

T.C
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



***PICHIA PASTORIS* GAP PROMOTORU ALTINDA HÜCRE DIŞI ÜRETİLEN
REKOMBİNANT PROTEİNLER İÇİN YARI-KESİKLİ PROSES
GELİŞTİRİLMESİ**

Semiramis YILMAZ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

KASIM 2018
ANTALYA

T.C
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**PICHIA PASTORIS GAP PROMOTORU ALTINDA HÜCRE DIŞI ÜRETİLEN
REKOMBİNANT PROTEİNLER İÇİN YARI-KESİKLİ PROSES
GELİŞTİRİLMESİ**

Semiramis YILMAZ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

KASIM 2018
ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***PICHIA PASTORIS* GAP PROMOTORU ALTINDA HÜCRE DIŞI ÜRETİLEN
REKOMBİNANT PROTEİNLER İÇİN YARI-KESİKLİ PROSES
GELİŞTİRİLMESİ**

Semiramis YILMAZ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

Bu tez

Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından
FKA-2018-3602 nolu proje ile desteklenmiştir.

KASIM 2018

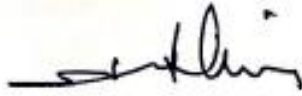
T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***PICHIA PASTORIS GAP PROMOTORU ALTINDA HÜCRE DIŞI ÜRETİLEN
REKOMBİNANT PROTEİNLER İÇİN YARI-KESİKLİ PROSES
GELİŞTİRİLMESİ***

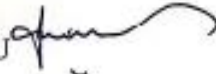
Semiramis YILMAZ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

Bu tez 23/11/2018 tarihinde jüri tarafından Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

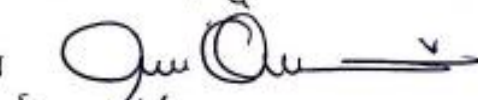
Prof. Dr. Mehmet İNAN (Danışman)



Prof. Dr. F. Yeşim EKİNCİ KADIPAŞAOĞLU



Prof. Dr. Gaye ÖNGEN ÖZGEN



Dr. Öğr. Üyesi Ersin AKINCI



Dr. Öğr. Üyesi Burcu Emine TEFON ÖZTÜRK



ÖZET

PICHIA PASTORIS GAP PROMOTORU ALTINDA HÜCRE DIŞI ÜRETİLEN REKOMBİNANT PROTEİNLER İÇİN YARI-KESİKLİ PROSES GELİŞTİRİLMESİ

Semiramis YILMAZ

Doktora Tezi, Gıda Mühendisliğı Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mehmet İNAN

Kasım 2018; 114 sayfa

Mikroorganizma kaynaklı biyoteknolojik ürünler için en temel operasyon basamağı üretimin gerçekleştirildiğı fermantasyon sürecidir. Fermantasyon, kapalı bir alanda (biyoreaktör) kontrollü bir şekilde gerçekleştirilen hücre gelişimi olarak tanımlanabilir. Biyoreaktör, hücrelerin, çözünmüş oksijen konsantrasyonu (ÇO), pH, redox potansiyeli ve besleme hızı gibi önemli parametrelerin ayarlanabildiğı tanımlı bir gelişim ortamında (medya) aseptik olarak çoğalmasını sağlar. Birçok değışkenin rol oynadığı böyle bir proseste değışkenlerin hepsi ayrı bir şekilde optimizasyonun hedefi olabilir.

Protein üretiminin gerçekleştirildiğı biyoproseslerde genellikle pahalı hammaddeler kullanılır, enerji tüketimi fazladır ve yüksek sermaye yatırımı gerektirir. Bu nedenle üretim sürecinde kaydedilecek en ufak bir gelişme bile toplam üretim maliyetini pozitif yönde etkileyecektir.

Pichia pastoris ekspresyon sisteminin kullanıldığı üretimlerde yüksek hücre yoğunluğu ile çalışıldığından çeşitli teknik kısıtlamalar ile karşılaşmaktadır. Bu kısıtlamaların en önemlisi oksijen transferidir. Rekombinant *P. pastoris* mayasının oksijen kısıtlamasına verdiği tepkilerin sürekli sistemde sistematik analizleri sırasında hipoksik koşulların, spesifik ürün oluşum hızını (q_p) 2,5 kat arttırdığı tespit edilmiştir. Bu tespiti dayanarak geliştirilen yarı-kesikli hipoksik besleme protokolünde substrat beslemesi, oksijen kısıtlamasında hücrenin oksidatif metabolizmadan oksidofermentatif metabolizmaya geçerek glukozdan ürettiğı etanol konsantrasyonuna göre ayarlanır.

Bu tez kapsamında, *P. pastoris* mayasında spesifik gelişim hızının (μ) ve oksijen kısıtlamasının (hipoksia) GAP promotörü altında yapılan hücre dışı protein üretimini ve hücrenin gelişim parametrelerini nasıl etkilediğı araştırılmıştır. Bu amaçla, ksilanaz enzimini hücre dışı üreten *P. pastoris* üretim suşu ile normoksik koşullar altında 4 farklı spesifik gelişme hızında (μ_{max} , $0,8\mu_{max}$, $0,4\mu_{max}$ ve $0,2\mu_{max}$) ve hipoksik koşullar altında 4 farklı etanol konsantrasyonunda (%1, %0,75, %0,5, %0,25 ethanol) glukoz beslemeli yarı-kesikli fermantasyonlar gerçekleştirilmiştir. Normoksik koşullarda yapılan üretimlerde kontrol parametresi olarak spesifik gelişme hızı (μ), hipoksik koşullarda yapılan üretimlerde ise etanol miktarı (%EtOH) seçilmiştir. Üretim boyunca spesifik gelişme hızının belli bir değıerde sabit kalması (sabit- μ stratejisi), substratın ortama hücrelerin belirlenen hızda gelişmesini (üstel gelişim) sağlayacak miktarlarda eklenmesi (üstel besleme stratejisi) ile sağlanmıştır. Hipoksik koşullarda gerçekleştirilen üretimlerde ise besleme hızı besiyeri ortamındaki etanol konsantrasyonunu çevrimiçi

ölçen bir sensör tarafından otomatik olarak ayarlanarak etanol konsantrasyonunun sabit kalması sağlanmıştır. Gerçekleştirilen fermantasyonlarda hücrelerin gelişim, enzim üretim ve substrat tüketimleri ile ilgili spesifik hızları, verimleri ve katsayıları hesaplanmış, karşılaştırmalı analizleri yapılmıştır.

Bu çalışma kapsamında, hipoksik koşulların *GAP* promotörü kontrolünde glukoz beslemeli yarı-kesikli üretimlerde, biyokütle oluşumunu sınırlarken (düşük spesifik gelişim hızı) hücresel verimi, spesifik ürün oluşum hızı ve hacimsel verimlilik değerlerini 2 kat arttırdığı tespit edilmiştir. *P. pastoris* ekspresyon sisteminde *GAP* promotörü altında hipoksik koşullarda yapılan rekombinant protein üretimlerinde biyokütle atığı azalırken üretim verimliliğini artmakta, bununla birlikte saf oksijen beslemesine ihtiyaç olmamakta ve hücre miktarının azalmasından dolayı ısı oluşumu ve soğutma gereksinimi azalmaktadır. Bu özelliklerinden dolayı hipoksik koşullar özellikle endüstriyel rekombinant protein üretimi için çok önemli avantajlara sahiptir. Özetle, hipoksik koşullarda gerçekleştirilen glukoz beslemeli yarı-kesikli üretimin, *GAP* promotörü altında rekombinant üretimi için en verimli olduğu düşünülen standart normoksik stratejilere göre teknik ve ekonomik avantajları olduğu tespit edilmiştir.

ANAHTAR KELİMELE: *GAP* promotörü, Hipoksik üretim, *Pichia pastoris*, Proses mühendisliği, Rekombinant protein, Spesifik gelişim hızı, Üretim kinetiği, Yarı-kesikli fermantasyon

JÜRİ: Prof. Dr. Mehmet İNAN

Prof. Dr. F. Yeşim EKİNCİ KADIPAŞAOĞLU

Prof. Dr. Gaye ÖNGEN ÖZGEN

Dr. Öğr. Üyesi Ersin AKINCI

Dr. Öğr. Üyesi Burcu Emine TEFON ÖZTÜRK

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF A FED-BATCH PROCESS FOR THE PRODUCTION OF RECOMBINANT PROTEINS IN *PICHIA PASTORIS* UNDER GAP PROMOTOR

Semiramis YILMAZ

PhD. Thesis in FOOD ENGINEERING

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet İnan

Kasım 2018, 114 pages

The most basic operation step for biotechnological products originating from microorganisms is the fermentation process where production is carried out. Fermentation can be defined as a controlled development of cell in a closed area (bioreactor). The bioreactor allows the cells to proliferate aseptically in a defined development environment (media) where important parameters such as dissolved oxygen concentration (DO), pH, redox potential and feed rate can be adjusted. In such a process where many variables play a role, all of the variables can be the target of optimization separately.

In bioprocesses where protein production is carried out, expensive raw materials are usually used, energy consumption is high and requires high capital investment. Therefore, even the slightest improvement in the production process will positively affect the total cost of production.

Various technical constraints are encountered in high cell density fermentations especially in *Pichia pastoris* expression system. The most important of these limitations is oxygen transfer. During the systematic analysis of the oxygen limitation response of recombinant *P. pastoris* strain, it has been found that hypoxic conditions increase the specific product formation rate (q_p) by 2.5 fold. In the fed-batch hypoxic feeding protocol that was developed based on this detection, the substrate feed is adjusted according to the ethanol concentration produced by cells from glucose under oxygen limitation.

In this study, the effects of specific growth rate (μ) and oxygen restriction (hypoxia) on growth and production parameters of recombinant *P. pastoris* strain expressing xylanase enzyme under the *GAP* promoter were investigated. For this purpose, the glucose limited fed-batch productions were performed at 4 different specific growth rates (μ_{max} , $0.8\mu_{max}$, $0.4\mu_{max}$ and $0.2\mu_{max}$) under normoxic conditions where %DO value was controlled over %30 with the addition of pure oxygen when necessary. At the same time, hypoxic fed-batch fermentations were carried out where the concentration of ethanol in the culture were kept constant at 4 different values (1.0%, 0.75%, 0.5%, 0.25% v/v) assuming different hypoxia levels were created. In hypoxic fermentations, culture was supplied only with air, %DO was not controlled and allowed to fall to zero. In normoxic fermentations, the specific growth rate remained constant at a certain value (constant- μ strategy) by the addition of the substrate to the medium in a predefined amount (exponential feeding strategy) to allow the cells to develop at the specified rate (exponential growth). For constant-ethanol feeding strategy under hypoxic conditions, the

feed rate is automatically adjusted by a sensor which has a probe immersed in the broth and a control unit connected to the feed pump. The sensor retained the ethanol concentration in the broth around the setpoint by controlling directly the action of feed pump. After performing all fermentations, performance of the processes were evaluated comparatively on the basis of specific rates, yields and coefficients related to cell growth, enzyme production and substrate consumptions.

In the scope of this study, it was found that hypoxic conditions increased the cellular yield (Y_{PX}), specific product formation rate (q_p) and volumetric efficiency (Q_p) of the process by 2 fold while limiting the biomass formation (lowering the specific growth rate) in the glucose-limited fed-batch production under the control of *GAP* promoter. In addition to reducing the biomass waste and increasing the production efficiency, hypoxic conditions, especially for large-scale industrial production, have very important advantages such as the lack of pure oxygen supply to the system during the process, reduced heat generation and reduced cooling requirement due to the decrease in the amount of cells formed. In summary, it was shown in detail that fed-batch production under hypoxic conditions has several technical and economical advantages over the standart normoxic strategies which were most commonly applied and considered to be the most efficient for the recombinant productions under *GAP* promoter.

KEYWORDS: *GAP* promoter, Hypoxic conditions, *Pichia pastoris*, Process engineering, Recombinant protein, Specific growth rate, Production kinetics, Fed-batch fermentation

COMMITTEE: Prof. Dr. Mehmet İNAN
Prof. Dr. F. Yeşim EKİNCİ KADIPAŞAOĞLU
Prof. Dr. Gaye ÖNGEN ÖZGEN
Asst. Prof. Dr. Ersin AKINCI
Asst. Prof. Dr. Burcu Emine TEFON ÖZTÜRK

ÖNSÖZ

Doktora öğrenimim süresince sonsuz bir sabırla ve ilgiyle bilgi ve tecrübelerini paylaşan, araştırmaya olan heyecanını hiç kaybetmeyerek bana en büyük motivasyon kaynağı olan danışmanım Sayın Prof. Dr. Mehmet İnan hocama, verdiği destek ve sağladığı olanaklar için saygılarımı ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez İzleme Kurulunda bulunan Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ersin Akıncı ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Burcu Emine Tefon Öztürk hocalarıma ve diğer tez jüri üyeleri Sayın Prof. Dr. F. Yeşim Ekinci Kadıpaşaoğlu ve Prof. Dr. Gaye Öngen Özgen hocalarıma destekleyici ve yönlendirici katkılarından dolayı çok teşekkür ederim.

Dr. Öğr. Gör. Aysun Özçelik'e, bana projelerinde çalışma imkânı sunduğu için ve ayrıca ilgisi, bilgisi ve dostluğu ile yerle bir olması an meselesi olan motivasyonumu ayakta tuttuğu için ne kadar teşekkür etsem azdır.

Çalışmamın HPLC analizlerini gerçekleştiren Dr. Öğr. Gör. İhsan Burak Çam'a sabrı, ilgisi, arkadaşlığı, keyifli sohbetleri ve ne zaman ne için arasam yardımına koştuğu için minnettarım.

ESA'm Fidan Erden Karaoğlu'na ve çalışma arkadaşlarım Fatma Ersöz Canlı ve Gürkan Yılmaz'a yardımları, destekleri ve en önemlisi dostlukları için teşekkür ederim.

En büyük teşekkürüm ise kocaman bir özürle birlikte tabiki sevgili eşim Abdurrahman ve canlarım Sinan ve Civan'a...

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iv
ÖNSÖZ	vi
AKADEMİK BEYAN	x
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI	3
2.1. Gen Mühendisliği.....	4
2.1.1. Kodon optimizasyonu ve gen kopya sayısı	4
2.1.2. Promotor seçimi ve promotor mühendisliği.....	5
2.1.3. Protein sekresyonu	8
2.2. Biyoproses Mühendisliği	9
2.3. Biyoreaktör İşletim Sistemleri	10
2.4. Fermantasyon Kontrol Stratejileri.....	12
2.4.1. Geribildirim kontrolsüz besleme stratejileri.....	15
2.4.2. Geribildirim kontrollü besleme stratejileri	16
2.5. Spesifik Gelişme Hızının Rekombinant Protein Üretimine Etkisi	18
2.5.1. AOX1 kontrollü proseslerde üretim kinetiği.....	19
2.5.2. GAP promotoru kontrollü proseslerde üretim kinetiği.....	21
2.5.3. GAP ve AOX1 kontrollü proseslerin üretim kinetiği açısından karşılaştırılması	23
2.6. Normoksik ve Hipoksik Koşullarda Rekombinant Protein Üretimi	26
3. MATERYAL ve METOT	30
3.1. Çalışmada Kullanılan Üretim Suşu.....	30
3.2. Hücre Bankasının Hazırlanması	30
3.3. İnokulumun Hazırlanması.....	31
3.4. Biyoreaktör çalışmaları	31
3.4.1. Kesikli faz	34
3.4.2. Yarı-kesikli faz	34
3.4.3. Sabit-μ stratejisi besleme profillerinin hesaplanması.....	35
3.4.4. Sabit-EtOH stratejisi besleme profili	35

3.5. Hücre Konsantrasyonunun Ölçülmesi	36
3.6. SDS-PAGE Analizi.....	36
3.7. Ksilanaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	37
3.8. Toplam Protein Ölçümü.....	38
3.9. Organik Asitlerin Ölçümü.....	38
3.10. Artık Glukoz Konsantrasyonu Ölçümü	38
3.11. Yarı-Kesikli Proses Teori ve Hesaplamaları.....	38
3.11.1. Biyokütle için toplam kütle eşitliği	38
3.11.2. Substrat için toplam kütle eşitliği	39
3.11.3. Ürün için toplam kütle eşitliği.....	40
3.12. Deneysel Verilerden Spesifik Hız ve Verim Katsayılarının Hesaplanması	41
3.12.1. Hücre gelişim kinetiği	42
3.12.2. Substrat tüketim kinetiği	44
3.12.3. Ürün oluşum kinetiği	46
3.12.4. Genel ve anlık verim katsayıları.....	48
3.12.5. Bakım katsayısı (m)	49
3.13. İstatistiksel Analiz.....	49
4. BULGULAR.....	50
4.1. Fizyolojik Parametrelerin Belirlenmesi (μ_{max} ve Y_{XS}).....	52
4.2 Sabit- μ Stratejisi ile Gerçekleştirilen Üretimler.....	53
4.2.1. Sabit- μ stratejisi biyokütle oluşum kinetiği.....	58
4.2.2. Sabit- μ stratejisi substrat tüketim kinetiği	59
4.2.3. Sabit- μ stratejisi ürün oluşum kinetiği	63
4.2.4. Sabit- μ stratejisi hücresel verim (kU/gkha).....	66
4.2.5. Sabit- μ stratejisi hücre dışı toplam protein.....	70
4.3. Sabit-EtOH Stratejisi: Hipoksik Koşullarda Geribildirim Kontrollü Üretim	71
4.3.1. Sabit-EtOH stratejisinde hücre gelişim kinetiği.....	76
4.3.2. Sabit-EtOH stratejisi substrat tüketim kinetiği.....	79
4.3.3. Sabit-EtOH stratejisi ürün oluşum kinetiği (r_p , q_p ve Q_p)	82
4.3.4. Sabit-EtOH stratejisi hücresel verim (kU/gkha)	85
4.3.5. Sabit-EtOH stratejisi hücre ve ürün verimleri.....	86
4.3.6. Sabit-EtOH stratejisi hücre dışı toplam protein	88

5. TARTIŞMA	91
6. SONUÇ	100
7. KAYNAKLAR	102
8. EKLER.....	111
ÖZGEÇMİŞ	



AKADEMİK BEYAN

Doktora Tezi olarak sunduğum “*Pichia pastoris* GAP Promotoru Altında Hücre Dışı Üretilen Rekombinant Proteinler İçin Yarı-kesikli Proses Geliştirilmesi” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak bulunduğunu belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

23/11/2018

Semiramis YILMAZ



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

D	: Dilüsyon oranı [sa^{-1}]
F	: Besleme hızı [g sa^{-1}]
K	: Kilo
kDa	: Kilo dalton
kU	: Kilo ünite
L	: Litre
M	: Molar
m	: Bakım katsayısı [$\text{g g}^{-1} \text{sa}^{-1}$]
μ	: Spesifik gelişme hızı [$\text{g g}^{-1} \text{sa}^{-1}$]
OD	: Optik yoğunluk [Optical Density]
P	: Hacimsel enzim aktivitesi [U/ml]
P_{O_2}	: Hücre içi kısmi oksijen basıncı [kPa]
q_s	: Spesifik substrat tüketim hızı [$\text{g}_{\text{subs}} \text{g}_{\text{kha}}^{-1} \text{sa}^{-1}$]
q_p	: Spesifik üretim hızı [$\text{U g}_{\text{kha}}^{-1} \text{sa}^{-1}$]
Q	: Eklenen toplam substrat miktarı [g]
Q_p	: Hacimsel üretim hızı [$\text{U L}^{-1} \text{sa}^{-1}$]
r_s	: Substrat tüketim hızı [g sa^{-1}]
r_p	: Üretim hızı [U sa^{-1}]
s	: Saniye
sa	: Saat
S	: Reaksiyon ortamındaki substrat konsantrasyonu [g L^{-1}]
t_k	: Kesikli faz süresi [sa]
t	: Yarı-kesikli faz süresi [sa]
t_p	: Proses toplam süresi [sa]
U	: Ünite
V	: Hacim [L]

X_0 : Yarı-kesikli faz başlangıcındaki hücre konsantrasyonu [$g\ L^{-1}$]
 X : Hücre konsantrasyonu [$g\ L^{-1}$]
 Y_{XS} : Substrat biyokütle verimi [$g_{kha}\ g_{subs}^{-1}$]
 Y_{PS} : Substrat ürün verimi [$kU\ g_{subs}^{-1}$]
 Y_{PX} : Hücre ürün verimi [$kU\ g_{kha}^{-1}$]
 ρ : *P. pastoris* maya hücresinin yoğunluğu [$g_{kha}\ L^{-1}$]

Kısaltmalar

AOX1 : Alkol oksidaz
bç : Baz çifti
BMGY : Tamponlanmış kompleks gliserol besiyeri
BSA : Bovine serum albümin
BSM : Temel tuz besiyeri
ÇO : Çözülmüş oksijen
DNA : Deoksiribonükleik asit
DIG : Digoksinin
EtOH : Etanol
GAP : Gliseraldehit 3 fosfat dehidrogenaz
glu : Glukoz
kha : Kuru hücre ağırlığı
LB : Luria-Bertani
PAGE : Poliakrilamid jel elektroforezi
PZR : Polimeraz zincir reaksiyonu
SDS : Sodyum dodesil sülfat
UPR : Katlanmamış protein tepkisi
yha : Yaş hücre ağırlığı
YPD : Maya pepton dekstroza

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. <i>P. pastoris</i> rekombinant protein üretiminin verimini arttırmaya yönelik uygulanan stratejiler	3
Şekil 2.2. Kesikli, yarı-kesikli ve sürekli fermentasyon işletim sistemleri	11
Şekil 2.3. Besleme hızının yarı-kesikli fermentasyon prosesinde etkilediği parametreler	13
Şekil 2.4. (A) Geribildirim kontrolsüz yarı-kesikli proses, (B) Geribildirim kontrollü yarı-kesikli proses.....	14
Şekil 2.5. Yarı-kesikli fermentasyon proseslerinde uygulanan besleme stratejileri	15
Şekil 2.6. Yarı-kesikli fazda uygulanan besleme profillerinin hesaplanması ve spesifik gelişim profilleri	19
Şekil 2.7. <i>GAP</i> kontrolü altındaki farklı proteinlerin spesifik gelişim hızı (μ) ve spesifik üretim hızı (q_p) arasındaki ilişki.....	21
Şekil 2.8. <i>AOX1</i> ve <i>GAP</i> kontrollü ekspresyonların üretim kinetikleri.....	24
Şekil 3.1. Çalışmada gerçekleştirilen yarı-kesikli proseslerin genel hatları.....	32
Şekil 3.2. Çalışmadaki yarı-kesikli fermentasyonların gerçekleştirildiği Biostat B Twin fermentörü genel görünüş	32
Şekil 3.3. Sabit- μ stratejisinin uygulandığı 4 farklı spesifik gelişim hızı (μ) için hesaplanan besleme profilleri.....	35
Şekil 3.4. <i>P. pastoris</i> kültürünün ve hücrelerin çöktürülmesiyle elde edilen süpernatanın hacimlerinin gösterilmesi ve herbirinde yapılan analitik ölçümler	42
Şekil 3.5. Hücre gelişim profilinin matematiksel modellenmesi ve anlık spesifik gelişim hız değerlerinin (μ) gelişim eğrisi denkleminde hesaplanmasının grafik üzerinde gösterilmesi	43
Şekil 3.6. Prosesin ortalama spesifik gelişim hızı (μ_{ort}) zamana karşı çizilen $\ln(XV/X_0V_0)$ ya da $\ln(XV)$ grafiğinin doğrusal eğilim çizgisinin eğiminden elde edilir	44
Şekil 3.7. Substrat tüketim profilinin matematiksel modellenmesi.....	45
Şekil 3.8. Ürün oluşum profilinin matematiksel modellenmesi	47
Şekil 4.1. Çalışmada gerçekleştirilen yarı-kesikli fermentasyonların ve uygulanan besleme stratejilerinin şematik olarak gösterilmesi.....	51

Şekil 4.2. Gliserol Kesikli ve Glukoz Yarı-kesikli fazda glukoz-doygun şartlarda geliştirilen hücrelerin maksimum spesifik gelişim hızının hesaplanması.....	53
Şekil 4.3. Sabit- μ stratejisine göre 0,1 sa ⁻¹ değerinde gerçekleştirilen fermentasyonun (A) çevrimiçi ölçülen verileri, (B) çevrimdışı ölçülen verileri	54
Şekil 4.4. Sabit- μ stratejisine göre 0,08 sa ⁻¹ değerinde gerçekleştirilen fermentasyonun (A) çevrimiçi ölçülen verileri, (B) çevrimdışı ölçülen verileri	55
Şekil 4.5. Sabit- μ stratejisine göre 0,04 sa ⁻¹ değerinde gerçekleştirilen fermentasyonun (A) çevrimiçi ölçülen verileri, (B) çevrimdışı ölçülen verileri	56
Şekil 4.6. Sabit- μ stratejisine göre 0,02 sa ⁻¹ değerinde gerçekleştirilen fermentasyonun (A) çevrimiçi ölçülen verileri, (B) çevrimdışı ölçülen verileri	57
Şekil 4.7. Sabit- μ stratejisine göre gerçekleştirilen yarı-kesikli fermentasyonların biyokütle oluşum profilleri.....	58
Şekil 4.8. Sabit- μ stratejisine göre gerçekleştirilen yarı-kesikli fermentasyonların spesifik gelişim hızı (μ) profilleri	59
Şekil 4.9. Sabit μ besleme stratejisinin 4 farklı değer için uygulandığı üretimlerdeki substrat besleme ve substrat tüketim hızı profilleri	60
Şekil 4.10. Farklı sabit- μ değerlerinde gerçekleştirilen yarı-kesikli proseslerin substrat hücre verimi (Y_{XS}) katsayılarının hesaplanması.....	63
Şekil 4.11. Sabit μ besleme stratejisinin 4 farklı değer için uygulandığı üretimlerdeki toplam enzim aktivitesi (U) ve spesifik ürün oluşum hızı (q_p) profilleri	64
Şekil 4.12. Spesifik gelişim hızı (μ) ile spesifik ürün oluşum hızı (q_p) ve hacimsel verimlilik (Q_p) arasındaki ilişki.....	66
Şekil 4.13. Sabit μ besleme stratejisinin 4 farklı değer için uygulandığı üretimlerdeki hücresel verim (U/g_{kha}) profilleri.....	66
Şekil 4.14. Farklı sabit- μ değerlerinde gerçekleştirilen yarı-kesikli proseslerin hücre ürün verimi (Y_{PX}) katsayılarının hesaplanması.....	67
Şekil 4.15. Farklı sabit- μ değerlerinde gerçekleştirilen yarı-kesikli proseslerin substrat ürün verimi (Y_{PS}) katsayılarının hesaplanması.....	68
Şekil 4.16. Farklı sabit- μ değerlerinde gerçekleştirilen üretimlerin yarı-kesikli proses boyunca alınan süpernatant örneklerinin SDS PAGE görüntüleri.....	71
Şekil 4.17. Etanol konsantrasyonunu %1'de sabit tutacak şekilde hipoksik koşullarda gerçekleştirilen fermentasyon süresince ölçülen (A) çevrimiçi ve (B) çevrimdışı veriler	72

Şekil 4.18. Etanol konsantrasyonunu %0,75'de sabit tutacak şekilde hipoksik koşullarda gerçekleştirilen fermentasyon süresince ölçülen (A) çevrimiçi ve (B) çevrimdışı veriler	73
Şekil 4.19. Etanol konsantrasyonunu %0,5'de sabit tutacak şekilde hipoksik koşullarda gerçekleştirilen fermentasyon süresince ölçülen (A) çevrimiçi ve (B) çevrimdışı veriler	74
Şekil 4.20. Etanol konsantrasyonunu %0,25'de sabit tutacak şekilde hipoksik koşullarda gerçekleştirilen fermentasyon süresince ölçülen (A) çevrimiçi ve (B) çevrimdışı veriler	75
Şekil 4.21. Sabit-EtOH stratejisine göre gerçekleştirilen yarı-kesikli fermentasyonların (A) biyokütle oluşum ve (B) spesifik gelişim hızı (μ) profilleri.....	76
Şekil 4.22. Sabit-EtOH besleme stratejisinin 4 farklı değer için uygulandığı üretimlerdeki substrat besleme profilleri substrat tüketim hızı.....	79
Şekil 4.23. Sabit-EtOH besleme stratejisinin 4 farklı değer için uygulandığı üretimlerdeki toplam enzim aktivitesi ve spesifik ürün oluşum hızı	82
Şekil 4.24. Sabit-EtOH besleme stratejisinin 4 farklı değer için uygulandığı üretimlerdeki hücrel verim (U/g_{kha}) profilleri.....	85
Şekil 4.25. Farklı sabit-EtOH değerlerinde gerçekleştirilen yarı-kesikli proseslerin substrat hücre verimi (Y_{XS}) katsayılarının hesaplanması	86
Şekil 4.26. Farklı sabit-EtOH değerlerinde gerçekleştirilen yarı-kesikli proseslerin hücre ürün verimi (Y_{PX}) katsayılarının hesaplanması	87
Şekil 4.27. Farklı sabit-EtOH değerlerinde gerçekleştirilen yarı-kesikli proseslerin substrat ürün verimi (Y_{PS}) katsayılarının hesaplanması	87
Şekil 4.28. Farklı sabit-EtOH değerlerinde gerçekleştirilen üretimlerin yarı-kesikli proses boyunca alınan süpernatant örneklerinin SDS PAGE görüntüleri	89
Şekil 5.1. Farklı sabit- μ değerlerinde gerçekleştirilen normoksik üretimlerin substrat tüketim hızı (q_S), substrat hücre verimi (Y_{XS}) ve bakım katsayısı (m) profilleri	92
Şekil 5.2. Normoksik ve hipoksik üretimlerde oluşan toplam biyokütle miktarları (XV , g_{kha}) ve substrat hücre verimleri (Y_{XS}).....	93
Şekil 5.3. Normoksik ve hipoksik üretimlerde uygulanan besleme profilleri.....	94
Şekil 5.4. Normoksik ve hipoksik üretimlerin spesifik gelişim hızı kinetikleri.....	94
Şekil 5.5. Normoksik ve hipoksik üretimlerde oluşan toplam ürün miktarı (PV , kU), substrat ürün verimleri (Y_{PS}) ve hücre dışı toplam protein miktarları (mg/L).....	96

Şekil 5.6. Sabit- μ ve sabit-etanol yarı-kesikli üretimlerin spesifik ürün oluşum hızı (q_p) ve hacimsel verimlilik (Q_p) değerlerinin karşılaştırılması 98

Şekil 5.7. Normoksik ve hipoksik yarı-kesikli üretimlerin toplam biyokütle, toplam enzim aktivitesi ve hücre ürün verimi (Y_{PX}) değerlerinin karşılaştırılması 99



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. <i>P. pastoris</i> promotorları, regülasyonları ve ekspresyon seviyeleri	5
Çizelge 2.2. <i>AOX1</i> ve <i>GAP</i> promotoru altında sabit- μ stratejisi ile gerçekleştirilen sürekli ve yarı-kesikli proseslerin üretim kinetiği verileri	25
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan Biostat B (Sartorius Stedim Systems, Almanya) sisteminin biyoreaktör parametreleri.....	31
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan Biostat B (Sartorius Stedim Systems, Almanya) sisteminde proses kontrolünü sağlayan sensörler	33
Çizelge 3.3. Substrat tüketim profili grafiğinden hesaplanan parametreler, tanımları ve hesaplama yöntemleri	46
Çizelge 3.4. Proses değerlendirmesi için ölçümleri ve hesaplamaları yapılan üretim kinetiği parametreleri, tanımları ve hesaplama yöntemleri	47
Çizelge 3.5. Proses verim katsayıları, tanımları ve grafiksel hesaplama yöntemleri	48
Çizelge 4.1. Ksilanaz üretim suşunun glukozda maksimum spesifik gelişim hızının (μ_{max}) hesaplanması.....	53
Çizelge 4.2. Sabit- μ stratejisi uygulanan üretimlerde planlanan ve gerçekleşen μ değerleri, gerçekleşen biyokütle profillerinin üstel regresyon eğri formülleri ve R^2 değerleri	59
Çizelge 4.3. Sabit- μ stratejisinde uygulanan substrat besleme profillerini tanımlayan üçüncü dereceden polinom eğrilerinin denklem (ax^3+bx^2+cx) katsayıları ve R^2 değerleri	61
Çizelge 4.4. Sabit- μ stratejisinde gerçekleştirilen fermentasyonların t (sa), XV (g_{kha}), F (g/sa) ve q_s ($g_{glu} g_{kha}^{-1} sa^{-1}$) değerleri	62
Çizelge 4.5. Toplam enzim aktivitesi profillerinin üçüncü dereceden polinom eğrilerinin denklem (ax^3+bx^2+cx+d) katsayıları ve R^2 değerleri	65
Çizelge 4.6. Farklı sabit- μ değerlerinde gerçekleştirilen yarı-kesikli proseslerin maksimum ve ortalama spesifik ürün oluşum hızları (q_p) ve hacimsel verimlilik (Q_p) değerleri	65
Çizelge 4.7. Sabit- μ stratejisinde gerçekleştirilen fermentasyonların ölçülen ve hesaplanan üretim kinetiği parametreleri	68
Çizelge 4.8. Farklı sabit- μ değerlerinde gerçekleştirilen yarı-kesikli proseslerin ortalama hücre, substrat ve ürün verim değerleri.....	69

Çizelge 4.9. Farklı sabit- μ değerlerinde gerçekleştirilen yarı-kesikli proseslerin hacimsel aktivite (U/ml), hücre dışı toplam protein ($\mu\text{g/ml}$) ve spesifik aktivite (kU/mg) değerleri.....	70
Çizelge 4.10. Sabit-EtOH stratejisi uygulanan üretimlerde gerçekleşen biyokütle profillerinin üçüncü dereceden polinom eğrilerinin denklem (ax^3+bx^2+cx+d) katsayıları ve R^2 değerleri	77
Çizelge 4.11. Sabit-EtOH stratejisinde gerçekleştirilen fermentasyonların t (sa), XV (g_{yha}) ve μ (sa^{-1}) değerleri	78
Çizelge 4.12. Sabit-EtOH stratejisinde gerçekleştirilen fermentasyonların t (sa), Q (g_{glu}), XV (g_{kha}), F (g/sa) ve q_s ($\text{g}_{\text{glu}} \text{g}_{\text{kha}}^{-1} \text{sa}^{-1}$) değerleri	81
Çizelge 4.13. Toplam enzim aktivitesi profillerinin üçüncü dereceden polinom eğrilerinin denklem (ax^3+bx^2+cx+d) katsayıları ve R^2 değerleri	83
Çizelge 4.14. Sabit-EtOH stratejisinde gerçekleştirilen fermentasyonların ölçülen ve hesaplanan üretim kinetiği parametreleri	84
Çizelge 4.15. Farklı sabit-EtOH değerlerinde gerçekleştirilen yarı-kesikli proseslerin ortalama hücre, substrat ve ürün verim değerleri	86
Çizelge 4.16. Farklı sabit-EtOH değerlerinde gerçekleştirilen yarı-kesikli proseslerin hacimsel aktivite (U/ml), hücre dışı toplam protein ($\mu\text{g/ml}$) ve spesifik aktivite (kU/mg) değerleri.....	88
Çizelge 4.17. Sabit- μ ve sabit-EtOH stratejilerinin hücre gelişim ve üretim kinetik parametrelerinin ortalama değerleri	90

1. GİRİŞ

Rekombinant proteinler başta biyoteknoloji, ilaç ve yaşam bilimleri olmak üzere çok geniş kullanım alanına sahip biyolojik ürünlerdir. Rekombinant proteinlere olan talep dünya çapında sürekli artmaktadır. Yaşamsal ve ticari olarak çok büyük bir öneme ve değere sahip olan bu proteinlerin üretim sistemlerinin ekonomik olarak daha verimli hale getirilmesi yönünde çalışmaların artması biyoproses mühendisliğinde birçok ilerlemenin gerçekleşmesine yol açmıştır (Potvin vd. 2012).

Metilotrofik bir maya olan *Pichia pastoris*, 1970'lerde, özellikle endüstriyel enzim sektörü ve biyofarmasötik endüstrisinde kullanılmak üzere geliştirilen başarılı bir ekspresyon platformudur (Cregg 1993). *P. pastoris*, özellikle yabanıl NRRL Y-11430 (ya da CBS7435) (Cregg vd. 1985) suşu *Komagataella phaffii* olarak sınıflandırılmıştır (Kurtzman 2009). Protein ekspresyonunda en çok kullanılan GS115 (*his4*) ve prototrofik X33 suşları bu yabanıl suşlardan türetilmiştir ve ticari olarak dağıtımı Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, ABD) tarafından yapılmaktadır. GRAS (genel olarak güvenli kabul edilir) kategorisinde bulunan *P. pastoris* mayası, 2009 yılı verilerine göre 500'den fazla farmasötik protein ve 1000'den fazla rekombinant proteinin üretiminde kullanılmıştır (Yang ve Zhang 2018). Özellikle, gıda ve yem endüstrisinin artan ihtiyaçları doğrultusunda ksilanaz ve fitaz gibi enzimlerin üretimi için çok önemli bir konukçu organizma durumuna gelmiştir (Spohner vd. 2015). Son yıllarda yapısal biyolojideki ilerlemelerin de kolaylaştırması ile ökaryot membran proteinlerin ekspresyonu için tercih edilmeye başlanmıştır (Gonçalves vd. 2013). *P. pastoris*, ayrıca, yüzey teşhir teknikleri ile birlikte biyoyakıt ve diğer başka kimyasalların sentezinde kullanılmaktadır (Tanaka vd. 2012). Biyoteknoloji alanında 160'dan fazla şirketin *P. pastoris* lisansına sahip olduğu bilinmektedir (Julien 2006).

Pichia sisteminin yaygınlığının artmasındaki nedenler arasında en başta diğer konukçu organizmalara göre çok yüksek hücre konsantrasyonlarına ulaşabilmesi (500-700 g_{yha}/L) gelmektedir. Heyland vd. (2010) glukozun karbon kaynağı olarak kullanıldığı bir çalışmada *P. pastoris*'in kuru hücre ağırlığı olarak 200 g/L (hacimce %66) biyokütle konsantrasyonuna ulaştığını rapor etmişlerdir. Ökaryot ya da prokaryot orijinli proteinleri doğru işlenmiş bir şekilde (disülfid bağları ve glikozilasyon) yüksek miktarlarda hücre içi ya da dışı olarak üretebilmesi de *Pichia* sisteminin en önemli avantajlarından (Yang ve Zhang 2017). Ürün konsantrasyonlarında hücre içi üretimlerde 22 g/L (Hasslacher vd. 1997), hücre dışı üretimlerde ise 18 g/L (Mellitzer vd. 2014) miktarlarına ulaşıldığı rapor edilmiştir. Ayrıca *P. pastoris* genomunun manipulasyonu basittir ve *Pichia* ekspresyon sistemi ticari kit olarak da bulunmaktadır (Invitrogen 2002). *P. pastoris*'te ekspresyonu gerçekleştirilen proteinlerin sinyal peptitler aracılığı ile hücre dışına salgılanmaları mümkün olmakta ve böylelikle fermentasyon sonrası işlemlerde (ürün saflaştırması) önemli ölçüde kolaylık sağlanabilmektedir (Idiris vd. 2010).

Heterolog proteinlerin üretim verimleri önemli ölçüde kullanılan konukçu suşa ve üretilecek olan ürünün özelliklerine bağlı olmakla birlikte kültür koşulları başta olmak üzere birçok faktörden etkilenir. Bu nedenle, yüksek verime sahip bir üretim suşu geliştirebilmek için hem genetik hem proses mühendisliği yaklaşımlarını içeren farklı stratejilerin uygulanması gerekir.

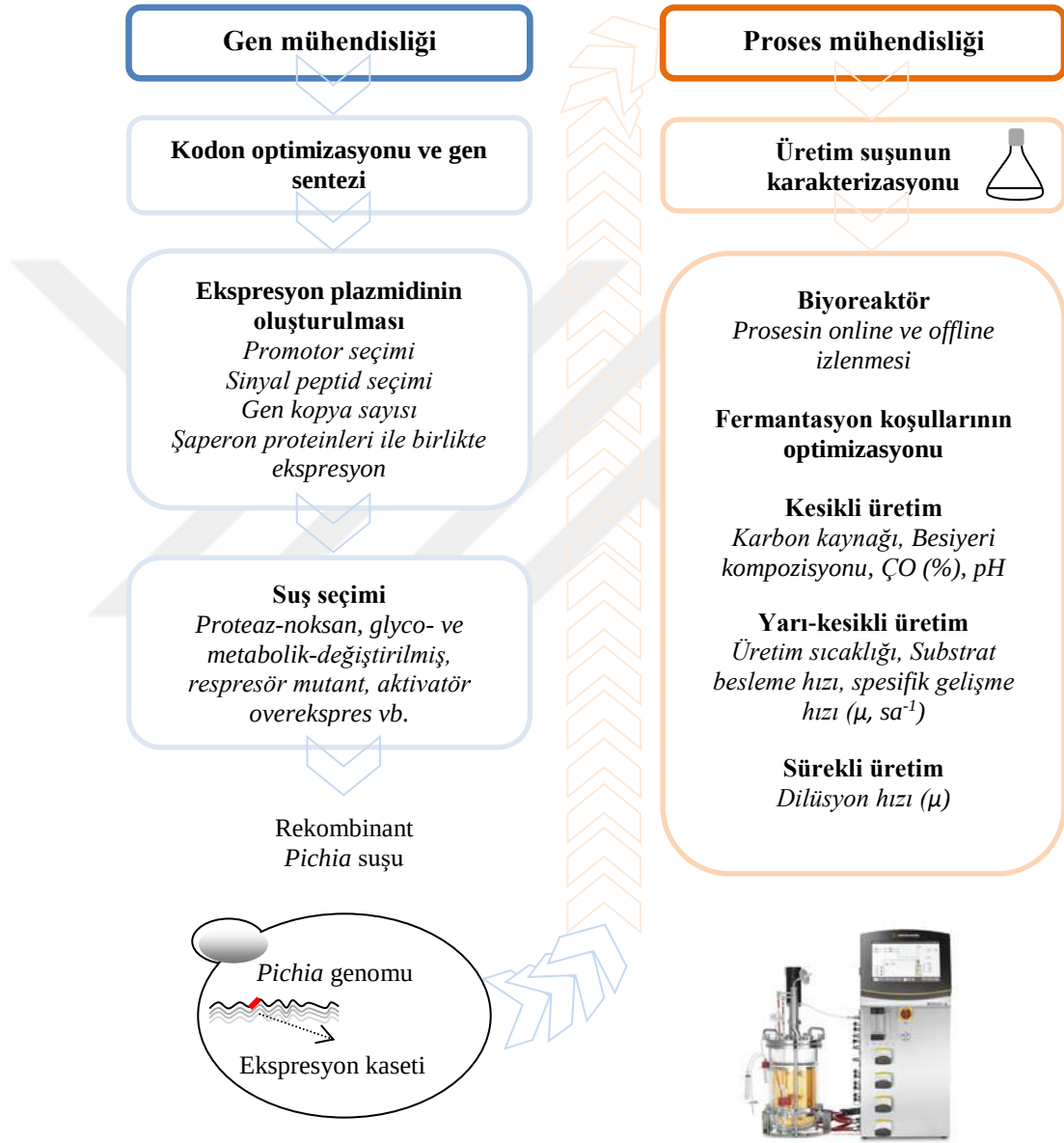
Biyoproses dizaynı ile, genel olarak, biyokütle gelişimi ve ürün oluşumu için uygun kültür şartlarının (pH, sıcaklık, oksijen, besiyeri vb.) belirlenmesi amaçlanır (Çalik vd. 2015). *P. pastoris* üretim suşunun fizyolojik sınırlarının belirlenmesinin merkezinde ise karbon ve enerji kaynaklarının kültür ortamına eklenmesi için en uygun modelin geliştirilmesi (besleme stratejisi) bulunmaktadır (Maurer vd. 2006a). Uygun kültür şartları ve besleme stratejileri rekombinant proteinin özelliğine, kullanılan suşa ve promotora göre değişir (Potgieter vd. 2010). Üretim prosesi optimizasyonu yapılırken amaçlanan, belli kalitedeki bir ürünü maksimum miktarda ve minimum zamanda elde etmektir. Bu nedenle, spesifik verimlilik (q_p), toplam biyokütle (XxV) ve üretim süresi (t_u , ürün oluşumunun başlaması ve hasat edilmesi arasındaki süre) prosesi etkileyen en önemli faktörlerdir. Genel olarak, spesifik ürün oluşum hızı (q_p , $g_{ürün} g_{kha}^{-1} sa^{-1}$) ve spesifik gelişim hızı (μ , sa^{-1}) arasındaki ilişkiyi yansıtan ürün oluşumu kinetiğinin ($q_p(\mu)$) önceden tahmin edilmesi çok zordur ve her bir promotor/protein kombinasyonu için deneysel olarak tespit edilmesi gerekir (Potgieter vd. 2010).

Bu çalışma ile amaçlanan, endüstriyel ölçekli üretimlerde en fazla tercih edilen yapısal GAP promotoru altında ksilanaz üretimi için *P. pastoris* üretim klonunun normoksik (% $\text{CO}_2 > 20$, tamamen aerobik solunum) ve hipoksik koşullarda (% $\text{CO}_2 \sim 0$, kısmi aerobik solunum) hücre gelişim ve üretim kinetiklerinin belirlenmesidir. Bu amaçla farklı kontrol parametreleri hedef alınarak yarı-kesikli üretimler gerçekleştirilmiş ve optimum üretim koşulları (substrat besleme hızı, oksijen beslemesi, üretim süresi vb.) tespit edilmeye çalışılmıştır. Çalışmada model protein olarak Ksilanaz enzimi kullanılmıştır. Ksilanaz enzimi, doğada en yaygın yenilenebilir kaynaklardan biri olan hemiselülozun ana bileşeni olan ksilan'ı, ana zincirdeki ksiloz molekülleri arasındaki 1,4- β -D-ksilozidik bağları parçalayarak monomerlerine ayırır. Yem, gıda, biyoyakıt, kâğıt endüstrisinde hammadde olarak kullanılan ve %33 oranında hemiselüloz içeren lignoselülozik maddelerin biyodönüşümünde çok önemli bir role sahiptir (Shang vd. 2017).

Çalışmada, ksilanaz enzimini hücre dışı üreten *P. pastoris* üretim suşu ile normoksik koşullar altında 4 farklı spesifik gelişim hızında (μ_{max} ($0,1 sa^{-1}$), $0,8\mu_{max}$, $0,4\mu_{max}$ ve $0,2\mu_{max}$) ve hipoksik koşullar altında 4 farklı etanol konsantrasyonunda (%1, %0,75, %0,5, %0,25 EtOH) glukoz beslemeli yarı-kesikli fermantasyonlar gerçekleştirilmiştir. Normoksik koşullarda yapılan üretimlerde kontrol parametresi olarak spesifik gelişim hızı (μ), hipoksik (oksijen-kısıtlı) koşullarda yapılan üretimlerde ise hücrenin oksijen kısıtlamasında oksidatif yoldan fermentatif yolağa geçerek ürettiği etanol miktarı (%EtOH) seçilmiştir. Üretim boyunca spesifik gelişim hızının belli bir değerde sabit kalması (sabit- μ stratejisi), substratın ortama hücrelerin belirlenen hızda gelişmesini (üstel gelişim) sağlayacak miktarlarda eklenmesi (üstel besleme stratejisi, ÜBS) ile sağlanmıştır. Hipoksik koşullarda gerçekleştirilen üretimlerde ise besleme hızı, besiyeri ortamındaki etanol konsantrasyonunu çevrimiçi ölçen bir sensör tarafından otomatik olarak ayarlanmış ve etanol konsantrasyonunun sabit kalması sağlanmıştır. Gerçekleştirilen fermantasyonlarda hücrelerin gelişim, enzim üretim ve substrat tüketimleri ile ilgili spesifik hızlar, verimler ve katsayılar hesaplanmış, böylelikle büyük ölçekte ksilanaz üretimi için tasarlanacak biyoprosesler için temel oluşturulacak veriler elde edilmiştir.

2. KAYNAK TARAMASI

Rekombinant protein üretiminde üretim verimliliğini arttırmaya yönelik uygulanan stratejiler genetik mühendisliği ve biyoproses mühendisliği olarak iki genel başlık altında toplanabilirler. Bu stratejiler ve uygulamalar sırasında dikkate alınan ana noktalar Şekil 2.1'de grafiksel olarak özetlenmiştir.



Şekil 2.1. *P. pastoris* rekombinant protein üretiminin verimini arttırmaya yönelik uygulanan stratejiler. Genetik mühendisliği ve proses mühendisliği olarak iki başlık altında toplanan stratejiler ürünün özelliklerine göre tek tek ya da birkaçı birlikte kullanılabilir (Yang ve Zang 2017).

Takip eden bölümlerde *Pichia* ekspresyon sisteminin verimini arttırmaya yönelik genetik ve biyoproses mühendisliği çerçevesinde yapılan çalışmaların kapsamlı bir özeti verilerek bu tez çalışmasının çizilen çerçevede hangi bölüme dahil olduğu açıklanmaya çalışılmıştır.

2.1. Gen Mühendisliği

Heterolog proteinlerin verimi genetik ve kültür koşulları başta olmak üzere birçok faktörden etkilenir. Genetik faktörler olarak kodon kullanımı, proteine ait genin GC içeriği, üretilen proteinin üzerinde bulunan proteolitik kesim ve glikozilasyon bölgelerinin etkilerinden sözedilebilir. Farklı türe ait genlerin *Pichia*'nın kodon kullanım tercihine göre kodon sekanslarının optimize edilmesinin ve GC içeriğinin değiştirilmesinin protein ekspresyon seviyelerinde 10 kata varan artışa yol açtığını gösteren çalışmalar bu tür genetik manipülasyon stratejilerinin işe yaradığını ortaya koymuştur (Sinclair ve Choy 2002). Promotor ve gen kopya sayısı gibi suşa özgü özellikler de ekspresyon seviyelerini etkilemektedir (Macauley-Patrick vd. 2005).

2.1.1. Kodon optimizasyonu ve gen kopya sayısı

Literatürde ekspresyon seviyesini arttırmaya yönelik araştırmalar arasında çoklu gen kopya sayısı üzerine yapılmış birçok çalışma bulunmaktadır. *P. pastoris*'te gen ekspresyon kasetleri genoma çoklu kopya olarak entegre edilebilmektedir. Ancak gen kopya sayısının etkisi proteinden proteine değişebilmektedir. Clare vd. (1991) 19 kopya sayısına, Vassileva vd. (2001) ise 8 kopya sayısına kadar protein üretiminde lineer artış gözlemişlerdir. Zhu vd. (2009) en iyi üretimi 12 kopya ile elde ederken daha yüksek kopya sayılarının rekombinant protein üretiminde önemli bir düşüşe neden olduğu belirlenmiştir. Hohenblum vd. (2004) çalışmalarında *AOX1* ve *GAP* promotorlarını farklı gen kopya sayılarıyla karşılaştırmıştır. *GAP* ile ekspresyonda 1, 2 ve 3 kopya arasında fark gözlenmezken *AOX1* promotoru ile 2 kopya üzerinde ekspresyonda düşüş görülmüştür. Inan vd. (2005) gen kopya sayısının artışı ile hücre dışı üretimin azaldığını göstermişlerdir. Hücre içi ve hücre dışı birlikte toplam protein olarak hesaplandığında kopya sayısı ile bir artış gözlenmiştir ancak üretilen protein hücre içinde birikmiştir.

Rekombinant protein üretimi sırasında salgılama (sekresyon) miktarında etkili faktörler hedef proteinin özellikleri, konukçu hücre, kültür koşulları, promotor seçimi, kodon kullanım tercihi, sinyal peptitleri, proteinin işlenmesi, katlanması ve sekresyonudur. Bu faktörlerden birinin yetersiz olması, protein verimini olumsuz etkilemekte ve proteinlerin organellerde birikmesine neden olabilmektedir (İdiris vd. 2010). Inan vd. (2006) yüksek kopya klonlarda protein disülfid izomeraz enziminin (endoplazmik retikulumda yanlış disülfid eşleşmelerinin yeniden düzenlenmesini sağlayan enzim) aşırı ifadesi ile salgılama sistemindeki endoplazmik retikuluma bağlı degradasyonu azaltarak, hücre dışı salgılamayı arttırmışlardır (Inan vd. 2006a).

Tripsinojen üretilen bir çalışmada, gen kopya sayısı ve ekspresyon arasında negatif ilişki gözlenmiştir. En yüksek tripsin aktivitesi tek kopya ekspresyon kaseti ile sağlanmıştır. Artan kopya sayıları üretimi negatif yönde etkilemiştir. Aynı çalışmada doğal promotordan daha güçsüz bir sentetik promotor varyantı ile 4 kopyada en iyi ekspresyon elde edilmiştir (Ruth vd. 2010).

Marx vd. (2009) çalışmalarında gen kopya sayısı ile protein üretimini 7 kopyaya kadar arttırmışlardır. Ancak rekombinant proteinin (hSOD, insan süperoksit dismutaz) aşırı ifadesi biyokütle verimini %75'e düşürmüştür. Nocon vd. (2014), rekombinant proteinin aşırı ifadesinin hücrenin birincil metabolizmasını doğrudan etkilemesinden yola çıkarak, genom düzeyinde metabolik modelleme geliştirmiştir. Bu amaçla rekombinant protein üretiminin artırılmasında rol oynayabilecek metabolik genlerin silinmesi veya aşırı ifadesi üzerine çalışılmıştır. Test edilen 9 genden 5'inin tekli modifikasyonu (aşırı ifadesi veya nakavt) rekombinant protein üretiminin artmasında etkili olmuştur.

2.1.2. Promotor seçimi ve promotor mühendisliği

Pichia ekspresyon sisteminin en önemli avantajlarından olan heterolog protein ekspresyonunun farklı ve güçlü promotorlar altında gerçekleştirilmesi, ürün verimi olarak diğer ekspresyon platformlarının önüne geçmesini sağlamaktadır. Hem araştırmalarda hem endüstride en yaygın kullanılan promotorların listesi Çizelge 2.1'de verilmiştir. Bu promotorların arasında özellikle 2 promotor kullanım yaygınlığı açısından öne çıkmaktadır: Yapısal gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz promotoru (pGAP) ve metanolle tetiklenen alkol oksidaz 1 promotoru (pAOX1).

Çizelge 2.1. *P. pastoris* promotorları, regülasyonları ve ekspresyon seviyeleri

Tetiklenebilir promotorlar				
Gen adı	Gen ürünü	Tetikleyici	Ekspresyon seviyesi	Referans
AOX1	Alkol oksidaz 1	Metanol	Güçlü	(Cregg vd. 2000)
ADH3	Alkol dehidrogenaz	Etanol	Güçlü	(Karaoglan vd. 2016)
DAS	Dihidroksi aseton fosfat	Metanol	Güçlü	(Ellis vd. 1985)
FLD1	Formaldehit dehidrogenaz	Metanol/ metilamin	Güçlü	(Shen vd. 1998)
PEX8	Peroksizomal matriks protein	Metanol/oleat	Zayıf	(Cereghino ve Cregg 2000)
ICL1	Izositrat liyaz	Etanol		(Menendez vd. 2003)
LRA3	L-ramnonat dehidrataz	Ramnoz	pGAP'ın ~%75'i	(Liu vd. 2016)
LRA4	L-KDR aldolaz	Ramnoz	pGAP'ın ~%22'si	(Liu vd. 2016)
THI11	Tiamine biyosentez proteini	Tiamin baskılar	pGAP'ın ~%70'i	(Stadlmayr vd. 2010)
GTH1	Yüksek afiniteli glukoz taşıyıcı	Glukoz kısıtlı		(Prielhofer vd. 2013)
CUP1	Bakır bağlayıcı metallothionein proteini	Bakır		(Koller vd. 2000)
PPLCC1	Lakkaz	Bakır		(Kim vd. 2016)
Yapısal promotorlar				
GAP	Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz		Güçlü	(Waterham vd. 1997)
YPT1	Sekresyonda görev alan GTPaz		Zayıf	(Sears vd. 1998)
TEF1	Translasyon uzama faktörü 1 alfa		Güçlü	(Stadlmayr vd. 2010)
GCW14	Glikozil fosfatidil inositol		Zayıf	(Liang vd. 2013)
PGK1	Fosfoglisarat kinaz		pGAP'ın ~%10'u	(Stadlmayr vd. 2010)

P. pastoris genomunda alkol oksidaz geninin *AOX1* ve *AOX2* olmak üzere iki kopyası bulunmaktadır. *AOX1*, hücrede alkol oksidaz aktivitesinin %85'inden sorumludur ve güçlü bir promotora sahiptir. Alkol oksidaz enzimi metanol metabolizmasını düzenler ve metanol asimilasyonunun ilk basamağını katalizleyerek metanolü formaldehite çevirir. *Pichia* sisteminde gerçekleştirilen heterolog protein ekspresyonlarında *AOX1* promotorunun yaygın olarak kullanılmasının en önemli nedeni sıkı bir şekilde kontrol edilebilmesidir. *AOX1* ekspresyonunun regülasyonu temel olarak indüksiyon ve represyon şeklinde transkripsiyon seviyesinde gerçekleşir. Metanol dışındaki kaynaklar tarafından (glukoz, gliserol, etanol, asetat vb.) güçlü bir şekilde baskılanan *AOX1* promotoru, hücreler yalnızca metanol olan besiyerine geçirildiğinde tetiklenmekte ve genin ekspresyonu toplam hücre proteininin %30'unu oluşturacak kadar yüksek bir oranda gerçekleşmektedir. *AOX1* gibi tetiklenebilir promotorların en büyük avantajı biyokütle üretimi ve rekombinant protein üretimi aşamaların ayrı olarak gerçekleştirilebilmesi ve böylelikle toksik proteinlerin üretilmesine olanak sağlamasıdır (Ahmad vd. 2014; Weinhandl vd. 2014).

Pichia'da günümüze kadar yapılan çalışmalarda hücre içi üretimde 22g/L (Hasslachter vd. 1997); hücre dışı üretimde 18 g/L seviyelerine kadar (Mellitzer vd. 2014) en yüksek protein üretiminin *AOX1* promotoru ile elde edilmesi de üzerine en çok çalışma yapılan promotor olmasının diğer bir nedenidir (Vogl ve Glieder 2013). Ancak, *AOX1* promotoru ile gerçekleştirilen büyük ölçekli endüstriyel fermentasyonlar, protein üretimi için kullanılmak zorunda olan metanolün toksisitesinden, kolaylıkla yanabilir olmasından, taşıma ve depolama zorluklarından dolayı potansiyel tehlikelere sahiptir. Ayrıca metanolün tek karbon kaynağı olduğu durumda biyokütle üretimi için gerekli olan oksijen miktarı, karbon kaynağı olarak glukozun kullanıldığı durumla kıyaslandığında 3 ila 4 kat daha fazladır. Bu durum saf oksijen kullanımını beraberinde getirmekte aynı zamanda fazla miktarda harcanan oksijen biyoreaktörün sıcaklığını yükseltmektedir (Lin vd. 2000). Yüksek miktarda oksijen ihtiyacı ve ısı uzaklaştırması için gerekli olan teçhizat üretim maliyetini arttırmakta ve büyük ölçekli üretimlerde zorluklara neden olmaktadır.

Metanole atfedilen dezavantajları bertaraf etmek üzere *AOX1* promotorunun aktivasyon ve represyon mekanizmaları üzerine yapılan çalışmaların ortaya çıkardığı bilgiler ışığında, metanol yolağının aktivasyonu ya da katabolit represyon yolağının inaktivasyonu yolu ile *AOX1* promotorunun altında metanol kullanımına gerek kalmadan rekombinant üretimin yapılmasını sağlayan metanol-ari sistemlerin geliştirilmesine yönelik çalışmalar bulunmaktadır (Wang vd. 2017). Aynı zamanda alternatif promotorların araştırılması ve geliştirilmesi için de birçok çalışma yapılagelmektedir. Bunlar arasında öne çıkan Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (*GAPDH*) yapısal promotoru (pGAP) ilk kez 1997'de izole edilmiştir (Waterham vd. 1997). *GAP* promotorunun kontrolü altında genlerin ekspresyonları, birçok farklı karbon kaynağında (metanol, glukoz, gliserol, fruktoz ve etanol) gerçekleşmekle birlikte yapılan üretimlerde substrat olarak genellikle glukoz ya da gliserol kullanılır (Potvin 2015). *GAP* promotorunun, metanolün toksisite ve riskleri gözönüne alındığında özellikle gıda endüstrisinde kullanımı öne çıkmaktadır. Ayrıca metanolün taşınması ve depolanmasından kaynaklanan ekstra maliyetleri bertaraf ettiğinden, büyük ölçekli heterolog rekombinant protein üretiminde daha çok tercih edilmektedir (Zhang vd. 2009).

Protein üretiminin yalnızca metanolün varlığında gerçekleştiği *AOX1* sistemlerinin tersine, *GAP* sistemlerinde biyokütle ve protein sentezi eş zamanlı olarak

gerçekleşir (Vassileva vd. 2001). *GAP* altındaki üretimler *AOX1* sistemine göre daha az kontrol gerektirir ve kararlı ve verimli bir şekilde 30 güne kadar varan uzun süreli üretimler yapmak mümkündür (Boer vd. 2000; Goodrick vd. 2001). *GAP* sisteminde litrede gram seviyesinde ekspresyonların gerçekleştirildiği ve *AOX1* sistemi ile karşılaştırılabilir olduğu kaydedilmiştir (Zhang vd. 2009). *GAP* promotörü altında alkaline fitaz ekspresyonunun *AOX1* sistemindeki üretimden 8 kat fazla olduğu rapor edilmiştir (Yang vd. 2015). Ayrıca hedef genin aynı suşta hem *GAP* hem *AOX1* altına klonlandığı ikili promotör stratejilerinin lipaz üretimini 6 kat arttırdığı (He vd. 2015), α -amilaz ve fitaz üretiminde de etkili olduğu gösterilmiştir (Parashar ve Satyanarayana 2016).

Bir üretimde maksimum miktarda ürün elde etmede gen ekspresyonunun kesin ve öngörülse (prediktif) kontrolü önemli faktörlerden biridir. Doğal promotörlerin regülasyonu represyon, derepresyon ve aktivasyon mekanizmaları tarafından yönetilen transkripsiyon düzeyinde gerçekleşir. Doğal promotörlere genetik modifikasyonlar yaparak promotör gücünü değiştirmek, promotörün regülasyonunda rol oynayan cis-etkili bölgeleri tanımlamak ve trans-etkili faktörleri tespit etmek, mevcut promotörlerden farklı amaçlara uygun farklı güce sahip promotörlerden oluşan kütüphaneler oluşturmak gibi çalışmalar promotör mühendisliği olarak tanımlanır (Ata vd. 2017). Böylelikle ilgili genin ekspresyonunun artırılarak ya da azaltılarak istenen şekilde kontrol edilebilmesi mümkün olabilmektedir. Güçlü promotörler, toksik olmayan proteinlerin gen kopya sayısı düşük olan klonlarda bile yüksek miktarda üretimine olanak sağlarken; zayıf promotörler ile de hücre için toksik proteinler başarılı bir şekilde üretilebilmektedir. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve farklı mutageniz teknikleri kullanılarak oluşturulan promotör kütüphaneleri, genotip-fenotip karakterizasyonu ve yeni cis-etkili elemanları tanımlamak için kullanılan önemli araçlardır (Peña vd. 2018).

Hartner vd. (2008) tarafından yapılan çalışmada *AOX1* promotörü üzerinde transkripsiyon faktörleri bağlanma bölgelerinin silinmesi ve eklenmesi ile promotör kütüphanesi oluşturulmuştur. Oluşturulan kütüphanede promotör aktiviteleri doğal promotör aktivitesinin %6'sı ile %160'ı arasında değişmektedir. Qin vd. (2011) tarafından yapılan çalışmada rastgele mutageniz tekniği kullanılarak mutant *GAP* promotörlerinden oluşan ve promotör aktivitesi doğal promotörün ~%0,6'sı ile 19,2 katı arasında değişen promotör kütüphanesi elde edilmiştir.

GAP promotörünün transkripsiyonel regülasyonunun daha derin bir şekilde anlaşılması için, olası transkripsiyonel faktör bağlanma bölgelerinin çoğaltıldığı veya silindiği varyantlardan oluşan sentetik bir *GAP* kütüphanesi oluşturulmuş ve karakterize edilmiştir (Ata vd. 2017). Yeşil floresan proteinin (GFP) ve insan serum albüminin (HSA) raportör olarak kullanıldığı çalışmada ekspresyon seviyelerinin GFP için 0,33-3,1 kat ve HSA için ise 1,6-2,4 kat arasında değiştiği farklı promotör varyantları elde edilmiştir. Ayrıca araştırılan transkripsiyon faktörleri arasında, çoğaltılmış *GAL4*-benzeri bağlanma bölgelerinin veya *GAL4*-benzeri transkripsiyon faktörünün aşırı ifadesinin, test edilen tüm koşullarda her iki raportör proteinin ekspresyonunu arttırdığı tespit edilmiştir. Sentetik promotörler, hedef promotörlerin regülasyon mekanizmalarını daha iyi anlayabilmek ve rasyonel tasarıma dayanan daha ileri promotör mühendisliği için bir model sunmaktadır (Yang ve Zhang 2017).

Son dönemde yayınlanan derlemelerden, bu çalışmanın da üzerine inşa edildiği GAP promotorunun özellikleri ve yapılan araştırmalar hakkında daha kapsamlı bilgiye ulaşılabilir (Zhang vd. 2009; Seidler 2013; Çalık vd. 2015).

2.1.3. Protein sekresyonu

Pichia sisteminin, rekombinant protein üretiminde başlıca avantajlarından biri kültür ortamına doğru şekilde katlanmış, translasyon sonrası işlenmiş ve aktif rekombinant proteinleri yüksek miktarlarda salgılama yeteneğidir. Bu sayede üretim sonrası işlemler önemli ölçüde kolaylaşabilmektedir. Genel bir kural olarak, doğal konukçularında hücre dışına salgılanan proteinler *P. pastoris*'te üretilirken de salgılanacaktır. Ancak, sekresyon sinyalleri kullanılarak GFP veya insan katalazı gibi normalde hücre içi olarak üretilen proteinlerin sekresyonu da başarılı bir şekilde gerçekleştirilmektedir (Ahmad vd. 2014).

P. pastoris'te en yaygın kullanılan sekresyon sinyalleri, *S. cerevisiae* α -mating faktörü (α -MF), *S. cerevisiae* invertaz (*SUC2*) ve *P. pastoris* endojen asit fosfataz (*PHO1*) ve insan serum albümininden (*HSA*) türetilmiştir (Daly ve Hearn 2005). Ticari kitler, aynı zamanda, en uygun sinyal dizisinin taranmasına izin veren farklı sekresyon sinyallerine sahip vektörler temin etmektedir. *S. cerevisiae* α -mating faktörü (α -MF) prepro-peptidi en yaygın olarak kullanılan sinyal dizisidir (Lin-Cereghino vd. 2013). Mevcut sinyal sekansların verimini arttırmaya yönelik çalışmalarla birlikte yeni sinyal sekanslarının tanımlanmasına yönelik çalışmalar da yapılmaya devam etmektedir. Protein sekresyonunu arttırmak için yönlendirilmiş mutagenез ile α -MF'nın 57-70 amino asitlerinin silinmesi, protein sekresyonunda %50'lik bir artışa yol açmıştır (Lin-Cereghino vd. 2013). Bir *P. pastoris* proteininin 18-aminoasitlik sekresyon sekansı tanımlanmış ve etkili bir alternatif olarak işlev gördüğü rapor edilmiştir (Govindappa vd. 2014). *P. pastoris* sekretomunun proteomik analizi sonucunda tespit edilen Epx1 proteininin sekresyon sinyalinden varyantlar oluşturulmuş ve yaygın olarak kullanılan sekresyon liderlerinden daha verimli oldukları kanıtlanmıştır (Heiss vd. 2015). *P. pastoris* sekretomundan *in silico* tespit edilen bir grup sinyal sekansı rekombinant protein üretiminde test edilmiş ve başarılı bir şekilde protein salgılamasını gerçekleştirmeleri yanında α -MF sinyal sekansından daha az etkili oldukları rapor edilmiştir (Massahi ve Çalık 2016).

P. pastoris için yüzey teşhir sisteminin geliştirildiği çalışmada *P. pastoris*'in kendisinden izole edilen Pir1 (protein with internal repeats) proteininin kendisi ile heterolog proteinin hücrenin yüzeyinde başarı ile teşhir edilmesi sağlanmış, sekresyon sinyal sekansı (*PIR1*) ile ise, heterolog proteinin hücre dışı üretimi gerçekleştirilmiştir (Pal Khasa vd. 2011). Ksilanaz enziminin hücre dışı üretiminde farklı sinyal sekanslarının (α -MF, *PHO1*, *HSA* ve *PIR1*) etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada en yüksek ksilanaz aktivitesi *PIR1* sinyal sekansı ile yapılan üretimde elde edilmiştir (Karaoğlu vd. 2014).

Çalışmalarda elde edilen farklı sonuçlara bakıldığında diğer faktörlerde olduğu gibi üretilcek protein için en uygun sinyal peptidinin hangisi olduğunun sistematik olarak gerçekleştirilen deneylerle belirlenmesi gerekir.

P. pastoris'te gen mühendisliği uygulamaları hakkında daha ayrıntılı bilgi için yakın tarihli kapsamlı derlemelere başvurulabilir. Pena vd. (2018) metabolik mühendislik

için bir platform olarak *P. pastoris*'in potansiyel rolü ve gücü, sentetik biyoloji prensiplerine dayanarak geliştirilen suşlarının gelişimleri için başlıca gereklilikler üzerine bir derleme yapmışlardır. Schwarzhans vd. (2017) yaptıkları derlemede, *P. pastoris*'teki metabolik mühendislik çalışmalarının mevcut durumu ve hücre mühendisliği metodolojisi üzerine kapsamlı bir tartışma ortaya koymuşlardır. Ayrıca Zahrl vd. (2017) *P. pastoris*'te hücre fizyolojisinin daha iyi anlaşılmasından rekombinant protein üretiminin geliştirilmesine kadar uzanan bir aralıkta sistem biyoloji uygulamalarının genel ve geniş bir değerlendirmesini yapmışlardır. (Schwarzhans vd. 2017; Zahrl vd. 2017; Peña vd. 2018)

2.2. Biyoproses Mühendisliği

Biyoproses mühendisliği, son yüzyılda biyoteknolojinin endüstriyel uygulamalı bilim olarak ortaya çıkması ile birlikte yeni ürünlerin sentezi için klasik endüstriyel proseslere alternatif olarak kurulmuş ve geliştirilmiştir. Biyoteknoloji ve biyoproses, ikinci nesil rekombinant insülin ve büyüme hormonu gibi farmosötiklerin üretimi, atık su uygulamaları, bira sanayiinden enzim üretimi gibi gıda endüstrisindeki sayısız uygulamalara kadar çok geniş bir alana hizmet etmektedir (Yang ve Zhang 2018).

Biyoproses mühendisliğinde yaşanan teknolojik gelişmeler sayesinde *P. pastoris* sistemi hala çok yönlü ve güçlü rekombinant protein üretim sistemlerinden biri olarak kullanılmaya devam etmektedir. Yüksek verimleri, düşük üretim maliyetleri ve terapötik kullanıma uygun fonksiyonel proteinler üretme yeteneği göz önüne alındığında, bu sistemin önemli bir endüstriyel ilgiye sahip olması şaşırtıcı değildir. Rekombinant protein üretim kinetiği, çalışma koşullarına ve üretilen proteine özgü faktörlere büyük ölçüde bağlı olduğundan rekombinant protein üretimi için tek bir optimum stratejiden söz etmek mümkün değildir. Ürün özelliklerindeki değişkenlik göz önüne alındığında, farklı proteinlerin üretildiği proseslerin doğrudan karşılaştırmasından anlamlı bir sonuç elde etmek zordur. Üretilen her bir protein için, kullanılacak sistemin teknik olanakları ve kısıtları da gözönünde bulundurularak proteine ve üretim platformuna özgü proses geliştirilmesi gerekir (Potvin vd. 2012a).

Üretilen rekombinant proteinin kalitesini ve miktarını etkileyen faktörlerin başında proses koşulları gelir (besiyeri kompozisyonu, çözünmüş oksijen konsantrasyonu (ÇO), pH, sıcaklık vb.). Kültür koşullarının etkisi, hücrenin moleküler mekanizması üzerine etki ederek doğrudan ya da hücre gelişimini etkileyerek dolaylı yoldan olmaktadır. Biyoproses dizaynı, öncelikle, hücre gelişimi ve ürün oluşumu için, pH, sıcaklık, oksijen ve karbon kaynağı beslemesi gibi koşulların optimum değerlerinin belirlenmesini amaçlar (Cos vd. 2006a). Üretim optimizasyonunun merkezinde ise karbon ve enerji substratlarının eklenmesi için uygun bir modun geliştirilmesi yani besleme profilinin/stratejisinin belirlenmesi yer almaktadır (Zhang vd. 2000). Uygulanacak olan kültür koşulları ve besleme stratejileri, rekombinant proteinin hangi suşta ve hangi promotörün altında üretileceğine bağlı olarak belirlenir.

P. pastoris'in optimum gelişme sıcaklığı 30°C olmasına rağmen (Cos vd. 2006a) 15°C'ye varan düşük sıcaklıklarda yapılan üretimin hücre gelişimini etkilemeden protein ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir (Wu vd. 2008). Düşük kültürasyon sıcaklıkları ayrıca proteaz aktivitesini düşürdüğünden üretilen proteinin özelliklerine bağlı olarak proses verimliliğini olumlu yönde etkileyebilir (Sirén vd. 2006). *P. pastoris* ile üretim

genellikle 3-7 arasındaki pH değerlerinde gerçekleştirilir (Cregg vd. 2000). Bu aralıkta pH değerleri hücre gelişimini çok az etkiliyor olsa da protein stabilitesi ve hücre dışı proteaz aktivitesini etkileyebilmekte ve özellikle yüksek pH larda besiyerindeki tuzların çökmesine neden olabilmektedir (Jahic vd. 2003).

Proses optimizasyonunun amacı, istenen kalite özelliklerine sahip ürünü en kısa sürede ve maksimum miktarda üretmektir. Bu nedenle spesifik üretim hızı q_p (saatte hücre başına üretilen ürün), maksimum biyokütle XV ve üretim süresi (t_u) gözönünde bulundurulması ve belirlenmesi gereken en önemli faktörlerdir. Spesifik gelişim hızı (μ) ve spesifik üretim hızı (q_p) gibi parametreler suşa özgü verilerdir ve farklı sistemler arasında karşılaştırma yapılmasına olanak sağlar. Biyokütle konsantrasyonu, biyoreaktör hacmi ve işlem süresi gibi veriler ise prosese özgü olup doğrudan karşılaştırılabilir değillerdir (Looser vd. 2014).

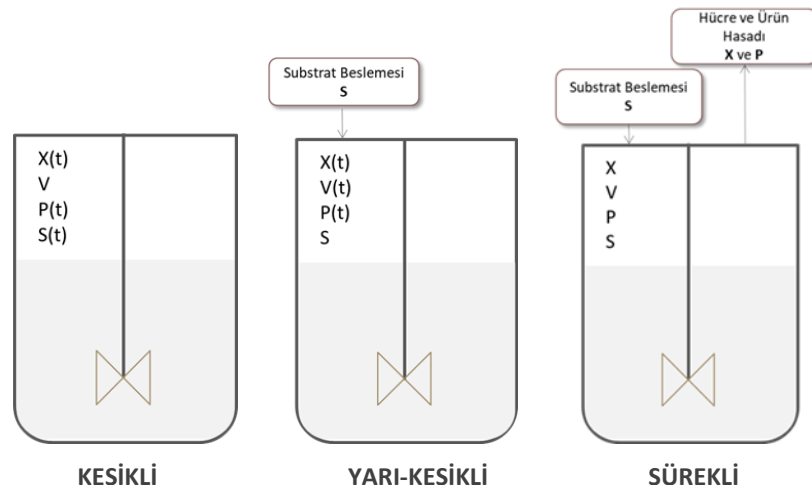
Bir rekombinant proteinin üretimi için en uygun koşullar, üretilcek olan moleküle ve kullanılan promotora göre farklılık gösterir. Özellikleri bilinmeyen yeni oluşturulmuş bir suş için üretim prosesi geliştirilirken işe suşun fizyolojik karakterizasyonu ile başlamak çok önemlidir. Böyle bir karakterizasyonun teorik olarak yapılması için gerekli veri altyapısı yeterli olmadığından büyüme ve ürün oluşumu arasındaki ilişkinin ampirik olarak tespit edilmesi gerekir. Üretim koşullarının tespit edilmesi (spesifik gelişim hızının optimum aralığı ve süreci) ve bu koşulların yarı-kesikli proseslerde kontrollü substrat beslemesi ile uygulaması ancak üretim kinetiği bilgisine dayanarak yapılabilir.

Aşağıdaki bölümlerde öncelikle fermantasyon işletim sistemleri ve kontrol stratejileri hakkında genel bilgiler verilmiş, sonrasında gelişim ve üretim kinetiklerinin fizyolojik olarak ne anlam ifade ettiği açıklanmaya çalışılmış ve son olarak da literatürdeki farklı rekombinant proteinler için q_p ve μ arasındaki ilişkiyi ortaya koyan çalışmaların bir derlemesi yapılmıştır.

2.3. Biyoreaktör İşletim Sistemleri

Biyoreaktör, bir veya daha fazla biyokimyasal reaksiyonun enzim ya da mikroorganizma gibi bir biyokataliz tarafından gerçekleştirildiği kapalı alan olarak tanımlanabilir. Bir üretim prosesi geliştirilirken ilk olarak, sözkonusu ürünün en verimli elde edilecek olduğu işletim sisteminin tespit edilmesi gerekir.

Temel olarak işletim şekillerine göre birbirlerinden ayrılan üç sistemden söz edilebilir: (1) Kesikli, (2) Yarı-kesikli ve (3) Sürekli işletim sistemleri (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Kesikli, yarı-kesikli ve sürekli fermentasyon işletim sistemleri

Kesikli sistemde tüm karbon kaynağı ve besiyeri komponentleri fermentasyonun başında biyoreaktöre eklenir ve tüm karbon kaynağı hücreler tarafından tüketilene kadar operasyon devam ettirilir. İşletilmesi en kolay sistem olmakla birlikte arka arkaya üretim yapılabilmesi için gerekli olan ara sürelerin uzunluğu açısından (biyoreaktörün hazırlanması, boşaltılması, temizlenmesi ve üretim için yeniden hazırlanması) verimsizdir. Ayrıca proses süresince biyoreaktörün içindeki substrat konsantrasyonu değişir ve ürün oluşum hızı ve spesifik gelişim hızı gibi parametrelerin kontrol edilmesine olanak vermez. Kesikli sistemde substrat konsantrasyonu (S) ve dolayısıyla substrat tüketim hızı (r_s) zamanla azalırken, hücre konsantrasyonu (X) ve ürün konsantrasyonu (P) zamanla artar. Reaksiyon hacim (V) ise sabittir.

Sürekli sistemde proses süresince biyoreaktöre belirli bir hızda besleme yapılırken aynı hızda ortamdan kültür uzaklaştırılır. Böylelikle sistem denge halinde kalır ve bu şekilde uzun süreli üretim gerçekleştirilebilir. Sistem dengeye ulaştığı andan itibaren biyoreaktörün içindeki X , P , S ve V değerleri kararlı hale gelir. Verimliliği yüksek ve maliyeti görece düşük olan sürekli sistemle, yüksek konsantrasyonlarda inhibitör olabilen ya da hücreler tarafından katabolize olabilen ürünlerin üretimleri gerçekleştirilebilir. Fakat bu sistemin, özellikle endüstriyel ölçekte, çok sıkı kontrol koşulları ve izleme metotlarına ihtiyaç duyması gibi bazı operasyonel zorlukları bulunmaktadır. Ayrıca fermentasyon sonrası işlemler her zaman sürekli işletilemeyebileceğinden operasyonun zaman planında zorluklar yaşanabilir. Tüm bunlarla birlikte uzun süren sürekli operasyonlar için üretim süşunun genetik olarak kararlı olması gerekir ve kontaminasyon riski de diğer sistemlere göre yüksektir. Genel olarak arıtma endüstrisi gibi alanlarda ve laboratuvar çalışmalarında hücrelerin gelişim ve üretim kinetiklerinin araştırılmasında kullanılmaktadır .

Yüksek hücre yoğunluklarında gerçekleştirilen endüstriyel fermentasyon sistemlerinde sürekli sisteme göre kontrolü daha kolay olan **yarı-kesikli sistem** tercih edilir (Mears vd. 2017). Yarı-kesikli sistemde, biyoreaktöre belirlenmiş bir süre boyunca bir ya da daha fazla substrat eklemesi yapılır. Eklenen substrat genellikle bir karbon kaynağıdır. Biyoreaktörden belirli zamanlarda alınan örnekler ve hava dışında bir çıkış olmaz. Proses süresince kültürün hacmi ($V(t)$), hücre konsantrasyonu ($X(t)$) ve ürün

konsantrasyonu ($P(t)$) artar. Substrat konsantrasyonu ise ya belli bir değerde sabit tutulacak şekilde ya da kısıtlı olacak şekilde besleme profili uygulandığından proses süresince sabittir (S).

Yarı-kesikli sistem ilk kez 1900'lerin başında *S. cerevisiae* üretiminde kullanılmış ve sonrasında diğer biyoteknolojik proseslerde kullanımı yaygınlaşmıştır. Mikroorganizmalar metabolik performansları için gerekli olan substratın çok yüksek konsantrasyonlarında, ortamda ikincil metabolitlerin ya da başka ürünlerin birikmesi sonucu inhibe olabilmektedir. Substrat konsantrasyonun kontrol altında tutulduğu yarı-kesikli proseslerde substrat inhibisyonu ve katabolit represyon önlenmiş olur.

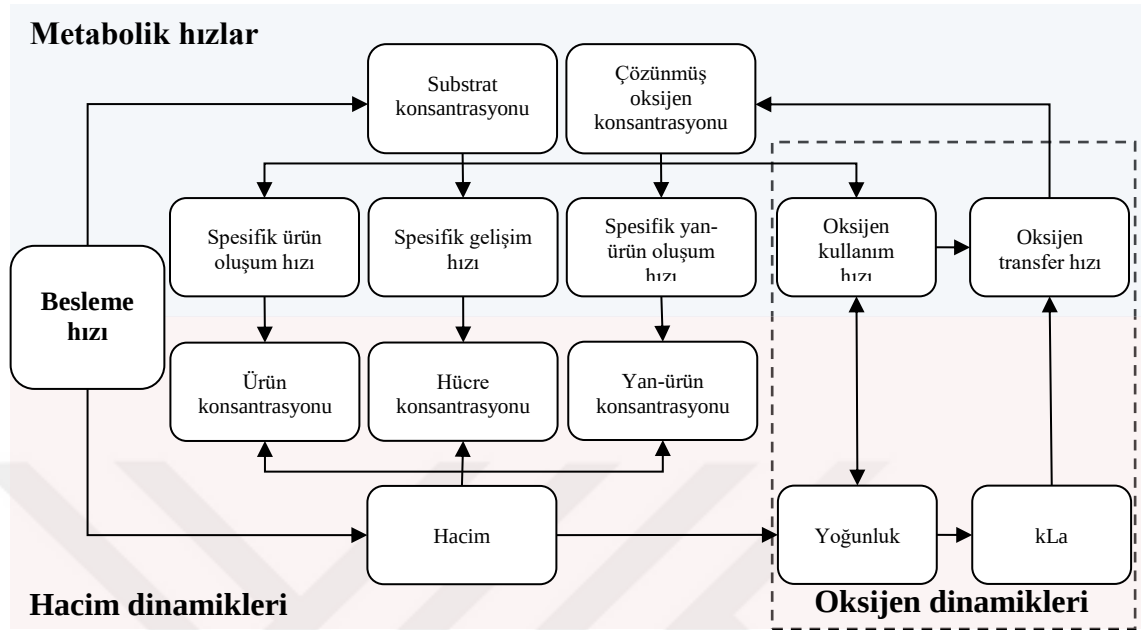
GAP kontrolü altında gerçekleştirilen yarı-kesikli fermantasyonlar 2 aşamadan oluşur. Hücre gelişimini amaçlayan kesikli faz ve üretimi amaçlayan yarı-kesikli faz. Gliserolün substrat olarak kullanıldığı ilk aşamada hedef biyokütle oluşumunu sağlamaktır. Kesikli gliserol fazı yaklaşık 24 saat sürer ve genellikle 40 g/L gliserol substrat konsantrasyonlarında başlatılır. Daha yüksek gliserol konsantrasyonlarının hücre gelişimini inhibe ettiği rapor edilmiştir (Cos vd. 2006b). % CO_2 değerindeki ani artış ile substratın tamamen bittiği anlaşılır ve yarı-kesikli (besleme) faza geçilir. İkinci aşamada, hücrelerin üretim yapması, gelişmeye devam etmesi ve bakım gereksinimleri için gerekli olan karbon kaynağı, tüm proses boyunca belirli bir hızda biyoreaktöre eklenir. Substrat olarak genel olarak glukoz veya gliserol kullanılır. Rekombinant protein üretiminde hangi substratın daha iyi olduğuna dair herhangi bir kesin sonuca ulaşmak zordur çünkü glukozun daha verimli olduğu çalışmalarla birlikte (Döring vd. 1998; Pal vd. 2006) gliserolün daha verimli olduğunu rapor eden çalışmalar da bulunmaktadır (Zhang vd. 2007; Tang vd. 2009). Besleme genellikle iz tuzları eklemesi yapılmış yüksek konsantrasyonlu substrat solüsyonu ile yapılır (500-600 g/L). Process süresince biyoreaktörden alınan örnekler dışında herhangi bir ürün uzaklaştırması yapılmaz. Substrat beslemesi nedeniyle reaksiyon hacmi zamanla artar. Yarı-kesikli prosesin en büyük avantajı besleme hızının değiştirilmesi ile birçok proses parametresinin kontrol altında tutulabilmesidir. Bu işletim sistemi ile yüksek konsantrasyonlarda biyokütle ve ürün elde edilebilmektedir.

2.4. Fermantasyon Kontrol Stratejileri

Fermantasyon prosesleri, ürün konsantrasyonunu arttırmak, yan-ürün oluşumunu azaltmak, proses verimini arttırmak, hücre konsantrasyonunu arttırmak, belli bir oksijen konsantrasyon profilini sağlamak gibi farklı amaçlarla kontrol altında tutulmak istenir.

Pichia ekspresyon sistemlerinde fermentasyon prosesini doğrudan etkileyen faktörlerin başında substrat besleme hızı (F , g/h) gelir. Ortama verilen substrat miktarı (Q , g) ve besleme hızı (F) ile belirlenen substrat konsantrasyonu (S , g/L), hücrelerin gelişim hızı, ürün oluşum hızı, yan-ürün oluşum hızı ve oksijen kullanım hızı gibi metabolik hızları doğrudan etkiler (Şekil 2.3). Ayrıca proses boyunca sürekli substrat beslemesi yapıldığından ve ürün uzaklaştırılmadığından, toplam reaksiyon hacmi zamanla artar ve değişen hacim dinamikleri ile birlikte sistemdeki tüm unsurların konsantrasyonu etkilenir. Besleme hızının, oksijen alım hızı (OUR) ve ayrıca yoğunluktan etkilenen oksijen transfer hızı (OTR) üzerinden oksijen dinamikleri üzerine de etkisi vardır. Genel olarak besleme hızı sistemi birçok yönden etkiler. Üretimde

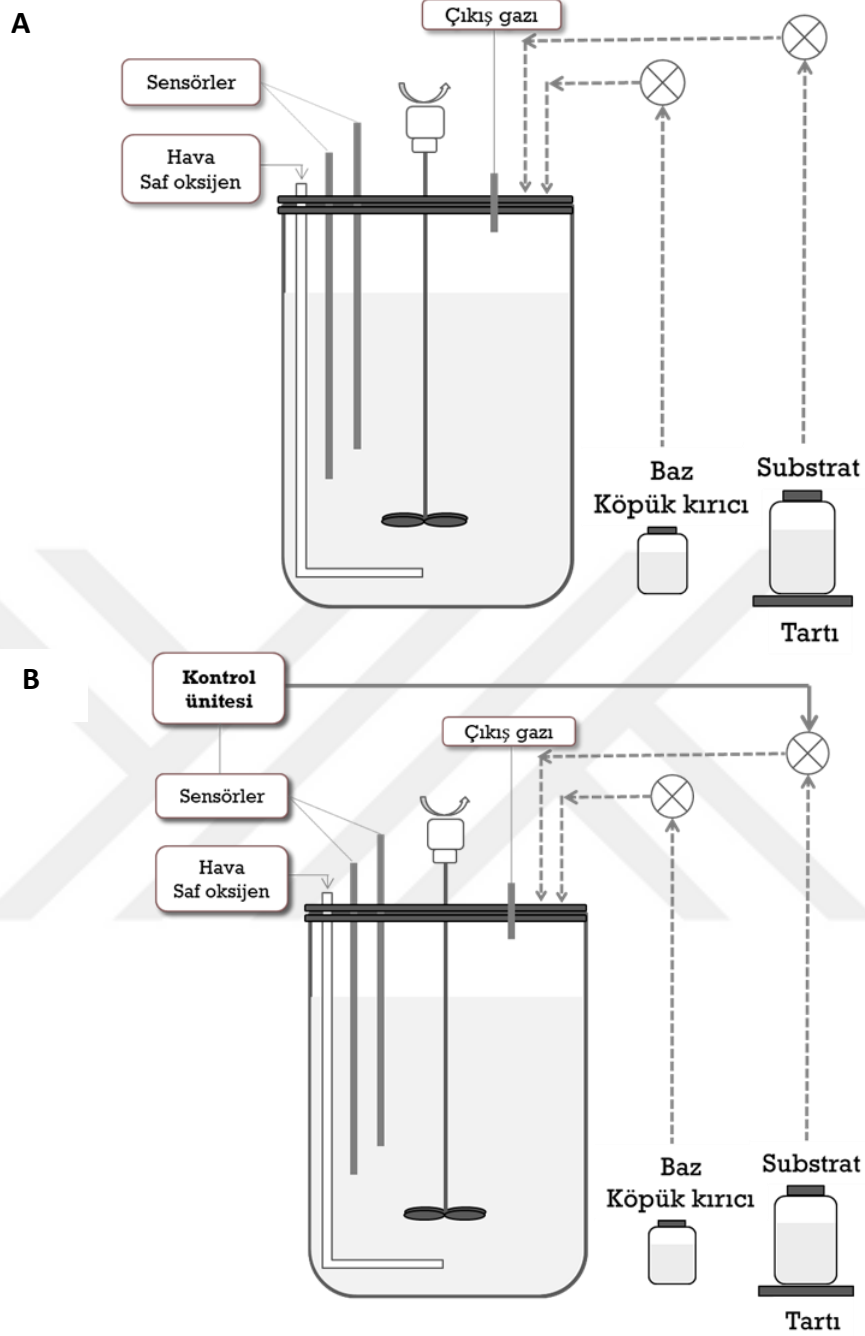
amaçlanan maksimum miktarda ürün elde etmek olduğunda, optimizasyonu yapılacak parametrelerin başında besleme stratejisi gelir (Cos vd. 2006b).



Şekil 2.3. Besleme hızının yarı-kesikli fermantasyon prosesinde etkilediği parametreler (Mears vd. 2017'den uyarlanmıştır)

Yüksek ürün konsantrasyonlarına ulaşmak için besleme hızı üretim yolağını doyuracak şekilde ayarlanmalıdır. Besleme az gelirse proses maksimum kapasitesine ulaşamaz. Bununla birlikte beslemenin fazla yapılması ise metabolizmanın taşmasına ve yan-ürün oluşumuna sebep olur (Nielsen vd. 2003). Yarı-kesikli sistemlerin lineer olmayan dinamiklerinden (üstel artan hücre konsantrasyonu, metabolik kaymalar, hacim dinamikleri, bazı bozucu etkenler vb.) dolayı optimal besleme hızının belirlenmesi zorlayıcı olabilmektedir.

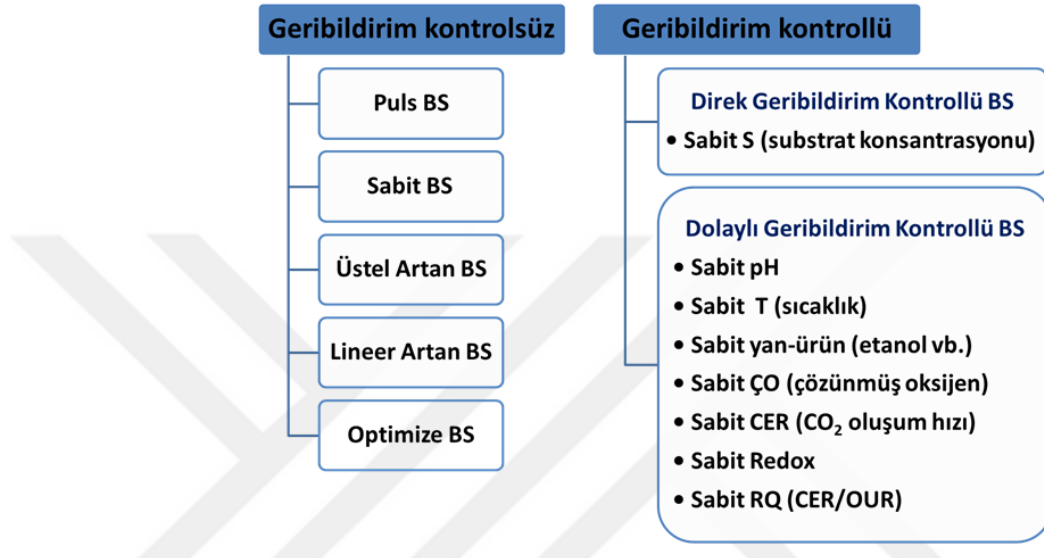
Pichia sisteminde, prosesin verimliliğini ve tekrarlanabilirliğini arttırmaya yönelik birçok besleme stratejisi önerilmiş ve uygulanmıştır. Yarı-kesikli prosesler uygulanan besleme stratejileri esas alınarak iki gruba ayrılabilirler: geribildirim kontrolsüz prosesler ve geribildirim kontrollü prosesler (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. (A) Geribildirim kontrolsüz yarı-kesikli proses. Besleme rejimi deneysel olarak elde edilmiş bazı verilere dayanarak önceden belirlenir. (B) Geribildirim kontrollü yarı-kesikli proses. Proses parametreleri kontrol ünitesine bağlı sensör aracılığı ile takip edilir. Kontrol ünitesi sensörden gelen verilere göre besleme hızını azaltır ya da artırır (Öztürk vd. 2016'dan uyarlanmıştır).

2.4.1. Geribildirim kontrolsüz besleme stratejileri

Geribildirim kontrolsüz proseslerde substratın besleme profili, belli varsayımlar ve deneysel verilere dayanarak önceden belirlenir ve proses devam ederken herhangi bir müdahale yapılmaz (açık döngülü kontrol). Uygulama kolaylığı açısından GAP promotoru kontrolündeki üretimlerde sıklıkla kullanılan bu tür stratejiler, beslemenin sürekliliğine ve artış şekline göre aşağıdaki gibi 5 başlık altında sınıflandırılabilirler (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Yarı-kesikli fermantasyon proseslerinde uygulanan geribildirim kontrolsüz ve geribildirim kontrollü besleme stratejileri (BS)

1. Puls besleme

Substrat konsantrasyonunu belli değerler aralığında tutmak için biyoreaktöre belirli aralıklarla belli bir miktarda substrat verilir. Substratın en düşük ve en yüksek konsantrasyonu, her seferinde ne kadar substratın verileceği ve kaç kez (puls) verileceği optimize edilmesi gereken parametrelerdir.

2. Sabit hızla besleme

Substrat sabit bir besleme hızı ile verilir. Hücre konsantrasyonu zamanla arttığından hücre başına eklenen substrat miktarı zamanla azalır. Bunun sonucunda spesifik gelişim hızı (μ) ve spesifik substrat tüketim hızı (q_s) da zamanla azalır.

3. Üstel artan hızla besleme (sabit- μ)

Substrat, biyoreaktöre sürekli ve üstel artan bir hızla verilir. Besleme hızı (F , g/L)) zaman (t) ve μ parametrelerine göre aşağıdaki eşitliğe (2.1) göre hesaplanır:

$$F = \frac{\mu \cdot X_0 \cdot V_0}{Y_{xs}} e^{\mu t} \quad (2.1)$$

μ : üretimin gerçekleştirilmek istendiği spesifik gelişim hızı (sa^{-1}); X_0 : beslemenin başlatıldığı andaki hücre konsantrasyonu (g/L); V_0 : beslemenin başlatıldığı andaki biyoreaktörün içindeki kültürün hacmi; Y_{XS} : substrat hücre verimi (g/g); t : zaman (sa).

Bu algoritma ile proses boyunca μ ve Y_{XS} değerlerinin sabit kalacağı varsayımı yapılarak belirli bir gelişim hızına göre besleme profili çıkarılır.

Bu stratejide, biyoreaktöre eklenen substrat hücreler tarafından hemen kullanıldığından substrat konsantrasyonu 0'a yakın olur. Bu nedenle substrat-kısıtlı (substrate-limited) proses olarak da adlandırılmaktadır.

4. Lineer artan hızla besleme

Substrat beslemesi hacimsel olarak sabit artan bir hızla yapılır. Sabit beslemeye göre μ ve q_s değerlerindeki azalma bir ölçüde önlenmiş olur. Üstel artan beslemeye göre ise artış hızı teorik bir hesaplama dayanamaz, hacimsel olarak sabit bir ivme ile besleme hızı arttırılır.

5. Optimize edilmiş besleme

Sabit, üstel ya da doğrusal artan besleme stratejilerinin kombinasyonu uygulanır. Genel olarak, üstel/lineer artan besleme stratejisi uygulanırken, değişken proses dinamiklerinden ve bozucu unsurlardan kaynaklanan spesifik hücre büyüme hızındaki ve dolayısıyla spesifik substrat tüketim hızındaki azalmanın sonucunda ortamda karbon kaynağı birikmeye başladığında, sabit besleme stratejisine geçiş yapılır.

2.4.2. Geribildirim kontrollü besleme stratejileri

Kapalı döngü kontrollü olarak da adlandırılan geribildirim kontrollü prosesler kontrol türüne bağlı olarak direk geribildirim kontrollü ve dolaylı geribildirim kontrollü olarak iki grup altında sınıflandırılabilirler (Şekil 2.5).

Direk geri bildirim kontrollü sistemlerde, besiyerindeki substrat konsantrasyonu sensör yardımı ile online olarak ölçülür ve besleme hızı substrat konsantrasyonunu belirlenen değer aralığında tutacak şekilde direk besleme pompasına bağlı kontrol ünitesi aracılığı ile azaltılır ya da arttırılır. Substrat-doygun (substrat non-limited) olarak da adlandırılan bu strateji özellikle *AOX1* promotörü kontrolünde metanol beslemesi ile yapılan üretimlerde başarı ile uygulanmıştır (Guarna vd. 1997; Zhang vd. 2000; Mayson vd. 2003; Cunha vd. 2004; Barrigón vd. 2013). Gurramkonda vd. (2009), metanol sensörü yardımı ile metanol konsantrasyonunu 2 g/L konsantrasyonunda sabit tutarak insülin precursor üretiminde bu stratejiyi uygulamış ve 3 g/L seviyesinde ürün elde etmiştir (Gurramkonda vd. 2009). Wu vd. (2011) 0,5-3,5 g/L aralığındaki metanol konsantrasyonlarının *Rhizopus chinensis* prolipaz üretimine etkisini incelemişler ve optimal metanol konsantrasyonunu 1 g/L olarak tespit etmişlerdir (Wu vd. 2011). Metanol konsantrasyonunun online izlenmesini müteakip etkili bir kontrol sistemi, prosesin kararlılığı ve tekrarlanabilirliği açısından gerekli olan önkoşullardır (Potvin vd. 2012a). *GAP* promotörü kontrolünde glukoz ya da gliserol beslemesi ile yapılan üretimlerde ise çevrimdışı analizlerle glukoz/gliserol konsantrasyonunun takip edilip puls

şeklinde substrat eklemesi yapılarak substrat konsantrasyonunun belli bir aralıkta tutulmaya çalışıldığı çalışmalar bulunmaktadır (Hu vd. 2008; Zhao vd. 2008; Kottmeier vd. 2012).

Dolaylı geribildirim kontrollü sistemler, belirli proses parametrelerin izlenmesi ve besleme hızının ayarlanması ile kontrol altında tutulması esasına dayanır. Bu parametreler arasında çözünmüş oksijen konsantrasyonu (ÇO), pH, sıcaklık (T), çıkış gazındaki CO₂ konsantrasyonu (CER), solunum oranı (RQ, CER/OUR), yan-ürün konsantrasyonu (etanol vb.) ve redox olarak sıralanabilir.

Farklı besleme stratejilerin uygulandığı ve karşılaştırıldığı birçok çalışma bulunmaktadır. *GAP* promotörü kontrolünde lipaz enziminin üretildiği bir çalışmada sabit-substrat, sabit- μ ve sabit-pH stratejilerine göre besleme profilleri uygulanmış ve sabit- μ ve sabit-pH stratejilerinin birlikte uygulandığı proseste maksimum verimliliğe ulaşılmıştır (Zhao vd. 2008).

P. pastoris kültürlerinde ulaşılan çok yüksek hücre yoğunluğuna bağlı olarak, kültivasyonda genellikle 2 ila 3 gün arasında oksijen transferi sınırlaması meydana gelir. Oksijenin sınırlı hale geldiği aşamada substrat beslemesi % ÇO değerini belli bir set noktasında tutacak şekilde ayarlanarak biyokütle konsantrasyonu arttırılmaya devam edilebilir (Ferreira vd. 2012). İnsan angiotensin proteininin *GAP* promotörü altında üretildiği ve gliserol besleme hızının ÇO değerini %25-30 aralığında tutacak şekilde ayarlandığı bir çalışmada 36 saatte 305 g/L hücre yoğunluğuna ve 176 mg/L ürün konsantrasyonuna ulaşılarak, *AOX1* promotörü kontrolünde yapılan üretimlerde elde edilen maksimum değerlere ulaşıldığı kaydedilmiştir (Zhang vd. 2007). rhIL-2-HSA füzyon proteininin *GAP* altında üretildiği ve glukoz beslemesinin ÇO değerini %25-40 arasında tutacak şekilde ayarlandığı başka bir çalışmada ise 60 saat sonunda 250 mg/L ürün konsantrasyonu elde edilmiş ve büyük ölçekte uygulanabilirliği yüksek olan basit bir fermentasyon stratejisi olarak değerlendirilmiştir (Guan vd. 2013).

MAT (metiyonin adenoziltransferaz) enziminin *GAP* altında üretildiği ve 5 farklı stratejinin uygulandığı bir çalışmada, gliserol ile %50, %25 ve %0 ÇO değerlerinde substrat-kısıtlı ve ayrıca 2 farklı puls stratejisi ile substrat-doygun koşullarda üretim yapılmıştır. En yüksek verim, gliserol konsantrasyonunu her yarım saatte bir yapılan analizlerle 2 g/L seviyesinde tutacak şekilde puls beslemenin uygulandığı stratejide elde edilmiştir. Bu durumun %2 gliserolün besiyerinin oksijen doyum değerini ve hacimsel oksijen transfer katsayısını (k_{La}) yükselttiği ve dolayısıyla spesifik oksijen alım hızının (q_{O_2}) ve spesifik gliserol tüketim hızının (q_s) arttığı yorumu yapılmıştır (Hu vd. 2008).

Bauman vd. (2008) hipoksik koşulların *P. pastoris*’te rekombinant protein üretimine olan etkilerini inceledikleri çalışmada *GAP* promotörü altında 3 farklı proteininin üretimini, besleme hızının hücrelerin hipoksik koşullarda glukozda gelişirken ürettiği **etanol miktarını sabit tutacak şekilde** ayarlanması ile gerçekleştirmişlerdir. Biyoreaktörden çıkan havadaki etanol gazının konsantrasyonu kontrol ünitesine bağlı olan bir gaz analizörü ile ölçülmüş ve etanol konsantrasyonu hacimce %1’de sabit kalacak şekilde besleme hızı kontrol edilmiştir. Üç farklı protein üretim suşunda test edilen bu üretim stratejisi, sabit-besleme stratejisi ile karşılaştırıldığında spesifik üretim hızını (q_p) 3-6 kat arttırırken, proses süresini 3 kat azaltmıştır (Baumann vd. 2008). Ksilanaz üretim suşunun hipoksik koşullarda gelişim ve üretim kinetiklerinin belirlenmesi için bu tez

kapsamında gerçekleştirilmiş olan yarı-kesikli proseslerde uygulanan sabit-etanol stratejisi için bu çalışma temel alınmıştır.

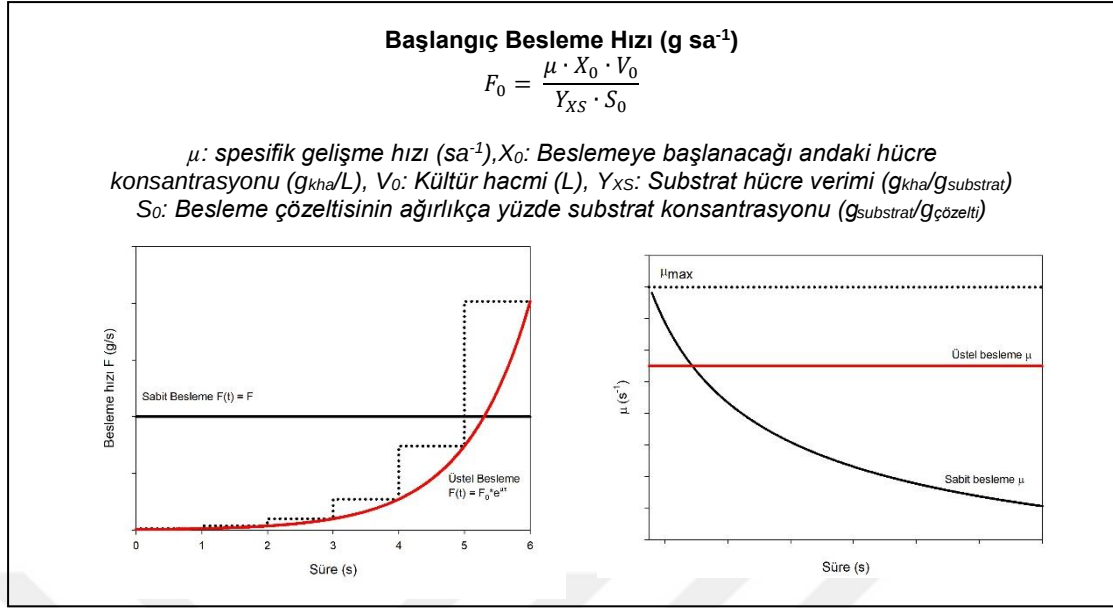
Besleme stratejileri tasarlanırken sayısız olasılık ve zorluk derecesi arasından uygulanacak olan kombinasyonların seçimi hücrenin üretim kinetiği hakkındaki bilgilere bağlı olmakla birlikte fermentasyon ünitesinin sahip olduğu izleme ve kontrol tekniklerinin de gözönünde bulundurulması gerekir.

2.5. Spesifik Gelişme Hızının Rekombinant Protein Üretimine Etkisi

Spesifik gelişim hızı (μ), *P. pastoris*'te rekombinant protein sekresyon kinetiği ve ürün kalitesi üzerine etkisi olan önemli parametrelerden biridir (Zhang vd. 2004; Wu vd. 2011). Spesifik üretim hızı (q_p , $\text{g}_{\text{ürün}} \text{g}_{\text{kha}}^{-1} \text{sa}^{-1}$) ve μ (sa^{-1}) arasındaki ilişki, hücre içinde ürün salgılanana kadar gerçekleşen çeşitli süreçler arasındaki dengeyi yansıtır (genin indüklenmesi, ekspresyon, translasyon, protein katlanması ve endoplazmik retikulumda degradasyon, katlanmış proteinin ER'ın dışına taşınması ve salgı mekanizmasındaki birimler arasındaki trafik vb.). Aynı zamanda "üretim kinetiği" olarak adlandırılan bu ilişkinin belirlenmesi üretim stratejilerinin tasarımı için çok önemlidir (Barrigon vd. 2015). *P. pastoris*'le rekombinant protein üretimi için geniş ve sistematik bir uygulama deneyimi henüz mevcut olmadığından, q_p ve μ arasındaki ilişki öngörülemez ve ampirik olarak belirlenmelidir (Potgieter vd. 2010).

Üretim kinetiğinin belirlenmesi için, genel olarak, önceden belirlenmiş farklı μ değerlerinde çok sayıda yarı-kesikli fermentasyon (Kobayashi vd. 2000; Potgieter vd. 2010) veya sürekli fermentasyon (Jungo vd. 2006) gerçekleştirilir. Yarı-kesikli besleme stratejileri (bir organik karbonun ve enerji kaynağının biyoreaktöre eklenmesi) genellikle zamana bağlı substrat ilavesinin (yani besleme profilinin) hızını tanımlayan matematiksel fonksiyonlara dayanır (Şekil 2.6). Bu tür stratejilerde, substrat önceden belirlenmiş bir hızda lineer, üstel ya da aşamalı olarak artan ya da azalan oranlarda eklenir.

Yarı-kesikli proses boyunca hücrelerin sabit bir spesifik gelişim hızında büyümelerini sağlamak için besleme hızı, hücre başına saatte eklenen substrat miktarı sabit kalacak şekilde üstel olarak arttırılmalıdır çünkü hücreler de üstel olarak çoğalır (Potgieter vd. 2009). Sabit- μ stratejisi olarak da adlandırılan bu kontrol yönteminde, substrat besleme hızı (F), sabit bir spesifik gelişme hızını teorik olarak sürdürmek için kütle dengesi denklemlerine göre hesaplanır (Cos vd. 2006b). Bu yaklaşım basit hücre büyüme modellerine uygulanabilir ve sistem parametrelerinin çevrimiçi izlenmesini gerektirmez. Bu metodun uygulanabilmesi için proses süresince Y_{XS} değerinin sabit olduğu varsayılır ve beslemenin başlatılacağı andaki hücre konsantrasyonu (X_0 , g/L) ve reaksiyon hacminin (V_0 , L) bilinmesi gerekir. Üstel artan besleme stratejisinde biyoreaktöre tanımlı bir değere (μ_{max} ya da altında bir μ değeri) göre eklenen substrat hücreler tarafından hemen kullanıldığından hücreler sadece substrat miktarının izin verdiği ölçüde büyüebilir ve bu şekilde spesifik gelişim hızı kontrol edilmiş olur (Zhang vd. 2007). Bu strateji, proses süresince biyoreaktör besiyerindeki substrat konsantrasyonu 0'a yakın olacağından substrat-kısıtlı strateji olarak da tanımlanabilir.



Şekil 2.6. Yarı-kesikli fazda uygulanan besleme profillerinin hesaplanması ve spesifik gelişim profilleri

Protein üretimi de dahil olmak üzere çoğu biyokimyasal süreç, ya doğrudan ya da dolaylı olarak hücre büyümesi ile ilişkili olduğundan, spesifik gelişme hızı kontrolü, süreç optimizasyonu için etkili bir strateji olarak kabul edilmektedir (Potvin vd. 2012b). Proses süresince sabit gelişme hızının sağlanması prosesin tekrarlanabilirliğini artırır ve heterolog protein üretimi üzerindeki gelişme hızına bağlı etkilerin sistematik çalışmasını kolaylaştırır.

P. pastoris'te *AOX1* kontrollü üretim süreçlerinde, doğrusal olarak artan ya da azalan, hiperbolik ya da çan eğrisi gibi çok farklı üretim kinetikleri rapor edilmiştir (Zhang vd. 2005; Jungo vd. 2006; Potgieter vd. 2010). *GAP* kontrollü üretimlerde ise, spesifik protein üretim hızı ile hücresel büyüme arasında büyük çoğunlukla pozitif korelasyon tespit edilmiştir (Şekil 2.7).

2.5.1. *AOX1* kontrollü proseslerde üretim kinetiği

Zhang vd. (2000) *AOX1* kontrollü üretimler için spesifik gelişme hızı (μ), metanol konsantrasyonu (S) ve spesifik metanol tüketim hızı (q_s) arasındaki ilişkiyi tanımlayan bir model geliştirmişlerdir. Bu modelden hesaplanan maksimum spesifik gelişme hızı (μ_{max}) 0,08 sa⁻¹, 3,65 g/L'lik bir metanol konsantrasyonunda gerçekleşmiştir. Maksimum rekombinant protein verimine ise, μ_{max} değerinin yaklaşık üçte biri kadar olan μ değerinde (0,0267 sa⁻¹) ulaşılmıştır (Zhang vd. 2000). Ren vd. (2003) *P. pastoris* insan serum albümini (rHSA) ekspresyon suşu için stokiometrik eşitliklere dayanan, protein üretimini ve hücre büyümesini tanımlayan bir makrokinetik model geliştirmiştir (Ren vd. 2003). Bir sonraki çalışmalarında, bu modele dayanarak, μ ile rHSA üretimi arasındaki ilişkiyi incelemişler ve μ değerini belirlenen bir değerde sabit tutmak için doğrusal ve üstel artan metanol besleme profillerinin bir kombinasyonunu uygulamışlardır. Çalışmada aynı zamanda, sabit- μ kontrol stratejisinin, verimliliği en üst düzeye

çıkarmada sabit besleme hızından daha etkili olduğu ileri sürülmüştür (Ren ve Yuan 2005).

Sinha vd. (2003) metanolde hücre büyümesini substrat-besleme denklemi ile modellemişler ve *P. pastoris* fermentasyonunda substrat besleme stratejisinin, rekombinant protein indüksiyonu ve proteaz üretiminin kontrol edilmesinde anahtar rol oynadığını göstermişlerdir. Üstel artan besleme stratejisi ile 0,02-0,04 sa⁻¹ aralığında 5 farklı μ değerinde gerçekleştirilen fermentasyonlar sonucunda optimal μ değeri 0.025 sa⁻¹ olarak bulunmuştur (Sinha vd. 2003).

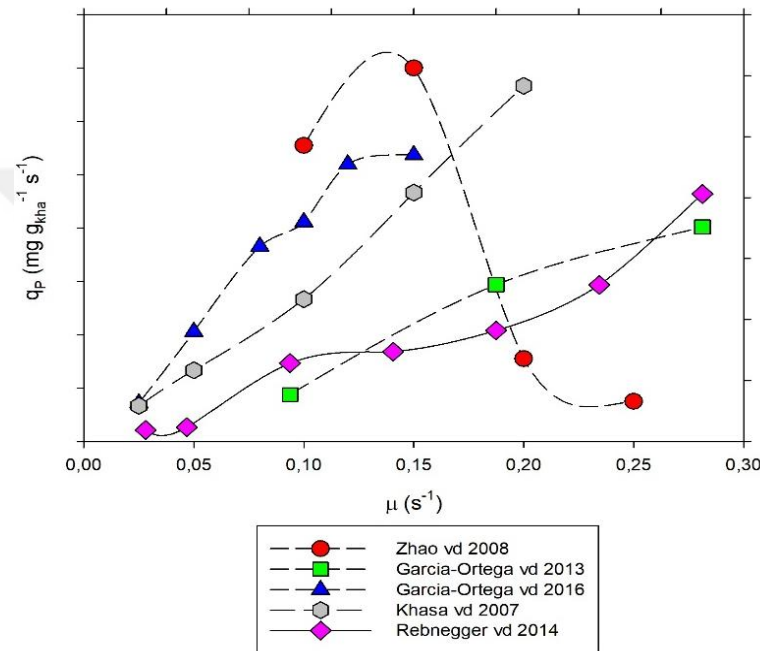
Trinh vd. (2003), fare endostatininin *P. pastoris*'te üretimi için üç farklı metanol besleme stratejisini karşılaştırmışlardır. İlk yöntem metanol konsantrasyonunu sabit tutmak (% 0,3 v/v), ikincisi ÇO değerine göre metanol konsantrasyonu % 0,3 olacak şekilde puls vermek, üçüncüsü ise μ değerini 0,02'de tutacak şekilde üstel artan besleme stratejisi şeklinde gerçekleştirilen yarı-kesikli fermentasyonlar sonucunda birim metanol ve birim biyokütle başına elde edilen ürünün sabit- μ stratejisinde diğerlerine göre iki kat daha yüksek olduğu bulunmuştur (Trinh vd. 2003).

Rekombinant galaktoz oksidaz üretiminde yüksek ve düşük μ değerlerinde üstel artan besleme stratejileri karşılaştırılmış ve düşük μ değerlerindeki üstel beslenme profilinin daha yüksek verimlilik ve ürün konsantrasyonuna yol açtığı bulunmuştur. Bir adım sonrasında yapılan optimizasyon çalışmasında ise optimum μ değeri 0,05 sa⁻¹ olarak belirlenmiştir (Anasontzis vd. 2014). Min vd. (2010) saxatilin üretimini farklı μ değerlerinde gerçekleştirmişler ve en yüksek verimi ve spesifik üretim hızını ortalama μ değerlerinde elde etmişlerdir. Yüksek μ değerlerinde substratın daha çok biyokütle üretmeye harcadığını ve protein sentezine daha az substrat kaldığı yorumunda bulunmuşlardır. Ayrıca sabit besleme ve iki aşamalı besleme stratejilerini uygulamışlar ve önce yüksek μ değerine göre belirlenmiş üstel besleme stratejisini müteakip düşük μ değerini sağlayan besleme profiline geçiş yapmanın fermentasyon süresini kısalttığı ve maksimum verimlere ulaşıldığı sonucu çıkarılmıştır (Min vd. 2010). Jacobs vd. (2010) GM-CSF üretiminde $\mu_{\max}$ değerinin %25, %50 ve %75 ve %100'ünde gerçekleştirdikleri üretimlerde maksimum biyokütle miktarına ve protein konsantrasyonuna sırasıyla %50 ve %25 $\mu_{\max}$ değerlerinde ulaşmıştır (Jacobs vd. 2010). Barrigon vd. (2013) üç farklı μ değerinde (0,015 sa⁻¹, 0,02 sa⁻² ve 0,045 sa⁻¹) *R. oryzae* lipaz (ROL) üretimini gerçekleştirmişler ve en yüksek enzim aktivitesi, hacimsel verim ve spesifik verimi 0,015 μ değerinde elde etmişlerdir (Barrigón vd. 2013).

Sabit- μ stratejisi, geribildirim kontrolü olmayan bir açık döngü kontrol stratejisidir ve bu nedenle proses kararlılığı açısından bazı zorluklarla karşılaşabilmektedir. Başlangıç koşullarındaki değişiklikler ve proses değişkenlerindeki bozulmalar substratın aşırı birikmesine neden olabilir. AOX1 kontrollü üretimlerde metanol birikmesi olasılığının önüne geçebilmek için üretimler genellikle maksimum spesifik üretim hızının altındaki μ değerlerinde gerçekleştirilir. Ayrıca yapılan çalışmalar birlikte değerlendirildiğinde AOX1 kontrollü üretimlerde verimlilik değerlerinin yükselen μ ile birlikte düşüşe geçtiği ve maksimum değerlerin genellikle düşük μ üretimleride (<0,02 sa⁻¹) ulaşıldığı görülebilir (Çizelge 2.2).

2.5.2. GAP promotoru kontrollü proseslerde üretim kinetiği

GAP promotoru kontrolünde yapılan üretimlerde üretim, hücre gelişimi ile ilişkili olarak gerçekleşir ve üretim kinetikleri genellikle $0,02-0,19 \text{ sa}^{-1}$ değerleri arasında incelenmiştir (Maurer vd. 2006a; Buchetics vd. 2011). Genellikle spesifik gelişim hızı maksimum değerine ulaşana kadar artan μ ile birlikte q_p değeri de lineer ya da gelişim ile orantılı bir şekilde artar (Şekil 2.7). GAP kontrollü üretimlerde maksimum verimlere genellikle $\mu_{\max}$ değerlerine yakın μ değerlerini sağlayan besleme profilleri ile yapılan üretimlerde ulaşılır (Çalik vd. 2015). Bununla birlikte yüksek μ değerlerinde sekresyon yollarının doygunluğa ulaştığını bildiren çalışmalar da bulunmaktadır (Zhao vd. 2008).



Şekil 2.7. GAP kontrolü altındaki farklı proteinlerin spesifik gelişim hızı (μ) ve spesifik üretim hızı (q_p) arasındaki ilişki [hGM-CSF (Khasa vd. 2007), Fab fragmenti (Garcia-Ortega vd. 2013, 2016), lipaz (Zhao vd. 2008) ve HSA (Rebnegger vd. 2014) proteinleri]

GAP kontrolü altında angiostatin üretimi için strateji geliştirilen bir çalışmada öncelikle besleme için en uygun karbon kaynağı araştırılmış ve gliserol, anjiyostatin sekresyonunda glukoz ve metanole göre daha iyi sonuç vermiştir. Hücrelerin kesikli fazda gliserolde geliştirildikten sonra yarı-kesikli fazda gliserol solüsyonu ile farklı hızlarda beslendiği çalışmada en yüksek verime en hızlı besleme profilinde ulaşılmıştır (Zhang vd. 2007).

İnsan granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktörünün (hGM-CSF) *P. pastoris* GAP kontrolü altında ekspresyonu, Khasa vd. (2007) tarafından sürekli sistemde bir dizi üretim gerçekleştirilerek incelenmiştir. Besleme çözeltisinin substrat konsantrasyonu etkisinin de incelendiği çalışmada ve en yüksek substrat konsantrasyonundaki besleme solüsyonu (4x) ile en yüksek spesifik gelişme hızında ($0,2 \text{ sa}^{-1}$) elde edilen hacimsel verimin ($16,4 \text{ mg/L/sa}$) 1x besleme solüsyonu ile en düşük hızda ($0,025 \text{ sa}^{-1}$) elde edilen verimden ($0,4 \text{ mg/L/sa}$) 40 kat daha fazla olduğu bulunmuştur. GAP promotoru ile üretim yapılırken

ürün oluşumunun büyüme-bağılantılı doğasını daha net ortaya koymak için spesifik gelişme hızlarındaki spesifik ürün oluşum hızları hesaplanmış, μ arttıkça q_p değerlerinin arttığı tespit edilmiş, ürün oluşumu ve gelişme hızı (seyreltme oranı) arasında güçlü bir ilişki olduğu rapor edilmiştir (Khasa vd. 2007).

Maurer vd. (2006) *P. pastoris* X33 GAP promotoru altında Fab fragmenti 2F5 hücre dışı üretimi için yarı-kesikli fermentasyon modeli geliştirmek üzere yaptıkları çalışmada sürekli kültürde $0,0086 \text{ sa}^{-1}$ ve $0,2 \text{ sa}^{-1}$ aralığında farklı dilüsyon oranlarında (D, sa^{-1}) q_p değerlerini elde etmişler ve dilüsyon oranı, yani μ arttıkça q_p değerinin arttığını göstermişlerdir. Yarı-kesikli proses için hacimsel verimliliği ($Q_p, \text{mg L}^{-1} \text{ sa}^{-1}$) maksimize etmek için geliştirdikleri modelde ise optimum besleme profili üstel ve lineer artan iki bölümden oluşmuştur. İlk bölümde spesifik gelişim hızı $\mu_{\max}$ ($0,2 \text{ sa}^{-1}$) değerinde sabit kalırken, beslemenin lineer arttığı ikinci bölümde μ giderek azalır (Maurer vd. 2006b).

Zhao vd. (2008) GAP kontrolünde lipaz üretimi için farklı spesifik gelişme hızlarında ($0,10, 0,15, 0,20$ ve $0,25 \text{ sa}^{-1}$) üretimler gerçekleştirmişlerdir. Maksimum hücre yoğunluğu ve lipaz aktivitesine $0,25 \mu$ değerinde ulaşılrken (sırası ile 447 g/L ve 2.302 IU/ml), hücresel verim (Y_{PX}) ve spesifik üretim hızı (q_p) $0,15 \mu$ değerinde en yüksek değerine ulaşmış ve en düşük q_p değeri maksimum μ değerinde elde edilmiştir (Zhao vd. 2008). Bu sonuç, GAP kontrolünde her zaman yüksek gelişim hızının yüksek verimlilikle sonuçlanmayabileceği, yüksek lipaz aktivitesinin nispeten düşük hücre büyüme hızlarında da elde edilebileceğini ortaya koymuştur.

Spesifik gelişme hızının insan antijen bağlayıcı fragman (Fab) üretimi üzerindeki etkisinin üstel beslenme stratejisi uygulanarak değerlendirildiği bir çalışmada glukoz üzerinde üç spesifik büyüme oranı araştırılmıştır ($0,05 \text{ sa}^{-1}, 0,1 \text{ sa}^{-1}$ ve $0,15 \text{ sa}^{-1}$). En yüksek hacimsel verimlilik $0,15 \text{ sa}^{-1}$ 'de elde edilmesine rağmen tüm gelişim hızlarında toplamda benzer ürün miktarları elde edilmiştir (Garcia-Ortega vd. 2013). Aynı grup tarafından daha sonra yapılan başka bir çalışmada, sürekli sistemde Fab üretimine $0,025 \text{ sa}^{-1}$ ile $0,15 \text{ sa}^{-1}$ arasında değişen spesifik gelişim hızlarının etkisi araştırılmıştır. Spesifik gelişim hızı arttıkça Fab üretim oranının sabit bir şekilde arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca, ilginç bir şekilde, üstel besleme sırasında kısa karbon açlık dönemlerinin uygulanmasının Fab üretimini arttırdığı tespit edilmiştir. Özellikle, 90 dakikada bir 30 dakikalık açlık süresi, standart işlemle karşılaştırıldığında Fab üretiminin %44,8 oranında artmasına neden olmuştur. Bu stratejinin Fab'ın salgılanmasına faydalı olan mekanizmasının açlık boyunca glikolitik yolların upregülasyonuna bağlı olabileceği yorumu yapılmıştır (Garcia-Ortega vd. 2016).

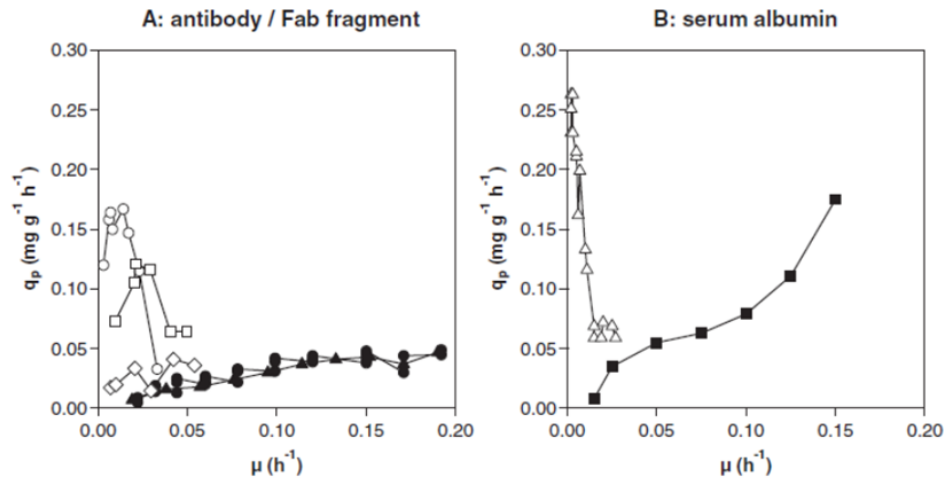
GAP kontrollü üretimlerde yüksek performanslı proses tasarlarlarken maksimum hıza yakın değerlerde gelişimi kontrol etmek ilk bakışta mantıklı görünse de, gelişimi hızlı başlatıp prosesin ilerleyen zamanlarında azalan bir şekilde kontrol etmekle de yüksek verimliliklere ulaşıldığı görülmüştür (Maurer vd. 2006b). GAP kontrollü üretimde genel üretim kinetiği trendinden uzak sonuçların elde edildiği enterokinaz üretilen başka bir çalışmada, hücreler yüksek hızda gelişirken enterokinaz enzim aktivitesi çok düşük değerlerde (1 U/ml 'den daha az) tespit edilmiştir. Bir tesadüf sonucu hücreler durgun faza ulaştığında yani yüksek hücre yoğunluğu, inhibe edici metabolitlerin birikimi veya bazı besin maddelerinin tükenmesi nedeniyle hücrelerin büyümesi çok yavaşladığında

enzimatik aktivite çok önemli ölçüde artmıştır. Yoğun büyüme sırasında heterolog enterokinaz ekspresyonu ile hücrenin fizyolojik süreçlerinin arasında bazı yarışmaların olduğu hipotezi öne sürülmüştür (Melicherová vd. 2017). Ayrıca yüksek μ değerlerinde yapılan üretimlerde, hücre gelişimi hızlı olduğundan sistemin sınırlarına da çok hızlı ulaşılır. Bu nedenle *GAP*-kontrollü üretimlerin düşük spesifik gelişim hızlarında da ($<0,1 \text{ sa}^{-1}$) üretimini arttırmaya yönelik suş mühendisliği çalışmaları yapılmaktadır (Buchetics vd. 2011).

2.5.3. *GAP* ve *AOX1* kontrollü proseslerin üretim kinetiği açısından karşılaştırılması

P. pastoris ekspresyon sisteminde promotorun ve üretilen proteinin, üretim kinetiğine etkisinin anlaşılması bakımından literatürdeki üretim kinetikleri belirlenmiş olan proteinlerden iki tanesi (Fab-fragmenti ve serum albümin proteinleri) temsilci olarak seçilerek farklı çalışmalarda veriler Şekil 2.8’de biraraya getirilmiştir (Looser vd. 2014). *GAP* promotoru altında üretimleri yapılan anti-HIV antikor 2F5’in Fab fragmenti (Maurer vd. 2006b) ve insan antikor 3H6’nın Fab fragmentinin (Buchetics vd. 2011) sürekli proseste glukoz beslemesi ile yapılan üretimlerinden elde edilen q_p verileri karşılaştırılabilir bulunmuştur (Şekil 2.8.A). *GAP* promotorunun kontrolü altında gerçekleşen her iki hücre-dışı üretimin hücre gelişimi ile olan ilişkisi hiperbolik bir trend göstermiştir. Bu bulguların tam aksine metanol beslemesi ile *AOX1* kontrolü altında gerçekleştirilen glikozile antikorun (ağır ve hafif zincirli IgG1) üretiminde q_p ile μ arasında negatif ilişki olduğu tespit edilmiştir (Potgieter vd. 2010). Metanolün substrat olarak kullanıldığı antikor üretimlerinde, *GAP* kontrolünde üretilen Fab fragmentlerine göre çok daha düşük gelişim hızlarında maksimum spesifik üretim hızlarına ulaşılmıştır. Serum albümin için de aynı şekilde metanol ve glukozla yapılan üretimlerde farklı üretim kinetikleri tespit edilmiştir (Şekil 2.4.B). *AOX1* kontrolünde yapılan üretimlerde gelişimle ters orantılı üretim verimlilikleri elde edilirken (Kobayashi vd. 2000) *GAP* kontrolünde glukoz ile yapılan üretimlerde gelişimle pozitif orantılı ürün oluşumu rapor edilmiştir (Rebnegger vd. 2014) (Çizelge 2.2).

Bu iki örnek proteine ait verilerden anlaşıldığı üzere benzer ya da aynı rekombinant proteinler kullanılan promotora (*AOX1* ya da *GAP*) ya da proses parametrelerine göre farklı üretim kinetiklerine sahip olabilmektedir. Esas olarak farklı proteinlerin aynı tasarıma sahip suşlarda ve aynı kültür koşulları altında (yani, promotor ve substrat kombinasyonu) yapılan üretimlerde üretim kinetikleri daha fazla benzerlik göstermiştir (Şekil 2.8). Bu nedenle, henüz karakterizasyonu yapılmamış suşlar için proses geliştirirken, uygulanacak olan substrat ve strateji kombinasyonuna kullanılan promotora ve suş özelliklerine göre karar verilmelidir.



Şekil 2.8. AOX1 ve GAP kontrollü ekspresyonların üretim kinetikleri. Hücre dışı üretilen antikor/Fab fragmentleri (A) ve insan serum albümininin (B) yayınlanmış üretim kinetikleri. AOX1 promotörü altında metanol ile üretilenler (boş semboller) ve GAP promotörü altında glukoz ile üretilenler (siyah semboller). (○) Potgieter vd. 2010, (◇) Yamawaki vd. 2007, %10 sabit-ÇO, (□) Yamawaki vd. 2007, 3,9 g/L sabit-metanol, (●) Maurer vd. 2006, (▲) Buchetics vd. 2011, (Δ) Kobayashi vd. 2000, (■) Rebnegger vd. 2014 (Looser vd. 2014).

AOX1 kontrollü protein üretimlerinde ürün oluşum kinetiği GAP-kontrollü üretimlerden farklı olarak genellikle çan şeklinde bir eğilim sergiler. Şimdiye kadar, farklı ekspresyon sistemleri arasındaki sekresyon kinetiği açısından farklılıklara neden olan faktörler tam olarak aydınlatılabilmemiş değildir. Hücreler metanolde gelişirken, *P. pastoris*'in fizyolojisinde, metanol metabolizmasında yer alan proteinlerin kuvvetli upregülasyonu, aminoasit sentez hızındaki artış, daha yüksek translasyonel aktivite gibi önemli değişiklikler meydana gelir (Russmayer vd. 2015). Spesifik gelişim hızı arttıkça üretim hızının azalması, rekombinant proteinin promotor ve gen kopya sayısına bağlı olarak çok yüksek ifadesi nedeniyle sekresyon yolunun doygunluğu ya da doğrudan metanol ile ilişkili olabilir. Metanolün yüksek konsantrasyonları hücrelere toksik hale gelir ve bu durumun yüksek gelişim hızlarında protein sekresyonu üzerinde bir etkisi olabilir (Ren ve Yuan 2005). Karakterizasyonu yapılmamış bir suş için proses tasarımı yapılırken AOX1 kontrollü üretimlerde yarı-kesikli fermantasyonlar $\mu_{\max}$ değerinin sırasıyla %30'u, %50'si ve %10'u değerlerinde sabit olacak şekilde uygulanan üstel beslemeler ile gerçekleştirilebilir. Yüksek verimlilik değerlerine ulaşmak için öncelikle düşük spesifik gelişim hızları ($<0,04 \text{ sa}^{-1}$) tercih edilebilir. GAP kontrolündeki üretimlerde ise %25, %50, %75 ve $\mu_{\max}$ değerlerinde yarı-kesikli 4 fermantasyon ile üretim kinetiği verileri elde edilebileceği önerilmektedir (Looser vd. 2014).

Genel olarak, her rekombinant protein için uygulanabilecek bir ekspresyon sistemi ve optimum bir yetiştirme stratejisi olmadığı, neredeyse her üretim optimizasyonunun bireysel yaklaşımına ihtiyaç duyduğu ve en uygun üretim koşullarının çoğu durumda ancak deneysel olarak tespit edilebileceği bilinmektedir.

Çizelge 2.2. AOX1 ve GAP promotoru altında üstel besleme (sabit- μ) stratejisi ile gerçekleştirilen sürekli ve yarı-kesikli proseslerin üretim kinetiği verileri

Ürün	Promotor	Substrat	Besleme stratejisi	Kinetik	μ (sa ⁻¹)	$\mu(q_{pmax})$ (sa ⁻¹)	q_{pmax} (mg/g) IU/g	Ref
Fab fragment 3H6	GAP	Glu	Sürekli	Gelişimle pozitif korelasyon	0,02-0,19	0,19	0,05	(Buchetics vd. 2011)
Fab fragment anti-HIV antikor 2F5	GAP	Glu	Sürekli	Gelişimle pozitif korelasyon	0,02-0,19	0,19	0,049	(Maurer vd. 2006b)
Lipaz	GAP	Glu	Yarı-kesikli	Çan şeklinde	0,10-0,25	0,15	84,0x10 ³	(Zhao vd. 2008)
Fab fragment	GAP	Glu	Yarı-kesikli	Gelişimle pozitif korelasyon	0,05-0,15	0,15	35,2x10 ⁻³	(Garcia-Ortega vd. 2013)
Fab 2F5	GAP	Glu	Sürekli	Gelişimle pozitif korelasyon	0,025-0,15	0,15	47x10 ⁻³	(Garcia-Ortega vd. 2016)
hGM-CSF	GAP	Glu	Sürekli	Gelişimle pozitif korelasyon	0,02-0,20	0,20	0,49	(Khasa vd. 2007)
HSA	GAP	Glu	Sürekli	Gelişimle pozitif korelasyon	0,015-0,15	0,15	0,17	(Rebnegger vd. 2014)
Antikor IgG1	AOX1	M	Yarı-kesikli	Çan şeklinde	0,003-0,03	0,014	0,17	(Potgieter vd. 2010)
İnsülin precursor	AOX1	M	Yarı-kesikli	Çan şeklinde	0,003-0,023	0,016	0,1	(Hang vd. 2008)
GM-CSF	AOX1	Glu	Yarı-kesikli	Gelişimle negatif korelasyon	0,015-0,062	0,015	179*	(Jacobs vd. 2010)
İnterferone	AOX1	M	Yarı-kesikli	Çan şeklinde	0,02-0,04	0,025	22,7	(Sinha vd. 2003)
İnsan serum albumini	AOX1	M	Yarı-kesikli	Gelişimle negatif korelasyon	0,002-0,027	0,002	0,26	(Kobayashi vd. 2000)
Saxatilin	AOX1	M	Yarı-kesikli	Gelişimle negatif korelasyon	0,004-0,021	0,004	0,023	(Min vd. 2010)
scFV fragment	AOX1	M	Sürekli	Çan şeklinde	0,009-0,05	0,02	0,12	(Yamawaki vd. 2007)
A-galaktosidaz	AOX1	M	Yarı-kesikli	Çan şeklinde (kompleks)	0,0015-0,06	0,03	0,42	(Zhang vd. 2005)
Chymotrypsinogen B	AOX1	M	Sürekli	Gelişimle pozitif korelasyon	0,04-0,08	0,08	0,24	(Curvers vd. 2001)
Avidin	AOX1	M	Sürekli	Gelişimle pozitif korelasyon	0,03-0,12	0,12	0,03	(Jungo vd. 2006)

*Verilen diğer değerlerden hesaplama yapılarak bulunmuş değerlerdir.

2.6. Normoksik ve Hipoksik Koşullarda Rekombinant Protein Üretimi

Biyoproses dizaynı yapılırken hem ekonomik hem de teknik koşulların gözönünde bulundurulması gerekir. Yüksek hücre yoğunluğuna sahip üretimler, biyokütlenin fermentasyon sonrası işlemlerde ayrıştırılması gibi zorlukları beraberinde getirir (Meyer vd. 2016). Ayrıca yüksek hücre yoğunluğunda gerçekleştirilen büyük ölçekli üretimlerde (>130 g/L kha), özellikle oksijen transferi en önemli kısıtlayıcı faktörlerden biri haline gelir (Baumann vd. 2008).

Oksijen, maya dahil tüm ökaryotik hücrelerde birçok biyokimyasal reaksiyon için kritik öneme sahiptir. Moleküler oksijen, solunum yolağındaki en son elektron alıcısı olarak görev yapar. Ayrıca oksijene, hücre içindeki steroller ve doymamış yağ asitleri gibi metabolitlerin sentezi için ihtiyaç vardır. Oksijen kısıtlanmasına uyum sağlamak hücrelerin hayatta kalması için gerekli olmakla birlikte aynı zamanda hücrede önemli metabolik, fonksiyonel ve yapısal değişiklikleri beraberinde getirir. Hücrelerin kullanabileceği oksijen miktarı azaldığında solunum hızlı bir şekilde düşer, karbon kaynağının fermentatif disimilasyonu için metabolizma yeniden programlanır. Bu metabolik değişiklikler ve ayarlamalar bazı metabolitler (*P. pastoris*'te etanol ve arabitol) hücre dışına salgılandığından kolayca tespit edilebilir (Carnicer vd. 2009). Özetle, oksijen kısıtlanması, hücrelerin metabolik akılarını hücresel solunumdan fermentasyona yeniden ayarlamasını gerektirerek, hücrenin gelişimi, protein üretimi, hücrenin içerisindeki redoks reaksiyonları ve proteinin katlanması gibi bir dizi olayı etkiler (Delic 2012).

Pichia pastoris'in oksijen gereksinimi kullanılan hangi karbon kaynağında geliştiğine göre değişiklik gösterir. Metanolün moleküler oksijen ile oksidasyonu, hem enerji üretimi hem de karbon asimilasyonunun ilk basamağıdır. Metanolün tek karbon kaynağı olarak kullanıldığı AOX1 promotörü altında yapılan üretimler tamamen aerobik olarak gerçekleştirilir ve çözünmüş oksijen konsantrasyonu (ÇO) sabit karıştırma hızında %20-30 aralığında tutulmaya çalışır. Prosesin ilerlemesi ve artan hücre yoğunluğu ile birlikte artan oksijen talebini karşılayabilmek için sisteme gerektiğinde hava ile karıştırılarak saf oksijen gazı verilmektedir (Lee vd. 2003).

Glukozun karbon kaynağı olarak kullanıldığı GAP promotörü altında yapılan üretimler için de %20-30 aralığında çözünmüş oksijen seviyeleri uygulanmakta, üretim optimizasyonları çoğunlukla aerobik koşullarda gerçekleştirilmektedir. Bununla birlikte, hem AOX1 (Trentmann vd. 2004; Charoenrat vd. 2005) hem de GAP kontrollü üretimlerde (Baumann vd. 2008) oksijen kısıtlamasının verimlilik üzerine olumlu etkilerinin olduğunun keşfedilmesi ile birlikte, hipoksik koşulların hücre gelişimi, substrat kullanımı ve üretim kinetiğine olan etkisinin her yönüyle aydınlatılabilmesi için sistematik çalışmalar yapılmaya başlanmıştır.

Rekombinant protein ekspresyonu ATP gerektiren çok aşamalı bir metabolik süreçtir. Bu nedenle kültür ortamındaki oksijen seviyesinin normoksik atmosferik seviyelerden (%20 ÇO) hipoksi seviyelerine (~%0 ÇO) azalması ile hücrelerin fermentatif metabolizmaya geçiş yapması ve böylelikle protein sentezinin ve hücre dışına salgılama mekanizmasının bir şekilde etkilenmesi beklenir.

Tek zincir antikör (scFv) proteininin *AOX1* promotorunun kontrolünde substrat-doygun şartlarda üretilirken farklı oksijen değerlerinin deneildiği çalışmada, ortama saf oksijen verilmediği ve CO değerinin 0'lara kadar düşmesine izin verildiği durum, oksijen takviyesi yapılarak CO değerinin % 40'larda tutulmaya çalışıldığı duruma göre daha stabil bir üretim süreci ve 65 saatlik prosesin sonunda daha fazla ürün (oksijen-kısıtlı 1065 mg iken oksijen beslemeli 688,5 mg liyofilize scFv) elde edilmesi ile sonuçlanmıştır. Oksijen-kısıtlı prosesin sonunda daha az substrat harcanarak daha az hücre yoğunluğuna ulaşıldığından (357 g yha/L) hücre başına üretilen protein miktarı (374 mg/kg) oksijen beslemeli stratejide ulaşılan değerin (170 mg/kg) 2 katından fazla gerçekleşmiştir (Trentmann vd. 2004).

Rekombinant β -glukozidaz enziminin *AOX1* promotoru altındaki üretiminin yarı-kesikli fazında; oksijen-kısıtlı ve substrat-kısıtlı üretim stratejilerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada oksijen kısıtlamasına gidilmesinin hücre gelişimini sınırladığı, böylelikle ortamda yüksek metanol konsantrasyonunun sağlandığı ve *AOX1* promotorunun daha fazla tetiklendiği, oksijen transfer hızının arttığı ve dolayısıyla enzim üretiminin arttığı gösterilmiştir (Charoenrat vd. 2005). Hücrelerin canlılığı her iki strateji için de %90-95 aralığında benzer bir şekilde gerçekleşmiş, ayrıca hücre dışına salgılanan toplam protein kısıtlı oksijen stratejisinde daha az olduğundan **% 64 daha saf enzim elde edilmiş** ve üretim sonrası saflaştırma aşamalarında çok büyük bir avantaj sağlanmıştır (Charoenrat vd. 2005).

Khatrı ve Hoffmann (2006) oksijen kısıtlı koşullarda metanol konsantrasyonunun tek-zincir antikör fragmenti (scFv) üretimini çok güçlü bir şekilde etkilediğini göstermişlerdir. Oksijenin yokluğunu dengelemek, protein üretimini tamamen tetiklemek ve aynı zamanda biyokütle oluşumunu azaltmak için yüksek metanol konsantrasyonuna gerek vardır. %0,3, %1 ve %3 metanol konsantrasyonlarında yapılan oksijen-kısıtlı üretimlerde sırasıyla 60, 150 ve 350 mg/L ürün konsantrasyonlarına ulaşılmıştır. Oksijen verilerek yapılan üretimlerde ise metanol konsantrasyonu ürün konsantrasyonunu etkilememiştir (300-400 mg/L). Oksijen kısıtlı şartlarda yüksek metanol konsantrasyonunda elde edilen ürün konsantrasyonu, oksijen verilerek yapılan üretimlerdeki kadar yüksek bulunmuştur. Bu üretim stratejisinin en büyük avantajı proste oksijenin kullanılmaması olarak belirtilmiştir (Khatrı ve Hoffmann 2006).

Hücrelerin metanolde gelişmesi aerobik bir proses olduğundan oksijen limitasyonu ortama verilen metanolden bağımsız olarak hücre gelişiminin sınırlanması ile sonuçlanır (Charoenrat vd. 2005). Glukozun substrat olarak kullanıldığı *GAP* kontrollü üretimlerde ise oksijen kısıtlaması substrat tüketimini kısıtlamaz, hücrenin alternatif bir metabolik yola geçerek yan-ürün (etanol ve arabitol) oluşturmalarını sağlar (Carnicer vd. 2009). *GAP* promotoru altında yapılan rekombinant protein üretimi esnasında oksijen kısıtlamasına gidilmesinin (hipoksik şartlarda) protein üretimini arttırdığını gösteren ilk çalışma Baumann vd. (2008) tarafından yapılmıştır. Kemostat çalışmalarında biyoreaktöre giren havanın oksijen konsantrasyonunun N_2 gazı ile karıştırılarak ayarlanması ile normoksik (%21), oksijen-kısıtlı (%11) ve hipoksik (%8,4 ve %5,9) şartlar oluşturulmuştur. Oksijen-kısıtlı ve hipoksik şartlarda % CO konsantrasyonu 0 iken, normoksik şartlarda %45'lerde seyretmiştir. Oksijen-kısıtlı koşullarda, reaksiyon sıvısında % CO konsantrasyonu ölçülebilir oranların altında kalmasına rağmen hücreler tam aerobik glukoz metabolizmasını gerçekleştirebilirler. Hipoksik koşullarda ise şartlar metabolizmanın fermentatif yolağa kaymasına neden olmuş, biyokütle miktarı azalmış ve

önemli seviyelerde etanol (%0,582) oluşmuştur. Hipoksik koşullarda beklenmedik bir şekilde spesifik üretim hızında (q_p) bir artış gözlenmesi ile proses verimini arttırmak üzere yarı-kesikli üretim sistemleri için hipoksik bir protokol geliştirmişlerdir. Fermantatif metabolizmayı belli bir seviyede kontrol altında tutmak için hipoksik koşullarda hücreler tarafından glukozdan üretilen etanolü sabit tutacak şekilde geribildirim kontrollü bir besleme stratejisi uygulamışlardır. Etanol biyoreaktörün çıkış gazından ölçülmüş ve glukoz solüsyonunun besleme hızı ayarlanarak %1 değerinde sabit tutulmuştur. Üretim verileri normoksik koşullarda sabit beslemeli standart protokolün uygulandığı üretim ile karşılaştırıldığında hipoksik koşulların spesifik verimi arttırdığı, ve hacimsel verimi (Q_p) iki katına çıkıdığı rapor edilmiştir (Baumann vd. 2008).

Aynı grup tarafından gerçekleştirilen müteakip çalışmada, oksijenin rekombinant *P. pastoris* fizyolojisine etkisi transkriptomik, proteomik, metabolik akı ve metabolomik verilerinin birleştirilmesi ile incelenmiştir (Baumann vd. 2010). Bu çalışmada hipoksik koşullarda **glikoliz ve oksidatif olmayan pentoz fosfat (PPP) yollarının transkripsiyonel indüksiyonunun** yanısıra **TCA döngüsünün baskılandığı** ortaya koyulmuştur. Hücrelerin makromoleküler ve elementsel analizlerinin yapılması ile normoksia'dan hipoksia'ya doğru gidildikçe toplam protein içeriğinin (özellikle hücre dışı protein) ve toplam lipid miktarının arttığı (triasilgliseritlerin relatif miktarları artarken ergosterolde azalma), karbonhidrat miktarının ise azaldığı rapor edilmiştir (Carnicer vd. 2009).

S. cerevisiae (Crabtree pozitif) ve *P. pastoris* (Crabtree negatif) gen ekspresyon profillerinin, *GAP* promotörü altında rekombinant protein (Fab3H6) üreten kemostat koşullarında üç farklı oksijenasyon koşulu (normoksik, kısıtlı-oksijen ve hipoksik) için karşılaştırmalı analiz edildiği bir sonraki çalışmada crabtree negatif ve crabtree pozitif mayaların oksijen mevcudiyetine farklı adaptasyon tepkileri verdiği ortaya koyulmuştur. Oksijen miktarının, hücrenin **ergosterol biyosentezini, merkezi karbon metabolizmasını** ve özellikle **katlanmamış protein cevabı (UPR)** başta olmak üzere **stres tepkilerini** güçlü bir şekilde etkilediği gösterilmiştir. Çalışmada düşük oksijen seviyelerinin *S. cerevisiae* mayasının transkriptomunu *P. pastoris*'e göre daha az etkilediği gösterilmiş ve bu durumun oksijen kısıtlamasına karşı *S. cerevisiae*'nin toleransının ve fermentasyon kapasitesinin daha yüksek olmasından kaynaklandığı ileri sürülmüştür (Baumann vd. 2011).

Bazı sonuçlar özellikle değişen lipid metabolizmasının (ergosterol biyosentezi ve membranın yeniden modellenmesi) protein sekresyonunu etkileyebileceğini göstermiştir. Hipoksik koşulların, rekombinant protein sekresyonunu önemli ölçüde arttırdığı *P. pastoris*'te lipid metabolizmasında da çok belirgin yeniden yapılanmalara yol açması, suş mühendisliği için yeni genlerin hedef gösterilmesini sağlamıştır (Baumann vd. 2010). Lipid metabolizması, UPR ve protein sekresyonu arasındaki ilişkilerin daha iyi anlaşılabilmesi için rekombinant *P. pastoris* suşunun hipoksik koşullarda lipidom analizleri yapılmıştır. Lipid kompozisyon analizlerinin daha önceki transkriptom veri setleri ile birleştirilerek değerlendirilmesi ile oksijen kısıtlamasının lipid metabolizmasında yol açtığı yeniden modellemelerin açıklanması sağlanmıştır. Oksijen oranındaki düşme ile birlikte hücrelerin membran kompozisyonlarını sterol ve sifingolipid oranlarını değiştirerek ayarladıkları gösterilmiştir. Kemostat koşullarında gerçekleştirilen çalışmada hipoksik şartlar Fab konsantrasyonunda (mg/L) ve spesifik Fab üretim hızında (q_p , $\text{mg}_{\text{Fab}} \text{g}_{\text{kha}} \text{sa}^{-1}$) 2 kat artışa yol açmıştır (Adelantado vd. 2017).

Hipoksik şartların *P. pastoris* rekombinant protein üretimine etkisini inceleyen çalışmaların bir tanesi hariç (Baumann vd. 2008) tamamı kemostat sisteminde giriş havasının oksijen konsantrasyonlarının belli değerlere ayarlanarak sisteme verilmesi şeklinde besleme hızı sabit ($D = 0,1 \text{ sa}^{-1}$) olarak gerçekleştirilmiştir (Carnicer vd. 2009; Baumann vd. 2010, 2011; Adelantado vd. 2017). Yarı-kesikli sistemde gerçekleştirilen hipoksik üretim protokolünün oluşturulduğu tek çalışmada ise etanol değeri %1'de sabit tutulacak şekilde geribildirimli besleme stratejisi uygulanmış ve karşılaştırmalar sabit-besleme stratejisinin uygulandığı standart protokole göre yapılmıştır.

Bu doktora tezi çalışması kapsamında farklı hipoksi seviyelerinin rekombinant *P. pastoris* suşunun yarı-kesikli üretim kinetiğini nasıl etkilediği ilk kez araştırılmıştır. Oksijen kısıtlamasına gidildiğinde hücreler tarafından glukozdan üretilen etanol konsantrasyonlarının farklı değerlerde sabit kalmasını sağlayacak şekilde geribildirim kontrollü besleme yapılarak farklı hipoksi koşulları oluşturulmuş ve gerçekleştirilen üretimlerin hücre gelişim ve üretim kinetik parametreleri hesaplanmıştır.

Aynı zamanda, spesifik gelişim hızının üretime olan etkisinin araştırılması için farklı μ değerlerinde üretimler gerçekleştirilmiştir. Hipoksik üretime atfedilen avantajların gerçek boyutlarının belirlenebilmesi için normoksik koşullardaki en verimli üretim prosesi ile hipoksik üretimlerin karşılaştırılması yapılmıştır.

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Çalışmada Kullanılan Üretim Suşu

Çalışmada, rekombinant *Aspergillus niger* ksilanaz enzimini (*XylB*), yapısal *GAP* (gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz) promotörü (*pGAP*) kontrolünde, *PIR* sinyal sekansı altında hücre dışı üreten, zeosin direnç genine sahip *P. pastoris* X33 (yabanıl) üretim suşu (*X33 pGAPZ-PIR-Ksi*) kullanılmıştır. Kullanılan üretim suşu BAP B Tipi Araştırma Projesi (No: 2012.01.0200.003) kapsamında laboratuvarımızda geliştirilmiştir. Suşun nasıl elde edildiği aşağıda özetlenmiştir:

- *A. niger* *Ksilanaz B* geni (DQ174549.1) GenScript (Piscataway, NJ) tarafından sentezlenmiş ve liyofilize olarak pUC57 plazmidi üzerinde (pUC57-KSL) elimine edilmiştir. Plazmit, üretici firma talimatları doğrultusunda sulandırılmış ve *E. coli* XL1-Blue hücrelerine transform edilerek donmuş kültürleri hazırlanmış ve -80 °C'de muhafaza edilmiştir.
- Hücre dışı ksilanaz üretim klonu için oluşturulan **pGAPZ-PIR1-KSL** ekspresyon vektörünün elde edilmesi için öncelikle *PIR1* geninin yalnızca sekresyon sinyal sekansı PZR ile amplifiye edilmiştir. X33 genomik DNA'sı kalıp olarak kullanılmış, *PIR1SfuI* (5'-TATTCGAAACGATGTACAGGAACCTTAATAATGC-3') ve *PIR1REcoRI* (5'-GGGAATTCTCTCTTAATCTTGTCGGCATC-3') primerleri ile çoğaltılan fragmentin *SfuI* ve *EcoRI* enzimleri ile kesilerek pGAPZA vektörüne ligasyonu yapılmıştır. pGAPZ-PIR1 olarak adlandırılan bu vektöre, pUC57-KSL plazmidinden *EcoRI* ve *NotI* enzimleri ile kesilerek agaroz jelden izole edilen *Ksilanaz* geninin ligasyonu yapılarak pGAPZ-PIR1-KSL ekspresyon vektörü elde edilmiştir.
- Elde edilen ekspresyon vektörü *E. coli* hücrelerine aktarılmış, zeosinli plakalardan seçilimi gerçekleştirilen klonların plazmit izolasyonları yapılmış ve restriksiyon analizi ile vektörlerin doğrulaması yapılmıştır.
- *P. pastoris* X33 elektro-kompetent hücreler Wu ve Letchworth (2004) tarafından kullanılan metoda göre hazırlanmıştır. Ekspresyon vektörü pGAPZ-PIR1-KSL *AvrII* restriksiyon enzimi ile lineer hale getirilmiş, elektro-kompetent *P. pastoris* X33 hücrelerine elektroporasyon (Eppendorf-2510) tekniği ile transformasyonları yapılmıştır. Transformant hücreler farklı zeosin konsantrasyonları (50, 100, 500, 1000 µg/ml) içeren YPD (%1 maya ekstraktı, %2 pepton, %2 glukoz, %1,5 agar) plakalarına ekilerek ve 30°C'de 2-3 gün inkübe edilmiştir. 3 günlük inkübasyondan sonra oluşan koloniler arasında 17 adet klon seçilmiştir. Seçilen klonlara YPDS plakalarda teke düşürme çizimleri yapılmıştır. 3 günlük inkübasyon sonrasında oluşan kolonilerden -80 stok kültürleri hazırlanmıştır. Bu tez kapsamında kullanılmak üzere çalkalamalı erlenlerde yapılan ekspresyon çalışmaları sonucunda en yüksek ksilanaz aktivitesini veren klon (*X33 pGAPZ-PIR-Ksi#6*) seçilmiştir.

3.2. Hücre Bankasının Hazırlanması

Ana stok kültürden (-80°C'de muhafaza %25 gliserol içeren kültür) YPD plakalara tek koloni düşürecek şekilde çizim yapılmış ve 28°C inkübatörde 3 gün geliştirilmiştir.

Oluşan tek kolonilerden bir tanesi 3 ml YPD sıvı besiyerine ekilmiş ve 28°C çalkalamalı inkübatörde geceboyu geliştirilmiştir. Daha sonra bu kültürden BYED (%3 maya ekstraktı, %2 glukoz, %1,34 YNB, 100 mM potasyum fosfat tamponu pH 6,0, %4x10⁻⁵ biotin) besiyerine başlangıç OD'si 0,1 olacak şekilde ekim yapılmış, OD değeri 10-12 olana kadar 28°C 225 rpm çalkalamalı inkübatörde geliştirilmiştir. 3:1 oranında %80 gliserol ile karıştırılan kültür, tüplere 1'er ml bölüştürülerek -80°C'de muhafaza edilmişlerdir.

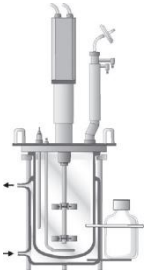
3.3. İnokulumun Hazırlanması

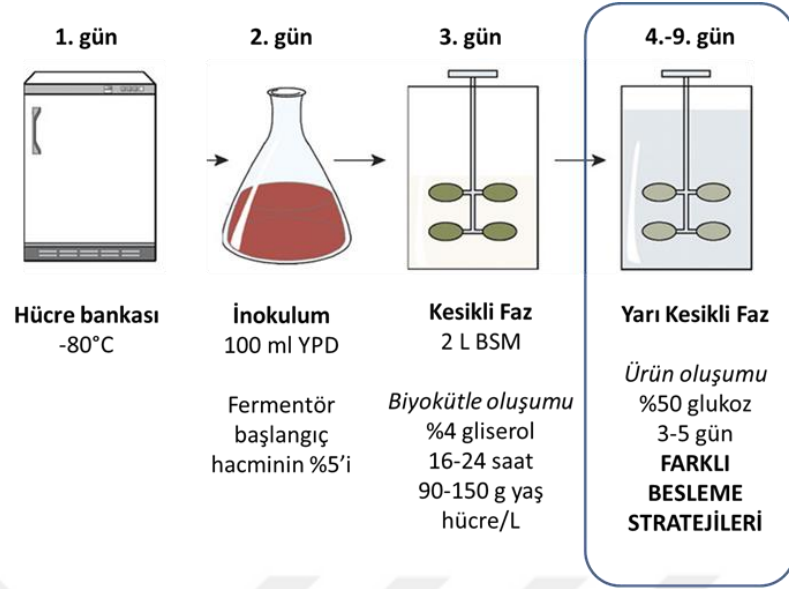
1 ml hücre bankası çözülerek 100 ml BMGY besiyeri (%1 maya özütü, %2 soytan; 0,1 M potasyon fosfat tamponu pH 6,0, %1,34 YNB, %2 gliserol) içeren engelli erlenlere ilave edilmiştir. Maya kültürü, 600 nm'deki optik yoğunluğu 8-10 oluncaya kadar çalkalamalı inkübatörde yaklaşık 15 saat geliştirilmiştir. Gelişimini tamamlayan 100 ml inokulumun tamamı, 2 L başlangıç besiyeri içeren fermentöre aseptik olarak aktarılmıştır.

3.4. Biyoreaktör çalışmaları

Fermantasyon çalışmaları iki hazneli 5 L Biostat B (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Almanya) biyoreaktöründe **Kesikli** ve **Yarı-kesikli** olmak üzere 2 aşamada gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.1 ve Şekil 3.2). Yaklaşık 20 saat süren kesikli faza 2 L besiyeri ile başlanmış, yarı-kesikli fazda toplam 2.000 gr besleme solüsyonunun (~1.600 ml %50 glukoz solüsyonu) eklenmesi ile maksimum çalışma hacmine ulaştığında fermentasyon sonlandırılmıştır. Çalışmanın gerçekleştirildiği biyoreaktöre ait parametreler Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan Biostat B (Sartorius Stedim Systems, Almanya) sisteminin biyoreaktör parametreleri

	Biyoreaktör parametreleri	Sembol	Değer	Birim
	Brüt hacim	V_b	6,6	L
	Net hacim	V_n	5	L
	Çalışma hacmi	V	0,6-5	L
	Yükseklik:çap	$H:D_R$	2:1	-
	Karıştırıcı disk çapı	D	64	mm
	Karıştırıcı hızı		20-1.500	rpm
	Kültür yoğunluğu	ρ	1100	kg L ⁻³



Şekil 3.1. Çalışmada gerçekleştirilen yarı-kesikli proseslerin genel hatları



Şekil 3.2. Çalışmadaki yarı-kesikli fermentasyonların gerçekleştirildiği Biostat B Twin (Sartorius Stedim Systems, Almanya) fermentörü genel görünüş

Sistemin sahip olduğu proses kontrolünü sağlayan sensörlerin listesi Çizelge 3.2’de yer almaktadır. Çözünmüş oksijen, pH, sıcaklık, karıştırıcı hızı, köpüklenme, hava ve oksijen hızı, besleme hızı proses süresince kontrol edilebilen parametrelerdir. Ana oksijen kaynağı olarak sisteme kompresör tarafından sağlanan hava kullanılır. Hava oksijeninin yeterli gelmediği durumlarda, hava %0-100 aralığında saf oksijen ile karıştırılarak verilir. Oksijenin fermentasyon ortamına homojen olarak dağılımını sağlamak için biyoreaktörün içinde 4 engel bulunur. Ayrıca hava fermentasyon ortamına hava dağıtıcısı aracılığı ile verilerek havanın sıvı içerisinde baloncuklar şeklinde dağılması sağlanır. Karıştırma işlemi, 2 adet 6 kanatlı disk takılı olan karıştırıcı tarafından gerçekleştirilir. Ortamın pH’sı sensör aracılığı ile ölçülür ve ayar değerinde sabit kalması için dahili pompa ile ortama baz solüsyonu ilave edilir. Proses ilerledikçe hücre parçalanmasından kaynaklanan köpüklenmeler köpük sensörü ile tespit edilir, sensöre köpük değmesi ile birlikte %5 antifoam solüsyonu (Antifoam C Emulsion, Sigma A8011) sisteme dahili pompa aracılığı ile eklenir. Sıcaklık sensörü tarafından ölçülen kültür sıcaklığının ayar değerinde sabit kalması için harici bir soğutucu tarafından biyoreaktörün ceketine soğutma ajanlı su akışı olmaktadır. Besleme çözeltisi, biyoreaktör kontrol sistemine bağlı harici bir peristaltik pompa (Watson Marlow 120U, İngiltere) aracılığı ile kontrollü bir şekilde biyoreaktöre verilir.

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan Biostat B (Sartorius Stedim Systems, Almanya) sisteminde proses kontrolünü sağlayan sensörler

Sensör	Tanım	Ölçüm aralığı (doğruluk değeri)
Sıcaklık	Termovelli paslanmaz çelik	0-150°C (kontrol aralığı 0-80°C) (0,1°C)
Çözünmüş O₂	OxyFern FDA VP 120 (Hamilton, İsviçre)	%0-100 (%0,1)
pH & Redoks	EasyFerm Plus VP 120 (Hamilton, İsviçre)	0-14 pH (0,01 pH) -1.000 – 1.000m mV (1 mV)
Köpük kontrolü	Elektrik iletken sensör, seramik kaplı paslanmaz çelik	
Tartı	PMA7501-000W (Sartorius Weighing Technology GmbH, Almanya)	Max 7 kg (1 gr)
Çıkış CO₂ & O₂	BioPat Xgas Analyser (Sartorius Stedim, Almanya)	%1-50 O ₂ %0-10 CO ₂
Çözünmüş etanol	(Raven Biotech Inc., Kanada)	%0,1-%1,5 etanol

3.4.1. Kesikli faz

Üretimin ilk aşaması olan kesikli fazda, hücrelerin %4 gliserol içeren 2 L temel tuz besiyerine (BSM, 1 litre besiyerinde 26,7 ml 85% H_3PO_4 , 0,93 g $CaSO_4$, 18,2 g K_2SO_4 , 14,9 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 4,13 g KOH, ve 40,0 g gliserol) inokulasyonu yapılmadan önce pH değeri %26 amonyum hidroksitle 5,0'e ayarlanmış ve sonrasında 8,7 ml PTM1 tuzu (1 litrede 6.0 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0,08 g NaI, 3,0 g $MnSO_4 \cdot H_2O$, 0,2 g $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 0,02 g H_3BO_3 , 0,5 g $CoCl_2$, 20,0 g $ZnCl_2$, 65,0 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,2 g biotin ve 5,0 ml H_2SO_4) eklenmiştir (Invitrogen Corporation 2002). Optik yoğunluğu 10-12 olana kadar 100 ml BMGY besiyerinde geliştirilen inokulumun tamamı aseptik koşullarda biyoreaktöre eklenerek kesikli faz başlatılmıştır. Kesikli faz süresince sıcaklık 28°C'de, hava girişi 1,0 vvm'de sabit tutulmuştur. pH değeri sisteme gerektiğinde %26 amonyum solüsyonu ilavesi ile $5,0 \pm 0,1$ değerinde tutulmuş, köpüklenme ise %5 köpük kırıcı solüsyonu ilavesi ile kontrol altına alınmıştır. İnokulumun verildiği başlangıç noktasında %100 olan çözünmüş oksijen (ÇO) konsantrasyonu hücrelerin gelişmesi ve oksijeni kullanmaya başlaması ile birlikte %20'lere kadar düşmüş ve set değeri olarak girilen bu değerde önce karıştırıcı hızı 600'den 900 rpm'e artırılarak, daha sonrasında içeri giren havaya saf oksijen karıştırılarak otomatik olarak sabit tutulmuştur (kaskad modu). Besiyerindeki gliserolün tamamının hücreler tarafından tüketilmesi ve sonucunda ÇO değerinin aniden yükselmesi ile sona eren kesikli faz yaklaşık 19-22 saat sürmüştür. Kesikli fazın sonunda yaklaşık 110 g/L yaş hücre ağırlığına ulaşılmıştır.

3.4.2. Yarı-kesikli faz

Oksijen değerinin (%ÇO) pik yaptığı noktada kesikli fazın bitmesi ile birlikte esas olarak protein üretiminin gerçekleşeceği yarı-kesikli faz başlatılmıştır. Yarı-kesikli faz boyunca sıcaklık 28°C, pH 5,0 ve hava 1 vvm'de sabit tutulmuştur. Besleme solüsyonu olarak 12 ml/L PTM1 tuzu ilave edilmiş %50 glukoz (ağırlık/ağırlık) çözeltisi kullanılmıştır. Optimizasyon ve üretim kinetiği parametrelerinin elde edildiği bu fazda, iki farklı besleme stratejisinin paralel olarak 4 farklı set değerinde uygulandığı toplam 16 (2x2x4) yarı-kesikli fermentasyon gerçekleştirilmiştir:

1. Normoksik şartlarda gerçekleştirilen **sabit- μ** stratejisi (üstel besleme)
4 farklı μ değerinde ve normoksik şartlarda gerçekleştirilen bu stratejide çözünmüş oksijen konsantrasyonu sistem tarafından %30 değerinde sabit tutulmuştur. Bunun için %ÇO değeri set değerinin (%30) altına düştüğünde sistem tarafından öncelikle karıştırma hızı 600 rpm'den 900 rpm'e kadar çıkarılmış, karıştırma hızının yetersiz kaldığı noktada sisteme giren hava %0-100 aralığında saf oksijenle karıştırılarak verilmiştir.
2. Hipoksik koşullarda gerçekleştirilen **sabit-etanol** stratejisi
Hipoksik koşullar altında 4 farklı etanol set değerinde gerçekleştirilen fermentasyonlarda çözünmüş oksijen kontrolü yapılmamıştır. Karıştırıcı 800 rpm sabit hızda çalıştırılmış ve sisteme proses boyunca 1 vvm hızında sabit hava girişi olmuştur. Glukoz çözeltisi ile besleme başladıktan yaklaşık 1 saat sonra %ÇO değeri %0'lara düşmüş ve proses süresince ortamdaki ÇO konsantrasyonu sensörün ölçüm limitinin altında kalmıştır.

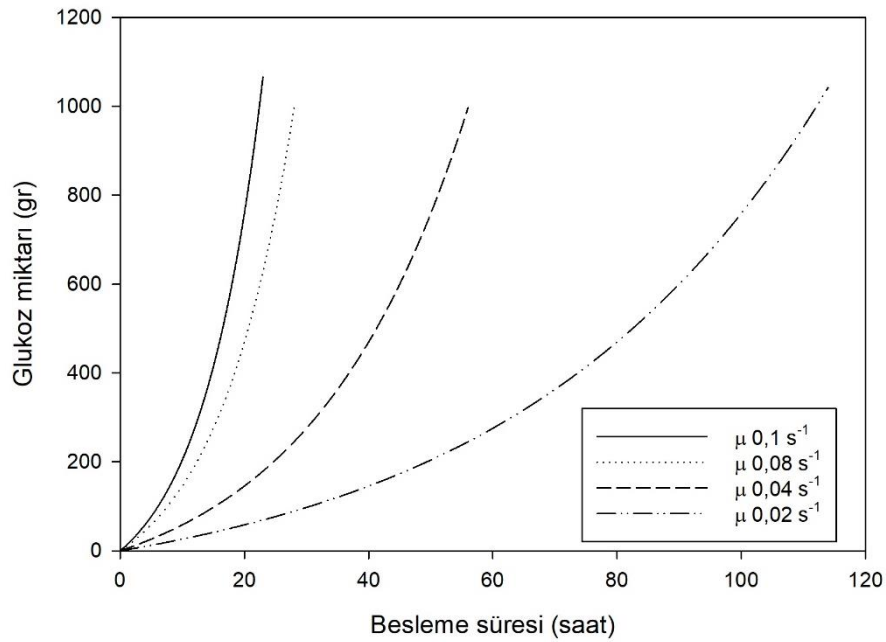
3.4.3. Sabit- μ stratejisi besleme profillerinin hesaplanması

Sabit- μ stratejisinde uygulanacak olan 4 farklı μ değeri için 4 farklı besleme profili oluşturulmuştur. Besleme hızı (F , g_{glu}/sa) belirlenen μ değerine göre (3.1) eşitliği kullanılarak hesaplanmıştır.

$$F = \frac{\mu X_0 V_0 e^{\mu t}}{Y_{xs}} \quad (3.1)$$

μ , sabit kalacağı öngörülen spesifik gelişme hızı değeri (sa^{-1}), t , besleme süresi (sa), X_0 , beslemenin başlangıcındaki litrede g hücre kuru ağırlığı (g_{kha}/L), V_0 beslemenin başlangıcındaki reaksiyon sıvısının hacmi (L), Y_{xs} glukozdaki substrat/hücre verimi (g_{glu}/g_{kha})

Uygulanacak olan spesifik gelişim hızları (μ) deneysel olarak tespit edilen μ_{max} ($0,1 \text{ sa}^{-1}$) değerinin %20, %40, %80 ve %100'ü olacak şekilde $0,02 \text{ sa}^{-1}$, $0,04 \text{ sa}^{-1}$, $0,08 \text{ sa}^{-1}$ ve $0,10 \text{ sa}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Her bir μ değeri için (3.26) eşitliği kullanılarak hesaplanan besleme profili Şekil 3.3'de grafiksel olarak gösterilmiştir.



Şekil 3.3. Sabit- μ stratejisinin uygulandığı 4 farklı spesifik gelişim hızı (μ) için hesaplanan besleme profilleri

3.4.4. Sabit-EtOH stratejisi besleme profili

Hipoksik şartlar altında gerçekleştirilen fermentasyonlarda uygulanan **ikinci yaklaşımda** ise besleme hızı, etanol sensörünün (MeOH Sensör, Raven BioTech, Kanada), belirlenen set değerini sabit tutmak üzere besleme solüsyonunun bağlı olduğu pompaya aç/kapa komutu vermesi ile gerçekleştirilmiştir.

Kesikli faz tamamlandıktan sonra, çözünmüş oksijenin pik yapması ile birlikte ortama deneyin gerçekleştirileceği etanol değerini sağlayacak miktarda %100 etanol

şırınga ile eklenmiş ve etanol sensörünün 5 dakika içerisinde ulaştığı maksimum değer set değeri olarak girilmek üzere not edilmiştir. Etanol sensörüne girilecek set değerinin belirlenmesi için yapılan bu işlemde %1 etanol değeri için 20 ml, %0,75 için 15 ml, %0,5 için 10 ml ve %0,25 değeri için 5 ml etanol eklenmiştir. Etanol sensörü tarafından mV olarak okunan değer sensöre set değeri olarak girilmiş fakat glukoz beslemesine başlamadan önce ortama eklenen etanolün hücreler tarafından tüketilmesi beklenmiştir. Etanolün tükenmesi ile birlikte çözünmüş oksijende ani artış gözlenmiş ve glukoz beslemesi başlatılmıştır. Sıcaklık 28°C, 1 vvm hava girişi, pH 5,0 ve 800 rpm karıştırıcı değerleri besleme süresince sabit tutulmuştur. ÇO kontrolü yapılmamış, oksijenin %0 değerine kadar düşmesine izin verilmiştir.

Başlangıçta, etanol sensörü set değerine ulaşana kadar besleme solüsyonu pompasını açık tutmuş, kültür besiyerindeki ÇO değerinin %0'a kadar düşmesi ile birlikte etanol üretmeye başlamıştır. Hücreler tarafından glukozdan üretilen etanol konsantrasyonu sensöre girilen set değerine ulaştığında sensörden pompaya (Watson-Marlow 120U) gönderilen kapa komutu ile besleme kesilmiş, değer altına düştüğünde ise aç komutu ile tekrar açılmıştır. Prosese toplam 2 kg %50 glukoz çözeltisi (1000 gr glukoz) verilene kadar devam edilmiştir.

Besiyerinde çözünmüş oksijen (%ÇO) (OXYFERM FDA, Hamilton, İsviçre) ve etanol konsantrasyonu (MeOH Sensor, Raven Biotech, Kanada), çıkış gazından CO₂ ve O₂ konsantrasyonları (BioPAT Xgas, Sartorius Stedim, Almanya), besiyerinde pH/Redoks (EASYFERM PLUS, Hamilton, İsviçre), sıcaklık (°C), eklenen besiyeri miktarı (gram) değerleri çevrimiçi olarak ölçülen verilerdir.

3.5. Hücre Konsantrasyonunun Ölçülmesi

Alınan örneklerdeki hücre konsantrasyonu yaş hücre ağırlığı olarak (YHA) gravimetrik yöntemle hesaplanmıştır. Örnek olarak alınan 15 ml hücre kültürü, boş olarak tartımları yapılmış 2 ml'lik 3 tüpe 1'er ml olarak dağıtılmış, tüpler 4°C'de 5 dk 15.000 g'de santrifüjlenerek hücreler çöktürülmüştür. Süpernatantlar diğer analizler için temiz tüplere aktarılarak analizleri yapılabilmek için -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Elde edilen peletler 2 kez 1'er ml ultra saf su içinde süspanse edilerek tekrar çöktürülmüş, süpernatantlar dökülmüş ve peletlerin tartımları yapılmıştır. Elde edilen üç değerlerin ortalaması alınarak hücre konsantrasyonu g_{yha}/L olarak kaydedilmiştir. Kuru hücre ağırlığının hesaplanması için deneysel olarak tespit edilen 1 gr yaş hücre ağırlığının 0,28 gr kuru hücre ağırlığına eşit olduğu verisi kullanılmıştır (Zhang vd. 2000).

3.6. SDS-PAGE Analizi

SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE) OWL P8D8 (Thermo Scientific) cihazı ile %5 polyakrilamid yükleme jeli ve %10 polyakrilamid ayırma jeli olacak şekilde hazırlanarak yürütülmüştür. Süpernatant örnekleri toplam 25 µl'de hacimde 4xSDS jel yükleme tamponu (200 mM Tris-Cl, pH 6,8, %8 SDS, %0,4 bromphenol blue, %40 glycerol, 100 mM DTT) ile hazırlanarak 70°C'de 10 dak. denatüre edilmiştir. Ardından 10µl'lik kısmı jele yüklenmiştir. Elektrofrezis işlemi, jelin 1×TGS (0,025 M Tris base, 0,192 M Glycine, %0,1 SDS, pH 8,3) tamponunda 150 V değerinde 60 dak. yürütülmesi ile gerçekleştirilmiştir.

Görüntüleme işlemi için jel, 1 saat boyunca Coomassie çözeltisi (% 0,1 Coomassie Blue R250, % 10 asetik asit, % 50 metanol ve % 40 saf su) ile orbital çalkalayıcı üzerinde boyanmıştır. Daha sonra 1 saat % 10 asetik asit, % 50 metanol ve % 40 saf su çözeltisi ile yıkanarak boya uzaklaştırılmıştır. 15 dk saf su ile çalkalandıktan sonra LiCor (Odyssey) cihazında taranmıştır.

3.7. Ksilanaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Enzim aktivitesi, ksilandan serbest bırakılan indirgen şekerin ölçülmesi ile tespit edilmiştir (Bailey vd. 1992).

- 2 ml tüplerin içerisine 900 µl substrat solüsyonu [%1,0 beechwood xylan (Sigma X4252), 50 mM sodium sitrat tamponu pH 5,0 içinde] dağıtılır ve 50°C’de ısıtılır. Üzerinden 100 µl örnek eklenir ve vortekslenir. Tüpler 50 °C’de 5 dk inkübe edilir. Örneklerin seyreltmeleri 50 mM sodium sitrat tamponu ile yapılır.
- 5 dakika sonunda bu karışımdan 100 µl alınır ve içinde 900 µl DNS solüsyonu [40 ml 1 M NaOH, 30 gr Potasyum sodyum tartarat tetrahidrat (Merck 1.08087), 1 gr 2 hydroxy, 3,5-dinitrobenzoic acid (Merck 8.00141) saf su ile 100 ml’ye tamamlanır] bulunan tüpe aktararak reaksiyon durdurulur. Vortekslenir ve 95°C’de 5 dk inkübe edilir.
- Buz üzerine alınarak oda sıcaklığına getirilen örnekler 540 nm dalga boyunda kontrole karşı okutulur.
 - ✓ Spektro cihazını körlemek için kullanılmak üzere substrat solüsyonuna örnek yerine 100 µl sodium sitrat tamponu eklenir ve tüm işlemler aynen tekrarlanır.
 - ✓ Proseste substrat olarak glukoz kullanıldığından ve besiyerinden gelen glukoz da renk gelişimine neden olacağından her örnek için biri kontrol olacak şekilde 2 tüp hazırlanır. Örnek tüpüne 50°C’de inkübasyon işlemi uygulanırken kontrol tüpüne uygulanmaz. Diğer bütün işlemler her iki tüp için de aynıdır. Hesaplamalar, her örneğin değerinden kendi kontrol değeri çıkarılarak yapılır.
- Standart eğrisi 6 noktadan, örneklerle aynı şekilde muamele edilen Ksiloz (0, 1, 2, 3, 4, 5, 7,5 ve 10 µmol) standartları okutulur ve çizdirilir. Eğri çizdirilirken 0 noktasından geçirilerek y=ax denklemleri elde edilir (Ek 8.2).
- Örneklerin ksilanaz aktivitesi aşağıdaki (3.2) eşitliği kullanılarak hesaplanır.

$$\text{Aktivite (U/ml)} = \frac{OD/a}{V \cdot t} \times DF \quad (3.2)$$

OD, 540 nm’de okunan değer; a, standart eğrinin eğimi; V, reaksiyon hazırlanırken kullanılan örnek hacmi (ml); t, 50°C’deki inkübasyon süresi (dakika); DF, dilüsyon faktörü

Bir ünite ksilanaz aktivitesi, 1 dakikada, deney koşullarında, 1µmol indirgen şekeri (glukoza eşdeğer) üretmek için gereken enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

3.8. Toplam Protein Ölçümü

Hücre süpernatantlarının protein içeriği Pierce Coomassie (Bradford) Assay Kit (Thermo Scientific, ABD) kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Örneklerin protein konsantrasyonları BSA standart solüsyonlarının absorbans değerleri referans alınarak belirlenmiştir. Deneyler sırasında elde edilen standart grafiklerden biri Ek 8.3’de verilmiştir.

3.9. Organik Asitlerin Ölçümü

Alınan örneklerde hücreler çöktürüldükten sonra elde edilen süpernatanda, **glukoz, gliserol, etanol, asetik asit, arabitol** konsantrasyonları Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi, HPLC (Shimadzu) ile gerçekleştirilmiştir. Herbir analitin konsantrasyonu, 250-1000 mg/L konsantrasyon aralığında hazırlanmış karışık standart çözeltilerin analizinden elde edilen standart eğriler kullanılarak hesaplanmıştır. Örnek olarak Ek 8.1’de 250 ppm karışık standart çözeltisinin kromatogramı verilmiştir.

3.10. Artık Glukoz Konsantrasyonu Ölçümü

Besiyerindeki artık glukoz konsantrasyonu ölçümü Megazyme D-glukoz [glukoz oksidaz/peroksidaz (GOPOD)] kiti (Megazyme, İrlanda) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yöntem, serbest D-glukozun glukoz oksidaz ve peroksidaz enzimleri ile reaksiyonu sonucunda 510 nm dalga boyunda absorbans veren quinoneimine boyasına indirgenmesi esasına dayanır. Toplam 3 ml’de gerçekleştirilen kit protokolü 1 ml’ye uyarlanmıştır. 1 ml GOPOD Tamponu 33,3 µl örnek ile karıştırılarak 40-50°C’de 20 dakika inkübe edilir. Örnek yerine su ile hazırlanan köre karşı 510 nm dalgaboyunda okutulur. 10-1000 mg/L aralığındaki konsantrasyonlarda hazırlanan glukoz standartları ile de aynı şekilde reaksiyonlar gerçekleştirilir ve standart eğri çizdirilir ($y=ax$) (Ek 8.3). Örnek absorbansının standart eğrinin eğimine (a) bölünmesi ile D-glukoz konsantrasyonu hesaplanmış olur.

3.11. Yarı-Kesikli Proses Teori ve Hesaplamaları

3.11.1. Biyokütle için toplam kütle eşitliği

$$\{biriken\} = \{giren\} + \{üretilen\} - \{ölen\} - \{alınan\} \quad (3.3)$$

Sisteme yalnızca steril besleme solüsyonu girişi olduğundan, herhangi bir hücre girişi söz konusu değildir. Proses süresince sistemden herhangi bir hücre kaybı yaşanmadığı, yani alınan örneklerle ve ölen hücrelerle yaşanan kaybın önemsiz olduğu varsayıldığında yarı-kesikli fazdaki toplam kütle eşitliği (3.4) bağıntısındaki gibi ifade edilir.

$$\frac{d(XV)}{dt} = r_x \quad (3.4)$$

Mikrobiyal gelişim hızı genel olarak spesifik büyüme hızı ile ifade edilir. Birim zamanda oluşan hücre miktarı (r_x , $g_{\text{hücre}}/sa$), biyokütle oluşum hızı olarak tanımlanır ve hücre miktarı (XV , g) ile spesifik gelişim hızının (μ , sa^{-1}) çarpımına eşittir (3.5).

$$r_x = \mu XV \quad (3.5)$$

(3.5) eşitliğinin (3.4) da yerine koyulması ile (3.6) eşitliği elde edilir:

$$\frac{d(XV)}{dt} = \mu(XV) \quad (3.6)$$

$$\frac{1}{XV} d(XV) = \mu dt \quad (3.7)$$

$$\mu = \frac{1}{XV} \frac{d(XV)}{dt} \quad (3.8)$$

(3.8) bağıntısının integralini alırsak:

$$\int_{X_0 V_0}^{XV} \frac{1}{XV} d(XV) = \mu \int_0^t dt \quad (3.9)$$

X hücre konsantrasyonu (g/L), V kültür hacmi (L), t besleme zamanı (s) ve μ spesifik gelişim hızı (h^{-1})

$$\ln \left| \frac{XV}{X_0 V_0} \right| = \mu t \quad (3.10)$$

XV değerini bulmak için her iki tarafın üstel fonksiyonları alındığında üstel çoğalmayı hesaplamamızı sağlayan aşağıdaki (3.11) bağıntısı elde edilmiş olur.

$$e^{\ln \left(\frac{XV}{X_0 V_0} \right)} = e^{\mu t} \quad (3.11)$$

$$XV = X_0 V_0 e^{\mu t} \quad (3.12)$$

$X_0 V_0$ beslemeye başlandığı andaki, XV ise t anındaki biyoreaktörün içerisinde bulunan toplam hücre miktarı (g) demektir.

3.11.2. Substrat için toplam kütle eşitliği

Yarı-kesikli sistemlerde toplam substrat eşitliği (3.13) aşağıdaki şekilde yazılabilir:

$$\{biriken\} = \{giren\} - \{tüketilen\} \quad (3.13)$$

$$\frac{d(SV)}{dt} = F - r_s \quad (3.14)$$

S reaksiyon sıvısındaki substrat konsantrasyonu (g/L), V biyoreaktörün içindeki kültürün hacmi (L), F besleme hızı (g_{substrat}/sa), r_s substrat tüketim hızı (g/s)

Glukozun proses süresince reaksiyon hacminde hiç birikmediği durumlarda ($\frac{d(SV)}{dt} = 0$) ve hacimdeki değişiklikler ihmal edildiğinde yarı-kesikli sistemin glukoz için yarı-kararlı duruma ulaştığı varsayılır ve (3.14) eşitliği aşağıdaki şekilde yeniden yazılır:

$$F = r_s \quad (3.15)$$

Substrat tüketim hızı (r_s) hücre konsantrasyonu ile ilişkili olarak birinci dereceden kinetik eşitlik (3.16) olarak ifade edilip (3.15) eşitliğinde yerine koyulduğunda:

$$r_s = q_s XV \quad (3.16)$$

$$F = q_s XV \quad (3.17)$$

Eşitlik (3.12)'i (3.17)'de yerine koyarsak:

$$F = q_s (X_0 V_0) e^{\mu t} \quad (3.18)$$

Spesifik substrat tüketim hızı (q_s) (3.19) eşitliğindeki gibi spesifik gelişim hızının (μ) substrat/hücre verim katsayısına (Y_{XS}) bölünmesi ile ifade edilir ve (3.18) eşitliğinde yerine koyulursa besleme hızını (g_{glukoz}/s) tanımlayan (3.20) eşitliği elde edilir:

$$q_s = \frac{\mu}{Y_{XS}} \quad (3.19)$$

$$F = \frac{\mu X_0 V_0 e^{\mu t}}{Y_{XS}} \quad (3.20)$$

μ , sabit kalacağı öngörülen spesifik gelişme hızı ayar değeri (sa^{-1}), t , besleme süresi (sa), X_0 , beslemenin başlangıcındaki litrede g kuru hücre ağırlığı (g_{kha}/L), V_0 beslemenin başlangıcındaki reaksiyon sıvısının hacmi (L), Y_{XS} glukozdaki substrat/hücre verimi (g_{glukoz}/g_{kha})

(3.20) eşitliği hücrelerin sabit bir spesifik gelişim hızında büyümelerini sağlayacak besleme profillerinin hesaplanmasında kullanılmıştır.

3.11.3. Ürün için toplam kütle eşitliği

Yarı-kesikli sistemlerde toplam ürün eşitliği (3.21) aşağıdaki şekilde yazılabilir:

$$\{biriken\} = \{üretilen\} \quad (3.21)$$

$$\frac{d(PV)}{dt} = r_P \quad (3.22)$$

P toplam hacimdeki ürün konsantrasyonu (g/L), V biyoreaktörün içindeki kültürün hacmi (L), r_P ürün oluşum hızı (U/sa)

Ürün oluşum hızı ayrıca, spesifik ürün oluşum hızı (q_P) ve toplam biyokütle ağırlığının (XV) çarpımı olarak ifade edilir:

$$r_P = q_P XV \quad (3.23)$$

Bu ifade (3.22)'de yerine koyulur ve türev işlemleri yapılırsa spesifik ürün oluşum hızını (q_P) veren eşitlik (3.27) elde edilir:

$$\frac{d(PV)}{dt} = q_P XV \quad (3.24)$$

$$V \frac{d(P)}{dt} + P \frac{d(V)}{dt} = q_P XV \quad (3.25)$$

dV/dt 'nin besleme hızına (F) eşit olduğu durumda:

$$\frac{d(P)}{dt} = q_P X - \frac{PF}{V} \quad (3.26)$$

$$q_P = \frac{PF}{XV} + \frac{1}{X} \frac{d(P)}{dt} \quad (3.27)$$

q_P , spesifik ürün oluşum hızı (U/g_{kha} sa), XV , toplam biyokütle g_{kha} , F , substrat besleme hızı (g_{glu}/sa)

3.12. Deneyisel Verilerden Spesifik Hız ve Verim Katsayılarının Hesaplanması

Bir biyoprosesin karakterize edilmesi ve değerlendirilmesi için spesifik hızlar ve verim katsayıları gibi parametlerin hesaplanması gerekir. Bu parametreler proses boyunca alınan örneklerde yapılan ölçümlerden elde edilen ya da sistem tarafından online olarak kaydedilen verilerden hesaplanır.

Biyokütle artışını ifade eden spesifik gelişim hızı (μ , sa^{-1}), substrat kullanımını ifade eden spesifik substrat tüketim hızı (q_s , $g_{glu}g_{kha}^{-1}sa^{-1}$) ve ürün oluşumunu ifade eden spesifik ürün oluşum hızının (q_P , $U g_{kha}^{-1}sa^{-1}$) hesaplanması için en etkin yol proses süresince alınan örneklerde her bir bileşenin konsantrasyonlarını ölçmektir.

Yarı-kesikli proseslerde, biyoreaktöre sürekli bir besiyeri girişi olduğundan reaksiyon hacmi sürekli artar. Spesifik gelişim (μ), spesifik üretim (q_P) ve spesifik tüketim (q_s) hızlarının ve tüm verim katsayılarının hesaplanmasında besleme solüsyonunun dilüsyon etkisinden dolayı konsantrasyonu (g/L , U/ml gibi) değerleri kullanılamaz. Tüm hız ve katsayı hesaplamaları, toplam biyokütle ($gr yha/kha$), toplam aktivite (U ya da mg), toplam substrat miktarı (g) ve toplam protein miktarı (mg) esas alınarak yapılmalıdır. Bu nedenle yarı-kesikli proseslerde toplam verilerin hesaplanabilmesi için ölçümlerin yapıldığı her bir t anındaki kültürün hacminin bilinmesi çok önemlidir.

Her bir t anındaki kültürün hacmi (V_t), başlangıçtaki besiyeri hacmine (V_0), biyoreaktöre o ana kadar eklenen baz (V_{baz}), köpük kırıcı (V_{kk}) ve besleme solüsyonlarının (V_{bs}) hacimlerinin eklenmesi ve örnek zamanlarında alınan örneklerin hacimlerinin ($V_{\bar{o}}$) çıkarılması ile (3.28) bağıntısındaki gibi hesaplanmıştır.

$$V_t = V_0 + V_{baz} + V_{kk} + V_{bs} - V_{\bar{o}} \quad (3.28)$$

Konsantrasyon ölçümleri yapılırken hücre konsantrasyonunun ölçümü 1 ml kültürden yapılırken, enzim aktivitesi, toplam protein konsantrasyonu ve glukoz konsantrasyonu analizleri 1 ml kültürden hücreler çöktürüldükten sonra kalan

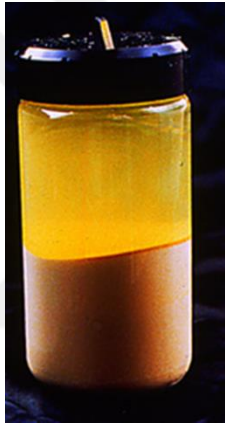
süpernatanda yapılmıştır (Şekil 3.4). Bu nedenle toplam değerler hesaplanırken süpernatanda ölçümleri yapılan konsantrasyon değerlerine (enzim aktivitesi, P; toplam protein, Tp; artık glukoz konsantrasyonu, S) düzeltme faktörü uygulanarak toplam hacimdeki değerleri tekrar hesaplanmıştır (Borzani 2008).

$$P(t) = P^*(t) \times \left(1 - \frac{X(t) \times \sigma}{\rho}\right) \quad (3.29)$$

$$Tp(t) = Tp^*(t) \times \left(1 - \frac{X(t) \times \sigma}{\rho}\right) \quad (3.30)$$

$$S(t) = S^*(t) \times \left(1 - \frac{X(t) \times \sigma}{\rho}\right) \quad (3.31)$$

*Süpernatanda ölçülen konsantrasyon değerleri; X(t), t anındaki hücre konsantrasyonu, g_{yha}/L; σ, yaş hücre ağırlığındaki kuru hücre fraksiyonu, 0,28 g_{kha}/g_{yha} (Zhang vd. 2000); ρ, *P. pastoris* hücre peletinin yoğunluğu, 330 g_{kha}/L (Maurer vd. 2006a).



Süpernatant hacmi (V*)

Enzim aktivitesi (U/ml)
Toplam hücre dışı protein (mg/L)
Artık glukoz miktarı (mg/ml)
Organik asit vd. ölçümler (mg/L)

Kültür hacmi (V)

Hücre konsantrasyonu (g/L)

Şekil 3.4. *P. pastoris* kültürünün ve hücrelerin çöktürülmesiyle elde edilen süpernatanın hacimlerinin gösterilmesi ve herbirinde yapılan analitik ölçümler

Fermantasyon kinetiği ile ilgili yapılan çalışmalarda, gelişim hızı (r_x , μ), ürün oluşum hızı (r_p , q_p), substrat tüketim hızı (r_s , q_s) gibi parametreler ve verim katsayıları (Y_{XS} , Y_{PS} , Y_{PS}), zamana göre artan biyokütle miktarı (XV, g_{yha}), ürün miktarı (PV, U) ve ortama eklenen substrat miktarı (g_{glu}) değerlerinin grafiksel ifadeleri üzerinden geometrik olarak hesaplanabilmektedir (Leduy ve Zajic 1973). Aşağıdaki bölümlerde deneysel verilerden elde edilen biyokütle profili (zamana karşı çizilen XV), toplam enzim aktivitesi profili (zamana karşı çizilen PV) ve substrat tüketim profili (zamana karşı çizilen biyoreaktöre eklenen toplam glukoz miktarı) grafiklerinden hangi hız ve verim katsayılarının ne şekilde hesaplanabileceği verilmiştir.

3.12.1. Hücre gelişim kinetiği (hücre gelişim hızlarının hesaplanması)

Yarı-kesikli proses boyunca alınan örneklerden elde edilen biyokütle değerlerinin (XV) zamana (t) karşı çizilen grafiğinden biyokütle oluşum profili elde edilir. Grafikteki veri noktalarından geçen en uygun eğrinin matematiksel tanımı yapılarak prosesin hücre gelişimi modellenmiş olur. Verilere en iyi uyan model MS Excel yazılımındaki “eğilim

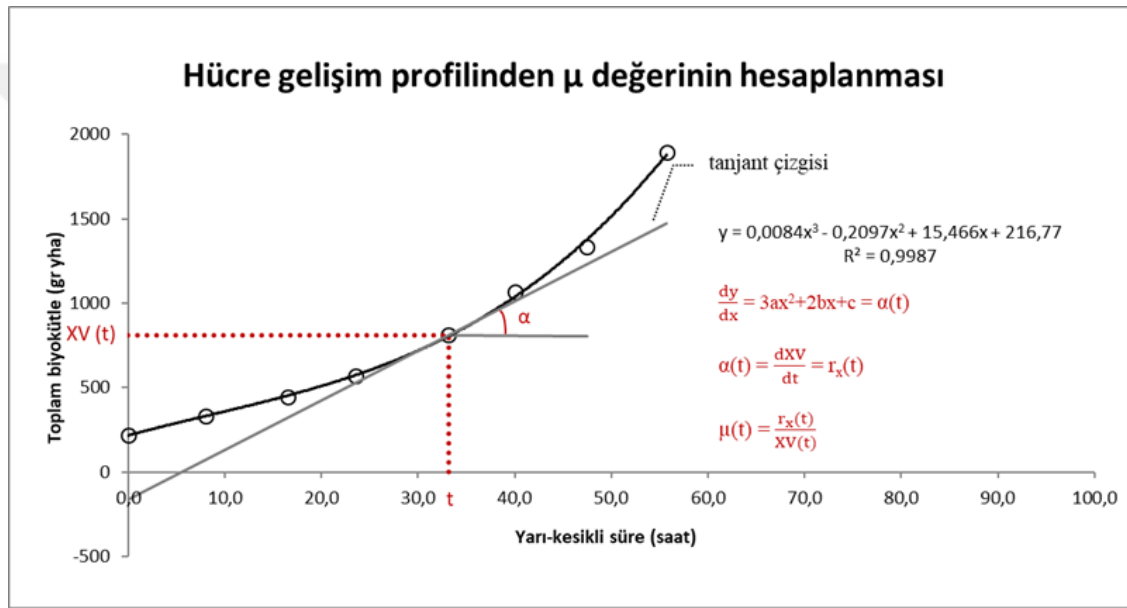
çizgisi ekleme” fonksiyonu kullanılarak üstel ya da polinom seçeneklerinden en yüksek korelasyon değerini (R^2) veren eğri seçilerek çıkarılmıştır (Şekil 3.3).

Biyokütle oluşum profili çıkarıldıktan ve matematiksel denklem ile tanımlandıktan sonra grafik eğrisinin t anındaki eğimi (3.4) eşitliğinde tanımlandığı gibi birim zamanda oluşan hücre miktarını (hücre gelişim hızını, r_x , g hücre/s) verir.

$$\frac{d(XV)}{dt} = r_x \quad (3.4)$$

t anındaki gelişim hızının (r_x), t anındaki biyokütle miktarına (XV) bölünmesi ile (3.8) eşitliğinde tanımlandığı gibi t anındaki spesifik gelişim hızı (μ) hesaplanmış olur.

$$\mu = \frac{1}{XV} \frac{d(XV)}{dt} \quad (3.8)$$



Şekil 3.5. Hücre gelişim profilinin matematiksel modellenmesi ve anlık spesifik gelişim hız değerlerinin (μ) gelişim eğrisi denkleminde hesaplanmasının grafik üzerinde gösterilmesi

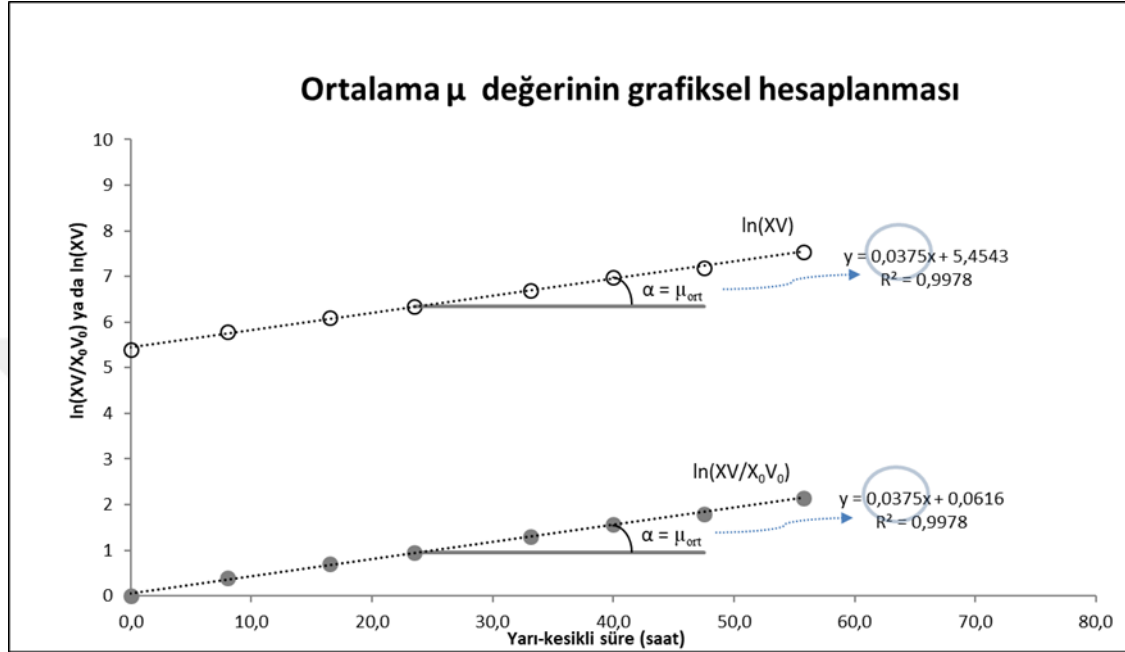
Bir fonksiyonun bir noktadaki türevi, anlık değişim oranı olarak veya fonksiyonun grafiğine o noktada teğet olan tanjant çizgisinin eğimi olarak tanımlanabilir. Bu tanıma göre hücre gelişim profilini tanımlayan 3. dereceden polinom denkleminin t noktasındaki türevi, t noktasındaki tanjant eğrisinin eğimini yani t noktasındaki hücre gelişim hızını (r_x , g/sa) verecektir. Bu değer $XV(t)$ değerine bölünmesi ile her bir t noktasındaki **anlık spesifik gelişim hızı** ($\mu(t)$) hesaplanabilir (Şekil 3.5). Anlık μ değerlerinin ortalaması proses boyunca gerçekleşen ortalama μ değerini verir.

Prosesin ortalama μ değerini grafiksel olarak hesaplamannın bir diğer yolu ise (3.10) bağıntısının yeniden yazılması ile elde edilir:

$$\ln \left| \frac{XV}{X_0 V_0} \right| = \mu t \quad (3.10)$$

$$\ln XV = \mu t + \ln X_0 V_0 \quad (3.32)$$

(3.10) ve (3.32) bağıntılarından anlaşıldığı üzere $\ln(\frac{XV}{X_0 V_0})$ ya da $\ln(XV)$ değerlerinin zamana karşı çizilen lineer grafiğin eğimi prosesin ortalama spesifik gelişim hızını (μ_{ort}) verir (Şekil 3.6) (Zhang vd. 2005).



Şekil 3.6. Prosesin ortalama spesifik gelişim hızı (μ_{ort}) zamana karşı çizilen $\ln(XV/X_0 V_0)$ ya da $\ln(XV)$ grafiğinin doğrusal eğilim çizgisinin eğiminden elde edilir

İki t noktası arasındaki spesifik gelişim hızı formül kullanılarak doğrudan t ve XV(t) değerlerinden de hesaplanabilir. (3.10) eşitliği aşağıdaki şekilde yeniden yazılması ile elde edilen (3.33) eşitliği μ hesaplanmasında kullanılabilir.

$$\mu(t) = \frac{\ln X_t V_t - \ln X_0 V_0}{t - t_0} \quad (3.33)$$

3.12.2. Substrat tüketim kinetiği (substrat tüketim hızlarının hesaplanması)

Substratın kısıtlı olduğu, ortamda birikmediği üstel beslemeli kesikli fazda hücrelere verilmesi gereken substrat miktarı (Q, g_{substrat}) aşağıdaki (3.34) bağıntısı ile ifade edilir (Katakura vd. 1998):

$$Q = \int_0^t F dt = q_s \int_0^t XV dt \quad (3.34)$$

F, substrat besleme hızı (g_{substrat}/h), q_s , spesifik substrat tüketim hızı ($g_{\text{substrat}} g_{\text{kha}}^{-1} \text{sa}^{-1}$), XV, toplam kuru hücre ağırlığı (g_{kha})

(3.34) eşitliğinin her iki tarafının türevi alındığında aşağıdaki eşitlikler elde edilir:

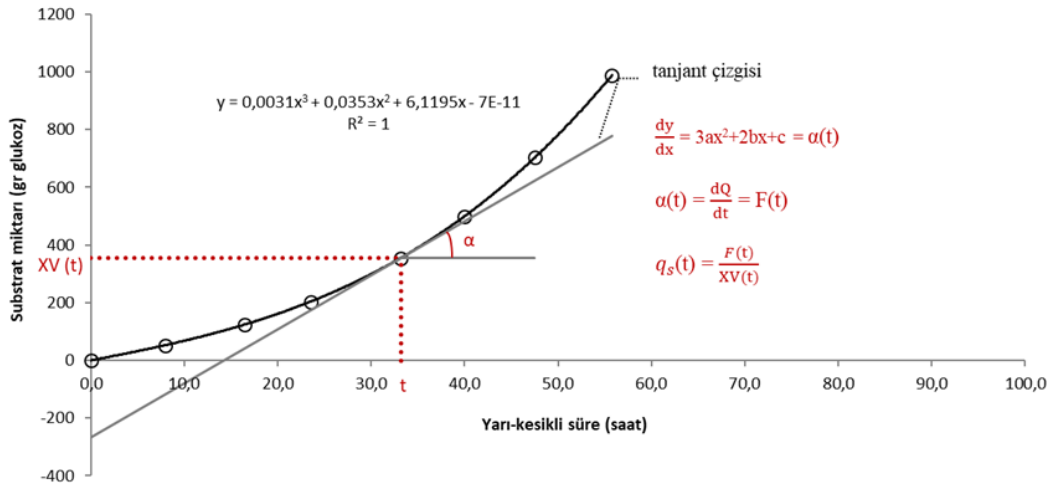
$$\frac{dQ}{dt} = F = q_s \cdot XV \quad (3.35)$$

$$q_s = \frac{1}{XV} \frac{dQ}{dt} = \frac{1}{XV} F \quad (3.36)$$

Proses süresince, substrat şişesinin üzerinde bulunduğu tartıdan kaydedilen verilerden elde edilen Q (g_{glu}) değerlerinin zamana (t) karşı çizilen grafiğinden Substrat Profili elde edilmiştir. Üstel beslemeli yarı-kesikli proseslerde besiyerindeki eklenen substratın tamamı hücreler tarafından anında tüketildiği ve besiyerinde substrat birikmesi meydana gelmediği için eklenen substrat miktarı aynı zamanda hücreler tarafından tüketilen substrat miktarıdır. Bu nedenle elde edilen grafik Substrat Tüketim Profili olarak adlandırılmıştır. Grafikteki veri noktalarından geçen en uygun eğrinin matematiksel tanımı yapılarak prosesin substrat tüketimi modellenmiştir. Verilere en iyi uyan model MS Excel yazılımındaki “eğilim çizgisi ekleme” fonksiyonu kullanılarak polinom seçeneklerinden en yüksek korelasyon değerini (R^2) veren eğri seçilerek çıkarılmıştır (Şekil 3.7).

Substrat Tüketim Profili çıkarıldıktan ve matematiksel denklem ile tanımlandıktan sonra grafik eğrisinin t anındaki eğimi (dQ/dt), (3.35) eşitliğinde tanımlandığı gibi birim zamanda biyoreaktöre eklenen substrat miktarını (F , besleme hızı, g_{glukoz}/sa) verir. (3.42) eşitliğine göre t anındaki besleme hızının $[F(t)]$, t anındaki biyokütle miktarına $[XV(t), g_{kha}]$ bölünmesi ile t anındaki substrat tüketim hızı $[q_s(t)]$ hesaplanmış olur (Şekil 3.7).

Substrat tüketim profilinden F ve q_s değerlerinin hesaplanması



Şekil 3.7. Substrat tüketim profilinin matematiksel modellenmesi. Anlık spesifik substrat tüketim hızı $[q_s(t)]$ ve gerçekleşen besleme hızı (F) değerlerinin substrat eğrisini tanımlayan 3. derece polinom denkleminde hesaplanmasının grafik üzerinde gösterilmesi

Çizelge 3.3’de substrat tüketim profili grafiğinden hesaplanan parametreler, tanımları ve hesaplama yöntemleri özet olarak verilmiştir.

Çizelge 3.3. Substrat tüketim profili grafiğinden hesaplanan parametreler, tanımları ve hesaplama yöntemleri

Parametre	Tanım	Hesaplanması
F (g_{glu}/sa)	Besleme hızı <i>Biyoreaktöre saatte verilen glukoz miktarı</i>	Substrat profili denkleminin türevi $\frac{dy}{dx} = (ax^3+bx^2+cx+d)' = 3ax^2+2bx+c$
r_s (g_{glu}/sa)	Substrat tüketim hızı <i>Saatte tüketilen toplam substrat miktarı</i>	
q_s ($g_{glukoz}g_{kha}^{-1}sa^{-1}$)	Spesifik substrat tüketim hızı <i>Saatte gram kuru hücre başına tüketilen substrat miktarı</i>	$q_s = \frac{F}{XV} = \frac{r_s}{XV}$ XV (toplam kuru hücre ağırlığı, g_{kha})

3.12.3. Ürün oluşum kinetiği (ürün oluşum hızları ve verimlilik değerlerinin hesaplanması)

Yarı-kesikli proseslerde ürün oluşum kinetiği (3.24) eşitliği ile tanımlanır:

$$\frac{d(PV)}{dt} = q_p(XV) \quad (3.24)$$

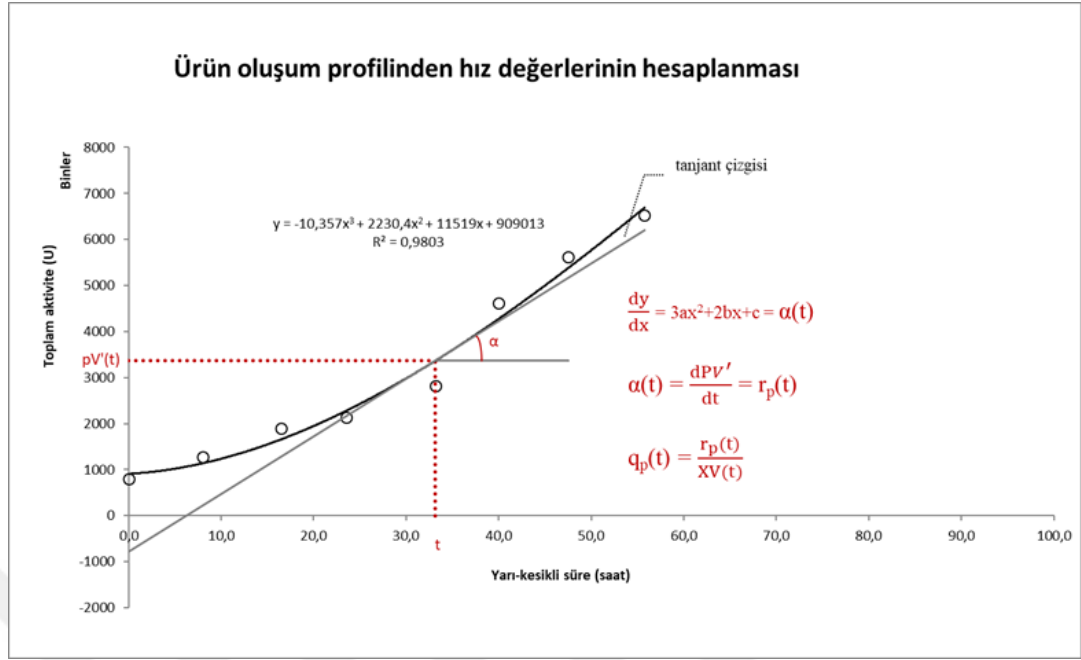
$$q_p = \frac{1}{XV} \frac{d(PV)}{dt} \quad (3.37)$$

PV, toplam ürün miktarı/enzim aktivitesi (U ya da mg), q_p , spesifik ürün oluşum hızı (U ya da $mg\ g_{kha}^{-1}sa^{-1}$), XV, toplam kuru hücre ağırlığı (g_{kha})

Proses süresince biyoreaktörde biriken ürün miktarı, belirli aralıklarla alınan örneklerde enzim aktivitesi tayini yapılarak elde edilmiş ve PV (U) değerlerinin zamana (t) karşı çizilen grafiğinden Ürün Oluşum Profili elde edilmiştir. Verilere en iyi uyan matematiksel model MS Excel yazılımındaki “eğilim çizgisi ekleme” fonksiyonu kullanılarak polinom seçeneklerinden en yüksek korelasyon değerini (R^2) veren eğri seçilerek çıkarılmıştır (Şekil 3.5).

Ürün Oluşum Profili çıkarıldıktan ve matematiksel denklem ile tanımlandıktan sonra grafik eğrisinin t anındaki eğimi ($d(PV)/dt$), saatte oluşan ürün miktarı yani ürün oluşum hızını (r_p , U/sa) verir. (3.43) eşitliğine göre t anındaki r_p değerlerinin t anındaki biyokütle miktarına [$XV(t)$, g_{kha}] bölünmesi ile t anındaki ürün oluşum hızı [$q_p(t)$] hesaplanmış olur (Şekil 3.8).

Proses süresince herbir t anı için hesaplanabilen q_p değerlerinin ortalaması alındığında prosesin ortalama q_p değeri elde edilmiş olur. Ürün oluşum profil grafiğinden elde edilen ürün oluşum hızı, r_p (U/sa), değerinden ve diğer proses verileri kullanılarak hesaplanabilecek üretim kinetiği parametrelerinin bir listesi tanımları ile birlikte Çizelge 3.4’de verilmiştir.



Şekil 3.8. Ürün oluşum profilinin matematiksel modellenmesi. Anlık ürün oluşum hızı $[r_p(t)]$ ve spesifik ürün oluşum hızları $[q_p(t)]$ değerlerinin ürün oluşumunu tanımlayan 3. derece polinom denkleminde hesaplanmasının grafik üzerinde gösterilmesi

Çizelge 3.4. Proses değerlendirmesi için ölçümleri ve hesaplamaları yapılan üretim kinetiği parametreleri, tanımları ve hesaplama yöntemleri

Parametre	Tanım	Hesaplanması
r_p (U/sa)	Ürün oluşum hızı Saatte üretilen toplam enzim aktivitesi	Ürün oluşum profili denkleminin türevi $\frac{dy}{dx} = (ax^3 + bx^2 + cx + d)' = 3ax^2 + 2bx + c$
q_p (U g _{kha} ⁻¹ sa ⁻¹)	Spesifik ürün oluşum hızı Saatte gram kuru hücre başına üretilen enzim aktivitesi	$q_p = \frac{r_p}{XV}$ XV (toplam kuru hücre ağırlığı, g _{kha})
Q_p (U L ⁻¹ sa ⁻¹)	Hacimsel üretim hızı Saatte birim hacim başına üretilen enzim aktivitesi	$Q_p = \frac{r_p}{V}$ V (toplam kültür hacmi, L)
P (U/ml)	Hacimsel verim Birim hacim başına düşen aktivite	Enzim aktivitesi analizi
U (g _{kha} ⁻¹)	Hücre verim Gram kuru hücre başına üretilen enzim aktivitesi	$U/g_{kha} = \frac{PV}{XV}$ PV (toplam enzim aktivitesi, U) XV (toplam kuru hücre ağırlığı, g _{kha})
U (mg _{protein} ⁻¹)	Spesifik aktivite Toplam hücre dışı proteinin miligramı başına düşen aktivite	$U/mg_{protein} = \frac{PV}{TpV}$ PV (toplam enzim aktivitesi, U) TpV (toplam hücre dışı protein miktarı, mg)

3.12.4. Genel ve anlık verim katsayıları

Moleküllerin oluşum hızlarının moleküllerin tüketim hızlarına oranı olarak tanımlanan verim katsayıları biyoproses performansının değerlendirilmesinde kullanılan önemli parametrelerdendir. Anlık verim katsayıları matematiksel olarak aşağıdaki eşitliklerle ifade edilir.

$$Y_{XS}' = \frac{r_x}{-r_s} = \left(\frac{\frac{dXV}{dt}}{\frac{dQ}{dt}} \right) \quad (3.38)$$

$$Y_{PS}' = \frac{r_P}{-r_s} = \left(\frac{\frac{dPV'}{dt}}{\frac{dQ}{dt}} \right) \quad (3.39)$$

$$Y_{PX}' = \frac{r_P}{-r_X} = \left(\frac{\frac{dPV'}{dt}}{\frac{dXV}{dt}} \right) \quad (3.40)$$

Bir zaman aralığı için hesaplanan genel verim katsayıları ise aşağıdaki eşitliklerle ifade edilir:

$$Y_{XS} = \frac{r_x}{-r_s} = \left(\frac{\frac{\Delta XV}{\Delta t}}{\frac{\Delta Q}{\Delta t}} \right) \quad (3.41)$$

$$Y_{PS} = \frac{r_P}{-r_s} = \left(\frac{\frac{\Delta PV'}{\Delta t}}{\frac{\Delta Q}{\Delta t}} \right) \quad (3.42)$$

$$Y_{PX} = \frac{r_P}{-r_X} = \left(\frac{\frac{\Delta PV'}{\Delta t}}{\frac{\Delta XV}{\Delta t}} \right) \quad (3.43)$$

Verim katsayılarının tanımları ve grafiksel hesaplama yöntemleri Çizelge 3.5'de listelenmiştir.

Çizelge 3.5. Proses verim katsayıları, tanımları ve grafiksel hesaplama yöntemleri

Parametre	Tanım	Grafiksel Hesaplanması
Y_{XS} $g_{kha} g_{substrat}^{-1}$	Substrat hücre verimi <i>Tüketilen birim substrat ağırlığı başına üretilen hücre ağırlığı</i>	$(XV-X_0V_0, g_{kha})$ değerlerinin $(Q, g_{substrat})$ değerlerine karşı çizilen grafiğin doğrusal eğim çizgisinin eğimi
Y_{PS} $U g_{substrat}^{-1}$	Substrat ürün verimi <i>Tüketilen birim substrat ağırlığı başına üretilen ürün miktarı</i>	$(PV-P_0V_0, U)$ değerlerinin $(Q, g_{substrat})$ değerlerine karşı çizilen grafiğin doğrusal eğim çizgisinin eğimi
Y_{PX} $U g_{kha}^{-1}$	Hücre ürün verimi <i>Üretilen birim hücre kuru ağırlığı başına üretilen ürün miktarı</i>	$(PV-P_0V_0, U)$ değerlerinin $(XV-X_0V_0, g_{kha})$ değerlerine karşı çizilen grafiğin doğrusal eğim çizgisinin eğimi

3.12.5. Bakım katsayısı (m)

Pirt 1965’de mikrobiyal hücre kültürlerinin gelişim hızına bağlı bakım enerji gereksinimlerini tanımlayan bir model öne sürmüştür (Pirt 1965). Modeli ifade eden eşitlik spesifik substrat tüketim hızı (q_s) ile spesifik gelişim hızı (μ) arasında lineer bir korelasyon olduğunu varsayar ve bu parametrelerin maksimum teorik substrat biyokütle verimi (Y_{XS}^{max}) ve bakım enerji katsayısı (m_s) ile arasındaki ilişkiyi tanımlar:

$$q_s = \frac{\mu}{Y_{XS}^{max}} + m_s \quad (3.44)$$

Bakım enerji katsayısı hücrelerin, gelişme-dışı prosesler (ozmoregülasyon, düzeltici faaliyetler makromoleküler döngü reaksiyonları vb.) için gerekli olan enerjiyi (ya da karşılık gelen substrat miktarını) tanımlar.

3.13. İstatistiksel Analiz

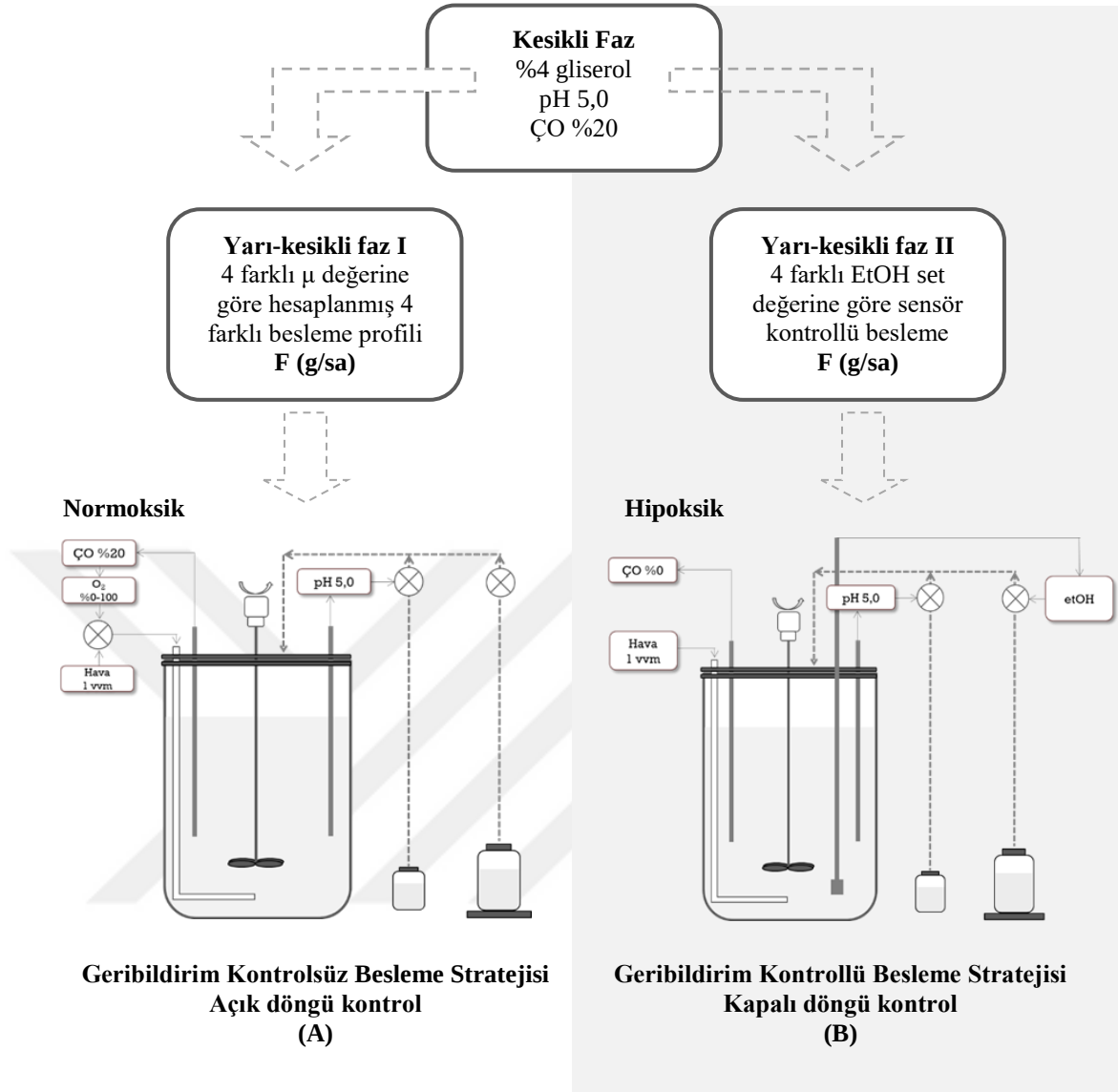
Analizler üç paralelli olarak yürütülmüştür. Elde edilen sonuçlar, SigmaPlot 14 (Systat Software) programı kullanılarak tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirilmiş ve veriler arasındaki farkların anlamlılığı %95 güven aralığında ($p < 0.05$) Duncan Çoklu Aralık Testi kullanılarak belirlenmiştir.

4. BULGULAR

Çalışmada yer alan tüm yarı-kesikli fermentasyon işlemleri, 2 aşamalı olarak Biostat B fermentöründe gerçekleştirilmiştir. Fermentasyonun ilk aşaması olan kesikli fazda hücreler %4 gliserol içeren 2 L temel tuz besiyerinde (BSM) karbon kaynağı bitene kadar yaklaşık 20 saat geliştirilmişlerdir. Kültivasyon sıcaklığı 28°C’de sabit tutulmuş, pH 5,0’de %26 ammonia solüsyonu ile kontrol edilmiş, çözünmüş oksijen konsantrasyonu karıştırıcı hızı 1 vvm sabit hava beslemesinde 600-900 rpm arasında kontrol edilerek ve gerektiğinde saf oksijen verilerek %30’un üzerinde tutulmuştur. Kesikli fazın sonunda ortamdaki gliserolün tamamen tükenmesi ile birlikte (%ÇO konsantrasyonundaki ani artış gözlemlendiği an) farklı besleme stratejilerinin uygulandığı yarı-kesikli besleme fazı başlatılmıştır.

Ksilanaz üretim suşunun fizyolojik karakterizasyonu için besleme fazında 4 farklı μ değerinde (μ_{max} , $0,8\mu_{max}$, $0,4\mu_{max}$ ve $0,2\mu_{max}$) 2x4 yarı-kesikli fermentasyon gerçekleştirilmiştir. Sabit- μ stratejisi olarak adlandırılan geribildirim kontrolsüz besleme stratejisinde, kültivasyon sıcaklığı 28°C ve pH 5,0’da sabit tutulmuş, %ÇO konsantrasyonu proses süresince, 1 vvm sabit hava beslemesi ve 900 rpm sabit karıştırıcı hızında gerektiğinde havaya saf oksijen ilavesi yapılarak %30 değerinde kontrol edilmiştir (Şekil 4.1).

Hipoksik koşullar altında rekombinant protein üretim kinetiğinin aydınlatılması için ise besleme fazında 4 farklı sabit etanol değerinde (%1, %0,75, %0,5 ve %0,25 etanol) 2x4 yarı-kesikli fermentasyon gerçekleştirilmiştir. Besiyerindeki etanol konsantrasyonunun bir sensör tarafından çevrimiçi ölçüldüğü ve sensörün substrat pompasına aç/kapa komutları göndererek etanolü belirlenen değerde kontrol altında tuttuğu geribildirim kontrollü fermentasyonlarda %ÇO kontrolü yapılmamıştır. Sistem 800 rpm sabit karıştırıcı hızı ve 1 vvm sabit hava girişi ile çalıştırılmış, glukoz çözeltisi ile besleme başladıktan sonra %ÇO değeri %0’lara kadar düşmüş ve proses süresince ÇO sensörünün ölçüm limiti değerinin altında kalmıştır (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Çalışmada gerçekleştirilen yarı-kesikli fermantasyonların ve uygulanan besleme stratejilerinin şematik olarak gösterilmesi. (A) Normoksik koşullarda (%30 ÇO) uygulanan sabit- μ besleme stratejisi, (B) Hipoksik koşullarda (%0 ÇO) uygulanan sabit-EtOH besleme stratejisi

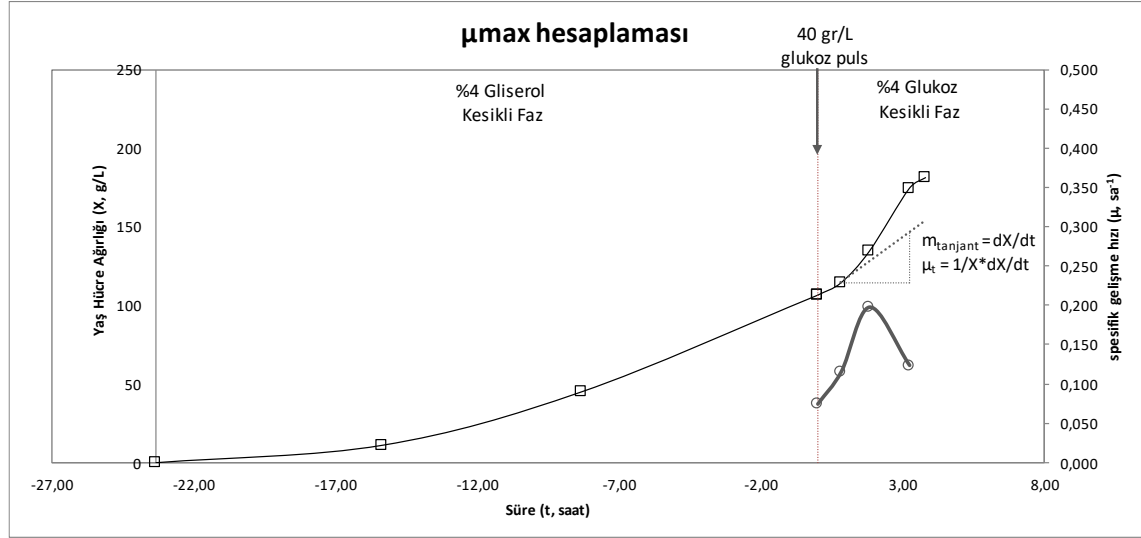
4.1. Fizyolojik Parametrelerin Belirlenmesi ($\mu_{\max}$ ve Y_{XS})

Bir üretim suşu için proses geliştirilirken öncelikle suşun sitokiyometrik ve kinetik büyüme parametrelerinin ($\mu_{\max}$, Y_{XS} , m_s) belirlenmesi gerekir. Bu parametrelerin başında gelen $\mu_{\max}$ (sa^{-1}) değeri, suşun fizyolojisinde rekombinant protein üretimine ve/veya yabancı bir genin aktarılmasına bağlı olarak herhangi bir olumsuz etkilenmenin meydana gelip gelmediğinin anlaşılmasını sağlar (Heyland vd. 2011). Fizyolojisi ağır derecede etkilenmiş olan suşlar büyümeyi durdurur, ölür ve ağır köpürme nedeniyle biyoreaktör operasyonunda sorunlara yol açabilir. Ayrıca hücrelerin parçalanması, hücre içi proteazların serbest kalması nedeni ile ürünün degradasyonuna yol açabilir (Jahic vd. 2003). Tüm bunlardan da önemlisi, maksimum spesifik gelişim hızı ($\mu_{\max}$), maksimum substrat tüketimini ve yarı-kesikli besleme profilinde substrat ilavesinin üst limitini belirlediğinden spesifik bir proses stratejisi tasarlanırken gözönünde bulundurulması gereken en kritik parametredir.

Besleme fazında farklı stratejiler uygulamaya başlamadan önce *P. pastoris* ksilanaz (XylB) hücre dışı üretim klonunun fizyolojik parametreleri belirlenmiştir. Bunun için öncelikle hücrelerin %4 gliserol içeren 2 L BSM besiyerinde kesikli fazda gelişmeleri sağlanmış daha sonra biyoreaktöre konsantrasyonu %4 olacak şekilde glukoz eklemesi yapılmıştır (80 gr/L %50 glukoz solüsyonu). Yaklaşık 4 saat sonra glukozun bitmesi ile sonlanan proses boyunca saat başı alınan örneklerde ölçülen yaş hücre ağırlığı verilerinden $\mu_{\max}$ hesaplaması yapılmıştır. Ayrıca eklenen glukoz miktarının kaç g hücreye dönüştüğünün oranlaması yapılarak Y_{XS} değeri elde edilmiştir.

Hücrelerin t zamandaki spesifik gelişim hızlarını hesaplamak için, Yarı-kesikli fazda elde edilen hücre gelişim grafiğini tanımlayan 4. derece denklemin ($-0,8204x^2+4,1571x^3-0,8323x^2+7,8815x+106,5$ $R^2=1$) türevi alınarak (dX/dt) t noktasındaki gelişim hızları (r_x , g/sa) hesaplanmıştır. Gelişim hızlarının t noktasındaki toplam hücre ağırlığına (g yha) bölünmesi ile spesifik gelişim hızları (μ , $\text{gg}^{-1}\text{sa}^{-1}$) elde edilmiştir. Şekil 4.2’de örnek alınan 4 noktada hesaplanan spesifik gelişim hızlarının nasıl bir seyir izlediği gösterilmiştir. Hücrelerin hızları belli bir noktaya kadar artmış daha sonra düşmeye başlamıştır. $\mu_{\max}$ değeri t noktasındaki değerlerin ortalaması alınarak hesaplanmıştır. Proses boyunca ölçülen hücre konsantrasyonu ve hesaplanan hız değerleri Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Glukozda biyokütle verimi $Y_{XS} = \Delta X/\Delta S = ((182-106)*0,28)/40 = 0,53$ ($\text{g}_{kha} \text{g}_{glu}^{-1}$) olarak hesaplanmıştır. Düşük spesifik gelişim hızında hücrelerin bakım katsayısı arttığından Y_{XS} değeri düşer. Hücreler $\mu_{\max}$ ’de gelişirken Y_{XS} değeri de max değerine ulaşır. *P. pastoris* HSA üretim suşunun, glukozda, 0,015-0,15 arasında 7 farklı değerde (sabit spesifik gelişim hızında) sürekli sistemde geliştirildiği bir çalışmada Y_{XS} değerinin 0,37-0,53 arasında değiştiği, artan μ ile arttığı rapor edilmiştir (Rebnegger vd. 2014). Çalışmada farklı μ değerleri için besleme profili hesaplanırken Y_{XS} değeri sabit varsayılmış ve ortalama 0,50 olarak hesaba katılmıştır (Heyland vd. 2010; Garcia-Ortega vd. 2013).



Şekil 4.2. Gliserol Kesikli ve Glukoz Yarı-kesikli fazda glukoz-doygun şartlarda geliştirilen hücrelerin maksimum spesifik gelişim hızının hesaplanması. Kesikli fazın sonunda glukozun verildiği zaman 0 olarak alınmıştır. Yaş hücre ağırlığı (□, g/L), spesifik gelişme hızı (○, sa⁻¹)

Çizelge 4.1. Ksilanaz üretim suşunun glukozda maksimum spesifik gelişim hızının (μ_{max}) hesaplanması. Hücrelerin %4 glukozda geliştiği ve hesaplanmanın yapıldığı faz gri olarak gölgelendirilmiştir.

t (sa)	X (g _{yha} /L)	rx dX/dt	μ (rx/X)
-23	0,7±0,1		
-15	11±0,7		
-8	45±1,2		
0	106±2,3	7,9	0,074
0,8	115±1,8	13,2	0,115
1,8	135±1,4	26,5	0,197
3,3	175±2,4	21,5	0,123
3,8	182±2,8	0,1	0,001
μ_{max} (ort)			0,102

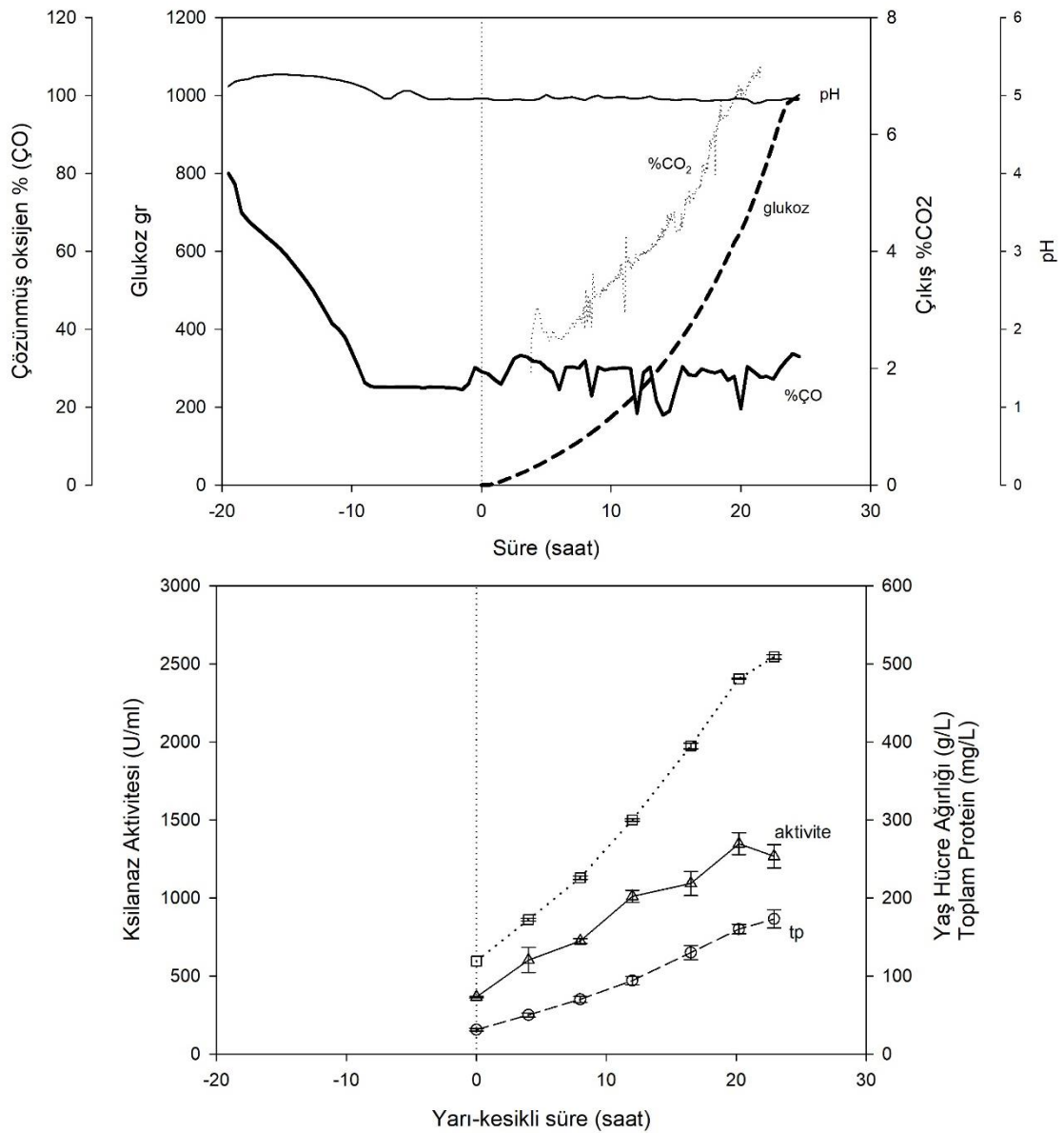
4.2. Sabit- μ Stratejisi ile Gerçekleştirilen Üretimler

Çalışmada uygulanan geribildirim kontrolsüz stratejide, uygulanacak olan μ değerleri 0,02, 0,04, 0,08 ve 0,1 sa⁻¹ olarak belirlenmiştir. Herbir μ değeri için uygulanması gereken üstel artan besleme profili 3.4.3 bölümünde anlatıldığı şekilde hesaplanmıştır. Spesifik gelişme hızını belirli bir değerde sabit tutmak için herbir t değerinde hücrelerin ulaşması gereken konsantrasyon değerine göre ortama verilmesi gereken glukoz miktarı önceden hesaplanmış ve besleme solüsyonu oluşturulan profile göre (F, g_{glu}/sa) ortama kesintisiz olarak verilmiştir.

Üretimin ilk aşaması olan kesikli fazda hücreler %4 gliserolde geliştirildikten sonra uygulanacak olan stratejiye göre ortama, hesaplanan besleme profillerine göre %50

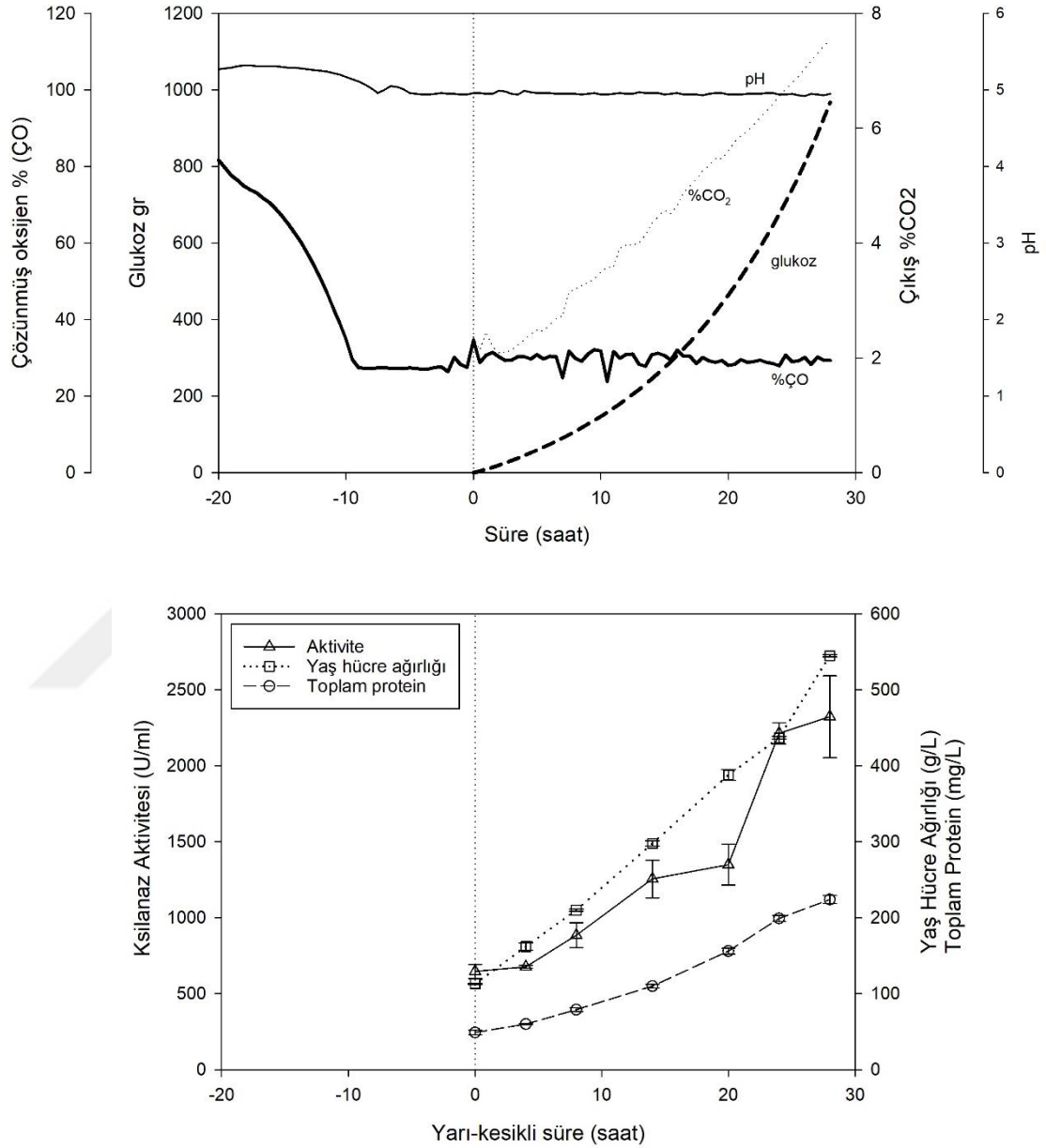
(ağırlık/ağırlık) glukoz besleme çözeltisi verilmeye başlanarak yarı-kesikli faza geçilmiştir. Deneyler 2 paralelli 4 farklı yarı-kesikli fermentasyon şeklinde gerçekleştirilmiştir. Herbir deneyin kesikli fazı ortalama 20 saat sürmüş ve hücreler ortalama 110 g_{yha}/L konsantrasyonuna ulaşmıştır. Besleme fazı, 2000 g besleme solüsyonu (1000 g glukoz) ortama verilene kadar devam ettirilmiştir.

Tüm fermentasyonlar süresince ortamdaki çözünmüş oksijen (%ÇO), pH, besleme solüsyonunun ağırlığı (gr) ve çıkış gazının %CO₂ oranları çevrimiçi ölçülmüştür. Ayrıca, üretim fazı boyunca belirli aralıklarla örnekler alınarak, zamana karşı yaş hücre ağırlığı, protein miktarı ve ksilanaz aktiviteleri çevrimdışı takip edilmiştir. Herbir μ için gerçekleştirilen fermentasyonların çevrimiçi ve çevrimdışı ölçülen değerleri herbir fermentasyon için ayrı grafikler şeklinde aşağıda verilmiştir (Şekil 4.3, 4.4, 4.5 ve 4.6).



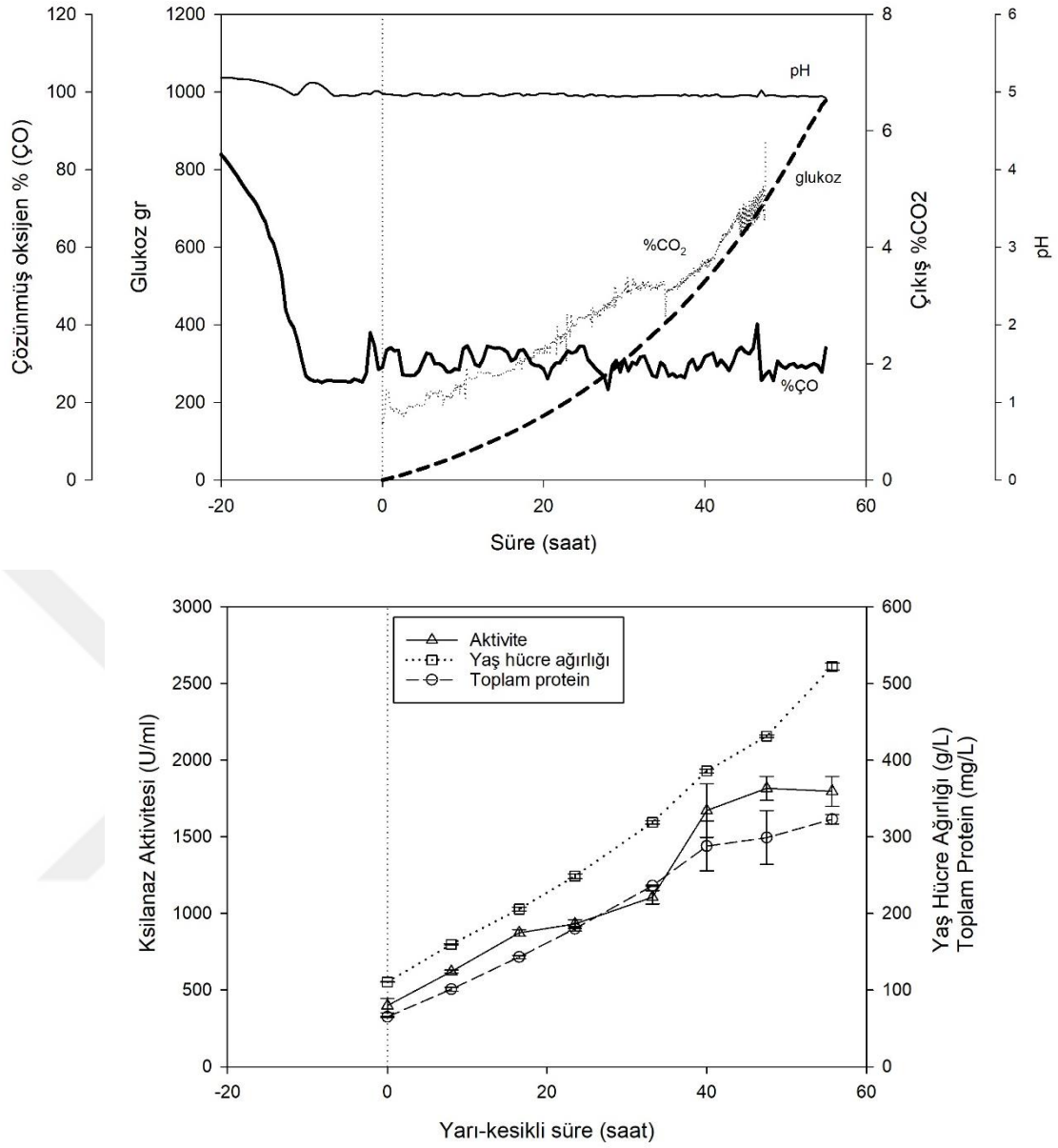
Şekil 4.3. Sabit- μ stratejisine göre 0,1 sa⁻¹ değerinde gerçekleştirilen fermentasyonun (A) çevrimiçi ölçülen verileri, (B) çevrimdışı ölçülen verileri

Spesifik gelişim hızının $0,1 \text{ sa}^{-1}$ değerinde sabit tutulduğu fermentasyonda yarı-kesikli faz 23 saat sürmüştür. Kesikli fazın sonunda 119 g/L olan yaş hücre ağırlığı besleme fazının sonunda 509 g/L 'ye ulaşmıştır. Ksilanaz enzim aktivitesi 1348 U/ml , hücre dışı toplam protein miktarı ise 173 mg/L olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.3).



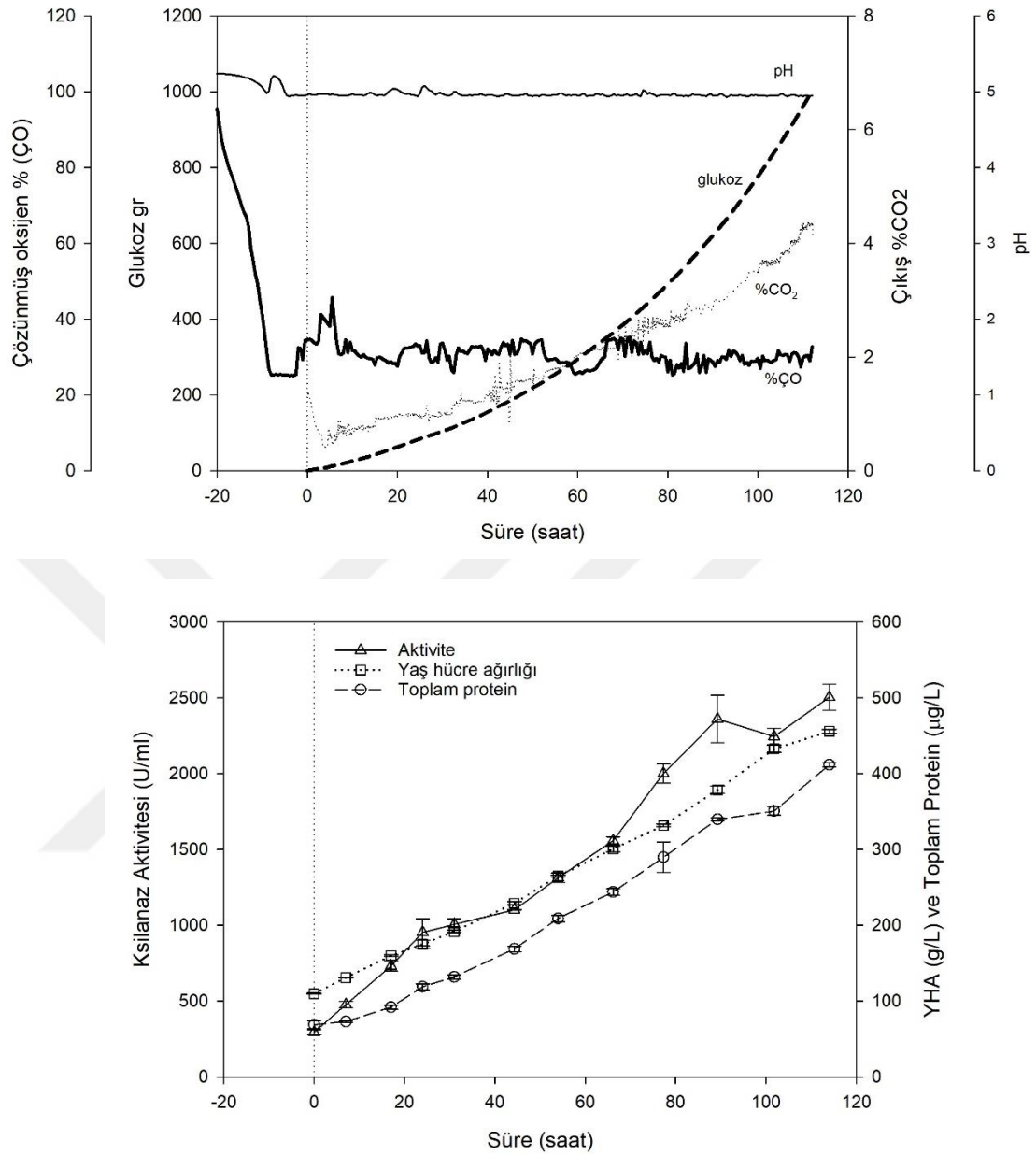
Şekil 4.4. Sabit- μ stratejisine göre $0,08 \text{ sa}^{-1}$ değerinde gerçekleştirilen fermentasyonun (A) çevrimiçi ölçülen verileri, (B) çevrimdışı ölçülen verileri

Spesifik gelişim hızının $0,08 \text{ s}^{-1}$ değerinde sabit tutulduğu fermentasyonda yarı-kesikli faz 28 saat sürmüştür. Kesikli fazın sonunda 113 g/L olan yaş hücre ağırlığı besleme fazının sonunda 545 g/L 'ye ulaşmıştır. Ksilanaz enzim aktivitesi 2324 U/ml , hücre dışı toplam protein miktarı ise 224 mg/L olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.4).



Şekil 4.5. Sabit- μ stratejisine göre $0,04 \text{ sa}^{-1}$ değerinde gerçekleştirilen fermentasyonun (A) çevrimiçi ölçülen verileri, (B) çevrimdışı ölçülen verileri

Spesifik gelişim hızının $0,04 \text{ sa}^{-1}$ değerinde sabit tutulduğu fermentasyonda yarı-kesikli faz 56 saat sürmüştür. Kesikli fazın sonunda 110 g/L olan yaş hücre ağırlığı besleme fazının sonunda 522 g/L 'ye ulaşmıştır. Ksilanaz enzim aktivitesi 1817 U/ml , hücre dışı toplam protein miktarı ise 323 mg/L olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.5).

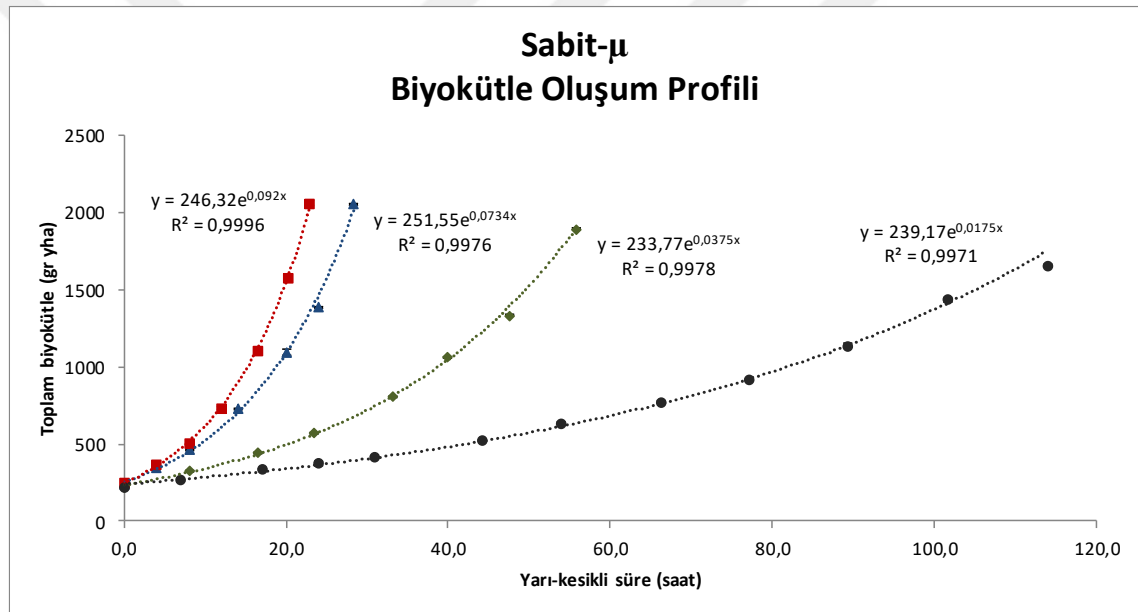


Şekil 4.6. Sabit- μ stratejisine göre $0,02 \text{ sa}^{-1}$ değerinde gerçekleştirilen fermentasyonun (A) çevrimiçi ölçülen verileri, (B) çevrimdışı ölçülen verileri

Spesifik gelişim hızının $0,02 \text{ sa}^{-1}$ değerinde sabit tutulduğu fermentasyonda yarı-kesikli faz 114 saat sürmüştür. Kesikli fazın sonunda 110 g/L olan yaş hücre ağırlığı besleme fazının sonunda 456 g/L 'ye ulaşmıştır. Ksilanaz enzim aktivitesi 2505 U/ml , hücre dışı toplam protein miktarı ise 412 mg/L olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.6).

4.2.1. Sabit- μ stratejisi biyokütle oluşum kinetiği

Sabit- μ stratejisi uygulanarak 4 farklı μ değerinde gerçekleştirilen yarı-kesikli fermentasyonlarda belirli aralıklarla alınan örneklerin yaş hücre ağırlığının (g/L) ölçülmesi ve grafiğe dökülmesi ile hücre gelişim eğrisi çıkarılmıştır (Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6). Spesifik gelişim (μ), spesifik üretim (q_p) ve spesifik tüketim (q_s) hızlarının hesaplanmasında besleme solüsyonunun dilüsyon etkisinden dolayı hücre konsantrasyonu (g/L) ve OD değerleri kullanılamaz. Bu nedenle tüm hız ve katsayı hesaplamaları, toplam biyokütle (gr yha ya da kha), toplam aktivite (U ya da mg) ve toplam protein miktarı (mg) esas alınarak yapılmıştır. Spesifik gelişim hızının hesaplaması hücre konsantrasyon değerlerinin (X, g/L) hacim (V, L) ile çarpılarak (X.V) elde edilen toplam biyokütle değerlerinin zamana karşı çizilen grafiğinden hesaplanmıştır. Herbir μ değeri için gerçekleştirilen fermentasyonların biyokütle oluşum profillerinin üstel eğilim çizgileri ($y = a \cdot e^{\mu t}$) MS Excel yazılımında çizilmiş ve eğrilerin formülleri ve R^2 değerleri grafik üzerinde gösterilmiştir (Şekil 4.7).



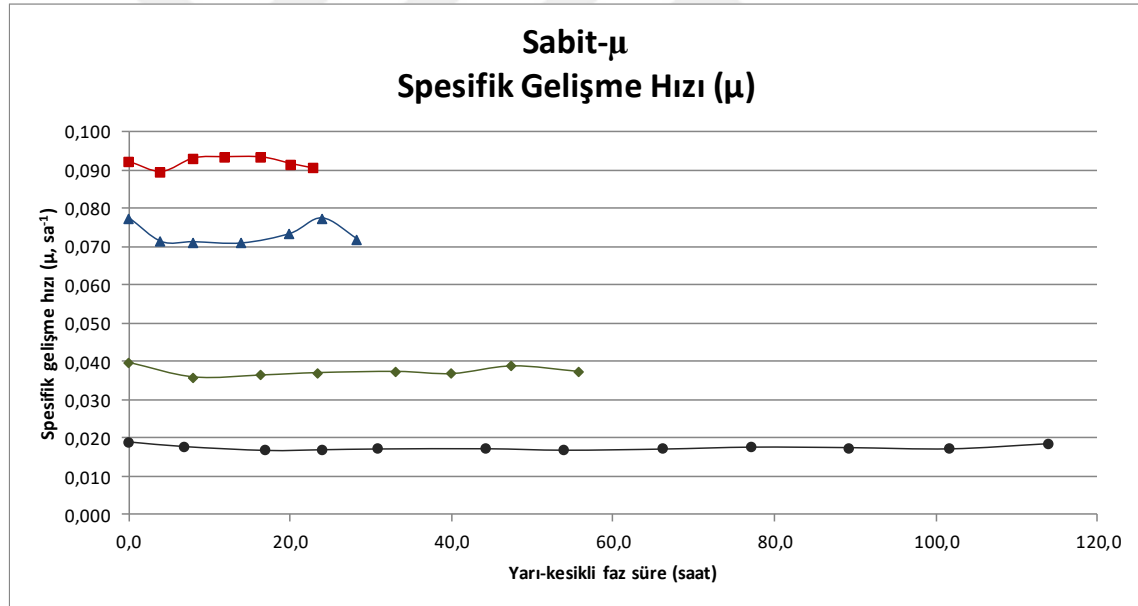
Şekil 4.7. Sabit- μ stratejisine göre gerçekleştirilen yarı-kesikli fermentasyonların biyokütle oluşum profilleri [μ 0,1 (■); μ 0,08 (▲); μ 0,04 (◆); μ 0,02 (●) sa⁻¹]

Sabit gelişim hızında gerçekleştirilen yarı-kesikli proseslerde hücre gelişim denkliği $d(XV) = \mu XV dt$ olarak ifade edilir. Beslemenin başladığı t_0 ve prosesin sona erdiği t zamanı aralığında integrali alındığında $XV = X_0 V_0 e^{\mu(t-t_0)}$ üstel eşitliği elde edilir. Toplam biyokütlenin zamana karşı grafiğinin üstel regresyon eğrisinin R^2 değerlerinin $>0,99$ olması herbir deneyde proses süresince uygulanan üstel besleme profilinin sabit gelişim hızını sağladığını göstermiştir (Şekil 4.7). Herbir fermentasyonda planlanan ve regresyon eğrilerinin formüllerinden çıkarılan (gerçekleşen) μ değerleri Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Sabit- μ stratejisi uygulanan üretimlerde planlanan ve gerçekleşen μ değerleri, gerçekleşen biyokütle profillerinin üstel regresyon eğri formülleri ve R^2 değerleri

μ planlanan (sa ⁻¹)	μ gerçekleşen (sa ⁻¹)	Regresyon eğrisi formül	Regresyon eğrisi R^2
0,10	0,092±0,001	$y=246 \cdot e^{0,092x}$	0,9996
0,08	0,073±0,003	$y=252 \cdot e^{0,0734x}$	0,9976
0,04	0,036±0,001	$y=234 \cdot e^{0,0375x}$	0,9978
0,02	0,018±0,001	$y=239 \cdot e^{0,0175x}$	0,9971

Biyokütle oluşum profillerinin regresyon eğrilerinin t zamanındaki eğimini hesaplamak için regresyon formülünün türevi alınarak anlık biyokütle oluşum hızları (r_x , g hücre/sa) hesaplanmıştır. r_x değerlerinin t anındaki biyokütle miktarına (XV, gr) bölünmesi ile anlık spesifik gelişim hızları (μ , g hücre/g hücre/sa) hesaplanarak herbir fermentasyonun μ profili çıkarılmıştır (Şekil 4.8).



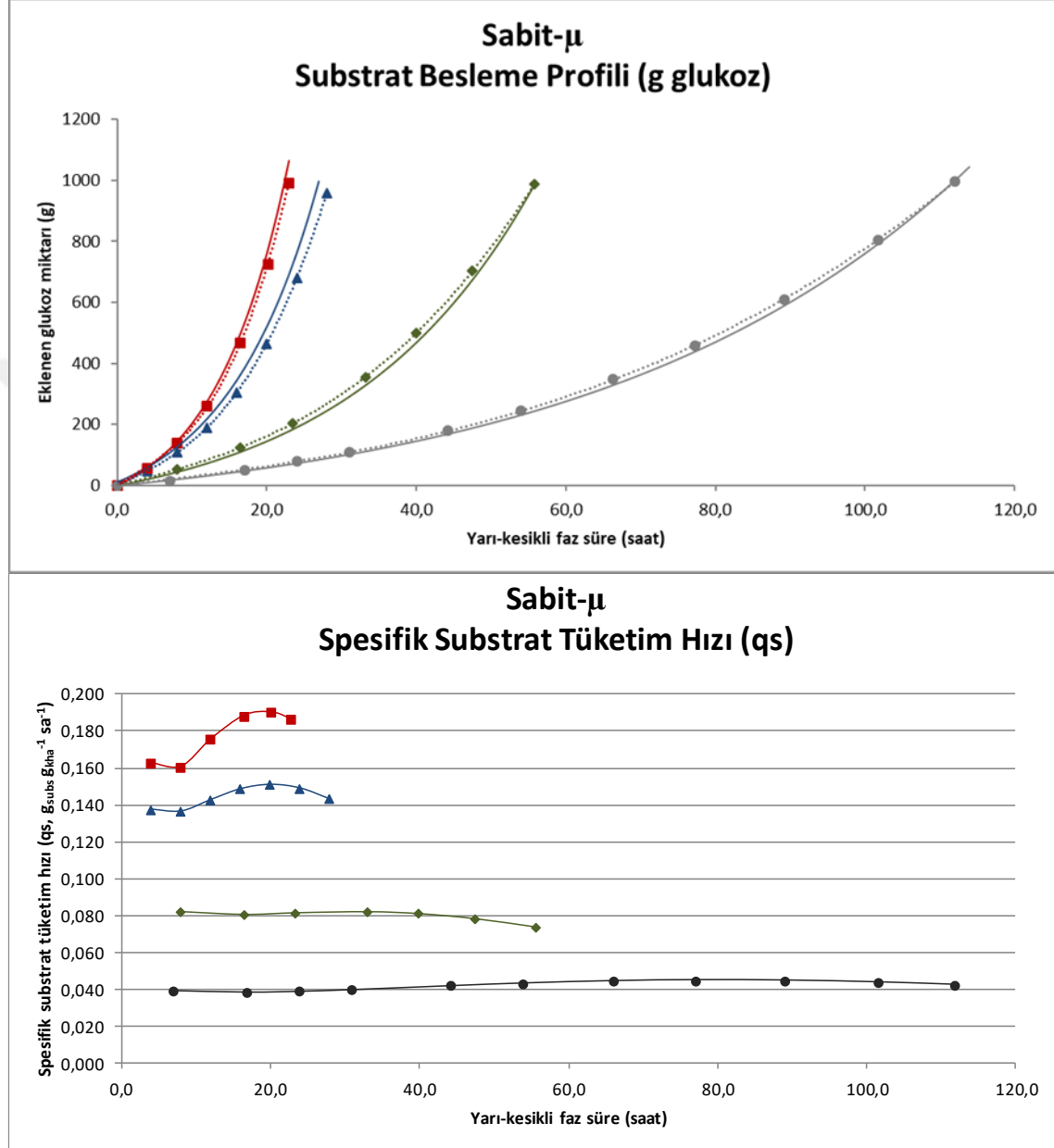
Şekil 4.8. Sabit- μ stratejisine göre gerçekleştirilen yarı-kesikli fermentasyonların spesifik gelişim hızı (μ) profilleri. (■) μ 0,1; (▲) μ 0,08; (◆) μ 0,04; (●) μ 0,02 sa⁻¹

Şekil 4.8’de görüldüğü üzere, μ değerlerinin proses süresince sabit olmasının sağlandığı, set değerlerine göre hesaplanarak belirlenmiş besleme profillerinin doğru olduğu ve teknik olarak sorunsuz bir şekilde uygulandığı söylenebilir.

4.2.2. Sabit- μ stratejisi substrat tüketim kinetiği (q_s , $g_{subs}/g_{kha}/sa$)

Şekil 4.9’da μ set değerlerine göre *hesaplanan besleme profilleri* ile birlikte substrat çözeltisinin çevrimiçi tartımından alınan verilerden elde edilen *gerçekleşen*

besleme profilleri ve substrat tüketim hızı (q_s , $g_{glu}/g_{kha}/sa$) profilleri verilmiştir. Her bir fermentasyonda μ değerinin sabit kalması (Şekil 4.8), kütle dengesi denklemlerine göre hesaplanan substrat besleme profilinin başarılı bir şekilde uygulanması ile gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.9. Sabit μ besleme stratejisinin 4 farklı değer için uygulandığı üretimlerdeki (A) hesaplanan (—) ve gerçekleştirilen (·····) substrat besleme profilleri, (B) substrat tüketim hızı (q_s , $g_{glu}/g_{kha}/sa$) profilleri (■) μ 0,1; (▲) μ 0,08; (◆) μ 0,04; (●) μ 0,02 sa^{-1}

Gerçekleşen substrat besleme profil eğrilerini tanımlayan denklemler çok yüksek korelasyon değerleri ($R^2 > 0,9999$) ile 3. dereceden polinom eğilim çizgilerinden elde edilmiştir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Sabit- μ stratejisinde uygulanan substrat besleme profillerini tanımlayan üçüncü dereceden polinom eğrilerinin denklem (ax^3+bx^2+cx) katsayıları ve R^2 değerleri

μ set değeri	a	b	c	R^2
0,10 sa⁻¹	0,0671	-0,3417	15,736	0,9999
0,08 sa⁻¹	0,0277	0,0403	11,351	1
0,04 sa⁻¹	0,0031	0,0353	6,1195	1
0,02 sa⁻¹	0,0004	0,011	2,7844	0,9999

Üstel artan besleme stratejisinde, tanımlı μ değerine göre eklenen substrat hücreler tarafından hemen kullanıldığından proses süresince biyoreaktör besiyerindeki substrat konsantrasyonu 0'a yakın olur (Zhang vd. 2007). Sabit- μ stratejisinin substrat-kısıtlı olduğu bilinmekle birlikte, alınan süpernatant örneklerde D-Glukoz (GOPOD) Kit (Megazyme, İrlanda) ile artık glukoz analizi yapılmış ve proses süresince artık glukoz konsantrasyonları 10-20 mg/L aralığında tespit edilmiştir (veri gösterilmemiştir). Elde edilen bu değerler literatürdeki sabit- μ stratejisinin uygulandığı çalışmalar ile uyumlu bulunmuştur (Rebnegger vd. 2014). Biyoreaktöre eklenen substrat hücreler tarafından hemen kullanıldığından, yapılan tüm hesaplamalarda substrat besleme profili, substrat tüketim profili olarak kullanılmıştır. Substrat besleme profil denklemlerinin t anındaki türevi alınarak gerçekleşen anlık besleme hızı ($F, g_{glukoz}/sa$), besleme hızının t anındaki toplam kuru hücre ağırlığına (F/XV) bölünmesi ile ise anlık spesifik substrat tüketim hızları ($q_s, g_{glukoz}/g_{kha}/sa$) hesaplanmıştır. 4 farklı μ değerinde gerçekleştirilen fermentasyonların t (sa), XV (g_{kha}), F (g/sa) ve q_s ($g_{glukoz}/g_{kha}^{-1}sa^{-1}$) değerleri Çizelge 4.4'de verilmiştir.

Hesaplanan q_s değerlerinin zamana karşı grafiklerine bakıldığı zaman (Şekil 4.9.B) herbir fermentasyonun q_s değerinin ilgili spesifik gelişim hızı ile tutarlı olduğu ve proses süresince sabit kaldığı görülmektedir. Ortalama q_s değerleri 0,02 μ üretimi için $0,04 \pm 0,002 g_{glukoz}/g_{kha}^{-1}sa^{-1}$; 0,04 μ üretimi için $0,08 \pm 0,003 g_{glukoz}/g_{kha}^{-1}sa^{-1}$; 0,08 μ üretimi için $0,14 \pm 0,006 g_{glukoz}/g_{kha}^{-1}sa^{-1}$ ve 0,10 μ üretimi için $0,18 \pm 0,013 g_{glukoz}/g_{kha}^{-1}sa^{-1}$ olarak gerçekleşmiştir.

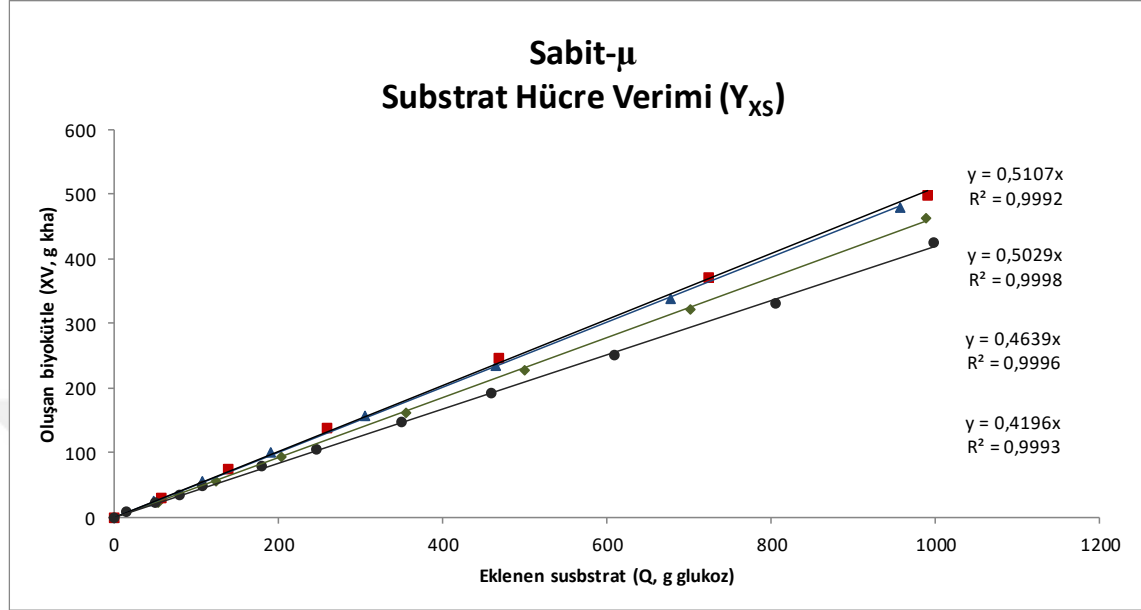
Farklı gelişim hızlarında gerçekleştirilen üstel beslemeli (substrat-kısıtlı) yarı-kesikli proseslerin μ ve q_s profilleri değerlendirildiğinde herbirinde yarı-kararlı duruma ulaşıldığı söylenebilir.

Çizelge 4.4. Sabit- μ stratejisinde gerçekleştirilen fermentasyonların t (sa), XV (g_{kha}), F (g/sa) ve q_s (g_{glu}g_{kha}⁻¹sa⁻¹) değerleri

μ set değeri (sa ⁻¹)	t (sa)	XV (g _{kha}) ($y=0,28 \cdot ae^{\mu t}$)*	F (g _{glu} /sa) ($3ax^2+2bx+c$) [†]	q _s (g _{glu} ⁻¹ g _{kha} sa ⁻¹) (F/XV)
0,02	0,0	62±0,3	2,8	-
	7,0	74±0,1	3,0	0,040
	17,0	93±0,6	3,5	0,039
	31,0	117±0,7	4,6	0,040
	44,3	147±1,3	6,1	0,042
	54,0	178±0,9	7,5	0,043
	66,2	217±2,8	9,5	0,045
	77,3	256±1,3	11,6	0,045
	89,3	318±4,2	14,3	0,045
	101,8	403±4,5	17,4	0,044
	112,0	465±2,6	20,3	0,043
0,04	0,0	62±0,02	6,1	-
	8,0	92±0,1	7,3	0,082
	16,5	125±0,3	9,8	0,081
	23,5	160±0,5	12,9	0,082
	33,2	227±0,5	18,7	0,082
	40,0	299±0,8	23,8	0,081
	47,5	374±0,7	30,5	0,078
	55,7	531±2,4	39,0	0,074
0,08	0,0	70±0,5	11,4	-
	4,0	94±2,8	13,0	0,138
	8,0	127±0,8	17,3	0,137
	12,0	170±2,3	24,3	0,143
	16,0	228±3,4	33,9	0,149
	20,0	306±5,8	46,2	0,151
	24,0	410±1,6	61,2	0,149
	28,0	550±1,5	78,8	0,143
0,10	0,0	69±0,9	15,7	-
	4,0	102±1,3	16,2	0,163
	8,0	142±0,9	23,2	0,161
	12,0	205±2,5	36,5	0,176
	16,5	310±0,6	59,3	0,188
	20,2	443±2,6	83,8	0,190
	22,9	577±3,7	105,8	0,186

*Biyokütle profillerini tanımlayan denklem (Çizelge 4.2), 0,28 yaş hücre ağırlığını kuru hücre ağırlığına çevirmek için kullanılan katsayıdır. [†]Substrat besleme profillerini tanımlayan denklem (Çizelge 4.3)

Substrat hücre verim değerleri (Y_{XS}) hesaplandığında (Şekil 4.10) μ değeri arttıkça substratın biyokütleye dönüşme oranının arttığı tespit edilmiştir. Y_{XS} değerleri düşük gelişim hızından başlayarak yüksek gelişim hızına doğru sırasıyla 0,42, 0,46, 0,50 ve 0,51 olarak gerçekleşmiştir.

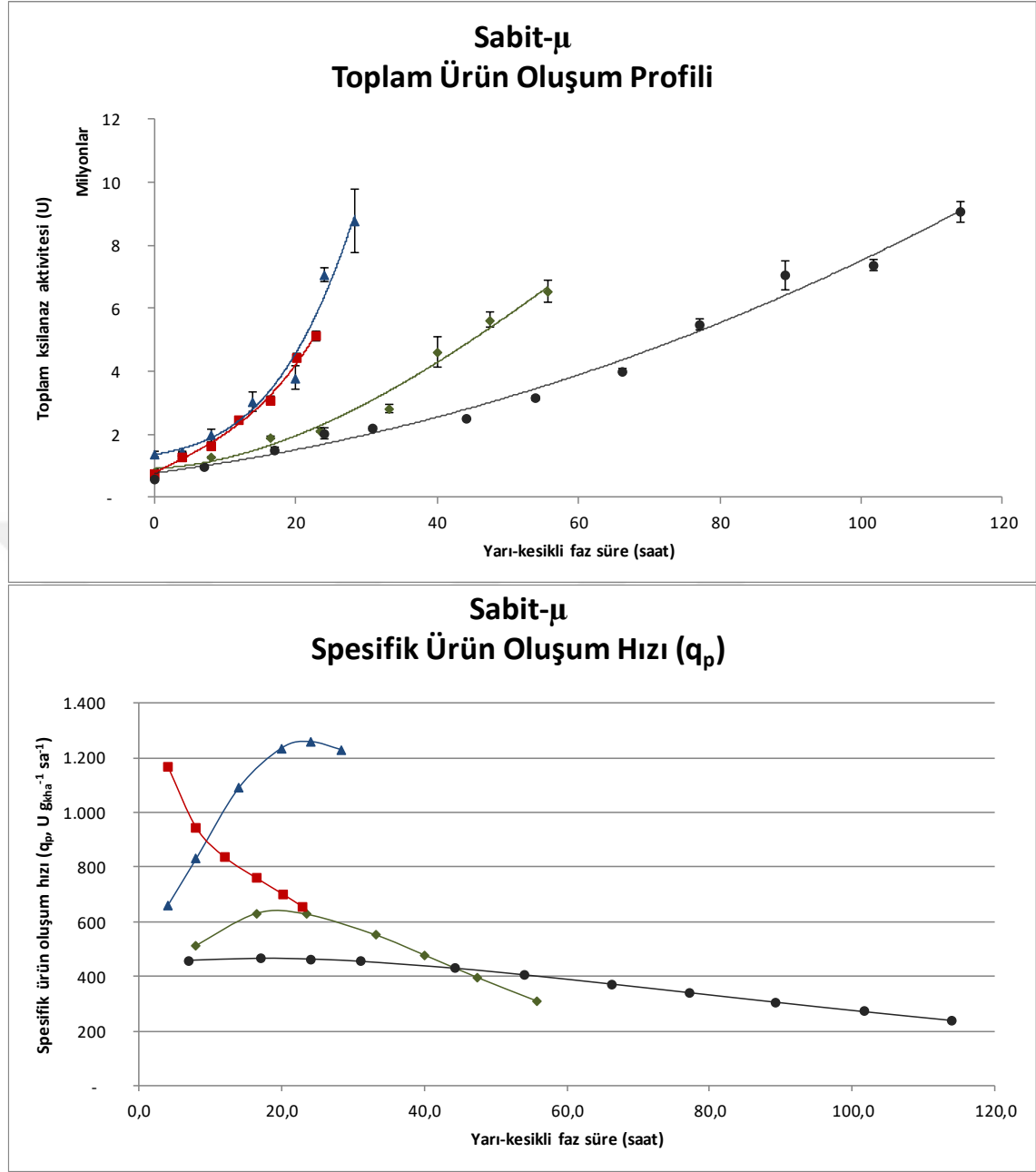


Şekil 4.10. Farklı sabit- μ değerlerinde gerçekleştirilen yarı-kesikli proseslerin substrat hücre verimi (Y_{XS}) katsayılarının hesaplanması [μ 0,1 (■), μ 0,08 (▲), μ 0,04 (◆), μ 0,02 (●) sa^{-1}]

Proses süresince eşit miktarda substrattan (1000 gr glukoz) oluşan toplam biyokütle miktarı ve dolayısıyla substrat hücre verimi (Y_{XS}) spesifik gelişim hızı ile birlikte artmıştır.

4.2.3. Sabit- μ stratejisi ürün oluşum kinetiği (q_p , $\text{kU/g}_{\text{kha}}/\text{sa}$ ve Q_p , kU/L/sa)

Şekil 4.11’de 4 farklı μ değeri için gerçekleştirilen üstel beslemeli yarı kesikli proseslerde belirli aralıklarla alınan örneklerin ksilanaz aktivite değerlerinin (P , U/L) toplam hacim (V , L) ile çarpımı sonucu elde edilen toplam enzim aktivitesi profilleri ve bu profillerinden hesaplanan spesifik ürün oluşum hızı (q_p , $\text{U g}_{\text{kha}}^{-1}\text{sa}^{-1}$) profilleri görülmektedir.



Şekil 4.11. Sabit μ besleme stratejisinin 4 farklı değer için uygulandığı üretimlerdeki (A) toplam enzim aktivitesi (U), (B) spesifik ürün oluşum hızı (q_p , U $g_{kha}^{-1}sa^{-1}$) profilleri [μ 0,1 (■); μ 0,08 (▲); μ 0,04 (◆); μ 0,02 (●) sa^{-1}]

Toplam enzim aktivitesi profillerinin 3. dereceden polinom denklemleri çıkarılarak matematiksel modellemeleri yapıldığında elde edilen denklem katsayıları ve R^2 değerleri Çizelge 4.5’de verilmiştir.

Çizelge 4.5. Toplam enzim aktivitesi profillerinin üçüncü dereceden polinom eğrilerinin denklem (ax^3+bx^2+cx+d) katsayıları ve R^2 değerleri

μ değeri	a	b	c	d	R^2
0,10 sa ⁻¹	193,31	-1.037,1	115.361	767.441	0,99
0,08 sa ⁻¹	248,23	901,7	43.442	1.000.000	0,98
0,04 sa ⁻¹	-10,36	2.230,4	11.519	909.013	0,98
0,02 sa ⁻¹	0,17	360,5	29.731	766.449	0,99

Toplam enzim aktivitesi (kU), toplam biyokütle ağırlığı ve üretim profillerinin denklemlerinden elde edilen üretim kinetiği parametreleri Çizelge 4.6’da verilmiştir. Elde edilen toplam üretimi karşılaştırdığımızda düşükten yüksek gelişim hızında gerçekleştirilen üretimlerde sırasıyla 112 saatte 9.062 ± 313 kU, 56 saatte 6.528 ± 357 , 29 saatte 8.766 ± 1.014 ve 23 saatte 5.129 ± 162 kU toplam enzim aktiviteleri elde edilmiştir. En yüksek toplam enzim aktivitelerine 0,02 ve 0,08 μ üretimlerinde ulaşılmıştır.

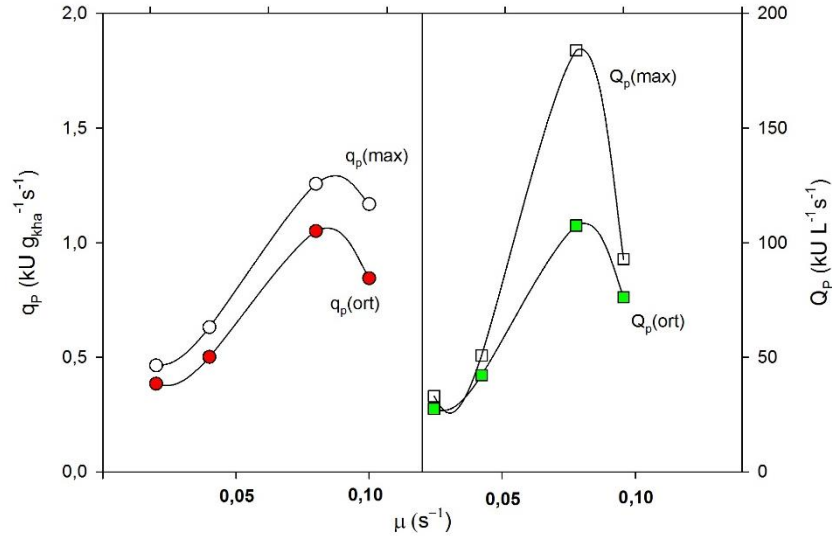
Spesifik ürün oluşum hızlarına baktığımızda $0,8\mu_{\max}$ üretiminin q_p değerleri proses süresince yükselen bir eğilim sergilerken, düşük gelişim hızlarındaki üretimlerde daha stabil bir seyir izlemiştir. Herbir üretimde ulaşılan **maksimum q_p** (U/g_{kha}/sa) değerleri düşük hızlı üretimde başlayarak sırasıyla 0,464 ($0,2\mu_{\max}$), 0,631 ($0,4\mu_{\max}$), 1,257 ($0,8\mu_{\max}$) ve 1,168 ($\mu_{\max}$) olarak hesaplanmıştır. **Ortalama q_p** değerleri ise aynı sıra ile 0,378, 0,501, 1,051 ve 0,844 olarak hesaplanmıştır. En yüksek ortalama q_p değeri, $0,4\mu_{\max}$ üretiminin 2 katı, $0,2\mu_{\max}$ üretiminin ise 3 katı olarak $0,8\mu_{\max}$ üretiminde gerçekleşmiştir.

Biyoprosesin ekonomisini tanımlayan en önemli parametrelerden biri olan ve uzay zaman verimi (STY, space time yield) olarak da ifade edilen hacimsel verimlilik (Q_p) birim zaman ve hacim başına düşen toplam ürün miktarı/enzim aktivitesi (kU/L/sa) olarak tanımlanır. Prosesin Q_p değerleri ürün oluşum hızlarının (r_p) toplam reaksiyon hacimlerine (V) bölünmesi ile hesaplanmıştır (Çizelge 4.6). Farklı μ değerlerinde gerçekleştirilen üretimlerde elde edilen Q_p profili maksimum ve ortalama Q_p değerleri Çizelge 4.6’da verilmiştir.

Çizelge 4.6. Farklı sabit- μ değerlerinde gerçekleştirilen yarı-kesikli proseslerin maksimum ve ortalama spesifik ürün oluşum hızları (q_p) ve hacimsel verimlilik (Q_p) değerleri

μ set değeri sa ⁻¹	$q_p(\max)$ (kU g _{kha} ⁻¹ sa ⁻¹)	$q_p(ort)$ (kU g _{kha} ⁻¹ sa ⁻¹)	$Q_p(\max)$ (kU L ⁻¹ sa ⁻¹)	$Q_p(ort)$ (kU L ⁻¹ sa ⁻¹)
0,02	0,464	0,384	33,0	26,4
0,04	0,631	0,501	50,8	37,6
0,08	1,257	1,051	183,9	95,1
0,10	1,168	0,844	92,9	76,2

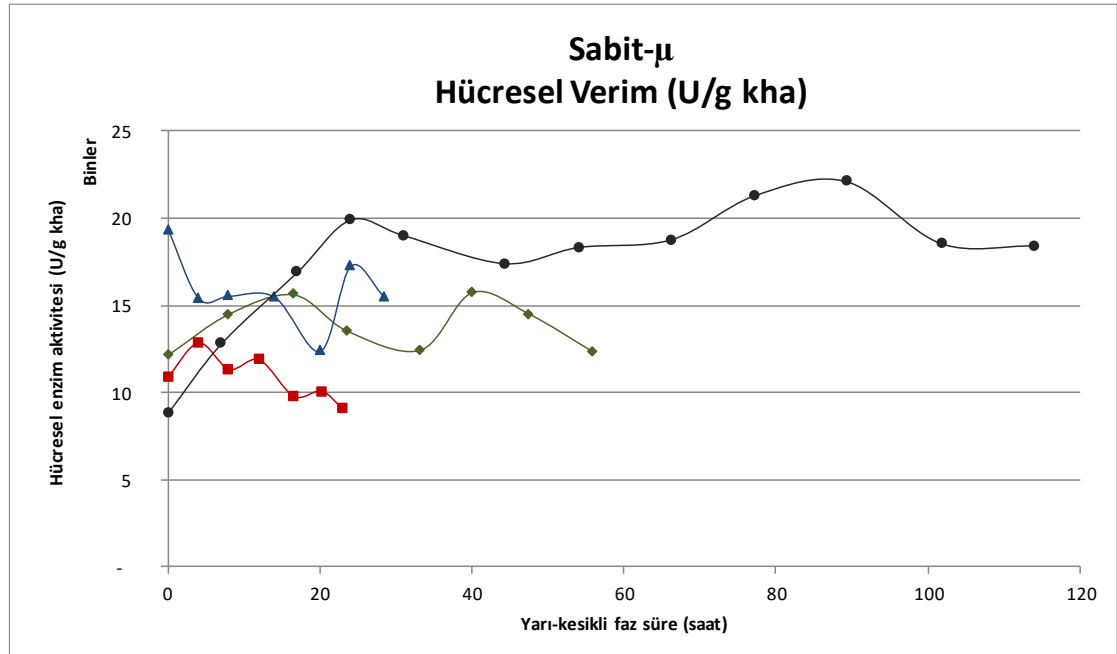
Çizelge 4.6’daki değerlerin grafiksel gösterimi Şekil 4.12’de verilmiştir. Q_p ve q_p değerlerinin ortalama değerleri aynı üretimde ($0,8\mu_{\max}$) en yüksek değerlerine ulaşmışlar ve $\mu_{\max}$ üretiminde düşüş göstermişlerdir.



Şekil 4.12. Spesifik gelişim hızı (μ) ile spesifik ürün oluşum hızı (q_p) ve hacimsel verimlilik (Q_p) arasındaki ilişki.

4.2.4. Sabit- μ stratejisi hücresel verim (kU/g_{kha})

Gram hücre başına üretilen enzim aktivitesi (U/g kuru hücre) olarak tanımlanan hücresel verim, hacimsel enzim aktivitesinin (P , U/ml) kuru hücre konsantrasyonuna (X , g_{kha}/L) bölünmesi ile hesaplanmıştır. Üstel besleme stratejisinin uygulandığı üretimlerde elde edilen hücresel verim değerleri Çizelge 4.8’de verilmiş, ayrıca Şekil 4.13’de gösterilmiştir.

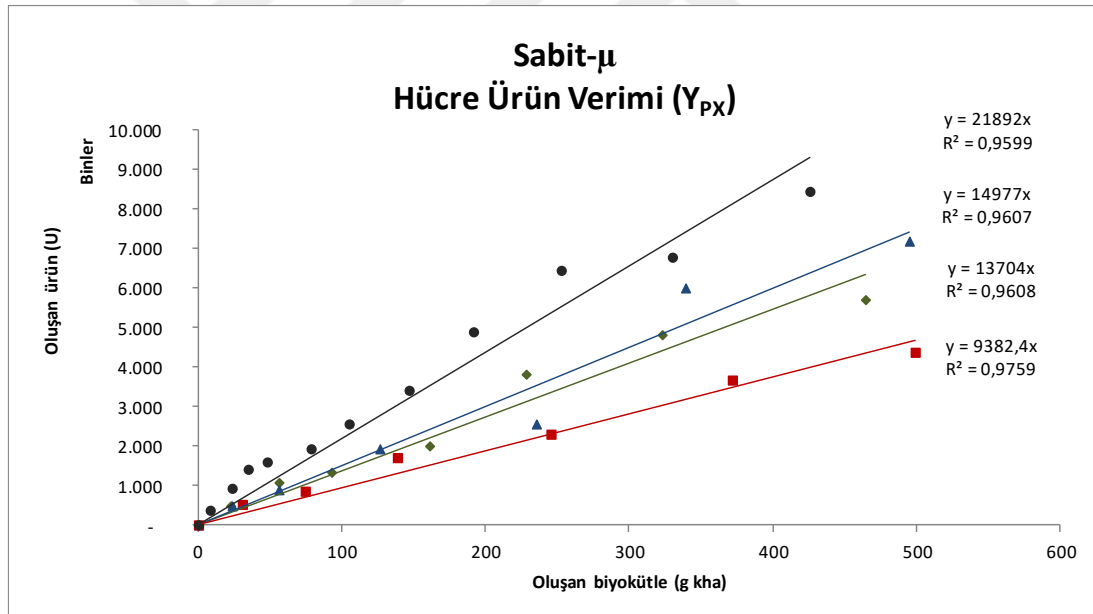


Şekil 4.13. Sabit- μ besleme stratejisinin 4 farklı değer için uygulandığı üretimlerdeki hücresel verim (U/g_{kha}) profilleri [μ 0,1 (■); μ 0,08 (▲); μ 0,04 (◆); μ 0,02 (●) sa⁻¹]

Şekil 4.13'deki profillerde görüldüğü gibi hücrel enzim aktivitesinin proses süresince stabil olduğu ve genel olarak μ değeri arttıkça azaldığı sonucuna varılabilir. Anlık hücrel verim değerlerinin ortalaması alındığında düşükten yüksek gelişim hızına doğru sırası ile $17,7 \pm 3,6$ ($0,2\mu_{\max}$), $13,8 \pm 1,5$ ($0,4\mu_{\max}$), $15,8 \pm 2,1$ ($0,8\mu_{\max}$) ve $10,8 \pm 1,3$ ($\mu_{\max}$) kU/g_{kha} değerleri elde edilmiştir.

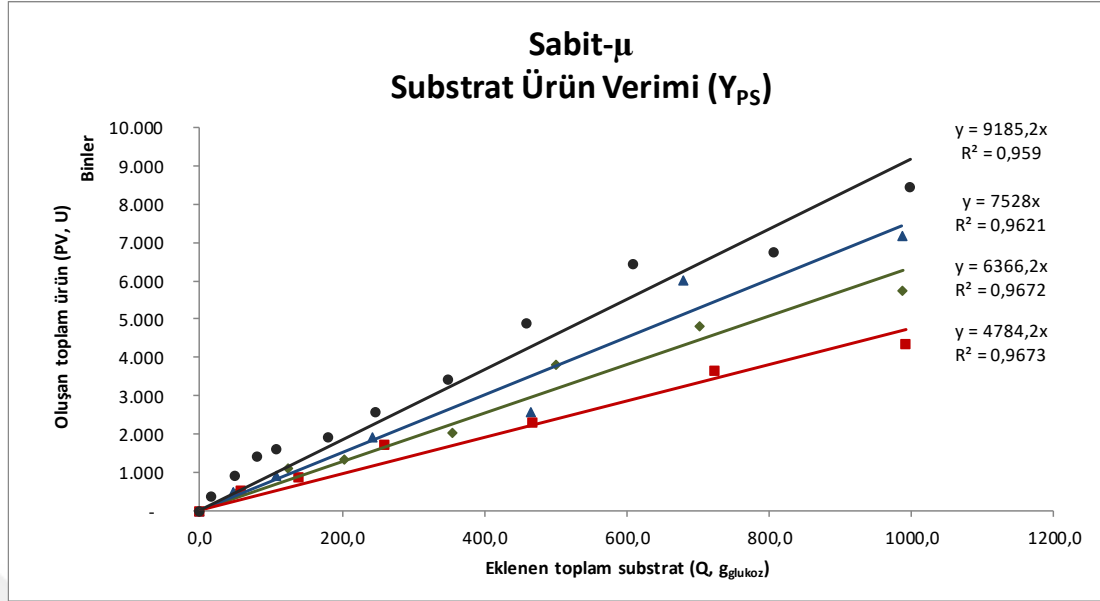
Proses süresince oluşan ürün miktarının (PV, U) oluşan toplam kuru hücre miktarına karşı çizilen grafiğin lineer regresyon analizinden de prosesin toplam hücre ürün verimi (Y_{PX} , U/g_{kha}) elde edilmiştir (Şekil 4.14). Grafikten elde edilen verim değerleri düşük gelişim hızlı üretimden başlayarak sırasıyla $21,97 \pm 0,9$; $13,7 \pm 0,7$; $15,0 \pm 0,8$ ve $9,4 \pm 0,4$ olarak elde edilmiştir.

En yüksek hücrel ($21,9 \pm 0,85 \text{ kU/g}_{\text{kha}}$) verim, aynı zamanda hacimsel aktivite ($2.505 \pm 87 \text{ U/ml}$) ve toplam enzim aktivitesinin ($9.062 \pm 313 \text{ kU}$) en yüksek olduğu $0,2\mu_{\max}$ üretiminde elde edilmiştir. Bununla birlikte toplam (r_p , kU/sa), spesifik (q_p , $\text{kU/g}_{\text{kha/sa}}$) ve hacimsel (Q_p , kU/L/sa) ürün oluşum hızları en yüksek değerlerine $0,8\mu_{\max}$ üretiminde ulaşmışlardır. $0,8\mu_{\max}$ ve $0,2\mu_{\max}$ üretimlerinde prosesin sonunda her ne kadar aynı miktarlarda enzim aktivitesi elde edildiyse de $0,2\mu_{\max}$ üretiminin üretim fazı 112 saat sürerken, $0,8\mu_{\max}$ üretiminde 29 saatte bitmesi, $0,8\mu_{\max}$ üretiminin verimlilik değerlerinin 3 kat daha fazla olmasını sağlamıştır.



Şekil 4.14. Farklı sabit- μ değerlerinde gerçekleştirilen yarı-kesikli proseslerin hücre ürün verimi (Y_{PX}) katsayılarının hesaplanması [μ 0,1 (■); μ 0,08 (▲); μ 0,04 (◆); μ 0,02 (●) sa^{-1}]

Birim substrattan elde edilen ürün verimleri (Y_{PS}) hesaplandığında (Şekil 4.15), artan μ ile birlikte substrat veriminin azaldığı tespit edilmiştir. Hesaplanan tüm proses verim değerleri Çizelge 4.7'de verilmiştir.



Şekil 4.15. Farklı sabit- μ değerlerinde gerçekleştirilen yarı-kesikli proseslerin substrat ürün verimi (Y_{PS}) katsayılarının hesaplanması [μ 0,1 (■); μ 0,08 (▲); μ 0,04 (◆); μ 0,02 (●) sa^{-1}]

Sabit- μ strateji ile gerçekleştirilen üretimlerde artan μ değeri ile birlikte hücre ve substrat başına üretilen ürün miktarı (Y_{PX} ve Y_{PS}) artarken substrat başına üretilen biyokütle miktarının (Y_{XS}) azaldığı tespit edilmiştir.

Çizelge 4.7. Farklı sabit- μ değerlerinde gerçekleştirilen yarı-kesikli proseslerin ortalama hücre, substrat ve ürün verim değerleri

μ set değeri sa^{-1}	Y_{XS} (g _{kha} g _{subs} ⁻¹)	Y_{PX} (kU g _{kha} ⁻¹)	Y_{PS} (kU g _{subs} ⁻¹)
0,02	0,42±0,002	21,9±0,9	9,2±0,4
0,04	0,46±0,002	13,7±0,7	6,4±0,3
0,08	0,50±0,002	15,0±0,8	7,5±0,4
0,10	0,51±0,004	9,4±0,4	4,8±0,2

Çizelge 4.8. Sabit- μ stratejisinde gerçekleştirilen fermentasyonların ölçülen ve hesaplanan üretim kinetiği parametreleri

μ set değeri (sa ⁻¹)	t (sa)	X (g _{kha} /L)	P (U/ml)	PV (kU) ax^3+bx^2+cx+d	r_p (kU/sa) $3ax^2+2bx+c$	q_p (kU/g _{kha} /sa) (r_p/XV)	Qp (kU/L/sa) (r_p/V)	Hücresel verim (kU/g _{kha}) (P/X)
0,02	0	31 ±0,2	296 ±17	592 ± 33	-	-	-	-
	24	49 ±1,5	954 ±90	2.026 ± 191	47,3	0,464	22,3	19,9
	44	64 ±0,6	1.102 ±20	2.526 ± 65	62,6	0,431	27,3	17,4
	54	74 ±0,4	1.314 ±31	3.155 ± 74	70,1	0,407	29,2	18,3
	77	93 ±0,5	2.002 ±63	5.507 ± 173	88,4	0,342	32,1	21,3
	102	121 ±1,3	2.246 ±53	7.367 ± 173	108,3	0,273	33,1	18,5
	112	128 ±0,7	2.505 ±87	9.062 ± 313	118,4	0,241	32,7	18,4
0,04	0	31 ±0,1	398 ±46	793 ±92	-	-	-	-
	17	58 ±0,7	873 ±22	1.897 ±47	76,7	0,631	35,3	15,6
	24	70 ±0,9	931 ±29	2.135 ±67	99,2	0,628	43,2	13,5
	33	89 ±0,6	1.105 ±44	2.816 ±113	125,3	0,552	49,2	12,4
	40	108 ±0,7	1.672 ±175	4.618 ±484	140,2	0,478	50,8	15,7
	48	121 ±0,5	1.817 ±77	5.628 ±239	153,3	0,394	49,5	14,5
	56	146 ±1,3	1.797 ±98	6.528 ±357	163,6	0,309	45,0	12,3
0,08	0	32 ±0,2	647 ±47	1.361 ±98	-	-	-	-
	4	45 ±1,3	677 ±10	1.456 ±23	62,6	0,662	29,1	15,4
	8	59 ±0,4	885 ±83	1.969 ±184	105,5	0,833	47,4	15,5
	14	84 ±0,9	1.256 ±124	3.047 ±300	214,6	1,090	88,5	15,5
	20	109 ±2,0	1.350 ±135	3.788 ±377	377,3	1,234	134,5	12,4
	24	122 ±0,5	2.215 ±70	7.076 ±225	515,6	1,257	161,4	17,3
	29	152 ±0,4	2.324 ±269	8.766 ±1.014	693,8	1,228	183,9	15,5
0,10	0	33 ±0,4	365 ±4	751 ±9	-	-	-	-
	8	63 ±0,4	724 ±12	1.630 ±28	135,9	0,944	60,4	11,3
	12	84 ±1,0	1.010 ±28	2.467 ±68	173,9	0,836	72,4	11,9
	17	111 ±0,2	1.093 ±49	3.068 ±138	239,0	0,759	85,8	9,7
	20	135 ±0,8	1.348 ±40	4.433 ±132	309,4	0,702	91,9	10,1
	23	143 ±0,9	1.267 ±40	5.129 ±162	372,4	0,656	92,9	9,0

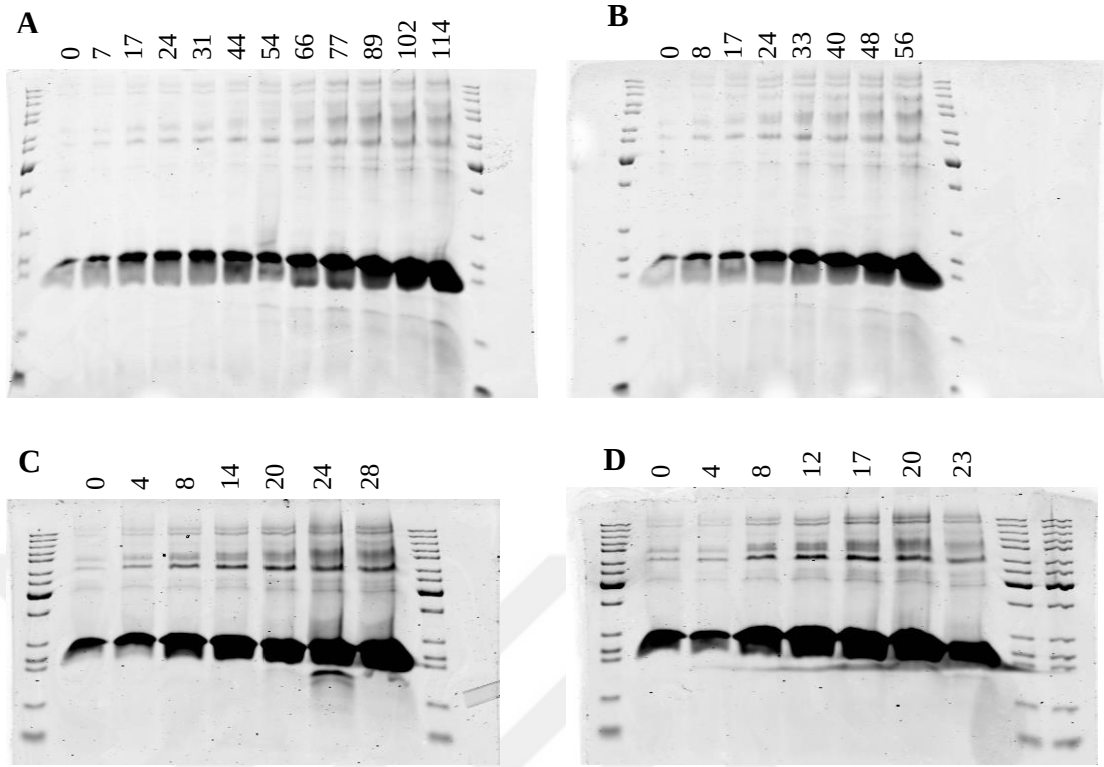
4.2.5. Sabit- μ stratejisi hücre dışı toplam protein

Sabit- μ stratejisi ile gerçekleştirilen fermentasyonlarda alınan örneklerde toplam protein analizi yapılarak hücrelerin ksilanaz ile birlikte hücre dışına salgıladığı toplam protein konsantrasyonu (mg/L) tayin edilmiş ve Çizelge 4.9’da verilmiştir.

Çizelge 4.9. Farklı sabit- μ değerlerinde gerçekleştirilen yarı-kesikli proseslerin hacimsel aktivite (U/ml), hücre dışı toplam protein (μ g/ml) ve spesifik aktivite (kU/mg) değerleri

μ set değeri (sa^{-1})	t (sa)	P (U/ml)	Tp (mg/L)	Sp. aktivite (kU/mg protein) (P/Tp)
0,02	0	296 $\pm$ 17	69 $\pm$ 5,4	4,3
	24	954 $\pm$ 90	119 $\pm$ 4,1	8,0
	44	1.102 $\pm$ 20	169 $\pm$ 3,6	6,5
	54	1.314 $\pm$ 31	209 $\pm$ 4,2	6,3
	77	2.002 $\pm$ 63	290 $\pm$ 20	6,9
	102	2.246 $\pm$ 53	351 $\pm$ 5,8	6,4
	112	2.505 $\pm$ 87	412 $\pm$ 2,7	6,1
0,04	0	398 $\pm$ 46	65 $\pm$ 0,9	6,1
	17	873 $\pm$ 22	143 $\pm$ 2,1	6,1
	24	931 $\pm$ 29	180 $\pm$ 3,0	5,2
	33	1.105 $\pm$ 44	236 $\pm$ 1,0	4,7
	40	1.672 $\pm$ 175	288 $\pm$ 33	5,8
	48	1.817 $\pm$ 77	299 $\pm$ 35	6,1
	56	1.797 $\pm$ 98	323 $\pm$ 6,2	5,6
0,08	0	647 $\pm$ 47	49 $\pm$ 3,0	13,2
	4	677 $\pm$ 10	60 $\pm$ 0,7	11,2
	8	885 $\pm$ 83	79 $\pm$ 2,4	11,2
	14	1.256 $\pm$ 124	110 $\pm$ 2,5	11,3
	20	1.350 $\pm$ 135	156 $\pm$ 3,8	8,7
	24	2.215 $\pm$ 70	199 $\pm$ 3,8	11,2
	29	2.324 $\pm$ 269	224 $\pm$ 5,5	10,3
0,1	0	365 $\pm$ 4	31 $\pm$ 1,5	11,7
	8	724 $\pm$ 12	70 $\pm$ 3,0	10,3
	12	1.010 $\pm$ 28	94 $\pm$ 4,0	10,7
	17	1.093 $\pm$ 49	130 $\pm$ 5,9	8,4
	20	1.348 $\pm$ 40	160 $\pm$ 3,4	8,4
	23	1.267 $\pm$ 40	173 $\pm$ 6,2	7,3

Hücrelerin hücre dışına salgıladığı toplam protein düşükten başlayarak yüksek gelişme hızına doğru sırasıyla 412, 323, 224 ve 173 mg/L olarak gerçekleşmiştir. Hücrelerin spesifik gelişme hızları arttıkça hücre dışına salgıladıkları toplam protein miktarının azaldığı tespit edilmiştir. Her bir üretim ayrıca SDS-PAGE ile analiz edilmiştir (Şekil 4.16).

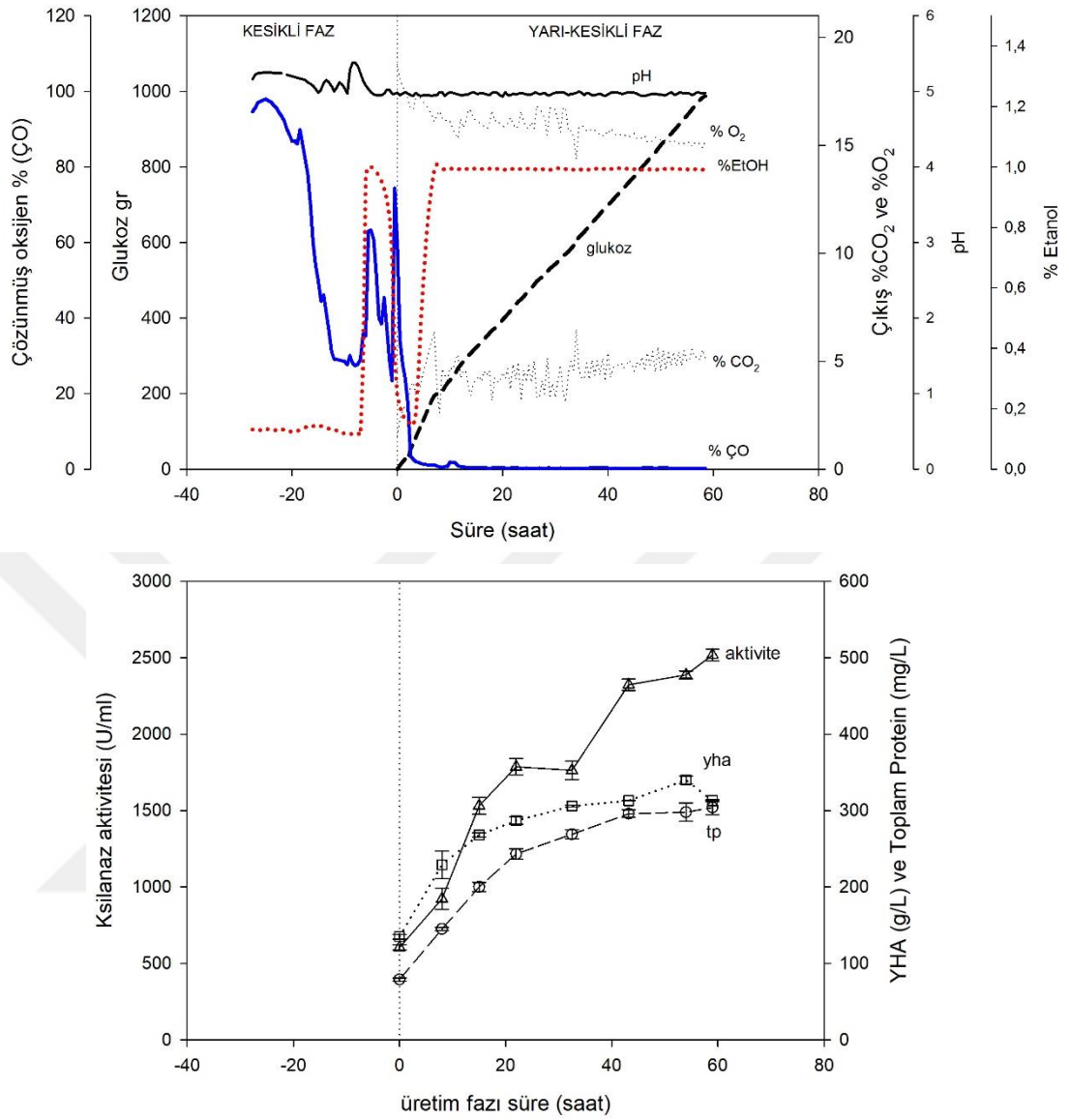


Şekil 4.16. Farklı sabit- μ değerlerinde gerçekleştirilen üretimlerin yarı-kesikli proses boyunca alınan süpernatant örneklerinin SDS PAGE görüntüleri (A) μ 0,02 sa^{-1} , (B) μ 0,04 sa^{-1} , (C) μ 0,08 sa^{-1} , (D) μ 0,10 sa^{-1}

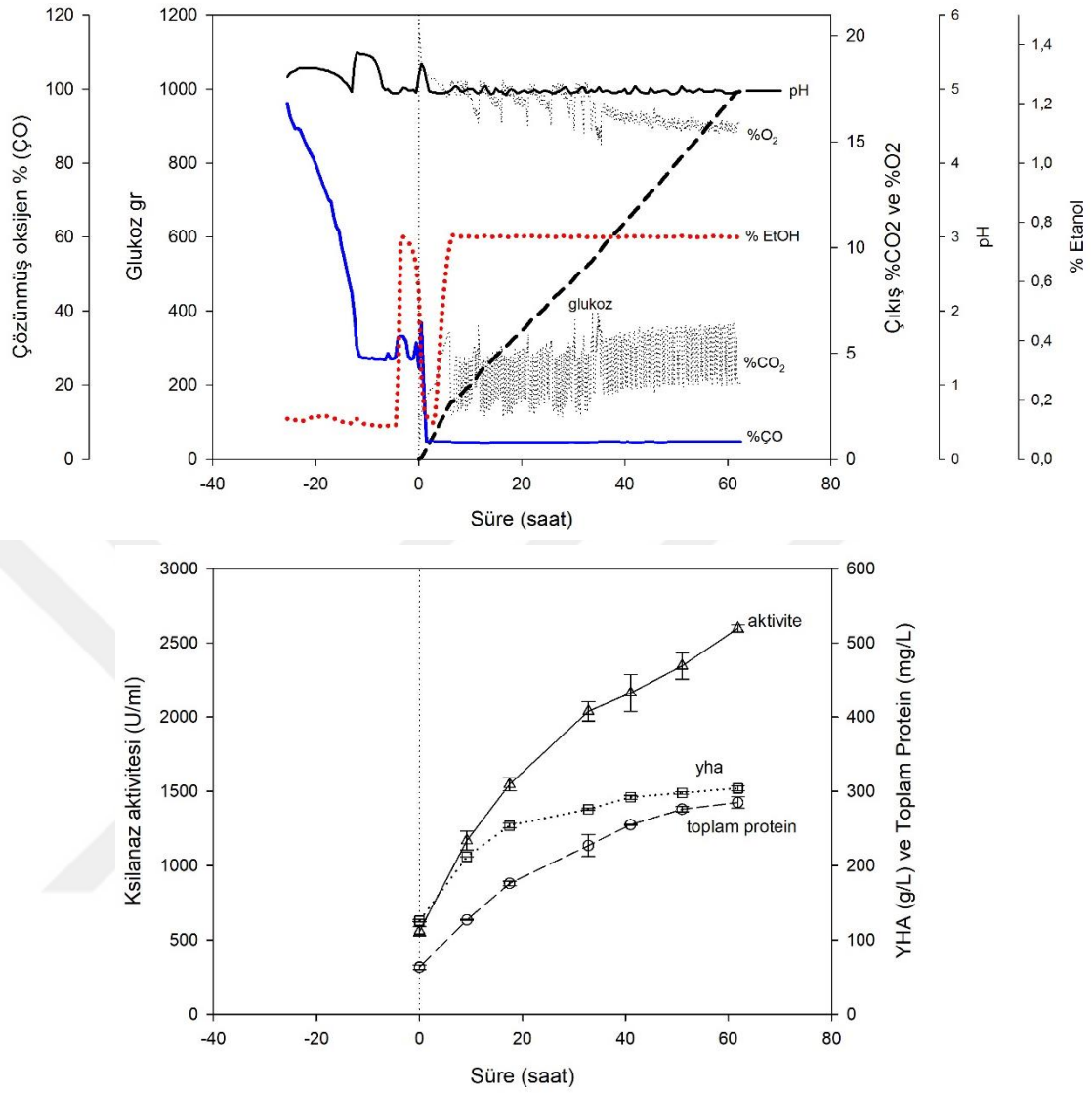
4.3. Sabit-EtOH Stratejisi: Hipoksik Koşullarda Geribildirim Kontrollü Üretim

Çalışmada uygulanan geribildirim kontrollü sabit-etanol stratejisinde, uygulanacak olan etanol değerlerinin hacimce yüzdeleri %0,25, %0,50, %0,75 ve %1 olarak belirlenmiştir. Hipoksik şartlar altında gerçekleşen fermentasyonlarda besleme hızı, reaksiyon sıvısına daldırılmış olan etanol sensörünün, belirlenen set değerini sabit tutmak üzere besleme solüsyonunun bağlı olduğu pompaya aç/kapa komutu vermesi ile otomatik olarak ayarlanmıştır. Besleme fazı, 2000 g besleme solüsyonu (1000 g glukoz) ortama verilene kadar devam ettirilmiştir.

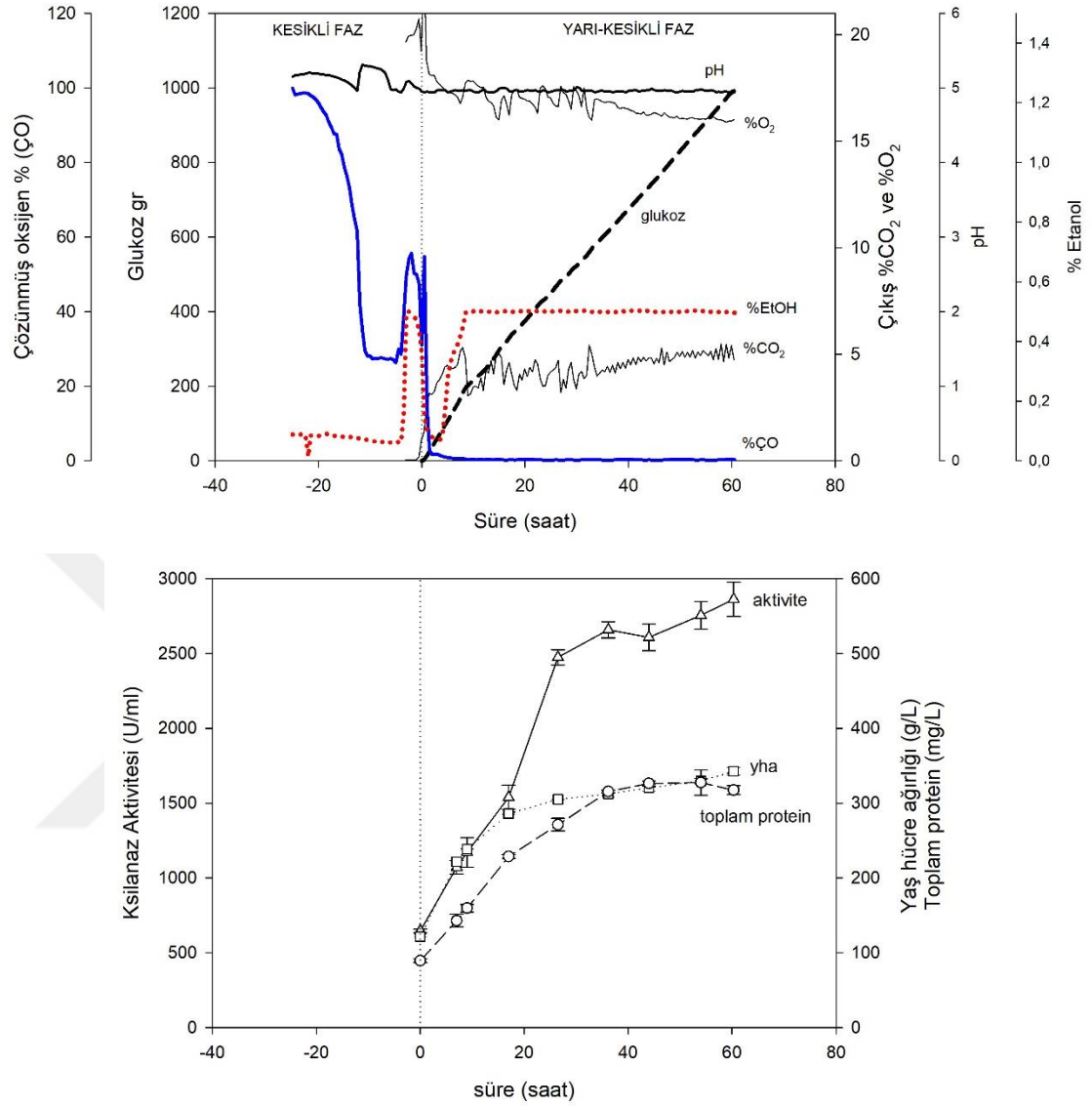
Tüm fermentasyonlar süresince ortamdaki çözünmüş oksijen (% CO), pH, besleme solüsyonunun ağırlığı (gr) ve çıkış gazının % CO_2 ve % O_2 oranları çevrimiçi ölçülmüştür. Ayrıca, üretim fazı boyunca belirli aralıklarla örnekler alınarak, zamana karşı yaş hücre ağırlığı, protein miktarı ve ksilanaz aktiviteleri çevrimdışı takip edilmiştir. Herbir etanol konsantrasyonu için gerçekleştirilen fermentasyonların çevrimiçi ve çevrimdışı ölçülen değerleri herbir fermentasyon için ayrı grafikler şeklinde aşağıda verilmiştir (Şekil 4.17, 4.18, 4.19 ve 4.20).



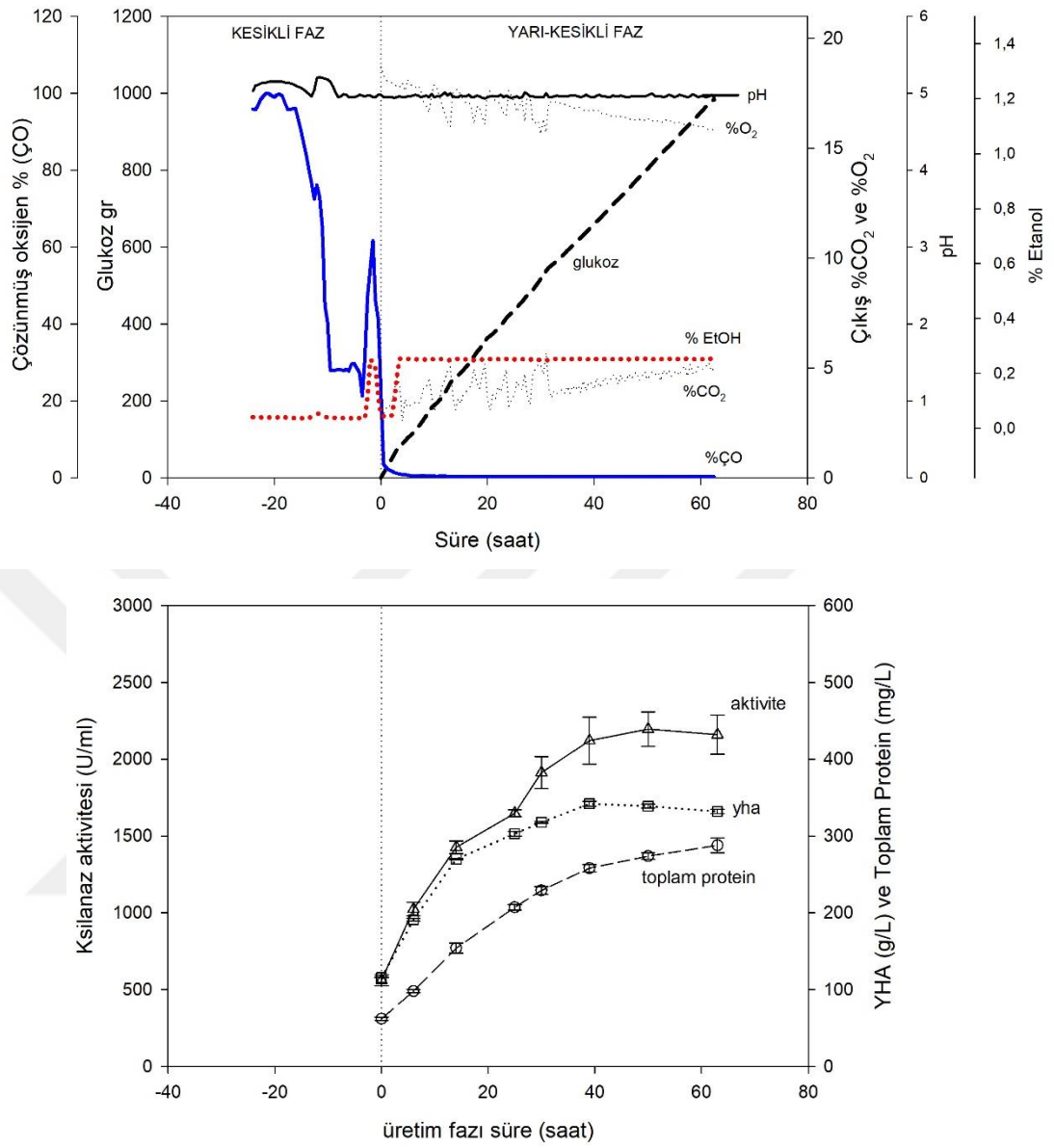
Şekil 4.17. Etanol konsantrasyonunu %1'de sabit tutacak şekilde hipoksik koşullarda gerçekleştirilen fermentasyon süresince ölçülen (A) çevrimiçi ve (B) çevrimdışı veriler (Enzim aktivitesi, U/ml; Yaş hücre ağırlığı, g; Toplam protein, mg/L)



Şekil 4.18. Etanol konsantrasyonunu %0,75'de sabit tutacak şekilde hipoksik koşullarda gerçekleştirilen fermentasyon süresince ölçülen (A) çevrimiçi ve (B) çevrimdışı veriler (Enzim aktivitesi, U/ml; Yaş hücre ağırlığı, g; Toplam protein, mg/L)



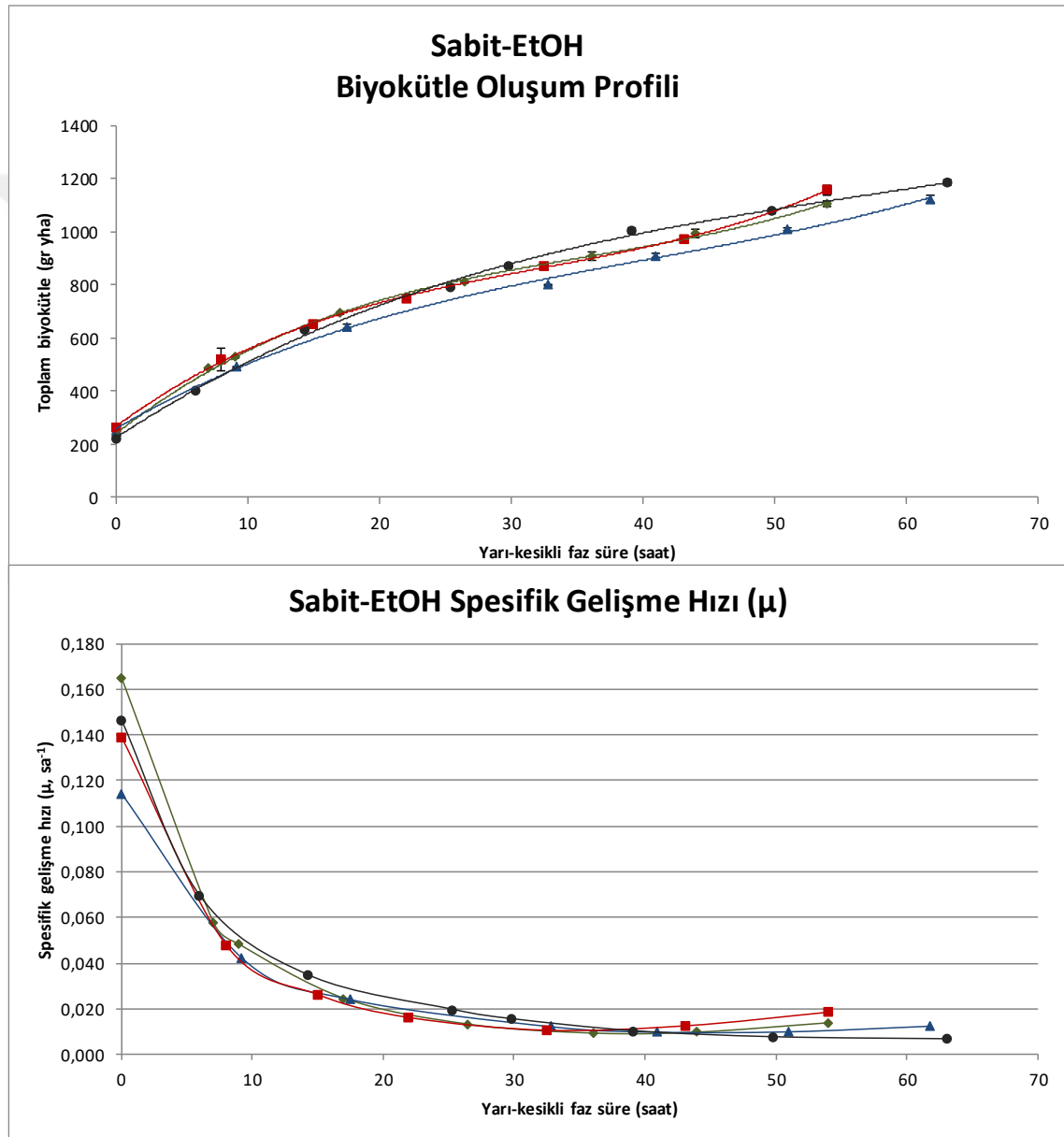
Şekil 4.19. Etanol konsantrasyonunu %0,5'de sabit tutacak şekilde hipoksik koşullarda gerçekleştirilen fermantasyon süresince ölçülen (A) çevrimiçi ve (B) çevrimdışı veriler (Enzim aktivitesi, U/ml; Yaş hücre ağırlığı, g; Toplam protein, mg/L)



Şekil 4.20. Etanol konsantrasyonunu %0,25'de sabit tutacak şekilde hipoksik koşullarda gerçekleştirilen fermentasyon süresince ölçülen (A) çevrimiçi ve (B) çevrimdışı veriler (Enzim aktivitesi, U/ml; Yaş hücre ağırlığı, g; Toplam protein, mg/L)

4.3.1. Sabit-EtOH stratejisinde hücre gelişim kinetiği

Sabit- EtOH stratejisi uygulanarak 4 farklı EtOH değerinde gerçekleştirilen yarı-kesikli fermentasyonlarda belirli aralıklarla alınan örneklerin yaş hücre ağırlığı (g/L) değerleri hacim (L) ile çarpılarak toplam biyokütle miktarları (gyha) hesaplanmış ve zamana karşı grafikleri çizilmiştir (Şekil 4.21). Proses süresince hücrelerin spesifik gelişim hızları (μ) toplam biyokütle oluşum profillerinden geometrik olarak hesaplanmıştır. Herbir profilin matematiksel denklemi MS Excel yazılımında polinom eğilim çizgileri ($y = ax^3 + bx^2 + cx + d$) ile belirlenmiştir (Şekil 4.22). Elde edilen denklemler ve R^2 değerleri Çizelge 4.9’da verilmiştir.



Şekil 4.21. Sabit-EtOH stratejisine göre gerçekleştirilen yarı-kesikli fermentasyonların (A) biyokütle oluşum ve (B) spesifik gelişim hızı (μ) profilleri (■) %1,0 EtOH; (▲) %0,75 EtOH; (◆) %0,50 EtOH ve (●) %0,25 EtOH

Çizelge 4.10. Sabit-EtOH stratejisi uygulanan üretimlerde gerçekleşen biyokütle profillerinin üçüncü dereceden polinom eğrilerinin denklem (ax^3+bx^2+cx+d) katsayıları ve R^2 değerleri

%EtOH set değeri	a	b	c	d	R^2
%1,0	0,0087	-0,8453	36,659	267,29	0,999
%0,75	0,0039	-0,48	28,783	258,55	0,998
%0,50	0,0079	-0,8499	38,898	240,16	0,999
%0,25	0,0025	-0,432	32,593	224,15	0,999

Biyokütle oluşum profillerinin regresyon eğrilerinin t zamanındaki eğimini hesaplamak için regresyon formülünün türevi alınarak anlık biyokütle oluşum hızları (r_x , g hücre/sa) hesaplanmıştır. r_x değerlerinin t anındaki biyokütle miktarına (XV, gr) bölünmesi ile anlık spesifik gelişim hızları (μ , g hücre/g hücre/sa) hesaplanarak herbir fermantasyonun μ profili çıkarılmıştır (Şekil 4.21.B).

Farklı etanol konsantrasyonunun sağlanması ile farklı hipoksik koşullar oluşturulması amaçlanan sabit-etanol üretimlerin herbiri ortalama 61 ± 2 saat sürmüştür. Biyokütle oluşum ve spesifik gelişme hızı profilleri (Şekil 4.21) incelendiğinde hücrelerin 4 farklı etanol konsantrasyonunda benzer hücre gelişim kinetiği sergilediği söylenebilir. Herbir üretimin sonunda ortalama 1159 ± 51 g yaş hücre ağırlığına ulaşılmıştır. Spesifik gelişim hızları ise prosesin başlangıcında maksimum gelişme hızından başlayıp proses sonuna kadar $0,010 \text{ sa}^{-1}$ değerlerine düşmüştür. Çizelge 4.11’de üretimlerin biyokütle verileri ve hesaplanan μ değerleri verilmiştir. Sabit-etanol stratejisinin tüm XV ve μ değerleri arasında tek taraflı ANOVA testi sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.

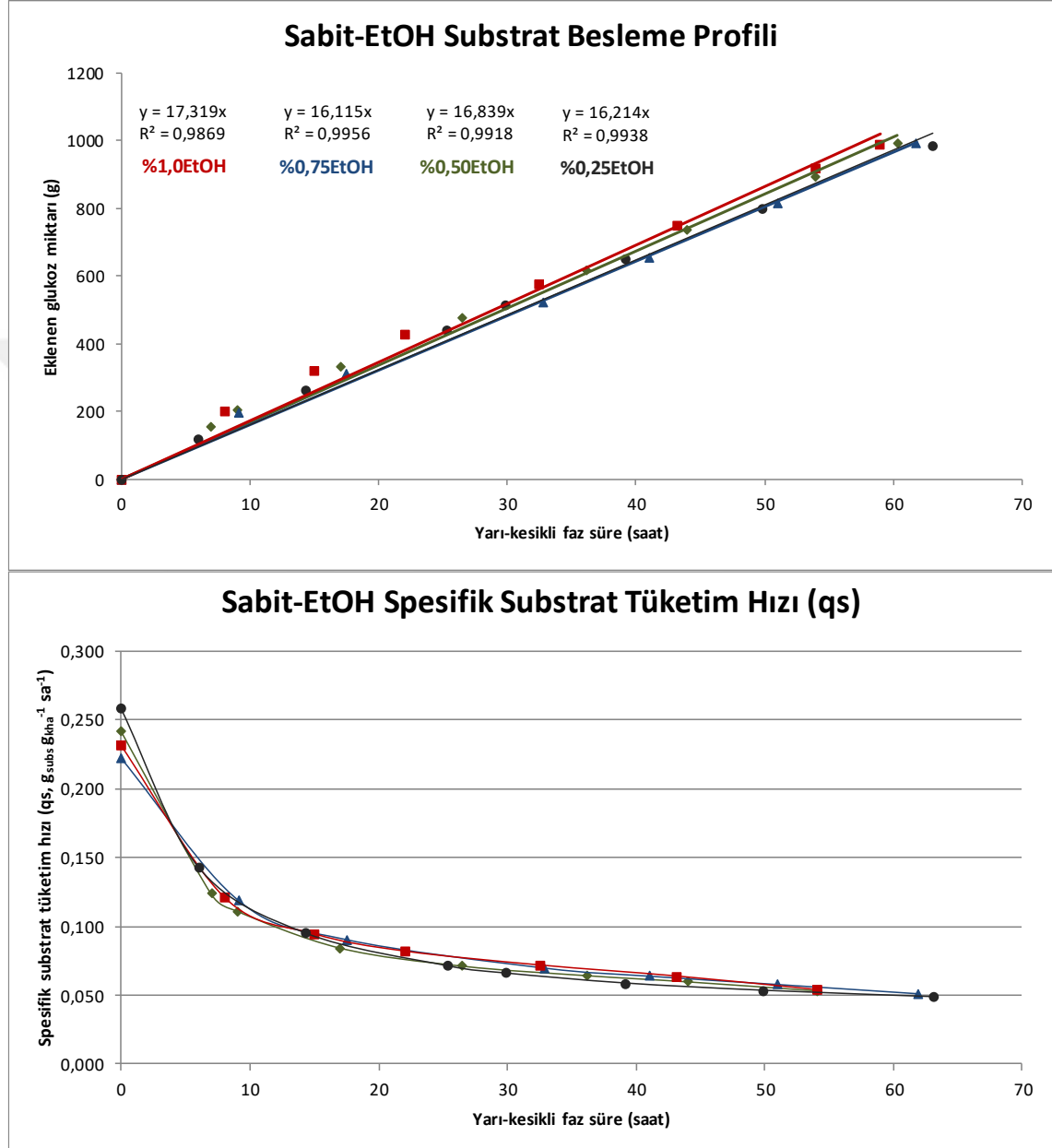
Çizelge 4.11. Sabit-EtOH stratejisinde gerçekleştirilen fermentasyonların t (sa), XV (gyha) ve μ (sa⁻¹) değerleri

EtOH set değeri (%)	t (sa)	XV (gyha) (ax^3+bx^2+cx+d)*	μ (sa⁻¹) ($3a^2+2ax+c$)/XV
0,25	0	223±1,0	0,146
	6	400±4,0	0,069
	14	630±2,5	0,035
	25	793±7,9	0,020
	30	871±3,2	0,015
	39	1.005±9,7	0,010
	50	1.078±7,5	0,008
	63	1.185±9,8	0,007
0,50	0	233±1,1	0,165
	7	485±2,2	0,058
	9	529±0,8	0,048
	17	694±2,2	0,024
	27	810±1,8	0,013
	36	908±15,2	0,009
	44	993±14,9	0,010
	54	1.104±10,9	0,014
0,75	60	1.217±18	0,017
	0	253±2,7	0,114
	9	494±0,2	0,042
	17	643±8,1	0,024
	33	800±4,0	0,012
	41	910±7,2	0,010
	51	1.011±5,3	0,010
	62	1.124±13,0	0,013
1,0	0	264±6,2	0,139
	8	519±40,7	0,048
	15	655±7,2	0,026
	22	748±12,8	0,016
	33	873±3,0	0,011
	43	975±0,8	0,013
	54	1.157±17,8	0,019
	59	1.110±4,3	0,025

*Biyokütle profillerini tanımlayan denklem (Çizelge 4.10)

4.3.2. Sabit-EtOH stratejisi substrat tüketim kinetiği (q_s , $g_{subs}/g_{kha}/sa$)

Şekil 4.22’da substrat çözeltisinin çevrimiçi tartımından alınan verilerden elde edilen besleme profilleri (g glukoz) ve substrat tüketim hızı (q_s , $g_{glu}/g_{kha}/sa$) profilleri verilmiştir.



Şekil 4.22. Sabit-EtOH besleme stratejisinin 4 farklı değer için uygulandığı üretimlerdeki (A) substrat besleme profilleri (B) substrat tüketim hızı (q_s , $g_{glu}/g_{kha}/sa$) profilleri ($\blacksquare$) %1,0 EtOH; ($\blacktriangle$) %0,75 EtOH; ($\blacklozenge$) %0,50 EtOH ve ($\bullet$) %0,25 EtOH

Gerçekleşen substrat besleme profil eğrilerini tanımlayan denklemler yüksek korelasyon değerleri ($R^2 > 0,98$) ile doğrusal eğilim çizgilerinden elde edilmiştir (Şekil 4.22.A).

Sabit- μ stratejisinin substrat-kısıtlı olduğu bilinmekle birlikte, beslemenin, reaksiyon sıvısındaki etanol konsantrasyonunu sabit tutacak şekilde sensör tarafından besleme pompasına aç/kapa komutu verilerek gerçekleştirildiği hipoksik üretimlerde, proses süresince kültür sıvısındaki substrat konsantrasyonları hakkında daha önce yapılmış çalışmalarda bir bilgi bulunmamaktadır. Bu çalışmada, örnek süpernatantlarında D-Glukoz (GOPOD) Kit (Megazyme, İrlanda) ile artık glukoz analizi yapılmış ve proses süresince reaksiyon sıvısındaki glukoz konsantrasyonları 10-20 mg/L aralığında tespit edilmiştir (Çizelge 4.12). Elde edilen bu değerlerle sabit-etanol stratejisinin uygulanmasında kültür sıvısında substrat birikmesinin yaşanmadığı ve prosesin substrat-kısıtlı olarak kabul edilebileceğini göstermiştir. Biyoreaktöre eklenen substrat hücreler tarafından hemen kullanıldığından, yapılan tüm hesaplamalarda substrat besleme profili, substrat tüketim profili olarak kullanılmıştır. t zaman aralığında biyoreaktöre eklenen glukoz miktarının (Q , g) t zamanına bölünmesi ile besleme hızı (F , g_{glukoz}/sa), besleme hızının t anındaki toplam kuru hücre ağırlığına (F/XV) bölünmesi ile ise anlık spesifik substrat tüketim hızları (q_s , g_{glukoz}/g_{kha}/sa) hesaplanmıştır. 4 farklı sabit-etanol değerinde gerçekleştirilen fermentasyonların t (sa), XV (g_{kha}), Q (g_{glukoz}), F (g_{glukoz}/sa) ve q_s (g_{glu} g_{kha}⁻¹sa⁻¹) değerleri Çizelge 4.12’de verilmiştir.

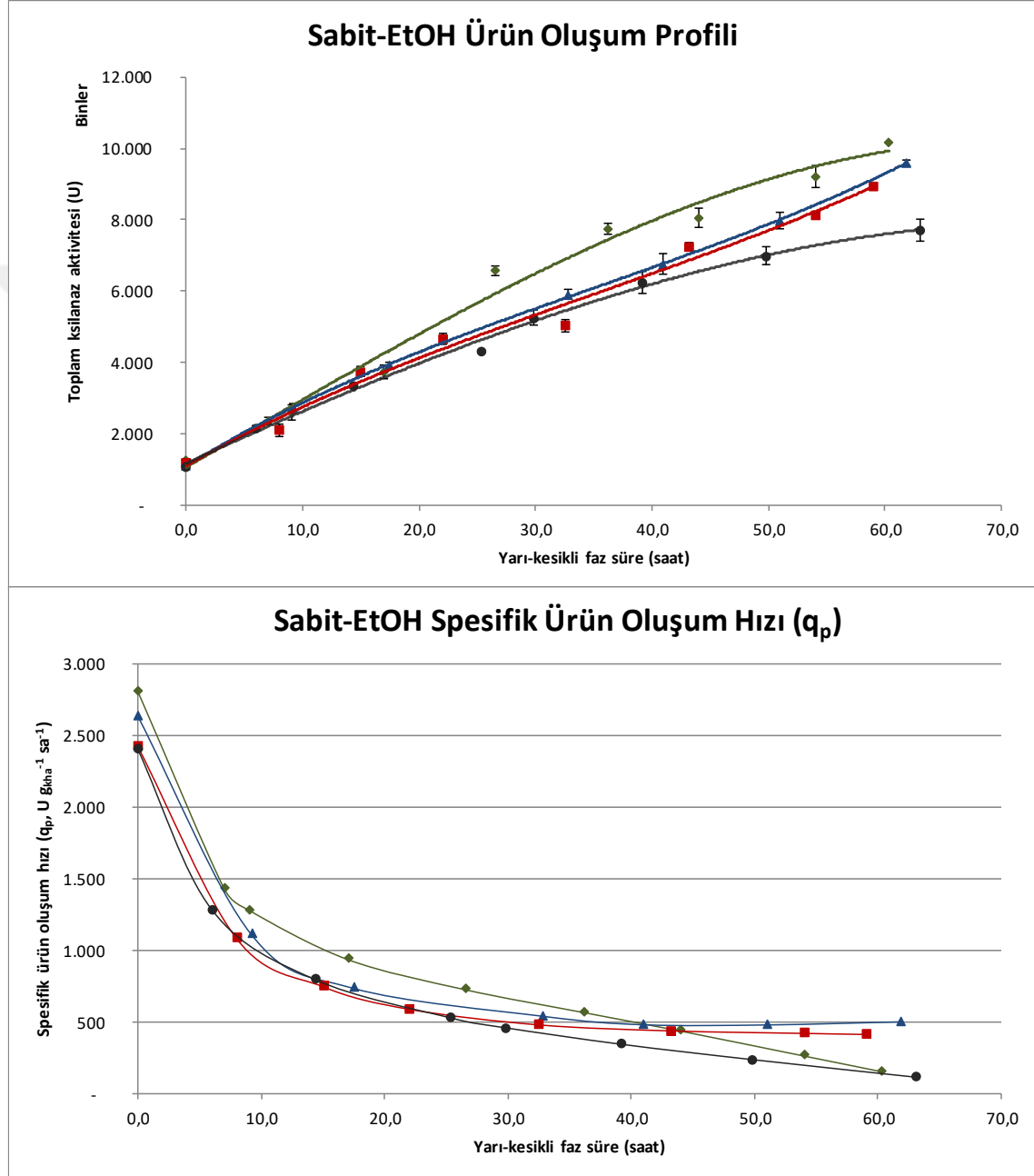
Hesaplanan q_s değerlerinin zamana karşı grafiklerine bakıldığı zaman (Şekil 4.22.B) herbir fermentasyonun q_s değerinin ilgili spesifik gelişim hızı ile tutarlı olarak maksimum değerinden başlayarak ($\sim 0,2$) proses süresince giderek azaldığı ($\sim 0,050$) görülmüştür. Besleme profiline bakıldığında ise besleme hızlarının düşük etanolden (%0,25) yüksek etanol konsantrasyonunda (%1,0) gerçekleştirilen fermentasyonlarda sırası ile $16 \pm 2,1$ g_{glukoz}/sa, $17 \pm 3,6$ g_{glukoz}/sa, $16 \pm 2,7$ g_{glukoz}/sa ve $17 \pm 3,8$ g_{glukoz}/sa hızlarında gerçekleştiği görülmüştür. Proseslerin ortalaması alındığında ise hipoksik şartlarda gerçekleştirilen, etanol konsantrasyonunun kontrol parametresi olarak seçildiği yarı-kesikli üretimlerde besleme hızının etanol konsantrasyonundan bağımsız olarak ortalama 17 ± 3 g_{glukoz}/sa değerinde sabit olduğu bulunmuştur.

Çizelge 4.12. Sabit-EtOH stratejisinde gerçekleştirilen fermentasyonların t (sa), Q (gglukoz) , XV (gkha), F (g/sa) ve qs (gglugkha⁻¹sa⁻¹) değerleri

%EtOH set değeri (%)	t (sa)	XV (gkha)	Q (gglukoz)	F (gglu/sa)	S Artık glukoz (mg/L)	qs (gglu ⁻¹ gkha ⁻¹ sa ⁻¹) (F/XV)
0,25	0	62±0,3	0		9±0,4	0,258
	6	112±1,1	117	19,5	14±0,4	0,143
	14	176±0,7	264	17,6	16±0,4	0,095
	25	222±2,2	439	15,9	15±0,4	0,071
	30	244±0,9	516	17,0	16±0,4	0,066
	39	281±2,7	649	14,2	18±0,4	0,059
	50	302±2,1	801	14,2	19±0,4	0,053
	63	332±2,8	985	13,9	20±0,4	0,049
0,50	0	65±0,3	0		12±1,1	0,242
	7	136±0,6	155	22,2	18±3,3	0,124
	9	148±0,2	203	23,8	17±0,4	0,111
	17	194±0,6	331	16,0	19±1,7	0,084
	27	227±0,5	476	15,3	11±1,3	0,071
	36	254±4,3	617	14,6	14±1,9	0,064
	44	278±4,2	736	15,1	16±1,2	0,060
	54	309±3,0	894	15,8	15±0,6	0,053
0,75	60	341±4,9	992	15,5	18±0,3	0,048
	0	71±0,8	0		13±0,4	0,223
	9	138±0,1	195	21,3	15±1,1	0,119
	17	180±2,3	311	13,9	15±0,8	0,090
	33	224±1,1	522	13,7	19±1,0	0,070
	41	255±2,0	655	16,3	18±1,1	0,064
	51	283±1,5	816	16,1	19±0,4	0,058
	62	315±3,6	993	16,3		0,051
1,0	0	74±1,7	0		19±1,3	0,231
	8	145±11	199	24,9	15±0,8	0,121
	15	183±2,0	322	17,5	18±1,1	0,094
	22	210±3,6	426	14,9	19±0,6	0,082
	33	245±0,8	576	14,2	11±0,4	0,072
	43	273±0,2	748	16,2	14±1,2	0,063
	54	324±5,0	920	15,9	16±1,2	0,054
	59	311±1,2	988	13,5	15±0,8	0,049

4.3.3. Sabit-EtOH stratejisi ürün oluşum kinetiği (r_p , q_p ve Q_p)

Şekil 4.23’de 4 farklı μ değeri için gerçekleştirilen üstel beslemeli yarı kesikli proseslerde belirli aralıklarla alınan örneklerin ksılanaz aktivite değerlerinin (P , U/L) toplam süpernatant hacmi (V , L) ile çarpımı sonucu elde edilen toplam enzim aktivitesi profilleri ve bu profillerinden hesaplanan spesifik ürün oluşum hızı (q_p , $U \text{ g}_{kha}^{-1} \text{ s}^{-1}$) profilleri görülmektedir.



Şekil 4.23. Sabit-EtOH besleme stratejisinin 4 farklı değer için uygulandığı üretimlerdeki (A) toplam enzim aktivitesi (U) ve (B) spesifik ürün oluşum hızı (q_p , $U \text{ g}_{kha}^{-1} \text{ sa}^{-1}$) profilleri (■) %1,0 EtOH; (▲) %0,75 EtOH; (◆) %0,50 EtOH ve (●) %0,25 EtOH

Toplam enzim aktivitesi profillerinin 3. dereceden polinom denklemleri çıkarılarak matematiksel modellemeleri yapıldığında elde edilen denklem katsayıları ve R^2 değerleri Çizelge 4.13’de verilmiştir.

Çizelge 4.13. Toplam enzim aktivitesi profillerinin üçüncü dereceden polinom eğrilerinin denklem (ax^3+bx^2+cx+d) katsayıları ve R^2 değerleri

%EtOH değeri	a	b	c	d	R^2
1,0	18,065	-1895,3	181.619	1E+06	0,9854
0,75	22,271	-2343,5	196.930	1E+06	0,9998
0,50	-14,111	147,43	189.591	1E+06	0,9869
0,25	-5,1161	-416,74	150.707	1E+06	0,9962

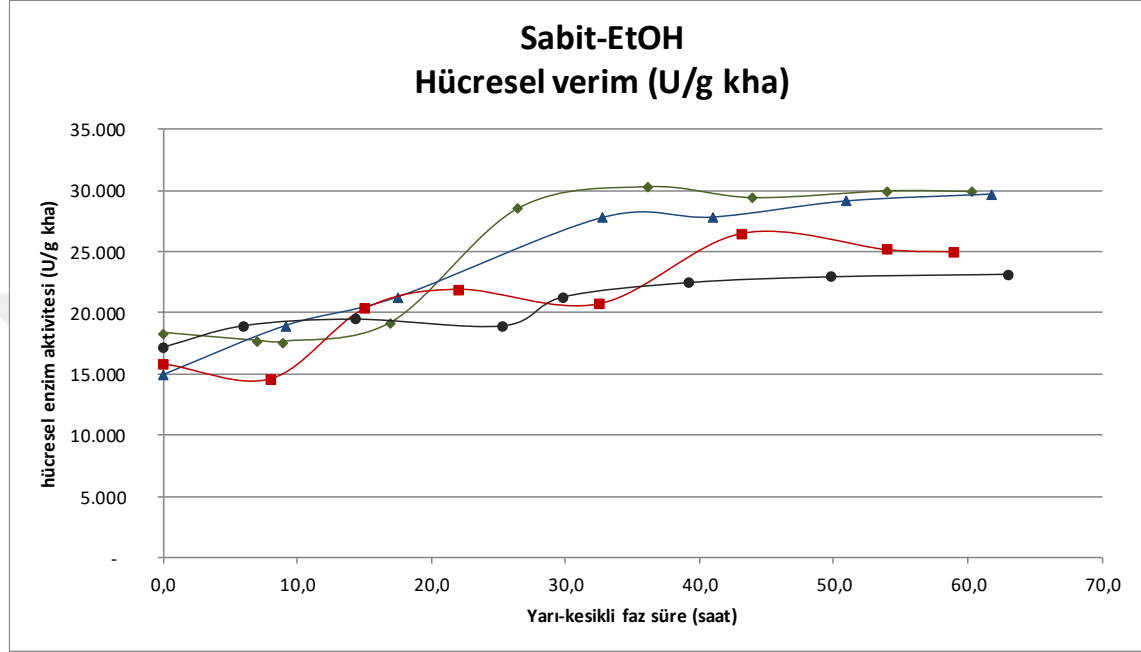
Toplam enzim aktivitesi (kU), toplam biyokütle ağırlığı ve üretim profillerinin denklemlerinden elde edilen üretim kinetiği parametreleri Çizelge 4.14’te verilmiştir. Herbir etanol değeri için gerçekleştirilen üretimde toplam ve spesifik ürün oluşum hızlarının (r_p , q_p ve Q_p) proses ilerledikçe azaldığı, hücre ürün veriminin ise belli bir değere kadar artış gösterip sonrasında stabil kaldığı tespit edilmiştir. Prosesler arasında elde edilen ve hesaplanan değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı tek yönlü ANOVA testi ile doğrulanmıştır ($p>0,05$).

Çizelge 4.14. Sabit-EtOH stratejisinde gerçekleştirilen fermentasyonların ölçülen ve hesaplanan üretim kinetiği parametreleri

Etanol değeri (%)	t (s)	X (g _{kha} /L)	P (U/ml)	PV (kU) ax^3+bx^2+cx+d	r _p (kU/h) $3ax^2+2bx+c$	q _p (kU/g _{kha} /s) (r _p /XV)	Q _p (kU/L/s) (r _p /V)	Hücresel verim (kU/g _{kha}) (P/X)
0,25	0	32 ±0,1	561 ±32	1.081 ±62	151	2,40	78,2	17,2
	14	76 ±0,3	1.427 ±32	3.331 ±75	136	0,79	58,1	19,5
	25	85 ±0,8	1.648 ±16	4.316 ±43	120	0,53	45,7	19,0
	39	96 ±0,9	2.121 ±105	6.227 ±309	95	0,34	32,2	22,5
	50	95 ±0,7	2.196 ±77	6.982 ±246	71	0,23	22,4	23,0
	63	93 ±0,8	2.160 ±89	7.717 ±318	37	0,11	10,4	23,2
0,50	0	34 ±0,2	646 ±12	1.241 ±23	190	2,81	98,7	18,4
	9	67 ±0,1	1.170 ±98	2.598 ±219	189	1,28	85,1	17,6
	17	80 ±0,2	1.540 ±79	3.736 ±193	182	0,94	75,1	19,2
	27	85 ±0,2	2.475 ±51	6.579 ±135	168	0,73	63,1	28,6
	36	87 ±1,5	2.659 ±54	7.731 ±157	145	0,57	49,8	30,3
	44	90 ±1,4	2.607 ±89	8.067 ±276	121	0,44	39,0	29,4
0,75	60	96 ±1,4	2.863 ±115	10.172 ±408	53	0,16	15,0	29,9
	0	35 ±0,4	560 ±27	1.119 ±54	197	2,63	98,5	14,9
	9	59 ±0,0	1.169 ±52	2.717 ±120	160	1,17	68,6	19,0
	17	71 ±0,9	1.547 ±33	3.921 ±84	135	0,74	53,4	21,3
	33	77 ±0,4	2.039 ±48	5.911 ±140	115	0,54	39,7	27,9
	41	82 ±0,6	2.163 ±91	6.751 ±284	117	0,48	37,5	27,9
1,0	51	83 ±0,4	2.346 ±66	7.971 ±223	131	0,48	38,8	29,2
	62	85 ±1,0	2.597 ±17	9.605 ±64	163	0,50	43,9	29,8
	0	38 ±0,9	604 ±18	1.184 ±36	182	2,43	92,7	15,8
	8	64 ±5,0	921 ±69	2.090 ±157	155	1,08	68,2	14,6
	15	75 ±0,8	1.531 ±55	3.744 ±134	137	0,75	56,0	20,4
	22	80 ±1,4	1.786 ±54	4.655 ±140	125	0,59	47,7	21,9
1,0	33	86 ±0,3	1.763 ±60	5.026 ±171	116	0,48	40,6	20,7
	43	88 ±0,1	2.323 ±37	7.242 ±116	119	0,44	38,2	26,5
	59	88 ±0,3	2.518 ±38	8.932 ±136	147	0,41	41,3	25,0

4.3.4. Sabit-EtOH stratejisi hücresel verim (kU/g_{kha})

Gram kuru hücre başına üretilen enzim aktivitesi (U/g kha) olarak tanımlanan hücresel verim, her bir t noktasında hacimsel enzim aktivitesinin (P , U/ml) kuru hücre konsantrasyonuna (X , $\text{g}_{\text{kha}}/\text{L}$) bölünmesi ile hesaplanmıştır. Sabit-EtOH stratejisinin uygulandığı üretimlerde elde edilen hücresel verim değerleri Çizelge 4.14'te verilmiş, ayrıca Şekil 4.24'te gösterilmiştir.

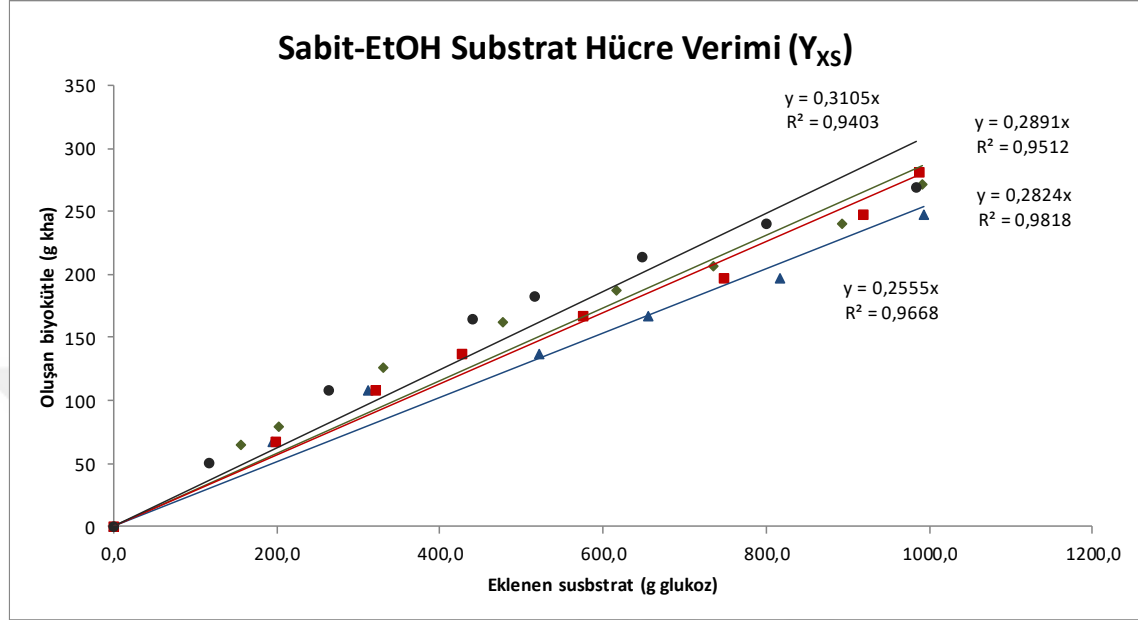


Şekil 4.24. Sabit-EtOH besleme stratejisinin 4 farklı değer için uygulandığı üretimlerdeki hücresel verim (U/g_{kha}) profilleri (■) %1,0 EtOH; (▲) %0,75 EtOH; (◆) %0,50 EtOH ve (●) %0,25 EtOH

Şekil 4.24'deki profillerde görüldüğü gibi hücresel enzim aktivitesinin proses süresince stabil olduğu ve ortalama etanol değerlerinde (%0,50 ve %0,75) gerçekleştirilen üretimlerde en yüksek değerlere ulaştığı söylenebilir. En yüksek (%1) ve en düşük (%0,25) etanol değerlerinde de birbirlerine çok yakın hücresel verim değerleri elde edilmiştir. Anlık hücresel verim değerlerinin ortalaması alındığında düşükten yüksek etanol değerine doğru sırası ile $20,6 \pm 2,2$ (%0,25 EtOH), $24,6 \pm 6,1$ (%0,50 EtOH), $24,3 \pm 5,8$ (%0,75 EtOH) ve $21,3 \pm 4,4$ (%1,0 Etanol) kU/g_{kha} değerleri elde edilmiştir.

4.3.5. Sabit-EtOH stratejisi hücre ve ürün verimleri (Y_{XS} , Y_{PS} ve Y_{PX})

Birim substrat başına oluşan biyokütle oranını ifade eden substrat hücre verimi (Y_{XS}) olarak, tüm sabit-etanol proseslerinde 0,26-0,31 arasında birbirine çok yakın değerler elde edilmiştir (Şekil 4.25).



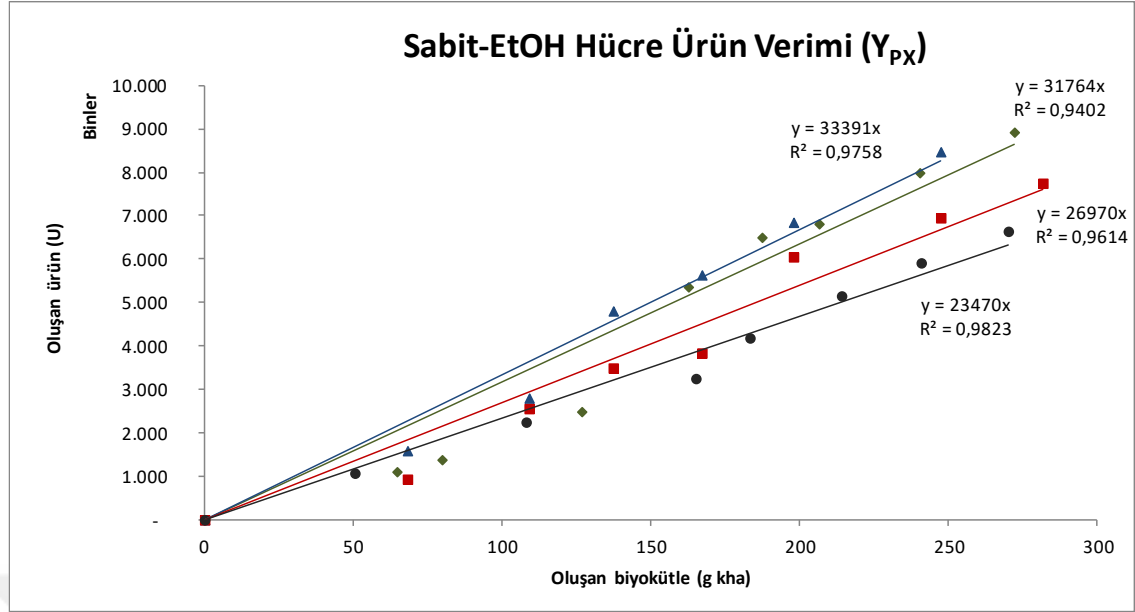
Şekil 4.25. Farklı sabit-EtOH değerlerinde gerçekleştirilen yarı-kesikli proseslerin substrat hücre verimi (Y_{XS}) katsayılarının hesaplanması (■) %1,0 EtOH; (▲) %0,75 EtOH; (◆) %0,50 EtOH ve (●) %0,25 EtOH

Hücre başına üretilen ürün miktarının ifadesi olan hücre ürün verimi (Y_{PX} , U/g_{kha}), proses süresince oluşan ürün miktarının (PV, U) oluşan toplam kuru hücre miktarına karşı çizilen grafiğin lineer regresyon analizinden elde edilir (Şekil 4.26). Doğrusal eğim çizgisinin eğimi, prosesin ortalama hücresel verimini (Y_{PX}) ifade eder.

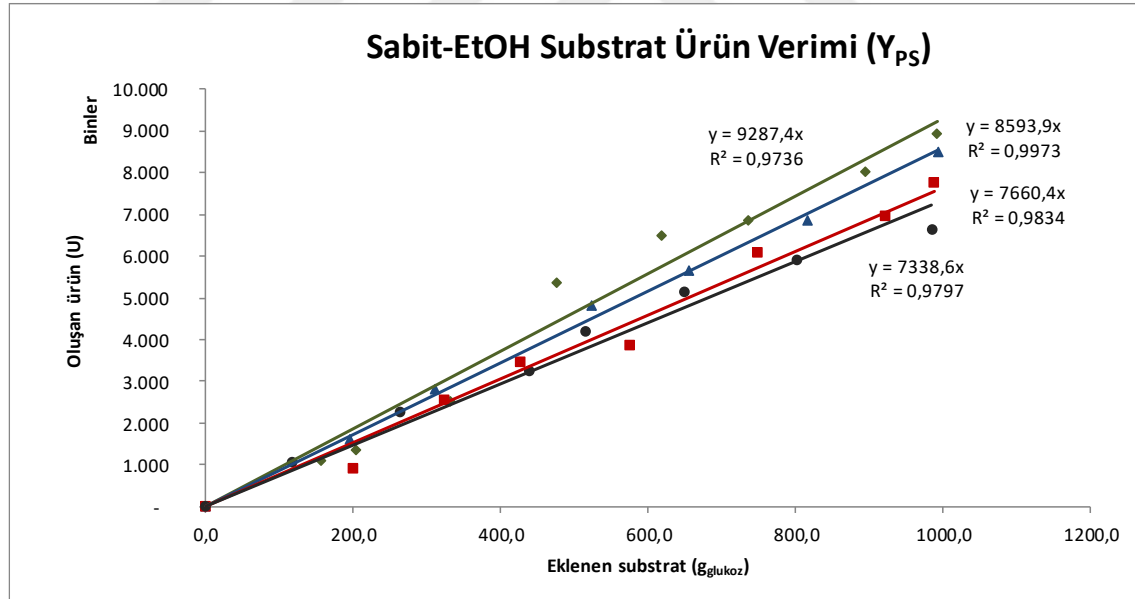
Birim substrat başına elde edilen ürün miktarını ifade eden substrat ürün verimi (Y_{PS}) Şekil 4.27’de gösterildiği şekilde eklenen oluşan toplam ürünün (U) toplam substrat miktarına (g glukoz) karşı çizilen grafikten hesaplanmıştır. Sabit-etanol proseslerine ait tüm verim değerleri Çizelge 4.15’de verilmiştir.

Çizelge 4.15. Farklı sabit-EtOH değerlerinde gerçekleştirilen yarı-kesikli proseslerin ortalama hücre, substrat ve ürün verim değerleri

%EtOH set değeri	Y_{XS} (g _{kha} g _{subs} ⁻¹)	Y_{PX} (kU g _{kha} ⁻¹)	Y_{PS} (kU g _{subs} ⁻¹)
0,25	0,31 ±0,01	23,5 ±0,6	7,3 ±0,2
0,50	0,29 ±0,01	31,8 ±1,6	9,3 ±0,3
0,75	0,26 ±0,01	33,4 ±1,2	8,6 ±0,1
1,0	0,28 ±0,1	27,0 ±1,1	7,7 ±0,2



Şekil 4.26. Farklı sabit-EtOH değerlerinde gerçekleştirilen yarı-kesikli proseslerin hücre ürün verimi (Y_{PX}) katsayılarının hesaplanması (■) %1,0 EtOH; (▲) %0,75 EtOH; (◆) %0,50 EtOH ve (●) %0,25 EtOH



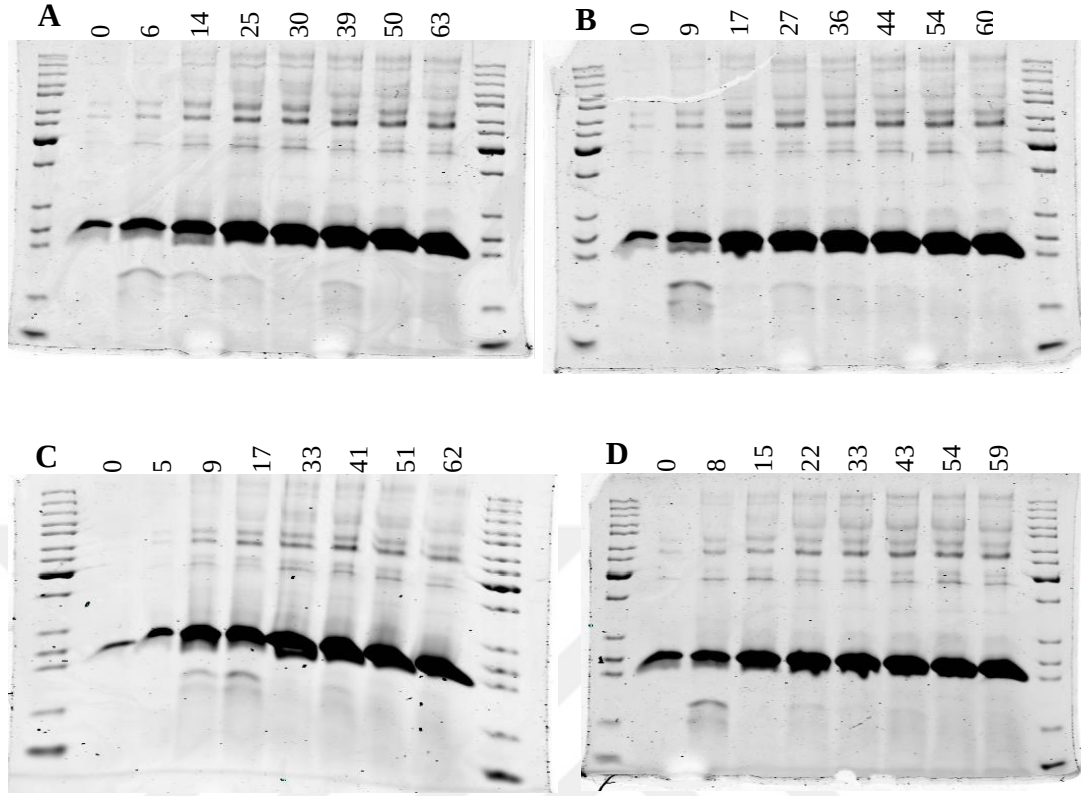
Şekil 4.27. Farklı sabit-EtOH değerlerinde gerçekleştirilen yarı-kesikli proseslerin substrat ürün verimi (Y_{PS}) katsayılarının hesaplanması (■) %1,0 EtOH; (▲) %0,75 EtOH; (◆) %0,50 EtOH ve (●) %0,25 EtOH

4.3.6. Sabit-EtOH stratejisi hücre dışı toplam protein

Sabit-etanol stratejisi ile gerçekleştirilen fermentasyonlarda alınan örneklerde toplam protein analizi yapılarak hücrelerin ksilanaz ile birlikte hücre dışına salgıladığı toplam protein konsantrasyonları (mg/L) tayin edilmiştir (Çizelge 4.16). Toplam hücre dışı protein açısından prosesler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık elde edilememiştir. Ortalama 300 mg/L hücre dışı protein elde edilmiştir. Örneklerin ayrıca SDS-PAGE analizleri yapılmıştır (Şekil 4.28).

Çizelge 4.16. Farklı sabit-EtOH değerlerinde gerçekleştirilen yarı-kesikli proseslerin hacimsel aktivite (U/ml), hücre dışı toplam protein (mg/L) ve spesifik aktivite (kU/mg) değerleri

Etanol değeri (%)	t (sa)	P (U/ml)	Tp (mg/L)	Sp. aktivite (kU/mg protein) (P/Tp)
0,25	0	561 ±32	62 ±1,9	9,0
	14	1.427 ±32	154 ±5,0	9,3
	25	1.648 ±16	207 ±2,6	8,0
	39	2.121 ±105	258 ±3,2	8,2
	50	2.196 ±77	274 ±3,0	8,0
	63	2.160 ±89	288 ±6,7	7,5
0,50	0	646 ±12	74 ±2,0	8,7
	9	1.170 ±98	130 ±4,2	9,0
	17	1.540 ±79	189 ±1,7	8,1
	27	2.475 ±51	231 ±7,2	10,7
	36	2.659 ±54	264 ±1,7	10,1
	44	2.607 ±89	275 ±3,3	9,5
	60	2.863 ±115	261 ±4,9	11,0
0,75	0	560 ±27	63 ±2,6	8,9
	9	1.169 ±52	127 ±0,5	9,2
	17	1.547 ±33	176 ±2,3	8,8
	33	2.039 ±48	227 ±1,1	9,0
	41	2.163 ±91	255 ±0,4	8,5
	51	2.346 ±66	276 ±2,6	8,5
	62	2.597 ±17	285 ±5,5	9,1
1,0	0	604 ±18	79 ±2,2	7,6
	8	921 ±69	145 ±2,5	6,3
	15	1.531 ±55	200 ±6,3	7,6
	22	1.786 ±54	243 ±7,1	7,3
	33	1.763 ±60	269 ±5,6	6,6
	43	2.323 ±37	296 ±5,1	7,9
	59	2.518 ±38	304 ±8,7	8,3



Şekil 4.28. Farklı sabit-EtOH değerlerinde gerçekleştirilen üretimlerin yarı-kesikli proses boyunca alınan süpernatant örneklerinin SDS PAGE görüntüleri (A) %0,25 EtOH; (B) %0,50 EtOH; (C) %0,75 EtOH ve (D) %0,10 EtOH

Tez kapsamında gerçekleştirilen tüm üretimlere (sabit- μ ve sabit-etanol) ait gelişim, üretim ve substrat tüketim hız ve verim değerlerinin ortalamaları Çizelge 4.17’de verilmiştir.

Çizelge 4.17. Sabit- μ ve sabit-EtOH stratejilerinin hücre gelişim ve üretim kinetik parametrelerinin ortalama değerleri

Set değeri		Yarı-kesikli süre (s)	Final X (g _{kha} /L)	Final P (U/ml)	μ ort s ⁻¹	q _s ort g _{glu} g _{kha} ⁻¹ s ⁻¹	q _p (max) kU/g _{kha} /s	q _p ort kU/g _{kha} /s
0,2 $\mu_{\max}$	normoksik	114	128	2.505	0,018	0,04	0,467	0,378
0,4 $\mu_{\max}$	normoksik	56	146	1.817	0,036	0,08	0,631	0,501
0,8 $\mu_{\max}$	normoksik	28	152	2.324	0,073	0,14	1,257	1,051
$\mu_{\max}$	normoksik	23	143	1.348	0,092	0,18	1,168	0,844
%0,25 etanol	hipoksik	63	93	2.160	0,039	0,08	2,401	0,768
%0,50 etanol	hipoksik	60	96	2.863	0,040	0,08	2,805	0,958
%0,75 etanol	hipoksik	62	85	2.597	0,032	0,08	2,631	0,928
%1,0 etanol	hipoksik	59	88	2.518	0,037	0,08	2,427	0,823

Set değeri		Max Biyokütle XV (g _{kha})	Max Toplam Ürün PV (kU)	Y _{XS} (g _{kha} /g _{glu})	Y _{PX} (kU/g _{kha})	Y _{PS} (kU/g _{glu})	r _p (kU/s)	Q _p (kU/L/s)
0,2 $\mu_{\max}$	normoksik	465	9.062	0,42	21,9	9,2	69,4	27,5
0,4 $\mu_{\max}$	normoksik	531	6.528	0,46	13,7	6,4	101,9	42,1
0,8 $\mu_{\max}$	normoksik	576	8.766	0,50	15,0	7,5	287,6	107,5
$\mu_{\max}$	normoksik	577	5.129	0,51	9,4	4,8	208,9	76,2
%0,25 etanol	hipoksik	332	7.717	0,31	23,5	7,3	108,3	44,6
%0,50 etanol	hipoksik	341	10.172	0,29	31,8	9,3	146,5	59,7
%0,75 etanol	hipoksik	315	9.605	0,26	33,4	8,6	145,5	54,3
%1,0 etanol	hipoksik	311	8.932	0,28	27,0	7,7	139,3	53,0

5. TARTIŞMA

P. pastoris hücre dışı ksilanaz üretim suşunun **normoksik** ve **hipoksik** koşullardaki gelişim ve üretim kinetiklerinin belirlenmesi için 2 farklı besleme stratejisi ile yarı-kesikli üretimler aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir: (1) Hesaplamalarla belirlenmiş besleme profilleri ile spesifik gelişim hızının 4 farklı değerinde kontrol altında tutulduğu **normoksik** şartlarda gerçekleştirilen üretimler ve (2) Beslemenin, hücrelerin oksijen kısıtlamasında glukozdan yan-ürün olarak ürettiği etanol konsantrasyonunun 4 farklı değerinde sabit tutulacak şekilde sensör aracılığı ile otomatik ayarlandığı **hipoksik** şartlarda gerçekleştirilen üretimler.

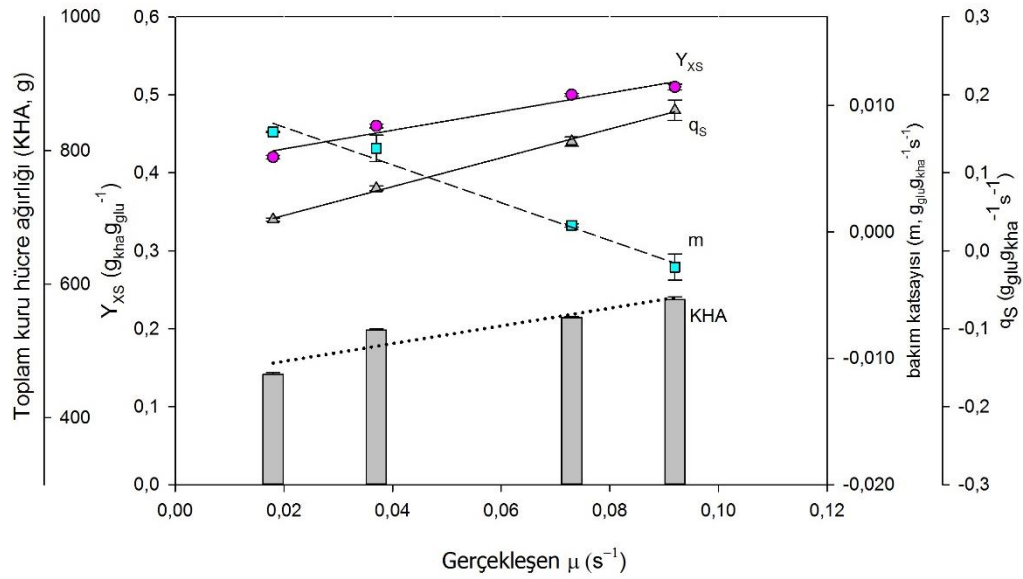
Hacim olarak 2 L besiyeri ile başlayan tüm prosesler, yarı-kesikli proses süresince toplamda 1000 gr glukoz beslemesi yapılarak ortalama 3,7 L kültür hacminde sonlandırılmıştır. Gerçekleştirilen deneylerin proses parametrelerinin ortalama değerleri Çizelge 4.17’de özet şeklinde verilmiştir.

Hipoksik üretimlerde, farklı sabit-etanol değerlerinde gerçekleştirilen üretimler arasında herhangi bir fark gözlenmemiştir

Hipoksik üretimlerde kontrol parametresi olarak kullanılan, hücrelerin mitokondriyal solunum yolağından fermentatif yolağa geçiş yapması ile oluşan etanol miktarı ortamın hipoksik olduğunun bir göstergesidir. Besleme hızının ayarlanarak etanolün sabit tutulması ile hücrelerin fermentatif metabolizmada kalması ve ortamın tamamen oksijensiz (anoksia) duruma düşmemesi kontrol altında tutulmuş olur. Etanol konsantrasyonunun farklı seviyelerde sabit tutulmasının hücrelerin gelişim ve üretim kinetiğine olan etkisinin incelendiği çalışmamızda üretimlerin proses parametreleri arasında istatistiksek olarak anlamlı bir fark elde edilmemiştir. Hipoksik üretimlerde kontrol parametresi etanol miktarının test edilen oranlarda (%0,25-%1 arasında) üretim üzerine herhangi bir etkisi olmadığı tespit edilmiştir.

Normoksik şartlarda, düşük gelişim hızlarında hücrenin bakım enerji ihtiyacı yükselmiş, hücre substrat verimi düşmüş ve daha az biyokütle oluşmuştur.

Spesifik gelişim hızının düşmesi ile birlikte toplam enerji bütçesinden hücrenin bakımı için ayrılan enerji miktarı artacağından daha az biyokütle oluşur (Pirt 1965). Başka bir deyişle substrat hücre verimi (Y_{XS}) spesifik gelişim hızı ile birlikte azalır. Çalışmamızda da literatüre uyumlu olarak μ_{max} hızında gerçekleştirilen üretimde en yüksek substrat hücre verimi ($Y_{XS} = 0,51$) elde edilmiş ve μ azaldıkça Y_{XS} değeri 0,42’ye kadar düşmüştür. Pirt eşitliğinden hesaplanan bakım katsayısının (m) μ ve Y_{XS} ile profilleri Şekil 5.1’de verilmiştir. Grafikten görüldüğü gibi spesifik gelişim hızı (μ) arttıkça spesifik substrat tüketim hızı ve substrat hücre verimi (Y_{XS}) lineer olarak artmış ve bakım katsayısı (m) azalmıştır. Ayrıca düşük gelişim hızında toplamda daha az biyokütle oluşumu gerçekleştiği tespit edilmiştir. Elde edilen veriler, Fab üretim suşunun gelişim ve üretim parametrelerinin kemostat sisteminde geniş bir gelişim hızı aralığında ($0,015-0,15 \text{ s}^{-1}$) incelendiği çalışma ile μ , Y_{XS} , m ve XV arasındaki ilişki açısından tutarlı bulunmuştur (Rebnegger vd. 2014).



Şekil 5.1. Farklı sabit- μ değerlerinde gerçekleştirilen normoksik üretimlerin substrat tüketim hızı (q_S), substrat hücre verimi (Y_{XS}), bakım katsayısı (m) ve toplam biyokütle (XV) değerleri karşılaştırması

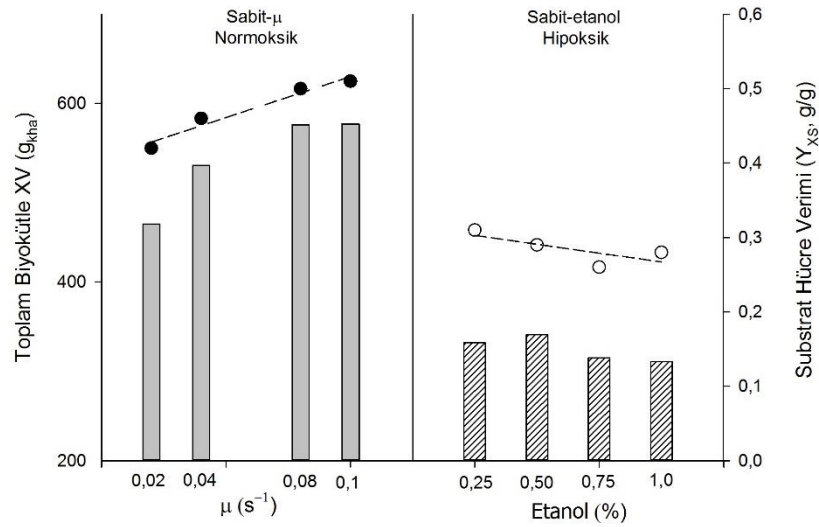
Hipoksik koşullarda normoksik koşullara göre yaklaşık %40 daha az biyokütle oluşmuştur.

Şekil 5.2’de farklı μ değerlerinde gerçekleştirilen normoksik üretimlerde ve farklı sabit-etanol değerlerinde gerçekleştirilen hipoksik üretimlerde elde edilen toplam biyokütle miktarları Y_{XS} değerleri ile birlikte verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi aynı miktarda substrattan hipoksik koşullarda, normoksik koşullardakinin ($465-577 g_{kha}$) yaklaşık yarısı kadar ($311-332 g_{kha}$) biyokütle oluşmuştur. Substrat hücre verimleri ise normoksik şartlarda μ ile lineer orantılı olarak $0,42-0,51$ arasında artarken, hipoksik şartlarda $0,28-0,31$ arasında stabil değerler vermiştir.

Hipoksik koşullarda (%1 sabit-etanolde) 3 farklı proteinin ekspresyonunun yarı-kesikli sistemde gerçekleştirildiği çalışmada hipoksianın Y_{XS} katsayısını düşürdüğü ve her üç protein için de sabit beslemeli normoksik standart protokole göre daha az biyokütle elde edildiği gösterilmiştir (Baumann vd. 2008). Ayrıca, *P. pastoris*’te hipoksik koşulların rekombinant protein üretimine olan etkisinin sürekli (kemostat) sistemde, transkriptomik, proteomik ve metabolomik analizler ile çok geniş araştırıldığı diğer çalışmalarda da normoksik şartlara göre biyokütlerde azalma tespit edilmiştir (Carnicer vd. 2009; Baumann vd. 2010; Carnicer 2012; Adelantado vd. 2017).

P. pastoris metanolde gelişirken oksijen kısıtlamasında hücre gelişimini kısıtlar, daha az biyokütle oluşturur (Trentmann vd. 2004). Glukozda gelişirken de aynı şekilde oksijen kısıtlaması toplam biyokütle oluşumunu negatif yönde etkiler. Bu iki substrat arasındaki fark, metanolde oksijen azlığının substrat tüketimini kısıtlayarak daha az biyokütle oluşumuna sebep olurken, glukozda substrat tüketimini etkilememesidir. Hücreler glukozda gelişirken oksijen azaldığında aerobik solunumdan fermentatif yolağa

geçerler (oksidofermentatif) ve substratın bir kısmı etanol ve arabitol gibi metabolitler için harcanır (Carnicer vd. 2009).

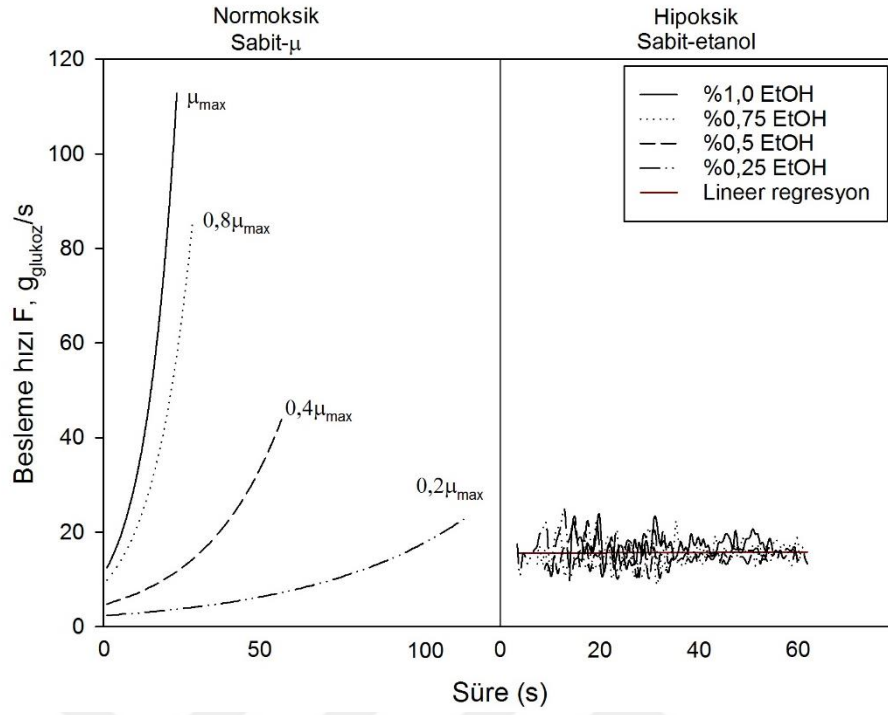


Şekil 5.2. Normoksik ve hipoksik üretimlerde oluşan toplam biyokütle miktarları (XV, g_{kha}) (bar grafik) ve substrat hücre verimleri (Y_{XS}) (○,●)

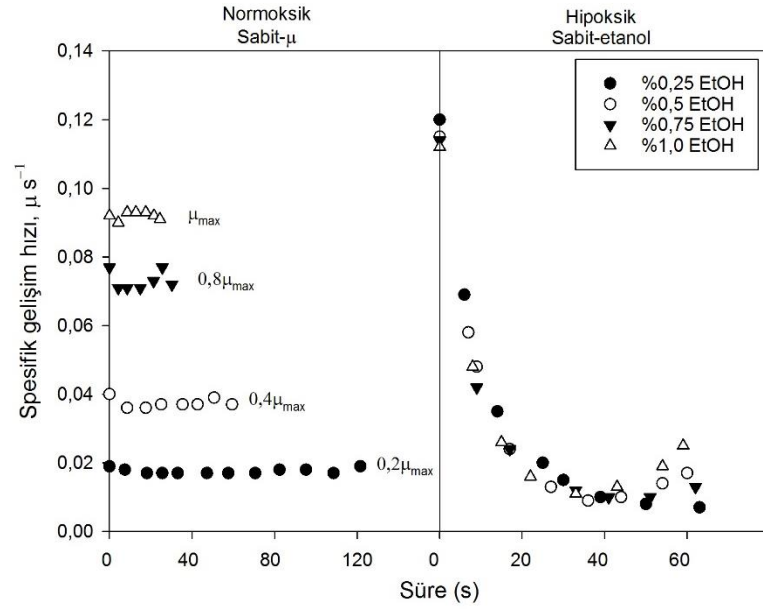
Normoksik ve hipoksik üretimlerdeki toplam biyokütle miktarları arasındaki bu büyük fark, hipoksik üretimin en önemli sonuçlarından biridir. Yüksek hücre yoğunluklarında oksijen ve ısı transferi ile ilgili teknik sınırlamalar yanında ürünün pürifikasyonu ile ilgili zorluklar da ortaya çıkmaktadır (Mattanovich vd. 2012). Proses açısından biyokütle miktarının az olması, fermentasyon sonrası işlemler için avantajlı bir durumdur.

Hipoksik sabit-etanol üretimlerinde sensör tarafından otomatik olarak ayarlanan besleme, sabit hızda gerçekleşmiştir.

Sabit-μ stratejisinde set değerine göre kütle eşitliklerinden hesaplanarak proses öncesinde belirlenmiş üstel artan besleme profilleri uygulanırken, sabit-etanol stratejisinde besleme, etanol set değerine göre etanol sensörü tarafından besleme pompası kontrol edilerek otomatik olarak gerçekleşmiştir. Şekil 5.3'te her iki strateji için uygulanan besleme profilleri karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Hipoksik üretimlerde beslemenin 60 saat boyunca ortalama 16,6 g_{glu}/s sabit hızda gerçekleştiği tespit edilmiştir. Sabit-μ stratejisinde Sabit-μ stratejisinde üstel besleme profillerinin uygulanması ile hücreler proses süresince beklendiği gibi sabit spesifik gelişme hızında gelişmişlerdir. Sabit-etanol stratejisinde ise spesifik gelişim hızı kinetiği standart sabit besleme profiline uygun olacak şekilde gerçekleşmiş, maksimum değerden başlayarak proses ilerledikçe azalmıştır (Şekil 5.4). Hipoksik şartlarda spesifik gelişim hızının gösterdiği kinetik Baumann vd.'nin (2008) elde ettiği sonuçlar ile benzerlik göstermiştir. Besleme profili ve μ kinetiği olarak ayrıca AOX1 promotörü kontrolünde metanol beslemeli oksijen-kısıtlı üretimde elde edilen verilerle paralel sonuçlar elde edilmiştir (Trentmann vd. 2004).



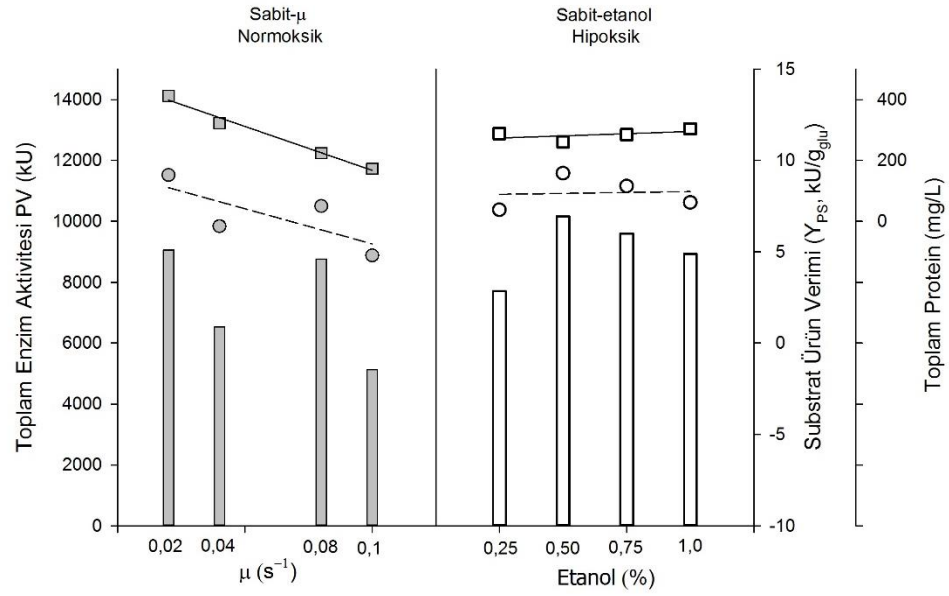
Şekil 5.3. Normoksik ve hipoksik üretimlerde uygulanan besleme profilleri



Şekil 5.4. Normoksik ve hipoksik üretimlerin spesifik gelişim hızı kinetikleri

Normoksik üretimlerde toplam ürün miktarı spesifik gelişim hızı ile negatif korelasyon göstermiştir. Hipoksik üretimlerde ise etanol konsantrasyonundan bağımsız olarak yaklaşık aynı miktarlarda ürün elde edilirken normoksik üretimlerde elde edilenden %12 daha fazla toplam ürün miktarına ulaşılmıştır.

Proses sonunda elde edilen toplam ürün açısından üretimleri kıyasladığımızda (Şekil 5.5) normoksik şartlarda gerçekleşen sabit- μ üretimlerinde en yüksek ürün miktarına $0,2\mu_{\max}$ ve $0,8\mu_{\max}$ üretimlerinde ulaşılırken en düşük ürün miktarı $\mu_{\max}$ üretiminde elde edilmiştir. Birim substrattan elde edilen ürün miktarını ifade eden Y_{PS} değeri ise μ ile negatif korelasyon vermiştir. Kullanılan substrat miktarının tüm proseslede aynı olduğu (1000 gr glukoz) göz önünde bulundurulduğunda, Y_{PS} değerinin μ ile negatif korelasyon içinde olmasının, toplam ürün miktarındaki azalmadan kaynaklandığı söylenebilir. Sürekli sistemde yapılan GAP kontrollü üretimlerde spesifik gelişim hızının protein üretim kinetiğine olan etkilerinin incelendiği bir çalışmada μ ile XV, PV, Y_{PS} , Y_{PX} parametreleri arasında pozitif korelasyon tespit edilmiştir (Rebnegger vd. 2014). Yarı-kesikli sistemlerde özellikle $\mu_{\max}$ hızında gerçekleştirilen üretimlerde beslemenin çok hızlı olmasından dolayı çok hızlı değişen hacim dinamikleri hücrelerin yarı-kararlı hale ulaşmasına engel olmakta ve birçok parametreyi etkilemektedir. Yapısal GAP promotörü kontrolünde yapılan üretimlerde genel olarak yüksek ürün miktarlarına, yüksek hücre konsantrasyonu ile birlikte yüksek spesifik gelişim hızlarında ulaşılır (Garcia-Ortega vd. 2013). Bu çalışmada, genel verilerden farklı olarak spesifik gelişim hızının maksimum gelişim hızına ulaşması ile birlikte toplam ürün miktarında azalma tespit edilmiştir. Hücreler maksimum hızda gelişirken yeni hücre materyaline olan ihtiyacı karşılayabilmek için protein üretim kapasitelerini arttırmalar. Spesifik gelişim hızı yükseldikçe ribosomal ve mitokondriyal genlerin ekspresyon seviyeleri ve dolayısı ile enerji ihtiyaçları artar (Rebnegger vd. 2014). Metabolik yük olarak tanımlanan ekstra enerji ihtiyacı gelişmenin yavaşlamasına ya da düşük miktarda ürün birikmesi ile sonuçlanabilir (Heyland vd. 2010). Ksilanaz hücre dışı üretim klonunun μ arttıkça hücre dışına salgıladığı protein miktarında meydana gelen azalma, proses boyunca elde edilen toplam enzim aktivitesindeki azalma ile uyumlu bulunmuş, bu durumun daha önce rapor edildiği gibi (Zhao vd. 2008) çok kısa sürede çok yüksek hücre yoğunluklarına çıkılmasından kaynaklı artan çevresel stres, enerji ihtiyacından kaynaklanabileceği yorumu yapılmıştır. Ayrıca rekombinant protein üretiminde proteinin yapısına bağlı olarak transkripsiyondan daha fazla sekresyonun basamağının kısıtlayıcı olduğu bildirilmiştir (Gasser vd. 2006; Hohenblum vd. 2004a).



Şekil 5.5. Normoksik (gri) ve hipoksik (beyaz) üretimlerde oluşan toplam ürün miktarı (PV, kU) (bar grafik), substrat ürün verimleri (○, Y_{PS}) ve hücre dışı toplam protein miktarları (□, mg/L)

Hipoksik şartlarda farklı sabit-etanol konsantrasyonlarında gerçekleştirilen üretimlerde elde edilen ürün miktarları arasında istatistiksel olarak bir fark tespit edilememiştir ($p=0,917$). Şekil 5.5’de görüldüğü üzere, hipoksik üretimlerde toplam ürün miktarı ve substrat ürün verimi açısından sabit-μ stratejisinden daha yüksek değerler elde edilmiştir. Hipoksik üretimlerde elde edilen maksimum enzim aktivitesi (10.172 kU) normoksik proseslerde elde edilen en yüksek ürün miktarından (9.062 kU) %12 daha fazladır. Hücre dışı toplam protein verileri karşılaştırıldığında ise hipoksik üretimde %12 daha fazla toplam enzim aktivitesine %37 daha az hücre dışı protein ile ulaşıldığı görülmektedir. Bu da daha enzimin daha saf elde edildiği anlamına gelir ve fermentasyon sonrası işlemlerde büyük avantaj sağlar.

Substrat ürün verimi Y_{PS} ise normoksik üretimlerde maksimum 9,2 kU/g_{glu}, hipoksik üretimlerde ise maksimum 9,3 kU/g_{glu} olarak hesaplanmıştır. Baumann vd.’nin (2008) çalışmasında 3 farklı protein için de yarı-kesikli hipoksik üretimde standart sabit beslemeli üretimin yaklaşık %10 fazlası kadar ürün konsantrasyonu (U tripsin/L ya da mg Fab/L) elde edilmiştir. Adelantado vd. (2017) ise sürekli sistemde $D=0,1 \text{ sa}^{-1}$ hızında gerçekleştirdikleri hipoksik üretimde normoksik üretimin 2 katı ürün konsantrasyonlarına (mg Fab/L) ulaşmışlardır. Hipoksik koşulların literatüre uyumlu olarak toplam ürün miktarı üzerine pozitif etki ettiği tespit edilmiştir.

Spesifik gelişim hızı (μ) ile spesifik üretim hızı (q_p) arasında pozitif korelasyon tespit edilmiştir

P. pastoris’te GAP promotörü altında üretilen çeşitli proteinlerin üretim kinetikleri genellikle kemostat (sürekli) temelli çalışmalarla incelenmiş ve spesifik gelişim hızı (μ) ile spesifik ürün oluşum hızları (q_p) arasında pozitif korelasyon tespit

edilmiştir (Khasa vd. 2007; Buchetics vd. 2011; Rebnegger vd. 2014) (Çizelge 2.2). Yarı-kesikli sistemlerde yapılan çalışmalarda yine yapısal GAP promotoru altında yapılan üretimlerin hücre gelişimine bağlı olduğunu göstermiş, yüksek gelişim hızında gerçekleştirilen üretimlerde yüksek verimliliğe ulaşılacağı rapor edilmiştir (Garcia-Ortega vd. 2013).

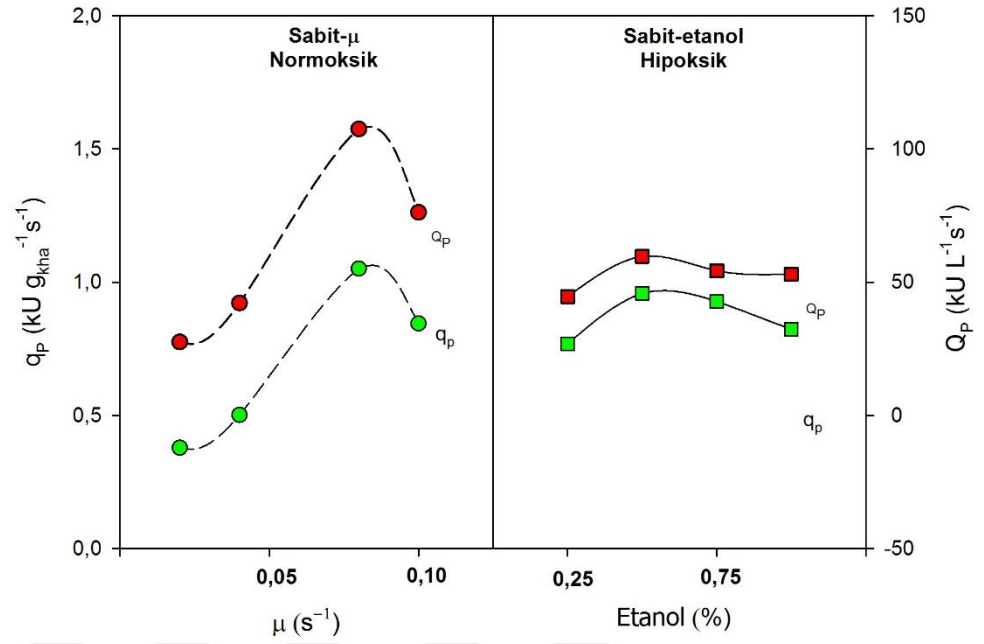
En yüksek $\mu_{\max}$ ($0,1 \text{ sa}^{-1}$) olmak üzere, hücrelerin yarı-kesikli sistemde 4 farklı μ değerinde ($\mu_{\max}$, $0,8\mu_{\max}$, $0,4\mu_{\max}$ ve $0,2\mu_{\max}$) sabit gelişimleri üstel besleme profillerinin uygulanması ile sağlanmıştır. $0,8\mu_{\max}$ değerine kadar μ ve q_p arasında literatüre uyumlu olacak şekilde pozitif korelasyon gözlenmiş, $\mu_{\max}$ değerinde gerçekleştirilen üretimde ise ürün miktarı ve dolayısı ile q_p değeri düşmüştür (Şekil 5.6). Yüksek hızlarda yapılan üretimlerde besleme hızı yüksek olduğundan biyoreaktörün hacmi hızla artar, hücreler hızla çoğalır ve sistemin teknik sınırlarına çok hızlı bir şekilde ulaşılır. Hücreler hızlı gelişmek için artan enerji ve yeni hücre materyali ihtiyacını karşılamamanın yanı sıra hızla değişen çevresel faktörlerden kaynaklı stresle de baş etmek zorunda kalır. Bu durum hücrelerin üretim kapasitelerinin düşmesi ile sonuçlanabilmektedir.

Hipoksik koşullar spesifik ve hacimsel ürün oluşum hızlarını (q_p ve Q_p) normoksik koşullara göre 2 kat arttırmıştır.

Hipoksik üretimlerde spesifik gelişim hızı (μ) maksimum değerden ($0,1 \text{ sa}^{-1}$) başlayıp prosesin sonlarına doğru $0,02$ 'lere düşerek ortalama $0,04 \text{ sa}^{-1}$ olarak gerçekleşmiştir. Proses süresi olarak normoksik $0,04 \text{ sa}^{-1}$ üretimi 56 saat, ortalama aynı μ değerine sahip hipoksik üretimler ise ortalama 60 saat sürmüştür. Aynı μ değerine ve yaklaşık proses süresine sahip $0,04 \text{ sa}^{-1}$ sabit- μ üretimi ile ve hipoksik üretimlerin değerleri karşılaştırıldığında normoksik üretimin spesifik üretim hızı q_p $0,501 \text{ U/g}_{kha}/\text{sa}$ iken hipoksik üretimde $0,958 \text{ U/g}_{kha}/\text{sa}$ olarak yaklaşık 2 katına çıkmıştır. Hipoksik koşullarda normoksik koşullara göre daha az hücre miktarı ile aynı miktarda ürün elde edilmesi ile sistemin verimliliği artırılmıştır.

Yüksek μ değerlerinde gerçekleşen üretimlerin q_p değerlerinin hipoksik üretimlerin değerlerine yaklaşık bulunması proses sürelerinin (23 ve 28 saat) hipoksik üretimlerin sürelerinin (~ 60 saat) yaklaşık yarısı olmalarından kaynaklanmıştır.

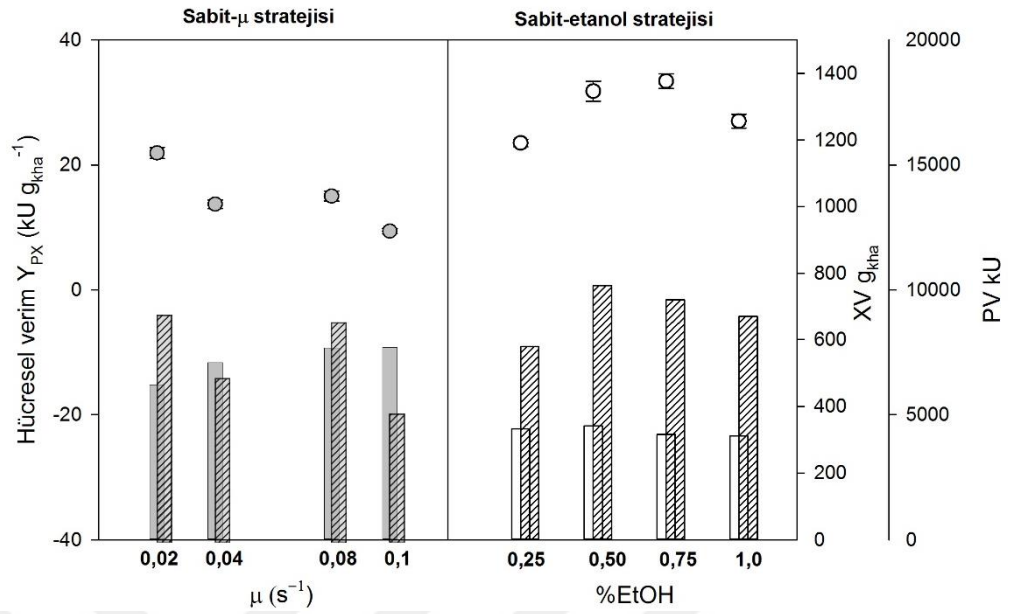
Maksimum toplam enzim aktivitesinin elde edildiği üretimler karşılaştırıldığında ise ($0,2\mu_{\max}$ ve $\%0,5 \text{ EtOH}$ üretimleri) normoksik üretimde 114 saatte elde edilen ürün miktarına hipoksik üretimde yarı zamanda (ortalama 60 saat) ve yaklaşık $\%40$ daha az hücre miktarı ile ulaşılmış ve hipoksik koşullar prosesin spesifik ürün oluşum hızını (q_p $\text{kU/g}_{kha}/\text{sa}$) 2,5 kat ve hacimsel verimliliğini (Q_p kU/L/sa) 2 kat arttırmıştır.



Şekil 5.6. Sabit- μ (kare) ve sabit-etanol (yuvarlak) yarı-kesikli üretimlerin spesifik ürün oluşum hızı (q_p , yeşil) ve hacimsel verimlilik (Q_p , kırmızı) değerlerinin karşılaştırılması

Hipoksik şartlarda hücresel verim (Y_{PX}) normoksik koşullardakinden ortalama 2 kat daha fazla gerçekleşmiştir.

Şekil 5.7’de normoksik ve hipoksik üretimlerin Y_{PX} değerleri XV (g_{kha}) ve PV (kU) değerleri ile birlikte karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Normoksik koşullarda Y_{PX} değerleri μ ’ye göre 9,4 ve 21,9 gibi çok geniş bir aralıkta değişirken, hipoksik koşullarda 23,5-33,4 kU/g_{kha} değerlerine ulaşılmıştır. Hipoksik koşullarda normoksik koşullara göre %12 daha fazla toplam ürün elde edilirken %30 daha az biyokütle oluşmuştur. Böylelikle birim hücre başına üretilen enzim miktarı (Y_{PX}) 1,5-3,5 kat arası daha fazla gerçekleşmiştir.



Şekil 5.7. Normoksik (gri) ve hipoksik (beyaz) yarı-kesikli üretimlerin toplam biyokütle (düz bar grafik), toplam enzim aktivitesi (taralı bar grafik) ve hücre ürün verimi (Y_{PX} , yuvarlak simgeler) değerlerinin karşılaştırılması

Hücre başına üretilen protein miktarının hipoksia ile birlikte artması kemostat ve yarı-kesikli hipoksik üretimlerin tamamında test edilen proteinler için elde edilen en önemli ortak sonuçtur. Oksijenin azalması glikolitik akıyı arttırdığından, *GAP* promotorunun altına klonlanan genin ekspresyonunu artırması da beklenen bir sonuçtur. Bununla birlikte proteinlerin hücre dışına salgılanmalarında kısıtlayıcı aşamanın transkripsiyondan çok sekresyon olduğu bilinmektedir (Gasser vd. 2006, 2007). Suş mühendisliği stratejileri ile rekombinant protein sekresyonunu arttıran yardımcı faktörler olarak tanımlanan ve protein salgılama yolağında görev olan *ERO1*, *PDI1* ve *HAC1* gibi UPR genlerinin aşırı ifadelerinin protein sekresyonunu arttırdığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Inan vd. 2006b; Gasser vd. 2008; Delic 2012). Hipoksik şartlarda transkriptomda meydana gelen en dikkat çekici değişikliklerden biri de UPR genlerinin transkripsiyonlarının upregüle olmasıdır (Baumann vd. 2010). Ayrıca hücrelerin oksijen azaldığında lipid metabolizmasını yeniden modelleyerek membranın sterol ve sfingolipid kompozisyonlarını değiştirmesi ve membranın akışkanlık ve geçirgenliğinin artmasının, rekombinant protein sekresyonunu olumlu etkilediği bildirilmiştir (Adelantado vd. 2017). Hipoksik şartlarda glikolitik akının artması, UPR proteinlerinin daha fazla üretilmesi ve hücre membranında meydana gelen fiziksel değişiklikler hep birlikte, hücrelerin rekombinant protein üretme kapasitesinin artmasına pozitif etkide bulunmuşlardır.

6. SONUÇ

Rekombinant protein üretiminde, üretim suşu oluşturulduktan sonra spesifik gelişim hızı ya da diğer proses parametrelerinin üretim kinetiğini nasıl etkilediğini araştırmak, endüstriyel ölçekte yarı-kesikli proseslerde en uygun üretim besleme profilini belirlemek açısından büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmada, ksilanaz enzimini *GAP* promotoru altında hücre dışı olarak üreten *P. pastoris* üretim suşunun üretim kinetiğini spesifik gelişim hızı ve oksijen kısıtlamasının nasıl etkilediği aydınlatılmaya çalışılmıştır.

- Sabit- μ stratejisinin uygulandığı üretimlerde spesifik gelişim hızı ile spesifik ürün oluşum hızı (μ ve q_p) arasında μ_{max} üretimi haricinde pozitif korelasyon tespit edilmiş, en yüksek spesifik gelişim hızı ve hacimsel verimlilik değerlerine (1,051 kU/gkha/s ve 107,5 kU/L/s) normoksik şartlar altında gerçekleştirilen $0,8\mu_{max}$ ($0,08\text{ s}^{-1}$) üretiminde ulaşılmıştır.
- Sabit- μ stratejisinin uygulandığı üretimlerde, prosesin sonunda en yüksek toplam ürün miktarına en düşük μ 'de ($0,02\text{ s}^{-1}$) gerçekleştirilen üretimde 114 saatte ulaşılmıştır (9.062 kU).
- Hipoksik şartlar altında farklı sabit-etanol konsantrasyonlarında gerçekleştirilen üretimlerde hücre gelişim ve ürün oluşum kinetiği açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilememiştir.
- Hipoksik koşulların en öne çıkan sonucu, aynı miktardaki substrattan, 60 saatte, daha az biyokütle ve daha az hücre dışı protein miktarı ile daha fazla enzim aktivitesi elde edilmiş olmasıdır. Hipoksik koşullarda (ortalama 324 g) normoksik koşullara göre (ortalama 537 g) %40 daha az biyokütle oluşmuştur. Hipoksik koşullarda maksimum toplam enzim aktivitesi normoksik üretimdekinden %37 daha az toplam hücre dışı protein ile %12 daha fazla elde edilmiştir.
- Hipoksik koşullar spesifik ürün oluşum hızı (q_p) ve hacimsel verimlilik (Q_p) ve hücresel verimi (Y_{PX}) normoksik koşullara göre 2 kat arttırmıştır.
- Hipoksik sabit-etanol üretimlerinde sensör tarafından otomatik olarak ayarlanan besleme profilinin sabit hızda gerçekleştiği tespit edilmiştir. Glukoz beslemeli *GAP* kontrollü hipoksik yarı-kesikli proses besleme profili ilk kez bu çalışma ile belirlenmiştir.

Genel olarak büyük ölçekli üretimlerde üretim yapan hücrenin kendisi (biyokütle) kaçınılmaz bir atıktır. Aynı zaman da gereklidir de çünkü çoğu mikrobiyal üretim prosesi gelişimle pozitif ilişkilidir. Birçok çalışmada gösterildiği üzere özellikle yapısal *GAP* promotoru kontrollü üretimlerde yüksek ürün oluşum hızı ve verimliliklere yüksek gelişim hızlarında ulaşılır. Fakat yüksek hücre yoğunluklarında oksijen ve ısı transferi ile ilgili teknik sınırlamalar yanında ürünün saflaştırılması ile ilgili zorluklar da ortaya çıkmaktadır (Mattanovich vd. 2012). Tüm bu nedenlerle biyoproses açısından hücre gelişiminin ve verimliliğin ayrılması oldukça caziptir. Daha yüksek ürün miktarları ancak

spesifik verimlilik ve spesifik gelişme hızı (q_p ve μ) arasında ilişkinin zayıflaması ve böylelikle düşük gelişme hızlarında yüksek spesifik salgılama hızlarına ulaşılması ile elde edilebilir. Bu senaryonun gerçekleşmesi için farklı stratejilerin uygulandığı çalışmalar yapılmaktadır. Örneğin Maurer vd. (2006) *GAP* promotörü ile glukoz beslemeli üretim için spesifik gelişim hızını optimize besleme profili ile başlangıçta yüksek sonrasında düşük değerlerde kontrol altında tutarak hacimsel verimliliği arttırmıştır. Buchetics vd. (2011) suş mühendisliği ile düşük gelişim hızlarında hücrenin spesifik salgılama hızını arttırmış, hacimsel verimlilik ve toplam ürün miktarında artış elde etmiştir.

Bu çalışma ile hipoksik koşulların *GAP* promotörü kontrolünde glukoz beslemeli yarı-kesikli üretimlerde, biyokütle oluşumunu sınırlarken (düşük spesifik gelişim hızı) hücresel verimi, spesifik ürün oluşum hızı ve hacimsel verimlilik değerlerini 2 kat arttırdığı tespit edilmiştir. Hipoksik koşulların, ayrıca, özellikle büyük ölçekli endüstriyel üretimler için, biyokütle atığını azaltmak ve üretim verimliliğini arttırmanın yanında, proses süresince sisteme saf oksijen beslemesi yapılmasına gerek olmaması, hücre miktarının azalmasından dolayı ısı oluşumunun ve soğutma gereksiniminin azalması gibi çok önemli avantajları bulunmaktadır.

7. KAYNAKLAR

- Adelantado, N., Tarazona, P., Grillitsch, K. et al. 2017. The effect of hypoxia on the lipidome of recombinant *Pichia pastoris*. *Microb Cell Fact*, 1–15.
- Ahmad, M., Hirz, M., Pichler, H. et al. 2014. Protein expression in *Pichia pastoris*: Recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 98, 5301–17.
- Analysis OO. BioPAT Xgas Metabolic Calculations General advice for monitoring Off-gas.
- Anasontzis, G. E., Penã, M. S., Spadiut, O. et al. 2014. Effects of temperature and glycerol and methanol-feeding profiles on the production of recombinant galactose oxidase in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Prog*, DOI: 10.1002/btpr.1878.
- Ata, Ö., Prielhofer, R., Gasser, B. et al. 2017. Transcriptional engineering of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter for improved heterologous protein production in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Bioeng*, 114, 2319–27.
- Barrigón, J. M., Montesinos, J. L., Valero, F. 2013. Searching the best operational strategies for *Rhizopus oryzae* lipase production in *Pichia pastoris* Mut+ phenotype: Methanol limited or methanol non-limited fed-batch cultures? *Biochem Eng J*, DOI: 10.1016/j.bej.2013.03.018.
- Barrigon, J. M., Valero, F., Montesinos, J. L. 2015. A macrokinetic model-based comparative meta-analysis of recombinant protein production by *Pichia pastoris* under AOX1 promoter. *Biotechnol Bioeng*, DOI: 10.1002/bit.25518.
- Baumann, K., Carnicer, M., Dragosits, M. et al. 2010. A multi-level study of recombinant *Pichia pastoris* in different oxygen conditions. *BMC Syst Biol*, 4, DOI: 10.1186/1752-0509-4-141.
- Baumann, K., Dato, L., Graf, A. B. et al. 2011. The impact of oxygen on the transcriptome of recombinant *S. cerevisiae* and *P. pastoris* - a comparative analysis. *BMC Genomics*, 12, 7–9.
- Baumann, K., Maurer, M., Dragosits, M. et al. 2008. Hypoxic fed-batch cultivation of *Pichia pastoris* increases specific and volumetric productivity of recombinant proteins. *Biotechnol Bioeng*, 100, 177–83.
- Boer, H., Teeri, T. T., Koivula, A. 2000. Characterization of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase Cel7a secreted from *Pichia pastoris* using two different promoters. *Biotechnol Bioeng*, DOI: 10.1002/1097-0290(20000905)69:5<486::AID-BIT3>3.0.CO;2-N.
- Borzani, W. 2008. Calculation of fermentation parameters from the results of a fed-batch test taking account of the volume of biomass in the fermenting medium. *Brazilian Arch Biol Technol*, 51, 441–6.
- Buchetics, M., Dragosits, M., Maurer, M. et al. 2011. Reverse engineering of protein secretion by uncoupling of cell cycle phases from growth. *Biotechnol Bioeng*, 108, 2403–12.
- Carnicer, M. 2012. Systematic metabolic analysis of recombinant *Pichia pastoris* under different oxygen conditions: A Metabolome and Fluxome Based Study. Dissertation, Universitat Autònoma de Barcelona, 179 pages.

- Carnicer, M., Baumann, K., Toplitz, I. et al. 2009. Macromolecular and elemental composition analysis and extracellular metabolite balances of *Pichia pastoris* growing at different oxygen levels. *Microb Cell Fact*, DOI: 10.1186/1475-2859-8-65.
- Cereghino, J.L., Cregg, J.M. 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Re*, DOI: 10.1016/S0168-6445(99)00029-7.
- Charoenrat, T., Ketudat-Cairns, M., Stendahl-Andersen, H. et al. 2005. Oxygen-limited fed-batch process: An alternative control for *Pichia pastoris* recombinant protein processes. *Bioprocess Biosyst Eng*, 27, 399–406.
- Cos, O., Ramón, R., Montesinos, J.L. et al. 2006a. Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: A review. *Microb Cell Fact*, 5, 1–20.
- Cos, O., Ramón, R., Montesinos, J.L. et al. 2006b. Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: A review. *Microb Cell Fact*, DOI: 10.1186/1475-2859-5-17.
- Cregg, J. 1993. The *Pichia* System. Keck Grad Institute, Claremont, Calif, 1–8.
- Cregg, J.M., Barringer, K.J., Hessler, A.Y. et al. 1985. *Pichia pastoris* as a host system for transformations. *Mol Cell Biol*, DOI: 10.1128/MCB.5.12.3376.
- Cregg, J.M., Cereghino, J.L., Shi, J. et al. 2000. Recombinant Protein Expression in *Pichia pastoris*. *Mol Biotechnol*, 16, 23–52.
- Cunha, A.E., Clemente, J.J., Gomes, R. et al. 2004. Methanol induction optimization for scFv antibody fragment production in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Bioeng*, DOI: 10.1002/bit.20051.
- Curvers, S., Brixius, P., Klauser, T. et al. 2001. Human chymotrypsinogen B production with *Pichia pastoris* by integrated development of fermentation and downstream processing. Part 1. Fermentation. *Biotechnol Prog*, DOI: 10.1021/bp000164j.
- Çalik, P., Ata, Ö., Güneş, H. et al. 2015. Recombinant protein production in *Pichia pastoris* under glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter: From carbon source metabolism to bioreactor operation parameters. *Biochem Eng J*, 95, 20–36.
- Delic, M., Rebnegger, C., Wanka, F., Puxbaum, V., Haberhauer-Troyer, C., Hann, S., Köllensperger, G., Mattanovich, D., Gasser, B. 2012. Oxidative protein folding and unfolded protein response elicit differing redox regulation in endoplasmic reticulum and cytosol of yeast. *Free Radic Biol Med*, 52(9), 2000-12.
- Döring, F., Klapper, M., Theis, S. et al. 1998. Use of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter for production of functional mammalian membrane transport proteins in the yeast *Pichia pastoris*. *Biochem Biophys Res Commun*, 250, 531–5.
- Ellis, S.B., Brust, P.F., Koutz, P.J. et al. 1985. Isolation of alcohol oxidase and two other methanol regulatable genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol Cell Biol*, DOI: 10.1128/MCB.5.5.1111.
- Ferreira, A.R., Ataíde, F., Von Stosch, M. et al. 2012. Application of adaptive DO-stat

- feeding control to *Pichia pastoris* X33 cultures expressing a single chain antibody fragment (scFv). *Bioprocess Biosyst Eng*, DOI: 10.1007/s00449-012-0751-z.
- Garcia-Ochoa, F. and Gomez, E. 2009. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. *Biotechnology Advances*, 27(2), 153–176. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.10.006>
- Garcia-Ortega, X., Adelantado, N., Ferrer, P. et al. 2016. A step forward to improve recombinant protein production in *Pichia pastoris*: From specific growth rate effect on protein secretion to carbon-starving conditions as advanced strategy. *Process Biochem*, 51, 681–91.
- Garcia-Ortega, X., Ferrer, P., Montesinos, J.L. et al. 2013. Fed-batch operational strategies for recombinant Fab production with *Pichia pastoris* using the constitutive GAP promoter. *Biochem Eng J*, 79, 172–81.
- Gasser, B., Maurer, M., Gach, J. et al. 2006. Engineering of *Pichia pastoris* for improved production of antibody fragments. *Biotechnol Bioeng*, DOI: 10.1002/bit.20851.
- Gasser, B., Saloheimo, M., Rinas, U. et al. 2008. Protein folding and conformational stress in microbial cells producing recombinant proteins: A host comparative overview. *Microb Cell Fact*, DOI: 10.1186/1475-2859-7-11.
- Gasser, B., Sauer, M., Maurer, M. et al. 2007. Transcriptomics-based identification of novel factors enhancing heterologous protein secretion in yeasts. *Appl Environ Microbiol*, DOI: 10.1128/AEM.01196-07.
- Gonçalves, A.M., Pedro, A.Q., Maia, C. et al. 2013. *Pichia pastoris*: A recombinant microfactory for antibodies and human membrane proteins. *J Microbiol Biotechnol*, 23, 587–601.
- Goodrick, J.C., Xu, M., Finnegan, R. et al. 2001. High-level expression and stabilization of recombinant human chitinase produced in a continuous constitutive *Pichia pastoris* expression system. *Biotechnol Bioeng*, 74, 492–7.
- Govindappa, N., Hanumanthappa, M., Venkatarangaiah, K. et al. 2014. A new signal sequence for recombinant protein secretion in *Pichia pastoris*. *J Microbiol Biotechnol*, DOI: 10.4014/jmb.1308.08085.
- Guan, B., Chen, F., Lei, J. et al. 2013. Constitutive expression of a rhIL-2-HSA fusion protein in *Pichia pastoris* using glucose as carbon source. *Appl Biochem Biotechnol*, 171, 1792–804.
- Guarna, M.M., Lesnicki, G.J., Tam, B.M. et al. 1997. On-line monitoring and control of methanol concentration in shake-flask cultures of *Pichia pastoris*. *Biotechnol Bioeng*, DOI: 10.1002/(SICI)1097-0290(19971105)56:3<279::AID-BIT5>3.0.CO;2-G.
- Gurramkonda, C., Adnan, A., Gäbel, T. et al. 2009. Simple high-cell density fed-batch technique for high-level recombinant protein production with *Pichia pastoris*: Application to intracellular production of Hepatitis B surface antigen. *Microb Cell Fact*, 8, 1–8.
- Hang, H.F., Chen, W., Guo, M.J. et al. 2008. A simple unstructured model-based control for efficient expression of recombinant porcine insulin precursor by *Pichia pastoris*. *Korean J Chem Eng*, DOI: 10.1007/s11814-008-0174-3.
- Hasslacher, M., Schall, M., Hayn, M. et al. 1997. High-level intracellular expression of

- hydroxynitrile lyase from the tropical rubber tree *Hevea brasiliensis* in microbial hosts. *Protein Expr Purif*, DOI: 10.1006/prep.1997.0765.
- He, D., Luo, W., Wang, Z. et al. 2015. Combined use of *GAP* and *AOX1* promoters and optimization of culture conditions to enhance expression of *Rhizomucor miehei* lipase. *J Ind Microbiol Biotechnol*, DOI: 10.1007/s10295-015-1633-6.
- Heiss, S., Puxbaum, V., Gruber, C. et al. 2015. Multistep processing of the secretion leader of the extracellular protein Epx1 in *Pichia pastoris* and implications for protein localization. *Microbiol (United Kingdom)*, DOI: 10.1099/mic.0.000105.
- Heyland, J., Fu, J., Blank, L.M. et al. 2010. Quantitative physiology of *Pichia pastoris* during glucose-limited high-cell density fed-batch cultivation for recombinant protein production. *Biotechnol Bioeng*, 107, 357–68.
- Heyland, J., Fu, J., Blank, L.M. et al. 2011. Carbon metabolism limits recombinant protein production in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Bioeng*, 108, 1942–53.
- Hu, X.Q., Chu, J., Zhang, Z. et al. 2008. Effects of different glycerol feeding strategies on S-adenosyl-L-methionine biosynthesis by pGAP-driven *Pichia pastoris* overexpressing methionine adenosyltransferase. *J Biotechnol*, 137, 44–9.
- Inan, M., Aryasomayajula, D., Sinha, J. et al. 2006a. Enhancement of protein secretion in *Pichia pastoris* by overexpression of protein disulfide isomerase. *Biotechnol Bioeng*, 93, 771–8.
- Inan, M., Aryasomayajula, D., Sinha, J. et al. 2006b. Enhancement of protein secretion in *Pichia pastoris* by overexpression of protein disulfide isomerase. *Biotechnol Bioeng*, DOI: 10.1002/bit.20762.
- Invitrogen Corporation. 2002. *Pichia Fermentation Process Guidelines Overview*. Prog Bot, 67, 1–11.
- Jacobs, P.P., Inan, M., Festjens, N. et al. 2010. Fed-batch fermentation of GM-CSF-producing glycoengineered *Pichia pastoris* under controlled specific growth rate. *Microb Cell Fact*, DOI: 10.1186/1475-2859-9-93.
- Jahic, M., Gustavsson, M., Jansen, A.K. et al. 2003. Analysis and control of proteolysis of a fusion protein in *Pichia pastoris* fed-batch processes. *J Biotechnol*, 102, 45–53.
- Julien, C. 2006. Production of Humanlike Recombinant Proteins in *Pichia pastoris*. *BioProcess Tech*, 4, 22–31.
- Jungo, C., Rérat, C., Marison, I.W. et al. 2006. Quantitative characterization of the regulation of the synthesis of alcohol oxidase and of the expression of recombinant avidin in a *Pichia pastoris* Mut⁺ strain. *Enzyme Microb Technol*, 39, 936–44.
- Karaoglan, M., Karaoglan, F.E., Inan, M. 2016. Comparison of *ADH3* promoter with commonly used promoters for recombinant protein production in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif*, 121:112–7.
- Karaoglan, M., Yildiz, H., Inan, M. 2014. Screening of signal sequences for extracellular production of *Aspergillus niger* xylanase in *Pichia pastoris*. *Biochem Eng J*, 92, 16–21.
- Katakura, Y., Zhang, W., Zhuang, G. et al. 1998. Effect of methanol concentration on the production of human $\beta 2$ - glycoprotein I domain V by a recombinant *Pichia*

- pastoris*: A simple system for the control of methanol concentration using a semiconductor gas sensor. *J Ferment Bioeng*, DOI: 10.1016/S0922-338X(98)80156-6.
- Khasa, Y.P., Khushoo, A., Srivastava, L. et al. 2007. Kinetic studies of constitutive human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (hGM-CSF) expression in continuous culture of *Pichia pastoris*. *Biotechnol Lett*, 29, 1903–8.
- Khatri, N.K., Hoffmann, F. 2006. Oxygen-limited control of methanol uptake for improved production of a single-chain antibody fragment with recombinant *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 72, 492–8.
- Kim, N., Choi, Y., Jung, S. et al. 2000. Modeling *Pichia pastoris* growth on methanol and optimizing the production of a recombinant protein, the heavy-chain fragment C of botulinum neurotoxin, serotype A. *Biotechnol Bioeng*, DOI: 10.1002/1097-0290(20001005)70:1<1::AID-BIT1>3.0.CO;2-Y.
- Kim, S., Ha, B.S., Kim, M.S. et al. 2016. Evaluation of copper-inducible fungal laccase promoter in foreign gene expression in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Bioprocess Eng*, DOI: 10.1007/s12257-015-0567-1.
- Kobayashi, K., Kuwae, S., Ohya, T. et al. 2000. High level secretion of recombinant human serum albumin by fed-batch fermentation of the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*, based on optimal methanol feeding strategy. *J Biosci Bioeng*, DOI: 10.1016/S1389-1723(00)80082-1.
- Koller, A., Valesco, J., Subramani, S. 2000. The *CUP1* promoter of *Saccharomyces cerevisiae* is inducible by copper in *Pichia pastoris*. *Yeast* 2000, DOI: 10.1002/(SICI)1097-0061(200005)16:7<651::AID-YEA580>3.0.CO;2-F.
- Kottmeier, K., Günther, T.J., Weber, J. et al. 2012. Constitutive expression of hydrophobin *HFB1* from *Trichoderma reesei* in *Pichia pastoris* and its pre-purification by foam separation during cultivation. *Eng Life Sci*, DOI: 10.1002/elsc.201100155.
- Kurtzman, C.P. 2009. Biotechnological strains of *Komagataella (Pichia) pastoris* are *Komagataella phaffii* as determined from multigene sequence analysis. *J Ind Microbiol Biotechnol*, DOI: 10.1007/s10295-009-0638-4.
- Leduy, A., Zajic, J.E. 1973. A Geometrical Approach for Differentiation of an Experimental Function at a Point: Applied to Growth and Product Formation. *Biotechnol Bioeng*, XV, 805–10.
- Lee, C.Y., Lee, S.J., Jung, K.H. et al. 2003. High dissolved oxygen tension enhances heterologous protein expression by recombinant *Pichia pastoris*. *Process Biochem*, 38, 1147–54.
- Liang, S., Zou, C., Lin, Y. et al. 2013. Identification and characterization of *PGCW14*: A novel, strong constitutive promoter of *Pichia pastoris*. *Biotechnol Lett*, DOI: 10.1007/s10529-013-1265-8.
- Lin-Cereghino, G.P., Stark, C.M., Kim, D. et al. 2013. The effect of α -mating factor secretion signal mutations on recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Gene*, DOI: 10.1016/j.gene.2013.01.062.
- Liu, B., Zhang, Y., Zhang, X. et al. 2016. Discovery of a rhamnose utilization pathway and rhamnose-inducible promoters in *Pichia pastoris*. *Sci Rep*, DOI:

10.1038/srep27352.

- Looser, V., Bruhlmann, B., Bumbak, F. et al. 2014. Cultivation strategies to enhance productivity of *Pichia pastoris*: A review. *Biotechnol Adv*, 33, 1177–93.
- Massahi, A., Çalık, P. 2016. Endogenous signal peptides in recombinant protein production by *Pichia pastoris*: From in-silico analysis to fermentation. *J Theor Biol*, 408, 22–33.
- Mattanovich, D., Branduardi, P., Dato, L. et al. 2012. Recombinant protein production in yeasts. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), DOI:10.1007/978-1-61779-770-5.
- Maurer, M., Kühleitner, M., Gasser, B. et al. 2006a. Versatile modeling and optimization of fed batch processes for the production of secreted heterologous proteins with *Pichia pastoris*. *Microb Cell Fact*, 5, 1–10.
- Maurer, M., Kühleitner, M., Gasser, B. et al. 2006b. Versatile modeling and optimization of fed batch processes for the production of secreted heterologous proteins with *Pichia pastoris*. *Microb Cell Fact*, 5, 37.
- Mayson, B.E., Kilburn, D.G., Zamost, B.L. et al. 2003. Effects of methanol concentration on expression levels of recombinant protein in fed-batch cultures of *Pichia methanolica*. *Biotechnol Bioeng*, DOI: 10.1002/bit.10464.
- Mears, L., Stocks, S.M., Sin, G. et al. 2017. A review of control strategies for manipulating the feed rate in fed-batch fermentation processes. *J Biotechnol*, DOI: 10.1016/j.jbiotec.2017.01.008.
- Melicherová, K., Krahulec, J., Šafránek, M. et al. 2017. Optimization of the fermentation and downstream processes for human enterokinase production in *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 101, 1927–34.
- Mellitzer, A., Ruth, C., Gustafsson, C. et al. 2014. Synergistic modular promoter and gene optimization to push cellulase secretion by *Pichia pastoris* beyond existing benchmarks. *J Biotechnol*, DOI: 10.1016/j.jbiotec.2014.08.035.
- Menendez, J., Valdes, I., Cabrera, N. 2003. The *ICLI* gene of *Pichia pastoris*, transcriptional regulation and use of its promoter. *Yeast*, DOI: 10.1002/yea.1028.
- Meyer, H.P., Minas, W., Schmidhalter, D. 2016. Industrial-scale fermentation. In: Wittmann, C. and Liao, J.C. (Eds.), *Industrial Biotechnology: Products and Processes*. Wiley, pp. 1-53.
- Min, C.K., Lee, J.W., Chung, K.H. et al. 2010. Control of specific growth rate to enhance the production of a novel disintegrin, saxatilin, in recombinant *Pichia pastoris*. *J Biosci Bioeng*, DOI: 10.1016/j.jbiosc.2010.03.013.
- Nielsen, J., Villadsen, J., Lidén, G. 2003. *Bioreaction Engineering Principles*. Springer, US, DOI: 10.1002/aic.690421032.
- Öztürk, S., Çalık, P., Özdamar, T.H. 2016. Fed-Batch Biomolecule Production by *Bacillus subtilis*: A State of the Art Review. *Trends Biotechnol*, 34, 329–45.
- Pal Khasa, Y., Conrad, S., Sengul, M. et al. 2011. Isolation of *Pichia pastoris* *PIR* genes and their utilization for cell surface display and recombinant protein secretion. *Yeast*, DOI: 10.1002/yea.1832.
- Pal, Y., Khushoo, A., Mukherjee, K.J. 2006. Process optimization of constitutive human

- granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (hGM-CSF) expression in *Pichia pastoris* fed-batch culture. *Appl Microbiol Biotechnol*, DOI: 10.1007/s00253-005-0018-6.
- Parashar, D., Satyanarayana, T. 2016. Enhancing the production of recombinant acidic α -amylase and phytase in *Pichia pastoris* under dual promoters [constitutive (GAP) and inducible (AOX)] in mixed fed batch high cell density cultivation. *Process Biochem*, 51, 1315–22.
- Peña, D.A., Gasser, B., Zanghellini, J. et al. 2018. Metabolic engineering of *Pichia pastoris*. *Metab Eng*, 1–14.
- Pirt, S.J. 1965. The Maintenance Energy of Bacteria in Growing Cultures. *Proc R Soc B Biol Sci*, DOI: 10.1098/rspb.1965.0069.
- Potgieter, T.I., Cukan, M., Drummond, J.E. et al. 2009. Production of monoclonal antibodies by glycoengineered *Pichia pastoris*. *J Biotechnol*, 139, 318–25.
- Potgieter, T.I., Kersey, S.D., Mallem, M.R. et al. 2010. Antibody expression kinetics in glycoengineered *Pichia Pastoris*. *Biotechnol Bioeng*, 106, 918–27.
- Potvin, G. 2015. Development and Optimization of Novel Platforms for the Production of Recombinant Proteins. Dissertation, University of Ottawa, Canada, 153 p.
- Potvin, G., Ahmad, A., Zhang, Z. 2012a. Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: A review. *Biochem Eng J*, 64, 91–105.
- Potvin, G., Ahmad, A., Zhang, Z. 2012b. Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: A review. *Biochem Eng J*, DOI: 10.1016/j.bej.2010.07.017.
- Prielhofer, R., Maurer, M., Klein, J. et al. 2013. Induction without methanol: Novel regulated promoters enable high-level expression in *Pichia pastoris*. *Microb Cell Fact*, 12, 1–10.
- Rebnegger, C., Graf, A.B., Valli, M. et al. 2014. In *Pichia pastoris*, growth rate regulates protein synthesis and secretion, mating and stress response. *Biotechnol J*, 9, 511–25.
- Ren, H. and Yuan, J. 2005. Model-based specific growth rate control for *Pichia pastoris* to improve recombinant protein production. *J Chem Technol Biotechnol*, 80, 1268–72.
- Ren, H.T., Yuan, J.Q., Bellgardt, K.H. 2003. Macrokinetic model for methylotrophic *Pichia pastoris* based on stoichiometric balance. *J Biotechnol*, DOI: 10.1016/j.jbiotec.2003.08.003.
- Russmayer, H., Troyer, C., Neubauer, S. et al. 2015. Metabolomics sampling of *Pichia pastoris* revisited: Rapid filtration prevents metabolite loss during quenching. *FEMS Yeast Res*, DOI: 10.1093/femsyr/fov049.
- Schwarzahns, J.P., Luttermann, T., Wibberg, D. et al. 2017. A mitochondrial autonomously replicating sequence from *Pichia pastoris* for uniform high level recombinant protein production. *Front Microbiol*, DOI: 10.3389/fmicb.2017.00780.
- Sears, I.B., O'Connor, J., Rossanese, O.W. et al. 1998. A versatile set of vectors for constitutive and regulated gene expression in *Pichia pastoris*. *Yeast*, DOI:

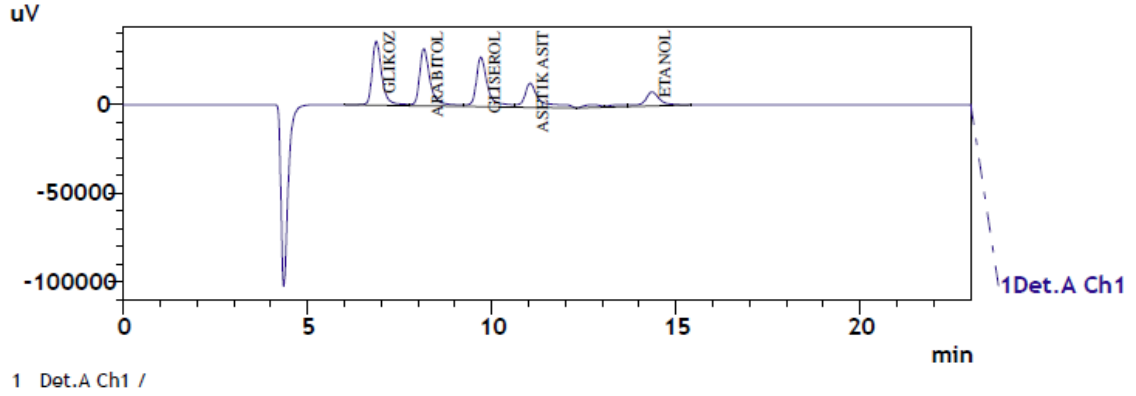
- 10.1002/(SICI)1097-0061(19980615)14:8<783::AID-YEA272>3.0.CO;2-Y.
- Seidler, N.W. 2013. Basic biology of *GAPDH*. *Adv Exp Med Biol*, 985, 1–36.
- Shang, T., Si, D., Zhang, D. et al. 2017. Enhancement of thermoalkaliphilic xylanase production by *Pichia pastoris* through novel fed-batch strategy in high cell-density fermentation. *BMC Biotechnol*, 17, 1–10.
- Shen, S., Sulter, G., Jeffries, T.W. et al. 1998. A strong nitrogen source-regulated promoter for controlled expression of foreign genes in the yeast *Pichia pastoris*. *Gene*, DOI: 10.1016/S0378-1119(98)00315-1.
- Sinha, J., Plantz, B.A., Zhang, W. et al. 2003. Improved production of recombinant ovine interferon- τ by Mut+strain of *Pichia pastoris* using an optimized methanol feed profile. *Biotechnol Prog*, DOI: 10.1021/bp025744q.
- Sirén, N., Weegar, J., Dahlbacka, J. et al. 2006. Production of recombinant HIV-1 Nef (negative factor) protein using *Pichia pastoris* and a low-temperature fed-batch strategy. *Biotechnol Appl Biochem*, 44, 151–8.
- Spohner, S.C., Müller, H., Quitmann, H. et al. 2015. Expression of enzymes for the usage in food and feed industry with *Pichia pastoris*. *J Biotechnol*, 202, 118–34.
- Stadlmayr, G., Mecklenbräuker, A., Rothmüller, M. et al. 2010. Identification and characterisation of novel *Pichia pastoris* promoters for heterologous protein production. *J Biotechnol*, DOI: 10.1016/j.jbiotec.2010.09.957.
- Tanaka, T., Yamada, R., Ogino, C. et al. 2012. Recent developments in yeast cell surface display toward extended applications in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol*, 95, 577–91.
- Tang, S., Boehme, L., Lam, H. et al. 2008. *Pichia pastoris* fermentation for phytase production using crude glycerol from biodiesel production as the sole carbon source. *Biochem Eng J*, DOI: 10.1016/j.bej.2008.09.020.
- Trentmann, O., Khatri, N.K., Hoffmann, F. 2004. Reduced oxygen supply increases process stability and product yield with recombinant *Pichia pastoris*. *Biotechnol Prog*, DOI: 10.1021/bp049711h.
- Trinh, L.B., Phue, J.N., Shiloach, J. 2003. Effect of methanol feeding strategies on production and yield of recombinant mouse endostatin from *Pichia pastoris*. *Biotechnol Bioeng*, 82, 438–44.
- Wang, L. 2014. Design and Implementation of a Real-time Adaptive Oxygen Transfer Rate Estimator. Dissertation, Clemson University, USA.
- Waterham, H.R., Digan, M.E., Koutz, P.J. et al. 1997. Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. *Gene*, DOI: 10.1016/S0378-1119(96)00675-0.
- Weinhandl, K., Winkler, M., Glieder, A. et al. 2014. Carbon source dependent promoters in yeasts. *Microb Cell Fact*, DOI: 10.1186/1475-2859-13-5.
- Wu, D., Hao, Y.Y., Chu, J. et al. 2008. Inhibition of degradation and aggregation of recombinant human consensus interferon- α mutant expressed in *Pichia pastoris* with complex medium in bioreactor. *Appl Microbiol Biotechnol*, 80, 1063–71.
- Wu, D., Yu, X.W., Wang, T.C. et al. 2011. High yield *Rhizopus chinenisis* prolipase production in *Pichia pastoris*: Impact of methanol concentration. *Biotechnol*

Bioprocess Eng, DOI: 10.1007/s12257-009-3021-4.

- Yamawaki, S., Matsumoto, T., Ohnishi, Y. et al. 2007. Production of Single-Chain Variable Fragment Antibody (scFv) in Fed-Batch and Continuous Culture of *Pichia pastoris* by Two Different Methanol Feeding Methods. *J Biosci Bioeng*, DOI: 10.1263/jbb.104.403.
- Yang, M., Teymorian, S., Olivares, P. et al. 2015. Extracellular expression of alkaline phytase in *Pichia pastoris*: Influence of signal peptides, promoters and growth medium. *Biotechnol Reports*, DOI: 10.1016/j.btre.2015.03.005.
- Yang, Z. and Zhang, Z. 2018. Engineering strategies for enhanced production of protein and bio-products in *Pichia pastoris*: A review. *Biotechnol Adv*, 36, 182–95.
- Zahrl, R.J., Peña, D.A., Mattanovich, D. et al. 2017. Systems biotechnology for protein production in *Pichia pastoris*. *FEMS Yeast Res*, DOI: 10.1093/femsyr/fox068.
- Zhang, A.L., Luo, J.X., Zhang, T.Y. et al. 2009. Recent advances on the *GAP* promoter derived expression system of *Pichia pastoris*. *Mol Biol Rep*, 36, 1611–9.
- Zhang, A.L., Zhang, T.Y., Luo, J.X. et al. 2007. Constitutive expression of human angiostatin in *Pichia pastoris* by high-density cell culture. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 34, 117–22.
- Zhang, W., Bevins, M.A., Plantz, B.A. et al. 2000a. Modeling *Pichia pastoris* Growth on Methanol and Optimizing the Production of a Recombinant Protein , the Heavy-Chain Fragment C of Botulinum Neurotoxin , Serotype A. *Papers in Biotechnology*, 18.
- Zhang, W., Inan, M., Meagher, M.M. 2000b. Fermentation strategies for recombinant protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnol Bioprocess Eng*, 5, 275–87.
- Zhang, W., Inan, M., Meagher, M.M. 2007. Rational design and optimization of fed-batch and continuous fermentations. *Methods Mol Biol*, DOI: 10.1385/1-59745-456-7:43.
- Zhang, W., Liu, C.P., Inan, M. et al. 2004. Optimization of cell density and dilution rate in *Pichia pastoris* continuous fermentations for production of recombinant proteins. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 31, 330–4.
- Zhang, W., Sinha, J., Smith, L.A. et al. 2005. Maximization of production of secreted recombinant proteins in *Pichia pastoris* fed-batch fermentation. *Biotechnol Prog*, DOI: 10.1021/bp049811n.
- Zhao, W., Wang, J., Deng, R. et al. 2008. Scale-up fermentation of recombinant *Candida rugosa* lipase expressed in *Pichia pastoris* using the *GAP* promoter. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 35, 189–95.

8. EKLER

8.1. Hücre dışı Metabolitlerin HPLC Analizi ile Tespit Edilmesinde Kullanılan 250 ppm Karışık Standart Spekturumu

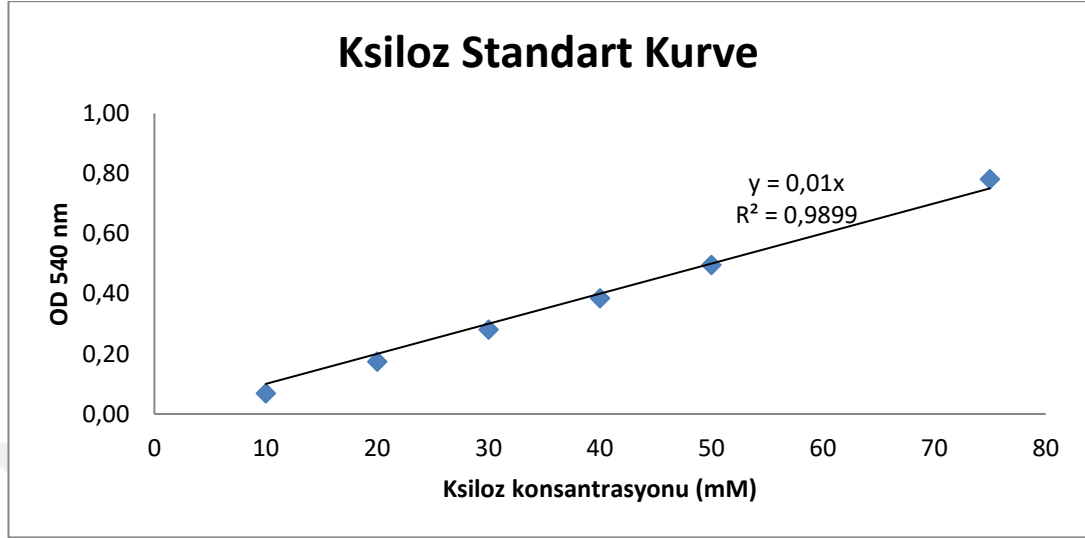


Elde Edilen Piklerin Tablosu

Detector A Ch1

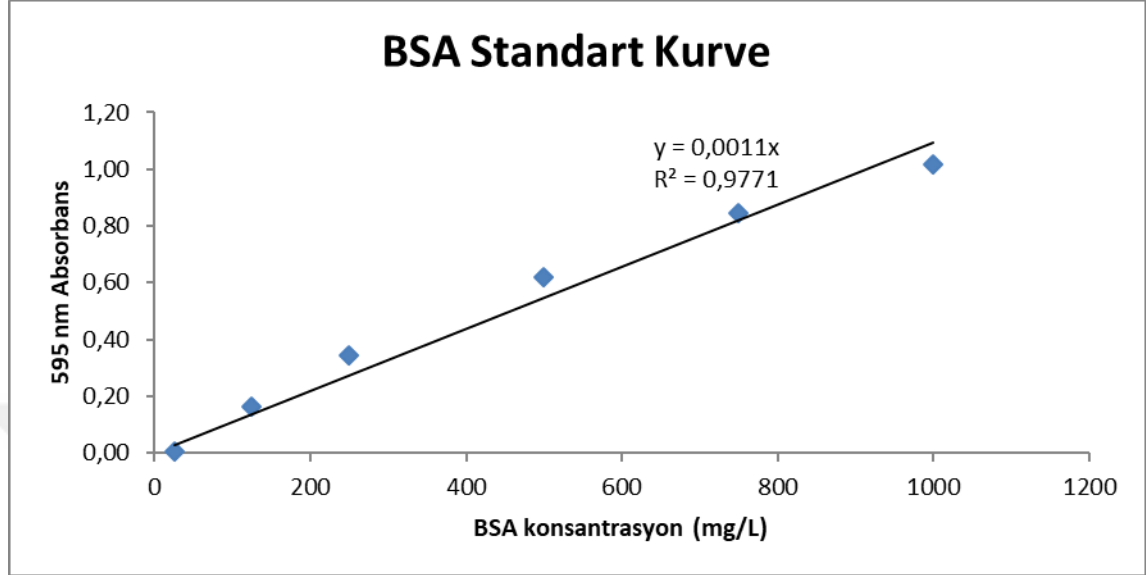
Peak#	Ret. Time	Name	Area	Height	Area %	Conc.
1	6.861	GLIKOZ	669997	36080	25.334	270.813
2	8.153	ARABITOL	657982	32214	24.880	273.431
3	9.702	GLISEROL	606209	27946	22.922	294.978
4	11.038	ASETİK ASİT	390997	13654	14.784	326.408
5	12.745		49339	1573	1.866	0.000
6	13.642		38222	1101	1.445	0.000
7	14.350	ETANOL	231925	8018	8.770	282.573
Total			2644671	120586	100.000	

8.2. Ksilanaz Enzim Aktivitesi Hesaplamasında Kullanılan Standart Kurve



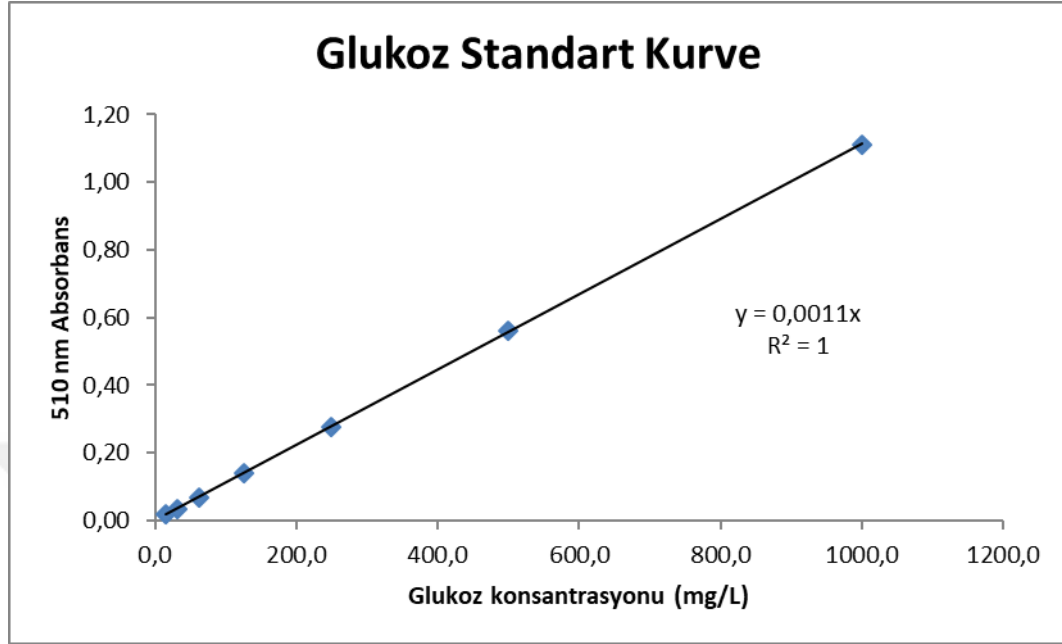
	540 nm Absorbans				
Xylose mM	1. ölçüm	2. ölçüm	3. ölçüm	ort	ss
0					
10	0,072	0,065	0,068	0,07	0,00
20	0,177	0,173	0,172	0,17	0,00
30	0,288	0,276	0,278	0,28	0,01
40	0,395	0,384	0,375	0,38	0,01
50	0,482	0,505	0,502	0,50	0,01
75	0,805	0,784	0,754	0,78	0,03

8.3. Toplam Protein Miktarının Hesaplanmasında Kullanılan Standart Protein (BSA) Kurvesi



BSA mg/L	595 nm Absorbans					
	1. ölçüm	2. ölçüm	3. ölçüm	ort	ss	düz. ort.
0	0,495	0,491	0,493	0,49		0,00
25	0,498	0,494	0,504	0,50	0,01	0,01
125	0,656	0,655	0,654	0,66	0,00	0,16
250	0,839	0,836	0,839	0,84	0,00	0,35
500	1,116	1,112	1,111	1,11	0,00	0,62
750	1,35	1,331	1,329	1,34	0,01	0,84

8.4. Artık Glukoz Miktarının Hesaplanmasında Kullanılan Standart Kurve



Glucose mg/L	1. ölçüm	2. ölçüm	3. ölçüm	ort	ss
15,6	0,019	0,018	0,02	0,02	0,00
31,3	0,031	0,035	0,036	0,03	0,00
62,5	0,07	0,069	0,068	0,07	0,00
125	0,14	0,139	0,137	0,14	0,00
250	0,277	0,279	0,279	0,28	0,00
500	0,564	0,563	0,56	0,56	0,00
1000	1,117	1,104	1,111	1,11	0,01

ÖZGEÇMİŞ

Semiramis YILMAZ
sgeredeli@yahoo.com



ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Doktora 2013-2018	Akdeniz Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Antalya
Yüksek Lisans 2011-2013	Akdeniz Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Antalya
Lisans 1992-1997	Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara

ESERLER

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

- 1- Türkanoglu Özçelik A., **Yılmaz S.**, Gökboro S., İnan M. 2019. A quantitative polymerase chain reaction assay for the detection of equine (horse and donkey)-originated meat in processed bovine meat products. *Food Science and Technology International*, 25, pp.38-46
- 2- Anlı, R. E.; Vural, N.; **Yılmaz, S.**; Vural, I.H. 2004. The Determination of biogenic amines in Turkish red wines. *J Food Comp Anal*, 17, 53-62

Kitap bölümleri

- 1- Özçelik A., **Yılmaz S.**, İnan M., *in press*. *Pichia pastoris* Promoters. In: Methods Molecular Biology, Vol. 1923, Gasser B. and Mattanovich D. (Eds.), Recombinant Protein Production in Yeasts. Springer Nature.
- 2- İnan M., **Yılmaz, S.**, Karaoğlu M., Erden F., 2015. Mikrobiyal Fizyoloji (Kısım 1 çeviri). In: Turhan İ. (Ed.), Endüstriyel Mikrobiyolojiye Giriş. Palme Yayıncılık A.Ş., ANKARA

Diğer dergilerde yayınlanan makaleler

- 1- Türkanoglu Özçelik A., Torun A., **Yılmaz S.**, İnan M. 2018. İnsan İnsülin Hormonu Öncülerinin *Pichia pastoris* AOX1 Promotoru Altında Klonlanması, Ekspresyonu ve Biyoreaktörde Üretimi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, vol.22, pp.1190-1196
- 2- **Geredeli, S.**, Anlı, R.E. 2005. Şaraptaki Laktik Asit Bakterilerinin Malolaktik Fermantasyondaki Önemleri. *Or-Lab. Online Mikrobiyoloji Dergisi*, 03,01, 1-14

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

- 1- Gökbora S., **Yılmaz S.**, Türkanoglu Özçelik A., İnan M. Development of a multiplex real-time quantitative PCR assay (Q-PCR) for detection of equine meat in processed meat products. *International Agricultural, Biological and Life Science Conference*, Edirne, Türkiye, 2-5 Eylül 2018, p. 750
- 2- Özçelik A., **Yılmaz S.**, İnan M. Cloning and expression of recombinant human insulin precursor in yeast. 2. *International Conference on Advances in Natural and Applied Sciences*, Antalya, Türkiye, 18-21 Nisan 2017, p.319
- 3- Özçelik A., Torun A., **Yılmaz S.**, İnan M. *Pichia Pastoris*'te Rekombinant İnsan İnsülin Hormonu Öncüleri Üretimi. 5. *Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi*, Konya, Türkiye, 18-21 Temmuz 2016, p. 7
- 4- **Yılmaz S.**, Yıldız H., İnan M. Molecular and Functional Characterization of *Pichia pastoris* MIG1 and MIG2 Genes. 20. *International Biomedical Science and Technology Symposium* (BiyoMed2014), Köyceğiz, Muğla, 24-27 Ağustos 2014, p. 32.