glukoz başına üretilen SAP, Y_{AG}, değerleri hesaplanmış ve Tablo 6'da gösterilmiştir. En yüksek Y_{AG}, *r-B.sphaericus* ve *r-B.licheniformis* ile en düşük Y_{AG} 'de *r-B. alvei* ,*r- B.amyloliquefaciens*, ve *r-B.cereus* ile bulunmuştur.

2.2.2. Hücreiçi Tepkime Hızlarının Bulunması

Rekombinant mikroorganizmaların glukoz tüketim hızlarının yaklaşık aynı olduğu ve t=43 st sonunda glukozun tamamının tüm mikroorganizmalar tarafından tüketildiği, yaklaşık t=18 st'te tüm mikroorganizmaların üstel çoğalma fazını tamamlayıp durgunluk fazına ulaştıkları ve tüm mikroorganizmalarda SAP aktivitesinin üstel çoğalma fazından sonra glukoz kısıtlayıcı seviyelere ulaştığında (t=18 st) artmaya başladığı gözlenmiştir. *r-B.sphaericus*, *r-B.licheniformis* yüksek aktiviteye, *r-B.alvei* ve *r-B.coagulans* düşük aktiviteye sahip mikroorganizmalardır. (Şekil 5, 6).

SAP üretim prosesi, hücre ve SAP sentez profilleri dikkate alınarak, Evre I (0 < t ≤ 18 st) hücre çoğalma ve Evre II (18 < t < 43) SAP sentez periyodu olmak üzere iki evreye ayrılmıştır. Bu çalışma kapsamında SAP sentez hızının yüksek olduğu t=43 st hücreiçi tepkime hızları analizi için seçilmiştir (Şekil 5, 6).

MYM analizi ile rekombinant *Bacillus* türleri için hücreiçi akı dağılımları belirlenmiş ve birbirleri ile karşılaştırılmıştır. Karbon kaynağı olarak kullanılan glukoz, tüm mikroorganizmalarda hem glikoliz yolizi ile hem de pentoz fosfat yoliziyle tüketilmiştir. Glikogeneosis yolizi tüm mikroorganizmalarda aktif değildir. Glukozun parçalandığı ve TCA döngüsü, pentoz fosfat yolizi gibi diğer yolizleri ile serin alanin grubu gibi amino asitlerin sentezi için girdilerin oluşturuğu, karbon metabolizmasının ana yolizlerinden biri olan glikoliz yolizindeki tepkimelerin hızları karşılaştırıldığında akı değerlerinin *r-B.licheniformis*'te en yüksek, *r-B.sphaericus*'ta ise en düşük olduğu; nükleik asitlerin ve hücre bileşenlerinin oluşumunun ana yolu olan pentoz yolizinde ise genel olarak akıların *r-B.badius*'ta en yüksek, *r-B.alvei*'de en düşük olduğu görülmüştür.



Şekil 10. *B. licheniformis*'in metabolik yolu haritası

Metabolizmanın enerji ihtiyacının büyük bir kısmının karşılandığı ve temel bazı amino asitlerin sentezi için dallanmaların olduğu diğer ana yoluzi TCA döngüsüdür. TCA döngüsünün hızı hücrelerin ATP gereksinimine bağlıdır. Hücreler enerjiye gereksinim duyduklarında TCA döngüsü tamamlanmakta; hücreler enerjiye ihtiyaç duymuyorlar ise gliksolat şöntü aktif olmaktadır. Rekombinant mikroorganizmalardan *r-B.subtilis*, *r-B.cereus*, *r-B.coagulans* ve *r-B.alvei*'de TCA döngüsünün, *r-B.sphaericus* ve *r-B.amyloliquefaciens*'te gliksolat şöntünün, *r-B.firmus*, *r-B.badius* ve *r-B.licheniformis*'te ise hem TCA döngüsünün hem de gliksolat şöntünün aktif olduğu belirlenmiştir. TCA döngüsünün *r-B.subtilis* dışındaki mikroorganizmalarda tamamlandığı, *r-B.subtilis*'te ise TCA döngüsünün son tepkimesi olan malattan okzaloasetat oluşum hızının sıfır olması nedeniyle tamamlanamadığı görülmüştür. Genel olarak TCA döngüsündeki akılar *r-B.firmus*'ta en yüksek iken *r-B.alvei*'de en düşüktür.

SAP bileşiminin %25'ni oluşturan, serin, glisin ve SAP'ta hiç bulunmayan sisteini içine alan serin grubu amino asitlerin biyosentez tepkimeleri incelendiğinde serinin sentez hızının *r-B.cereus*'ta, glisinin *r-B.licheniformis*'te en yüksek ve bunların *r-B.alvei*'de en düşük olduğu; sistein sentezinin ise *r-B.licheniformis*'te aktif değilken *r-B.cereus*'ta en yüksek olduğu gözlenmiştir.

SAP'ın sentezinde önemli yer tutan diğer bir grup, alanin grubu amino asitlerdir. SAP'ın bileşiminin yaklaşık %32'ni oluşturan alanin, valin ve lözini içine alan bu grup amino asitlerinin sentez tepkimelerinin tüm mikroorganizmalarda aktif olduğu ve akıları karşılaştırıldığında *r-B.licheniformis*'te en yüksek *r-B.alvei* ve *r-B.coagulans*'ta en düşük olduğu bulunmuştur.

SAP'ın yaklaşık %19'nu oluşturan aspartik grubu amino asitlerin sentezinin ilk basamağı olması açısından önemli olan okzaloasetattan aspartik asit oluşum tepkimesi tüm mikroorganizmalarda aktiftir ve *r-B.firmus*'ta en hızlı iken *B.coagulans*'ta en yavaştır. *r-B.sphaericus*, *r-B.firmus* ve *r-B.licheniformis* dışındaki tüm mikroorganizmalarda aspartik asit grubunda yer alan tüm amino asitlerin biyosentez tepkimeleri aktif iken, *r-B.sphaericus*'ta lizin biyosentezi, *r-B.firmus*'ta izolözin biyosentezi ve *r-B.licheniformis*'te metiyonin biyosentezi aktif değildir. Aspartik asit grubundaki tepkime akıları *r-B.firmus* ve *r-B.licheniformis*'te en yüksek iken *r-B.alvei* ve *r-B.coagulans*'ta en düşüktür. Fenilalanin, triptofan, tirozinden oluşan ve SAP molekülündeki toplam amino asitlerin % 6'nı oluşturan aromatik grubu amino asitlerin biyosentez akılarına bakıldığında, *r-B.subtilis*, *r-B.cereus*, *r-B.amyloliquefaciens* ve *r-B.coagulans*'ta fenilalanin sentezi; *r-B.cereus* ve *r-B.alvei*'de ise tirozin sentezi aktif değil iken triptofan sentezi tüm mikroorganizmalarda aktiftir. Genel olarak aromatik grubu amino asitlerin sentez akıları aspartik grubunda olduğu gibi *r-B.licheniformis*'te en yüksek iken *r-B.alvei* ve *r-B.coagulans*'ta en düşüktür. Glutamik asit, glutamin, prolin, ornitin ve

arginini içine alan glutamik asit grubu amino asitlerin biyosentezinin başlangıç tepkimesi olan α -ketoglutaratdan glutamik asit oluşumu önemlidir. Çünkü glutamik asit ve ondan üretilen glutamin ya biyosentez reaksiyonlarında glutaminin doğrudan katılımı ile ya da transaminasyon reaksiyonunda glutamik asitin substrat olarak davranmasıyla hücrenel bileşenlerde bütün amino ve amit gruplarının vericisi olarak görev yaparlar. Bu tepkime *r-B.licheniformis*'te en hızlı iken *r-B.badius*'ta aktif değildir. Genel olarak glutamik asit grubundaki diğer amino asitlerin sentez akıları *r-B.licheniformis*'te en yüksek, *r-B.coagulans*'ta en düşüktür.

Amino asitlerden protein sentezi anabolik tepkimelerdir ve yüksek miktarda enerjiye ihtiyaç duyarlar. Biyoproses süresince enerji $FADH_2$ ve $NADH$ 'dan, TCA döngüsünden ve glikoliz yolizinden üretilmiştir. $FADH_2$ ve $NADH$ 'dan ATP üretimini gösteren tepkimeler açısından mikroorganizmaları karşılaştırdığımızda bu tepkimelerin başta *r-B.firmus* olmak üzere *r-B.subtilis* ve *r-B.licheniformis*'te hızlı *r-B.alvei*'de ise en yavaş olduğu görülmüştür. TCA döngüsünden süksinat oluşum tepkimesiyle ATP üretimi de *r-B.firmus*, *r-B.subtilis* ve *r-B.licheniformis*'te yüksek iken *r-B.sphaericus* ve *r-B.amyloliquefaciens*'te aktif değildir. Genel olarak glikoliz yolizinden ATP üretiminin *r-B.licheniformis*'te en yüksek, *r-B.sphaericus*' ta en düşük olduğu belirlenmiştir.

ATP'nin yaşam fonksiyonları için kullanımı (maintenance) tepkime sisteminde ADP'ye dönüşümü olarak verilmiştir ve bu tepkime hızı *r-B.sphaericus*, *r-B.cereus*, *r-B.firmus* ve *r-B.licheniformis*'te sıfır iken *r-B.subtilis*'te en yüksektir. *r-B.sphaericus*, *r-B.cereus*, *r-B.firmus* ve *r-B.licheniformis*'te proses enerji kısıtlamalı iken, yaşam için harcanan enerji değeri sıfır olmayan *r-B.subtilis*, *r-B.amyloliquefaciens*, *r-B.badius*, *r-B.coagulans* ve *r-B.alvei*'de proses karbon kaynağı kısıtlamalıdır.

Son olarak SAP sentez akıları açısından mikroorganizmaları karşılaştırdığımızda, SAP sentezinin *r-B.licheniformis*'te en yüksek olduğu, onu *r-B.firmus* ve *r-B.sphaericus*'un takip ettiği ve *r-B.coagulans* ve *r-B.alvei*'de en düşük olduğu belirlenmiştir.

Bu çalışmada SAP üretimi için, SAP geninin transfer edilmesiyle dokuz rekombinant *Bacillus* türü geliştirilmiş ve bu mikroorganizmalarda hücreiçi tepkime akıları belirlenerek birbirleri ile kıyaslanmıştır. Aynı genin transfer edilmesine rağmen farklı hücreiçi tepkime hızlarının elde edilmesi, seçilen mikroorganizmaların hücreiçi kontrol mekanizmalarının farklı olduğunu göstermektedir. Genel olarak sonuçları özetlediğimizde amino asit ve SAP sentez akılarının *r-B.licheniformis*'te en yüksek, *r-B.alvei* ve *r-B.coagulans*'ta en düşük olduğu bulunmuştur. SAP sentez akısı düşük olan *r-B.alvei*'de özellikle serin, alanin, aromatik grubu amino asitlerin, ATP üretiminin düşük ve tirozin üretiminin aktif olmadığı; *r-B.coagulans*'ta ise özellikle alanin, aromatik, glutamik asit grubu akıların düşük ve fenilalanin üretiminin aktif olmadığı gözlenmiştir ve bunların SAP üretimi için darboğaz oluşturduğu

belirlenmiştir. Bu gruptaki amino asitlerin üretim ortamına eklenmesiyle hücre içi üretimi kontrol eden amino asitler belirlenerek genetik mühendisliği teknikleriyle üretim iyileştirilebilir sonucuna ulaşılmıştır. Bu aşamada, tanımlanmış ortamda SAP üretim hızı en yüksek bulunan *B.licheniformis* ile araştırmalar devam edilmiştir.

2.2.3. Hücre içi Metabolitlerin Derişimlerinin Ölçümü İçin Yöntem Geliştirilmesi

Hücelere uygulanacak ön işlemlerin belirlenmesi: Hücre içindeki metabolitlerin derişimlerinin belirlenmesi amacıyla lizozim enzimi ile hücre duvarını parçalama yöntemi geliştirilerek optimum koşulları araştırılmıştır. Bu amaçla pHV1431::*subC* taşıyan *r-B.licheniformis* SAP üretim ortamına aktarılmış ve prosesin yaklaşık 20. saatinde üretim ortamından alınan 3 cm³ hacmindeki örnekler 12000 dk⁻¹, 0°C'ta 10 dk santrifüjlenerek sıvısından ayrılmıştır. Çöken hücreler daha sonra +4°C'taki 1 cm³ steril saf su ile mikropipet yardımıyla yıkanmış ve 12000 dk⁻¹, 0°C'ta 10 dk santrifüjlenmiş ve sıvı kısım ayrılmıştır. Böylece mikroorganizmaların yüzeylerinde kalan amino asit, organik asit ve protein gibi metabolitler ortamdaki uzaklaştırılmıştır. Birbirine yapışık hücreleri ayırmak ve yüzeyi daha iyi temizlemek için örnekler yine mikropipet yardımıyla +4°C'taki 1 cm³ %0.9'luk NaCl çözeltisi ile yıkanmış; 12000 dk⁻¹, 0°C'ta 10 dk santrifüjlenerek sıvısı ayrılmıştır. Örneklerin herbirine yıkama işlemlerinden sonra Tablo 8'de belirtilen farklı ön işlemler uygulanmış ve sonuçlar karşılaştırılmıştır.

Tablo 8'de belirtilen ön işlemlerden geçirildikten sonra örneklere 750 µl haciminde (2mg/ml; 48000U/mg) lizozim enzimi eklenmiş ve +4°C'ta soğutucuda 2 saat süresince tepkime gerçekleştirilmiştir. Bu sürenin sonunda ortamdaki DNA ve RNA'nın çöktürülmesi amacıyla birinci, ikinci, dördüncü ve beşinci örneklere lizozim hacminin 0.7 katı kadar (525 µl) izopropanol, üçüncü örneğe ise izopropanola alternatif aynı hacimde etanol eklenmiş ve tepkimelerin durdurulması için örnekler -20°C'a konulmuştur. Bu deneyde aynı işlemlerden geçirilen ikinci ve üçüncü örneklerdeki hücrelerden birine izopropanol diğerine ise etanol eklenerek, ortamdaki DNA ve RNA'nın çöktürülmesi için kullanılan alkolün etkisi de araştırılmıştır. -20°C sıcaklıkta en az 20 dk süresince bekletilen örnekler 12000 dk⁻¹, 0°C'ta 10 dk santrifüjlenmiş; çöken DNA ve RNA sıvısından ayrılarak, hücre içi metabolitleri içeren sıvı kısım temiz bir ependorf tüpüne alınmıştır. Örnekler amino asit analiz sisteminde analizlenmiş ve incelenen her koşul için hücre içi amino asit derişimleri belirlenmiştir. Hücre en etkin birinci yöntem ile parçalandığı için yıkama işlemlerinden sonra başka bir ön işlem uygulanmadan lizozim enzimi eklenmesinin, DNA ve RNA'yı çöktürmek için de izopropanol eklenmesinin uygun olduğu belirlenmiş ve bu yöntem üzerinde çalışılmaya devam edilmiştir.

Tablo 8. Hücreiçi metabolitlerin belirlenmesi için yöntem geliştirilmesinde hücreye uygulanan önişlemlerin etkisi

| örnek | uygulanan önişlem | eklenen alkol | lizozim derişimi, mg/ml |
|-------|--|---------------|-------------------------|
| 1 | — | izopropanol | 2 |
| 2 | +4°C'ta ultrasonik banyoda 20 dk bekletme | izopropanol | 2 |
| 3 | +4°C'ta ultrasonik banyoda 20 dk bekletme | etanol | 2 |
| 4 | 1 saat dondurarak kurutma | izopropanol | 2 |
| 5 | +4°C'ta ultrasonik banyoda 20 dk bekletme ve 1 saat dondurarak kurutma | izopropanol | 2 |

Üretim ortamından alınacak örnek hacminin ve lizozim ile tepkime süresinin belirlenmesi : *R-B.licheniformis* ile hücreiçi metabolitlerin belirlenmesi için yöntem geliştirilmesi çalışmalarının sonraki aşamasında üretim ortamından t=20 saatte alınan hücreler ile sonuçların tekrarlanabilirliğini göstermek amacıyla incelenen her koşul için paralel iki örnek hazırlanmıştır. 12 tane örnek için 1.5 cm³ ve 3.0 cm³ hacminde alınan hücreler 1, 2, 4, 8 ve 24 saat süresince lizozim enzimi ile tepkimeye bırakılmış; böylece bir yandan sonuçların tekrarlanabilirliği sınanırken diğer yandan üretim ortamından alınacak örnek hacmi ve lizozim ile optimum tepkime süresi de belirlenmiştir (Tablo 9). Tablo 9'da belirtilen hacimlerde alınan hücreler önce +4°C'taki 1 cm³ steril saf su ile mikropipet yardımıyla yıkanmış ve 12000 dk⁻¹, 0°C'ta 10 dk santrifüjlenerek sıvısı dökülmüştür. Daha sonra hücreler yine mikropipet yardımıyla +4°C'taki 1 cm³ %0.9'luk NaCl çözeltisi ile yıkanmış; 12000 dk⁻¹, 0°C'ta 10 dk santrifüjlenerek sıvısı dökülmüştür. Her örnek için aynı derişimde (2 mg/ml) 750 µl lizozim enzimi eklenerek Tablo 9'da belirtilen sürelerde buz içinde +4°C'ta tepkimeye bırakılmıştır. Hücreler her yarım saatte bir mikropipet yardımıyla karıştırıldığı için buz içerisinde olmalarına dikkat edilmiştir. Belirtilen sürelerin sonunda örneklere 525 µl izopropanol eklenerek -20°C'ta saklanmış; daha sonra amino asit analiz sisteminde analizlenmiştir. 1 saat süresince tepkimenin gerçekleştiği örneklerde diğerlerine kıyasla daha az sayıda amino asit gözlenirken, 2, 4, 8 ve 24 saat süresince tepkimenin gerçekleştiği örneklerde aynı sayıda ve derişimde amino asit gözlenmiştir. Üretim ortamından alınacak örnek hacminin 1.5 cm³ veya 3.0 cm³ olması durumunda ise sonucun değişmediği, homojen örnek almak koşulu ile 1.5 cm³ hacmin yeterli olduğu da görülmüştür. Sonuç

olarak araştırılan koşullar için amino asit dağılımları incelendiğinde en fazla sayıda amino asitin 1.5 cm³ örnek haciminde ve 2 saat tepkime süresinde elde edildiği belirlenmiştir.

Lizozim derişimi, karıştırma etkisi ve türevlendirme basamağındaki modifikasyonların belirlenmesi: Enzimatik tepkimelerle hücre duvarını parçalayarak hücreiçi metabolit derişimlerinin belirlenmesi için yöntem geliştirilmesi çalışmalarının üçüncü aşamasında 2, 6 ve 24 saat tepkime sürelerinde lizozim derişiminin etkisi araştırılmış; bununla birlikte daha etkin ve sistematik bir karıştırma yapmak amacıyla farklı yöntemler de incelenmiştir. Hücreiçi metabolitlerden amino asit ve organik asit derişimlerinin belirlendiği analiz sistemlerinde (sırasıyla Waters, AAAS ve Quanta, 4000E) cihazların belli bir hassasiyet sınırı olduğundan belirli derişimlerin altındaki pikler gözlenememiştir. Bu nedenle hücreiçi metabolitlerden amino asitlerin belirlenmesinde analiz basamaklarından biri olan türevlendirme basamağında türevlendirilecek örnek hacmi ve sisteme enjekte edilecek örnek hacmi ile ilgili modifikasyonlar yapılarak en fazla sayıda metabolitin gözlenebildiği optimum koşullar bulunmuştur (Tablo 10). Tablo 10'da üretim ortamından 1.5 cm³ haciminde alınan hücreler önce +4°C'taki 1 cm³ steril saf su ile mikropipet yardımıyla yıkanmış ve 12000 dk⁻¹, 0°C'ta 10 dk santrifüjlenerek sıvısı dökülmüştür. Daha sonra yine mikropipet yardımıyla +4°C'taki 1 cm³ %0.9'luk NaCl çözeltisi ile yıkanmış; 12000 dk⁻¹, 0°C'ta 10 dk santrifüjlenerek sıvısı dökülmüştür. Her örneğe Tablo 10'da belirtilen derişimlerde 750 µl lizozim enzimi eklenerek, buz içinde +4°C'taki soğutucuda tepkimeye bırakılmış ve Tablo 10'da belirtilen sistematik ve belirtilen yöntemle karıştırılmıştır. Tepkime süresi 2 ve 6 saat olan örnekler için her 15 dk veya 30 dk'da bir 10 sn süreyle karıştırma yapılmış, ancak tepkime süresi 24 saat olan örneklerde bu karıştırma aynı sistematik yapılamamıştır. Belirtilen

Tablo 9. Hücreiçi metabolitlerin belirlenmesi için yöntem geliştirilmesinde örnek hacmi ve tepkime süresinin etkisi

| örnek | örnek hacmi, cm ³ | tepkime süresi, st | lizozim derişimi, mg/ml |
|-------|------------------------------|--------------------|-------------------------|
| 1 | 1.5 | 1 | 2 |
| 2 | 1.5 | 1 | 2 |
| 3 | 1.5 | 2 | 2 |
| 4 | 1.5 | 2 | 2 |
| 5 | 3.0 | 2 | 2 |
| 6 | 1.5 | 4 | 2 |
| 7 | 1.5 | 4 | 2 |
| 8 | 3.0 | 4 | 2 |
| 9 | 1.5 | 8 | 2 |
| 10 | 1.5 | 8 | 2 |
| 11 | 1.5 | 24 | 2 |
| 12 | 1.5 | 24 | 2 |

Tablo 10. Hücreiçi metabolitlerin belirlenmesi için yöntem geliştirilmesinde lizozim derişimi, karıştırma türü ve sistematığının etkisi

| örnek | lizozim derişimi, mg/ ml | karıştırma türü | karıştırma sistematığı | tepkime süresi, st |
|-------|--------------------------|-----------------|------------------------|--------------------|
| 1 | 4 | mikropipet | her15 dk'da, 10 sn | 2 |
| 2 | 2 | vorteks | her15 dk'da, 10 sn | 2 |
| 3 | 2 | mikropipet | her15 dk'da, 10 sn | 6 |
| 4 | 2 | vorteks | her15 dk'da, 10 sn | 6 |
| 5 | 2 | vorteks | her30 dk'da, 10 sn | 6 |
| 6 | 4 | vorteks | her30 dk'da, 10 sn | 6 |
| 7 | 4 | vorteks | her15 dk'da, 10 sn | 6 |
| 8 | 2 | mikropipet | 60 dk'da, 10 sn* | 24 |
| 9 | 2 | vorteks | 60 dk'da, 10 sn* | 24 |
| 10 | 2 | vorteks | 30 dk'da, 10 sn* | 24 |
| 11 | 4 | vorteks | 60 dk'da, 10 sn* | 24 |
| 12 | 4 | vorteks | 30 dk'da, 10 sn* | 24 |

*belirtilen tepkime süresinin tamamında aynı sistematikte karıştırma yapılamamıştır

tepkime sürelerinin sonunda örneklere 525 µl izopropanol eklenerek -20°C'ta saklanmıştır. Tablo 10'da belirtilen örneklerin amino asit analiz sisteminde analizlenmesi sırasında, analiz basamaklarından biri olan türevlendirme basamağında her örnekten 5 µl yerine 20 ve 100 µl türevlendirilmiş; analiz sırasında sisteme 4µl yerine 10µl enjekte edilmiştir.

Sonuçlar karşılaştırıldığında aynı koşullar için lizozim derişiminin iki katına çıkarılmasıyla sonucun değişmediği, üretim ortamından alınan 1.5 cm³ hücre için 2 mg/ml derişiminde 750 µl lizozim enziminin yeterli olduğu belirlenmiştir. Bir önceki deneyde elde edilen sonuçları ve deneylerin tekrarlanabilirliğini sınamak amacıyla farklı tepkime sürelerinde incelenen örneklerde tepkime süresinin uzatılmasıyla sonucun değişmediği, 2, 6 ve 24 saat tepkime sürelerinde aynı sayıda ve derişimde amino asitin gözlenebildiği belirlenmiştir.

Sonuç olarak hücreiçi metabolit derişimlerinin belirlenmesi için yöntem geliştirilmesi amacıyla yapılan araştırmalar kapsamında lizozim enzimi ile hücre duvarı parçalanarak, hücre içindeki metabolitlerin tamamının gözlenebildiği optimum koşullar belirlenmiştir. Buna göre üretim ortamından alınan hücreler santrifüjlenerek ortamdan ayrıldıktan sonra sırasıyla +4°C'taki 1 cm³ steril

saf su ve %0.9'luk NaCl çözeltisi ile yıkanmıştır. 12000 dk⁻¹, 0°C'ta 10 dk santrifüjlendikten sonra hücreler üzerindeki az miktardaki sıvı da mikropipet yardımıyla alınmış ve hücrelere 2 mg/ml derişiminde 750 µl lizozim enzimi eklenerek 2 saat süresince 0°C 'ta tepkime gerçekleştirilmiştir. Yapılan araştırmalar sonunda karıştırma türü ve sistematığının de etkili olduğu görülmüş; en fazla sayıda metabolitin buz içindeki örneklerin 15 dakika arayla 10 saniye süresince vortekslenmesi sonucunda elde edildiği belirlenmiştir. Tepkime süresinin sonunda örneklere 525 µl izopropanol eklenerek tepkime durdurulmuş ve örnekler -20°C 'ta saklanmıştır.

Yapılan araştırmalar sonunda hücre içindeki metabolitlerden düşük derişimdeki amino asitlerin gözlenebilmesi için örneklerin amino asit analiz sisteminde (Waters, AAAS) analizlenmesi sırasında, analiz basamaklarından biri olan türevlendirme basamağında da modifikasyonlar yapılması gerektiği görülmüştür. Buna göre hücre dışı amino asit analizleri için 5 µl örnek yeterli olurken, hücreiçi analizler için 100 µl örnek kullanılmış; AAAS'ne ise 4 µl yerine 10 µl enjekte edilmiştir. Kapılar elektroferez (Quanta 4000E) sisteminde yapılan organik asit analizlerinde ise örnekler kalma süresine bağlı olarak farklı oranlarda seyreltilerek sisteme enjekte edilmiştir.

SAP üretiminde tanımlanmış ortamda (Tablo 4) hücreiçi metabolit derişimlerinin zamanla değişimleri incelenmiş ve proses süresince hücreiçi valin derişiminin düşük olması nedeniyle alanin grubu amino asitlerin SAP üretimine etkisi araştırılmıştır.

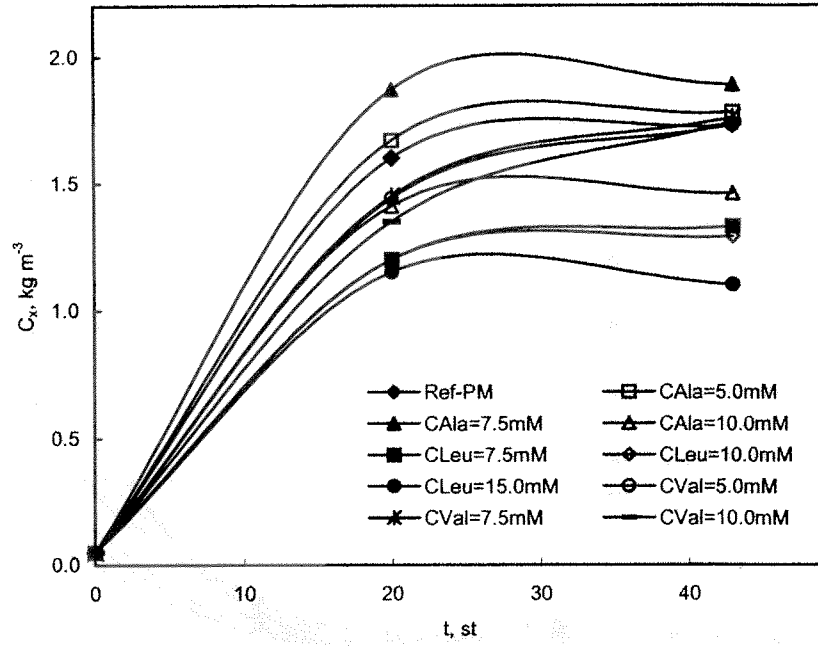
2.2.4. Alanin-Grubu Amino Asitlerin Etkisi

2.2.4.1. Alanin-grubu amino asitlerin hücre çoğalmasına etkisi

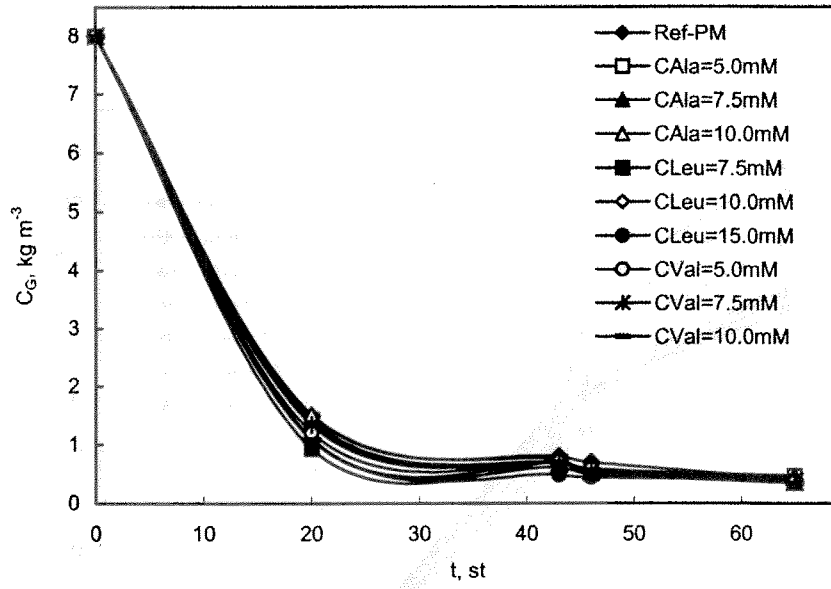
R-*B.licheniformis* pHV1431::subC SAP üretimine farklı başlangıç alanin C_{Ala}^0 , lözin C_{Leu}^0 , ve valine C_{Val}^0 derişimlerinin etkisi ve amino asitlerin üretim ortamına eklenme zamanları ($t=0$ st ve $t=18$ st) etkisi $C_{AA}^0=0-15$ mM aralığında araştırılmıştır. Hücre derişiminin başlangıç amino asit derişimi ve proses süresince değişimi Şekil 11'de verilmiştir. $t=18$ st üretim ortamına eklenen amino asitler hücre derişimini etkilememiş; $t=0$ st'te $C_{Ala}^0=7.5$ mM derişimine kadar hücre derişimi artarken daha yüksek değerler hücre çoğalmasını azaltmıştır. Üretim ortamına lözin eklenmesi hücre üretimini azaltırken, valine eklenmesi etkilememiştir (Şekil 11). En yüksek verim $C_{Ala}^0=7.5$ mM ile $Y_{X/S}=0.24$ olarak elde edilmiştir.

2.2.4.2. Alanin-grubu amino asitlerin substrat tüketimine etkisi

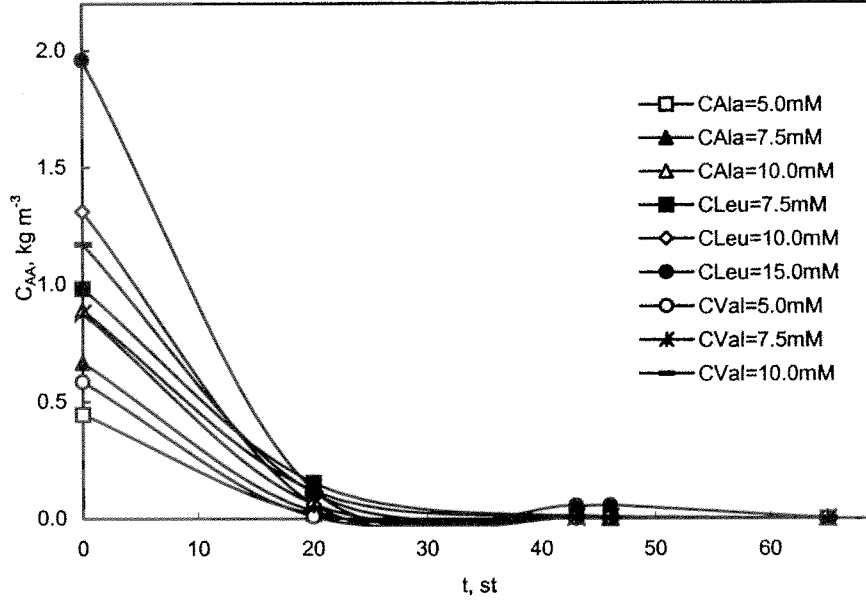
Glukoz derişiminin başlangıç amino asit derişimi ve proses süresince değişimi Şekil 12'de, başlangıç alanin grubu amino asitlerin, amino asit derişimi ve proses süresince değişimi Şekil 13'de verilmiştir. verilmiştir. Glukoz tüketim hızı, başlangıç amino asit derişiminin artması ile artmıştır. Alanin tüketim



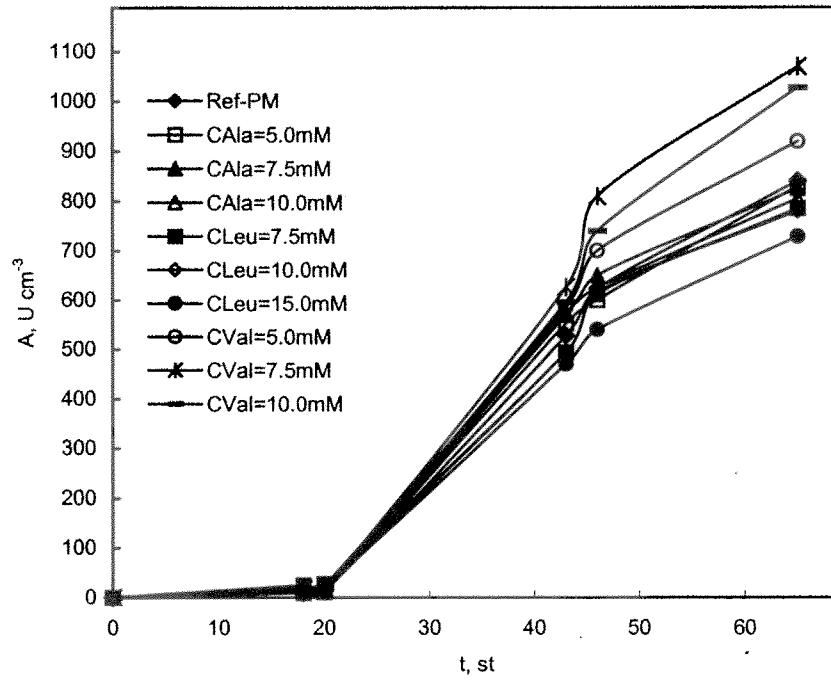
Şekil 11. Hücre derişiminin alanin grubu amino asit derişimleri ve zamanlade ğişimi



Şekil 12. Glukoz derişiminin alanin grubu amino asit derişimleri ve zamanla deĝişimi



Şekil 13. Amino asit derişimlerinin zamanla değişimi



Şekil 14. SAP aktivitesinin alanin grubu amino asit derişimleri ve zamanla değişimi

Tablo 11. Alanin grubu amino asitlerin ekleme zamanının SAP üretimine etkisi

| Amino asit ekleme zamanı: t= 0 st | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| | Ref-PM | | 2.5 mM | | 5.0 mM | | 7.5 mM | | 10 mM | | 15 mM | |
| | A Ucm ⁻³ t=43st | A Ucm ⁻³ t=65st | A Ucm ⁻³ t=43st | A Ucm ⁻³ t=65st | A Ucm ⁻³ t=43st | A Ucm ⁻³ t=65st | A Ucm ⁻³ t=43st | A Ucm ⁻³ t=65st | A Ucm ⁻³ t=43st | A Ucm ⁻³ t=65st | A Ucm ⁻³ t=43st | A Ucm ⁻³ t=65st |
| Alanin | 525 | 840 | - | - | 552 | 830 | 570 | 825 | 574 | 805 | 593 | 783 |
| Lözin | 525 | 840 | 495 | 785 | 495 | 790 | 495 | 785 | 495 | 780 | 495 | 728 |
| Valin | 525 | 840 | 550 | 908 | 585 | 919 | 626 | 1070 | 596 | 1027 | 642 | 1015 |

| Amino asit ekleme zamanı: t= 18 st | | | | | | | | | | | | |
|------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| | Ref-PM | | 2.5 mM | | 5.0 mM | | 7.5 mM | | 10 mM | | 15 mM | |
| | A Ucm ⁻³ t=43st | A Ucm ⁻³ t=65st | A Ucm ⁻³ t=43st | A Ucm ⁻³ t=65st | A Ucm ⁻³ t=43st | A Ucm ⁻³ t=65st | A Ucm ⁻³ t=43st | A Ucm ⁻³ t=65st | A Ucm ⁻³ t=43st | A Ucm ⁻³ t=65st | A Ucm ⁻³ t=43st | A Ucm ⁻³ t=65st |
| Alanin | 525 | 840 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Lözin | 525 | 840 | 550 | 815 | 495 | 775 | 572 | 775 | 488 | 742 | - | - |
| Valin | 525 | 840 | 649 | 1008 | 635 | 962 | 643 | 1005 | 643 | 928 | 620 | 813 |

hızı başlangıç alanin derişiminin artması ile artmış; $C_{Ala}^0 = 5\text{mM}$ ve 7.5mM içeren ortamlarda analaninin tamamı $t = 20$ st tüketilirken, $C_{Ala}^0 = 10\text{mM}$ içeren ortamlarda alaninin % 90'I tüketilmiştir. Lözin tüketim hızı da başlangıç lözin derişiminin artması ile artmış; $t = 65$ st'te ortamda tüketilmemiş lözin kalmıştır. Alanine ve leucine tüketimine benzer olarak valin tüketim hızı da başlangıç valin derişiminin artması ile artmış; ancak araştırılan tüm derişimlerde $t = 24$ st'te valinin tamamı tüketilmiştir.

2.2.4.3. Alanin-grubu amino asitlerin SAP üretimi üzerine etkisi

SAP aktivitesinin başlangıç amino asit derişimi ve proses süresince değişimi Şekil 14'de gösterilmiştir. Alanin derişimi $C_{Ala}^0 = 0-15\text{mM}$ aralığında SAP üretimini etkilemezken; lözin inhibe etmiş; valin ise SAP üretimini attırmıştır. Alanin grubu amino asitlerin eklenme zamanının SAP üretimine etkisi Tablo 11'de gösterilmiştir. $t = 18$ st'te amino asit eklenmesi SAP üretimini artırmamıştır. En yüksek ürün verimi $Y_{A/S} = 0.134\text{ U g}^{-1}$ olarak $t = 0$ st'te 7.5mM eklenmesiyle elde edilirken en düşük verim 15mM başlangıç lözin derişiminde $Y_{A/S} = 0.097\text{ U g}^{-1}$ bulunmuştur.

2.2.5. Kompleks Ortam Tasarımı

2.2.5.1. Melas temelli kompleks ortam tasarımının SAP üretimine etkisi

Melas temelli kompleks ortam tasarımında, ilk aşamada rekombinant *Bacillus* türleri ile PP0, PP1a ve PP1b ön işlemleri görmüş farklı derişimlerde melas/hidrolizlenmiş melas ortamlarında üretim gerçekleştirilmiş ve en uygun rekombinant konak mikroorganizma ve melas derişimi belirlenmiştir.

PP0 melası etkisi

Rekombinant *Bacillus* türü (*r-B. amyloliquefaciens*, *r-B. cereus*, *r-B. licheniformis*, *r-B. subtilis*, *r-B. firmus*, *r-B. badius*, *r-B. sphaericus* ve *r-B. coagulans*) mikroorganizmaların melas ortamında SAP üretim potansiyellerinin ön kıyaslamasını yapmak amacıyla, seyreltme ve santrifüjleme fiziksel işlemleri görmüş ve PP0 olarak adlandırılmış melas ile optimum glukoz derişimine göre karar verilmiş $C_{So} = 25.0$ veya 16.0 kg m^{-3} olmak üzere iki farklı başlangıç sukroz derişiminde sekiz farklı rekombinant *Bacillus* türü hücre kullanılarak proteaz üretimi gerçekleştirilmiş ve kalma süresinin sukroz tüketim hızı, hücre derişimi, pH ve SAP aktivitesine etkisi incelenmiştir. Bu inceleme sonuçlarına göre karar verilen dört farklı *Bacillus* türü mikroorganizma ile PP0 melası başlangıç sukroz derişimi ve melas ön işlemleri etkisi detaylı olarak araştırılmıştır.

PP0 melası ortamında aktivitesi yüksek olan mikroorganizmayı belirlemek amacıyla kullanılan sekiz farklı rekombinant *Bacillus* türü hücre arasından *r-B. amyloliquefaciens* ve *r-B. cereus* ile -optimum başlangıç glukoz derişimleri yüksek (20.0 kg m^{-3}) olması sebebiyle $C_{S_0}=25.0 \text{ kg m}^{-3}$ başlangıç sukroz derişiminde; *r-B. licheniformis*, *r-B. subtilis*, *r-B. badius*, *r-B. firmus*, *r-B. sphaericus* ve *r-B. coagulans* ile ise -optimum başlangıç glukoz derişimleri düşük ($6.0-10.0 \text{ kg m}^{-3}$) olması sebebiyle- $C_{S_0}=16.0 \text{ kg m}^{-3}$ başlangıç sukroz derişiminde laboratuvar ölçekte SAP üretimi incelenmiştir. Mikroorganizma türü ve kalma süresinin; sukroz tüketimine etkisi Şekil 15'de, hücre derişimine etkisi Şekil 16'da, SAP aktivitesine etkisi Şekil 17'de gösterilmiştir.

Başlangıç sukroz derişiminin kalma süresi ile değişimi incelendiğinde (Şekil 15) SAP üretiminin başladığı yaklaşık $t=18 \text{ st}$ 'ten sonra önemli ölçüde sukroz tüketiminin olmadığı görülmektedir. *r-B. amyloliquefaciens*, *r-B. cereus*, *r-B. licheniformis*, *r-B. subtilis*, *r-B. firmus*, *r-B. badius*, *r-B. sphaericus* ve *r-B. coagulans* ile sırasıyla sukrozun %87, %92, %96, %93, %95, %94, %95 ve %93'ü tüketilmiştir.

r-B. amyloliquefaciens, *r-B. cereus*, *r-B. licheniformis*, *r-B. badius* ve *r-B. sphaericus* derişimleri yaklaşık $t=20 \text{ st}$ 'te, *r-B. subtilis*, *r-B. firmus* ve *r-B. coagulans* derişimleri ise $t=40 \text{ st}$ 'te durgunluk fazına ulaşmıştır (Şekil 16). Kullanılan mikroorganizma türüne bağlı olarak maksimum hücre derişimi $10.0-12.0 \text{ kg m}^{-3}$ aralığında değişmektedir.

Farklı *Bacillus* türleri ile SAP aktivitesinin kalma süresi ile değişimini veren Şekil 17 incelendiğinde, *r-B. subtilis* ile maksimum aktiviteye ulaşıldığı görülmektedir. Bu değer $t=63 \text{ st}$ 'te 2178 U cm^{-3} 'tür. *r-B. amyloliquefaciens*, *r-B. cereus*, *r-B. licheniformis* ile ise maksimum SAP aktivitesi sırasıyla $t=88 \text{ st}$ 'te 1453 U cm^{-3} , $t=88 \text{ st}$ 'te 1972 U cm^{-3} , $t=65 \text{ st}$ 'te 1200 U cm^{-3} 'tür.

PP0 melası ile elde edilen sonuçlar ışığında en yüksek aktivite gözlenen *r-B. subtilis*; önceki çalışmalarla kıyaslayabilmek amacıyla *r-B. licheniformis*; ve optimum glukoz derişimi yüksek, dolayısıyla da enzim aktivitesini inhibe etmeden yüksek derişimde substrat tüketim potansiyeline sahip mikroorganizmalar *r-B. amyloliquefaciens* ve *r-B. cereus* ile ayrı ayrı başlangıç sukroz derişimi etkileri araştırılmış ve ilgili sonuçlar aşağıda verilmiştir.

Rekombinant *Bacillus amyloliquefaciens* ile üretim: Rekombinant *B. amyloliquefaciens* ile $C_{S_0}=15.0, 20.0, 25.0, 35.0, 45.0$ ve 55.0 kg m^{-3} başlangıç sukroz derişimlerinde PP0 melası ortamları ile SAP üretimi gerçekleştirilmiştir. Sukroz tüketim hızının $t=0-18 \text{ st}$ 'te yüksektir. Başlangıç substrat derişiminin artmasıyla substrat tüketim hızı artmış; proses sonunda $C_{S_0}=15.0, 20.0, 25.0, 35.0, 45.0,$

PP0 melası ortamında aktivitesi yüksek olan mikroorganizmayı belirlemek amacıyla kullanılan sekiz farklı rekombinant *Bacillus* türü hücre arasından *r-B. amyloliquefaciens* ve *r-B. cereus* ile -optimum başlangıç glukoz derişimleri yüksek (20.0 kg m^{-3}) olması sebebiyle $C_{S0}=25.0 \text{ kg m}^{-3}$ başlangıç sukroz derişiminde; *r-B. licheniformis*, *r-B. subtilis*, *r-B. badius*, *r-B. firmus*, *r-B. sphaericus* ve *r-B. coagulans* ile ise -optimum başlangıç glukoz derişimleri düşük ($6.0-10.0 \text{ kg m}^{-3}$) olması sebebiyle- $C_{S0}=16.0 \text{ kg m}^{-3}$ başlangıç sukroz derişiminde laboratuvar ölçekte SAP üretimi incelenmiştir. Mikroorganizma türü ve kalma süresinin; sukroz tüketimine etkisi Şekil 15’de, hücre derişimine etkisi Şekil 16’da, SAP aktivitesine etkisi Şekil 17’de gösterilmiştir.

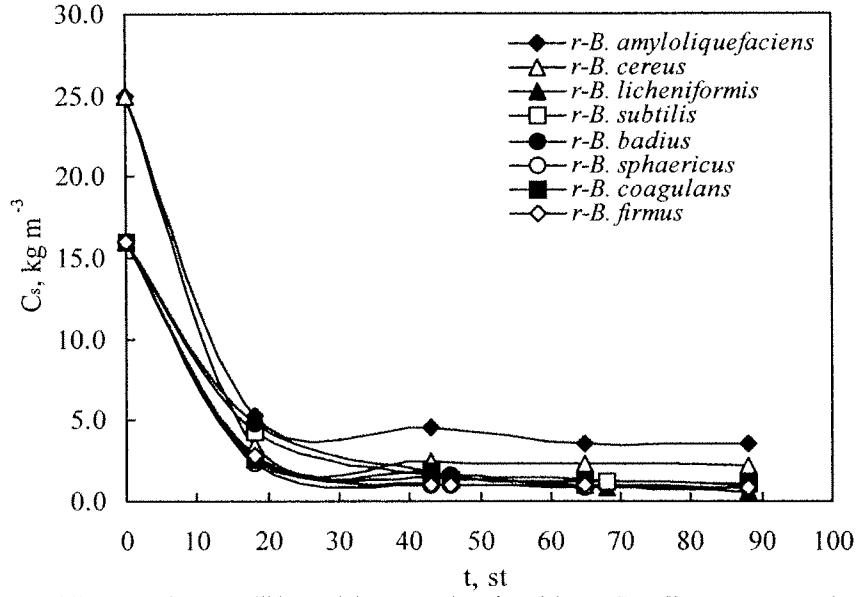
Başlangıç sukroz derişiminin kalma süresi ile değişimi incelendiğinde (Şekil 15) SAP üretiminin başladığı yaklaşık $t=18$ st’ten sonra önemli ölçüde sukroz tüketiminin olmadığı görülmektedir. *r-B. amyloliquefaciens*, *r-B. cereus*, *r-B. licheniformis*, *r-B. subtilis*, *r-B. firmus*, *r-B. badius*, *r-B. sphaericus* ve *r-B. coagulans* ile sırasıyla sukrozun %87, %92, %96, %93, %95, %94, %95 ve %93’ü tüketilmiştir.

r-B. amyloliquefaciens, *r-B. cereus*, *r-B. licheniformis*, *r-B. badius* ve *r-B. sphaericus* derişimleri yaklaşık $t=20$ st’te, *r-B. subtilis*, *r-B. firmus* ve *r-B. coagulans* derişimleri ise $t=40$ st’te durgunluk fazına ulaşmıştır (Şekil 16). Kullanılan mikroorganizma türüne bağlı olarak maksimum hücre derişimi $10.0-12.0 \text{ kg m}^{-3}$ aralığında değişmektedir.

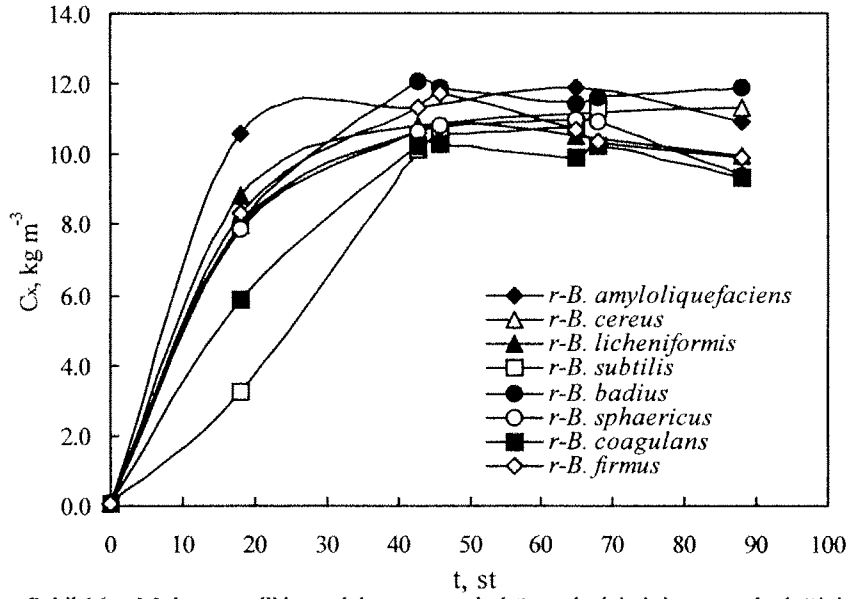
Farklı *Bacillus* türleri ile SAP aktivitesinin kalma süresi ile değişimini veren Şekil 17 incelendiğinde, *r-B. subtilis* ile maksimum aktiviteye ulaşıldığı görülmektedir. Bu değer $t=63$ st’te 2178 U cm^{-3} ’tür. *r-B. amyloliquefaciens*, *r-B. cereus*, *r-B. licheniformis* ile ise maksimum SAP aktivitesi sırasıyla $t=88$ st’te 1453 U cm^{-3} , $t=88$ st’te 1972 U cm^{-3} , $t=65$ st’te 1200 U cm^{-3} ’tür.

PP0 melası ile elde edilen sonuçlar ışığında en yüksek aktivite gözlenen *r-B. subtilis*; önceki çalışmalarla kıyaslayabilmek amacıyla *r-B. licheniformis*; ve optimum glukoz derişimi yüksek, dolayısıyla da enzim aktivitesini inhibe etmeden yüksek derişimde substrat tüketim potansiyeline sahip mikroorganizmalar *r-B. amyloliquefaciens* ve *r-B. cereus* ile ayrı ayrı başlangıç sukroz derişimi etkileri araştırılmış ve ilgili sonuçlar aşağıda verilmiştir.

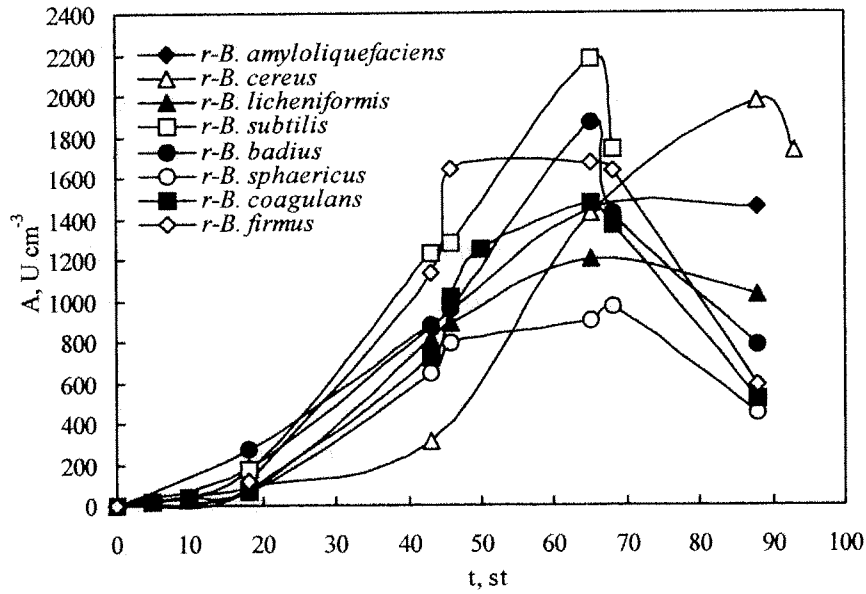
Rekombinant *Bacillus amyloliquefaciens* ile üretim: Rekombinant *B. amyloliquefaciens* ile $C_{S0}=15.0, 20.0, 25.0, 35.0, 45.0$ ve 55.0 kg m^{-3} başlangıç sukroz derişimlerinde PP0 melası ortamları ile SAP üretimi gerçekleştirilmiştir. Sukroz tüketim hızının $t=0-18$ st’te yüksektir. Başlangıç substrat derişiminin artmasıyla substrat tüketim hızı artmış; proses sonunda $C_{S0}=15.0, 20.0, 25.0, 35.0, 45.0,$



Şekil 15. Melas temelli kompleks ortamda rekombinant *Bacillus* türünün sukroz tüketimine etkisi



Şekil 16. Melas temelli kompleks ortamında hücre derişiminin zamanla değişimi



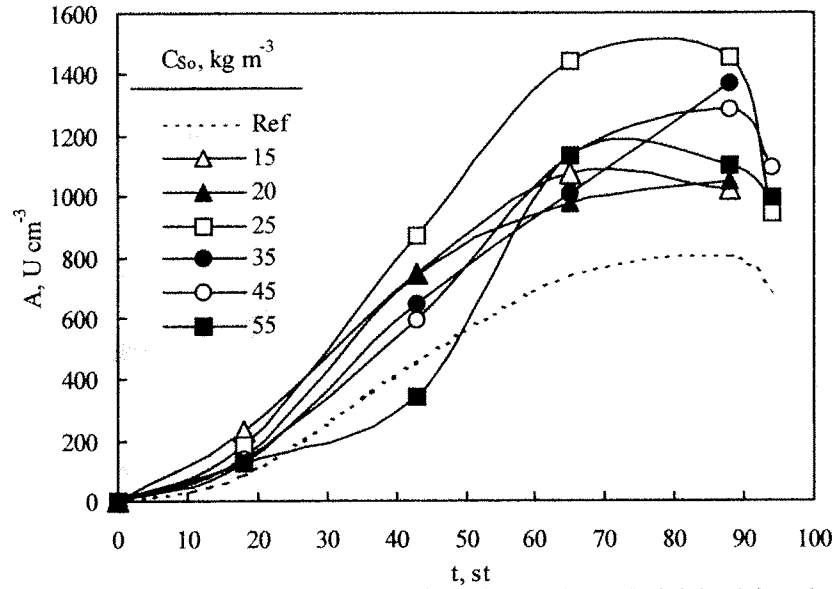
Şekil 17. Melas temelli kompleks ortamda rekombinant *Bacillus* türünün SAP üretimine etkisi

55.0 kg m⁻³ olan başlangıç sukroz derişimlerinde proses sonunda sırasıyla sukrozun %93, %92, %90, %89, %86 ve %84' ünün tüketildiği belirlenmiştir. *r-B. amyloliquefaciens* derişimi PP0 melası ortamında referans ortama göre daha yüksektir. En yüksek mikroorganizma derişimi başlangıç substrat derişimine bağlı olarak 9.0-13.0 kg m⁻³ aralığında değişmektedir. Glukoz derişimi 20.0 kg m⁻³ olan referans ortamda ise *r-B. amyloliquefaciens* derişimi 2.0 kg m⁻³ tür. SAP aktivitesinin kalma süresi ile derişimini incelendiğinde, C_{so}=25.0 kg m⁻³ sukroz içeren PP0 melası ortamında aktivitenin daha yüksek olduğu görülmektedir (Şekil 18). Bu ortamda elde edilen aktivite t=65-88 st'te 1453 U cm⁻³ tür ve referans ortamın aktivitesinden 1.8 kat daha yüksektir. Bu derişimden düşük ve yüksek sukroz derişimlerdeki PP0 melası ortamlarında aktivitede azalma görülmektedir.

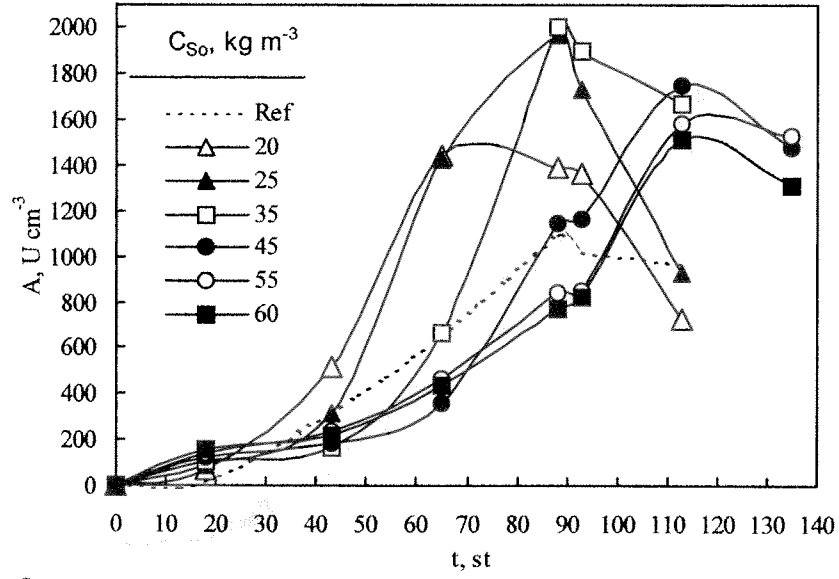
Rekombinant *Bacillus cereus* ile üretim: Rekombinant *B. cereus* ile C_{so}= 20.0, 25.0, 35.0, 45.0, 55.0 ve 60.0 kg m⁻³ başlangıç sukroz derişimlerinde PP0 melası ortamları ile SAP üretimi gerçekleştirilmiştir. Sukroz tüketiminin; C_{so} = 20.0-35.0 kg m⁻³ aralığında t=18 st'te tamamlandı; C_{so} ≥ 45.0 kg m⁻³ koşullarında ise yaklaşık t=65 st'e kadar sürdüğü bulunmuştur. Proses sonunda C_{so}=20.0, 25.0, 35.0, 45.0, 55.0 ve 60.0 kg m⁻³ sukroz içeren ortamlarda sırasıyla sukrozun %94, %95, %96, %96, %93 ve %92'si tüketilmiştir. *r-B. cereus* derişimi PP0 melası ortamında referans ortama kıyasla yaklaşık 6 kat daha yüksektir. Başlangıç substrat derişimine bağlı olarak en yüksek hücre derişimi 10.0-12.0 kg m⁻³ aralığında değişmektedir. Glukoz derişimi 20.0 kg m⁻³ olan referans ortamda ise *r-B.*

cereus derişimi 2.2 kg m^{-3} tür. $C_{s0} = 25.0$ ve 35.0 kg m^{-3} sukroz içeren PP0 melası ortamlarında SAP aktivitelerinin birbirine yakın ve yüksek olduğu bulunmuştur (Şekil 19). Bu ortamlarda elde edilen aktiviteler $t=88$ st'te sırasıyla 1972 ve 2008 U cm^{-3} tür ve referans ortamın aktivitesinden 1.8 kat daha yüksektir. Bu derişimlerden düşük ve yüksek sukroz derişimlerdeki PP0 melası ortamlarında aktivitede azalma görölmektedir. $C_{s0} \geq 45.0 \text{ kg m}^{-3}$ başlangıç sukroz derişimlerinde aktivitedeki düşüşü gözleyebilmek amacıyla üretime $t=135$ st süresince devam edilmiştir.

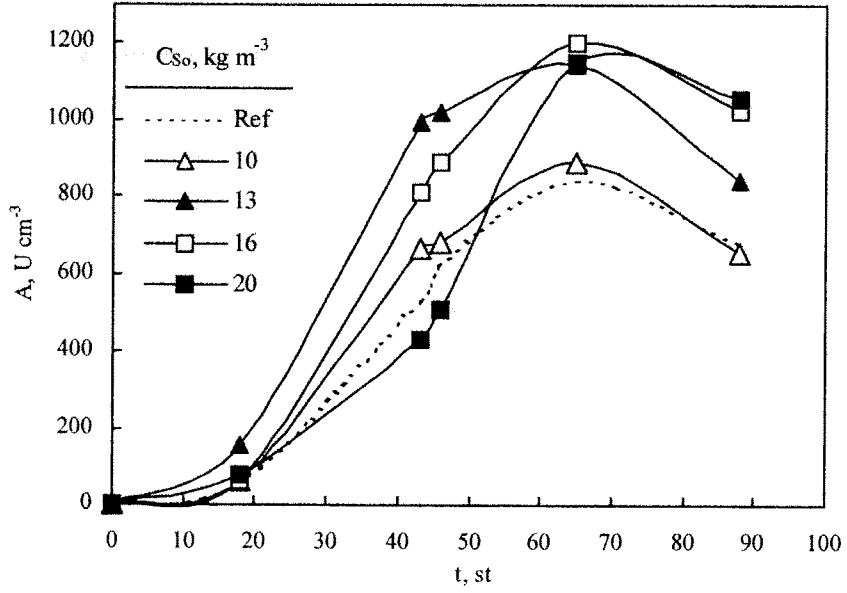
Rekombinant *Bacillus licheniformis* ile üretim: Rekombinant *B. licheniformis* ile $C_{s0} = 10.0, 13.0, 16.0$ ve 20.0 kg m^{-3} başlangıç sukroz derişimlerinde PP0 melası ortamları ile SAP üretimi gerçekleştirilmiştir. Proseste $t=18$ st'e kadar sukroz tüketiminin tamamlanmıştır. Proses sonunda bütün ortamlarda melas içindeki sukrozun yaklaşık olarak %96'sı tüketilmiştir. *r-B. licheniformis* derişimi PP0 melası ortamında başlangıç glukoz derişimi 8.0 kg m^{-3} olan referans ortama göre daha yüksektir. PP0 melası başlangıç derişimine bağılı olarak en yüksek hücre derişimi $8.0-11.0 \text{ kg m}^{-3}$ aralığında değışirken referans ortamda 1.8 kg m^{-3} tür. En yüksek SAP aktivitesinin $t=65$ st'te 1200 U cm^{-3} değıeri ile $C_{s0} = 16.0 \text{ kg m}^{-3}$ sukroz içeren PP0 melas ortamında elde edilmiştir (Şekil 20). Bu değıer referans ortamın aktivitesinden 1.3 kat daha yüksektir. $C_{s0} = 13.0$ ve 20.0 kg m^{-3} sukroz derişimlerinde elde edilen maksimum aktivite değıerleri de $C_{s0} = 16.0 \text{ kg m}^{-3}$ teki değıere yakındır ve sırasıyla 1142 U cm^{-3} ve 1150 U cm^{-3} tür.



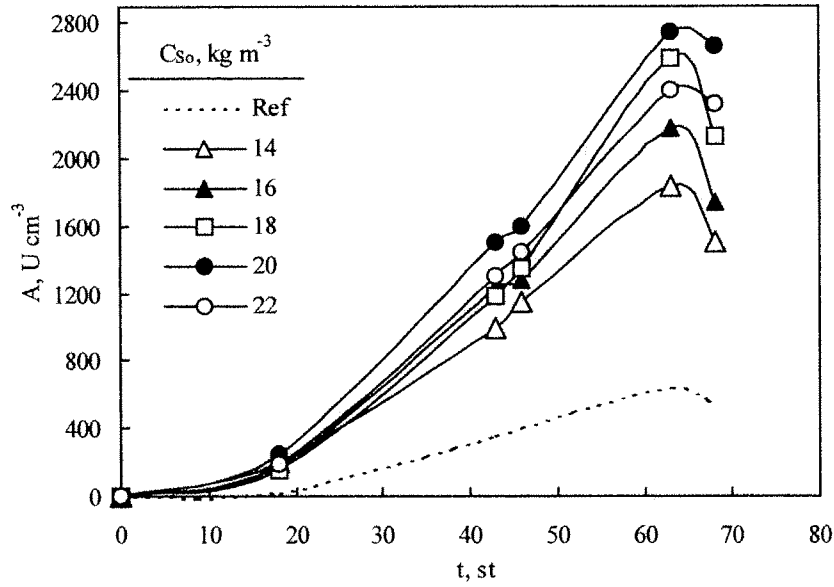
Şekil 18. Rekombinant *Bacillus amyloliquefaciens* ile SAP aktivitesinin sukroz derişimi ve zamanla değışimi



Şekil 19. Melas temelli kompleks ortamda rekombinant *Bacillus cereus* ile SAP aktivitesinin sukroz derişiminin ve zamanla değişimi



Şekil 20. Melas temelli kompleks ortamda rekombinant *Bacillus licheniformis* ile SAP aktivitesinin sukroz derişiminin ve zamanla değişimi



Şekil 21. Melas temelli kompleks ortamda rekombinant *Bacillus subtilis* ile SAP aktivitesinin sukroz derişiminin ve zamanla değişimi

Rekombinant *Bacillus subtilis* ile üretim: Rekombinant *B.subtilis* ile $C_{so}=14.0, 16.0, 18.0, 20.0$ ve 22.0 kg m^{-3} başlangıç sukroz derişimlerinde PP0 melası ortamları ile SAP üretimi gerçekleştirilmiştir. *r-B. subtilis* ile sukroz tüketiminin $t=0-18$ st aralığında önemli ölçüde tamamlanmıştır. $C_{so}=14.0, 16.0, 18.0, 20.0$ ve 22.0 kg m^{-3} sukroz içeren ortamlarda sırasıyla sukrozun %92, %90, %86, %85 ve %86'sı tüketilmiştir. *r-B. subtilis* derişimi PP0 melası ortamında başlangıç glukoz derişimi 8.0 kg m^{-3} olan referans ortama göre daha yüksektir. PP0 melası başlangıç derişimine bağlı olarak en yüksek hücre derişimi $10.0-12.5 \text{ kg m}^{-3}$ aralığında değişirken referans ortamda 1.0 kg m^{-3} 'tür. *r-B. subtilis* derişiminin diğer rekombinant *Bacillus* türlerinden farklı olarak $t>40$ st koşullarında durgunluk fazına ulaştığı görölmektedir. *r-B. subtilis* ile SAP aktivitesinin kalma süresi ile değişimini veren Şekil 21 incelendiğinde $C_{so}=20.0 \text{ kg m}^{-3}$ sukroz içeren PP0 melası ortamında aktivitenin daha yüksek olduğu görölmektedir. Bu ortamda elde edilen aktivite $t=65 \text{ st}$ ' te 2750 U cm^{-3} 'tür ve referans ortamın aktivitesinden 4.5 kat daha yüksektir. Bu derişimden düşük ve yüksek sukroz derişimlerindeki PP0 melası ortamlarında aktivite daha düşüktür.

PP1a melası etkisi

Melas seyreltme ve santrifüjleme ön işlemlerinden geçirilerek H_2SO_4 ile hidrolizlenmiş ve PP1a olarak adlandırılmış melas ortamında farklı indirgenmiş şeker (glukoz+fruktoz) derişimlerinde *r-B.*

amyloliquefaciens, *r-B. cereus*, *r-B. licheniformis* ve *r-B. subtilis* ile SAP üretimi gerçekleştirilmiştir. Belirtilen *Bacillus* türleri ile elde edilen sonuçlar sırasıyla aşağıda verilmiştir.

Rekombinant *Bacillus amyloliquefaciens* ile üretim: Rekombinant *B. amyloliquefaciens* ile SAP üretimine, PP1a melası ortamının etkisini incelemek amacıyla $C_{GF_0}=13.0, 25.0, 38.0$ ve 50.0 kg m^{-3} başlangıç indirgenmiş şeker derişimlerinde SAP üretimi gerçekleştirilmiştir. $C_{GF_0}=25.0 \text{ kg m}^{-3}$ indirgenmiş şeker derişiminde maksimum SAP aktivitesi 1050 U cm^{-3} 'tür. Bu derişimlerden düşük ve yüksek indirgenmiş şeker derişimlerindeki PP1a melası ortamında aktivitenin referans ortamın altında olduğu görülmektedir. Referans ortamın maksimum aktivitesi 800 U cm^{-3} tür.

Rekombinant *Bacillus cereus* ile üretim: Rekombinant *B. cereus* ile SAP üretimine, PP1a melası ortamının etkisini araştırmak amacıyla $C_{GF_0}=13.0, 25.0, 32.0$ ve 38.0 kg m^{-3} başlangıç indirgenmiş şeker derişimlerinde SAP üretimi gerçekleştirilmiştir. Maksimum SAP aktivitesi $C_{GF_0}=38.0 \text{ kg m}^{-3}$ başlangıç indirgenmiş şeker derişiminde 720 U cm^{-3} olarak bulunmuştur. Başlangıç substrat derişiminin incelenen aralığında ulaşılan maksimum aktivite değerleri maksimum referans ortam aktivitesinin (1100 U cm^{-3}) altındadır.

Rekombinant *Bacillus licheniformis* ile üretim: Rekombinant *B. licheniformis* ile SAP üretimine PP1a melası ortamının etkisini araştırmak amacıyla $C_{GF_0}=8.0, 16.0$ ve 20.0 kg m^{-3} başlangıç indirgenmiş şeker derişimlerinde SAP üretimi gerçekleştirilmiştir. En yüksek SAP aktivitesi 580 U cm^{-3} olarak $C_{GF_0}=20.0 \text{ kg m}^{-3}$ indirgenmiş şeker derişiminde elde edilmiştir. Maksimum aktivite değerleri kıyaslandığında bütün PP1a melası ortamlarının aktivitesi referans ortamın aktivitesinin altındadır; referans ortamın aktivitesi ise 840 U cm^{-3} tür.

2.2.5.1.1. Melas temelli kompleks ortam ile serin alkali proteaz üretimine oksijen aktarımı etkileri

Rekombinant *Bacillus* türleri ile serin alkali proteaz üretimi için kompleks ortamda oksijen aktarım etkilerinin mekanik karıştırmalı ve havalandırma hızı kontrollü 3.5 dm^3 hacimli pilot ölçek biyoreaktörde biyoproses süresince karıştırmaya hızı, çözünmüş oksijen derişimi, sıcaklık ve pH değerleri *on-line* izlenmiştir. Oksijen aktarımını etkileyen ve temel biyoproses parametrelerinden olan karıştırmaya hızının $N=500$ ve 750 dk^{-1} ; ve hava giriş hızının $Q_0/V=0.2, 0.5, 0.7$ ve 1.0 vvm değerlerinde araştırılmış ve Çalık vd (2000) tarafından kullanılan ve aynı karıştırmaya ve hava giriş hızı değerlerine karşılık gelen kısaltmalar benimsenmiştir (Tablo 12). Deneyler başlangıç substrat derişimi $C_{S_0}=20.0 \text{ kg m}^{-3}$, $T=37 \text{ }^\circ\text{C}$ sıcaklık, $V=2.2 \text{ dm}^3$ çalışma hacmi, başlangıç pH= 7.1 değeri ve toplam kalma

süresi $t=63$ st koşullarında SAP üretimleri gerçekleştirilmiştir. Zamana karşı alınan örneklerde hücre derişimi, proteaz aktivitesi, substrat derişimi ölçülmüştür.

Sukroz ve hücre profilleri

Sukroz ve hücre derişimlerinin oksijen aktarım koşulları ve zamanla değişimi Şekil 22 ve 23'te gösterilmiştir. Sukroz tüketim hızı $t=0-15$ st'te yüksekken, $t=15$ st'ten sonra sukroz derişimindeki azalma nedeniyle düşmüştür. $t=15$ st'ten sonra LOT1, MOT2, MOT3, ve HOT1 koşullarında sukroz tüketilmezken MOT1 koşulunda $t=30$ st'e kadar sukroz tüketimi sürmüştür. h. Toplam sukroz tüketimi oksijen aktarım koşuluna bağlı olarak % 85-90 arasında değişmiştir (Şekil 22). En yüksek hücre derişimine uygulanan oksijen aktarım koşuluna bağlı olarak $t=20-30$ st aralığında ulaşılmış değerleri de $C_x=8.4-11.0$ kg m^{-3} aralığında değişmiştir (Şekil 23).

Tablo 12. Oksijen aktarım koşulları ve kısaltmaları ($T=37^\circ C, C_s^\circ =20.0$ kg m^{-3} , $pH= 7.1$)

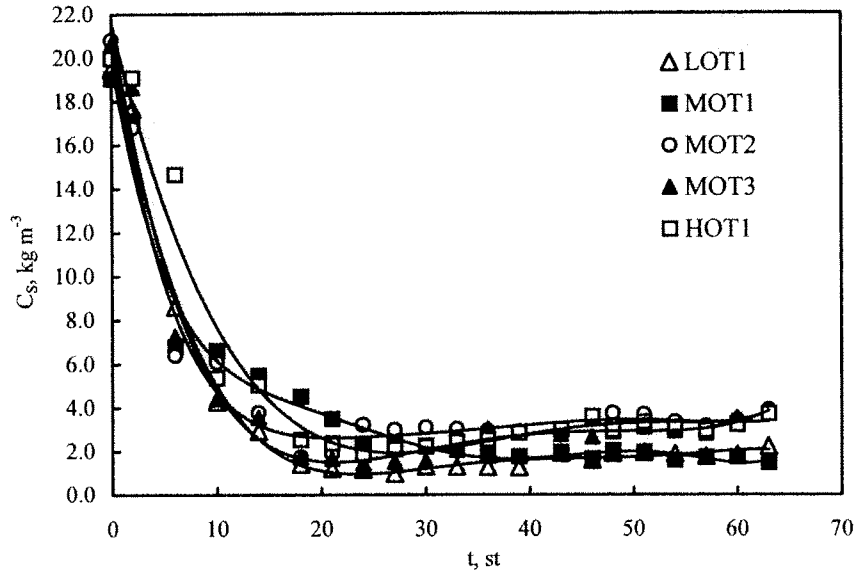
| Ölçek | V, cm^3 | N, dk^{-1} | $Q_o/V, vvm$ | Kısaltma |
|-------|-----------|--------------|--------------|----------|
| Pilot | 2200 | 750 | 0.2 | LOT1 |
| Pilot | 2200 | 500 | 0.5 | MOT1 |
| Pilot | 2200 | 750 | 0.5 | MOT2 |
| Pilot | 2200 | 750 | 0.7 | MOT3 |
| Pilot | 2200 | 750 | 1.0 | HOT1 |

Çözünmüş oksijen ve pH profilleri

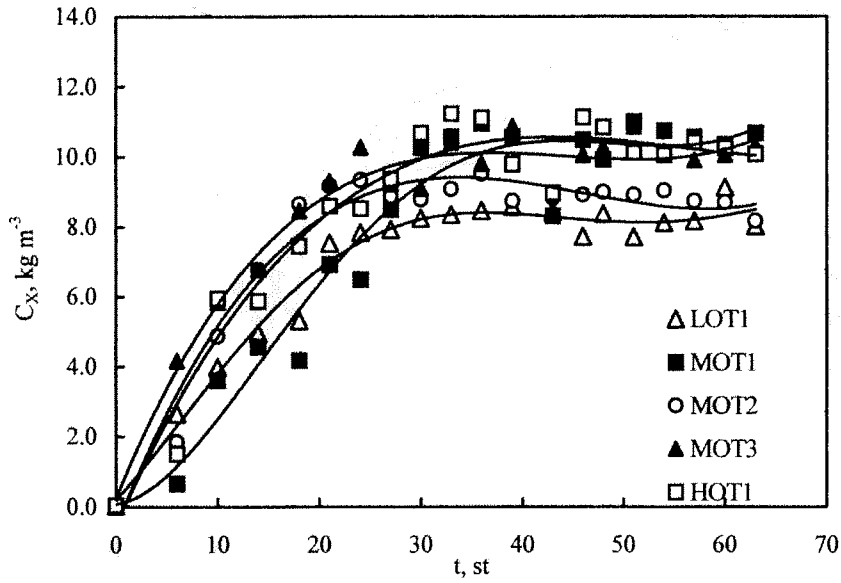
Çözünmüş oksijen ve pH'ın oksijen aktarım koşulları ve zamanla değişimi Şekil 24 ve 25'te gösterilmiştir. Çözünmüş oksijen profilleri genel olarak farklı oksijen aktarım koşullarında benzer eğilim göstermiştir; $t=5-20$ st aralığında minimum değerlerine ulaşmışlardır. Ancak MOT1 koşulunda C_{DO} $t=5-30$ st'te minimum değerinde kalmıştır. $t=20$ st'ten sonra çözünmüş oksijen derişimi doygunluk değerine ulaşmıştır. pH $t= 5-20$ st aralığında iki minimum verdikten sonra yükselmiştir.

SAP aktivite Profilleri

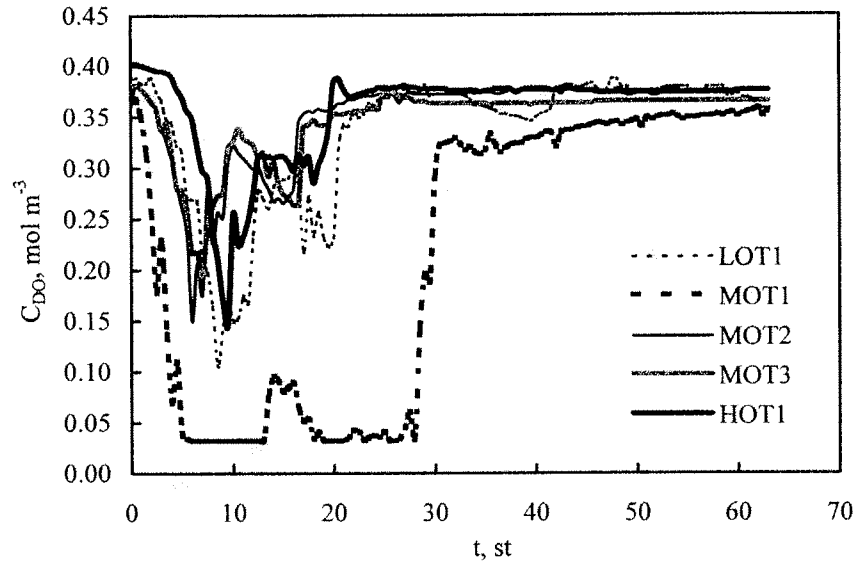
SAP aktivitesinin oksijen aktarım koşulları ve zamanla değişimi Şekil 26'da gösterilmiştir SAP üretimi $t=15-18$ st'ten sonra artmaya başlamıştır. En yüksek SAP aktivitesi oksijen aktarım koşuluna bağlı olarak $t=36-48$ st aralığında elde edilmiştir. En yüksek aktivite 2250 U cm^{-3} (250 U mg^{-1}) olarak MOT2 koşulunda $t=36$ st'te bulunmuştur.



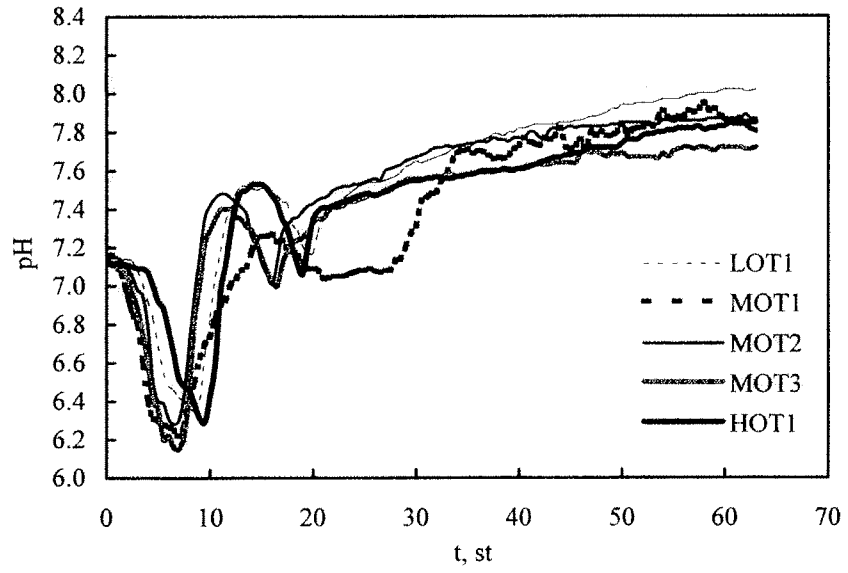
Şekil 22. Melas temelli kompleks ortamda rekombinant *Bacillus subtilis* ile sukroz derişiminin oksijen aktarım koşulları ve zamanla değişimi



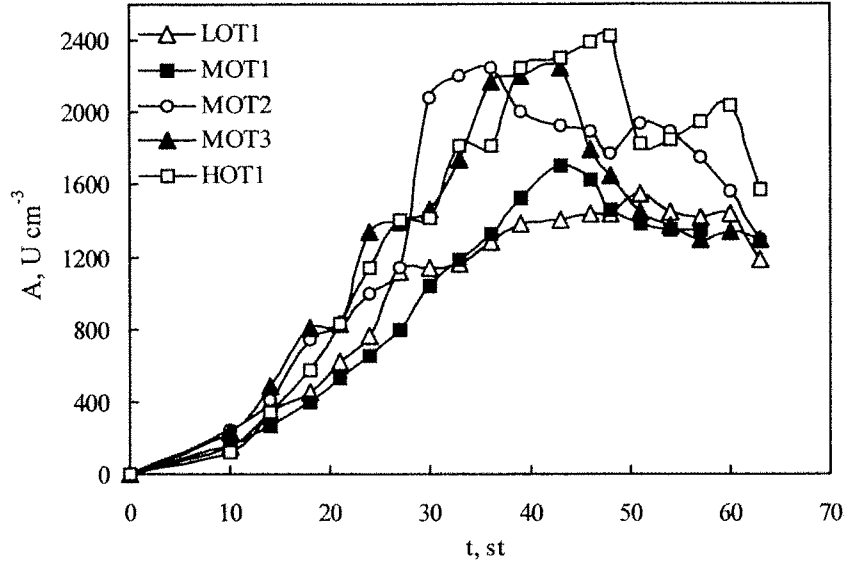
Şekil 23. Melas temelli kompleks ortamda rekombinant *Bacillus subtilis* ile hücre derişiminin oksijen aktarım koşulları ve zamanla değişimi



Şekil 24. Melas temelli kompleks ortamda rekombinant *Bacillus subtilis* ile çözülmüş oksijen derişiminin oksijen aktarım koşulları ve zamanla değişimi



Şekil 25. Melas temelli kompleks ortamda rekombinant *Bacillus subtilis* ile pH'nin oksijen aktarım koşulları ve zamanla değişimi



Şekil 26. Melas temelli kompleks ortamda rekombinant *Bacillus subtilis* ile SAP aktivitesinin oksijen aktarım koşulları ve zamanla değişimi

2.2.5.2. Protein temelli kompleks ortam tasarımının SAP üretimine etkisi

Soya, glukoz ve (NH₄)₂HPO₄ 'in SAP Üretimine Etkisi

Başlangıç yağı alınmış soya, glukoz ve (NH₄)₂HPO₄ derişimlerinin SAP üretimi üzerine etkisi $C_{soya}^0 = 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 \text{ kg m}^{-3}$, $C_G^0 = 0, 3, 6, 8, 10 \text{ kg m}^{-3}$, ve $C_{(NH_4)_2HPO_4}^0 = 0, 0.5 \text{ and } 1.0 \text{ kg m}^{-3}$ derişimlerinde incelenmiştir. En yüksek SAP aktivitesi (NH₄)₂HPO₄ içermeyen ve $C_{soya}^0 = 20 \text{ kg m}^{-3}$ ve $C_G^0 = 8 \text{ kg m}^{-3}$ ortamda $t=44 \text{ st}$ 'te $A=3050 \text{ U cm}^{-3}$ olarak bulunmuştur. Üretim ortamına eklenen inorganic azot kaynağı (NH₄)₂HPO₄ SAP üretimini inhibe etmiştir (Tablo 13).

Soya ve Sukrozun SAP Üretimine Etkisi

Başlangıç yağı alınmış soya ve sukroz derişimlerinin SAP üretimi üzerine etkisi $C_{soybean}^0 = 15, 20, 25, 30 \text{ kg m}^{-3}$ ve $C_{sucrose}^0 = 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25 \text{ kg m}^{-3}$ derişimlerinde incelenmiştir. En yüksek aktivite değeri $C_{soya}^0 = 20 \text{ kg m}^{-3}$ ve $C_s^0 = 15 \text{ kg m}^{-3}$ derişimlerinde $A=3850 \text{ U cm}^{-3}$ olarak bulunmuştur.

Kazein ve sukrozun SAP Üretimine Etkisi

Başlangıç kazein derişiminin etkisi $C_s^0 = 15 \text{ kg m}^{-3}$ derişiminde $C_{kazein}^0 = 5, 10, 15, \text{ ve } 20 \text{ kg m}^{-3}$ derişimlerinde araştırılmıştır (Tablo 14). Kazein SAP üretimini inhibe etmiştir (Tablo 14).

Inorganik Bileşiklerin SAP Üretimine Etkisi

Mg⁺² Derişiminin SAP Üretimine Etkisi

Karbon kaynağı olarak sukroz/glukoz kullanıldığında glikoliz yol izinde, glukozdan glukoz-6-fosfat oluşması, fruktoz-6-fosfatın fruktoz-1,6-difosfata dönüşmesi, 1,3-difosfogliseric asitten 3-fosfo gliserik asit oluşum reaksiyonlarının kofaktörü olan Mg⁺², 2-fosfogliseric asitten fosfoenol pirüvat oluşum tepkimesinin kofaktörü olan Mg⁺² veya Mn⁺², TCA döngüsünde de; izositrik asidin α -ketoglutarik aside dönüşmesi, α -ketoglutarik asidin süksinil CoA'ya dönüşmesi tepkimesinin kofaktörü olan Mg⁺² etkisi, MgSO₄, MgCl₂, Mg(CH₃COO)₂, bileşikleri kullanılarak 0-1100 g/m³ derişim aralığında araştırılmıştır. Mg⁺² eklenmesi SAP üretimini azaltmıştır. Soyada % 0.22 Mg⁺² SAP üretimi için yeterli bulunmuştur (Tablo 15).

Ca⁺² Derişiminin SAP Üretimine Etkisi

Ca⁺² etkisi, Ca⁺² kaynağı olarak CaCl₂ kullanılarak C_{CaCl₂} =0 ve 0.2 kg m⁻³ derişimlerinde araştırılmıştır. Mg⁺² sonuçlarına benzer olarak eklenen Ca⁺² SAP üretimini düşürmüştür. Bu nedenle soyada içindeki Ca⁺² SAP üretimi için yeterli bulunmuştur (Tablo 15).

Tablo 13. Üretim ortamına eklenen inorganik azot kaynağı (NH₄)₂HPO₄ SAP üretimine etkisi (C_{soybean}^o =30 kg m⁻³ and C_G^o = 8 kg m⁻³)

| C _{(NH₄)₂HPO₄} concentration (kg m ⁻³) | A, U cm ⁻³ |
|--|-----------------------|
| 0 | 2400 |
| 0.5 | 850 |
| 1.0 | 450 |

Tablo 14. Başlangıç kazein derişiminin SAP üretimine etkisi

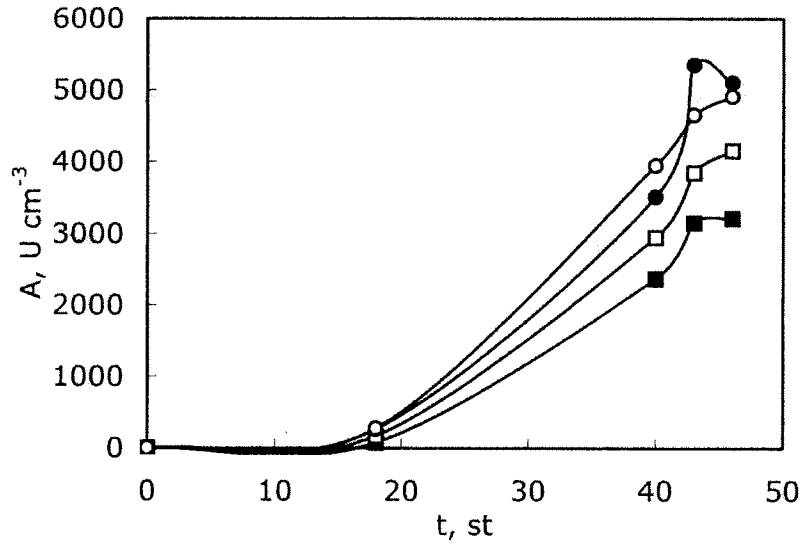
| Casein concentration (kg m ⁻³) | A, U cm ⁻³ |
|--|-----------------------|
| 5 | 200 |
| 10 | 250 |
| 15 | 205 |
| 20 | 170 |

Tablo 15. Mg^{+2} bileşiklerinin ve $CaCl_2$ 'ün SAP üretimine etkisi

| Compound | Concentration ($kg\ m^{-3}$) | A, $U\ cm^{-3}$ |
|-----------------|--------------------------------|-----------------|
| - | - | 3850 |
| $Mg(CH_3COO)_2$ | 0.870 | 3680 |
| $MgCl_2$ | 0.038 | 2900 |
| $MgSO_4$ | 0.150 | 3100 |
| $CaCl_2$ | 0.200 | 3350 |

Fosfat Derişiminin SAP Üretimine Etkisi

Fosfat derişiminin etkisi fosfat kaynağı olarak NaH_2PO_4 ve Na_2HPO_4 kullanılarak araştırılmış ve SAP aktivitesi $C^0_{Na_2HPO_4}=0.021\ kg\ m^{-3}$ ve $C^0_{NaH_2PO_4}=2.81\ kg\ m^{-3}$ derişimlerinde $A=5350\ U\ cm^{-3}$ olarak bulunmuştur (Şekil 27).



Şekil 27. Soya temelli kompleks ortamda rekombinant *Bacillus subtilis* ile fosfat derişiminin SAP üretimine etkisi. (○), $Na_2HPO_4=0.010\ kg\ m^{-3}$ - $NaH_2PO_4=1.40\ kg\ m^{-3}$; (●), $Na_2HPO_4=0.021\ kg\ m^{-3}$ - $NaH_2PO_4=2.81\ kg\ m^{-3}$; (□), $Na_2HPO_4=0.032\ kg\ m^{-3}$ - $NaH_2PO_4=4.22\ kg\ m^{-3}$; (■), $Na_2HPO_4=0.043\ kg\ m^{-3}$ - $NaH_2PO_4=5.63\ kg\ m^{-3}$.

2.2.5.2.1. Protein temelli kompleks ortam ile serin alkali proteaz üretiminde fermentasyon karakteristikleri

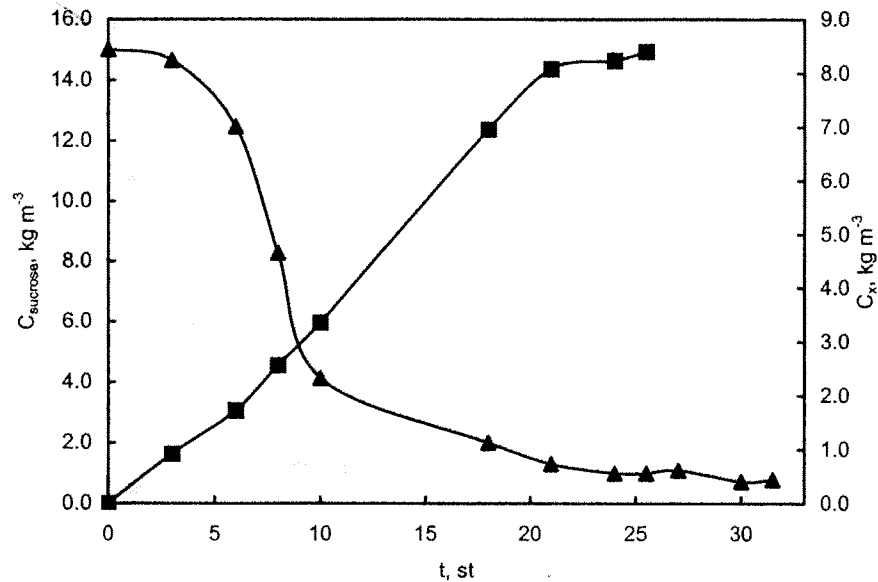
Pilot ölçek biyoreaktör sistemlerinde; $V_R=1.65 \text{ dm}^3$, $C_{\text{soya}}^0=20 \text{ kg m}^{-3}$, $C_S^0=15 \text{ kg m}^{-3}$, $C_{\text{Na}_2\text{HPO}_4}^0=0.021 \text{ kg m}^{-3}$ ve $C_{\text{NaH}_2\text{PO}_4}^0=2.81 \text{ kg m}^{-3}$, $\text{pH}_0=7.1$, $T=37^\circ\text{C}$, $\text{AO}=1/10$ tepkime koşullarında ve tanımlanmış ortamda (Çalık vd. 2000) ve melas temelli kompleks ortamda bulunan en uygun oksijen aktarım koşullarında $N=750 \text{ dk}^{-1}$ sabit karıştırma hızı ve $Q_0/V_R=0.5 \text{ vvm}$ sabit hava giriş hızında SAP üretimi gerçekleştirilmiştir.

Sukroz ve hücre derişimi profilleri

Sukroz ve hücre derişimlerinin proses süresince değişimi Şekil 28’de gösterilmiştir. Sukroz $t=0-10 \text{ st}$ aralığında yüksek; sukroz $t=10 - 27 \text{ st}$ ’te düşük bir hızla tüketilmiştir. $t=10 \text{ st}$ ’ten sonra soya ve sukrozdan sentezlenen yan-ürünler hücre çoğalması için kullanılmıştır. En yüksek hücre derişimi $t=21 \text{ st}$ ’te $C_x=8.0 \text{ kg m}^{-3}$ elde edilmiştir.

Çözünmüş oksijen ve pH profilleri

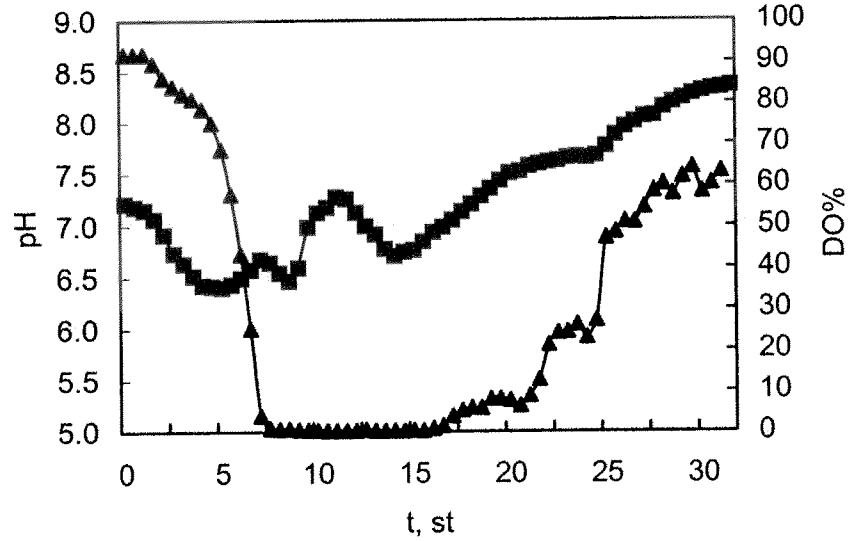
Çözünmüş oksijen derişimi ve pH’in proses süresince değişimi Şekil 29’da gösterilmiştir. pH prosesin ilk 18 st’inde salınmış, $t=18 \text{ st}$ ’ten sonra da artmıştır. Ortamdaki çözünmüş oksijen prosesin ilk $t=7 \text{ st}$ ’inde tüketilmiştir; $t=7 \text{ st}$ ’ten sonra ortamdaki çözünmüş oksijen derişimi sıfır olduğu için $7 < t < 16 \text{ st}$ ’te oksijen aktarım hızı oksijen tüketim hızına eşittir; $16 < t < 27 \text{ h}$ ortamdaki oksijen derişimi artmıştır.



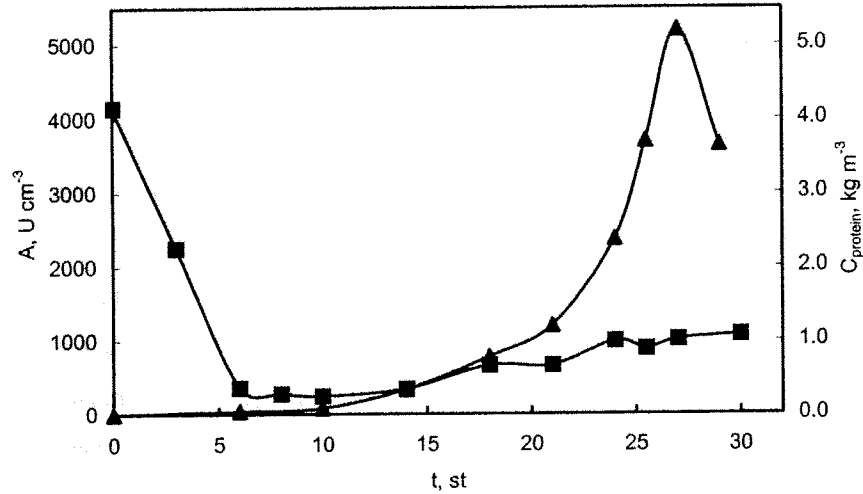
Şekil 28. Soya temelli kompleks ortamda rekombinant *Bacillus subtilis* ile sukroz ve hücre derişimlerinin zamanla değişimi. (), C_S ; (), C_X .

Protein ve SAP aktivite profilleri

Protein derişiminin ve SAP aktivitesinin proses süresince değişimi Şekil 30'da gösterilmiştir. Soyadan ekstrakte olan çözünmüş protein t=6 st'e kadar yüksek bir hızla tüketilmiştir. t=10 st'ten sonra SAP aktivitesindeki artmaya paralel olarak soyadan hidroliz ile açığa çıkan protein artmış ve bu da SAP üretiminde kullanılarak SAP üretimini artırmış; en yüksek SAP aktivitesi t=27 st'te $A=5200U$ cm^{-3} ($1.2 kg m^{-3}$) olarak bulunmuştur.



Şekil 29. Soya temelli kompleks ortamda rekombinant *Bacillus subtilis* ile çözünmüş oksijen derişiminin ve pH'ın zamanla değişimi. ($C_{DO}^*=0.37 mol m^{-3}$). (), pH; (), dissolved oxygen.



Şekil 30. Soya temelli kompleks ortamda rekombinant *Bacillus subtilis* ile SAP aktivitesi ve toplam protein derişiminin zamanla değişimi. (), Cprotein; (), SAP aktivitesi.

4. SONUÇLAR

1. TÜBİTAK MİSAG-176 araştırma projesi kapsamında yapılan bu çalışma serin alkali proteaz üretiminden sorumlu genin klonlanması ile SAP verim ve seçiciliğinin artırılması için konak rekombinant *Bacillus* türlerinin tanımlanmış ve kompleks ortamlarda üretim potansiyellerinin karşılaştırılmalarını ve kompleks ortamlarda oksijen aktarım koşullarının incelenmesiyle ortam tasarımıyla oksijen aktarım koşullarının metabolik kaymalarına etkisini gösteren sistematik araştırmaları içermektedir.
2. SAP üretimin artırılması için SAP sentezinden sorumlu *subC* geni önce pRS316 *E.coli*-yeast plasmidine klonlanmış ve *Bacillus* hücrelerinde ekspresyonu için bir sonraki adımda pHV1431 *E.coli*-*Bacillus* plasmidine sub-klonlanmıştır. Rekombinant plasmid farklı fenotipik özelliklere sahip *Bacillus* türlerine aktarılmış ve *Bacillus* türlerinin üretim potansiyelleri karşılaştırılmış ve en uygun konak hücrenin tanımlanmış ortamda yüksek SAP aktivitesi nedeniyle *B.licheniformis* pHV1431::*subC* olduğu bulunmuştur. Hücre içi tepkime hızlarının proses süresince değişimi incelenmiş ve SAP sentez hızı en yüksek *Bacillus* türü *B.licheniformis* pHV1431::*subC* olarak bulunmuştur.
3. Kompleks ortamda SAP üretimi için seyreltme ve santrifüjleme fiziksel ön-işlemleri görmüş melas ve fiziksel ön-işlem gördükten sonra H₂SO₄ veya HCl ile hidrolizlenip içindeki sukroz indirgenmiş şekerlere (glukoz + fruktoz) dönüştürülmüş melas kullanılmış; ve geliştirilen rekombinant *Bacillus* türü mikroorganizmalarının SAP üretim potansiyelleri karşılaştırılmıştır. En yüksek aktivite santrifüjleme fiziksel ön-işlemleri görmüş sukroz içeren melas ortamında *r-B. subtilis* ile C_{so}=20.0 kg m⁻³ sukroz derişiminde 2750 U cm⁻³ olarak bulunmuştur.
4. Laboratuvar ölçekli biyoreaktörlerde SAP üretimi araştırmaları kapsamında en yüksek SAP aktivitesine ulaşıldığı belirlenen melas ortamı - C_{so}=20.0 kg m⁻³ başlangıç sukroz derişimi- ve *r-B.subtilis* kullanılarak; karıştırma hızı, sıcaklık, pH, çözülmüş oksijen derişimi ve köpük kontrollü, oksijene göre sürekli diğer girdilere göre kesikli 3.5 dm³ hacimli pilot ölçek biyoreaktör sistemlerinde oksijen aktarımının SAP üretimine etkisi incelenmiş; en yüksek aktivite Q_o/V=0.5 vvm, N=750 dk⁻¹ (MOT2) koşullarında t=36 st'te A=2250 U cm⁻³ olarak bulunmuştur.
5. Son aşamada protein temelli kompleks ortam tasarımı yapılmış ve en yüksek aktivite 3852 U cm⁻³ olarak t=46 st'te C_{soya}^o = 20 kg m⁻³ and C_{sukroz}^o =15 kg m⁻³ ile elde edilmiştir. Bundan sonra, inorganik bileşiklerin etkisi araştırılmış ve SAP üretiminde soyanın, fosfat dışındaki inorganik kaynakları için yeterli olduğu bulunmuştur, ve fosfat derişiminin optimizasyonu ile aktivite 5347 U cm⁻³ değerine yükselmiştir. Pilot ölçekli sistemlerde yapılan deneylerde hem tanımlanmış ortamda (Çalık vd. 2000) hem de melas temelli kompleks ortamda bulunan en iyi oksijen aktarım koşullarında ; (Q_o/V=0.5 vvm, N=750 dk⁻¹: MOT2) gerçekleştirilmiş ve maksimum SAP aktivitesi t=27 st'te 5300 U cm⁻³ olarak elde edilmiştir.

KAYNAKLAR

Aiba, S., Humphrey, A.E. ve Milles, N.F. Biochemical Engineering, Academic Press Inc. New York, (1973). pp: 92-126.

Allfred, V.G., Alfred, E.M. How Cells Make Molecules in Recombinanat DNA, ed: Freifelder, F.D., W.H. Freeman and Company, San Francisco, 1978.

Atkinson B. and Mavituna F., Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook, Macmillan Publishers Ltd., 2nd Ed. 1991.

Biyoteknoloji Raporu, içinde: *DPT Bilim Araştırma Teknoloji Ana Planı*, 1988.

Borriss, R. Biology of Enzymes Biotechnology, in Biotechnology. ed: Rehm, N.J., Reed, G., Vol 7a, VCH, Weinheim, Germany, (1987), pp: 35-65.

Bailey, J.E., ve Ollis, D.F. Biocemical Engineering Fundamentals, 2.ed., Mc Graw Hill, New York, 1986. pp: 157-226.

Buchanan, R.E., Gibbons, N.E. Bergey's Manual of Determination ve Bacteriology, 8th edition, The Williams Wilkins Company, Baltimore, (1974), pp: 529-525.

Cohen, A. The PICO. TAG system: A New Motod to Analyze Primary and Secantary Amino Acids with one Picomole Sensitivity, *BioTechniques*, sep/oct, 273-275, (1983).

Çalık, P., Çalık, G., Özdamar, T.H. Oxygen transfer effects in serine alkaline protease fermentation by *Bacillus licheniformis*: Use of citric acid as the carbon source. *Enzyme Microb. Technol*; **23**, 451-461, (1998).

Çalık, P., Çalık, G., Takaç, S., Özdamar, T.H. Metabolic flux analysis for serine alkaline protease fermentation by *Bacillus licheniformis* in a defined medium: Effects of the oxygen transfer rate. *Biotechnol. Bioeng*, **64**, 151-167, (1999).

Çalık, P., Çalık, G., Özdamar, T.H. Oxygen transfer strategy and its regulation effects in serine alkaline protease production by *Bacillus licheniformis*. *Biotechnol. Bioeng*, **69**, 301-311, (2000).

Çalık, P., Bilir, E., Çalık, G., Özdamar, T.H. Influence of pH conditions on metabolic regulations in serine alkaline protease production. *Enzyme Microb. Technol*, **31**, 685-697, (2002).

Çalık, P., and Özdamar, T.H. Carbon sources affect metabolic capacities of *Bacillus* species for the production of industrial enzymes : theoretical analyses for serine and neutral proteases and α -amylase, *Biochemical Engineering Journal*, **8**, 61-81, (2001).

Çalık, P., Çalık, G., Özdamar, T.H. Bioprocess development for serine alkaline protease production: A Review. *Rev Chem Eng*, **17** (Suppl. S): 1-62, (2001).

Çalık, G., Berk, M., Boyacı, F.G., Çalık, P., Takaç, S., Özdamar, T.H. Pretreatment processes of molasses for the utilization in fermentation processes, in: Focus in Biotechnology, V:4: Engineering and Manufacturing for Biotechnology, Hofman, M. and Thonart, P. (ed), Kluwer Academic Publ., The Netherlands, 2001, pp. 21-28.

Çalık, P., Özdamar, T.H. Bioreaction network flux analysis for industrial microorganisms: A Review. *Rev Chem Eng*, **18(6)**, 553-596, (2002).

Çalık, P., Bilir, E., Çalık, G., Özdamar, T.H. Bioreactor operation parameters as tools for metabolic regulations in serine alkaline protease production: Influence of pH conditions. *Chemical Engineering Science*, **58(3)**: 759-766, (2003a).

Çalık, G., Pehlivan, N., Kalender, N., Özdamar, T.H., **Çalık, P.** Utilization of pretreated molasses for serine alkaline protease production with recombinant *Bacillus* species, *Chemical Engineering Communications*, **190**, 630-644, (2003b).

Çalık, P., Bayram, A., Özdamar, T.H. Regulatory effects of alanine group amino acids on serine alkaline protease production by recombinant *Bacillus licheniformis* *Biotechnology and Applied Biochemistry*, **37**, 165–171, (2003c).

Çalık, P., Tomlin, G., Oliver, S.G., Özdamar, T.H. Overexpression of serine alkaline protease in *Bacillus licheniformis* and its impact on the metabolic reaction network. *Enzyme Microb. Technol.*, **32**, 706-720, (2003d).

Çalık, P., Kalender, N., Özdamar, T.H. *baskıda*: 2003e. Expression of serine alkaline protease production *Bacillus* species: Comparative Performance Analyses. *Enzyme Microb. Technol.*

Çalık P., Çelik, E., Telli, I.E, Oktar, C., Özdemir, E., *baskıda*: 2003f. Protein based complex medium design for recombinant serine alkaline protease production by *Bacillus subtilis*. *Enzyme Microb. Technol.*

Dawson, R.M.C., Elliott, D.C., Elliott, W.H., Jones, K.M.,. Data for Biochemical Research, 2nd edition, Oxford University Press, London, (1974). pp: 1-65, 475-509.

Dechow, F.J. Separation and Purification Techniques in Biotechnology, Noyes Publications, Park Ridge, New Jersey, USA, (1989). pp: 288-295.

Frost, G.M., Moss, A.D. Production of Enzymes by Fermentation. Rehm, N.J., Reed, G., (Eds), Vol 7a, VCH, Weinheim, Germany, (1987). pp: 65-213.

Frankena, J., van Verseveld, H.W. and Stouthamer. A.H. A continuous culture study of the bioenergetic aspects of growth and production of exocellular protease in *Bacillus licheniformis*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **22**, 169-176, (1985).

Frankena, J., Koningstein, G.M., Verseveld, H.W. and Stouthamer, A.H.. Effect of different limitations in chemostat cultures on growth and production of exocellular protease by *Bacillus licheniformis*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **24**, 106-112, (1986).

Hanlon, G.W., Hodges, N.A. and Russell, A.D. The influence of glucose, ammonium and magnesium availability on the production of protease and bacitracin by *Bacillus licheniformis*, *J. Gen. Microbiol.*, **128**, 845-851, (1982).

Hanlon, G.W. and Hodges, N.A. Bacitracin and protease production in relation to sporulation during exponential growth of *Bacillus licheniformis* on poorly utilised carbon and nitrogen sources, *J. Bacteriol.*, **147**, 427-431, (1981).

Hübner, U., Bock, U. and Schügerl, K. Production of alkaline serine protease subtilisin Carlsberg by *Bacillus licheniformis* on complex medium in a stirred tank reactor, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **40**, 182-188, (1993).

Jacobs, M. Expression of the subtilisin Carlsberg-encoding gene in *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis*, *Gene*, **152**, 69-74, (1995).

Janniere, L., Braund, C., Ehrlich, D. Structurally stable *Bacillus subtilis* cloning vectors, *Gene*, **87**, 53-61, (1990).

Kalisz, M.M. Microbial Proteinase, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, ed: Fiecher, A., Springer-Verlag, Berlin, 1988. pp: 1-65.

Keay, L., Moseley, M.H., Anderson, R.G., O'Conner, R.J., Wildi, B.S. Production and Isolation of Microbial Proteases, in *Enzyme Engineering*. ed: Lemuel, B., Wingard, Jr., John Wiley & Sons, New York., 1972. pp: 63-92.

Kole, M.M., Draper, I. and Gerson, D.F. Protease production by *Bacillus subtilis* in oxygen controlled, glucose fed-batch cultivation, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **28**, 404-408, (1988).

Lowy, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. ve Randall, R.J. Protein Measurement with Folin Phenol Reagent, *Journal of Biological Chemistry*, **193**, 265-275, (1951).

Mark, F.M., Othmer, D.F. Encyclopedia of Chemical Technology, 3rd edition, John Wiley and Sons Inc. Press, New York, (1983). pp : 173-219.

Miller, G.L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar, *Analytical Chemistry*, **31**, 426-428, (1959).

Moon, S.H. and Parulekar, S.J. Some observations on protease production in continuous suspension cultures of *Bacillus firmus*, *Biotechnol. Bioeng.*, **41**, 43-54, (1993).

Moon, S.H. and Parulekar, S.J. A parametric study of protease production in batch and fed-batch cultures of *Bacillus firmus*, *Biotechnol. Bioeng.*, **37**, 467-483, (1991).

Pelczar, M.J., Chan, E.C.S. Laboratory Exercises in Microbiology, 4th edition, McGraw-Hill Book Company, New York, (1977). pp: 35-40, 85, 103.

Priest, F.G. Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*, *Bacteriol. Rev.*, **41**, 711-753, (1977).

Posprech, A. and Neumann, B. A Versatile Quick-prep of Genomic DNA from Gram-positive Bacteria, *Trens in Genetics*, **11**(6): 217-218, (1985).

Segel, I.R.. *Biochemical Calculations*, John Wiley & Sons, Inc, New York, (1968). pp: 94-141.

Segel, I.R. *Enzyme Kinetics*, John Wiley & Sons, Inc, New York, (1968). pp: 1-15.

Sikdar, S.K., Bier, M., Todd, P. *Frontiers in Bioprocessing*, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, (1989). pp: 1-5.

Skoog, D.A., ve Leary, J.J. *Principles of Instrumental Analysis*, 4th edition, Saunders College Publishing, New York, (1992). pp: 675-679.

Strauch, M.A. Regulation of *Bacillus subtilis* Gene Expression during the Transition from Exponential Growth to Stationary Phase, in *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, **V:46**, Academic Press, INC, USA, (1993).

Sikorski, R.S., Hieter, P. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **122**, 19-27, (1989).

Vasantha, N., and Freese, E. Enzyme changes during *Bacillus subtilis* sporulation caused by deprivation of guanine nucleotides. *J Bacteriol.*, **144(3)**, 1119-1125, (1980).

Vehmaanperä, J. Transformation of *Bacillus amyloliquefaciens* by Electroporation. *FEMS Microbiology Letters*, **61**, 165-170, (1989).

Yanisch-Perron, C., Viera, J., Messing, J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, **33**, 103-119, (1985).

Wallingford, R.A., Ewing A.G. *Advances in Chromatography Biotechnological Applications and Methods*, ed: Gidding, J.C., Grash, H.A., E., Brown, P.R., V:29, Marcel Dekker, Inc., USA, (1989). pp: 1-72.

Wright, C.P., Whitney, G.K., Dauglis, A.J. and White, B.N. Enhancement and regulation of extracellular protein production by *Bacillus brevis* 47 through manipulation of cell culture conditions, *Biotechnol. Bioeng.*, **40**, 46-52, (1992).

EKLER

Ek-1. *Bacillus licheniformis* 'in metabolik yolizi tepkimeleri

Glikoliz ve Glukoneogensiz Yolizi

1. Glc + PEP → G6P + Pyr
2. G6P → Glc + Pi
3. F6P → G6P
4. G6P → F6P
5. Frc + PEP → F6P + Pyr
6. Man + PEP → Man6P + Pyr
7. Man6P → F6P
8. F6P + ATP → 2T3P + ADP
9. 2T3P → F6P + Pi
10. T3P + ADP + Pi → PG3 + ATP + NADH
11. PG3 + ATP + NADH → T3P + ADP + Pi
12. PG3 → PEP
13. PEP → PG3
14. PEP + ADP → Pyr + ATP
15. Pyr + 2ATP → PEP + 2ADP
16. Pyr → AcCoA + NADH + CO₂

Pentoz Fosfat Yolizi

17. G6P → NADPH + Gluc6P
18. Glc → Gluc + NADH
19. Gluc + ATP → Gluc6P + ADP
20. Gluc6P → R5P + NADPH + CO₂
21. R5P → Xyl5P
22. Xyl5P → R5P
23. R5P → Rib5P
24. Rib5P → R5P
25. Xyl5P + Rib5P → S7P + T3P
26. S7P + T3P → Xyl5P + Rib5P
27. Xyl5P + E4P → F6P + T3P
28. F6P + T3P → Xyl5P + E4P
29. T3P + S7P → F6P + E4P
30. F6P + E4P → T3P + S7P

Glikoliz yolizinden ayrılan tepkimeler

31. Pyr + NADH → Lac
32. Lac → Pyr + NADH
33. AcCoA + ADP + Pi → Ac + ATP
34. Ac + ATP → AcCoA + ADP + Pi

Anapleoritik Tepkimeler

35. Mal → Pyr + CO₂ + NADPH
36. OA → Pyr + CO₂

TCA Döngüsü

37. AcCoA + OA → Cit
38. Cit → ICit
39. ICit → αKG + NADPH + CO₂

40. $\alpha\text{KG} \rightarrow \text{SucCoA} + \text{NADH} + \text{CO}_2$
41. $\text{SucCoA} + \text{Pi} + \text{ADP} \rightarrow \text{Suc} + \text{ATP} + \text{CoA}$
42. $\text{Suc} + \text{ATP} \rightarrow \text{SucCoA} + \text{Pi} + \text{ADP}$
43. $\text{Suc} \rightarrow \text{Fum} + \text{FADH}_2$
44. $\text{Fum} \rightarrow \text{Mal}$
45. $\text{Mal} \rightarrow \text{OA} + \text{NADH}$
46. $\text{ICit} \rightarrow \text{Glx} + \text{Suc}$
47. $\text{Glx} + \text{AcCoA} \rightarrow \text{Mal}$

Serin Grubu Amino Asitlerin Biyosentezi

48. $\text{PG3} + \text{Glu} \rightarrow \text{Ser} + \alpha\text{KG} + \text{NADH} + \text{Pi}$
49. $\text{Ser} + \text{THF} \rightarrow \text{MetTHF} + \text{Gly}$
50. $\text{Ser} + \text{AcCoA} + \text{H}_2\text{S} \rightarrow \text{Cys} + \text{Ac}$

Alanin Grubu Amino Asitlerin Biyosentezi

51. $\text{Pyr} + \text{Glu} \rightarrow \alpha\text{KG} + \text{Ala}$
52. $2 \text{Pyr} + \text{NADPH} \rightarrow \text{KVal}$
53. $\text{KVal} + \text{Glu} \rightarrow \alpha\text{KG} + \text{Val}$
54. $\text{KVal} + \text{AcCoA} + \text{Glu} \rightarrow \text{NADH} + \text{CO}_2 + \alpha\text{KG} + \text{Leu}$

Histidin Biyosentezi

55. $\text{R5P} + \text{ATP} \rightarrow \text{PRPP} + \text{AMP}$
56. $\text{PRPP} + \text{ATP} + \text{Gln} \rightarrow \text{His} + \text{PRAIC} + \alpha\text{KG} + 2\text{PPi} + 2\text{NADH} + \text{Pi}$

Aspartik Asit Grubu Amino Asitlerin Biyosentezi

57. $\text{OA} + \text{Glu} \rightarrow \text{Asp} + \alpha\text{KG}$
58. $\text{Asp} + \text{Gln} + \text{ATP} \rightarrow \text{Asn} + \text{Glu} + \text{AMP} + \text{PPi}$
59. $\text{Asp} + \text{ATP} + \text{NADPH} \rightarrow \text{AspSa} + \text{ADP} + \text{Pi}$
60. $\text{AspSa} + \text{Pyr} \rightarrow \text{DC}$
61. $\text{DC} + \text{NADPH} \rightarrow \text{Tet}$
62. $\text{Tet} + \text{AcCoA} + \text{Glu} \rightarrow \text{Ac} + \alpha\text{KG} + \text{mDAP}$
63. $\text{mDAP} \rightarrow \text{Lys} + \text{CO}_2$
64. $\text{AspSa} + \text{NADPH} \rightarrow \text{HSer}$
65. $\text{Hser} + \text{ATP} \rightarrow \text{Thr} + \text{ADP} + \text{Pi}$
66. $\text{Thr} + \text{Pyr} + \text{NADPH} + \text{Glu} \rightarrow \text{Ile} + \alpha\text{KG} + \text{NH}_3 + \text{CO}_2$
67. $\text{AcCoA} + \text{Cys} + \text{Hser} + \text{H}_2\text{S} + \text{MTHF} \rightarrow \text{Pyr} + 2\text{Ac} + \text{NH}_3 + \text{Met} + \text{THF}$

Aromatik Amino Asitlerin Biyosentezi

68. $2 \text{PEP} + \text{E4P} + \text{ATP} + \text{NADPH} \rightarrow \text{Chor} + \text{ADP} + 4 \text{Pi}$
69. $\text{Chor} + \text{Glu} \rightarrow \alpha\text{KG} + \text{Phe} + \text{CO}_2$
70. $\text{Chor} + \text{Glu} \rightarrow \text{Tyr} + \alpha\text{KG} + \text{NADH} + \text{CO}_2$
71. $\text{Chor} + \text{NH}_3 + \text{PRPP} \rightarrow \text{Pyr} + \text{IGP} + \text{CO}_2 + \text{PPi}$
72. $\text{IGP} + \text{Ser} \rightarrow \text{Trp} + \text{T3P}$

Glutamik Asit Grubu Amino Asitlerin Biyosentezi

73. $\alpha\text{KG} + \text{NH}_3 + \text{NADPH} \rightarrow \text{Glu}$
74. $\text{Glu} + \text{ATP} + \text{NH}_3 \rightarrow \text{Gln} + \text{ADP} + \text{Pi}$
75. $\text{Glu} + \text{ATP} + 2 \text{NADPH} \rightarrow \text{Pro} + \text{ADP} + \text{Pi}$
76. $2\text{Glu} + \text{AcCoA} + \text{ATP} + \text{NADPH} \rightarrow \text{Orn} + \text{Ac} + \text{ADP} + \text{Pi} + \alpha\text{KG}$
77. $\text{Orn} + \text{CaP} \rightarrow \text{Citr} + \text{Pi}$
78. $\text{Citr} + \text{Asp} + \text{ATP} \rightarrow \text{Arg} + \text{Fum} + \text{AMP} + \text{PPi}$

Amino Asitlerin Katabolizması

79. $\alpha\text{KG} + \text{Ala} \rightarrow \text{Pyr} + \text{Glu}$
80. $\text{Arg} + \alpha\text{KG} \rightarrow 2\text{Glu} + \text{NH}_3 + \text{NADPH} + \text{CO}_2$
81. $\text{Asn} \rightarrow \text{Asp} + \text{NH}_3$
82. $\text{Asp} \rightarrow \text{Fum} + \text{NH}_3$
83. $\text{Cys} \rightarrow \text{Pyr} + \text{NH}_3 + \text{H}_2\text{S}$
84. $\text{Gln} + \alpha\text{KG} + \text{NADPH} \rightarrow 2\text{Glu}$
85. $\text{Gly} + \text{MetTHF} \rightarrow \text{Ser} + \text{THF}$
86. $\text{His} + \text{THF} \rightarrow \text{Glu} + \text{MeTHF}$
87. $\text{Ile} + \alpha\text{KG} \rightarrow \text{Glu} + \text{FADH}_2 + 2\text{NADH} + \text{CO}_2 + \text{SucCoA} + \text{AcCoA}$
88. $\text{Leu} + \alpha\text{KG} + \text{ATP} \rightarrow \text{Glu} + \text{FADH}_2 + \text{NADH} + 2\text{AcCoA} + \text{ADP} + \text{Pi}$
89. $\text{Phe} \rightarrow \text{Tyr} + \text{NADPH}$
90. $\text{Pro} \rightarrow \text{Glu} + \text{NADPH}$
91. $\text{Ser} \rightarrow \text{Pyr} + \text{NH}_3$
92. $\text{Thr} \rightarrow \text{Gly} + \text{NADH} + \text{AcCoA}$
93. $\text{Trp} + \text{NADPH} \rightarrow \text{AcCoA} + \text{Ala}$
94. $\text{Tyr} + \alpha\text{KG} + \text{SucCoA} \rightarrow \text{Glu} + \text{Fum} + \text{AcCoA} + \text{Succ} + \text{CO}_2$
95. $\text{Val} + \alpha\text{KG} \rightarrow \text{Glu} + \text{FADH}_2 + 3\text{NADH} + 2\text{CO}_2 + \text{SucCoA}$

Nükleotitlerin Biyosentezi

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

Yağ Asitlerinin ve Fosfolipidlerin Biyosentezi

113. $\text{T3P} + \text{NADPH} \rightarrow \text{GL3P}$
114. $7\text{AcCoA} + 6\text{ATP} + 12\text{NADPH} \rightarrow \text{C14:0} + 6\text{ADP} + 6\text{Pi}$
115. $7\text{AcCoA} + 6\text{ATP} + 11\text{NADPH} \rightarrow \text{C14:1} + 6\text{ADP} + 6\text{Pi}$
116. $8.2\text{AcCoA} + 7.2\text{ATP} + 14\text{NADPH} \rightarrow 7.2\text{PI} + 7.2\text{ADP} + \text{PA}$
117. $\text{UTP} + \text{G1P} \rightarrow \text{UDPGlc} + \text{PPi}$
118. $\text{PEP} + \text{NADPH} + \text{UGPNAG} \rightarrow \text{UDPNAM} + \text{Pi}$
119. $2\text{ATP} + \text{CO}_2 + \text{Gln} \rightarrow \text{CaP} + \text{Glu} + 2\text{ADP} + \text{Pi}$

Kofaktörlerin Biosentezi

120. DHF + NADPH → THF
121. MetTHF + CO₂ + NH₃ + NADH → Gly + THF
122. MetTHF + NADPH → MTHF
123. MetTHF → MeTHF + NADPH
124. MeTHF → F10THF
125. MetTHF + NH₃ + NADH + CO₂ → Gly + THF
126. NADH → NADPH
127. NADPH → NADH

Elektron Taşınım Sistemi

128. NADH + 2ADP + 2Pi → 2ATP
129. FADH₂ + ADP + Pi → ATP

Taşınım Tepkimeleri

130. CO₂ → exp
131. imp → CO₂
132. imp → NH₃
133. NH₃ → exp
134. 2ATP + 4 NADPH → AMP + ADP + H₂S + PPi + Pi
135. PPi → 2Pi
136. imp → Pi
137. Pi → exp

Hücre Bileşenleri Sentezi

138. F6P + Gln + AcCoA + UTP → UDPNAG + Glu + PPi
139. R5P + PEP + CTP → CMPKDO + PPi + 2 Pi
140. Ser + CTP + ATP → CDPEtN + ADP + PPi + CO₂
141. S7P + ATP → ADPHep + PPi
142. G6P → G1P
143. G1P → G6P

Hücre Sentezi

144. 0.58 Gly + 0.25 Gln + 0.25 Glu + 0.17 Phe + 0.13 Tyr + 0.377 Ser + 0.05 Trp + 0.22 Asp + 0.22 Asn + 0.32 Lys + 0.09 Cys + 0.14 Met + 0.24 Thr + 0.27 Ile + 0.2 Pro + 0.0593 Orn + 0.28 Arg + 0.5352 Ala + 0.4 Val + 0.42 Leu + 0.09 His + 0.2 GTP + 0.13 UTP + 0.12 CTP + 0.22 DATP + 0.02 DCTP + 0.02 DGTP + 0.02 DTTP + 0.129 GL3P + 0.0235 C140 + 0.0235 C141 + 0.259 PA + 0.0433 UDPNAG + 0.0276 UDPNAM + 0.0235 CMPKDO + 0.0235 CDPETN + 0.0157 UDPGLC + 0.02354ADPHEP + 0.154 G1P + 41.139 ATP → Hücre + 41.139 ADP + 41.139 Pi

Serin Alkali Proteaz Sentezi

145. (0.127 Gly + 0.0255 Gln + 0.0182 Glu + 0.0146 Phe + 0.0474 Tyr + 0.116 Ser + 0.0036Trp + 0.0328 Asp + 0.0657 Asn + 0.0328 Lys + 0.0182 Met + 0.0729 Thr + 0.0365 Ile + 0.0365 Pro + 0.0146 Arg + 0.145 Ala + 0.113 Val + 0.0584 Leu + 0.0182 His)x274 + 5.5 ATP → SAP + 5.5 ADP + 5.5 Pi

Yaşam (maintenance)

146. ATP → ADP + Pi

Anaplerotik Tepkime

147. Pyr + CO₂ → OA

Simgeler

| | | | |
|------------------|-----------------------------|-----------------|--|
| Ac | Asetat | IGP | İndolgliserolfosfat |
| AcCoA | Asetil koenzim A | Ile | L-Izolözin |
| ADP | Adenozin 5'-difosfat | IMP | İndosinmonofosfat |
| ADPHep | ADP-D-gliserol-D-mannofetoz | α KG | α -ketoglutarat |
| Ala | L-Alanin | Kval | Ketovalin |
| AMP | Adenozin 5'-monofosfat | Lac | Laktat |
| Arg | L-Arginin | Leu | L-Lözin |
| Asn | L-Asparagin | Lys | L-Lizin |
| Asp | L-Aspartat | Mal | Malat |
| AspSa | Aspartat semialdehid | Man | Mannoz |
| ATP | Adenozin 5'-trifosfat | Man6P | Mannoz 6-fosfat |
| C14:0 | Miristic asit | mDAP | meso-Diaminopimelat |
| C14:1 | Hidroksimiristik asit | Met | L-Metiyonin |
| CaP | Karbomil-fosfat | MeTHF | N ⁵ -N ¹⁰ -metenil-THF |
| CDP | Sitidin 5'-difosfat | MetTHF | N ⁵ -N ¹⁰ -metilen-THF |
| CDPEtN | CDP-etanolamin | MTHF | N ⁵ -metil-THF |
| Cit | Sitrat | NADH | Nikotinamid-adenindinükle |
| Citr | Sitruilin | NADPH | Nikotinamid-adenindinükle |
| Chor | Korisimat | | fosfat |
| CMP | Sitidin 5'-monofosfat | NH ₃ | Amonyak |
| CMPKDO | CMP-3-deoksi-D-manno- | OA | Okzaloasetat |
| | oktulosonik asit | Orn | Ornitin |
| CO ₂ | Karbondioksit | PEP | Fosfofenolpürivat |
| CTP | Sitidin 5'-trifosfat | PPP | Pentoz fosfat yolizi |
| Cys | L-Sistein | PG3 | Gliserat 3-fosfat |
| dATP | 2'-Deoksi-ATP | Phe | L-Fenilalanin |
| dCTP | 2'-Deoksi-CTP | Pi | İnorganik ortofosfat |
| dGTP | 2'-Deoksi-GTP | Ppi | İnorganik pirofosfat |
| dTTP | 2'-Deoksi-TTP | PRAIC | 5'-Fosforiboz-4-karboksiarr |
| DC | L,2,3 dihidrodipicolinate | | aminoimidazol |
| DHF | 7.8-Dihidrofolat | Pro | L-Prolin |
| E4P | Eritiroz 4-fosfat | PRPP | 5-Fosfat-D-ribozilpirofosfat |
| F10THF | N ¹⁰ -Formil-THF | Pyr | Pürivat |
| F6P | Fruktoz 6-fosfat | R5P | Ribüloz 5-fosfat |
| FA | Yağ asitleri | Rib5P | Riboz 5-fosfat |
| FADH | Flavinadenindinükleotit | SAP | Serine alkaline protease |
| Frc | Fruktoz | S7P | Sedoheptuloz-7-fosfat |
| Fum | Fumarat | Ser | L-Serin |
| G1P | Glukoz 1-fosfat | Suc | Süksinat |
| G6P | Glukoz 6-fosfat | SucCoA | Süksinat koenzim A |
| GDP | Guanozine 5'-difosfat | Xyl5P | Ksiloz 5-fosfat |
| GL3P | Gliserol 5-fosfat | TCA | Trikarboksilik asit döngüsü |
| Glc | Glukoz | Tet | L,2,3,4,5 Tetrahidrodipikoli |
| Gln | L-Glutamin | T3P | Tiroz 3-fosfat |
| Glu | L-Glutamat | THF | Tetrahidrofolat |
| Gluc | Glukonat | Thr | L-Treonin |
| Gluc6P | Glukonat 6-fosfat | Trp | L-Triptofan |
| Glx | Glyoxlate | Tyr | L-Tirozin |
| Gly | L-Glisin | UDP | Uridin 5'-difosfat |
| GMP | Guanozin 5'-monofosfat | UDPGlc | UDP-glukoz |
| GTP | Guanozin 5'-trifosfat | UDPNAG | UDP-N-Acetil-glucozamine |
| H ₂ S | Hidrojen sulfid | UDPNAM | UDP-N-Acetil-muramik asi |
| His | L-Histidin | UMP | Uridin 5'-monofosfat |
| Hser | Homoserin | UTP | Uridin 5'-trifosfat |
| ICit | İzositrat | Val | L-Valine |

Ek-2 *subC* nükleik asit dizini (GenBank Acc. No. X03341)

| | | | |
|------------|---------------------|---------|------------|
| terminator | | 487721: | 1271..1305 |
| Gene | Locus: subC | 487721: | 262..1531 |
| Sequence | 1588 nt, linear dna | | |

```

1 gatcgacaag accgcaacct cttcgacaa aaaatgatct cttaaaataa
51 atgaatagta ttttcataaa atyaatcaga tggagcaatc tcctgtcatt
101 cgcggccctc gggacctctt tcctgccag gctgaagcgg tctattcata
151 ctttcgaact gaacatTTTT ctaaaacagt tattaataac caaaaaattt
201 taaattggtc ctccaaaaaa ataggcctac catataattc attttttttc

251 tataataaat taacagaata attggaatag attatattat ctttctattt
301 aaattattct gaataaagag gaggagagtg agtaatgatg aggaaaaaga
351 gtttttggct tgggatgctg acggccttca tgctcgtggt cacgatggca
401 ttcagcgatt ccgcttctgc tgctcaaccg gcgaaaaatg ttgaaaagga
451 ttatattgtc ggatttaagt caggagtgaa aaccgcatct gtcaaaaagg

501 acatcatcaa agagagcggc ggaaaagtgg acaagcagtt tagaatcatc
551 aacgcggcaa aagcgaagct agacaaagaa gcgcttaagg aagtcaaaaa
601 tgatccggat gtcgcttatg tggaagagga tcatgtggcc catgccttgg
651 cgcaaaccgt tccttacggc attcctctca ttaaagcgga caaagtgcag
701 gctcaaggct ttaagggagc gaatgtaaaa gtagccgtcc tggatacagg

751 aatccaagct tctcatccgg acttgaacgt agtcggcgga gcaagctttg
801 tggctggcga agcttataac accgacggga acggacacgg cacacatggt
851 gccggtacag tagctgcgct tgacaataca acgggtgtat taggcgttgc
901 gccaaagcgt tccttgtagc cggttaaagt actgaattca agcgggaagcg
951 gaacttacag cggcattgta agcgggaatcg agtgggcgac gacaaacggc

1001 atggatgtta tcaacatgag tcttggagga ccatcaggct caacagcgat
1051 gaaacagggc gttgacaatg catatgcaag aggggttgtc gttgtggcgg
1101 ctgctgggaa cagcggatct tcaggaaaca cgaatacaat cggctatcct
1151 gcgaaatacg actctgtcat cgcagttggc gcggtagact ctaacagcaa
1201 cagagcttca ttttccagcg tcggagcaga gcttgaagtc atggctcctg

1251 gcgcaggcgt gtacagcact tacccaacca gcacttatgc aacattgaac
1301 ggaacgtcaa tggcttctcc tcatgtagcg ggagcagcag ctttgcattt
1351 gtcaaaacat ccgaaccttt cagcttcaca agtccgcaac cgtctctcca
1401 gtacggcgac ttatttggga agctccttct actatggaaa aggtctgatc
1451 aatgtcgaag ctgccgctca ataacatatt ctaacaaatg gcatatagaa

1501 aaagctagtg tttttagcac tagctttttc ttcattcagt tgaagactgt
1551 tcaatatttt gaatccgttc cattatggtc ggatggcc

```

Journal of Agricultural Science, Cambridge
 Printed in the United Kingdom
 © Cambridge University Press 1987

PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

| |
|--|
| Proje Kodu: MİSAG176 |
| Proje Başlığı: SERİN ALKALİ PROTEAZ ÜRETİMİNDE HÜCREİÇİ DARBOĞAZLARIN BELİRLENMESİ VE PROSESİN GELİŞTİRİLMESİ |
| Proje Yürütücüsü ve Yardımcı Araştırmacılar: Doç.Dr. Pınar Çalık |
| Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü |
| Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: |
| Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: Mart 2001 – Mart 2003 |
| Öz (en çok 70 kelime): Beş alt araştırma programından oluşan projenin ilk alt-programında <i>B.licheniformis</i> 'te serin alkali proteaz (SAP) üretiminden sorumlu gen <i>subC</i> dokuz <i>Bacillus</i> türü hücreye klonlanmış; rekombinant mikroorganizmaların performanları kıyaslanmıştır. İkinci alt-programda metabolik yolizi mühendisliği analizi ile rekombinant hücrelerin hücreiçi tepkime hızlarındaki değişimler bulunmuştur. Üçüncü alt-programda hücreiçi metabolit derişimlerinin belirlenmesi için yöntem geliştirilmiş ve valinin SAP üretimini kısıtladığı bulunmuş ve dördüncü alt-programda alanin grubu amino asitlerin SAP üretimine etkisi araştırılmıştır. Son alt-programda tasarlanan melas temelli kompleks ortamda oksijen aktarımının etkisi incelenmiştir. Son aşamada soya temelli ortam tasarımı yapılarak SAP üretim prosesi geliştirilmiştir. |
| Anahtar Kelimeler: Serin alkali proteaz, metabolik yolizi mühendisliği, hız kısıtlayıcı bileşikler, rekombinant <i>Bacillus</i> türleri, kompleks ortam tasarımı |
| Projeden Kaynaklanan Yayınlar: Çalık, P., Bayram, A., and Özdamar, T.H., 2003. Regulatory effects of alanine group amino acids on serine alkaline protease production by recombinant <i>Bacillus licheniformis</i> , Biotechnology and Applied Biochemistry , 37, 165-171. Çalık, P., Bilir, E., Çalık, G., Özdamar, T.H., 2003. Bioreactor operation parameters as tools for metabolic regulations in serine alkaline protease production: Influence of pH conditions. Chemical Engineering Science , 58(3), 759-766. Çalık, P., Kalender, N., Özdamar, T.H., 2003. Overexpression of serine alkaline protease encoding gene in <i>Bacillus</i> species: Performance Analyses. Enzyme and Microbial Technology , 33(7), 967-974. Çalık P., Çelik, E., Telli, I.E, Oktar, C., Özdemir, E., 2003. Protein based complex medium design for recombinant serine alkaline protease production by <i>Bacillus subtilis</i> . Enzyme and Microbial Technology , 33(7), 975-986. Çalık, P., Bilir, E., Özçelik-Şenver, İ., Çalık, G., 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(1), 194-200. |
| Bilim Dalı: Kimya Mühendisliği Doçentlik Bilim Dalı Kodu: |