



2006-433

TÜBİTAK

TÜRKİYE BİLİMSEL VE TEKNOLOJİK ARAŞTIRMA KURUMU
THE SCIENTIFIC AND TECHNOLOGICAL RESEARCH COUNCIL OF TURKEY

Mühendislik Araştırma Grubu
Engineering Sciences Research Grant Group

9/234

**BETA-LAKTAMAZ ENZİM ÜRETİMİ İÇİN ENDÜSTRİYEL
BİYOTEKNOLOJİK PROSES GELİŞTİRİLMESİ**

**PROJE NO:MİSAG 258
103M033**

PROF.DR. PINAR ÇALIK

**KASIM 2006
ANKARA**

Önsöz

“Beta-laktamaz enzim üretimi için endüstriyel biyoteknolojik proses geliştirilmesi” konulu MİSAG 258 Projesi, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, “Endüstriyel Biyoteknoloji ve Metabolik Mühendislik Laboratuvarında” yürütülmüştür. Farmasötik sanayinde kullanılan beta-laktamaz enziminin biyoteknolojik prosesle üretimi için projelendirilmiş ve TÜBİTAK-MİSAG tarafından desteklenmiştir

Türkiye'nin Avrupa Birliğine, Bağımsız Devletler Topluluğuna, Orta Doğu Pazarlarına yakınlığı ve büyük nüfusu, ortaya çıkan ve yeni çıkacak taleplerin karşılanması için doğal kaynaklarımızın kullanılarak yeni ürünler üretilmesini ve bunun için özgün proseslerin geliştirilmesini öncelikli araştırma ve uygulama alanı yapmaktadır. Bilim-buluş-teknoloji güdümünde sanayileşmenin temel strateji olarak benimsendiği Sekizinci Plan Döneminde, önerilen ve desteklenen MİSAG-258 Projesi biyoteknolojik ürünler üretim alanında, enzim üretim sektörünün oluşması için önemli bir araştırma projesidir. Birim fiyatı $\text{€ } 25 \text{ U}^{-1}$ olan β -laktamaz enziminin Türkiye'de üretimi yoktur. Bu proje kapsamında, “antibody-yönlendirilmiş enzim prodrug terapi (antibody-directed enzyme prodrug therapy: ADEPT)” tasarımı -son üç yıldan beri- kullanılan β -laktamaz enziminin %99.9 saf olması gerektiği için, üretim ortamı maya özütü gibi kompleks bileşikler içerdiğinde enzim saflaştırma maliyetleri artacağından, bu amaçla üretilecek β -laktamaz üretim ortamında yarı-tanımlanmış üretim ortamı kullanılmaması gerektiği düşünülmüştür. Kompleks bileşikler içeren geliştirilen birinci ortam “yarı-tanımlanmış ortam” yerine, kompleks bileşikler içermeyen “tanımlanmış ortam” tasarımı yapılması gerekli görülmüştür. Tanımlanmış üretim ortamı zenginleştirilmiş ortam olmadığından, beklendiği gibi β -laktamaz aktivitesi, zengin “yarı-tanımlanmış ortama” göre daha düşük bulunmuştur ($t=27$ st'te $A= 90 \text{ U cm}^{-3}$). Bu nedenle, biyoreaktör işletim koşullarının β -laktamaz üretimine etkisi “tanımlanmış ortamda” incelenmiştir. Tanımlanmış ortam ile β -laktamaz üretimini arttırmak için de, kesikli biyoreaktör sistemi yerine yarı-kesikli biyoreaktör sisteminde üretim yöntemi kullanılarak, daha kısa biyoreaktör kalma süresinde ($t=16$ st'te) $A=106 \text{ U cm}^{-3}$ aktiviteli β -laktamaz üretimi başarılmıştır.

TÜBİTAK-MİSAG 258 projesi iki değerli araştırmacının yetişmesi için olanak sağlamıştır. KYM Eda Çelik'in başarılı araştırmalarıyla Projenin birinci araştırma programı, KYM Nazar İleri'nin başarılı yüksek lisans araştırmalarıyla da Projenin ikinci önemli araştırma programı tamamlanmıştır. Şimdi ODTÜ 'de (EÇ) ve UC Davis'de (Nİ) doktora araştırmalarını başarıyla sürdüren geleceğin iki değerli bilim insanı, yüksek lisans araştırmalarını tamamladıktan sonra da yaptıkları çalışmalarla projenin başarıyla sürmesinde, yayınların oluşmasında değerli katkılarını yapmışlardır. Proje kapsamında elde edilen bilgiler doğrultusunda literatüre önemli katkılar yapılmıştır. İki Biotechnology Progress'de, biri Journal of Chemical Technology and Biotechnology'de, biri de Journal of Applied Microbiology'de dört makale yayınlanmıştır.

Pınar Çalık

9 Kasım 2006

İçindekiler

	Sayfa
Önsöz	i
İçindekiler Listesi	ii
Şekillerin Liste	iv
Çizelgelerin Listeleri	vi
Simgeleme	vii
Öz	viii
Abstract	ix
1. GİRİŞ	1
2. GELİŞME	2
2.1. Materyal ve Metot	2
2.1.1. Kullanılan bakteriler, çoğalma ortamı	2
2.1.2. β -laktamaz katı ve on-sıvı ortamları	3
2.1.3. β -laktamaz üretim ortamı	3
2.1.4. Ölçek büyütme adımları ve biyoreaktör sistemi	4
2.1.5. Analitik Yöntemler	5
2.1.6. Sıvı faz kütle aktarım katsayısının ve oksijen tüketim hızının belirlenmesi	7
2.1.7. Metabolik Yolizi Mühendisliği Analizi İçin Optimizasyon Programı	8
2.2. Bulgular	9
2.2.1. Beta-laktamaz üretim potansiyeli yüksek mikroorganizmanın seçimi	9
2.2.1.1. İndükleme stratejisi	9
2.2.1.2. İndüklenerek ve doğal olarak β -laktamaz üreten mikroorganizmaların karşılaştırılması	9
2.2.2. Ortam tasarımı	9
2.2.2.1. Glukoz derişiminin etkisi	10
2.2.2.2. İnorganik azot kaynaklarının etkisi	11
2.2.2.3. $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ve maya özütünün etkileri	11
2.2.2.4. Organik azot kaynaklarının etkisi	13
2.2.2.5. Alternatif karbon kaynaklarının etkisi	13
2.2.2.6. Tanımlanmış ortam	13
2.2.3. Beta-laktamaz üretime oksijen aktarımının etkisi	15
2.2.4. Hücreiçi tepkime hızlarına oksijen aktarımının etkisi	20
2.2.5. Beta-laktamaz üretimi üzerine pH etkisi	30

2.2.6. Besleme stratejisi geliştirilmesi	34
2.2.7. Hücre içi tepkime hızlarına besleme stratejisinin etkisi	38
3.SONUÇLAR	42
Kaynaklar	43
Ekler	45
Ek-1	45

Şekillerin Listesi:

- Şekil 1. β -laktamaz aktivitesinin başlangıç glukoz derişiminine bağlı değişimi. $t=35$ st, $V_R=33$ cm^3 , $T=37^\circ\text{C}$, $\text{pH}=7.2$, $N=200$ dk^{-1}
- Şekil 2. β -laktamaz aktivitesi ve hücre derişiminin başlangıç azot derişiminine bağlı değişimi. $C_{G^0}=8.0$ kg m^{-3} , $t=35$ st, $V_R=33$ cm^3 , $T=37^\circ\text{C}$, $\text{pH}=7.2$, $N=200$ dk^{-1} .
- Şekil 3. β -laktamaz aktivitesinin , başlangıç pepton ve kazaminoasitler derişimleri ve kalma süresi ile değişimi. $V_R=33$ cm^3 , $T=37^\circ\text{C}$, $\text{pH}=7.2$, $N=200$ dk^{-1} .
- Şekil 4. β -laktamaz aktivitesinin faklı karbon kaynaklarının ve kalma süresi ile değişimi. $V_R=33$ cm^3 , $T=37^\circ\text{C}$, $\text{pH}=7.2$, $N=200$ dk^{-1} .
- Şekil 5. Çözünmüş oksijen derişiminin kalma süresi ve oksijen aktarım koşulları ile değişimi. $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=1.65$ dm^3 .
- Şekil 6. Ortam pH 'ının kalma süresi ve oksijen aktarım koşulları ile değişimi. $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=1.65$ dm^3 .
- Şekil 7. Glukoz derişiminin kalma süresi ve oksijen aktarım koşulları ile değişimi. $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=1.65$ dm^3 .
- Şekil 8. Hücre derişiminin kalma süresi ve oksijen aktarım koşulları ile değişimi. $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=1.65$ dm^3 .
- Şekil 9. Beta-laktamaz aktivitesinin kalma süresi ve oksijen aktarım koşulları ile değişimi $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=1.65$ dm^3 .
- Şekil 10. Hücre ve beta-laktamaz derişimlerinin kalma süresi ve oksijen aktarım koşulları ile değişimi. $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=1.65$ dm^3 .
- Şekil 11. Evre I pyruvat (Pyr) nodundaki akı dağılımı
- Şekil 12. Hücre derişiminin pH ve kalma süresi ile değişimi. $C_{G^0}=7.0$ kg m^{-3} , $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=1.65$ dm^3 , $Q_0/V_R=0.5$ vvm , $N=500$ min^{-1} .
- Şekil 13. Glukoz derişiminin pH ve kalma süresi ile değişimi $C_{G^0}=7.0$ kg m^{-3} , $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=1.65$ dm^3 , $Q_0/V_R=0.5$ vvm , $N=500$ min^{-1} .
- Şekil 14. β -laktamaz aktivitesinin pH ve kalma süresi ile değişimi. $C_{G^0}=7.0$ kg m^{-3} , $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=1.65$ dm^3 , $Q_0/V_R=0.5$ vvm , $N=500$ min^{-1} .
- Şekil 15. Çözünmüş oksijen derişiminin pH ve kalma süresi ile değişimi. $C_{DO^*}=0.20$ mol m^{-3} . $C_{G^0}=7.0$ kg m^{-3} , $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=1.65$ dm^3 , $Q_0/V_R=0.5$ vvm , $N=500$ min^{-1} .
- Şekil 16. Oksijen derişiminin besleme stratejisi ve kalma süresi ile değişimi. FB1 ve FB2 için $C_{G^0}=2.5$ kg m^{-3} , $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=1.65$ dm^3 , $Q_0/V_R=0.5$ vvm , $N=500$ dk^{-1} .
- Şekil 17. Glukoz derişiminin besleme stratejisi ve kalma süresi ile değişimi. FB1 ve FB2 için $C_{G^0}=2.5$ kg m^{-3} , $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=1.65$ dm^3 , $Q_0/V_R=0.5$ vvm , $N=500$ dk^{-1} .

Şekil 18. Besleme stratejisinin hücre derişimine etkisi. FB1 ve FB2 için $C_G^0 = 2.5 \text{ kg m}^{-3}$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R= 1.65 \text{ dm}^3$, $Q_0/V_R=0.5 \text{ vvm}$, $N=500 \text{ dk}^{-1}$.

Şekil 19. Besleme stratejisinin β -laktamaz aktivitesine etkisi. FB1 ve FB2 için $C_G^0 = 2.5 \text{ kg m}^{-3}$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R= 1.65 \text{ dm}^3$, $Q_0/V_R=0.5 \text{ vvm}$, $N=500 \text{ dk}^{-1}$.

Şekil 20. Üstel-artışla yarı-kesikli işletimde $t=18 \text{ st}$ *B.licheniformis* canlılığı

Çizelgeleri Listesi:

- Çizelge 1. *Bacillus sp.* için katı çoğalma ortamı
- Çizelge 2. *Bacillus sp.* için ön-sıvı çoğalma ortamı
- Çizelge 3. β -laktamaz üretim prosesi için tasarlanan parametreler
- Çizelge 4. β -laktamaz üretim prosesi için referans üretim ortamı
- Çizelge 5. β -laktamaz aktivitesinin, başlangıç maya özütü ve azot kaynağı $((\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4)$ derişimleri ile değişimi
- Çizelge 6. Oksijen aktarım koşulları ve kısaltmaları
- Çizelge 7. Toplam amino asit derişimlerinin ve ortama salgılanmayan amino asitlerin oksijen aktarım koşulu ile değişimi
- Çizelge 8. Toplam organik asit derişimlerinin ve ortama salgılanan organik asitlerin oksijen aktarım koşulu ile değişimi
- Çizelge 9. K_{1a} 'nın kalma süresi, karıştırma ve gaz giriş hızı ile değişimi
- Çizelge 10. Hücreiçi tepkime hızlarının oksijen aktarımı ile değişimi
- Çizelge 11. Oksijen tüketim hızı (OTH) ve oksijen aktarım hızının (K_{1a}) pH ve kalma süresi ile değişimi (GP: Hücre çoğalma periyodu; PP: enzim üretim periyodu).
- Çizelge 12. Fosfat ile zenginleştirilmiş β -laktamaz üretim ortam bileşimi
- Çizelge 13. Hücre dışı amino asit derişimlerinin kesikli ve yarı-kesikli üretim ile değişimi
- Çizelge 14. Hücre dışı organik asit derişimlerinin kesikli ve yarı-kesikli üretim ile değişimi
- Çizelge 15. İşletim modu ve zamanla hücre canlılığının değişimi

Simgeleme

C_{AA}	toplam amino asit derişimi, kg/m^3
C_{Blac}	beta-laktamaz derişimi, kg/m^3
C_{DO}	çözünmüş oksijen derişimi, mol/m^3
C_G	glukoz derişimi, kg/m^3
$C_{MÖ}$	başlangıç maya özütü derişimi, kg/m^3
C_X	kuru hücre derişimi, kg/m^3
K_{La}	tüm kütle aktarım katsayısı, s^{-1}
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, $^{\circ}\text{C}$
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}

Kısaltmalar:

A	beta laktamaz aktivitesi
AA	amino asitler
C	pH kontrollü işletim
GP	hücre çoğalma fazı
PP	enzim üretim fazı
UC	pH kontrolsüz işletim

Öz

β -laktamaz enzimi farmasötik endüstrisinde ilaç tasarımında, kanda penisilin ve diğer β -laktam antibiyotiklerinin derişimlerinin tayininde, vücutta antibiyotik alerjisine karşı penisilin ve β -laktam antibiyotiklerin parçalanmasında ve ELİSA kitlerinde enzim-etiketi (label) olarak, "antibody-yönlendirilmiş enzim prodrug terapi (antibody-directed enzyme prodrug therapy: ADEPT)" tasarımında -son üç yıldan beri- kullanılmakta olan önemli endüstriyel enzimlerdendir. β -laktamaz üretimi için metabolik ve reaksiyon mühendisliği prensip ve teknikleri kullanılarak verim ve seçimliliği yüksek mikroorganizmanın ve biyoteknolojik prosesin geliştirilmesi gerekmektedir. Beş alt-araştırma programından oluşan projenin birinci evresinde β -laktamaz üretim potansiyeli yüksek mikroorganizma seçimi yapılmıştır. İkinci alt-araştırma programında seçilen *Bacillus licheniformis* 749/C için ortam tasarlanmıştır; üçüncü alt program ile oksijen aktarımının β -laktamaz üretimi üzerine etkisi araştırılmış; dördüncü alt-araştırma program ile metabolik yolizi mühendisliği (MYM) analizi ile hücreiçi tepkimeler stokiyometrik denklemleriyle birlikte araştırılarak 143 tepkimeden oluşan tepkime yolizleri belirlenmiş, 143 tepkimede yer alan 105 bileşik için kütle korunum denklemlerinden oluşan matematik model kurulmuş, ve oksijen aktarımının hücreiçi tepkime hızlarına etkisi araştırılmıştır. Beşinci alt-araştırma programında pH kontrollunun ve substrat besleme stratejisinin β -laktamaz üretimi üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu proje kapsamında, glukoz ve maya özütü içeren yarı-tanımlanmış üretim ortamında β -laktamaz aktivitesi 210 U cm^{-3} ile üretilmiştir; ancak "antibody-yönlendirilmiş enzim prodrug terapi (antibody-directed enzyme prodrug therapy: ADEPT)" tasarımında -son üç yıldan beri- kullanılan β -laktamaz enziminin %99.9 saf olması gerektiği için, üretim ortamı maya özütü gibi kompleks bileşikler içerdiğinde enzim saflaştırma maliyetleri artacağından, glukoz temelli tanımlanmış ortam tasarlanmıştır. En yüksek β -laktamaz aktivitesine ulaşılan glukoz temelli ortam ile; karıştırma hızı, sıcaklık, pH, çözülmüş oksijen derişimi ve köpük kontrollu, oksijene göre sürekli diğer girdilere göre kesikli 3.0 dm^3 hacımlı pilot ölçek biyoreaktör sistemlerinde oksijen aktarımının β -laktamaz üretimine etkisi incelenmiş; en yüksek aktivite $Q_0/V=0.5 \text{ vvm}$, $N=500 \text{ dk}^{-1}$ $\text{pH}_{\text{UC}}=7.5$ koşullarında $t=27 \text{ st}'te$ $A=90 \text{ U cm}^{-3}$ olarak bulunmuştur. β -laktamaz birincisi $t=0-10 \text{ st}$ ikincisi $t=20-28 \text{ st}$ olmak üzere iki evrede üretilmiştir. Birinci evreyi uzatmak için besleme stratejisi araştırılmıştır. Ancak yarı-kesikli işletimde pH'da önemli değişimler olacağı için önce pH kontrol etkisi araştırılmış, en uygun pH işletim koşulu $\text{pH}_c=6.75$ olarak bulunmuştur. Bulunan en uygun pH işletim koşulunda, üstel-besleme stratejisi ile $t=16 \text{ st}'te$ en yüksek aktivite $A=106 \text{ U cm}^{-3}$ olarak elde edilmiştir.

Anahtar kelimeler: β -laktamaz, oksijen aktarımı, metabolik yolizi mühendisliği, pH, *Bacillus*, ortam tasarımı, besleme stratejisi

Abstract

Among biotechnological products beta-lactamase, pharmaceutical enzyme, is used for pharmaceutical drug design, for destruction of residual penicillin in blood cultures, for the treatment of penicillin sensitivity reactions, further, the development of beta-lactamase dependent prodrugs with the applications in antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT) has been an area of particular interest showing that the application fields of beta-lactamase is increasing considerably. The broad objective of this research project is to produce beta-lactamase with high productivity and selectivity by using metabolic + reaction engineering principles and techniques. In this context, in the first phase of the research beta-lactamase producing *Bacillus licheniformis* was selected, among *Bacillus* strains and for the one having the highest potential for the enzyme production, was designed. In the third phase of the research, the effects of bioreactor operation parameters on beta-lactamase production was investigated. Thereafter, using a mass flux-balance based stoichiometric model for *B.licheniformis* has been set up. The model considers 143 reaction fluxes, and there are 105 metabolites that are assumed to be in pseudo-steady state. Using the model, effect of oxygen transfer on intracellular reaction network of *B.licheniformis* was investigated. In the last phase of the research, effect of pH controlled operation and feeding strategy development were focused. Firstly, glucose and yeast extract based semi-defined medium was designed in which $A=210 \text{ U cm}^{-3}$ β -lactamase activity was obtained at $t=32 \text{ h}$. Thereafter, on the basis of the use of the enzyme in ADEPT defined medium was designed. Using the glucose based medium contained (kg m^{-3}): glucose, 7.0; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 7.1; and the following salt solution (kg m^{-3}): $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.25; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.0×10^{-3} ; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.0×10^{-3} ; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 7.5×10^{-5} ; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1.0, the highest activity was obtained at $N = 500 \text{ min}^{-1}$ and air inlet rates of $Q_0/V_R = 0.5 \text{ vvm}$ at $\text{pH}_{\text{UC}}=7.5$ at $t=27 \text{ h}$ as $A=90 \text{ U cm}^{-3}$ using the bioreactor systems (BBraun, Germany) with $V=3.0 \text{ dm}^3$ and $V_R=1.65 \text{ dm}^3$ working volume, and consisted of temperature, pH, foam, air inlet, and stirring rate controls. Biphasic variations in β -lactamase production was enhanced to mono-phasic variation with the exponential feeding strategy where the activity was obtained as $A=106 \text{ U cm}^{-3}$ at $t=16 \text{ h}$ with the operation conditions of $N = 500 \text{ min}^{-1}$ and $Q_0/V_R = 0.5 \text{ vvm}$, $\text{pH}_C=6.75$.

Key words: β -lactamase, oxygen transfer, metabolic flux analysis, pH, *Bacillus*, medium design, feeding strategy

1. GİRİŞ

Enzimler amino asitlerin peptit bağları ile bağlanması sonucu oluşan ve biyokimyasal tepkimeleri katalizleyen protein yapısındaki biyopolimerlerdir. Mikrobiyal hücre, hayvan ve bitki dokularından üretilen enzimlerin endüstride farmasötik, gıda, deri, tekstil ve deterjan sanayilerinde kullanımı gereklidir. Başta penisilin olmak üzere, β -laktam antibiyotiklerinin laktam halkasındaki amid bağına parçalayan, hidroliz sınıfına giren beta-laktamaz (EC 3.5.2.6), farmasötik enzimlerdendir. Beta-laktamaz, *Bacillus* bakteri grubu tarafından üretilir; *B. cereus*, *B. licheniformis*, β -laktamaz üretme potansiyeli en yüksek olan türlerdir. Beta-laktamaz enzimi farmasötik endüstrisinde ilaç tasarımı, kanda penisilin ve diğer β -laktam antibiyotiklerinin derişimlerinin tayininde, vücutta antibiyotik alerjisine karşı penisilin ve β -laktam antibiyotiklerin hidroliz edilmesinde ve ELİSA kitlerinde enzim-etiketi (label) olarak kullanılmaktadır (White ve White, 1997) ve kullanım alanları da sürekli artmaktadır. Son yıllarda, geliştirilen β -laktamaz temelli antijen yönlendirmeli enzim-ilaç terapi ilaçları da β -laktamaz enzimine ilgiyi arttırmıştır (Tang et al., 2003; McDonagh et al., 2003; Harding et al., 2005, Hakimelahi et al., 2005; Alderson et al., 2006). Enzimatik transformasyon tepkimelerinde kullanılan enzimlerin toplam üretiminin %20'sini β -laktamaz oluşturur (West, 1996). Unitesi 25 € olan β -laktamaz enziminin Türkiye'de üretimi yoktur.

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

Farmasötik endüstrisinde kullanılması nedeniyle β -laktamaz enzimlerinin yapıları ve enzimatik özellikleri ile ilgili literatürde yeterli yayım olmasına karşın (Citri ve Kalkstein 1967; Kuwabara 1970; Kuwabara vd. 1970; Nielsen ve Lampen 1983; Connolly ve Waley 1983; Bounaga vd. 1998; Carfi 1998.), β -laktamaz enzimlerinin *Bacillus* türü mikroorganizmalarla üretimi ile ilgili üç çalışma (Hemila vd. 1992; Sargantanis ve Karim 1996, 1998) bulunmaktadır. Hemila vd. (1992) standart bir ortam olan Luria ortamını (LB) glukoz ile modifiye etmiş ve proteaz üretimini azaltarak β -laktamaz parçalanmasını engellediğini bildirmiş ve tasarladığı ortamda pH ve sıcaklık etkisi araştırmış ve β -

laktamaz üretimini gliserol (4 g/L), tripton (12 g/L) ve maya özütünce (24 g/L) zengin üretim ortamında 260 U cm³'e çıkarmışlardır. Sargantanis ve Karim (1996) önce oksijen kısıtlamasının β-laktamaz üretimine etkisini araştırdıktan sonra aynı grup (Sargantanis ve Karim 1998) oksijen kısıtlamalı koşullarda model desteğiyle oksijen derişimini kontrol etmişler, ancak en uygun koşullarında 2.5 U cm³ aktiviteye sahip β-laktamaz üretimi gerçekleştirmişlerdir. Yukarıdaki üç çalışmada en uygun koşullar olarak bildirilen koşulların, proteaz üretiminin inhibe edildiği ve aynı zamanda *Bacillus* türü hücrelerin hem çoğalma hem de enzim/protein üretimi açısından verimsiz olduğu koşullardır. Proje ekibinin *Bacillus* ile enzim üretimi araştırma (Çalık vd., 1998, 2000) birikimi temelinde, β-laktamaz ile ilgili mevcut literatür bilgilerinin yetersizliği dikkati çekmektedir.

Beta-laktamaz enziminin, endüstriyel üretimi için metabolik ve reaksiyon mühendisliği teknikleriyle, verim ve seçimliliği yüksek mikroorganizmanın ve biyoteknolojik prosesin geliştirilmesi önerilen projenin konusunu oluşturmaktadır. Bu kapsamında farklı *Bacillus* türlerinin β-laktamaz üretim ve salgılama kapasiteleri karşılaştırılmış, β-laktamaz üretim potansiyeli yüksek mikroorganizma kullanılarak β-laktamaz üretimi için ortam tasarlanmıştır. Tasarlanan ortamda biyoreaktör işletim parametrelerinden oksijen aktarımının ürün ve yan-ürün dağılımına etkisi araştırılmıştır. Metabolik yolizi mühendisliği (MYM) analizi ile hücreiçi tepkimeler stokiyometrik denklemleriyle birlikte araştırılarak 143 tepkimeden oluşan tepkime yozizleri belirlenmiş, 143 tepkimede yer alan 105 bileşik için kütle korunum denklemlerinden oluşan matematik model kurulmuş, ve oksijen aktarımının hücreiçi tepkime hızlarına etkisi araştırılmıştır. Projenin son araştırma programında pH kontrollunun ve substrat besleme stratejisinin β-laktamaz üretimi üzerine etkisi araştırılmıştır.

2. GELİŞME

2.1. Materyal ve Metot

2.1. 1. Kullanılan bakteriler ve çoğalma ortamı

Bacillus licheniformis 749/C (ATCC 25972), *Bacillus licheniformis* (NRS 978), *Bacillus licheniformis* (NRS 243), *Bacillus licheniformis* (DSM 1969), *Bacillus subtilis* (NRS 1125), *Bacillus subtilis* (BGSC 168) 5 kg m⁻³ soytripton, 5 kg m⁻³ pepton, 0.010 kg m⁻³ MnSO₄.2H₂O, 15 kg m⁻³ agar içeren katı ortamda çoğaltılmış ve β-laktamaz üretim potansiyelleri karşılaştırılmıştır.

2.1.2. β -laktamaz katı ve ön-sıvı ortamları

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

Çizelge 1. *Bacillus sp.* için katı çoğalma ortamı

Bileşen	Derişim, kg m^{-3}
Pepton	5.0
Soytripton	5.0
$\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.01
Agar	15.0

Çizelge 2. *Bacillus sp.* için ön-sıvı çoğalma ortamı

Bileşen	Derişim, kg m^{-3}
Soyton	15
Pepton	5.0
CaCl_2	0.10
Na_2HPO_4	0.25
$\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.01

2.1.3. β -laktamaz üretim ortamı

Sıvı çoğalma ortamı tasarımı için araştırma programı kapsamında incelenen parametreler Çizelge 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 Çizelge 4 'te verilen üretim ortamlarına aktarılmıştır.

2.1.4 Ölçek büyütme adımları ve biyoreaktör Sistemi

β -laktamaz enzimi üretiminde kullanılan ölçek büyütme adımları: Birinci basamakta mikroorganizma mikrobanktan katı ortama aktarılmış, ikinci basamakta katı ortamdaki 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.

β -laktamaz üretim deneyleri, laboratuvar ve pilot ölçek olmak üzere iki farklı ölçekte yapılmıştır. Laboratuvar ölçekte $V_g=33 \text{ cm}^3$ çalışma hacimli mikrobiyolojik hava filtreli tam karıştırmalı kesikli biyoreaktörlerde $N=200 \text{ dk}^{-1}$ karıştırma hızı, $T=37^\circ\text{C}$ sıcaklıkta yaklaşık $t=30$ st süreyle β -laktamaz üretimi gerçekleştirilmiştir.

Pilot ölçekte yapılan β -laktamaz üretim deneylerinde $V=3 \text{ dm}^3$ biyoreaktör üretim ortamına aktarılmıştır. Bu adımda kullanılan BBraun-CT2-2 biyoreaktörler $V_R=1.65 \text{ dm}^3$ toplam hacimli, mekanik karıştırmalı, 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 çeketten yapılmaktadır. Soğutma suyu, sıcaklığı $T=-5-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 'e ayarlanabilen soğutmalı sirkülasyon ile; reaktöre beslenen hava ise hava kompresörü ile sağlanmıştır.

Çizelge 3. β -laktamaz üretim prosesi için tasarlanan parametreler

Ortam bileşenleri	Biyoreaktör Tasarım Parametreleri
Glukoz	Oksijen Aktarımı
Fruktoz	Hava giriş hızı
Sukroz	Karıştırma hızı
Maya özütü	pH
Sitrik asit	
Gliserol	
$(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$	
NH_4Cl	
Kazamino asitler	
Pepton	
Inorganik bileşikler	

Çizelge 4. β -laktamaz üretim prosesi için referans üretim ortamı

Bileşen	Derişim, kg m ⁻³
Glukoz	10.0
Kazamino asitler	10.0
Na ₂ HPO ₄	2.1
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	0.8
Tuz çözültisi	Derişim, kg m ⁻³
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.25
FeSO ₄ .7H ₂ O	1.0 x 10 ⁻³
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1.0 x 10 ⁻³
MnSO ₄ .H ₂ O	7.5 x 10 ⁻⁵
CuSO ₄ .5H ₂ O	1.0 x 10 ⁻⁵

2.1.5. Analitik Yöntemler

Mikroorganizma Derişimi

Mikroorganizma derişimi turbidimetrik olarak UV-spektrofotometrede $\lambda=600$ nm'de absorbans ölçümüyle belirlenmiştir.

β -laktamaz Enziminin Aktivitesi

β -laktamaz aktivitesi T=30°C, pH=7.0, t=1 dk koşullarında, benzilpenisilin hidrolizi sonunda açığa çıkan hidrolizatların absorbansının $\lambda=232$ nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmesiyle belirlenmiştir (Wase and Patel, 1987). Birim ünite, bir dakikada hidroliz edilen 1 μ mol benzilpenisilin olarak tanımlanarak aktivite U/cm³ veya U/g olarak bulunmuştur.

β -laktamaz ve Proteaz Derişimleri

Beta-laktamaz, alkali ve nötral proteaz derişimleri Quanta 4000E (Waters) kapiler elektroforez cihazıyla belirlenmiştir.

Organik Asit Derişimleri

Yan ürün olarak oluşan organik asitlerin derişimleri iki farklı pH 'da hazırlanan 5mM OFM Anion-BT (Waters) elektrolit çözeltisi kullanılarak kapiler elektroforez cihazı (Waters Quanta 4000E) ile aşağıdaki analiz koşullarında belirlenmiştir (Çalık vd 1998).

- Kolon	: Silika (SiO ₂) kaplı kapiler kolon
- Kolon boyutları	: 100cm x 75µm
- Güç kaynağı	: Negatif
- İşletme voltajı	: 20kV
- Enjeksiyon türü	: Hidrostatik basınçla
- Enjeksiyon hacmi	: 10µL
- Enjeksiyon süresi	: 45s
- Analiz sıcaklığı	: 15°C
- Kullanılan elektrolit	: 5mM Potasyum hidrojen fitalat 0.5mM OFM Anion-BT, pH=7.0
- Dedektör, dalga boyu	: UV, 254nm
- Analiz süresi	: 25dk

Organik asit derişimleri, araştırmanın son fazlarında HPLC ile yöntem geliştirilmiş ve belirlenmiştir (İleri ve Çalık, 2006).

Amino Asit Derişimleri

Yan ürün olarak oluşan amino asitlerin derişimlerinin belirlenmesi için yüksek basınç sıvı kromatografisi (Waters, Amino Asit Analiz Sistemi) kullanılmıştır. Amino asitler fenilzotiyosiyanat (PTTC) ile tepkimeye sokularak feniltiyokarbamilamino asit (PTC-AA) türevleri elde edildikten sonra sisteme enjekte edilmiştir. Elde edilen kromatogramlardan amino asit derişimleri, amino asit standartları temel alınarak hesaplanmıştır. Amino asitlerin analizi için aşağıda verilen koşullar kullanılmıştır :

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

İndirgenmiş Şeker Derişimi

Üretim ortamındaki indirgenmiş şekerlerin -glukoz, fruktoz- analizi DNS (dinitrosalisilikasit) yöntemi kullanılarak (Miller, 1959) $\lambda=550$ nm'de absorbens ölçümü ile ve glucose oksidaz yöntemi $\lambda=505$ nm'de absorbens ölçümü ile (Boyaci et. al., 2005) belirlenmiştir.

Hücre Canlılığının Belirlenmesi

Hücre canlılığı LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit (Molecular Probes, Inc.) kiti kullanılarak flow cytometry (FACSCalibur with Cellquest Software) ile belirlenmiştir (İler vd., 2007).

2.1.6. Sıvı faz kütle aktarım katsayısının ve oksijen tüketim hızının belirlenmesi

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

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

2.1.7. Metabolik Yolizi Mühendisliği Analizi İçin Optimizasyon Programı

A. Metabolik yolizlerinin tanımlanması : Biyoreaktör ortamında kullanılan karbon kaynağının *B.licheniformis* hücreiçi tepkime sisteminde yolizlerinde biyokimyasal tepkimelerle akışını belirlemek için, girdilerden başlayarak –aynı mikroorganizma için daha önce geliştirdiğimiz (Çalık ve Özdamar, 1999)- metabolik yolizi tepkimeleri Ek 1 'de verilmiştir. Her tepkime için tepkime stokiyometrik denklemleri yazılmış ve metabolik yolizlerindeki metabolitler belirlenmiştir. Yolizlerindeki kesişme ve dallanma noktalarındaki bileşikler dikkate alınarak yolizindeki tepkimelerin sayısı –ardışık bazı tepkimelerin hızları eşit kabul edilip tepkimeler toplanarak- hücreiçi biyokimyasal tepkime sisteminin boyutu $n=143$ olarak minimize edilmiştir.

B. Matematik Model : Tepkime ağındaki metabolik bileşiğin birikim hızı, bileşiği üreten tüm tepkimeler ile bileşiği tüketen tepkimelerin cebirsel toplamına eşitlenerek metabolik yolizindeki bileşik sayısına ($m=105$) eşit sayıda kütle korunum temelli stokiyometrik denklemlerden oluşan matematik model kurulmuştur. Bu şekilde kurulan denklem sistemi matris notasyonu ile:

$$A * r(t) = c(t) \quad (1)$$

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

$$c(t) = c_1(t) + c_2(t) \quad (2)$$

$c_1(t)$ ve $c_2(t)$ sırasıyla hücre dışı ve hücreiçi metabolit birikim vektörleridir. Hücre dışı metabolitlerin birikim ve tüketim hızı, kalma süresi ile derişim değişimi eğrilerinden iki derişim arasındaki eğimden bulunmuştur. Metabolik yolizi mühendisliği (MYM) analizinin yapıldığı evrede, hücreiçinde yaklaşık yatışkın koşul varsayımı yapılmış ve böylece $c_2(t)=0$ olduğundan, denklem-2 denklem-3 'e indirgenmiştir:

$$c(t) = c_1(t) \quad (3)$$

C. Matematik modelin çözümü : Amaç fonksiyonu Z:

$$Z = \alpha_i r_i \quad (4)$$

i-bileşiği için α_i stokiyometrik katsayıları ile r_i hızlarının çarpımının lineer toplamı olarak tanımlanan denklem-4; hücreiçinde beta-laktamaz üretim hızı (R142) ile beta-laktamazın hücre dışına aktarım hızının ($dC_{Biac}/dt/C_X$) farkı olarak tanımlanan Z fonksiyonu minimize edilerek, lineer bir optimizasyon

programıyla denklem sistemi çözülmüştür. 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 hacmi başına hücre oluşum hızının C_x değerine bölünmesiyle $r_x = \mu$ olarak elde edilir.

2.2. Bulgular

2.2.1. Beta-laktamaz üretim potansiyeli yüksek mikroorganizmanın seçimi

Bacillus licheniformis 749/C (ATCC 25972), *Bacillus licheniformis* (NRS 978), *Bacillus licheniformis* (NRS 243), *Bacillus licheniformis* (DSM 1969), *Bacillus subtilis* (NRS 1125), *Bacillus subtilis* (BGSC 168) hücrelerinin, 5 kg m^{-3} soytripton, 5 kg m^{-3} pepton, 0.010 kg m^{-3} $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 15 kg m^{-3} agar içeren katı ortamda, β -laktamaz üretim potansiyelleri karşılaştırılmış; β -laktamaz enziminin, penisilin G'yi hidrolize eden bir enzim olması sebebiyle, katı ortama artan miktarlarda eklenen penisilin G'ye dayanıklılıkları baz alınarak, *Bacillus licheniformis* 749/C ve *Bacillus subtilis* NRS 1125, β -laktamaz üretim potansiyelleri en yüksek mikroorganizmalar olarak seçilmiştir (Çelik ve Çalık, 2004).

2.2.1.1. İndükleme stratejisi

Seçilen mikroorganizmalardan *Bacillus subtilis* NRS 1125'in, penisilin G ile indüklendiğinde β -laktamaz üretmesi sebebiyle, hücre derişimi $0.2 \text{ kg kuru hücre m}^{-3}$ olan ortamlara, 0.5 , 1.0 , ve 2.0 U cm^{-3} penisilin G eklenmiş ve relatif maximum aktiviteleri karşılaştırılmış (0.34 , 1.0 and 0.77), 1.0 U cm^{-3} penisilin G eklenen ortamda en yüksek β -laktamaz aktivitesi elde edilmiştir (Çelik ve Çalık, 2004).

2.2.1.2. İndüklenecek ve doğal olarak β -laktamaz üreten mikroorganizmaların karşılaştırılması

Doğal olarak β -laktamaz üreten *Bacillus licheniformis* 749/C ile, indükleme ile β -laktamaz üreten *Bacillus subtilis* NRS 1125'in, β -laktamaz üretim potansiyelleri referans üretim ortamında karşılaştırılmıştır. *Bacillus subtilis* NRS 1125'in ortamına 1.0 U cm^{-3} penisilin G eklenmiştir. Doğal olarak β -laktamaz üreten *Bacillus licheniformis* 749/C'in, *Bacillus subtilis* NRS 1125'e göre, 1.8 kat daha fazla β -laktamaz üretmesi nedeniyle, çalışmanın ileriki aşamalarında β -laktamaz üretimi için bu mikroorganizma kullanılmıştır (Çelik ve Çalık, 2004).

2.2.2. Ortam tasarımı

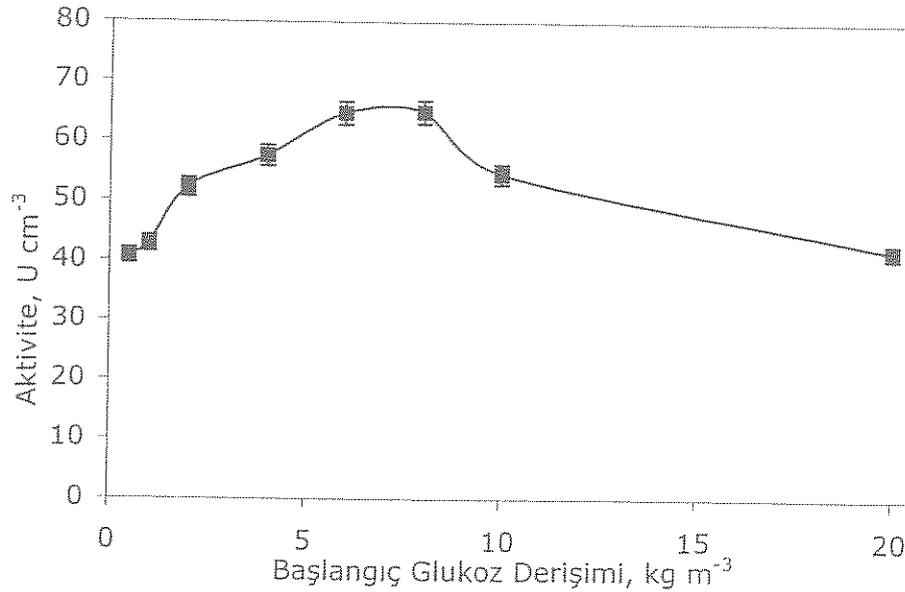
Mikroorganizma seçiminin ardından, β -laktamaz üretimi ve hücre derişimini optimize etmek için, yarı-tanımlanmış ortam tasarımı yapılmıştır. Bu kapsamda, karbon kaynaklarının (glukoz, fruktoz,

sukroz, sitrik asit ve gliserol), inorganik azot ((NH₄)₂HPO₄ ve NH₄Cl) ve organik azot kaynaklarının (maya özütü, pepton ve kazamino asitler) etkisi araştırılmıştır.

Literatürde kullanılan, ve 10.0 kg m⁻³ glukoz, 10.0 kg m⁻³ kazamino asitler, sodyum fosfat tamponu, pH 7.2 (0.02 M) ve “tuz çözeltisini” (0.25 kg m⁻³ MgSO₄.7H₂O, 1.0 x 10⁻³ kg m⁻³ FeSO₄.7H₂O, 1.0x10⁻³ kg m⁻³ ZnSO₄.7H₂O, 7.5x10⁻⁵ kg m⁻³ MnSO₄.H₂O, 1.0 x10⁻⁵ kg m⁻³ CuSO₄.5H₂O) içeren ortam (Pollock, 1965), “referans üretim ortamı (RPM)” olarak adlandırılmış ve β-laktamaz aktivitesi 35 U cm⁻³ olarak bulunmuştur. Ortamda bulunan 10.0 kg m⁻³ kazamino asitler yerine, 2 kg m⁻³ maya özütü ve 5 kg m⁻³ NH₄Cl kullanıldığında ise β-laktamaz aktivitesinin 50 U cm⁻³ olduğu bulunmuş, 10.0 kg m⁻³ glukoz, 2 kg m⁻³ maya özütü, 5 kg m⁻³ NH₄Cl, sodyum fosfat tamponu, pH 7.2 (0.02 M) ve tuz çözeltisini içeren ortam, ortam tasarımı deneylerinin başlangıç noktası olarak seçilmiştir (Çelik ve Çalık, 2004).

2.2.2.1 Glukoz derişiminin etkisi

Başlangıç glukoz derişiminin, C_{G0}, β-laktamaz üretimine etkisi, C_{G0}= 0.5, 1.0,2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0, ve 20.0 kg m⁻³ derişimlerinde incelenmiştir. Başlangıç glukoz derişiminin artmasıyla hücre derişimi artmış, β-laktamaz aktivitesi C_{G0}=8.0 kg m⁻³ başlangıç glukoz derişiminde en yüksek değerine (A=65 U cm⁻³) ulaşmıştır (Şekil 1) (Çelik ve Çalık, 2004).

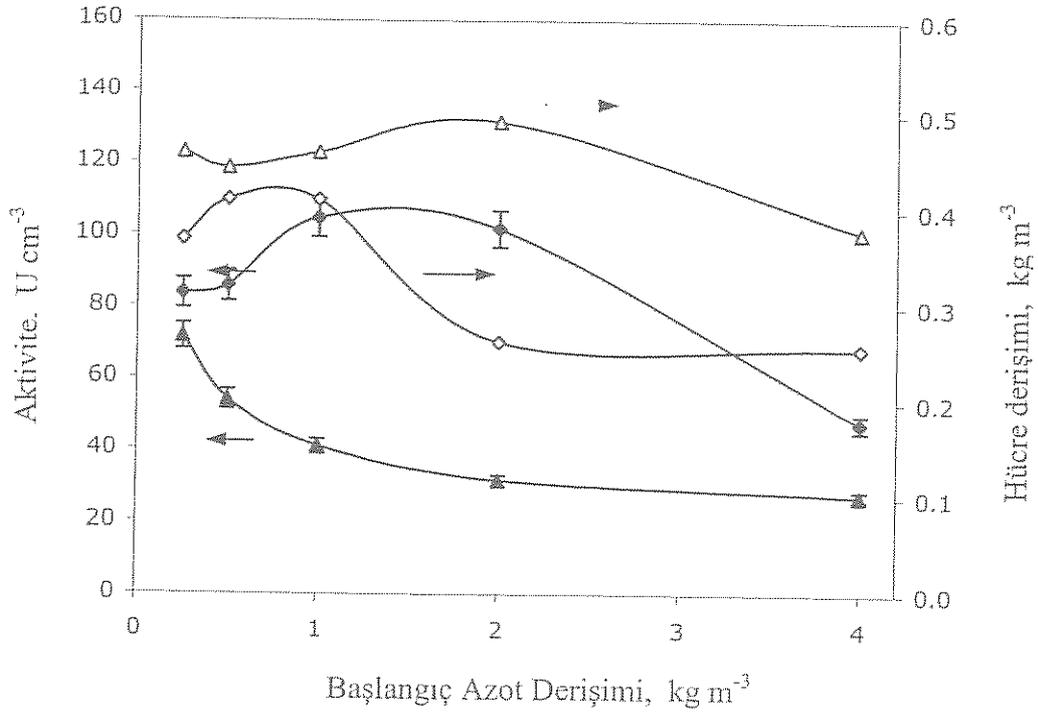


Şekil 1. β-laktamaz aktivitesinin başlangıç glukoz derişiminine bağlı değişimi

t=35 st, V_R =33 cm³, T=37°C, pH =7.2, N=200 dk⁻¹

2.2.2.2. İnorganik azot kaynaklarının etkisi

İnorganik azot kaynaklarının etkisinin araştırılmasında, başlangıç ortamından maya özütü çıkarılmış ve β -laktamaz aktivitesi için optimum olarak bulunan $C_{G0}=8.0 \text{ kg m}^{-3}$ başlangıç glukoz derişimi kullanılmıştır. Başlangıç azot derişiminin $C_{N0} = 0.25 - 4.0 \text{ kg m}^{-3}$ aralığına karşılık gelen derişimlerinde $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ve NH_4Cl 'ün etkileri incelenmiş; düşük azot derişimlerinde daha yüksek β -laktamaz aktivitesinin elde edildiği ve $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ bulunan üretim ortamında, NH_4Cl bulunan ortama kıyasla 2 kat fazla β -laktamaz üretildiği gözlenmiştir (Şekil 2). Bunun sebebi, PO_4^{3-} iyonunun indükleyici etkisi (Collins, 1979) veya Cl^- 'ün inhibisyon etkisidir. Ayrıca, yüksek azot derişimlerinin hücre derişimi üzerine inhibisyon etkisinin olduğu saptanmıştır (Çelik ve Çalık, 2004).



Şekil 2. β -laktamaz aktivitesi ve hücre derişiminin başlangıç azot derişimine bağlı değişimi.

$C_{G0}=8.0 \text{ kg m}^{-3}$, $t=35 \text{ st}$, $V_R =33 \text{ cm}^3$, $T=37^\circ\text{C}$, $\text{pH} =7.2$, $N=200 \text{ dk}^{-1}$ $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$: (◆, ◇); NH_4Cl : (▲, Δ).

2.2.2.3. $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ve maya özütünün etkileri

Düşük azot derişimlerinde daha yüksek β -laktamaz üretilmesi sebebiyle, başlangıç azot derişiminin $C_{N0} = 0.125 - 0.5 \text{ kg m}^{-3}$ aralığına karşılık gelen derişimlerinde $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 'ün etkisi, $C_{M0}^0=0.0, 2.0$,

4.0, 6.0, 8.0, 10.0 ve 12.0 kg m⁻³ başlangıç maya özütü derişimlerinde incelenmiştir. En en yüksek β-laktamaz aktiviteleri t=40 st'te elde edilmiş ve Çizelge 5'de verilmiştir. Artan maya özütü derişimi ile aktivite artmış, en yüksek değerine, A=200 U cm⁻³, 8.0 kg m⁻³ maya özütü ve 1.18 kg m⁻³ (NH₄)₂HPO₄ (C_{N0} = 0.25 kg m⁻³) içeren ortamda ulaşmıştır (Çizelge 5). Artan maya özütü derişimi ile β-laktamaz aktivitesinin artması, maya özütünün içeriğinde bulunan peptit, amino asitler, pürin ve pirimidin bazları ve suda çözünebilen B vitaminlerine bağlıdır. C_{M0}⁰=10.0 kg m⁻³ başlangıç maya özütü derişiminin üzerinde, β-laktamaz üretiminde inhibisyon etkisi gözlenmiştir. Yüksek maya özütü derişimlerinde, (NH₄)₂HPO₄ inhibisyonunun gözlemlenmesi, mikroorganizmanın öncelikli olarak organik azot kaynaklarını tükettiğini göstermektedir (Çelik ve Çalık, 2004). Hemila vd.(1992) gliserol (4 g/L), tripton (12 g/L) ve maya özütünce (24 g/L) içeren ortamda A=260 U cm⁻³ β-laktamaz aktivitesi bildirmişlerdir. Çelik ve Çalık (2004) ve Hemila vd.(1992) verimleri karşılaştırıldığında bu proje kapsamında üretilen β-laktamazın substrat üzerinden verimi (Y_{U/S}=12.5 U mg⁻¹) Hemila vd.(1992) veriminden (Y_{U/S}=6.5 U mg⁻¹) yaklaşık iki kat yüksektir.

Çizelge 5. β-laktamaz aktivitesinin, başlangıç maya özütü ve azot kaynağı ((NH₄)₂HPO₄) derişimleri ile değişimi. C_{G0}=8.0 kg m⁻³, t=35 st, V=33 cm³, T=37°C, pH =7.2, N=200 dk⁻¹

C _{M0} (kg m ⁻³)	C _N (kg m ⁻³)	A (U cm ⁻³)
0.0	0.125	83
0.0	0.500	85
0.0	1.000	105
2.0	0.125	78
2.0	0.250	90
2.0	0.500	101
4.0	0.125	96
4.0	0.250	114
4.0	0.500	102
6.0	0.250	186
8.0	0.125	187
8.0	0.250	202
8.0	0.500	164
10.0	0.250	201
12.0	0.250	180

2.2.2.4. Organik azot kaynaklarının etkisi

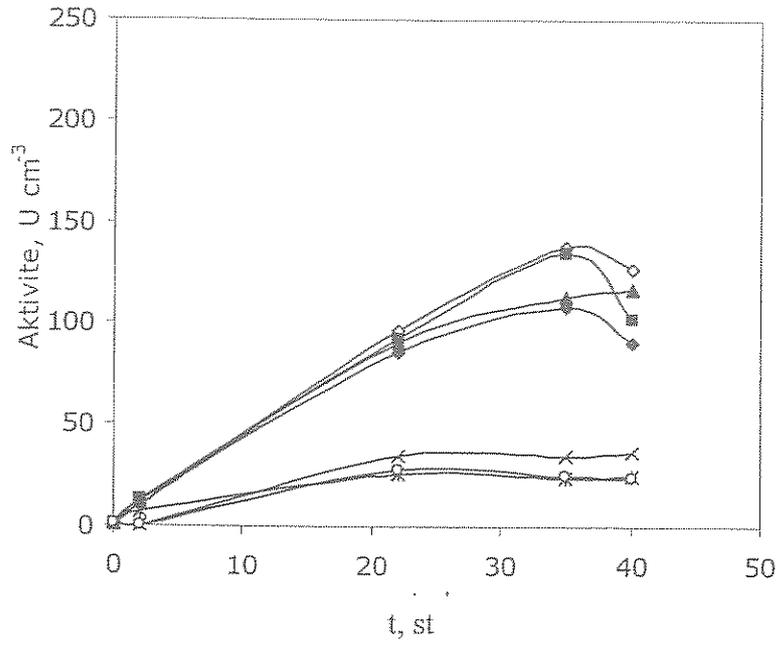
Sıkça kullanılan bazı diğer organik azot kaynaklarından pepton ve kazamino asitlerin etkisi, 6.0, 8.0, 10.0 ve 12.0 kg m⁻³ başlangıç derişimlerinde, 1.18 kg m⁻³ (NH₄)₂HPO₄, 8.0 kg m⁻³ glukoz ve tuz çözeltisini içeren ortamda incelenmiş; pepton ve kazamino asitlerin β-laktamaz üretimini artırmadığı, üretim ortamındaki derişimleri arttıkça ise β-laktamaz üretimi üzerinde inhibisyon etkilerinin olduğu bulunmuştur (Şekil 3). Kazamino asitlerinin içindeki yüksek klor miktarı ve peptonun içindeki yüksek potasyum miktarı bu inhibisyonun nedenleri olarak gösterilebilir (Çelik ve Çalık, 2004).

2.2.2.5. Alternatif karbon kaynaklarının etkisi

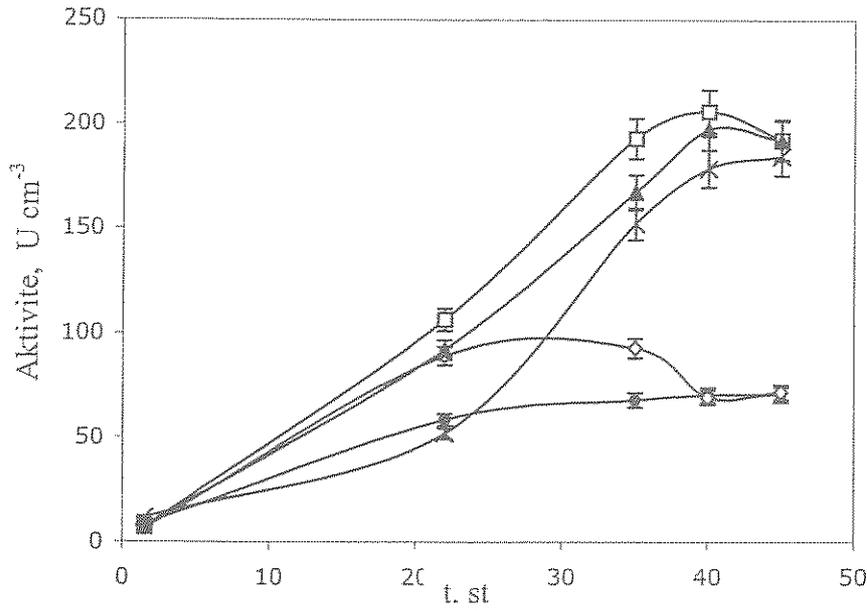
Alternatif karbon kaynaklarından glukoz, fruktoz, sukroz, sitrik asit ve gliserolün β-laktamaz üretimine etkisi, 1.18 kg m⁻³ (NH₄)₂HPO₄, 8.0 kg m⁻³ maya özütü ve “tuz çözeltisini” (bkz: RPM ortamı) içeren ortamda incelenmiştir (Şekil 4). Ortamdaki karbon miktarı, 8.0 kg m⁻³ glukoz içeren ortamdaki karbon miktarına eşit olacak şekilde ayarlanmış, dolayısıyla üretim ortamındaki başlangıç derişimleri (kg m⁻³): glukoz, 8.0; fruktoz, 8.0; sükroz, 6.6; gliserol, 8.1; sitrik asit, 9.2 olarak ayarlanmıştır. Hücreler sükrozu karbon kaynağı olarak kullanabilmiş; ancak β-laktamaz üretimini artırmamıştır. Gliserol içeren ortamda, glukoz içeren ortama göre 2.8 kat düşük aktivite gözlenmiştir (Çelik ve Çalık, 2004).

2.2.2.6. Tanımlanmış ortam

β-laktamaz enziminin antijen yönlendirmeli enzim-ilaç terapi ilaçlarında kullanıldığı ve enzimin %99.9 saf olması gerektiği ve üretim ortamı karmaşıklıklaştıkça saflaştırma maliyetleri arttığı için yarı-tanımlanmış üretim ortamı modifiye edilerek tanımlanmış-ortam oluşturulmuştur. Oksijen aktarımının beta-laktamaz üretimine, glukoz tüketimine, hücre çoğalmasına ve yan ürünlerinin oluşumuna etkisi de tanımlanmış-ortam kullanılarak araştırılmıştır. Tanımlanmış üretim ortamı için maya özütü yerine (NH₄)₂HPO₄ kullanılmış, derişiminin beta-laktamaz üretimine etkisi C_N⁰=0.0 – 4.0 kg m⁻³ azot derişimi aralığında araştırılmıştır. Laboratuvar ölçek biyoreaktörlerde tanımlanmış üretim ortamı ile yapılan deneylerde en yüksek aktivite, 7.0 kg m⁻³ glukoz, 7.1 kg m⁻³ (NH₄)₂HPO₄, ve tuz çözeltisini içeren ortamda, pH₀=7.5, T=37°C, N=200 dk⁻¹ koşullarında, A=115 Ucm⁻³ olarak bulunmuştur (Çalık vd., 2005).



Şekil 3. β-laktamaz aktivitesinin , başlangıç pepton ve kazaminoasitler derişimleri ve kalma süresi ile değişimi $V_R=33 \text{ cm}^3$, $T=37^\circ\text{C}$, $\text{pH}=7.2$, $N=200 \text{ dk}^{-1}$. Pepton (kg/m^3): 6, (◇); 8, (■); 10, (▲); 12, (◆); Kazamino asitler (kg/m^3): 6, (x); 8, (o); 12, (*)



Şekil 4. β-laktamaz aktivitesinin farklı karbon kaynaklarının ve kalma süresi ile değişimi $V_R=33 \text{ cm}^3$, $T=37^\circ\text{C}$, $\text{pH}=7.2$, $N=200 \text{ dk}^{-1}$
Fructoz, (□); Glukoz, (▲); Sükroz, (x); Sitrik asit, (◇); Gliserol, (○).

2.2.3. Beta-laktamaz üretime oksijen aktarımının etkisi

Laboratuvar ölçekteki en uygun biyoreaktör işletim koşulları olarak bulunan $T=37^{\circ}\text{C}$ ve $\text{pH}_0=7.5$ kullanılarak, tanımlanmış üretim ortamında oksijen aktarımının substrat tüketimine, mikroorganizma derişimine, ürün β -laktamaz ve yan-ürün oluşumuna etkileri üç farklı hava giriş hızında, $Q_0/V_R = 0.2, 0.5$ ve 1 vvm, ve üç farklı karıştırma hızında, $N=250, 500, 750$ dk^{-1} , $V= 3.0$ dm^3 hacimli, sıcaklık, pH, köpük, karıştırma ve çözünmüş oksijen derişimi kontrollü kesikli biyoreaktörde araştırılmıştır. Karıştırma ve hava giriş hızı değerleri ile oluşturulan oksijen aktarım koşulları ve tanımlama için kullanılan kısaltmalar Çizelge 6'da verilmiştir.

Çizelge 6. Oksijen aktarım koşulları ve kısaltmaları

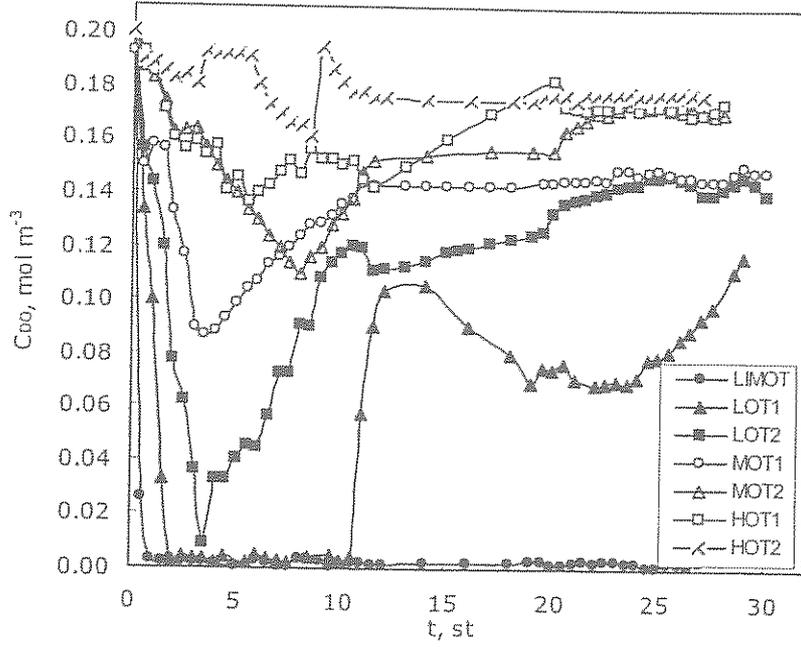
Q_0/V_R , vvm	N , dk^{-1}	Kısaltma
0.2	250	LimOT
0.5	250	LOT ₁
0.2	500	LOT ₂
0.5	500	MOT ₁
0.2	750	MOT ₂
1.0	500	HOT ₁
0.5	750	HOT ₂

Çözünmüş oksijen ve pH profilleri

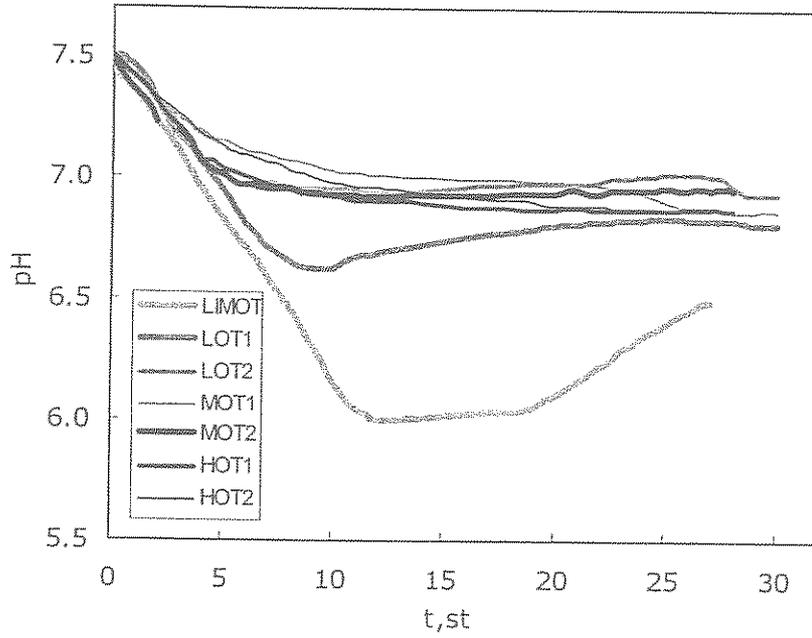
Çözünmüş oksijen derişiminin ve ortam pH'nın kalma süresi, karıştırma hızı ve hava giriş hızıyla derişimi sırasıyla Şekil 5 ve 6'de verilmiştir. Oksijen aktarım hızı (OAH) çok düşük olduğunda (LimOT) ve düşük olduğu (LOT₁) koşullarda prosesin başından itibaren aktarılan oksijenin tamamı tüketilmiştir. OAH'nın daha yüksek olduğu koşullarda (LOT₂, MOT₁, ve MOT₂) hücre metabolik faaliyetlerine bağlı olarak zamanla çözünmüş oksijen derişiminde artma ve/veya azalma gözlenmiş; yüksek OAH'ları HOT₁ ve HOT₂ 'de hücre çoğalmasına rağmen yüksek oksijen aktarımı nedeniyle C_{DO} proses süresince çok az derişmiştir. İncelenen oksijen aktarım koşullarında başlangıç pH'ı $\text{pH}_0=7.5$ 'a ayarlanmıştır. LOT₂, MOT₁, MOT₂, HOT₁, ve HOT₂ koşullarında pH profilleri benzer derişim göstermiş, $t=10$ st'e kadar azalmış sonra sabit kalmıştır. LOT₁ ve LimOT koşullarında diğer koşullara kıyasla pH daha hızlı düşmüştür. İncelenen koşullar arasında en düşük pH, LimOT koşulunda elde edilmiştir (Çalık vd.,2005).

Glukoz Derişimi Profilleri

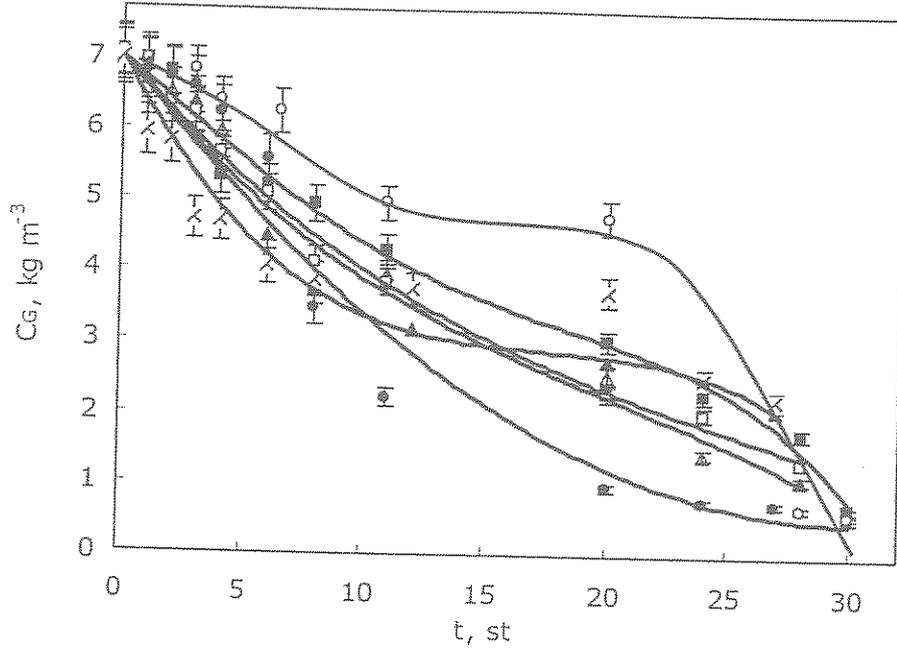
Glukoz derişiminin (C_G) kalma süresi, karıştırma hızı ve hava giriş hızıyla derişimi Şekil 7'te verilmiştir. C_G proses süresince beklendiği gibi azalmıştır. Proses sonunda, LimOT ve MOT₁ koşullarında başlangıçta ortamda bulunan glukozun %91.5'i tüketilmiştir (Çalık vd.,2005).



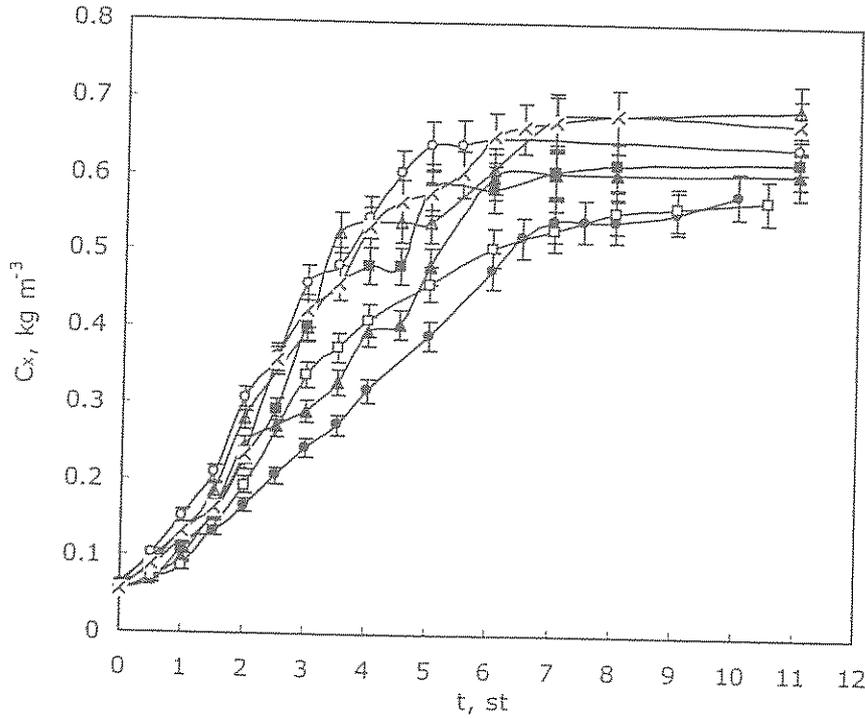
Şekil 5. Çözünmüş oksijen derişiminin kalma süresi ve oksijen aktarım koşulları ile değişimi $T=37^{\circ}\text{C}$, $V_R=1.65 \text{ dm}^3$.



Şekil 6. Ortam pH'nın kalma süresi ve oksijen aktarım koşulları ile değişimi $T=37^{\circ}\text{C}$, $V_R=1.65 \text{ dm}^3$.



Şekil 7. Glukoz derişiminin kalma süresi ve oksijen aktarım koşulları ile değişimi $T=37^{\circ}\text{C}$, $V_R=1.65$ dm^3 . LimOT: (●); LOT₁: (▲); LOT₂: (■); MOT₁: (○); MOT₂: (△); HOT₁: (□); HOT₂: (x).



Şekil 8. Hücre derişiminin kalma süresi ve oksijen aktarım koşulları ile değişimi $T=37^{\circ}\text{C}$, $V_R=1.65$ dm^3 . LimOT: (●); LOT₁: (▲); LOT₂: (■); MOT₁: (○); MOT₂: (△); HOT₁: (□); HOT₂: (x).

Hücre Derişimi Profilleri

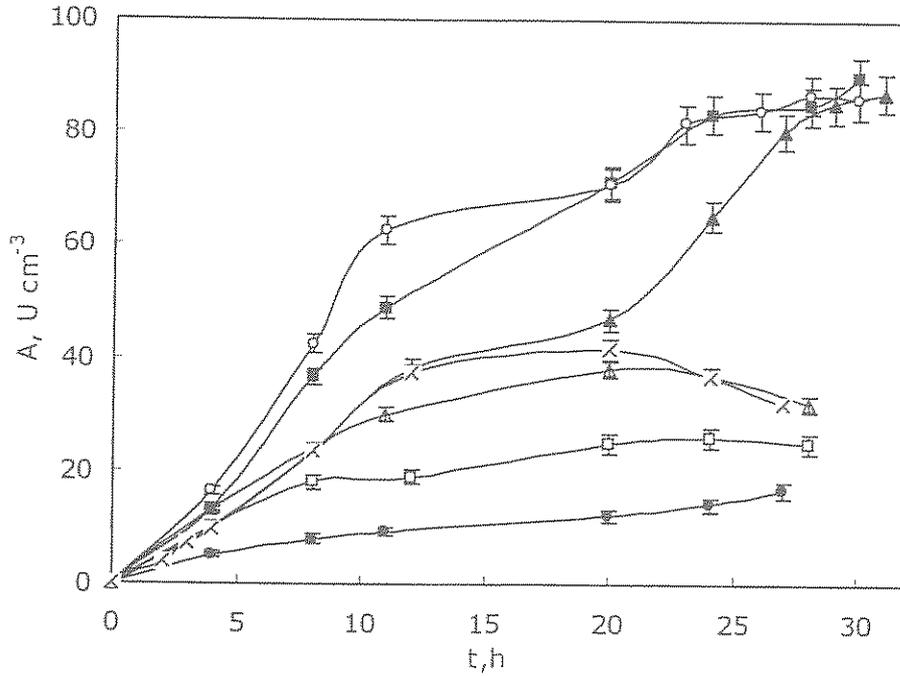
Hücre derişiminin (C_x) kalma süresi, karıştırma hızı, ve hava giriş hızıyla değişimi Şekil 8'te verilmiştir. Hücre derişimi prosesin $t=2-7$ st aralığında artmış ve durgunluk fazına ulaşmıştır. En yüksek hücre derişimi MOT_2 ve HOT_1 koşullarında $C_x=0.67 \text{ kg m}^{-3}$ olarak en düşük hücre derişimi de $LimOT$ ve HOT_2 koşullarının $C_x=0.54 \text{ kg m}^{-3}$ olarak bulunmuştur (Çalık vd.,2005).

Beta-laktamaz Aktivite Profilleri

β -laktamaz aktivitesinin kalma süresi, karıştırma hızı ve hava giriş hızıyla değişimi Şekil 9'da verilmiştir. En düşük aktivite en az hücrenin çoğaldığı $LimOT$ koşulunda elde edilmiştir. Proses sonunda en yüksek aktivite MOT_1 koşulunda elde edilmiştir. $t=24$ st dikkate alındığında ise LOT_2 ve MOT_1 koşullarında aynı aktivite elde edilmiştir (Çalık vd., 2005).

Amino Asit Derişimleri

Üretim ortamındaki amino asit derişimleri ve hücre dışına aktarılmayan amino asitlerin oksijen aktarım koşulları ile değişimi Çizelge 7'de verilmiştir. Etkisi araştırılan tüm oksijen aktarım koşullarında aspartik asit ve asparajin ortama salgılanmamıştır (Çalık vd.,2005).



Şekil 9. Beta-laktamaz aktivitesinin kalma süresi ve oksijen aktarım koşulları ile değişimi $T=37^{\circ}C$, $V_R=1.65 \text{ dm}^3$. $LimOT$: (●); LOT_1 : (▲); LOT_2 : (■); MOT_1 : (○); MOT_2 : (Δ); HOT_1 : (◻); HOT_2 : (x).

Proses süresince ortamdaki amino asit derişimleri düşük seviyede seyretmiş; amino asitler içinde en yüksek derişimde arginine LimOT koşulunda 0.072 kg m^{-3} olarak $t=3 \text{ st}$ 'te elde edilmiştir.

Organik Asit Derişimleri

Yedi oksijen aktarım koşulunda da ortama asetik asit ve/veya laktik asit salgılanmıştır. LimOT koşulu dışında bütün oksijen aktarım koşullarında ortama salgılanan toplam organik asit derişimi $t=0-10 \text{ st}$ 'e kadar artmış sonra azalmıştır. LimOT koşulunda ise organik asit derişimi proses süresince artmıştır. En yüksek derişim $C_{OA} = 2.513 \text{ kg m}^{-3}$ olarak bulunmuştur. Bu sonuç LimOT koşulunda pH'nin düşmesi ile paralellik göstermektedir. Toplam organik asit derişimleri ve ortama salgılanan organik asitlerin oksijen aktarım koşulu ile derişimi Çizelge 8'te gösterilmiştir. LOT₂, MOT₁, MOT₂, HOT₁ ve HOT₂ koşullarında, TCA döngüsü organik asitlerinden α -ketoglutarik asit and süksinik asit ortmada gözlenmezken; LimOT koşulunda α -ketoglutarik ve süksinik asit; LOT₁ koşulunda da süksinik asit üretim ortamına aktarılmıştır.

Çizelge 7. Toplam amino asit derişimlerinin ve ortama salgılanmayan amino asitlerin oksijen aktarım koşulu ile derişimi

Oksijen aktarım koşulu	$T_{AA} \text{ (kg m}^{-3}\text{)}$	Hücre dışına aktarılmayan amino asitler
LimOT	0.005-0.101	Glu, His, Pro, Tyr, Val, Met, Cys, Ile, Lys
LOT ₁	0.009-0.068	Glu, His, Pro, Tyr, Val, Met, Cys, Ile, Phe, Lys
LOT ₂	0.006-0.133	Arg, Thr, Ala, Val, Met, Cys, Trp, Lys
MOT ₁	0.019-0.066	Glu, Thr, Ala, Tyr, Ile, Leu, Lys
MOT ₂	0.002-0.046	Glu, Ser, Gly, Thr, Ala, Tyr, Ile, Trp, Lys
HOT ₁	0.001-0.031	Glu, Gln, Ser, Tyr, Val, Met, Cys, Trp, Lys
HOT ₂	0.006-0.028	Glu, Ser, Arg, Pro, Tyr, Val, Met, Cys, Ile, Lys

Çizelge 8. Toplam organik asit derişimlerinin ve ortama salgılanan organik asitlerin oksijen aktarım koşulu ile derişimi

Okijen aktarım koşulu	$C_{OA} \text{ (kg m}^{-3}\text{)}$	Ortama salgılanan organik asitler
LimOT	0.592-2.513	α -KG, süksinik, laktik, asetik
LOT ₁	0.576-1.630	α -KG, laktik, asetik
LOT ₂	0.268-0.679	laktik, asetik
MOT ₁	0.441-0.755	laktik, asetik, bütirik
MOT ₂	0.533-1.248	asetik, bütirik
HOT ₁	0.621-1.273	asetik, bütirik
HOT ₂	0.352-0.732	asetik, bütirik

Oksijen Aktarım Karakteristiği

Bacillus licheniformis ile beta-laktamaz üretimi için glukoz temelli tanımlanmış ortamda farklı oksijen aktarım koşullarında sıvı faz hacımsal kütle aktarım katsayısı K_{La} proses süresince belirlenmiştir (Çizelge 9). $t=1-27$ st aralığında LimOT koşulunda; $t=2-11$ st aralığında LOT_1 koşulunda; ve $t=1-8$ st aralığında LOT_2 koşulunda düşük oksijen derişimi nedeniyle dinamik yöntem uygulanmamış ve K_{La_0} (fiziksel kütle aktarım katsayısı) 'ın K_{La} 'ya eşit olduğu varsayılmıştır. Çizelge 9'da da görüldüğü gibi, K_{La} karıştırma ve hava giriş hızının artmasıyla artmıştır. K_{La} MOT_1 ve MOT_2 koşullarında önce artmış sonra azalmıştır. LOT_1 , LOT_2 , HOT_1 , ve HOT_2 koşullarında ise proses süresince artmıştır. En yüksek oksijen aktarım katsayısı HOT_2 koşulunda $0.044 s^{-1}$ olarak bulunmuştur.

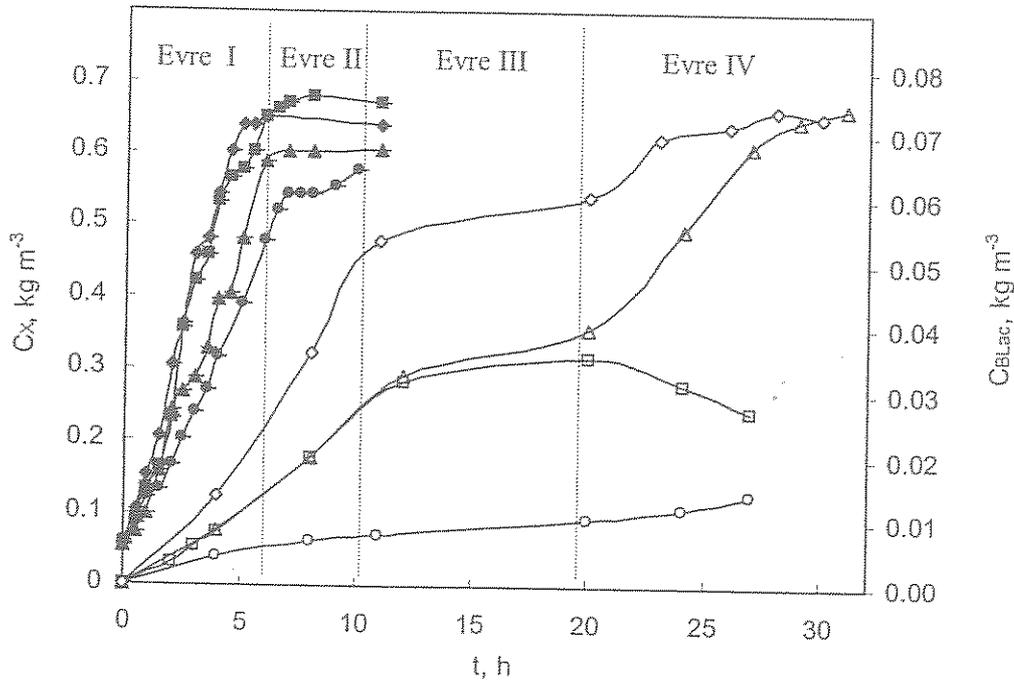
2.2.4. Hücre içi tepkime hızlarına oksijen aktarımının etkisi

Metabolik hızların (akıların) biyoreaktörde çoğalma, ürün ve yan-ürün oluşumu sürecindeki dağılımı beta-laktamaz üretim prosesinin geliştirilmesi için tepkime yolizindeki önemli özelliklerin belirlenmesi amacıyla incelenmiştir. Oksijen aktarımının, metabolik yolizlerine etkilerinin ayrıntılı olarak incelenebilmesi amacıyla, Çizelge 6.'de verilen koşulları içinden kısıtlayıcı oksijen aktarım koşulu - hava giriş hızı $Q_0/V_R = 0.2$ vvm karıştırma hızı $N = 250 \text{ min}^{-1}$ (LimOT)-, düşük oksijen aktarım koşulları içinden $-Q_0/V_R = 0.5$ vvm and $N = 250 \text{ min}^{-1}$ (LOT_1)-, orta oksijen aktarım koşulları içinden $-Q_0/V_R = 0.5$ vvm and $N = 500 \text{ min}^{-1}$ (MOT_1)- ve yüksek oksijen aktarım koşulu $-Q_0/V_R = 0.5$ vvm and $N = 750 \text{ min}^{-1}$ (HOT_2) düşük, orta ve yüksek oksijen aktarım koşulu gruplarını iyi tanımladıkları için seçilmiş ve MYM analizi yapılmıştır.

Hücre ve beta-laktamaz sentez profilleri dikkate alındığında proses dört evreye ayrılmıştır (Şekil 10). Evre I ($0 < t < 6$ st) hücrelerin üstel çoğalma evresi ve beta-laktamaz enzim üretiminin başlangıcı, Evre II ($6 < t < 11$ st) beta-laktamaz sentez bölgesi, Evre III ($11 < t < 20$ st) β -laktamase üretiminin durgunluk bölgesi, Evre IV ($20 < t < 30$ st) ikinci beta-laktamaz sentez bölgesidir. Evre I'de kalma süresi $t_1=4$ st, Evre II'de $t_2=8$ st, Evre III'de $t_3=15$ st, Evre IV'de $t_4=22$ st MYM analizi için seçilmiştir.

Çizelge 9. K_{La} 'nın kalma süresi, karıştırma ve gaz giriş hızı ile değişimi

Oksijen aktarım koşulu	t	K_{La}	Oksijen aktarım koşulu	t	K_{La}
LimOT	2	0.007	MOT ₂	2	0.020
	5	0.007		5	0.022
	8	0.007		8	0.023
	11	0.007		11	0.024
	20	0.007		20	0.024
	24	0.007		24	0.033
	28	0.007		28	0.028
LOT ₁	2	0.008	HOT ₁	2	0.019
	5	0.008		5	0.019
	8	0.008		8	0.019
	11	0.008		11	0.019
	20	0.014		20	0.020
	24	0.014		24	0.029
	28	0.017		28	0.036
LOT ₂	2	0.010	HOT ₂	2	0.044
	5	0.010		5	0.035
	8	0.010		8	0.030
	11	0.013		11	0.029
	20	0.014		20	0.044
	24	0.016		24	0.044
	28	0.021		28	-
MOT ₁	2	0.016			
	5	0.018			
	8	0.026			
	11	0.026			
	20	0.020			
	24	0.022			
	28	0.022			



Şekil 10. Hücre ve beta-laktamaz derişimlerinin kalma süresi ve oksijen aktarım koşulları ile değişimi.

$C_G^0 = 7.0 \text{ kg m}^{-3}$, $T = 37^\circ\text{C}$, $V_R = 1.65 * 10^{-3} \text{ m}^3$. LimOT: (●, ○); LOT: (▲, △); MOT: (◆, ◇); HOT: (■, □).

Evre I ($0 < t < 6 \text{ st}$): Üstel çoğalma fazı

Hücre içi tepkime hızlarının oksijen aktarım koşulları ve evreler ile değişimi Çizelge 10'da verilmiştir. Çizelge 10'da da görüldüğü gibi kısıtlanmalı-, düşük-, orta- ve yüksek oksijen aktarım koşullarında glikoliz yolizi aktif, glikoneogenesis yolizi inaktiftir. Glikoliz yolizi akı değerleri LimOT ve LOT koşullarında MOT ve HOT koşullarına kıyasla 1.8-2.0 kat daha yüksektir. Nükleik asitlerin ve hücre bileşenlerinin girdisi R5P, ya G6P 'tan oksidatif yolla üretilebilmekte ya da glikoliz yolizi metabolitleri olan F6P ve T3P'den iç-dönüşüm tepkimeleri ile üretilebilmektedir. LimOT, LOT ve MOT koşullarında, R5P, hem iç-dönüşüm tepkimeleri (R20-R25) hemde oksidatif tepkimeler (R14, R15) ile üretilirken HOT koşulunda iç-dönüşüm tepkimeleri ile üretilmiştir (R20-R25).

LimOT, LOT, MOT ve HOT koşullarında pyruvat (Pyr) nodundaki akı dağılımı Şekil 11'da gösterilmiştir. LimOT ve LOT koşullarında, laktat (Lac) sentez tepkimesi (R26) akı değeri sırasıyla, 6.64 ve 6.69 mmol/gKH st'tur. MOT koşulundaki laktat akısı (R26) sıfıra çok yakın bir değerken, HOT koşulunda sıfırdır. Tüm oksijen aktarım koşullarında asetat (Ac) sentez tepkimesi aktiftir ve en

yüksek akı değeri ($R_{28}=3.40$ mmol/gKH st) LOT koşulundadır. LOT koşulunu LimOT koşulu takip etmiştir ($R_{28}=2.01$ mmol/gKH st); MOT ve HOT koşulu Ac akıları birbirine çok yakındır ve LOT koşulu değerinden yaklaşık iki kat daha düşüktür. TCA döngüsü akıları ve CO_2 üretim akısı ise HOT koşulunda en yüksektir ($R_{33}=4.76$ mmol/gKH st), HOT koşulunu MOT koşulu takip etmiştir ($R_{33}=1.94$ mmol/gKH st) (Çizelge 10). Bu bulgu karbon kaynağı olarak sitrit asit kullanıldığı durumla benzerlik göstermektedir (Çalık vd.1999). Sonuç olarak karbon kaynağı karbon metabolizmasına nereden girerse girsin yüksek oksijen aktarım koşullarında TCA döngüsünün hızına göre metabolizma regüle ediliyor denilebilir. Ancak LOT koşulunda bir kayma olmuş ve en düşük TCA döngüsü akı değerleri yüksek Lac ve Ac sentezi sonucunda elde edilmiştir.

LimOT, LOT, MOT ve HOT koşullarında Evre I'de hücre sentez tepkimesi (R_{141}) aktiftir. Evre I'de buna paralel olarak hücre bileşenleri sentez tepkimeleri de aktiftir. Tepkime sisteminde amino asitler, hücre ve beta-laktamaz sentezinde kullanılmaktadır. Bu nedenle amino asit akıları amino asitin üretim ve tüketim hızlarına, beta-laktamaz ve hücre sentez hızına bağlıdır (Çizelge 10) ve bu akı değerleri Evre II, III ve IV akı değerleri ile kıyaslandığında daha yüksektir.

En yüksek β -laktamase (R_{142}) akı değeri MOT ($R_{142}=2.14 \times 10^{-4}$ mmol/gKH st) koşulunda elde edilmiş, bunu LOT ($R_{142}=1.66 \times 10^{-4}$ mmol/gKH st) koşulu takip etmiş, en düşük değer ise LimOT koşulunda ($R_{142}=1.15 \times 10^{-4}$ mmol/gKH st) elde edilmiştir (Çizelge 10).

ATP glikoliz yolizinde ve TCA döngüsünde sırasıyla R_7 , R_{11} ve R_{37} tepkimeleri substrat seviyesinde fosforlanma ve oksidatif fosforlanma tepkimeleri (R_{118} , R_{119}) ile üretilmektedir. Evre I'de ATP sentez hızı HOT koşulunda en yüksekken LOT koşulunda en düşüktür. Üretilen toplam ATP'nin LimOT, LOT, MOT ve HOT koşullarında sırasıyla %55, 62, 70 ve 90'ı yaşam fonksiyonları (R_{143}) için kullanılmıştır.

EvreII (6<t<11 st) : β -laktamaz sentez fazı

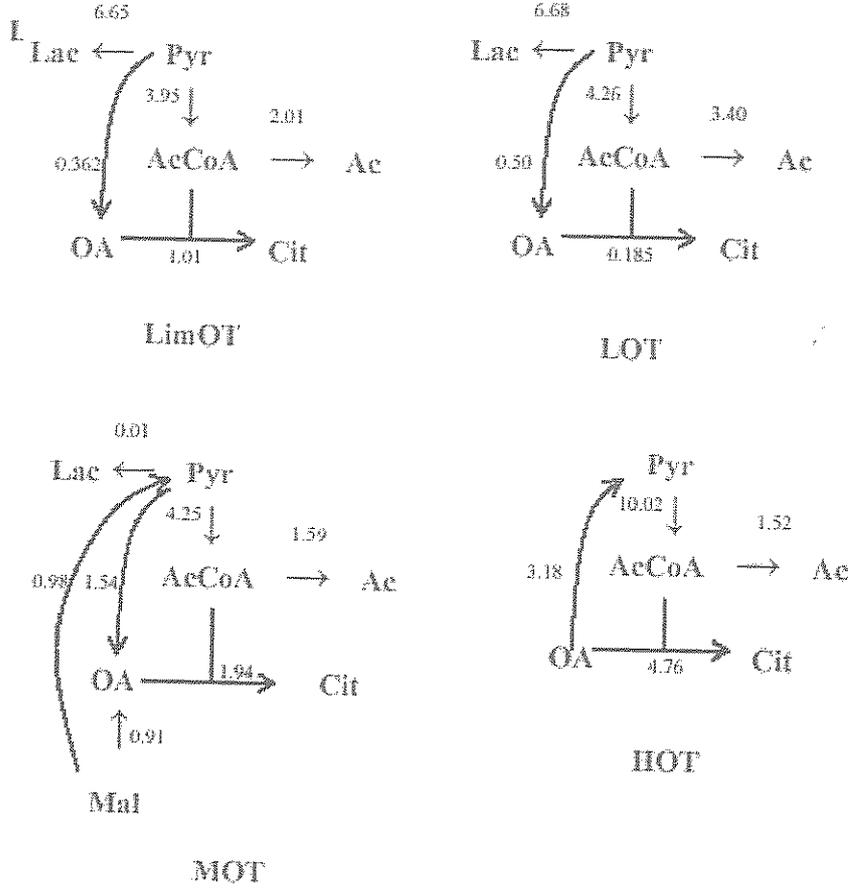
Evre I'e benzer olarak Evre II'de de glikoliz yolizi aktif, glikoneogenesis yolizi inaktiftir. En yüksek ve en düşük glikoliz akıları sırasıyla LimOT ve LOT koşullarında elde edilmiştir, LimOT koşulu akıları LOT koşulu glikoliz yolizi akıları değerlerinden 1.7- kat fazla iken, MOT ve HOT koşulları akı değerlerinden sırasıyla 1.2- ve 1.1- kat daha yüksektir. LimOT ve LOT koşulu akıları Evre I'den Evre II'ye geçildiğinde yaklaşık sırasıyla 1.7- ve 3.2 kat azalırken MOT ve HOT koşullarındaki azalma sadece 1.1- kattır. Bu sonuç, LOT koşulunun Evre II'de metabolizmada oksijen aktarımı açısından geçiş koşulu olarak davrandığını göstermektedir (Çizelge 10).

Çizelge 10. Hücreyi tepkime hızlarının oksijen aktarımı ile değişimi

R#	LimOT				LOT				MOT				HOT		
	Evre I	Evre II	Evre III	Evre IV	Evre I	Evre II	Evre III	Evre IV	Evre I	Evre II	Evre III	Evre IV	Evre I	Evre II	Evre III
1	6.250	3.590	2.700	1.100	6.700	2.037	0.463	1.000	3.100	2.950	0.773	4.400	3.460	3.150	0.750
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	5.988	3.590	2.699	1.100	6.614	2.037	0.000	1.000	2.807	0	0.773	4.366	3.446	3.150	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	5.963	3.587	2.700	1.100	6.355	2.036	0.250	0.999	2.859	1.966	0.773	4.376	3.390	3.146	0.499
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	11.889	7.179	5.399	2.199	12.634	4.070	0.654	1.996	5.704	4.914	1.545	8.752	6.745	6.292	1.247
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	11.574	7.179	5.399	2.199	12.224	4.063	0.581	1.996	5.448	4.908	1.535	8.74	6.654	6.285	1.247
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	5.284	3.588	0	1.098	5.056	2.021	0	0.989	2.211	1.955	0.76	4.321	3.184	3.126	0.496
12	0	0	2.669	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	3.951	6.937	5.487	4.488	4.257	4.003	1.145	1.893	4.248	4.801	1.39	8.859	10.025	12.584	2.365
14	0.218	0	5.83E-04	0	0.059	0	0.463	0	0.264	2.95	4.80E-04	0.034	0	0	0.75
15	0.218	0	5.83E-04	0	0.059	0	0.463	0	0.264	2.95	4.80E-04	0.034	0	0	0.75
16	0	0	2.59E-04	0	0	0	0.25	0	0.068	1.966	0	0.01	0	0	0.499
17	0	2.53E-04	0	3.11E-04	0.244	0.001	0	0.001	0	0	0	0	0.049	0.004	0
18	0.01	1.27E-04	2.59E-04	1.56E-04	0	6.64E-04	0.155	9.44E-04	0.068	0.983	3.20E-04	0.01	0	5.81E-04	0.25
19	0	0	0	0	0.005	0	0	0	0	0	0	0	0.022	0	0
20	0.01	1.27E-04	2.59E-04	1.56E-04	0	6.64E-04	0.155	9.44E-04	0.068	0.983	3.20E-04	0.01	0	5.81E-04	0.25
21	0	0	0	0	0.005	0	0	0	0	0	0	0	0.022	0	0
22	0	0	0	0	0	0	0.095	0	0	0.982	0	0	0	0	0.249
23	0.01	3.80E-04	0	4.67E-04	0.239	0.002	0	0.002	0	0	3.20E-04	0	0.027	0.004	0
24	0.004	1.27E-04	2.59E-04	1.56E-04	0	6.64E-04	0.155	9.44E-04	0.064	0.983	3.20E-04	0.01	0	5.81E-04	0.25
25	0	0	0	0	0.009	0	0	0	0	0	0	0	0.024	0	0
26	6.648	0	0	0	6.687	0	0	0	0.007	5.00E-04	0.079	0	0	0	0.086
27	0	0	0.063	2.28	0	0	0.541	0	1.588	0	0	0.078	0.419	0	0
28	2.01	1.898	0.866	2.848	3.404	0	0	0	0.947	0	0.215	0	1.517	0	0
29	0	0	0	0	0	0.03	1.266	0.012	0	0.012	0	1.843	0	0.133	0.068
30	0	0	0.028	0	0	0	2.465	0	0.947	0	0	0	0	12.7	0
31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.065	3.182	0	1.207
32	0.362	0.237	0	0	0.509	0	2.475	0.075	1.538	0.064	0.055	0	0	6.37	0
33	1.011	5.038	4.621	1.608	0.185	3.914	2.475	1.889	1.938	4.795	1.161	10.699	4.761	6.357	1.216
34	1.011	5.038	4.621	1.608	0.185	3.914	2.475	1.889	1.938	4.792	1.161	10.699	4.761	6.357	1.216
35	1.011	5.038	4.621	1.579	0.185	3.832	2.475	1.889	1.938	4.792	1.161	10.699	1.342	0.008	0
36	1.181	4.806	4.619	1.58	0	3.797	2.474	1.879	1.706	4.76	0	10.703	1.257	0	0
37	1.181	4.806	4.619	1.58	0	3.797	2.474	1.879	1.706	4.76	1.143	10.703	1.257	0	0
38	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
39	1.181	4.806	4.653	1.609	0	3.879	2.465	1.879	1.706	4.76	1.143	10.703	4.676	6.349	1.216

R#	LimOT				LOT				MOT				HOT			
	Evre I	Evre II	Evre III	Evre IV	Evre I	Evre II	Evre III	Evre IV	Evre I	Evre II	Evre III	Evre IV	Evre I	Evre II	Evre III	Evre IV
40	1.284	4.807	4.653	1.61	0.111	3.904	2.465	1.883	1.856	4.762	1.144	10.764	4.738	6.351	1.217	
41	1.284	4.807	4.626	1.639	0.111	3.987	0	1.883	0.908	4.762	1.144	10.764	8.157	61	2.433	
42	0	0	0	0.029	0	0.083	0	0	0	0	0	0	3.419	6.349	1.216	
43	0	0	0	0.029	0	0.083	0	0	0	0	0	0	3.419	6.349	1.216	
44	0.315	0	0	0	0.41	0.007	0.072	0	0.256	0.007	0.01	0.012	0.091	0.006	6.27E-0	
45	0.149	0	0	0	0.115	0.002	0	0	0.127	0.003	0.002	0.007	0.038	0.002	2.31E-0	
46	0.06	1.27E-04	6.84E-04	1.56E-04	0.039	6.64E-04	2.02E-04	9.44E-04	0.054	0	0.008	1.38E-04	0.019	5.76E-04	8.80E-0	
47	0.088	7.61E-04	3.88E-04	9.34E-04	0.09	0.032	0	0.004	0.096	0.007	9.60E-04	8.28E-04	0.035	0.003	5.28E-0	
48	0.182	0.001	6.80E-04	0.002	0.158	0.009	0.001	0.01	0.148	0.012	0.005	0.001	0.072	0.008	4.24E-0	
49	0.106	4.76E-04	2.43E-04	5.84E-04	0.067	0.002	7.58E-04	0.004	0.071	0.004	0.004	5.18E-04	0.034	0.002	3.30E-0	
50	0.076	8.56E-04	4.37E-04	0.001	0.091	0.006	3.64E-04	0.006	0.077	0.008	0.001	9.32E-04	0.037	0.006	9.40E-0	
51	0.202	1.27E-04	6.48E-04	1.56E-04	0.304	3.64E-04	0.059	2.36E-04	0.124	6.64E-04	1.60E-04	0.014	0.069	0.003	0.001	
52	0.024	3.17E-04	1.62E-05	3.89E-05	0.015	1.66E-04	5.05E-05	2.36E-04	0.004	2.91E-04	4.00E-05	0.014	0.013	1.28E-04	0.001	
53	0.635	0.005	0.005	0.031	0.435	0.072	0	0.068	0.508	0.032	0.038	0	0.215	0.013	0.011	
54	0.094	4.12E-05	0.002	0.024	0.047	0.002	6.57E-04	0.028	0.035	0.002	0.003	0	0.012	0.002	0.003	
55	0.221	0.004	0.002	0.003	0.162	0.034	0.002	0.015	0.216	0.019	0.005	0.002	0.071	0.009	0.001	
56	0.086	7.61E-04	3.88E-04	9.34E-04	0.055	0.004	0.001	0.006	0.06	0.007	9.60E-04	8.28E-04	0.029	0.003	5.28E-0	
57	0.086	7.61E-04	3.88E-04	9.34E-04	0.055	0.004	0.001	0.006	0.06	0.007	9.60E-04	8.28E-04	0.029	0.003	5.28E-0	
58	0.086	7.61E-04	3.88E-04	9.34E-04	0.055	0.004	0.001	0.006	0.06	0.007	9.60E-04	8.28E-04	0.029	0.003	5.28E-0	
59	0.086	7.61E-04	3.88E-04	9.34E-04	0.055	0.004	0.001	0.006	0.06	0.007	9.60E-04	8.28E-04	0.029	0.003	5.28E-0	
60	0.135	0.003	0.002	0.002	0.106	0.03	8.13E-04	0.01	0.157	0.012	0.004	0.001	0.042	0.006	9.02E-0	
61	0.098	0.003	0.002	0.001	0.083	0.029	6.11E-04	0.009	0.126	0.011	0.001	0.001	0.03	0.005	8.14E-0	
62	0.072	4.44E-04	2.27E-04	5.45E-04	0.046	0.002	7.07E-04	0.003	0.049	0.004	5.60E-04	4.83E-04	0.024	0.002	3.08E-0	
63	0.037	1.27E-04	6.48E-05	1.56E-04	0.023	6.64E-04	2.02E-04	9.44E-04	0.031	0.001	0.002	1.38E-04	0.012	5.76E-04	8.80E-0	
64	0.013	5.07E-04	2.59E-04	6.22E-04	0.23	0.002	0.059	0.003	0.064	0.001	6.40E-04	0.01	0.003	0.005	3.52E-0	
65	0	2.22E-04	1.13E-04	2.72E-04	0.028	0.001	6.57E-04	0.002	0.036	0	2.80E-04	0.009	0	0.001	1.54E-0	
66	0.013	1.90E-04	9.72E-05	2.33E-04	0.022	9.96E-04	0	0.001	0.023	7.83E-04	2.40E-04	2.07E-04	0.003	8.64E-04	1.32E-0	
67	0	9.51E-05	4.86E-05	1.17E-04	0.18	1.98E-04	0.059	0	0.004	3.73E-04	1.20E-04	1.04E-04	4.32E-04	0.003	6.60E-0	
68	0	9.51E-05	4.86E-05	1.17E-04	0.18	1.98E-04	0.059	0	0.004	3.73E-04	1.20E-04	1.04E-04	4.32E-04	0.003	6.60E-0	
69	0.889	0.011	0.009	0.035	1.5	0.189	0	0.108	1.515	0.104	0.074	0.036	0.595	0.048	0.015	
70	0.506	0.001	0.004	0.021	0.357	0.032	2.18E-04	0.03	0.388	0.008	0.004	0.015	0.165	0.005	0.005	
71	0.053	3.49E-04	1.78E-04	4.28E-04	0.034	0.002	5.56E-04	0.003	0.036	0.019	0.016	3.80E-04	0.018	0.002	2.42E-0	
72	0.015	4.44E-04	2.26E-04	5.45E-04	0.057	0.024	1.07E-04	0.003	0.104	0.002	5.60E-04	4.83E-04	0.029	0.002	3.08E-0	
73	0	4.44E-04	2.26E-04	5.45E-04	0.047	0.024	1.07E-04	0.003	0.094	0.002	5.60E-04	4.83E-04	0.024	0.002	3.08E-0	
74	0	4.44E-04	2.26E-04	5.45E-04	0.047	0.024	1.07E-04	0.003	0.094	0.002	5.60E-04	4.83E-04	0.024	0.002	3.08E-0	
75	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
76	0.372	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
77	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
78	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
79	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8.36E-04	0	0	
80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

R#	LimOT				LOT				MOT				HOT			
	Evre I	Evre II	Evre III	Evre IV	Evre I	Evre II	Evre III	Evre IV	Evre I	Evre II	Evre III	Evre IV	Evre I	Evre II	Evre III	Evre IV
122	0.91	0.011	0.008	0.031	1.988	0.219	0.032	0.117	1.859	0.108	0.075	0	0.709	0.054	0.02	0
123	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
124	0.097	2.54E-04	1.30E-04	3.11E-04	0.061	0.001	4.04E-04	0.002	0.085	3.28E-04	0.011	2.76E-04	0.031	0.001	1.76E-0	0
125	0.52	0.001	0.003	0.025	0.537	0.028	0.06	0.034	0.409	0.005	0.015	0.03	0.181	0.008	0.006	0
126	0.557	0	0	0	0.343	0	0	0	0.364	0	0	0	0.171	0	0	0
127	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
128	0.034	0	0	0	0.021	0	0	0	0.022	0	0	0	0.01	0	0	0
129	0.006	0	0	0	0.004	0	0	0	0.004	0	0	0	0.002	0	0	0
130	0.006	0	0	0	0.004	0	0	0	0.004	0	0	0	0.002	0	0	0
131	0.067	0	0	0	0.041	0	0	0	0.044	0	0	0	0.021	0	0	0
132	0.11	4.44E-04	2.27E-04	5.45E-04	0.115	0.024	1.07E-04	0.003	0.166	0.002	5.60E-04	4.83E-04	0.058	0.002	3.08E-0	0
133	0.018	0	0	0	0.011	0	0	0	0.012	0	0	0	0.006	0	0	0
134	0.007	0	0	0	0.004	0	0	0	0.005	0	0	0	0.002	0	0	0
135	0.006	0	0	0	0.004	0	0	0	0.004	0	0	0	0.002	0	0	0
136	0.006	0	0	0	0.004	0	0	0	0.004	0	0	0	0.002	0	0	0
137	0.006	0	0	0	0.004	0	0	0	0.004	0	0	0	0.002	0	0	0
138	0.044	0	0	0	0.027	0	0	0	0.029	0	0	0	0.014	0	0	0
139	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
140	0.004	0	0	0	0.003	0	0	0	0.003	0	0	0	0.001	0	0	0
141	0.26	0	0	0	0.16	0	0	0	0.17	0	0	0	0.08	0	0	0
142	1.15E-04	3.17E-05	1.62E-05	3.89E-05	1.77E-04	1.66E-04	5.05E-05	2.36E-04	2.14E-04	2.91E-04	4.00E-05	3.45E-05	1.44E-04	1.44E-04	2.20E-0	0
143	23.412	74.171	65.191	35.615	21.187	50.269	25.169	24.355	26.253	73.815	16.263	127.997	63.186	75.445	17.254	0



Şekil 11. Evre I pyruvat (Pyr) nodundaki akı dağılımı

LimOT, LOT ve HOT koşullarında, R5P iç dönüşüm tepkimeleri (R20-R25) ile sentezlenirken, MOT koşulunda R5P hem iç dönüşüm hem de oksidatif tepkimeler ile üretilmiştir. Ancak hücre sentezi olmadığı için PFY akı değerleri düşüktür (Çizelge 10).

Pyr nodunda, sadece LimOT koşulunda Ac sentez tepkimesi (R28=1.88 mmol/gKH st) aktiftir. LOT, MOT ve HOT koşullarında Ac (R28) üretim tepkimesi inaktiftir, tüm oksijen aktarım koşullarında Lac sentez tepkimesi (R26) inaktiftir (Çizelge 10).

Anaplerotik tepkimeler (R29, R30, R31) LimOT ve LOT koşulunda inaktiftir, MOT koşulunda R30 tepkimesi aktiftir ve akı değeri $R30=0.947$ mmol/gKH st, HOT koşulunda da R31 tepkimesi $R31=3.18$ mmol/gKH st akı değeri ile aktiftir.

Evre I'e benzer olarak Evre II'de de TCA döngüsü ve CO_2 üretim akıları en yüksek ve en düşük sırasıyla HOT ve LOT koşullarındadır. Glikolat şöntü MOT ve HOT koşullarında aktifken; LimOT ve LOT koşullarında inaktiftir. Evre I ve Evre II kıyaslandığında TCA döngüsü akıları Evre II'de LimOT koşulunda 4.9-kat, LOT koşulunda 21-kat, MOT koşulunda 2.52 kat, HOT koşulunda da 1.33-kat artmıştır. LOT koşulundaki artışın temel nedeni Lac (26) ve Ac (28)'a giden akının TCA döngüsüne yönlendirilmesidir; buna rağmen oksijen aktarım koşulları içinde en düşük TCA döngüsü akıları LOT koşulunda elde edilmiştir (Çizelge 10).

Tüm oksijen aktarım koşullarında Evre II'de hücre sentez tepkimesi (R141) inaktiftir. Buna paralel olarak Evre II'de hücre bileşenleri sentez tepkimeleri de inaktiftir. Amino asit sentez hızları genel olarak Evre II'de Evre I'e kıyasla azalmıştır. Evre II'de de Evre I'e benzer şekilde β -laktamaz akısı MOT koşulunda en yüksektir ($R142=2.91 \times 10^{-4}$ mmol/gKH st), onu LOT koşulu takip etmiş ($R142=1.66 \times 10^{-4}$ mmol/gKH st), en düşük akı değeri ise LimOT koşulunda elde edilmiştir ($R142=3.17 \times 10^{-5}$ mmol/gKH st) (Çizelge 10).

ATP üretimi HOT koşulunda en yüksekken LOT koşulunda en düşüktür. Evre II'ye kıyasla Evre I'de daha fazla ATP üretilmiştir, ancak üretilen ATP'nin büyük bir kısmı yaşam fonksiyonları için kullanılmıştır.

Evre III (11<I<20 st) : β -laktamaz sentezi için durgunluk fazı

Evre I ve II'ye benzer olarak Evre III'te de glikoliz yolizi aktif, glukoneogenesis yolizi inaktiftir. Tüm oksijen aktarım koşullarında glikoliz yolizi akı değerleri düşmüştür. Ancak, LimOT koşulu glikoliz akı değerleri LOT, MOT ve HOT koşulları akı değerlerinden 3.5-5.8 kat daha yüksektir. LimOT koşulunda Ac sentez ($R28=0.85$ mmol/gKH st) tepkimesi aktiftir. Buna ek olarak, LimOT koşulunda TCA döngüsü, ATP ve CO_2 üretim akıları değerleri de diğer koşulların akı değerlerinden yüksektir. TCA döngüsü akı değerleri LOT koşulunda MOT ve HOT koşuluna kıyasla 2-kat yüksekken, LimOT TCA döngüsü akı değerleri de LOT koşulu akı değerlerinden 1.8-kat yüksektir (Çizelge 10).

β -laktamaz akısı (R142) Evre III'de tüm oksijen aktarım koşulları için düşmüştür, en düşük β -laktamaz sentez akısı ise diğer yolizlerindeki yüksek akı değerlerine rağmen LimOT koşulunda

($R_{142}=1.62 \times 10^{-5}$ mmol/gKH st) elde edilirken, en yüksek β -laktamaz sentez akısı LOT ($R_{142}=5.05 \times 10^{-5}$ mmol/gKH st) koşulunda elde edilmiştir (Çizelge 10)

Evre IV (20<t<30 st) : İkinci β -laktamaz üretim fazı

Diğer evrelerde olduğu gibi Evre IV'de de glikoliz yolizi aktiftir, ancak glikoliz yolizi akıları MOT koşulunda en yüksektir, onu LOT koşulu takip etmiştir (Çizelge 10). Glikoliz yolizi akılarındaki artmaya benzer olarak TCA döngüsü, ATP sentez ve CO₂ üretim akıları da MOT koşulunda diğer koşullara kıyasla yüksektir. Evre III'e benzer şekilde Evre IV'de de β -laktamaz sentez akısı LOT koşulunda ($R_{142}=3.36 \times 10^{-4}$ mmol/gKH st) en yüksektir, ancak Evre IV LOT β -laktamaz sentez akısı LimOT ve MOT koşulu akı değerinden yaklaşık 6-kat daha yüksektir (Çizelge 10). Evre IV'de β -laktamaz hidroliz olduğu için hücre içi tepkime hızları hesaplanamamıştır.

2.2.5. Beta-laktamaz üretimi üzerine pH etkisi

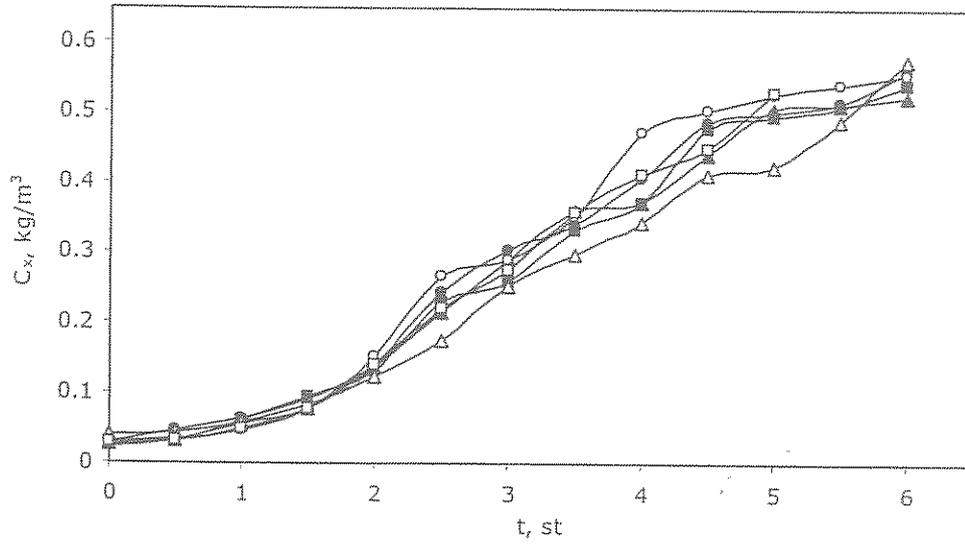
Projenin bu aşamasına kadar elde edilen sonuçlar değerlendirilmiş ve beta-laktamaz üretiminin artırılması, Evre III'deki durgunluk fazının geciktirilerek üretim fazına dönüştürülebilmesi için, sürekli glukoz beslemesi ile yarı-kesikli biyoreaktörde üretim yapılmasına karar verilmiştir. Ancak sürekli glukoz beslemesinde ortam pH'ında meydana gelecek düşme prosesi olumsuz etkileyeceğinden, pH kontrollü işletim yapılmasını karar verilmiştir. Bulunan en uygun oksijen aktarım koşullarında, $Q_o/V_R=0.5$ vvm, $N=500$ min⁻¹, pH etkisi $V=3.0$ dm³ hacimli ve $V_R=1.65$ dm³ çalışma hacimli biyoreaktörlerde pH: 6.5, 6.75, 7, 7.25, ve 7.5 kontrollü-pH koşullarında gerçekleştirilmiştir. Proses süresince pH kontrolü 5M KOH ve/veya 5M H₃PO₄ kullanımı ile yapılmıştır (İleri ve Çalık, 2006).

Hücre profilleri

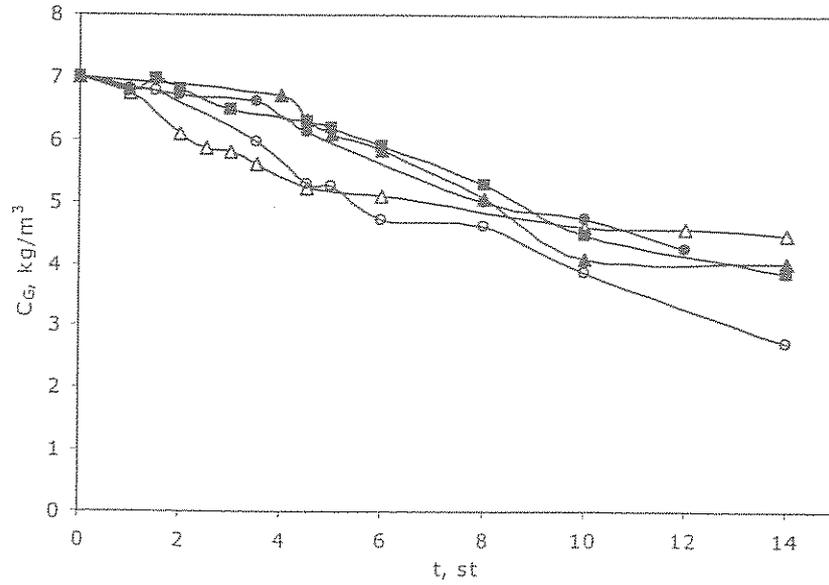
Hücre derişiminin pH ve kalma süresi ile değişimi Şekil 12'te verilmiştir. Hücre derişimi $t=1-6$ st arasında artmış ve en yüksek değerlerine $t=5-6$ st'leri arasında ulaşmıştır. Şekilden de görüldüğü gibi pH=6.5-7.5 arasında pH kontrolü hücre derişimini etkilememiştir. Kontrolsüz pH_{Huc}= 7.5 ile kıyaslandığında da pH'ın hücre çoğalmasına etkisi olmadığı görülmektedir (İleri ve Çalık, 2006).

Glukoz Profilleri

Glukoz derişiminin pH ve kalma süresi ile değişimi Şekil 13' de verilmiştir. En yüksek glukoz tüketimi pH_c=6.75, elde edilmiştir. Kontrolsüz pH_{Huc}=7.5 ile kıyaslandığında glukoz tüketimini pH kontrolü ile arttığı görülmektedir (İleri ve Çalık, 2006).



Şekil 12. Hücre derişiminin pH ve kalma süresi ile değişimi. $C_G^0 = 7.0 \text{ kg m}^{-3}$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R= 1.65 \times 10^{-3} \text{ m}^3$, $Q_0/V_R=0.5 \text{ vvm}$, $N=500 \text{ min}^{-1}$: $\text{pH}_C=7.5$, (●); $\text{pH}_C=7.25$, (▲); $\text{pH}_C=7.0$, (■); $\text{pH}_C=6.75$, (○); $\text{pH}_C=6.5$, (Δ).



Şekil 13. Glukoz derişiminin pH ve kalma süresi ile değişimi $C_G^0 = 7.0 \text{ kg m}^{-3}$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R= 1.65 \times 10^{-3} \text{ m}^3$, $Q_0/V_R=0.5 \text{ vvm}$, $N=500 \text{ min}^{-1}$: $\text{pH}_C=7.5$, (●); $\text{pH}_C=7.25$, (▲); $\text{pH}_C=7.0$, (■); $\text{pH}_C=6.75$, (○); $\text{pH}_C=6.5$, (Δ).

β -lactamaz Aktivite Profilleri

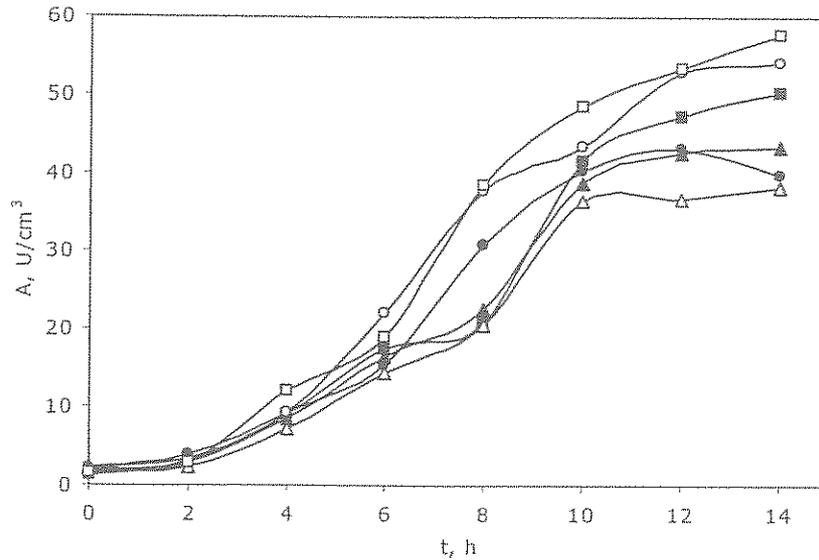
β -lactamaz aktivitesinin pH ve kalma süresi ile değişimi Şekil 14'te verilmiştir. En yüksek β -lactamaz aktivitesi $pH_{UC}=7.5$ koşulunda $t=14$ st'te $A=57$ U/cm^3 olarak, kontrollü $pH_C=7.5$ 'da ise $A=37$ U/cm^3 olarak bulunmuştur. Kontrollü pH'lar içinde ise en yüksek aktivite $pH_C=6.75$ koşulunda $A=55$ U/cm^3 olarak bulunmuştur. $pH_{UC}=7.5$ ve $pH_C=6.75$ koşulları aktivitelerinin birbirlerine çok yakın olması nedeniyle yarı-kesikli çalışmalarda $pH_C=6.75$ koşulda çalışılmasına karar verilmiştir (İleri ve Çalık, 2006).

Çözünmüş Oksijen Profilleri

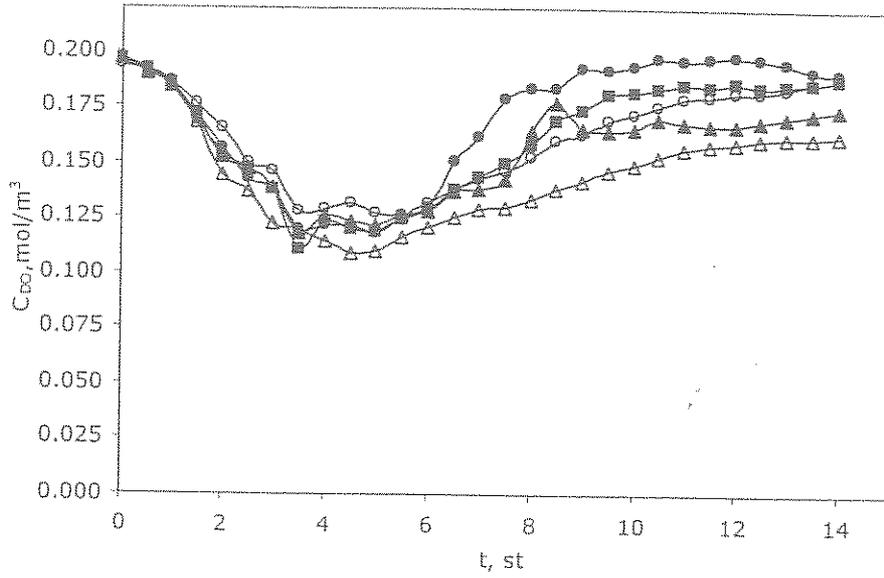
Çözünmüş oksijen derişiminin pH ve kalma süresi ile değişimi Şekil 15'da verilmiştir. İncelenen bütün pH değerlerinde aynı oksijen aktarım koşulunda çalışılması nedeniyle benzer oksijen derişimi profilleri elde edilmiştir. Prosesin $t=0-6$ st aralığında oksijen derişimi hızla düşmüş ($C_{DO}=0.1-0.13$ $mol\ m^{-3}$) hücre çoğalması tamamlandıktan sonra artmıştır (İleri ve Çalık, 2006).

Oksijen Aktarım karakteristikleri

Oksijen tüketim hızı (OTH) ve oksijen aktarım hızının (K_La) bulunması için dinamik yöntem kullanılmıştır. β -lactamaz üretim prosesi hücre çoğalma ve β -lactamaz üretim fazı olmak üzere iki periyota bölünmüş ve OTH ve K_La 'nın pH ile değişimi Çizelge 11'de verilmiştir. Proses süresince K_La $0.012-0.032\ s^{-1}$ aralığında değişmiştir. OTH genel olarak hücre çoğalma periyodunda hücrenin metabolik aktivite yüksekliğinden dolayı daha yüksek bulunmuştur (İleri ve Çalık, 2006).



Şekil 14. β -lactamaz aktivitesinin pH ve kalma süresi ile değişimi. $C_G^0 = 7.0$ $kg\ m^{-3}$, $T=37^\circ C$, $V_R=1.65 \times 10^{-3}$ m^3 , $Q_0/V_R=0.5$ vvm, $N=500$ min^{-1} ; $pH_C=7.5$, (●); $pH_C=7.25$, (▲); $pH_C=7.0$, (■); $pH_C=6.75$, (○); $pH_C=6.5$, (Δ), $pH_{UC} = (\square)$.



Şekil 15. Çözünmüş oksijen derişiminin pH ve kalma süresi ile değişimi. $C_{DO}^* = 0.20 \text{ mol m}^{-3}$. $C_G^0 = 7.0 \text{ kg m}^{-3}$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R = 1.65 \times 10^{-3} \text{ m}^3$, $Q_0/V_R = 0.5 \text{ vvm}$, $N=500 \text{ min}^{-1}$: $\text{pH}_C=7.5$, (\bullet); $\text{pH}_C=7.25$, (\blacktriangle); $\text{pH}_C=7.0$, (\blacksquare); $\text{pH}_C=6.75$, (\circ); $\text{pH}_C=6.5$, (\triangle).

Çizelge 11. Oksijen tüketim hızı (OTH) ve oksijen aktarım katsayısının ($K_{L,a}$) pH ve kalma süresi ile değişimi (GP: Hücre çoğalma periyodu; PP: enzim üretim periyodu).

Biyoreaktör işletim pH'ı	Periyot	$K_{L,a}$ (s^{-1})	OTH $\times 10^3$ ($\text{mol m}^{-3} \text{ s}^{-1}$)
pH _C :7.5	GP	0.012	1.0000
	PP	0.032	0.5600
pH _C :7.25	GP	0.012	1.0650
	PP	0.015	0.5964
pH _C :7.0	GP	0.012	1.0333
	PP	0.014	0.9000
pH _C :6.75	GP	0.011	1.0043
	PP	0.013	0.9107
pH _C :6.5	GP	0.011	0.9177
	PP	0.014	0.7605

2.2.6. Besleme stratejisi geliştirilmesi

Beta-laktamaz üretimini arttırmak için besleme stratejisi için tasarlanan araştırma programında, K_2HPO_4 ve Na_2HPO_4 derişimlerinin β -laktamaz üretimi üzerine etkisi Na-K pompası üzerine olabilecek etki düşünülerek araştırılmıştır. Bu iki inorganik kimyasal madde aynı zamanda ortamdaki fosfat derişimini de arttıracığından proses üzerinde ikili etki oluşacaktır. Bileşimi Çizelge 3'te verilen üretim ortamlarına (kg/m^3): a) Na_2HPO_4 , 0; K_2HPO_4 , 0 (Çalık et al., 2005), b) Na_2HPO_4 , 0.5; K_2HPO_4 , 0.5, c) Na_2HPO_4 , 1.0; K_2HPO_4 , 1.0, d) Na_2HPO_4 , 1.25; K_2HPO_4 , 1.25, ve e) Na_2HPO_4 , 1.5; K_2HPO_4 , 1.5, eklenmesi ile elde edilen ortamlarda iki bileşiğin β -laktamaz üretimi üzerine etkisi $V_R=33$ ml hacimli reaktörlerde incelenmiştir. Na_2HPO_4 , $1.0 kg/m^3$ ve K_2HPO_4 , $1.0 kg/m^3$ eklenerek, referans-ortama kıyasla aktivite 1.2- kat artmıştır. Sonuç olarak, besleme stratejisi deneyleri için $t=0$ st başlangıç ortamı bileşimi modifiye edilmiştir ve Çizelge 12'de verilmiştir.

Çizelge 12. Beta-laktamaz üretim ortam bileşimi

Bileşen	Derişim, $kg m^{-3}$
Glukoz	7.0
$(NH_4)_2HPO_4$	7.1
Na_2HPO_4	1.0
K_2HPO_4	1.0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.25
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	1.0×10^{-3}
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	1.0×10^{-3}
$MnSO_4 \cdot H_2O$	7.5×10^{-5}
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	1.0×10^{-5}

Kesikli biyoreaktör sonuçları değerlendirilmiş ve sürekli glukoz beslemesi ile yarı-kesikli biyoreaktörde üretim için bir alt-araştırma programı tasarlanmıştır. $V_R=33$ ml'de yapılan ön-deneyle hücre çoğalma evresi sonunda beslemenin beta-laktamaz üretimini arttırdığı bulunmuş, bu nedenle $t=7$ st 'te besleme başlatılmıştır. Bu programdaki ön-deneyle sabit-debide değişik glukoz derişimlerinde yapılan üretimler yerine, biyoproses karakteristikleri değerlendirilerek, düşük glukoz debilerinden başlayarak debinin tasarlanacak bir programla zaman ile artırılmasının iyi sonuçlar vereceği öngörülmüştür. Prosesin $t=0-7$ st aralığında $2.5 kg/m^3$ glukoz tüketildiği için, glukoz-besleme stratejisinde başlangıç glukoz derişimi de $C_G^0=2.5 kg/m^3$ olarak tasarlanmıştır. Enzim

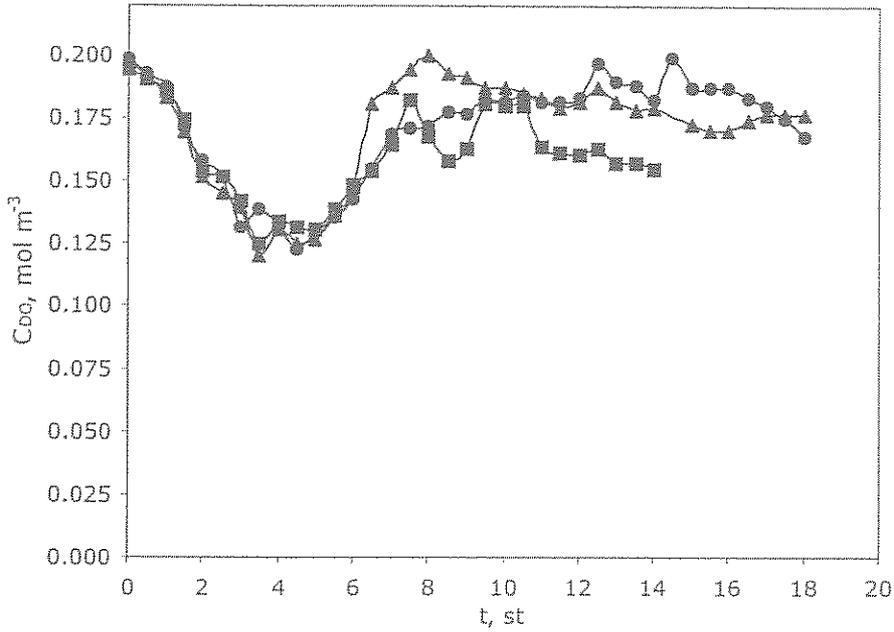
zaman ile değişimi ve hücreiçi tepkime hızları dikkate alınarak, biyoreaktörde $t=7$ st' de başlayarak glukoz çözeltisi debisi Q_G , kalma süresi t 'nin fonksiyonu olarak, iki alternatif stratejiyle:

* $Q_G(t)$ üstel- artırılarak (FB1), ve

* $Q_G(t)$ lineer- artırılarak (FB2),

glukoz-besleme hızının beta-laktamaz üretimi üzerine etkisi araştırılmıştır. Oksijen aktarım koşulları olarak bulunan en uygun koşullar $Q_o/V_R=0.5$ vvm ve $N=500$ dk⁻¹ kullanılmıştır.

Oksijen, hücre, glukoz derişimleri ve beta-laktamaz aktivitesinin zamanla ve besleme stratejisi ile değişimleri, sırasıyla, Şekil 16, 17, 18 ve 19'da verilmiştir. FB1, FB2, ve kesikli üretim deneyleri en az iki defa tekrar edilmiştir. Tekrar edilen deney sonuçları arasında en fazla %5 fark gözlenmiş, sonuçlar ortalama değerler alınarak verilmiştir.



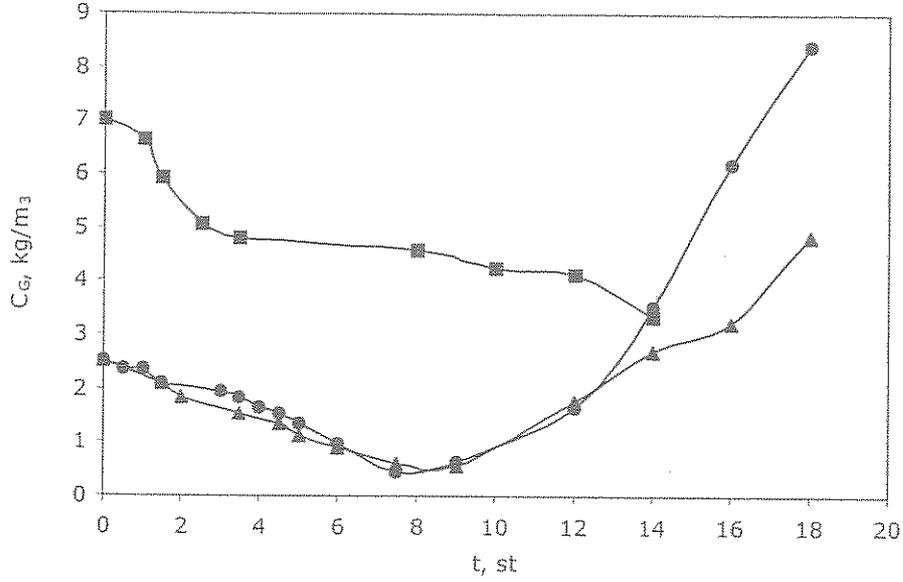
Şekil 16. Oksijen derişiminin besleme stratejisi ve kalma süresi ile değişimi FB1 ve FB2 için $C_G^0 = 2.5$ kg m⁻³, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=1.65 \times 10^{-3}$ m³, $Q_o/V_R=0.5$ vvm, $N=500$ dk⁻¹, $\text{pH}_C=6.75$, FB1, (●); FB2, (▲); $N\text{-pH}_C=6.75$, (■).

Glukoz beslemesi $t=7$ st'te başladığı ve bu zamana kadar kesikli işletim ile biyoproses sürdürüldüğü için, bu an durgunluk fazı girişine karşılık geldiği için, besleme stratejisi hücre üretimini etkilememiştir (Şekil 17). Glukoz beslemesinin glukoz çözelti deposundan ($C_G=320$ kg/m³):

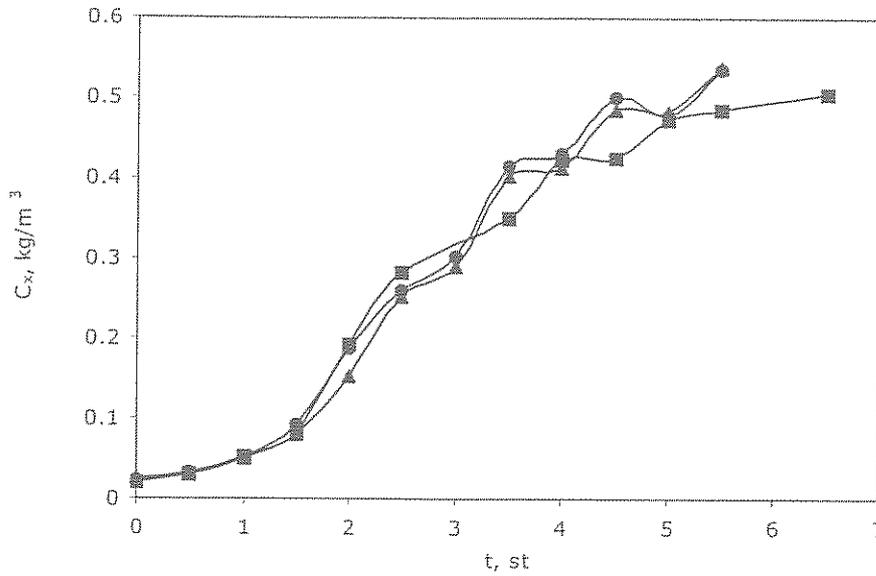
$Q_G=1.0e^{0.1t}$ ml/st debide üstel-artışla, ve

$Q_G=0.031t$ ml/dk debide lineer-artışla

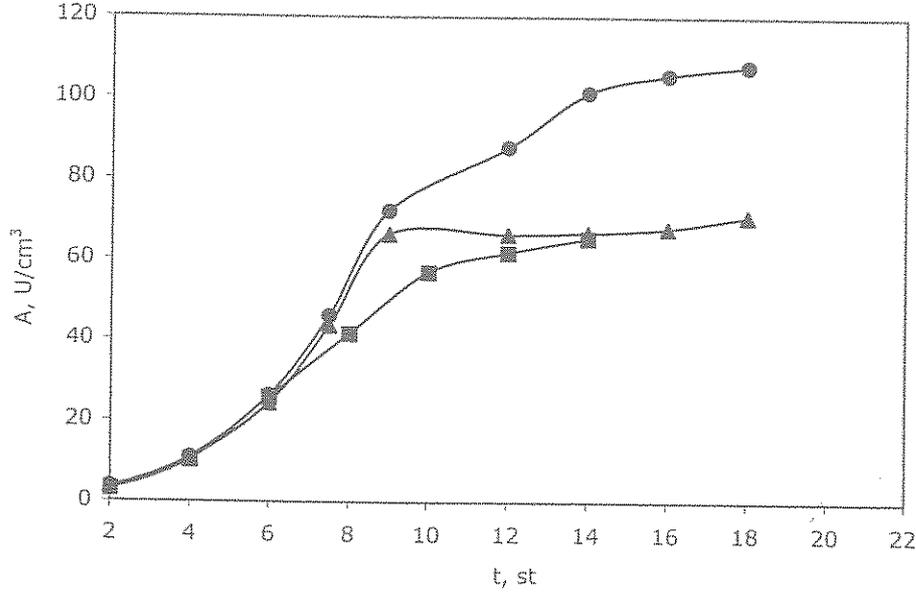
besleme yapılmıştır. En yüksek beta-laktamaz üretimi üstel-besleme stratejisinde $A=108 \text{ U cm}^{-3}$ olarak elde edilmiştir. Lineer besleme stratejisinde ise, ilk 12 st'te glukoz tüketiminin daha yüksek olduğu görülmektedir; hücre çoğalma evresi tamamlandıktan sonra biyoreaktördeki fazla glukoz metabolizmayı yan-ürün oluşumuna kaydırmıştır.



Şekil 17. Glukoz derişiminin besleme stratejisi ve kalma süresi ile değişimi FB1 ve FB2 için $C_G^0 = 2.5 \text{ kg m}^{-3}$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=1.65 \times 10^{-3} \text{ m}^3$, $Q_0/V_R=0.5 \text{ vvm}$, $N=500 \text{ dk}^{-1}$, $\text{pH}_C=6.75$, FB1, (●); FB2, (▲); N-pH_C=6.75, (■).



Şekil 18. Besleme stratejisinin hücre derişimine etkisi. FB1 ve FB2 için $C_G^0 = 2.5 \text{ kg m}^{-3}$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R=1.65 \times 10^{-3} \text{ m}^3$, $Q_0/V_R=0.5 \text{ vvm}$, $N=500 \text{ dk}^{-1}$, $\text{pH}_C=6.75$, FB1, (●); FB2, (▲); N-pH_C=6.75, (■).



Şekil 19. Besleme stratejisinin β -laktamaz aktivitesine etkisi. FB1 ve FB2 için $C_G^0 = 2.5 \text{ kg m}^{-3}$, $T=37^\circ\text{C}$, $V_R = 1.65 \times 10^{-3} \text{ m}^3$, $Q_G/V_R=0.5 \text{ vvm}$, $N=500 \text{ dk}^{-1}$, $\text{pH}_C=6.75$, FB1, (●); FB2, (▲); N- $\text{pH}_C=6.75$, (■).

Amino Asit Değişimleri

Hücre dışı amino asit değişimleri hücre çoğalma fazı ($\text{CP} : 0 < t < 6 \text{ st}$) ve enzim üretim fazı ($\text{PP} : 7 < t < 16 \text{ st}$) için Çizelge 13'te verilmiştir. Kesikli ve yarı-kesikli işletim koşullarında ortama salgılanan amino asitlerin değişimleri düşüktür. Ortama salgılanan amino asitler: asparajin, metiyonin, valin, fenilalanin ve tirozindir. Toplam hücre dışı amino asit değişimi kesikli işletim $t=14 \text{ st}$ 'te $T_{AA, \text{ext}} = 0.1604 \text{ kg m}^{-3}$ değeri ile en yüksektir.

Organik Asit Değişimleri

Hücre dışı organik asit değişimleri hücre çoğalma fazı ($\text{CP} : 0 < t < 6 \text{ st}$) ve enzim üretim fazı ($\text{PP} : 7 < t < 16 \text{ st}$) için Çizelge 14'te verilmiştir. Okzaloasetik asit dışındaki organik asitler hücre dışına salgılanmıştır. Yarı-kesikli işletim laktik ve asetik asidin ortama salgılanmasını arttırmıştır.

Hücre Canlılığı

Kesikli ve üstel-artışla yarı-kesikli işletimde hücrelerin canlılığı üretim süresince izlenmiştir (Çizelge 15). Üstel-artışla yarı-kesikli işletimde, hücrelerin $t=18 \text{ st}$ 'te %92'sinin canlı olduğu bulunmuştur (Şekil 20).

2.2.7. Hücre içi tepkime hızlarına besleme stratejisinin etkisi

Üstel-artışla yarı-kesikli işletim ve kesikli işletim için hücre içi tepkime hızları hesaplanmış ve karşılaştırılmıştır. Bu amaçla, üstel-artışla yarı-kesikli işletim hücre ve beta-laktamaz sentez profilleri dikkate alındığında proses üç evreye ayrılmıştır. Evre I ($0 < t < 6$ st) hücrelerin üstel çoğalma evresi ve beta-laktamaz enzim üretiminin başlangıcı, Evre II ($6 < t < 11$ st) üstel beta-laktamaz sentez evresi, Evre III ($11 < t < 16$ st) beta-laktamaz sentez bölgesidir. Evre I'de kalma süresi $t_1=4$ st, Evre II'de $t_2=8$ st, Evre III'de $t_2=11$ st, MYM analizi için seçilmiştir. Evre I akıları üstel-artışla yarı-kesikli işletim (FB1) ve kesikli işletim için kıyaslandığında, nükleik asit ve hücre bileşenlere giden akı değerleri birbirine yakın olmasına rağmen glikoliz yolizi akılarının FB1 koşulunda kesikli işleme kıyasla 2-kat düşük olduğu bulunmuştur. TCA döngüsü akıları ise iki işletim koşulunda da 0.22-0.40 mmol/gKH st aralığındadır. Pyr nodundaki akı dağılımı kıyaslandığında kesikli işletim koşulundaki laktat akısı (R26) sifira çok yakın bir değerken, FB1 koşulunda $R26=0.67$ mmol/gKH st 'tır. Bu sonuç, oksijen kısıtlamasına benzer olarak karbon kısıtlamalı ortamda da laktat sentez tepkimesi enzim derişiminin/aktivitesinin arttığını göstermektedir. FB1 koşulunda kesikli işletim koşuluna benzer, asetat (Ac) sentez tepkimesi aktiftir ($R28=0.75$ mmol/gKH st). β -laktamaz sentez akısı, yarı kesikli işletimde (FB1), kesikli işletimden %5 daha yüksek bulunmuştur. Evre II'de glukoliz yolizi akılar kesikli işletimde 2-kat fazla olmasına rağmen β -laktamaz sentez akısı (0.0012 mmol/gKH st) FB1 koşulunda kesikli işleme kıyasla 5-kat daha yüksek bulunmuştur. Ancak FB1'de asetat ve laktat üretim akıları kesikli işleme kıyasla 6 kat daha aktiftir. Bu sonuçlar β -laktamaz sentez evresinde glukoliz yolizinin çok aktif olmaması gerektiğini göstermektedir. Evre III'de glukoliz yolizi akılarının artması ile birlikte β -laktamaz sentez akısı (2.8×10^{-4} mmol/gKH st) düşmüştür.

Çizelge 13. Hücredeki amino asitler denişimlerinin besleme stratejisi ile değişimi

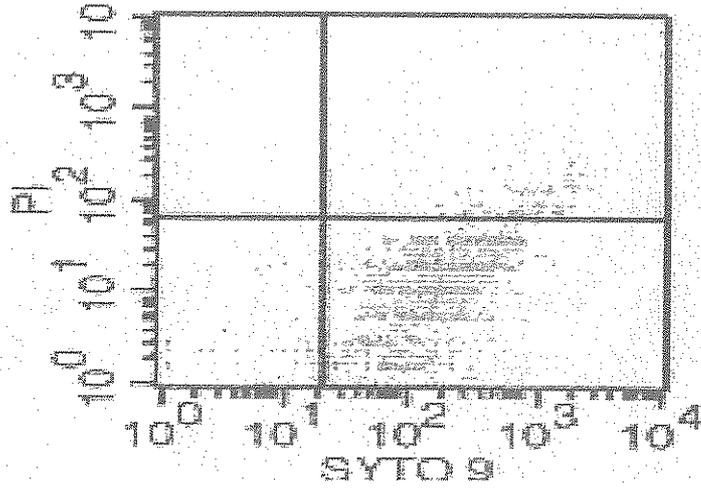
	İşletim Koşulu											
	Kesikli işletim			Kesikli işletim Fosfat ile zenginleştirilmiş ortam			FBO1			FBO2		
	CAA; kg m ⁻³			CAA; kg m ⁻³			CAA; kg m ⁻³			CAA; kg m ⁻³		
GP	PP		GP	PP		GP	PP		GP	PP		
Asn	0.020-0.141	0.023-0.098	0.052-0.079	0.034-0.071		0.009-0.046	0.009-0.023		0.014-0.056	0.046-0.074		
Asp	0.109-0.109	-	-	-		-	-		-	-		
Arg	0.084-0.110	-	-	-		-	-		-	-		
Ala	0.010-0.010	-	-	0.006-0.007		0.003-0.003	-		0.004-0.007	-		
His	-	0.022-0.027	0.003-0.003	0.002-0.004		0.005-0.005	0.003-0.010		0.002-0.006	-		
Pro	0.007-0.007	-	0.003-0.004	-		0.002-0.003	0.002-0.004		-	0.003-0.004		
Val	-	0.015-0.020	0.005-0.010	0.007-0.010		0.020-0.031	0.017-0.021		0.013-0.018	0.012-0.020		
Tyr	-	-	0.009-0.018	0.011-0.017		0.008-0.020	0.009-0.017		0.010-0.015	0.017-0.028		
Met	0.304-0.373	-	0.003-0.008	0.002-0.005		0.003-0.006	0.002-0.003		0.002-0.007	0.002-0.002		
Cys	-	-	0.001-0.002	0.001-0.003		0.002-0.003	0.001-0.006		-	0.002-0.006		
Lue	-	-	-	-		-	-		-	-		
Lys	0.008-0.015	-	0.006-0.012	0.004-0.010		0.006-0.008	-		0.002-0.012	-		
Phe	0.005-0.013	0.004-0.006	0.015-0.016	0.012-0.065		0.011-0.078	0.006-0.008		0.009-0.021	0.011-0.015		
Orn	0.004-0.017	0.003-0.008	0.010-0.010	0.002-0.006		-	-		-	-		
Trp	0.005-0.013	0.004-0.006	0.017-0.017	-		-	0.008-0.008		0.011-0.011	-		
Thr	-	-	-	-		0.001-0.003	0.001-0.001		0.003-0.023	0.019-0.019		
Gln	-	-	-	-		-	-		-	-		
Ile	-	-	-	-		-	-		-	-		
Ser	-	-	-	-		-	-		-	-		
Glu	-	-	-	-		0.004-0.008	0.003-0.005		0.006-0.006	-		
Gly	-	-	-	-		-	-		0.006-0.006	-		

Çizelge 14. Hücre dışı organik asitler derişimlerinin besleme stratejisi ile değişimi

İşletim Koşulu		C _{org} = C _{CO₂} (kg m ⁻³)												
		Ac	Cit	Form	Fum	aKG	Lac	Mal	Ox	OA	Pyr	Suc		
Kesikli işletim	GP	0.058-0.147	0.020-0.091	-	0.001-0.002	0.002-0.046	0.012-0.281	0.001-0.001	0.002-0.005	-	0.001-0.002	0.092-0.092		
	PP	0.061-0.148	0.013-0.014	0.006-0.012	0.003-0.006	0.093-0.127	0.543-0.740	0.001-0.001	0.004-0.005	-	0.001-0.001	0.901-0.987		
Kesikli işletim Fosfat ile zenginleştirilmiş ortam	GP	0.048-0.191	0.019-0.113	-	0.001-0.002	0.002-0.056	0.010-0.339	0.001-0.002	0.001-0.002	-	0.002-0.002	-		
	PP	0.152-0.312	-	0.009-0.041	0.001-0.002	0.061-0.115	0.355-0.642	0.001-0.002	0.003-0.004	-	0.003-0.005	0.026-0.140		
FBO1	GP	0.047-0.129	0.098-0.098	0.003-0.003	0.001-0.001	0.001-0.022	0.009-0.133	0.001-0.001	-	-	0.001-0.002	-		
	PP	0.152-0.406	0.097-0.097	0.006-0.039	0.001-0.003	0.059-0.150	0.342-0.843	0.001-0.003	0.003-0.007	-	0.001-0.013	0.022-0.188		
FBO2	GP	0.067-0.148	0.102-0.132	-	0.001-0.002	0.002-0.051	0.011-0.307	0.001-0.001	0.002-0.003	-	0.001-0.002	-		
	PP	0.182-0.439	0.077-0.077	0.007-0.048	0.001-0.003	0.084-0.165	0.488-0.945	0.001-0.003	0.004-0.006	-	0.001-0.007	0.027-0.027		

Çizelge 15. İşletim modu ve zamanla hücre canlılığının değişimi

İşletim Koşulu	t (st)	Canlılık (%)
Kesikli işletim (Fosfat ile zenginleştirilmiş ortam)	4	99
	8	99
	14	98
FBO1	4	99
	8	99
	12	99
	18	92



Şekil 20. Üstel-artışla yarı-kesikli işletimde t=18 st *B.licheniformis* canlılığı

3. TARTIŞMA ve SONUÇLAR

TÜBİTAK MİSAG-258 araştırma projesi kapsamında yapılan bu çalışma β -laktamaz üretimi için metabolik ve reaksiyon mühendisliği prensip ve teknikleri kullanılarak verim ve seçimliliğin artırılması için *Bacillus* türlerinin üretim potansiyellerinin karşılaştırılmalarını ve tanımlanmış ortam tasarımı ve bu ortamda oksijen aktarım koşullarının incelenmesiyle, oksijen aktarım koşullarının metabolik kaymalarına etkisini ve besleme stratejisinin üretim ve hücre içi tepkime yozizlerine etkisini gösteren sistematik araştırmaları içermektedir.

Laboratuvar ölçekli biyoreaktörlerde β -laktamaz üretimi araştırmaları kapsamında β -laktamaz üretim potansiyeli yüksek *Bacillus licheniformis* 749/C kullanılmıştır. İlk aşamada maya özütü ve glukoz içeren yarı tanımlanmış üretim ortamı yapılmış ve yüksek β -laktamaz aktivitesi $t=32$ st'te $A=210$ U cm^{-3} olarak bulunmuştur. β -laktamaz enziminin kullanım alanının son yıllarda antijen yönlendirmeli enzim-ilaç terapi ilaçları olduğu dikkate alınmış ve ilaç tasarımında kullanılan β -laktamaz enziminin %99.9 saf olması gerektiği ve üretim ortamı karmaşıklaştıkça saflaştırma maliyetleri arttığı için yarı-tanımlanmış üretim ortam tasarımına ek olarak tanımlanmış üretim ortam tasarımı yapılmıştır. En yüksek β -laktamaz aktivitesine ulaşıldığı belirlenen glukoz temelli ortam ile; karıştırma hızı, sıcaklık, pH, çözünmüş oksijen derişimi ve köpük kontrollu, oksijene göre sürekli diğer girdilere göre kesikli 3.0 dm³ hacimli pilot ölçek biyoreaktör sistemlerinde oksijen aktarımının β -laktamaz üretimine etkisi incelenmiş; en yüksek aktivite $Q_o/V=0.5$ vvm, $N=500$ dk⁻¹ $\text{pH}_{UC}=7.5$ koşullarında $t=27$ st'te $A=90$ U cm^{-3} olarak bulunmuştur. β -laktamaz birincisi $t=0-10$ st ikincisi $t=20-28$ st olmak üzere iki evrede üretilmiştir. Birinci evreyi uzatmak için besleme stratejisi araştırılmıştır. Ancak yarı-kesikli işletimde pH'da önemli değişimler olacağı için önce pH kontrol etkisi araştırılmış, en uygun pH işletim koşulu $\text{pH}_c=6.75$ olarak bulunmuştur. Bulunan en uygun pH işletim koşulunda, üstel-besleme stratejisi ile $t=16$ st'te en yüksek aktivite $A=106$ U cm^{-3} olarak elde edilmiştir.

KAYNAKLAR

- Alderson, R.F., Toki, B.E., Roberge, M., Geng W, Basler, J., Chin, R., Liu, A., Ueda, R., Hodges, D., Escandon, E., Chen, T., Kanavarioti, T., Babe, L., Senter, P.D., Fox, J.A., Schellenberger, V., (2006). Characterization of a CC49-based single-chain fragment-beta-lactamase fusion protein for antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT). *Bioconjug Chem*, 17(2), 410-8.
- Boyacı I. H. 2005. A new approach for determination of enzyme kinetic constants using response surface methodology; *Biochemical Engineering Journal*, 25 (1), 55-62.
- Bandyopadhyay, B., and Humprey, A.E., 1967. Dynamic Measurement of the Volumetric Oxygen Transfer Coefficient in Fermentation Systems, *Biotechnology and Bioengineering*, 9: 533-544.
- Bounaga, S., Laws, A.P., Galleni, M., Page, M.I. 1998. The Mechanism of Catalysis and the Inhibition of the *Bacillus cereus* Zinc-dependent beta-Lactamase. *Biochem J.*, 331, 703-11.
- Carfi, A., Duee, E., Galleni, M., Frere, J.M., Dideberg, O. 1998. 1.85 Å Resolution Structure of the Zinc (II) beta-Lactamase from *Bacillus cereus*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.*, 54, 313-23.
- Citri, N., Kalkstein, A. 1967. Purification and Properties of the gamma-Type beta-Lactamase of *Bacillus cereus*. *Arch Biochem Biophys.*, 121, 720-8.
- Collins, J.R., 1979. The *Bacillus licheniformis* β -Lactamase System, In: Hamilton-Miller M.T. and Smith J.T. (ed.), *Beta-Lactamases*, Academic Press, Inc., (London), Ltd., London.
- Connolly, A.K., Waley, S.G. 1983. Characterization of the Membrane Beta-Lactamase in *Bacillus cereus* 569/H/9. *Biochemistry*, 22, 4647-51.
- Çalık P., Arifoğlu, M., Çalık, G., 2005. Oxygen transfer effects in beta-lactamase production by *Bacillus licheniformis* in a glucose based defined medium. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 80(9), 1062-1071.
- Çalık, P., Çalık, G., Özdamar, H. T. 1998. Oxygen Transfer Effect in Serine Alkaline Protease Fermentation by *Bacillus licheniformis*: Use of Citric Acid as the Carbon Source. *Enzyme and Microbial Technology.*, 23, 451-461.
- Çalık and Özdamar. 1999. Mass Flux Balance-based Model and Metabolic Pathway Engineering Analysis for Serine Alkaline Protease Synthesis by *Bacillus licheniformis*. *Enzyme and Microbial Technology.*, 24, 621-635.
- Çalık, P., Çalık, G., Takaç, S., Özdamar, H. T. 1999. 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.
- Çalık, P., Çalık, G., Özdamar, H. T. 2000. Oxygen Transfer Strategy and Its Regulation Effects in Serine Alkaline Protease Production by *Bacillus licheniformis*. *Biotechnol. Bioeng.*, 69, 301-311.
- Çalık, P., Tomlin, G., Oliver, S.G., and Özdamar, T.H., *incelemede*: 2002. Overexpression of Serine Alkaline Protease in *Bacillus licheniformis* and its Impact on the Metabolic Reaction Network, *Enzyme and Microbial Technology*.
- Çelik, E., and Çalık P., 2004. Bioprocess and oxygen transfer characteristics in beta-lactamase production by *Bacillus species*. *Biotechnology Progress*, 20(2), 491-499.

- Hakimelahi, G.H., Moosavi-Movahedi, A.A., Saboury, A.A., Osetrov, V., Khodarahmi, G.A., Shia, K.S. (2005). Carbapenem-based prodrugs. Design, synthesis, and biological evaluation of carbapenems. *Eur J Med Chem.* 40(4), 339-49.
- Harding, F.A., Liu, A.D., Stickler, M., Razo, O.J., Chin, R., Faravashi, N., Viola, W., Graycar, T., Yeung, V.P., Aehle, W., Meijer, D., Wong, S., Rashid, M.H., Valdes, A.M., Schellenberger, V. (2005). A beta-lactamase with reduced immunogenicity for the targeted delivery of chemotherapeutics using antibody-directed enzyme prodrug therapy. *Mol Cancer Ther.* 4(11), 1791-800.
- Hemilä, H., Pokkinen, M., Palva, I. 1992. Improving the Production of E. Coli beta-Lactamase in *Bacillus subtilis*: The Effect of Glucose, Ph and Temperature on the Production Level. *J. Biotechnol.*, 26, 245-56.
- İleri, N., Çalık P., 2006. Effects of pH strategy on endo- and exo- metabolome profiles and sodium potassium hydrogen ports of beta-lactamase producing *Bacillus licheniformis*. *Biotechnology Progress*, 22(2). 411-419.
- İleri, N., Çalık P., Şengül A., 2007. Phosphate enrichment and fed-batch operation for prolonged β -lactamase production by *Bacillus licheniformis*. *Journal of Applied Microbiology*. Published article online: 27-Sep-2006 doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.03163.x
- Kuwabara, S. 1970. Purification and Properties of Two Extracellular beta-Lactamases from *Bacillus cereus* 569-H. *Biochem J.*, 118, 457-65.
- Kuwabara, S., Adams, E.P., Abraham, E.P. 1970. The Composition of beta-Lactamase I and beta-Lactamase II from *Bacillus cereus* 569-H. *Biochem J.*, 118, 475-80.
- Matagne, A., Misselyn-Bauduin, A.M., Joris, B., Ercicum, T., Granier, B., Frere, J.M., 1990. The Diversity of the Catalytic Properties of Class A beta-lactamses, *Biochem J.*265, 131-146.
- McDonagh, C.F., Beam, K.S., Wu, G.J., Chen, J.H., Chace, D.F., Senter, P.D., Francisco, J.A. (2003). Improved yield and stability of L49-sFv-beta-lactamase, a single-chain antibody fusion protein for anticancer prodrug activation, by protein engineering. *Bioconjug Chem.*, 14(5), 860-869.
- Pollock M.R., 1965. Purification and Properties of Penicillinases from Two Strains of *Bacillus licheniformis*: a Chemical, Physicochemical and Physiological Comparison, *Biochemical Journal*, 94, 666-675.
- Rainer; B.W. Determination methods of the volumetric oxygen transfer K_La in bioreactors; *Chem Biochem. Eng* 1990, 4, 185-196.
- Nielsen, J.B., Lampen, J.O. 1983. Beta-Lactamase III of *Bacillus cereus* 569: Membrane Lipoprotein and Secreted Protein. *Biochemistry*, 22, 4652-6.
- Sargantanis, I.G., Karim, M.N. 1996. Effect of Oxygen Limitation on beta-Lactamase Production. *Biotechnol. Prog.*, 12, 786-92.
- Sargantanis, I.G., Karim, M.N. 1998. Adaptive Pole Placement Control Algorithm for DO-Control in beta-Lactamase Production. *Biotechnol. Bioeng.*, 60, 1-9.
- West, S., 1996. Chemical Transformations. In: *Industrial Enzymology*, Godfrey, T., and West, S. (Ed.), Macmillan Press Ltd. V.2.8, p157-158.

Ek-1 *Bacillus licheniformis*'in yolizi tepkimeleri

Glikoliz ve Glukoneoensiz Yolizi

1. $\text{Glc} + \text{PEP} \rightarrow \text{G6P} + \text{Pyr}$
2. $\text{Frc} + \text{PEP} \rightarrow \text{F6P} + \text{Pyr}$
3. $\text{G6P} \rightarrow \text{F6P}$
4. $\text{F6P} \rightarrow \text{G6P}$
5. $\text{F6P} + \text{ATP} \rightarrow 2 \text{T3P} + \text{ADP}$
6. $2 \text{T3P} \rightarrow \text{F6P} + \text{Pi}$
7. $\text{T3P} + \text{ADP} + \text{Pi} \rightarrow \text{PG3} + \text{ATP} + \text{NADH}$
8. $\text{PG3} + \text{ATP} + \text{NADH} \rightarrow \text{T3P} + \text{ADP} + \text{Pi}$
9. $\text{PG3} \rightarrow \text{PEP}$
10. $\text{PEP} \rightarrow \text{PG3}$
11. $\text{PEP} + \text{ADP} \rightarrow \text{Pyr} + \text{ATP}$
12. $\text{Pyr} + 2 \text{ATP} \rightarrow \text{PEP} + 2 \text{ADP}$
13. $\text{Pyr} \rightarrow \text{AcCoA} + \text{CO}_2 + \text{NADH}$

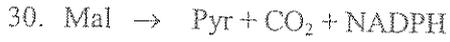
Pentoz Fosfat Yolizi

14. $\text{G6P} \rightarrow \text{Gluc6P} + \text{NADPH}$
15. $\text{Gluc6P} \rightarrow \text{R5P} + \text{CO}_2 + \text{NADPH}$
16. $\text{R5P} \rightarrow \text{Xyl5P}$
17. $\text{Xyl5P} \rightarrow \text{R5P}$
18. $\text{R5P} \rightarrow \text{Rib5P}$
19. $\text{Rib5P} \rightarrow \text{R5P}$
20. $\text{Xyl5P} + \text{Rib5P} \rightarrow \text{S7P} + \text{T3P}$
21. $\text{S7P} + \text{T3P} \rightarrow \text{Xyl5P} + \text{Rib5P}$
22. $\text{Xyl5P} + \text{E4P} \rightarrow \text{F6P} + \text{T3P}$
23. $\text{F6P} + \text{T3P} \rightarrow \text{Xyl5P} + \text{E4P}$
24. $\text{T3P} + \text{S7P} \rightarrow \text{F6P} + \text{E4P}$
25. $\text{F6P} + \text{E4P} \rightarrow \text{T3P} + \text{S7P}$

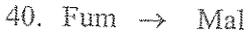
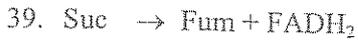
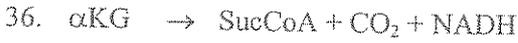
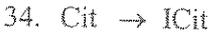
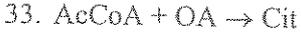
Glikoliz yolizinden ayırulan tepkimeler

26. $\text{Pyr} + \text{NADH} \rightarrow \text{Lac}$
27. $\text{Lac} \rightarrow \text{Pyr} + \text{NADH}$
28. $\text{AcCoA} + \text{ADP} + \text{Pi} \rightarrow \text{Ac} + \text{ATP}$
29. $\text{Ac} + \text{ATP} \rightarrow \text{AcCoA} + \text{ADP} + \text{Pi}$

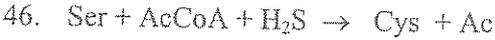
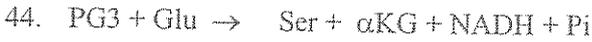
Anapleoritik Tepkimeler



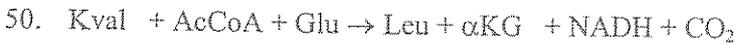
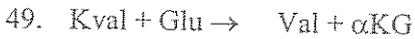
TCA Döngüsü



Serin Grubu Amino Asitlerin Biyosentezi



Alanin Grubu Amino Asitlerin Biyosentezi



Histidin Biyosentezi



Aspartik Asit Grubu Amino Asitlerin Biyosentezi



58. Tet + AcCoA + Glu \rightarrow Ac + α KG + mDAP
 59. mDAP \rightarrow Lys + CO₂
 60. AspSa + NADPH \rightarrow HSer
 61. HSer + ATP \rightarrow Thr + ADP + Pi
 62. Thr + Pyr + NADPH + Glu \rightarrow Ile + α KG + NH₃ + CO₂
 63. AcCoA + Cys + HSer + H₂S + MTHF \rightarrow Met + Pyr + 2 Ac + NH₃ + THF

Aromatik Amino Asitlerin Biyosentezi

64. 2 PEP + E4P + ATP + NADPH \rightarrow Chor + ADP + 4 Pi
 65. Chor + Glu \rightarrow Phe + α KG + CO₂
 66. Chor + Glu \rightarrow Tyr + α KG + NADH + CO₂
 67. Chor + NH₃ + PRPP \rightarrow Pyr + IGP + CO₂ + PPI
 68. IGP + Ser \rightarrow Trp + T3P

Glutamik Asit Grubu Amino Asitlerin Biyosentezi

69. α KG + NH₃ + NADPH \rightarrow Glu
 70. Glu + ATP + NH₃ \rightarrow Gln + ADP + Pi
 71. Glu + ATP + 2 NADPH \rightarrow Pro + ADP + Pi
 72. 2 Glu + AcCoA + ATP + NADPH \rightarrow Orn + α KG + Ac + ADP + Pi
 73. Orn + CaP \rightarrow Citr + Pi
 74. Citr + Asp + ATP \rightarrow Arg + Fum + AMP + PPI

Amino Asitlerin Katabolizması

75. α KG + Ala \rightarrow Pyr + Glu
 76. Arg + α KG \rightarrow 2 Glu + NH₃ + NADPH + CO₂
 77. Asn \rightarrow Asp + NH₃
 78. Asp \rightarrow Fum + NH₃
 79. Cys \rightarrow Pyr + NH₃ + H₂S
 80. Gln + α KG + NADPH \rightarrow 2Glu
 81. Gly + MetTHF \rightarrow Ser + THF
 82. His + THF \rightarrow Glu + MeTHF
 83. Ile + α KG \rightarrow Glu + FADH₂ + 2 NADH + CO₂ + SucCoA + AcCoA
 84. Leu + α KG + ATP \rightarrow Glu + FADH₂ + NADH + 2 AcCoA + ADP + Pi
 85. Phe \rightarrow Tyr + NADPH
 86. Pro \rightarrow Glu + NADPH
 87. Ser \rightarrow Pyr + NH₃
 88. Thr \rightarrow Gly + NADH + AcCoA

89. Trp + NADPH → AcCoA + Ala
 90. Tyr + αKG + SucCoA → Glu + Fum + AcCoA + Succ + CO₂
 91. Val + αKG → Glu + FADH₂ + 3 NADH + 2CO₂ + SucCoA

Nükleotillerin Biyosentezi

92. PRPP + 2 Gln + Asp + CO₂ + Gly + 4 ATP + F10THF →
 2 Glu + PPi + 4 ADP + 4 Pi + THF + PRAIC + Fum
 93. PRAIC + F10THF → IMP + THF
 94. IMP + Gln + ATP → NADH + GMP + Glu + AMP + PPi
 95. GMP + ATP → GDP + ADP
 96. ATP + GDP → ADP + GTP
 97. GTP + ADP → ATP + GDP
 98. NADPH + ATP → dATP
 99. NADPH + GDP + ATP → ADP + dGTP
 100. IMP + GTP + Asp → GDP + Pi + Fum + AMP
 101. AMP + ATP → 2 ADP
 102. PRPP + Asp + CaP → UMP + NADH + PPi + Pi + CO₂
 103. UMP + ATP → UDP + ADP
 104. UDP + ATP → ADP + UTP
 105. UTP + NH₃ + ATP → CTP + ADP + Pi
 106. ATP + NADPH + CDP → dCTP + ADP
 107. CDP + ATP → CTP + ADP
 108. CTP + ADP → CDP + ATP
 109. UDP + MetTHF + 2 ATP + NADPH → dTTP + DHF + 2 ADP + PPi

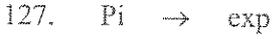
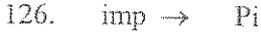
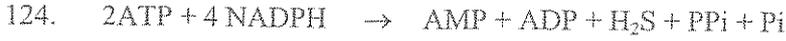
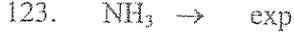
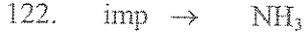
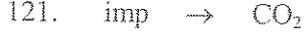
Kofaktörlerin Biyosentezi

110. DHF + NADPH → THF
 111. MetTHF + CO₂ + NH₃ + NADH → Gly + THF
 112. MetTHF + NADPH → MTHF
 113. MetTHF → MeTHF + NADPH
 114. MeTHF → F10THF
 115. Gly + THF → MetTHF + NH₃ + NADH + CO₂
 116. NADH → NADPH
 117. NADPH → NADH

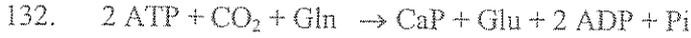
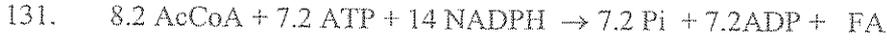
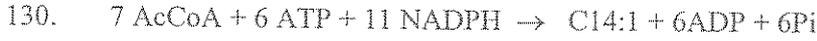
Elektron Taşınım Sistemi



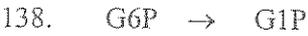
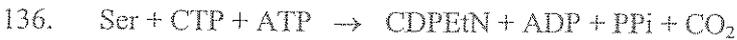
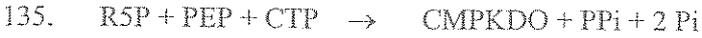
Taşınım Tepkimeleri



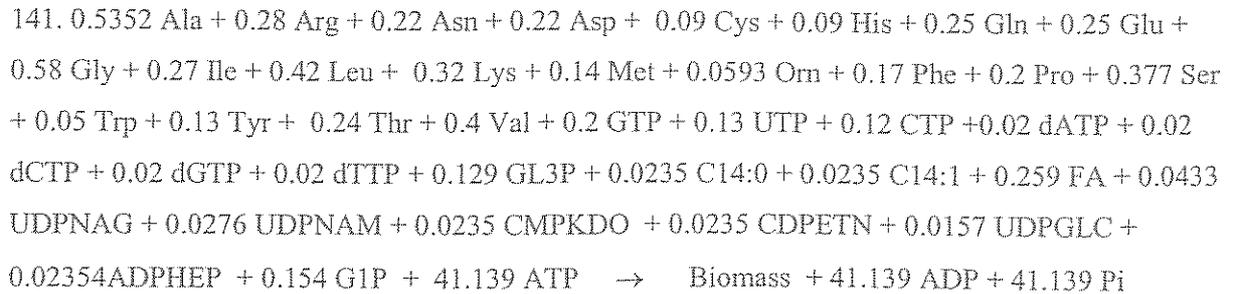
Yağ Asitlerinin ve Fosfolipidlerin Biyosentezi



Biyokütle Bileşenleri



Hücre sentezi



β -lactamase Synthesis

142. 24 Ala + 14 Arg + 13 Asn + 23 Asp + 8 Gln + 21 Glu + 16 Gly + 1 His + 14 Ile + 27 Leu + 24 Lys + 4
Met + 7 Phe + 11 Pro + 11 Ser + 23 Thr + 3 Trp + 6 Tyr + 15 Val + 5.5 ATP \rightarrow β -lactamase + 5.5 ADP + 5.5 Pi

143. ATP \rightarrow ADP + Pi

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-adenindinükleotid
Citr	Sitrulin	NADPH	Nikotinamid-adenindinükleotid fosfat
Chor	Korisimat	NH ₃	Amonyak
CMP	Sitidin 5'-monofosfat	OA	Okzaloasetat
CMPKDO	CMP-3-deoksi-D-mannooktulosonik 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-karboksiamid-5-aminoimidazol
DC	L,2,3 dihidrodipicolinate		L-Prolin
DHF	7.8-Dihidrofolat	Pro	5-Fosfat-D-ribozilpirofosfat
E4P	Eritiroz 4-fosfat	PRPP	Pürivat
F10THF	N ¹⁰ -Formil-THF		Ribüloz 5-fosfat
F6P	Fruktoz 6-fosfat	Pyr	Riboz 5-fosfat
FA	Yağ asitleri	R5P	Serine alkaline protease
FADH	Flavinadenindinükleotit	Rib5P	Sedoheptuloz-7-fosfat
Frc	Fruktoz	SAP	L-Serin
Fum	Fumarat	S7P	Süksinat
G1P	Glukoz 1-fosfat	Ser	Süksinat koenzim A
G6P	Glukoz 6-fosfat	Suc	Ksiloz 5-fosfat
GDP	Guanozine 5'-difosfat	SucCoA	Trikarboksilik asit döngüsü
GL3P	Gliserol 5-fosfat	Xyl5P	L,2,3,4,5
Glc	Glukoz	TCA	Tetrahidrodipikolinat
Gln	L-Glutamin	Tet	Tiroz 3-fosfat
Glu	L-Glutamat	T3P	Tetrahidrofolat
Gluc	Glukonat	THF	L-Treonin
Gluc6P	Glukonat 6-fosfat	Thr	L-Triptophan
Glx	Glyoxlate	Trp	L-Tirozin
Gly	L-Glisin	Tyr	
GMP	Guanozin 5'-monofosfat		
GTP	Guanozin 5'-trifosfat		

H₂S
His
Hser
ICit

Hidrojen sulfid
L-Histidin
Homoserin
İzositrat

UDP
UDPGlc
UDPNAG

UDPNAM

UMP
UTP
Val

Uridin 5'-difosfat
UDP-glukoz
UDP-N-Acetil-
glucozamine
UDP-N-Acetil-muramik
asit
Uridin 5'-monofosfat
Uridin 5'-trifosfat
L-Valine

PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Kodu: MİSAG258 1034037
Proje Başlığı: Beta-laktamaz Enzim Üretimi için Endüstriyel Biyoteknolojik Proses Geliştirilmesi
Proje Yürütücüsü ve Yardımcı Araştırmacılar: Prof.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 2003 – Aralık 2005
Öz (en çok 70 kelime): Beş alt-araştırma programından oluşan projenin birinci evresinde β -laktamaz üretim potansiyeli yüksek mikroorganizma seçimi yapılmıştır. İkinci alt-araştırma programda seçilen <i>Bacillus licheniformis</i> 749/C için ortam tasarlanmıştır; üçüncü alt program ile oksijen aktarımının β -laktamaz üretimi üzerine etkisi araştırılmış; dördüncü alt-araştırma program ile metabolik yoluzi mühendisliği (MYM) analizi ile hücreiçi tepkimeler stokiometrik denklemleriyle birlikte araştırılarak 143 tepkimeden oluşan tepkime yoluzleri belirlenmiş, 143 tepkimede yer alan 105 bileşik için kütle korunum denklemlerinden oluşan matematik model kurulmuş, ve oksijen aktarımının hücreiçi tepkime hızlarına etkisi araştırılmıştır. Beşinci alt-araştırma programında pH kontrollunun ve substrat besleme stratejisinin β -laktamaz üretime üzerine etkisi araştırılmıştır.
Anahtar Kelimeler: Beta-laktamaz, <i>Bacillus</i> , oksijen aktarımı, pH, hücreiçi tepkime hızları, besleme stratejisi.
Projeden Kaynaklanan Yayınlar: Çelik, E., and Çalık P., 2004. Bioprocess and oxygen transfer characteristics in beta-lactamase production by <i>Bacillus species</i> . Biotechnology Progress , 20(2), 491-499. Çalık P., Arifoğlu, M., Çalık, G., 2005. Oxygen transfer effects in beta-lactamase production by <i>Bacillus licheniformis</i> in a glucose based defined medium. Journal of Chemical Technology and Biotechnology , 80(9), 1062-1071. İleri, N., Çalık P., 2006. Effects of pH strategy on endo- and exo- metabolome profiles and sodium potassium hydrogen ports of beta-lactamase producing <i>Bacillus licheniformis</i> . Biotechnology Progress , 22(2). 411-419. İleri, N., Çalık P., 2007. Phosphate enrichment and fed-batch operation for prolonged beta-lactamase production by <i>Bacillus licheniformis</i> . Journal of Applied Microbiology . 27-Eylül-2006 doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.03163.x
Bilim Dalı: Kimya Mühendisliği Doçentlik Bilim Dalı Kodu: 912