

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Vitreoscilla* HEMOGLOBİN EKSPRASYONU YAPAN
REKOMBİNANT *Erwinia herbicola*'da İKİNCİL METABOLİT AKIŞ
DAĞILIMI**

ASLI GİRAY KURT

DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

MALATYA
Temmuz 2012

Tezin Başlığı: *Vitreoscilla* Hemogloblin Ekspresyonu Yapan Rekombinant *Erwinia herbicola*'da İkincil Metabolit Akış Dağılımı

Tezi Hazırlayan: Aslı GİRAY KURT

Sınav Tarihi: 06.07.2012

Yukarıda adı geçen tez jürimizce değerlendirilerek Biyoloji Anabilim Dalında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Sınav Jürisi Üyeleri

Prof.Dr. İsmet YILMAZ (Jüri Başkanı)	(İnönü Üniv.)	_____
Prof. Dr. Hikmet GEÇKİL (Danışman)	(İnönü Üniv.)	_____
Doç. Dr. Dilek ASMA (Üye)	(İnönü Üniv.)	_____
Doç. Dr. Süleyman AYDIN (Üye)	(Fırat Üniv.)	_____
Yrd. Doç. Dr. Hüseyin KAHRAMAN (Üye)	(İnönü Üniv.)	_____
Doç. Dr. Burhan ATEŞ (İkinci Danışman)	(İnönü Üniv.)	_____

İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Onayı

Prof. Dr. Asım KÜNKÜL
Enstitü Müdürü

Sevgili eşim Yakup ve biricik kızım Asya Sare'me...

Onur Sözü

Doktora tezi olarak sunduğum "***Vitreoscilla* Hemoglobin Ekspresyonu Yapan Rekombinant *Erwinia herbicola*'da İkincil Metabolit Akış Dağılımı**" başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığını ve yararlandığım bütün kaynakların, hem metin içinde hem de kaynakça yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunun onurumla doğrularım.

Aslı GİRAY KURT

ÖZET

Doktora Tezi

Vitreoscilla HEMOGLOBİN EKSPRASYONU YAPAN REKOMBİNANT *Erwinia herbicola*’da İKİNCİL METABOLİT AKIŞ DAĞILIMI

Aslı GİRAY KURT

İnönü Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

144 + xi sayfa
2012

Danışman: Prof. Dr. Hikmet GEÇKİL

İkinci danışman: Doç. Dr. Burhan ATEŞ

Bu çalışmada, *Erwinia herbicola* ve onun *Vitreoscilla* hemoglobin geni (*vgb*) klonlanmış suşu (*vgb*⁺) ile *vgb* içermeyen (*vgb*⁻) rekombinant suşları kullanılmıştır. *Vitreoscilla* hemoglobinin (VHb) *E. herbicola*’da indol-3-asetik asit, β-karoten, likopen, C vitamini, fenazin, meropenem, ATP ve NAD üretimi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. *E. herbicola*’da bu şekilde endojen rekombinant bir oksijen alım sisteminin bu metabolitlerin üretimi üzerindeki etkisi ilk defa çalışılmıştır.

Diğer iki suşla karşılaştırıldığında, *vgb*⁺ rekombinant suşunun düşük konsantrasyonda L-triptofan eklenen zengin kültür ortamının ileri kültür fazı ile yüksek glukozlu M9 ortamında önemli derecede yüksek indol-3-asetik asit seviyesine sahip olduğu belirlendi. Yine bu suşun diğer suşlara göre zengin besiyerinde daha yüksek β-karoten ve likopen seviyesine sahip olduğu gözlemlendi. VHb’nin C vitamini üretimini hem glukozlu M9 ortamı ve hem de zengin besiyerinde pozitif yönde etkilediği saptanırken, fenazin üretiminin fruktoz ortamında ve meropenem üretiminin ise sükroz ortamında VHb varlığından pozitif yönde etkilendiği belirlendi. Ayrıca, rekombinant suşların konakçıdan önemli derecede yüksek oksijen alımına sahip oldukları belirlendi. Zengin besiyerinde *vgb*⁺ suşunun hem ATP hem de NAD düzeyleri konakçı ve *vgb*⁻ rekombinantından daha yüksek bulundu.

ANAHTAR KELİMELELER: *Vitreoscilla* hemoglobini, *Erwinia herbicola*, ikincil metabolitler, IAA, β-karoten, likopen, C vitamini, fenazin, karbapenem

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

SECONDARY METABOLITE FLUX DISTRIBUTION IN *Erwinia herbicola* EXPRESSING *Vitreoscilla* HEMOGLOBIN

Aslı GİRAY KURT

Inonu University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

144 + xi pp
2012

Advisor: Hikmet GEÇKİL, Professor

Co-Advisor: Burhan ATEŞ, Assoc. Prof.

In this study *Erwinia herbicola* and its recombinants, one carrying the *Vitreoscilla* hemoglobin gene (*vgb*⁺) and the other missing it (*vgb*⁻), were used in a comparative fashion with respect to production of selected secondary metabolites. In this regard, this study is the first for investigation of the effect of such an endogenous recombinant oxygen-uptake system on microbial production of secondary metabolites as indol-3-asetik asit, β -caroten, lycopene, vitamin C, phenazine, meropenem whose production are tightly regulated by oxygen. Further, the energetic state of bacteria were evaluated through the level of ATP and NAD.

Compared to other two strains, the level of indol-3-asetik asit in the low L-tryptophan rich medium late phase *vgb*⁺ cultures was considerably high. Similarly, the level of this hormone in high glucose minimal medium cultures of *vgb*⁺ was higher than the host and *vgb*⁻ strains. The rich medium cultures of *vgb*⁺ recombinant strain had also considerably higher levels of β -carotene and lycopene. The *vgb*⁺ strain was also determined to have a higher level of vitamin C both in rich and glucose supplemented minimal media cultures. The presence of *vgb* was also determined to positively regulate the production of two antibiotics, phenazine and meropenem, under different carbon supply. The highest phenazine and meropenem levels were achieved with fructose and sucrose, respectively. Also, the recombinants had considerably higher oxygen uptake rates than the host strain. The levels of both ATP and NAD in rich cultures of *vgb*⁺ recombinant were higher than the host and *vgb*⁻ recombinant.

KEY WORDS: *Vitreoscilla* hemoglobin, *Erwinia herbicola*, IAA, secondary metabolites, β -carotene, lycopene, vitamin C, phenazine, carbapenem,

TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın yürütülmesinde bütün bölüm imkânlarından faydalanmamı sağlayan Biyoloji Bölüm Başkanlığı'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Tezimin her aşamasında yardımını, önerilerini ve desteğini esirgemedi beni yönlendiren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Hikmet GEÇKİL'e ve eş danışmanım Doç. Dr. Burhan ATEŞ'e;

Transmisyon Elektron Mikroskopu Ünitesi (TEM)'deki çalışmalarım esnasında desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Ali OTLU ve Doç. Dr. Mehmet GÜL'e; laboratuvar imkanları ile bana destek sağlayan Doç. Dr. Barış OTLU'ya;

İnönü Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Merkezi (İBTAM)'ndeki HPLC laboratuvarında çalışmalarımın sağlıklı bir şekilde yürütülmesinde bana yardımcı olan Uzm. Onur ÖZGÜL'e; Fırat Üniversitesi Kimya Bölümü HPLC laboratuvar imkanlarını kullanmamı sağlayan Doç. Dr. Mustafa KARATEPE'ye ve Sibel SELÇUK'a;

Doktoraya başladığım andan itibaren her türlü yardımını, desteğini ve anlayışını esirgemeyen sevgili arkadaşım Emel AYTAN'a ve laboratuvar arkadaşlarım Özgür YILMAZ ile Duygu ÖZCAN'a teşekkür ederim. Ayrıca benden desteklerini esirgemeyen ve bugüne gelmemi sağlayan canım aileme, beni hiç yalnız bırakmayan sevgili eşim Yakup'a ve ilham kaynağım biricik kızım Asya Sare'me sonsuz teşekkür ederim.

2011/10 nolu proje kapsamında bu çalışmayı destekleyen İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. <i>Erwinia herbicola</i>	3
1.2. İndol-3-asetik asit (IAA).....	5
1.2.1. İndol-3-asetamid (IAM) yolu.....	8
1.2.1.1. İndol-3-pirüvat (IPyA) yolu.....	8
1.3. Beta-karoten ve Likopen.....	9
1.3.1. Karotenoidlerin Biyosentezi.....	11
1.4. C Vitamini.....	13
1.5. <i>Erwinia herbicola</i> 'da Antibiyotik Üretimi.....	16
1.5.1. Fenazinler.....	17
1.5.2. Karbapenemler.....	22
1.5.2.1 <i>Erwinia herbicola</i> 'da Karbapenem Üretimi.....	24
1.6. Hücresel Enerjetik.....	25
1.6.1. ATP (Adenozin trifosfat)	25
1.6.2. NAD (Nikotinamid Adenin Dinükleotid).....	27
1.7. <i>Vitreoscilla</i> Hemoglobini (VHb)	29
1.7.1. VHb fonksiyonunun Mekanizmaları.....	32
1.7.2. VHb Metabolik Mühendislikteki Uygulamaları.....	35
2. KAYNAK ÖZETLERİ	39
3. MATERYAL VE YÖNTEM	46
3.1. Araştırmada Kullanılan Kimyasallar ve Ayıraçlar.....	46
3.2. Kullanılan Bakteriler.....	47
3.3. Bakterileri Stoklarının Hazırlanması.....	48
3.4. <i>vgb</i> Klonları.....	48
3.5. <i>E. herbicola</i> 'nın genetik manipülasyonu.....	49

3.5.1.	Plazmid izolasyonu için bakterilerin kültürü.....	49
3.5.2.	Plazmid izolasyonu.....	50
3.5.3	Plazmid miniprepleri.....	51
3.6.	<i>E. herbicola</i> ’daki Doğal (megadalton) Plazmid İzolasyonu.....	53
3.6.1.	<i>E. herbicola</i> ’daki Doğal Plazmidlerin Jel Elektroforezi.....	54
3.7.	Kültür Ortamındaki Toplam Biomas ve Canlı Hücre Sayısının Belirlenmesi..	55
3.8.	Bakterilerin Oksijen Alımı.....	56
3.9.	IAA Üretimi.....	57
3.9.1.	Bakteri Kültürlerinin Hazırlanması.....	57
3.9.2.	Kültür Supernatantlarının Saklanması.....	57
3.9.3.	IAA Tayini.....	58
3.10.	β -karoten, Likopen ve C Vitamini Üretimi.....	58
3.10.1	β -karoten ve Likopen Tayini İçin Ekstratların Hazırlanması.....	59
3.10.2	C Vitamini Tayini İçin Ekstratlarının Hazırlanması.....	60
3.10.3	β -karoten, Likopen ve C Vitaminin HPLC ile Analizi.....	60
3.11.	Fenazin Üretimi ve Tayini.....	62
3.11.1.	Fenazin Tayini İçin Ekstratların Hazırlanması.....	62
3.11.2.	Fenazinin HPLC ile Analizi.....	64
3.12.	Meropenem Üretimi ve Tayini.....	64
3.12.1	Meropenemin HPLC ile Analizi.....	65
3.13.	ATP Tayini.....	66
3.13.1	ATP’nin HPLC ile Analizi.....	66
3.14.	NAD ⁺ (Nikotinamid Adenin Dinükleotid) Tayini.....	67
3.14.1	NAD ⁺ ’ın HPLC ile Analizi.....	67
3.15	Bakterilerin TEM (Transmisyon Elektron Mikroskobu) Görüntüleri.....	69
4.	ARAŞTIRMA BULGULARI	70
4.1.	LB Kültürlerinde IAA Üretimi.....	70
4.2.	M9 Kültürlerinde IAA Üretimi.....	79
4.3.	LB Kültürlerinde β -karoten Üretimi.....	78
4.4.	M9 Kültürlerinde β -karoten Üretimi.....	79
4.5.	LB Kültürlerinde Likopen Üretimi.....	81
4.6.	M9 Kültürlerinde Likopen Üretimi.....	82
4.7.	LB Kültürlerinde C Vitamini Üretimi.....	84
4.8.	M9 Kültürlerinde C Vitamini Üretimi.....	85

4.9.	LB Kùltürlerinde Fenazin Üretimi.....	89
4.10.	M9 Kùltürlerinde Fenazin Üretimi.....	90
4.11	LB Kùltürlerinde Karbapenem Üretimi.....	92
4.12	M9 Kùltürlerinde Karbapenem Üretimi.....	94
4.13	LB Kùltürlerinde ATP ve NAD Üretimi.....	98
4.14	M9 Kùltürlerinde ATP ve NAD Üretimi.....	102
4.15	Bakterilerin Oksijen Tüketim Karakteristikleri.....	107
4.16	Farklı Kùltür Ortamlarındaki Bakterilerin Morfolojik Görünümleri.....	108
4.17	LB Kùltüründe Üretilen Bakterilerin TEM Görüntüleri.....	113
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ	115
5.1	IAA Üretimi.....	116
5.2	β -karoten Üretimi.....	117
5.3	Likopen Üretimi.....	118
5.4	C Vitamini Üretimi.....	119
5.5	Fenazin Üretimi.....	120
5.6	Karbapenem Üretimi.....	121
5.7	ATP ve NAD ⁺ Seviyeleri.....	124
5.8	Bakterilerin Oksijen Tüketim Karakteristikleri.....	126
6.	KAYNAKLAR	129
	ÖZGEÇMİŞ	142

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	<i>Erwinia herbicola</i> 'nın taksonomik konumu.....	4
Şekil 1.2.	İndol-3-Asetik Asit.....	5
Şekil 1.3.	Fitohormonlar, quorum sensing (QS) ve Hrp genleri arasındaki ilişki ve onların gal oluşumu ve epifitik uyum üzerindeki etkileri.....	7
Şekil 1.4 .	Bakterilerdeki IAA sentezi için farklı biyosentetik yollar. IAAld, indol-3-asetaldehit; IAM, indol-3-asetamid; IPDC, indol-3-pirüvat dekarboksilaz; Trp, triptofan.....	7
Şekil 1.5.	AA'nın IPyA ve IAM metabolik yolu: IaaM, triptofan-2-monooksijenaz; IaaH, indol-3-asetamid hidrolaz; IpdC, indol-3-pirüvat dekarboksilaz.....	9
Şekil 1.6.	Karotenoidlerin Biyosentezi (1).....	12
Şekil 1.7.	Karotenoidlerin Biyosentezi (2).....	13
Şekil 1.8.	Klasik Reichstein yöntemi ile L-askorbik asit biyosentezi.....	15
Şekil 1.9.	Fenazinin yapısal türevleri.....	19
Şekil 1.10.	Fenazin biyosentezi.....	21
Şekil 1.11.	Meropenem.....	24
Şekil 1.12.	N-(3-oksoheksanol)-L-homoserine lakton (OHHL) yapısı....	24
Şekil 1.13.	Adenozin trifosfat (ATP) yapısı.....	26
Şekil 1.14.	NAD ⁺ yapısı.....	27
Şekil 1.15.	NAD'ın hücre metabolizması ve fizyolojisindeki rolü	28
Şekil 1.16.	NAD metabolizması, dört farklı öncülünden NAD biyosentezi: nikotinamid, nikotinic asit, triptofan ve nikotinamid ribozid.....	29
Şekil 1.17.	VHb'nin yapısı.....	30
Şekil 1.18.	<i>E. coli</i> transkripsiyon sistemi tarafından tanınan <i>vgb</i> promotörü.....	31
Şekil 1.19.	<i>Vitreoscilla</i> hemoglobini (VHb) ve onun promotörünün potansiyel uygulamaları.....	32
Şekil 1.20.	Düşük oksijen yoğunluğunda <i>Vitreoscilla</i> hemoglobinin rolü.....	33
Şekil 1.21.	VHb ve OxyR arasındaki ilişki.....	34
Şekil 3.1.	pUC8 ve pUC8:15 plazmidlerinin fiziki haritası.....	49
Şekil 3.2.	HindIII ile kesilmiş λ (1), <i>E. herbicola</i> [pUC8] plazmidi (3) ve <i>E. herbicola</i> [pUC8:15] plazmidinin (4) agaroz jeldeki restriksiyon fragmanları.....	53
Şekil 3.3.	HindIII ile kesilmiş λ (1), <i>E. herbicola</i> doğal plazmidinin (2,3,4) agaroz jeldeki restriksiyon fragmanları.....	55
Şekil 4.1.	LB ortamında IAA üretimi.....	71
Şekil 4.2.	Triptofan destekli (% 0.1) LB ortamında IAA üretimi.....	72
Şekil 4.3.	Triptofan destekli (% 0.5) LB ortamında IAA üretimi.....	73
Şekil 4.4.	Glukoz destekli M9 ortamında 24 saat kültürlerinde IAA üretimi.....	75

Şekil 4.5.	Fruktoz destekli M9 ortamında 24 saat kültürlerinde IAA üretimi.....	76
Şekil 4.6.	Sükroz destekli M9 ortamında 24 saat kültürlerinde IAA üretimi.....	77
Şekil 4.7.	LB ortamında β -karoten üretimi.....	78
Şekil 4.8.	β -karoten için HPLC kromatogramı.....	78
Şekil 4.9.	Glukoz destekli M9 ortamında 24 saat kültürlerinde β -karoten üretimi.....	79
Şekil 4.10.	Fruktoz destekli M9 ortamında 24 saat kültürlerinde β -karoten üretimi.....	80
Şekil 4.11.	Sükroz destekli M9 ortamında 24 saat kültürlerinde β -karoten üretimi.....	80
Şekil 4.12.	LB ortamında likopen üretimi.....	81
Şekil 4.13.	Likopen için HPLC kromatogramı.....	81
Şekil 4.14	Glukoz destekli M9 ortamında 24 saat kültürlerinde likopen üretimi.....	82
Şekil 4.15	Fruktoz destekli M9 ortamında 24 saat kültürlerinde likopen üretimi.....	83
Şekil 4.16	Sükroz destekli M9 ortamında 24 saat kültürlerinde likopen üretimi.....	83
Şekil 4.17	LB ortamında C vitamini üretimi.....	84
Şekil 4.18	C vitamini için HPLC kromatogramı.....	85
Şekil 4.19	Glukoz destekli M9 ortamında 24 saat kültürlerinde C vitamini üretimi.....	86
Şekil 4.20	Fruktoz destekli M9 ortamında 24 saat kültürlerinde C vitamini üretimi.....	87
Şekil 4.21	Sükroz destekli M9 ortamında 24 saat kültürlerinde C vitamini üretimi.....	88
Şekil 4.22	Fenazin eklenmiş numune standardı (alttaki pik) ve örnekteki fenazinin aynı yerde pik veren (üstteki pik) HPLC diyagramı.....	89
Şekil 4.23	LB ortamında fenazin üretimi.....	90
Şekil 4.24	Glukoz destekli M9 ortamında 24 saat kültürlerinde fenazin üretimi.....	91
Şekil 4.25	Fruktoz destekli M9 ortamında 24 saat kültürlerinde fenazin üretimi.....	91
Şekil 4.26	Sükroz destekli M9 ortamında 24 saat kültürlerinde fenazin üretimi.....	92
Şekil 4.27	Meropenem standardı (alttaki pik) ve örnekteki meropenem aynı yerde pik veren (üstteki pik) HPLC diyagramı.....	93
Şekil 4.28	LB ortamında üretilen meropenem üretimi.....	93
Şekil 4.29	Glukoz destekli M9 ortamında 24 saat kültürlerinde meropenem üretimi.....	95
Şekil 4.30	Fruktoz destekli M9 ortamında 24 saat kültürlerinde meropenem üretimi.....	95
Şekil 4.31	Sükroz destekli M9 ortamında 24 saat kültürlerinde meropenem üretimi.....	96
Şekil 4.32	LB ortamında 37°C'deki ATP (a) ve NAD (b) ile 30°C'deki ATP (c) ve NAD (d) üretimi.....	100

Şekil 4.33	ATP için HPLC kromatogramı.....	101
Şekil 4.34	NAD için HPLC kromatogramı.....	101
Şekil 4.35	Glukoz destekli M9 ortamında 30°C ve 37°C’de 24 saatteki ATP (a) NAD üretimi (b).....	103
Şekil 4.36	Fruktoz destekli M9 ortamında 30°C ve 37°C’de 24 saatteki ATP (a) NAD üretimi (b).....	104
Şekil 4.37	Sükroz destekli M9 ortamında 30°C ve 37°C’de 24 saatteki ATP (a) NAD üretimi (b).....	106
Şekil 4.38	LB ortamında değişik kültür fazlarında oksijen alımı.....	107
Şekil 4.39	LB ortamında kültürü yapılan <i>E. herbicola</i> -yabanıl (a), <i>E. herbicola</i> [pUC8] (b) ve <i>E. herbicola</i> [pUC8:15] (c)’nin morfolojik görünüşleri.....	109
Şekil 4.40	% 0.1 glukoz + M9 ortamında <i>E. herbicola</i> -yabanıl (a), <i>E. herbicola</i> [pUC8] (b) ve <i>E. herbicola</i> [pUC8:15] (c)’nin morfolojik görünüşleri.....	109
Şekil 4.41	% 1 glukoz + M9 ortamında <i>E. herbicola</i> -yabanıl (a), <i>E. herbicola</i> [pUC8] (b) ve <i>E. herbicola</i> [pUC8:15] (c)’nin morfolojik görünüşleri.....	110
Şekil 4.42	% 0.1 fruktoz + M9 ortamında <i>E. herbicola</i> -yabanıl (a), <i>E. herbicola</i> [pUC8] (b) ve <i>E. herbicola</i> [pUC8:15] (c)’nin morfolojik görünüşleri.....	110
Şekil 4.43	% 1 fruktoz + M9 ortamında <i>E. herbicola</i> -yabanıl (a), <i>E. herbicola</i> [pUC8] (b) ve <i>E. herbicola</i> [pUC8:15] (c)’nin morfolojik görünüşleri.....	111
Şekil 4.44	% 0.1 sükroz + M9 ortamında <i>E. herbicola</i> -yabanıl (a), <i>E. herbicola</i> [pUC8] (b) ve <i>E. herbicola</i> [pUC8:15] (c)’nin morfolojik görünüşleri.....	111
Şekil 4.45	% 1 sükroz + M9 ortamında <i>E. herbicola</i> -yabanıl (a), <i>E. herbicola</i> [pUC8] (b) ve <i>E. herbicola</i> [pUC8:15] (c)’nin morfolojik görünüşleri.....	112
Şekil 4.46	<i>E. herbicola</i> (a), Eh[pUC8] (b) ve Eh[pUC8:15] suşunun (c) TEM görüntüleri (10,000 büyütme).....	113
Şekil 4.47	<i>E. herbicola</i> (a), Eh[pUC8] (b) ve Eh[pUC8:15] suşunun (c) TEM görüntüleri (63,000 büyütme).....	114

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1	VHb'nin metabolik mühendislikteki uygulamaları.....	36
Çizelge 1.2	Biyoremidasyonda vgb/VHb teknolojisinin son uygulamaları.....	37
Çizelge 1.4	Antibiyotik üretiminde vgb/VHb teknolojisinin son uygulamalar.	37
Çizelge 1.5	Polimer üretiminde vgb/VHb teknolojisinin son uygulamaları.....	37
Çizelge 1.6	Çeşitli biyokimyasal üretiminde vgb/VHb teknolojisi.....	37
Çizelge 1.7	Yüksek bitkilerde strese toleranslık, üretim, çimlenme.....	37
Çizelge 3.1	Luria-Bertani (LB) Besiyerinin İçeriği (g L ⁻¹).....	47
Çizelge 3.2	M9 Besiyerinin İçeriği (g L ⁻¹).....	47
Çizelge 3.3	β-karoten ve Likopen tayini için HPLC cihazı analiz parametreleri.....	61
Çizelge 3.4	Vitamin C tayini için HPLC cihazı analiz parametreleri.....	62
Çizelge 3.5	Fenazin tayini için HPLC cihazı analiz parametreleri.....	64
Çizelge 3.6	Meropenem tayini için HPLC analiz parametreleri.....	65
Çizelge 3.7	ATP tayini için HPLC cihazı analiz parametreleri.....	67
Çizelge 3.8	NAD tayini için HPLC cihazı analiz parametreleri.....	68
Çizelge 4.1	LB ortamında canlı hücre sayısı ve pH değişimi.....	71
Çizelge 4.2	Triptofan (% 0.1) destekli LB ortamında canlı hücre sayısı ve pH değişimi.....	72
Çizelge 4.3	Triptofan (% 0.5) destekli LB ortamında canlı hücre sayısı ve pH değişimi.....	74
Çizelge 4.4	Glukozla desteklenmiş M9 ortamında 24 saat kültürlerinde canlı hücre sayısı ve ortam asiditesindeki değişim	75
Çizelge 4.5	Fruktozla desteklenmiş M9 ortamında 24 saat kültürlerinde canlı hücre sayısı ve ortam asiditesindeki değişim	76
Çizelge 4.6	Sükrozla desteklenmiş M9 ortamında 24 saat kültürlerinde canlı hücre sayısı ve ortam asiditesindeki değişim	77
Çizelge 4.7	LB ortamında canlı hücre sayısı ve pH değişimi.....	85
Çizelge 4.8	Glukozla desteklenmiş M9 ortamında 24 saat kültürlerinde canlı hücre sayısı ve ortam asiditesindeki değişim	86
Çizelge 4.9	Fruktozla desteklenmiş M9 ortamında 24 saat kültürlerinde canlı hücre sayısı ve ortam asiditesindeki değişim	87
Çizelge 4.10	Sükrozla desteklenmiş M9 ortamında 24 saat kültürlerinde canlı hücre sayısı ve ortam asiditesindeki değişim	88
Çizelge 4.11	LB ortamında canlı hücre sayısı ve pH değişimi.....	94
Çizelge 4.12	M9 ortamında canlı hücre sayısı ve pH değişimi (% 0.1)	97
Çizelge 4.13	M9 ortamında canlı hücre sayısı ve pH değişim (% 1).....	97
Çizelge 4.14	Değişik kültür fazlarındaki oksijen alımında LB ortamında <i>E. herbicola</i> ve vgb ⁺ ile vgb ⁻ rekombinantlarının kültürlerinde biyokütle oluşumu, canlı hücre sayısı ve pH değişimi.....	108
Çizelge 5.1.	<i>E. herbicola</i> 'da vgb/VHb'nin metabolit üretmi üzerine etkisi.....	128

SİMGELER VE KISALTMALAR

IAA	İndol-3-asetik asit
OHHL	<i>N</i> -(3- oksohekzanol)-L-homoserin lakton
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotid
ATP	Adenozin trifosfat
CRP	cAMP reseptör protein
L-DOPA	3,4- dihidroksi fenil alanin
TPL	Tirozin fenol liyaz
HPLC	Yüksek basınçlı (performanslı) sıvı kromatografisi
<i>vgb</i>	Bakteriyel hemoglobini sentezleyen gen
VHb	<i>Vitreosilla</i> hemoglobin
IAM	İndol-3-asetamid
Mb	Miyoglobin
LB	Luria-Bertani
M9	Minimal ortam
mM	Milimolar
μ M	Mikromolar
g	Gram
mg	Miligram
μ g	Mikrogram
μ l	Mikrolitre
mL	Mililitre
rpm	Dakikada dönme hızı

1. GİRİŞ

Biyosferimizi oluşturan tüm canlılar arasında sayı, çeşit ve kütle olarak en fazla bulunan canlılar bakteriler olup, bazı araştırmalara göre dünyamızda 10^7 – 10^9 kadar farklı bakteri türü bulunmaktadır. Bu rakamlar dünyamızdaki tüm canlı türlerinden daha büyüktür. Her ne kadar küçük organizmalar olsalar da (1 bakterinin ağırlığı $\approx 10^{-12}$ g), yer küremizdeki (kara, su ve hava) toplam sayısı 5×10^{30} olarak tahmin edilen bakteriler ağırlık olarak dünyadaki tüm bitkilerin yaklaşık 2, tüm hayvanların ise 10 katını oluştururlar [1-3]. Bakteriler tüm canlılar içerisinde en yüksek çoğalma oranı ve en düşük jenerasyon sürelerine sahip olmaları ve logaritmik bir çoğalma (2^n) göstermelerinden dolayı uygun besi ortamlarında büyük kütlelere ulaşabilirler. Mikro boyutlardaki bakteri, fungus gibi organizmaların gelecekte insan sağlığından tarıma, çevre korumadan enerjiye birçok sektörde makro ölçeklerde uygulama bulacakları düşünülmektedir. Her ne kadar mikrobiyal biyoteknoloji günümüzde ilaçtan yakıta birçok maddenin önemli miktarlarda üretilmesine imkân tanısa da, bu yönelimin artarak devam edeceği sanılmaktadır.

Günümüzde “omics” teknolojileri kullanılarak çeşitli seviyelerde biyolojik veriler detaylı olarak ortaya konulabilmektedir. Genetik ve çevresel faktörler hücrelerin metabolik akış dağılımlarının nasıl ve ne yönde olacağını belirler [4]. Son yıllarda yaygın olarak kullanılmaya başlanılan “*metabolomik*” terimi, belli zaman ve ortamda organizmadaki veya hücredeki metabolik olayların bir bütün olarak nasıl etkilendiğini ifade etmek için ortaya atılmıştır. Bu bağlamda, birçok mikroorganizmanın (ör., 2010 itibarı ile yaklaşık 1000 bakterinin) komple genom dizi bilgisinin aydınlatılmış olması, metabolit akış şemalarının ayrıntılı olarak oluşturulmasında önemli katkı sağlamıştır. Ayrıca, analitik teknolojilerdeki son gelişmeler hücre içi ve hücre dışı metabolit seviyelerinin kapsamlı bir şekilde ölçülebilmesini mümkün kılmıştır [5]. Özellikle hücre dışı metabolitlerin belirlenmesi, karakterizasyonu ve kantitasyonunu mümkün kılan yaratıcı yaklaşımlarla hücrenin kendisine zarar verilmeden birçok canlıının metabolizması konusunda önemli bilgiler elde edilebilmektedir [6]. Bütün bunlar, çeşitli mikrobiyal ve ökaryotik mikroorganizmaların genom ölçekli metabolik ağlarının oluşturulmasına imkân tanımaktadır [7]. Bir hücre tarafından metabolitlerin salgılanması, o hücrenin internal metabolik durumunu yansıtır. Diğer bir deyimle,

genetik ve çevre şartlarındaki farklılıklara bağlı olarak metabolik akış şemalarında önemli dalgalanmalar ortaya çıkar [5].

Mikrobiyal ikincil metabolitler düşük moleküler ağırlıklı ürünler olup, mikroorganizmanın büyüme ve çoğalması için esas olmasalar da insan sağlığında önemli rolleri bulunmaktadır. Antibiyotikler, antitümör ajanlar, kolesterol düşürücü ilaçlar bu çeşit ürünler arasında sayılabilirler. Bu metabolitler olağandışı yapılara sahip olup genellikle üretici mikroorganizmanın geç büyüme fazında (idiofaz) sentezlenirler. Her ne kadar ikincil metabolizmanın doğası genetik temelli ise de, bu metabolizmanın ürünlerinin sentezi çevresel değişkenlerden önemli derecede etkilenir. Diğer bir deyimle, ikincil metabolitlerin sentezinde kültür için kullanılan besin karakteri ve atmosferik şartlar önemli rol oynar. İkincil metabolizmanın genellikle bir besin kıtlığı ve bunu takiben oluşan hücre büyüme ve çoğalmasındaki düşüşten kaynaklandığı bilinmektedir [8]. Bu olaylar, hücre içinde belli sinyallerin oluşturulup bir seri düzenleyici mekanizmaların harekete geçmesini ve böylece türe özgü ikincil metabolizma ile çeşitli metabolitlerin üretimini sağlar.

Genel olarak hemen tüm organizmaların paylaştığı intermediyer metabolik yollar varsa da, özellikle bakteriler başta olmak üzere türe özgü bazı önemli metabolik yollar da bulunmaktadır. Bu metabolik yollarla yapılan birçok metabolitin önemli kullanım alanları mevcuttur. Genel veya özel olsun tüm metabolik yolların belli oran belirleyici reaksiyon basamakları ve anahtar metabolitleri vardır. Bu reaksiyon oranlarının belirlenmesi ve anahtar metabolitlerin kantitasyonu hücrenin o andaki durumu konusunda bize önemli bilgiler sunar. Örneğin, hücrenin metabolizmasının enerjetik ya da biyokütle oluşturma yönünde mi olduğu bu çeşit anahtar metabolit ve reaksiyonların oranlarının ölçülmesi ile anlaşılabilir [9]. Böylece, çeşitli sanayilerde kullanımı bulunan metabolitlerin üretiminin hangi şartlarda daha iyi seviyelerde olacağı belirlenebilir.

Son yıllarda adını sıkça duyduğumuz “*metabolik mühendislik*” terimi böyle çalışmaları içinde barındıran bir çalışma alanını ifade etmek için kullanılmakta olup, metabolik mühendislik denildiğinde akla ilk gelen en önemli ajanlardan biri önemli bir metabolik modülatör olan *Vitreoscilla* hemoglobini [10-11]. Bakteriyel orijinli hemoglobinler arasında *Vitreoscilla* hemoglobini (VHb) ilk keşfedilen [12] ve karakterizasyonu en iyi yapılmış olan [13-16] hemoglobindir. Bu proteinin esas fonksiyonunun düşük konsantrasyonlarda bulunan ekstraselüler (hücre dışı) oksijeni

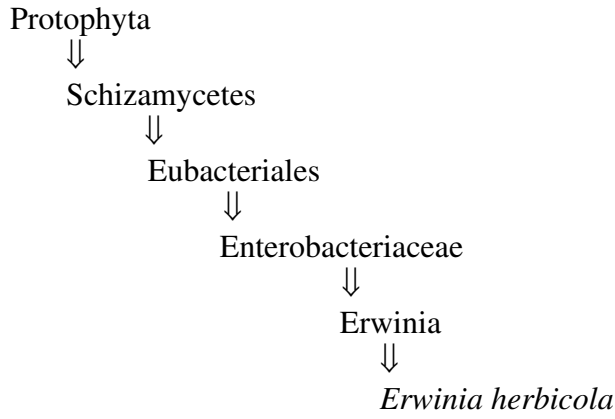
bağlayarak onu terminal solunum oksidazlarına vermek ve böylece hipoksik şartlarda hücresel solunuma katkıda bulunduğu sanılmaktadır [13]. Gerçekten de *vgb* geni oksijenle negatif regüle olan bir promotora sahip olup, oksijen seviyesinin düşük olduğu (yaklaşık % 2 O₂ içeren) ortamlarda genin ekspresyon düzeyi 50 kata varan oranlarda artmaktadır [17]. Bu şartlarda, *vgb* rekombinant bakterilerinin oksijen alım seviyelerinin 5-10 kat arttığı rapor edilmiştir. *Vitreoscilla* hemoglobininin (VHb) ifade edildiği çeşitli rekombinant mikroorganizmalarda kontrollü bir oksijen alım ve salınımı sağlayarak yapımları bu şekilde mikroaerofilik bir ortam gerektiren ürünlerin sentezinde avantaj sağladığı bilinmektedir [18-40].

Bu çalışma, gram negatif bir bakteri olan *E. herbicola* ve onun *vgb*⁻ (Eh[pUC8]) ve *vgb*⁺ (Eh[pUC8:15]) rekombinant suşlarındaki indol-3-asetik asit (IAA), β-karoten, likopen gibi önemli karotenoidlerin, fenazin ve karbapenem gibi antibiyotiklerin ve C vitamininin farklı kültür koşullarındaki sentezinin nasıl oluştuğunu içermektedir. Ayrıca VHb/*vgb* sisteminin hücrelerin büyüme, çoğalma ve oksijen kullanma karakteristikleri üzerindeki etkisi ve bütün bunların yukarıda bahsi geçen metabolitlerin üretimi konusunda ne anlama geldiği bu araştırmanın konusunu teşkil etmektedir.

1.1 *Erwinia herbicola*

Enterobacteriaceae familyasının bir üyesi olan *Erwinia herbicola* patojen olmayan, bitkilerin hava ile temas eden yüzeylerinde bulunan bir bakteri olup bitki-bakteri ilişkisinin araştırılmasında bazı çalışmalara konu olmuştur [41-43]. Aynı zamanda bitki lezyonlarında sekonder işgalci olarak bulunmaktadır. İnsan ve hayvanlar için patojen olan suşları *Erwinia agglomerans* türüne aittir. Buna rağmen, *E. herbicola* ve *E. agglomerans*'ın toplam DNA homolojisi ve elektrofotik protein profili önemli oranda benzerlik göstermektedir [44].

E. herbicola şekerleri ve alkolleri fermente edebilir ve bazı sebzelerde bulunan ramnoz, sellobioz, arabinoz ve mannitol gibi şekerleri kolaylıkla kullanabilir. Çoğu 37 °C'de gelişme gösterirken bazı suşlarının buzdolabında geliştiği (hatta 1 °C'de gelişebilen suşları) belirlenmiştir. Boyutları 0.5 x 1.3 µm arasında değişmektedir. Bitkilerde protopektin halinde bulunan pektini, sahip oldukları protopektinaz enzimi ile parçalayarak yumuşak çürüklük hastalığına neden olurlar. *Erwinia herbicola*'nın taksonomik konumu Şekil 1.1'de gösterilmiştir.



Şekil 1.1. *Erwinia herbicola* 'nın taksonomik konumu

Ana metabolizması diğer birçok bakteriye benzese de, Gram-negatif fakültatif anaerobik bir bakteri olan *Erwinia herbicola* kendine özgü metabolik yolları ile L-DOPA, çeşitli antibiyotikler, karotenoidler ve indol-3-asetik asit (IAA) gibi çeşitli endüstrilerde kullanımı bulunan ürünleri sekonder metabolizmasının bir parçası olarak sentezleyen nadir bakterilerden biridir. Örneğin, diketoglukonik asit yolu esas olarak bu organizma tarafından kullanılmaktadır [3, 45-46]. Diketoglukonik asit diğer bir takım endüstriyel ürünlere (ör. glukonat ve C vitamini) kolayca çevrilebilen önemli bir prekürsördür [47-48].

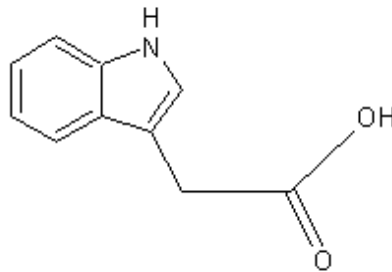
E. herbicola 'nın tipik olarak sarı karotenoid pigmentlerini içeren epifitik bir bakteri olmasının yansıra üretmiş olduğu bazı antibiyotikler (herbikolinler, pantosinler, fenazinler, karbapenemler) sayesinde bitkiyi patojenlere karşı koruduğu da rapor edilmiştir [49-51]. Bu bakteri aynı zamanda değişik kültür şartları altında birden çok antibiyotiği üretme potansiyelinde olan nadir bakterilerden biridir [51-53]. Bakterinin diğer bir özelliği genellikle bitkiler tarafından yapılan bir bitki hormonu olan indolasetik asiti (IAA, bir çeşit oksin) üretme özelliğidir [42, 54-56]. Her ne kadar bakterinin bu hormonu bitki ile kurmuş olduğu bir ilişki ve bitkinin mikrobiyal savunma stratejisini bypass etmek için kullandığı ileri sürülmüşse de, IAA'nin bir sinyal molekülü olarak davrandığı ve bakteri fizyolojisi üzerinde doğrudan etkili olduğu sanılmaktadır [42, 57].

Erwinia herbicola tarafından üretilen bazı önemli sekonder metabolik ürünler:

1. Oksin: İndol-3-asetik asit (IAA)
2. Karotenoidler: β -karoten, likopen, astaksantin
3. Vitaminler: A, E, C vitamini ve C vitamini öncülü (Diketoglukonik asit)
4. Antibiyotikler
 - a) Karbapenem
 - b) Herbikolin
 - c) Fenazin
 - d) Pantosin
5. Nörotransmitter maddeler: L-DOPA ve Dopamin

1.2 İndol-3-asetik asit (IAA)

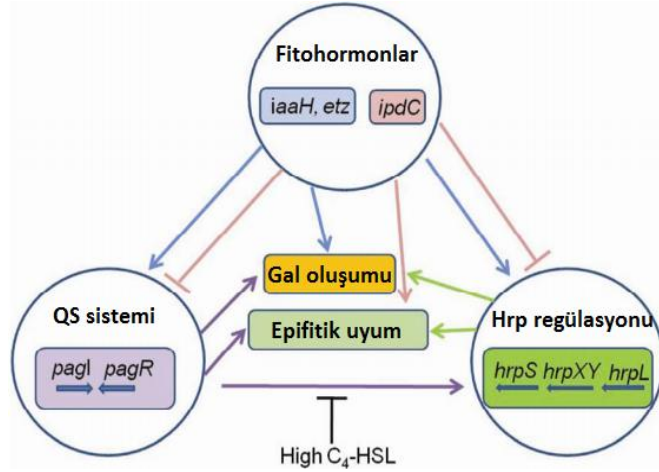
Günümüzde sadece yüksek organizasyonlu bitkilerin değil fungusların, likenlerin, alglerin ve bakterilerin de indol-3-asetik asit (IAA) oluşturdukları saptanmıştır [58]. Toprak mikroflorası içinde yer alan pek çok mikroorganizmanın IAA oluşturma yeteneğine sahip oldukları çok uzun zamandan beri bilinmektedir. Çeşitli bakteri türleri önemli bir fitohormon olan IAA üretme yeteneğine sahiptir. IAA biyosentezi, bitki ile ilişkili bakteriler arasında yaygın bulunan bir durum olup, bu hormonun üretimi için farklı biyosentetik yollar tanımlanmıştır. IAA üreten bakteri ve bitkiler arasındaki etkileşimler bitki lehinde olan bir durumdur ve patojenezden fitostimülasyona kadar çeşitli sonuçlara yol açmaktadır.



Şekil 1.2. İndol-3-Asetik Asit

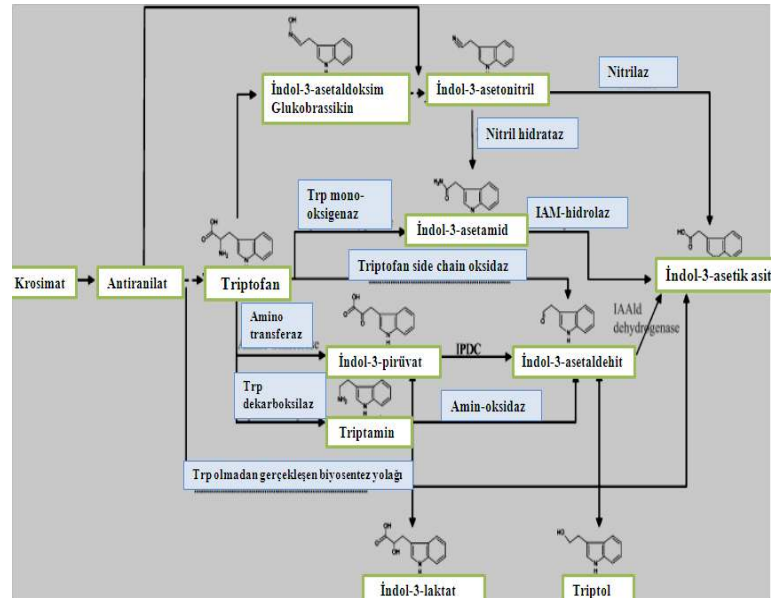
Farklı mikroorganizma ve bitki etkileşimlerinde IAA'nın önemli rolü bulunmaktadır. Bakteriler bu fitohormonu hem bazal bitki savunma mekanizması ve fitostimulasyonda hem de kendilerinin kolonizasyon stratejilerinin bir parçası olarak kullanmaktadırlar. Ayrıca biyokimyasal bakteriyel IAA sentez yolları ve onların regülasyonu üzerinde yapılan moleküler çalışmalar IAA'nın aynı zamanda bir sinyal molekülü olabildiğini ve böylece bakteri fizyolojisi üzerinde doğrudan bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Özellikle son gelişmeler, IAA üreten mikroorganizmalarda IAA'nın bir sinyal molekülü olduğunu açıkça ortaya koymaktadır. IAA biyosentezi bitki üzerinde kolonizasyonda ve bakteriyel dirençte önemli rol oynamaktadır. Ayrıca bitki ve bakteri IAA biyosentezi büyük oranda benzerlik göstermektedir [58]. Bakteri-bitki ilişkisinde bakteriyel IAA biyosentezi, konakçı üzerinde uyum ve kolonizasyona katkı sağlamaktadır. Diğer taraftan IAM yolağının inaktivasyonunun kolonizasyon yeteneğini etkilemediği belirlenmiştir. Bakteriler IAA'yı bitki dokularında proliferasyonu uyarmak için kendilerinin kolonizasyon stratejilerinin bir parçası olarak kullanırlar. Bitki savunması ve oksin sinyalleri arasındaki bağlantı, kolonizasyonda bakteriyel IAA'nın rolüne ekstra bir boyut kazandırmaktadır [59].

E. herbicola'da IAA biyosentezinde, ortamdaki bakteri yoğunluğu ve quorum-sensing (QS) sinyal molekülleri arasında önemli bir korelasyon bulunduğu bildirilmiştir [60]. Gal oluşumunun *hrp/hrc* genleri, fitohormonlar ve QS sistemi tarafından kontrol edildiği bilinmektedir. İndol-3-asetik asit (IAA) (*iaaH*) ve sitokininin biyosentetik yolları, hem QS sistemi (*pagI*, *pagR*) hem de Hrp regülatör genlerinin (*hrpS*, *hrpXY*, *hrpL*) ekspresyonu ile pozitif yönde regüle olmaktadır. IAA yolağı (*ipdC*), Hrp regülasyonu ve QS sisteminin transkripsiyonunu negatif yönde regüle etmektedir. QS sistemi Hrp regülatör genlerinin ekspresyonunu indüklemektedir. Yüksek C₄-HSL konsantrasyonları, Hrp reglonunu negatif etkilemektedir. Hücre oluşumu ve epifitik uyum bu üç sistem tarafından etkilenmektedir (Şekil 1.3) [61].



Şekil 1.3. Fitohormonlar, quorum sensing (QS) ve Hrp genleri arasındaki ilişki ve onların gal oluşumu ve epifitlik uyum üzerindeki etkileri. Çeşitli bileşenler daire ile; genler ve fenotipler ise dikdörtgen ile gösterilmiştir

Bakteriyel IAA sentezinde triptofan temel bir öncül olarak tanımlanmaktadır. IAA üretimi için öncül olarak triptofanın kullanıldığı beş farklı biyosentez yolu bulunmaktadır: İndol-3-asetamid (IAM) yolu, indol-3-pirüvat (IPyA) yolu, triptamin (TAM) yolu, triptofan yan zincir oksidaz yolu (TSO), indol-3-asetonitril (IAN) yolu (Şekil 1.4). *E. herbicola* IAA üretiminde indol-3-asetamid (IAM) ve indol-3-pirüvat (IPyA) yolunu kullanmaktadır.



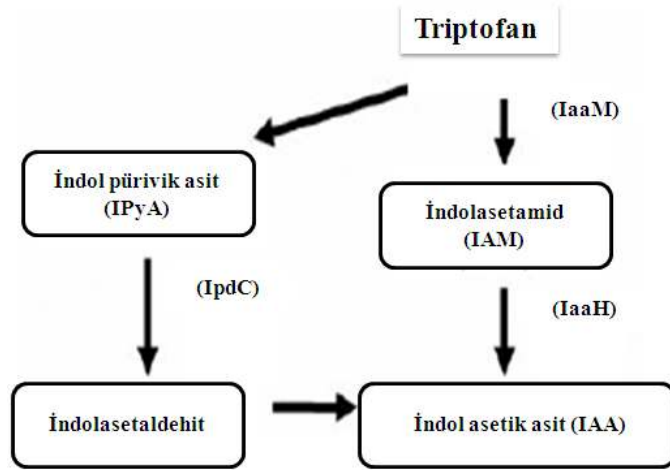
Şekil 1.4. Bakterilerdeki IAA sentezi için farklı biyosentetik yollar. IAAld, indol-3-asetaldehit; IAM, indol-3-asetamid; IPDC, indol-3-pirüvat dekarboksilaz; Trp, triptofan

1.2.1 İndol-3-asetamid (IAM) yolağı

İndol-3-asetamid (IAM) yolağı, bakterilerde en iyi karakterize edilmiş olan yoldur. İki basamaklı bu yolda triptofan öncelikle *iaaM* geni tarafından kodlanan triptofan-2-monooksijenaz (IaaM) enzimi tarafından IAM'ye dönüştürülür. Triptofan-2-monooksijenaz enziminin katalizlediğı bu reaksiyonda 1 mol triptofan ve 1 mol O₂ tüketilirken 1 mol indol-3-asetamid ve 1 mol CO₂ üretilmektedir. Enzimin çalıştığı optimum pH aralığı 7.2 ve 9.2 arasında değişmektedir [62]. İkinci basamakta *iaaH* geni tarafından kodlanan IAM hidrolaz (IaaH) enzimi tarafından IAA'ya dönüştürülür. IAM yolu, önceleri sadece bakterilere özgü bir yol olarak tanımlanmıştır fakat daha sonraları IAM analizinde yüksek duyarlılıktaki HPLC ve GC-MS/MS tekniklerinin kullanılmasıyla beraber IAM'nin *Arabidopsis thaliana*'da endojen bir bileşik olduğu tespit edilmiştir [63]. Daha sonraki çalışmaların da bu verileri destekleyici nitelikte olduğu rapor edilmiştir [64-65].

1.2.1.1 İndol-3-pirüvat (IPyA) yolağı

Bitkilerde IAA üretiminde indol-3-pirüvat (IPyA) yolağının oldukça önemli olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte bitkilerde bu yol ile ilgili anahtar gen veya enzimlerin henüz tanımlanmadığı rapor edilmiştir. Bu yoldaki ilk basamakta triptofan, bir aminotransferaz tarafından IPyA'ya dönüşmektedir. Oran sınırlayıcı basamakta, IPyA indol-3-pirüvat dekarboksilaz (IPDC) enzimi tarafından indol-3-asetaldehite (IAAId) dekarboksile olmaktadır. Son basamakta ise IAAId, IAA'ya okside edilmektedir [58].



Şekil 1.5. IAA'nın IPyA ve IAM metabolik yolu: IaaM, triptofan-2-monooksijenaz; IaaH, indol-3-asetamid hidrolaz; IpdC, indol-3-pirüvat dekarboksilaz [66]

Erwinia herbicola'da belirlenen indol-3-asetik asit (IAA) biyosentetik yolağında, *iaaM*, *iaaH* ve *ipdC* sırasıyla triptofan-2-monooksijenaz, indol-3-asetamid hirolaz ve indol-3-pirüvat dekarboksilaz enzimlerini kodlayan genlerdir (Şekil 1.5) [59].

Mikrobiyal bir metabolit ve sinyal molekülü olan IAA'nın fitopatojenik bakteriler tarafından gerçekleştirilen biyosentezinin, bu bakterilerin bitki yüzeylerinde canlı kalmalarına yardımcı olduğu belirtilmektedir. Ayrıca bakterilerde IAA üretimindeki biyosentetik yolların aynı zamanda triptofan analoglarının detoksifikasyonunda da gerekli olabildiği de rapor edilmektedir [66].

1.3 Beta-karoten ve Likopen

Karotenoidler sarı veya kırmızı renkli lipofilik pigmentlerdir. Fototrofik organizmalarda gerekli olan karotenoidlerin fotooksidatif hasara karşı savunmada önemli rolleri bulunmaktadır. Karotenoidler izoprenoid sınıfı metabolitlerin büyük bir grubu olup, *de novo* olarak bitki ve alglerde sentezlendiği gibi aynı zamanda bakteri ve fungus tarafından da sentezlenmektedirler [67]. Bitkilerle olan epifitik uyumunun bir sonucu olarak *E. herbicola*'nın değişik karotenoidler sentezleyerek sarı-turuncu yelpazede bir pigmentasyon gösterdiği kaydedilmiştir [68]. Pigmentasyon kaybının ve bunun sonucunda tiamin oksotrofinin ortaya çıkmasının nedeni olarak, bu bakterinin taşıdığı büyük (megadalton boyutlarda) plazmidlerin kaybı olduğu ileri sürülmüşse de, bunun genetik mekanizması henüz tam aydınlatılamamıştır [69]. Her ne kadar bu

canlıların daha çok fotosentetik olanları tarafından ışığı soğurma, enerji transferi ve serbest radikal süpürücü bağlantılı olarak yapılsa da, aynı özellikteki karotenoidler belli sayıda fotosentetik olmayan bakteri tarafından da sentezlenebilmektedir [70]. Doğada bitki, alg, fungus ve bakteriler tarafından sentezlenen 600'den fazla farklı karotenoid bileşiği bulunmaktadır. Bunlardan sadece 40 kadarının insan gıdaları arasında yer aldığı, bunların da 20 kadarının insan doku ve kanında ölçülebildiği ve ölçülebilenlerin % 90'a yakın kısmının ise α ve β -karoten, likopen, lutein ve kriptoksantinden oluştuğu in-vivo çalışmalarla belirlenmiştir [71]. Karotenoidlerin yaklaşık üç milyar yıl önce bakterilerde ortaya çıktığı, pigment bileşikler ailesine ait olduğu ve bitkilerde fotosentez sırasında hücreleri ışığın zararlı etkilerinden koruduğu düşünülmektedir [72]. Likopenin kan-beyin bariyerini geçtiği ve düşük yoğunluklarda da olsa merkezi sinir sisteminde bulunabildiği keşfedilmiş, yine serum likopen düzeyleri ile Alzheimer, Parkinson ve vasküler dementia gibi nörodejeneratif hastalıklar arasında da sıkı bir bağlantı olduğu yakın zamanlarda rapor edilmiştir [71].

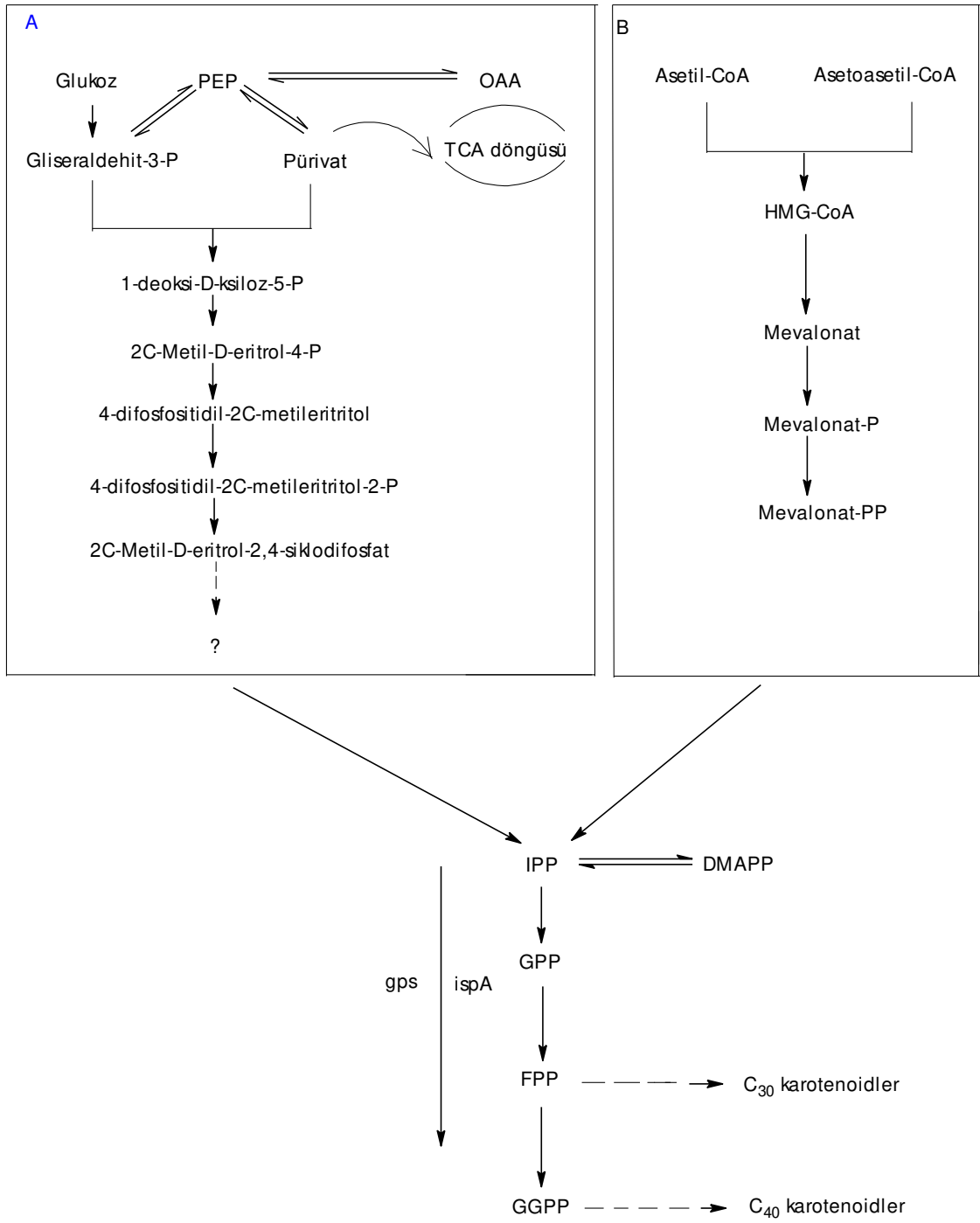
Doğada birçok bakteri, alg, ipliksi fungus ve mayanın yapısında beta karoten bulunmaktadır. Biyoteknolojik olarak en çok çalışma *Phycomyces blakeleeanus* (Mucoraceae) ve *Blakesleea trispora* (Choanopheraceae) fungusları üzerinde yapılmıştır. Bunun yanında *Mucor mucedo*, *Ustilago violaceae*, *Neurospora crassa*, *Fusarium aquaeductum*, *Choanophora cucurbitarum* fungusları, *Rhodotorula* mayaları, *Dunalinella salina* ve *Dunalinella bardawill* hipersalin mikroalglerinin de beta karoten sentezlediği belirtilmiştir [73].

β -karoten'in, en önemli işlevi organizmaları fotooksidatif hasara karşı korumasıdır. β -karoten aynı zamanda memelilerde A vitaminin öncülü olarak işlev görür [74]. β -karoten, likopen, karotenoidler enzimatik olmayıp, membran antioksidanları grubuna dahildirler. Likopen ve β -karoten gibi oksijenize edilmemiş karotenoidlerin genellikle membran ara yüzündeki C vitamini tarafından translokasyondan sonra ara yüze rejenere edilebildiği de bir hipotez olarak ileri sürülmektedir. Likopenin antioksidan özelliğinin β -karotenden iki kat daha fazla olduğu belirtilmektedir ve antikarsinojenik özellikleri ile bilinmektedir [72].

1.3.1 Karotenoidlerin Biyosentezi

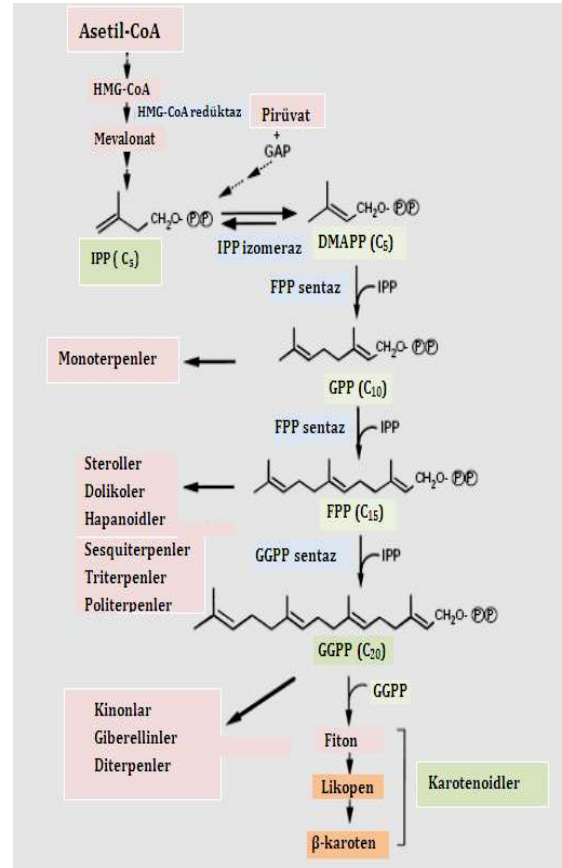
Bütün karotenoidler izoprenoid (ya da terpenoid) yolundan türevlenmektedirler. Farklı türlerde gerçekleşen iki biyosentez yolağı bulunmaktadır. Karotenoid biyosentezi iki şekilde gerçekleşmektedir: Mevalonata bağlı yolak (A) ve Mevalonatsız yolak (B) (Şekil 1.6 ve Şekil 1.7). Bu metabolik yolların her ikisi de farklı türlerde, ilk izoprenoid birimi olan izopentil prifosfatın (IPP) oluşumunu sağlamaktadırlar (Şekil 1.6). Mevalonatsız gerçekleşen biyosentez yolu son zamanlarda keşfedilmiştir. Bu yolun keşfine kadar karotenoid biyosentezinin sadece mevalonat yolu üzerinden IPP'den sentezlendiği düşünülmekteydi. Arkea, fungus, hayvan ve bitkilerde (plastidler hariç) IPP, başlangıç öncülü olarak asetil CoA ile birleşerek mevalonik asitten sentezlenmektedir. Eubakteria ve bitki plastidlerinde ise, IPP sentezi pürüvat ve gliseraldehit-3-fosfat arasındaki bir başlangıç kondensasyon reaksiyonu ile başlamaktadır. Bu yoldaki reaksiyonlar birkaç basamakta gerçekleşmekte olup bu reaksiyon basamaklarından bazıları ise henüz tanımlanmamıştır (Şekil 1.6).

Eubakterilerdeki mevalonatsız yolunun keşfi karotenogenik olmayan mikroorganizmalarda karotenoid verimliliğini arttırmak için izoprenoid akış mühendisliğini anlamayı sağlamıştır [75].



Şekil 1.6. Karotenoidlerin Biyosentezi (1)

Oran sınırlayıcı izoprenoid ekspresyonunun dengelenmesi ve karotenoid biyosentetik enzimleri, enzimlerin aşırı ekspresyonunun sebep olduğu büyüme inhibisyonunu rahatlatarak karotenoid yolu ile metabolik akışın artışında etkili olmuştur. Enzimlerin ekspresyon seviyelerinin modülasyonu, karotenoid yolu sayesinde metabolik akışın kontrol edilerek farklı oranlarda karotenoid ara ürünlerinin elde edilmesinde bir strateji olarak kullanılabilir. Fotosentetik bakteriler karotenoidleri iç membranlarında zaten yeterince sentezlemektedirler. Metabolik mühendisliğin amacı, karotenoidlerin heterolog üretimi için alternatif bir rota sağlamaktır.



Şekil 1.7. Karotenoid biyosentezi (2)

Karotenogenik olmayan mikroorganizmalarda rekombinant karotenoid üretimi, çeşitli karotenoid yapılarının üretimi için yeni yolların tasarlanmasına izin vermektedir. Farklı kaynaklardan karotenoid genlerinin kombinasyonu ve doğrudan evrim ile karotenoid enzim aktivitelerinin değişimi sayesinde yeni karotenoid yolları oluşmaktadır [75].

1.4 C Vitamini

Vitaminlerin yararlı etkileri bulunmaktadır. Vitaminler, gıda ve yem uygulamaları başta olmak üzere yıllık 10^5 tondan daha fazla üretilmektedir. Fungus, bakteri veya mikroalg çalışma prosesleri ekonomik ve ekolojik açıdan uygulanabilir.

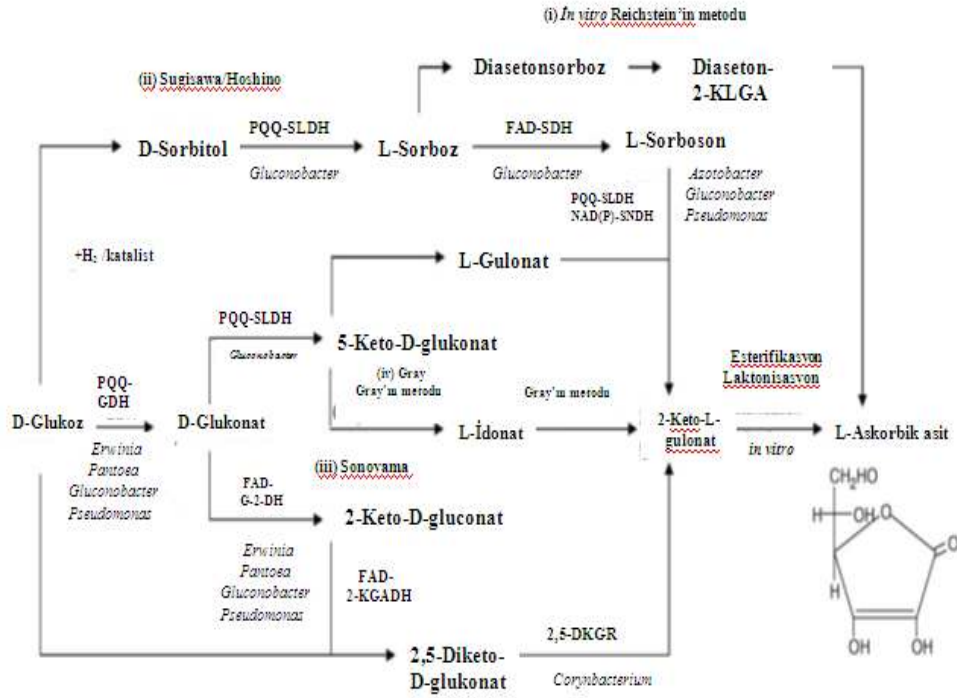
C vitamini olarak bilinen L-askorbik asit (L-AA) suda eriyen ve çeşitli fizyolojik işlevi olan vazgeçilmez bir vitamindir. İlk kez böbreküstü bezinde izole edilmiştir ve bitki dokularında karakteristiktir. L-AA insan, primatlar ve birkaç diğer memelide bu

vitamin sentezi yapılamadığı için bu canlılar için C vitamini önemli bir besindir ve bunu dışarıdan almaktadırlar. Bu organizmalarda, L-gulono-1,4-lakton oksidaz geninin biyosentezini katalizleyen son adım fonksiyonel değildir.

Metabolik fonksiyonu ve antioksidan öneminden dolayı L-AA insan diyetinde önemlidir. Buna ek olarak, L-AA'nın singlet oksijen ve süperoksit anyon gibi birçok reaktif oksijeni süpürücü etkisi bulunmaktadır. Bu nedenle, oldukça önemli bir işlevi olan zararlı oksidatif ürünlerden dokuları koruması kardiyovasküler hastalıklar da dahil olmak üzere birçok kronik hastalıkların ve kanserin oluşumunu engellemektedir.

L-Askorbik asit, yaklaşık 70 yıldan beri endüstriyel olarak üretilmektedir. Son iki yılda, çok sayıda yenilikçi biyolojik dönüşüm sistemini uzun süreli piyasa hakimiyetini kolaylaştırmak için Reichstein yöntemi önerilmiştir. L-askorbik asitin hala önemli bir bölümü kimyasal sentezle üretilmektedir. Yapılan çalışmalarla bakteri, maya ve mikroalg kullanılarak biyoteknolojik alternatifler açıklanmıştır. Ayrıca L-askorbik asitin doğrudan üretimi için yeni bakteriyel yollar da araştırılmaktadır.

Yılda yaklaşık tahmini 110,000 ton dünya üretimi ile C vitamini artan bir rekabete neden olmuştur. Sentetik üretilen L-AA ilaç sanayi (% 50), gıda sanayi (% 25), içecek sanayi (% 15), ve yiyecek sanayi (% 10) gibi farklı uygulamalar için kullanılmaktadır. Son 20 yıl içinde, L-AA'nın mevcut üretimini kolaylaştırmak için farklı bakteri suşları kullanılarak üretim yöntemleri araştırılmaktadır. 2-KLGA mikrobiyal üretimi *Gluconobacter*, *Acetobacter*, *Ketogulonicigenium*, *Pseudomonas*, *Erwinia* ve *Corynebacterium* cinslerine ait suşlar aracılığıyla D-glukoz, D-sorbitol veya L-sorbozdan elde edilebilir (Şekil 1.8) [76].



Şekil 1.8. Klasik Reichstein yöntemi ile L-askorbik asitin sentezi

Kimyasal sentez ve biyotransformasyon birleşimi, antioksidan olarak kullanılan ve kantitatif olarak vitaminlerin en önemlisi olan C vitamini üretimi için uygulanmaktadır. En fazla beş proses adımına ihtiyaç vardır. Bunlardan biri *Gluconobacter* sp ile ve diğeri *Ketogulonicigenium* sp. prosedürüyle kolaylaştırarak katalizlenir. *Blakeslea trispora* veya *Dunaliella salina* kaynaklı endüstriyel β -karotenin sadece küçük bir oranı A vitaminin öncüsüdür. Her iki süreçte genetik mühendisliği olmadan klasik suşlar kullanılmıştır. Pigment olarak astaksantine ihtiyaç duyulur bu kimyasal sentezlenir ama bazı tüketiciler özellikle *Haematococcus pluvialis* veya *Xanthophyllomyces dendrorhous* elde edilen doğal ürünleri tercih ederler.

Çoklu doymamış yağ asitleri, örneğin, araşidonik asit, *Mortierella alpina* tarafından üretilmektedir. Ayrıca, bazı mikroalgler dokosaheksaenoik asiti biriktirirler. R-pantotenik asit için biyoproses endüstriyel gerçekleştirmeye yakındır [77].

C vitamininin biyosentetik üretimi için genetiği değiştirilmiş olan fermantasyon mikroorganizmalar ve bitkiler kullanılmaktadır. Özellikle, askorbik asitin biyosentezik yolağına katılan enzimin aktivasyonunun arttırılması için genetik modifikasyonun kullanımı ile ilgilidir. Aynı zamanda, L-askorbik asit yolağı ve askorbik asitin biyosentetik üretimini arttırmak amacıyla GDP-D-rnannoz: GDP-L-galaktoz epirnerazi içeren epimerazların dizilerini kodlayan nükleotidin kullanımını içerir. Aynı zamanda bu biyoproses, L-askorbik asit üretimi için mikroalg suşları, bakteri, yararlı maya gibi genetiği değiştirilmiş mikroorganizmaların kullanımıyla da ilgilidir. Neredeyse tüm yaşam formlarında, bitki ve hayvanlar, hem askorbik asit (C vitamini) sentezi hem de besin için gereklidir. Askorbik asitin insanların ve hayvanların beslenmesinde önemli yer tuttuğu ilk kez belirlenmiştir. Askorbik asit (C vitamini) demir absorpsiyonu, soğuğa direnci, yaraların iyileşmesi, polisakkarit ve kologen sentezi, kıkırdak, kemik, dentin oluşumu, kapillerin onarımı ve antioksidan olarak kullanımıyla insan doku fonksiyonlarında son derece etkili bir yere sahiptir.

Askorbik asit *Acetobacter suboxidans* tarafından kalsiyum D-glukonatın oksidatif fermentasyonu ya da L-sorbozun kimyasal olarak oksidasyonu ile sentezinde doğal kaynak olarak izole edilebilir. Askorbik asitin fotosentez sırasında nötralize enerjisi elektronların fonksiyonu ve fotosentetik mikroorganizmaların kloroplastlarında üretildiği belirtilmiştir. Buna göre, fotosentetik organizmalarda askorbik asit üretiminin koruma mekanizması olarak işlev gördüğü bildirilmektedir [78].

1.5 *Erwinia herbicola*'da Antibiyotik Üretimi

Erwinia türlerinin zirai önemlerine ek olarak, iki *Erwinia* türünün bazı antibiyotikleri üretebildikleri tespit edilmiştir. Bunlardan *Erwinia herbicola* A 111 suşunun, lipopeptit antibiyotiklerden olan herbikolin A ve B'yi üretebildiği bulunmuştur [79]. *Erwinia carotovora*'nın bazı suşlarının ise bir β -laktam antibiyotiği olan 1-karbapen-2-em-3-karboksilik asiti (karbapenem) üretebildiği gösterilmiştir. Bu antibiyotiğin üretimiyle beraber antibiyotiğe karşı duyarlı olan bakterilerin sayısının azaltılarak rizosferdeki yaşama şansının arttığı düşünülmektedir [80].

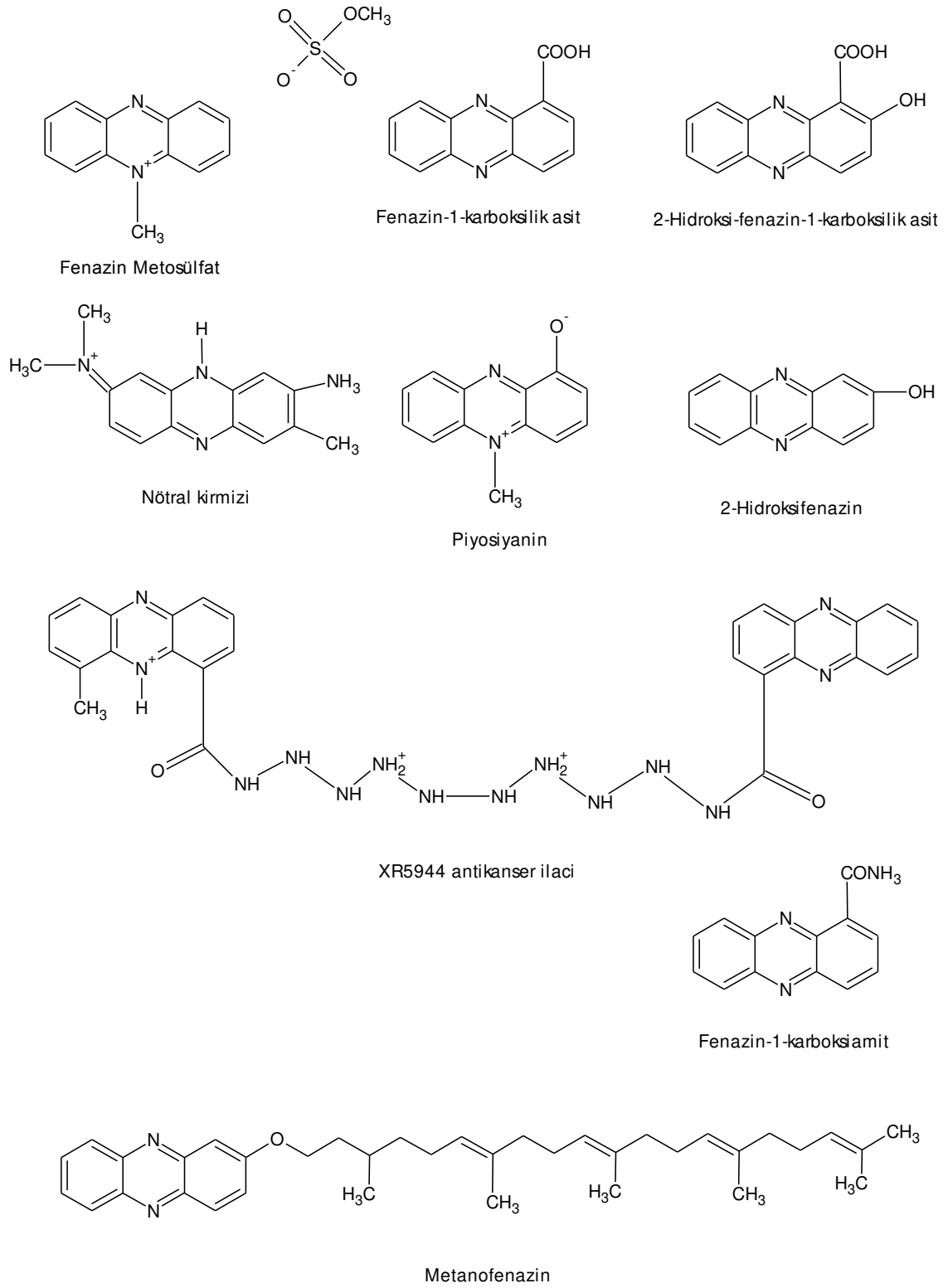
Epifitik bir bakteri olan *E. herbicola* kendine özgü metabolik yolları ile çeşitli antibiyotikleri sekonder metabolizmasının bir parçası olarak sentezleyen nadir bakterilerden biridir. *E. herbicola*, üretmiş olduğu bazı antibiyotikler (herbikolinler,

pantosinler, fenazinler, karbapenemler) sayesinde bitkiyi patojenlere karşı koruduğu rapor edilmiştir [49-51]. *E. herbicola*'nın tek suşu birçok antibiyotiği üretmektedir ve farklı suşları farklı yapıdaki birden fazla kompleks antibiyotiği üretme potansiyeline sahiptir. *E. herbicola* tarafından üretilen antibiyotiklerin biyolojiksel aktiviteleri ve kimyasal yapıları farklıdır. Bu antibiyotiklerinin moleküler doğasının oluşması kompleks bir biyosentetik model tarafından zorlaştırılmaktadır. Antibiyotiklerin çoğu ortak bir özelliği paylaşıyor gibi gözükse dahi ortama amino asit ilave edilmesi antibiyotik aktivitesinin bastırılabilirdiği rapor edilmiştir. *E. herbicola* antibiyotiklerinin kompleksliği tam olarak bilinmemektedir çünkü antibiyotik aktivitesini bastıran amino asitler sadece karakterizasyonunda model teşkil etmektedirler [81]. Bu çalışmada, *E. herbicola*'nın ürettiği olduğu antibiyotiklerden sadece karbapenem ve fenazin çalışılmıştır.

1.5.1 Fenazinler

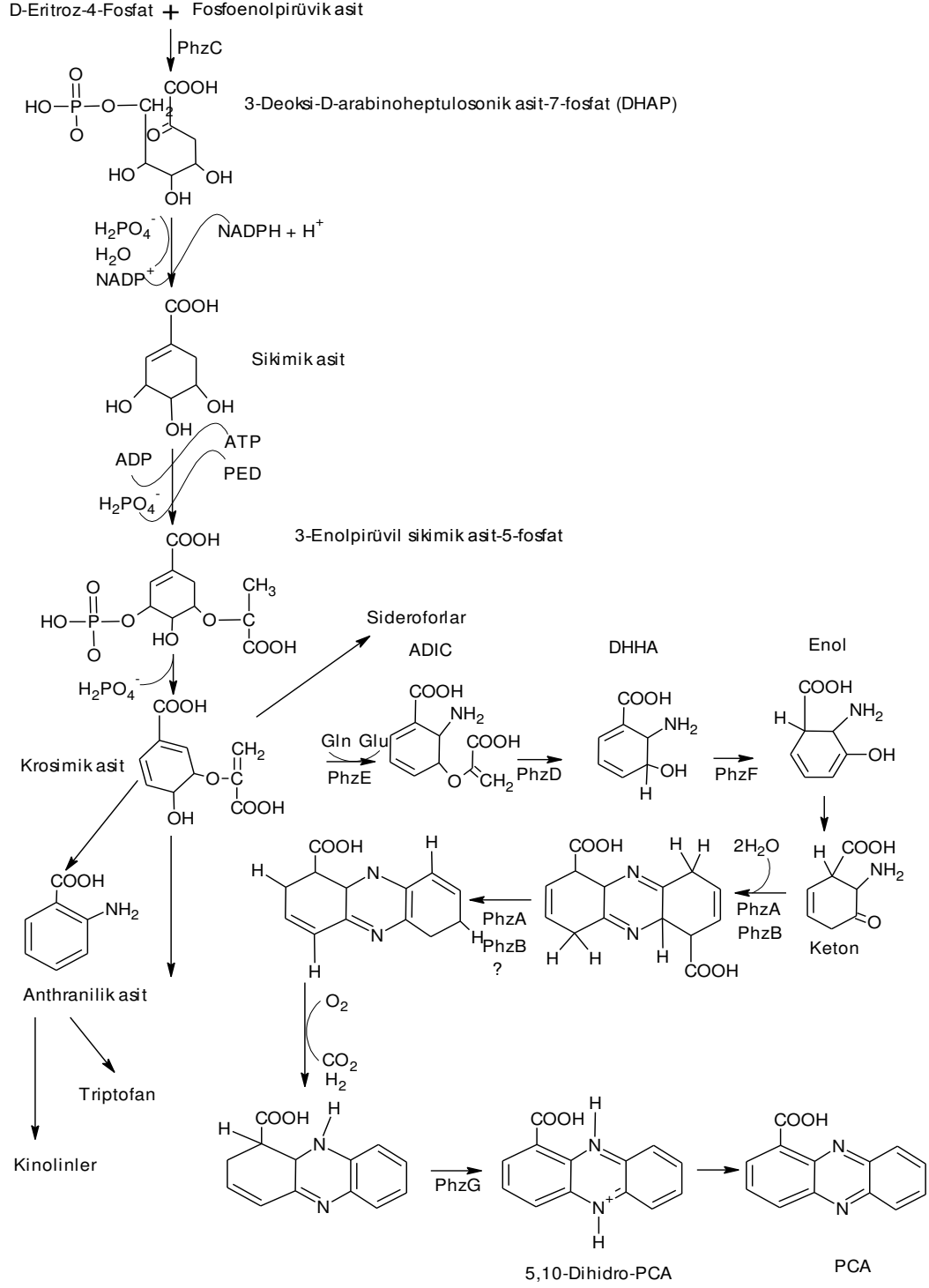
Fenazinler, bakteriler tarafından üretilen büyük bir azot grubu içeren, fonksiyonel grupların tipi ve pozisyonu üzerinde kimyasal ve fiziksel özellikleri farklılık gösteren heterosiklik bileşiklerdir. Doğada 100'den fazla farklı fenazin yapısal türevi tanımlanmıştır ve yapılarında merkezi bir parça olarak fenazin içeren 6.000'den fazla bileşik sentezlenmiştir. Bakteriler, bilinen tek doğal fenazin kaynaklarıdır. Birçok bakteri çok sayıda fenazin türevi üretmektedir. Hem doğal ve hem de sentetik fenazin türevlerinin bakteri üzerindeki etkileşimleri ve biyoteknolojik prosesleri çalışılmıştır (Şekil 1.9). Çeşitli bakteriler arasındaki fenazinin biyosentetik genlerinin biyoinformatik olarak karşılaştırılması, fenazin biyosentezinde beş genin (*phzB*, *phzD*, *phzE*, *phzF* ve *phzG*) yüksek derecede korunduğunu göstermiştir. Bu genler, üç halkalı fenazin yapısının sentezinden sorumlu olan çekirdek genlerdir. Son çalışmalar bu biyosentetik çekirdek genlerin, çeşitli bakteri jenerasyonları arasında horizontal transmisyon aracılığı ile taşındığını göstermiştir. Fenazinler alternatif terminal alıcılarına elektron mekiği olarak işlev gören, hücrel redoks durumlarını modifiye eden, hücre sinyalleri olarak hareket eden, gen ekspresyonu düzenleyen, biyofilm oluşumuna katkıda bulunan ve bakterinin hayatta kalabilmesini sağlayan önemli antibiyotiklerdir. Fenazinler, ökaryotik konak ve konakçı dokuları üzerinde konakçının hücrel yanıtları değiştirilmesi de dahil olmak üzere çeşitli etkilere sahiptirler. Fenazinler bitkilerde büyümeyi etkileyebilir ve sistemik direncin indüklenmesini

sağlarlar. Bu sekonder metabolitler çeşitli bakteriler tarafından özellikle *Pseudomonas* tarafından üretilmektedir ve virölans rolleri ile geniş spektrumlu antibiyotik özelliklerinden dolayı bu metabolitler yoğun bir şekilde çalışılmaktadırlar. Biyoteknolojik bir perspektiften bakıldığında, fenazinler, oksidasyon-redüksiyon (redoks) özellikleri, parlak pigmentasyon, pH ve redoks renk değişikliğini de içeren fizikokimyasal özelliklerinden dolayı büyük ilgi görmektedirler. Fenazinler çok çeşitli uygulamalarda elektron alıcısı ve vericisi olarak, yakıt hücrelerinin bileşenleri olarak, çevre sensörleri ve biyosensörler olarak, antitümör bileşiklerin merkezi bileşenleri olarak kullanılmaya devam edilmektedirler [82].



Şekil 1.9. Fenazinin yapısal türevleri

Bakteriyel sekonder metabolitler bakteri-konakçı ilişkilerinde birçok yönden önemli rol oynamaktadırlar. Virülans faktörler olarak işlev gören sekonder metabolitler, hastalık durumunda konakçı dokularının değiştirilmesinde merkezi bir rol oynar. Diğer sekonder metabolitler patojen bakterilerin sebep olduğu enfeksiyonları önlemek için işlev gören faydalı bakteriler tarafından üretilirler. Böyle sekonder metabolitler, faydalı bakterinin patojen bakteri ile rekabet yeteneğini artırarak ve patojenleri aktivitesini inhibe ederek ya da konakçının savunma sistemini tetikleyerek patojenlerin sebep olduğu enfeksiyonları önlemektedirler. Bu nedenle sekonder metabolitlerin düzenlenmesi, hastalıkların iyileştirilmesinde veya bastırılmasında önemlidir. Bakteriyel sekonder metabolitlerin regülasyonu, onların yararlı ya da zararlı olup olmadığı hususunda önemli ölçüde benzerlik gösterir. Örneğin RsmA/RsmB sistemi aracılığı ile transkripsiyonun regülasyonunda olduğu gibi, LuxI/R homologları sayesinde quorum sensing ile gen ekspresyonunun aktivasyonunun hem patojen hem de faydalı bakterilerdeki işlevi yüksek oranda korunmuştur. Bu global regülatörler sekonder metabolitlerin uygun ekspresyonunu kontrol etmek için yolaktaki spesifik aktivatör ve represörlerle birlikte işlev görürler. Multiple regülatörler fenazinin üretimini kontrol etmektedir [83]. PhzI ve PhzR quorum sensing sistemi, hücre yoğunluğuna bağlı bir durumda fenazinin üretimini regüle etmektedir [84]. Quorum sensing genleri olan *phzI* ve *phzR*, fenazinin biyosentetik operonunun aktivasyonunda doğrudan sorumludurlar [83]. *phzR* geni fenazinin operonunun transkripsiyonel bir regülatörünü kodlarken, *phzI* ise *N*-hekzanoil homoserin lakton (HHL) sinyalinin sentezini yönlendiren AHL (*N*-açilhomoserin lakton) sentaz enzimini kodlamaktadır [84]. Hücre yoğunluğuna bağlı olarak *phzI* tarafından üretilen *N*-hekzanoil Homoserin Lakton (HHL)'un birikimi fenazinin üretiminde önemli rol oynamaktadır [83]. HHL'nin bağlanmasıyla beraber PhzR aktive olmaya başlar ve böylece fenazinin genlerinin transkripsiyonu indüklenir. Fenazinin üretiminin kontrolünde aynı zamanda iki bileşenli GacS ve GacA sinyal transdüksiyon sistemi de gereklidir. Bu kontrolü, kısmen *phzI* transkripsiyon regülasyonu üzerinden kısmen de diğer regülatör elementler aracılığı ile gerçekleştirmektedir [84].



Şekil 1.10. Fenazin biyosentezi

Fenazinler birçok organizmada yüksek oranda korunmuş olan şikimik asit yolağından türevlenmektedirler. Krosmik asit, fenazin biyosentezindeki ilk dallanma noktasında fenazin genlerinin (*phzABCDEFG*) ifade edilmesinde işlev görmektedir. *phzB*, *phzD*, *phzE*, *phzF* ve *phzG* genleri fenazin biyosentezindeki çekirdek (core) genlerdir. *PhzC*, yani fenazin operonundaki üçüncü enzim, bir tip II-3-deoksi-D-arabinoheptulosonat-7-fosfattır (II-3-DAHP). Bu bileşik muhtemelen fenazin biyosentezinde şikimik asit yolağına doğru yeterli substrat sağlamaktadır (Şekil 1.10) [82].

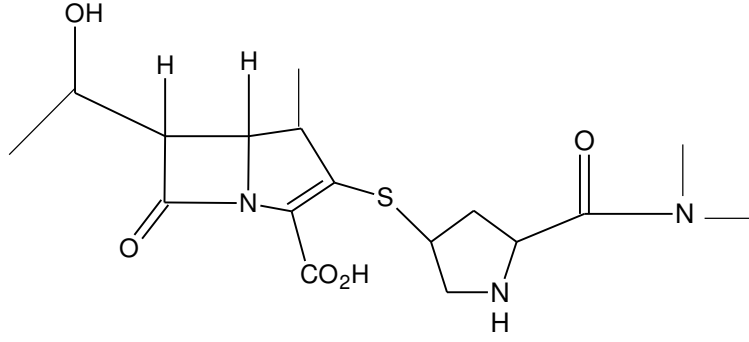
1.5.2 Karbapenemler

β -laktamlar ilk keşfedilen antibiyotik grubudur. İlk olarak ipliksi mantarlarda keşfedilmelerine rağmen daha sonra birçok Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilerde de bulundukları tespit edilmiştir [85]. β -laktam antibiyotikleri bakteri hücre duvarında bulunan peptidoglikan tabakasının biyosentezini engelleyici bir etkiye sahiptirler. Bakteriyel sitoplazmik membran üzerinde bulunan ve peptidoglikan biyosentezinde enzimatik rolleri olan Penisilin Bağlayan Proteinler (PBP), penisilinler ve diğer benzer antibiyotikler için direk hedef konumundadırlar. β -laktam grubu antibiyotikler günümüzde tıbbi tedavide kullanılan birçok antibiyotiğı ihtiva ederler. Yüksek oranda etkili ve düşük toksisiteye sahiptirler [86]. β -laktam antibiyotikleri penisilin, sefalosporin, sefamisin, klavam, monobaktam ve karbapenemlerdir.

Penisilinler ve sefalosporinlerin, birçok hastane kaynaklı enfeksiyonun tedavisindeki başarıları ispatlanmıştır [87-88]. Ancak bakteriyel patojenler arasında β -laktam direncinin artması, geniş spektrumlu yeni antibiyotiklere ihtiyaç olduğu gerçeğini ortaya çıkarmıştır. Karbapenemler, 1970'li yılların sonunda β -laktamazları inhibe eden yeni antibiyotikler bulmak amacıyla yürütülen böyle bir program çerçevesinde keşfedilmişlerdir [89-91]. Karbapenemler, penisilin ve sefalosporinlerin etki edemediğı anaerobik bakterilere karşı son derece yüksek aktivite gösterdiklerinden dolayı oldukça önemli bir gruptur. Geniş spektrumlu aktivitelerine ilave olarak aerobik ve fakültatif Gram-pozitif basillere karşı kullanıldıklarında post-antibiyotik bir etki gösterirler ve β -laktamazların varlığında kararlılıklarını koruyabilirler [87, 92-93]. Ancak *Bacillus* türleri, *Xanthomonas maltophilia*, bazı *Pseudomonas cepacia* izolatlarında ve nadiren bakteriosidlerde bulunan çinko aktiviteli β -laktamaz tarafından hidrolize edilirler [94]. Karbapenemler, kükürt atomunun yerini bir karbon atomunun

alması ve ikinci ve üçüncü karbonlar arasında bir çift bağ bulunması ile penisilinlerden ayrılırlar [88, 95]. Bu grup, tienamisinler, olivanik asitler ve karpetimisinler gibi doğal ürünleri ihtiva ederler. Tienamisin ilk keşfedilen karbapenem antibiyotiği olup, *Streptomyces cattleya* tarafından üretilmektedir. Bu antibiyotik Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere karşı çok geniş bir antibakteriyel spektruma sahiptir ve β -laktamazların çoğuna direnç gösterir [95-96]. *Streptomyces cattleya* tarafından üretilen tienamisin üzerinde yapılan radyoaktif izotop çalışmaları, tienamisin biyosentezinin penisilin ve sefalosporin biyosentezinde rol oynayan öncülerle ilişkili olmadığını göstermiştir [95]. Sefalosporin ve penisilin üretiminde kullanılan öncülerle tienamisin sentezi için gerekli öncülerin farklı olması karbapenemin yeni bir biyosentetik yolla sentezlendiğinin düşünülmesine yol açmaktadır. Karbapenemler β -laktamazlara dirençli olmalarına karşın bazı dezavantajları da vardır. Katı ve sıvı halde kararsız halde olup böbrekte bulunan dehidropeptidaz-I enzimi tarafından kolayca parçalanabilirler. Bu dezavantajlar yeni ve daha gelişmiş karbapenem arayışına neden olmuştur.

Keşiflerinden yaklaşık on yıl kadar sonra ilk ticari karbapenem olan imipenem (bir tienamisin türevi) ticari olarak satışa sunulmuştur (Şekil 1. 11). Ancak buda bir böbrek enzimi olan dehidropeptidaz tarafından kararsız hale dönüştürülebilmekteydi. Bu problem dehidropeptidaz-I' in etkili bir inhibitörü olan kilastatin ile çözülmüştür [97]. Karbapenem antibiyotiklerinin yeni bir üyesi olan meropenemin, imipeneme göre kararlı ve dehidropeptidaz-I'e daha dirençli olduğu bulunmuştur. Meropenem tıbbi öneme sahip olan Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere karşı geniş spektrumlu bir aktiviteye sahiptir [98]. Karbapenemler esasen *Streptomyces* türlerinden izole edilmişlerdir. Ancak, bu organizmada karbapenem biyosentezi üzerine yapılan araştırmalar; *Streptomyces* lerin yavaş üremesi, az ürün vermesi ve genetik çalışmalara yatkın olmaması, düşük üretim titresine sahip olması nedeniyle son derece sınırlı kalmıştır [95].

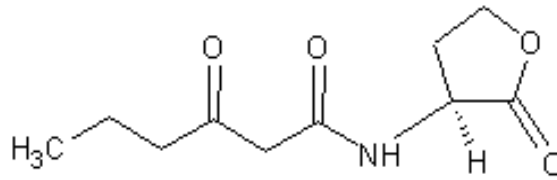


Şekil 1.11. Meropenem

1.5.2.1 *Erwinia herbicola*'da Karbapenem Üretimi

Olivanik asit ve thienamycin'e ilave olarak, diğer bir tarama programını takiben, bir seri doğal karbapenem daha keşfedilmiştir. *Serratia* ve bazı *Erwinia* türlerinden izole edilen 1-karbapen-2-em-3-karboksilik asit (karbapenem) de bunların arasındaydı [80, 99]. Bu karbapenem oldukça kararsız olup aktivitesi, donma veya yüksek konsantrasyon gibi koşullarda çabuk kaybolan bir maddedir. Ancak, bu antibiyotiğe duyarlı bir *E. coli* suşu kullanılarak kolayca tespit edilebilir.

Bu antibiyotik *Streptomyces*'ler deki çoklu antibiyotik üretiminin aksine *Serratia* ve *Erwinia* tarafından üretilen tek antibiyotiktir. Bu organizmalar tarafından üretilen tek antibiyotik olması, ayrıca hızlı üremeleri ve genetik çalışmalara yatkın olmaları nedeniyle karbapenem antibiyotik üretiminin çalışmalarında *Serratia* ve *Erwinia* türlerini cazip hale getirmiştir [80]. *E. herbicola*'da karbapenem üretimi, ortamdaki bakteri yoğunluğuna ve *N*-(3- oksoheksanol)-L-homoserin lakton (OHHL) adı verilen bir sinyal molekülünün varlığına bağlıdır [99] (Şekil 1.12).



Şekil 1.12. *N*-(3-oksoheksanol)-L-homoserine lakton (OHHL) yapısı

Ecc'de OHHL moleküllerinin varlığının tespit edilmesi bu bakteride de karbapenem biyosentezinin, *Vibrio fischeri*' de biyoişıma oluşumu ile benzer bir yolla gerçekleşebileceği fikrini ortaya çıkarmıştır. Daha sonraki çalışmalar bu fikri doğrulamıştır. Biyoişımada olduğu gibi karbapenem üretimi de hücre yoğunluğuna bağlıdır. Yapılan deneysel çalışmalar, antibiyotik üretiminin, hücre yoğunluğunun en yüksek düzeyde olduğu logaritmik fazın sonu ile durgun fazın başlarında gerçekleştiğini göstermiştir. Üreme ortamında OHHL konsantrasyonu belli bir eşik değere ulaştığında bu molekül CarR proteinine bağlanır ve karbapenem oluşumundan sorumlu genleri aktive eder. Çevreyi algılama sistemi ile kontrol edilen fizyolojik işlemler genellikle çevresel faktörler tarafından da etkilenirler. Örneğin; katabolit baskılaması, besin ve oksijen yetersizliği, sıcaklık şoku ve demir limitasyonun, *V. fischeri*'de lux sisteminin ekspresyonu üzerinde etkili olduğu bilinmektedir. Lux sistemine analog olması nedeniyle, karbapenem üretiminde de çevresel faktörlerden etkilenip etkilenmediğinin tespiti önemlidir [100].

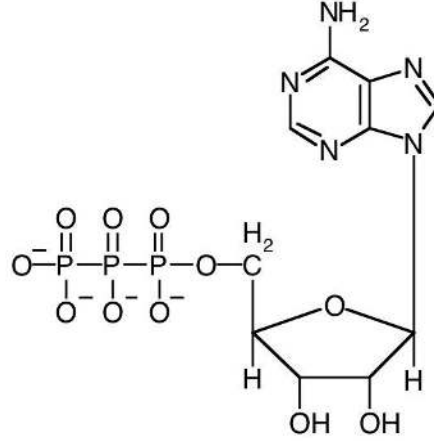
1.6 Hücresel Enerjetik

Enerji metabolizması, biyokimyasal ve fizyolojiksel aktiviteleri içeren kompleks işlevleri içerir [101]. Bir hücrenin büyümesinden ve bölünmesinden bir kalbin atışına, düşünmeyi oluşturan bir nöronun elektrik aktivitesine kadar, yaşamın her unsuru enerji gerektirir. Hücreler, çok sayıda kimyasal reaksiyonun ve taşıma işleminin zaman ve mekanda eşgüdümlü olarak düzenlendiği kompleks sistemlerdir ve çevrelerinden aldıkları maddeler ve enerji olmadan son derece organize yapılarını üretemez, sürdüremez ve kapsamlı metabolizmalarını yürütemezler [102]. Glikoliz, Krebs döngüsü, elektron transport sistemi ve oksidatif fosforilasyondaki bazı anahtar enzimler hücrelerin enerji seviyeleri tarafından regüle edilmektedir [101].

1.6.1 ATP (Adenozin trifosfat)

Dışsal enerji kaynakları biyolojik olarak evrensel hücre içi bir enerji kaynağı olan adenozin trifosfata yani ATP'ye dönüşmektedir. ATP, adeozin ribonükleozitine bağlanmış üç fosfat molekülü içermektedir (Şekil 1.13). Organizma nasıl bir hayat tarzına sahip olursa olsun, elde ettiği enerjinin bir kısmını ATP şeklinde korumak zorundadır. ATP ekzergonik tepkimeler sırasında oluşturulan ve belirli endergonik

tepkimelerde tüketilen en önemli hücresel enerji kaynağıdır. ATP molekülün yapısı incelendiğinde (Şekil 1.13) fosfat bağlarından ikisinin fosfoanhidrit olduğu görülmektedir. Dolayısıyla bunların hidrolizi için serbest enerji 30 kJ'dan fazladır. Şöyle ki; $ATP \rightarrow ADP + P_i$ ve $ADP \rightarrow AMP + P_i$ tepkimelerinin her biri yaklaşık olarak 32 kJ/mol enerji açığa çıkarmaktadır.



Şekil 1.13. Adenozin trifosfat (ATP) yapısı

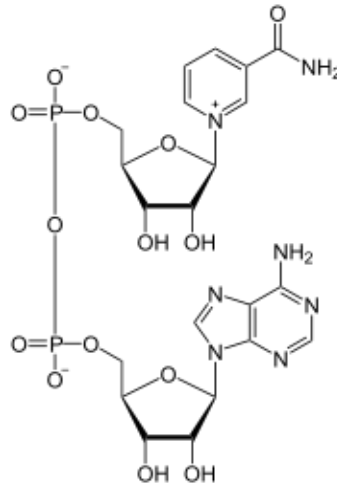
Her ne kadar ATP hidrolizinden açığa çıkan enerji yaklaşık -32 kJ olsa da, ATP sentezi için gereksinimlerinin tam olarak tanımlanması için buraya bir uyarı eklenmesi gerekmektedir. Aktif olarak büyümekte olan bir hücrede, ATP/ADP oranı yüksek tutulur ve bu oran takriben 1000'dir. Bu durum ATP sentezi için enerji gereksinimlerini önemli ölçüde etkilemektedir. Aktif bir şekilde büyüyen hücrede bir molekül ATP sentezi için aktüel enerji gereksinimi (yani ΔG) -55 ile -60 kJ arasındadır.

ATP, hücrede dinamik bir dönüşüm içindedir; biyosentetik tepkimeleri gerçekleştirebilmek için sürekli yıkıma uğramaktadır ve katabolik tepkimeler sırasında tekrar sentezlenmektedir. Bununla birlikte, aktif olarak büyümekte olan bir hücrede ATP konsantrasyonu oldukça düşük olup, yaklaşık 2 milimolar (mM) kadardır. Mikroorganizmalar uzun dönemli enerji deposu olarak oksitlenebilen ve suda çözünmeyen polimerler üretir ve bunları daha sonra ATP üretimi için kullanırlar. Prokaryotlardaki uzun dönemli enerji depolarına glukoz polimeri olan glikojen, lipid polimeri olan poli- β -hidroksibütirat ve diğer polihidroksialkonatlar örnek verilebilir. Bu polimerler hücre içerisinde ışık ya da elektron mikroskobu ile görülebilecek kadar büyük polimerler halinde depolanmaktadır. Ökaryotik mikroorganizmalardaki en temel

depo maddeleri, glukoz polimeri olan nişasta ya da basit yağ formundaki lipidlerdir. Çevrede enerji kaynağı bulunmayan durumlarda, yeni hücre materyallerini oluşturmak ya da hücre bütünlüğünü sürdürmek için gerekli olan enerji, bu polimerlerin oksidasyonundan sağlanmaktadır [103].

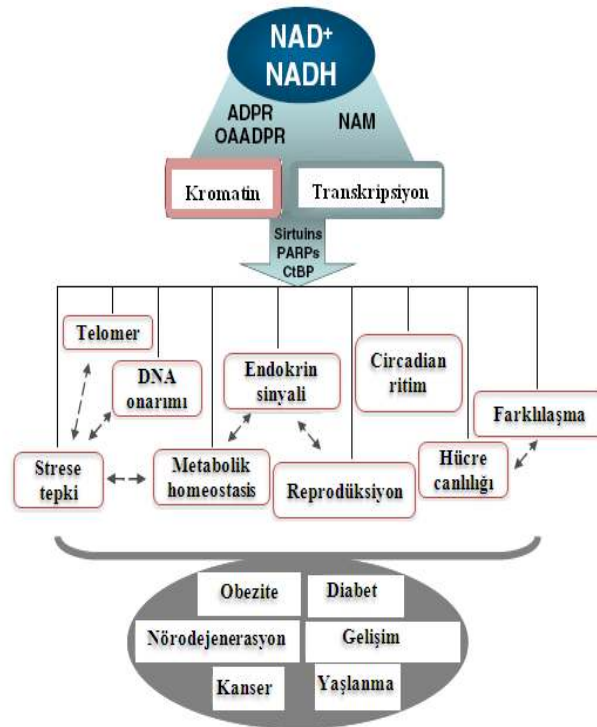
1.6.2 NAD (Nikotinamid Adenin Dinükleotid)

Hücrelerde enerji eldesi oksidasyon-redüksüyon tepkimelerini gerektirmektedir. Birçok enzim, kataliz işlemine katılan ancak protein yapısında olmayan küçük moleküller içerir. Enzim ile birlikte iş gören bu küçük moleküller enzim ile ortaklık kurma şekillerine göre prostetik gruplar ve koenzimler olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Prostetik gruplar enzimlerine kovalent bağlarla ve daimi olarak sıkıca bağlanmışlardır. Sitokromlarda bulunan hem grubu prostetik gruplara örnek verilebilir. Koenzimler ise enzimlere gevşek olarak bağlanır ve tek bir koenzim molekülü birkaç farklı enzim ile ilişkiye girebilir. Koenzimlerin çoğu vitaminlerin türevleridir. Örneğin NAD^+ , NADH , niasin ve B_3 vitamininden türevlenen ve birçok metabolik reaksiyona eşlik eden önemli bir anahtar metabolittir. NAD ve NADP , hücresel savunmada ve sinyal iletimi gibi metabolik dönüşümlerde rol oynamaktadır. Her iki koenzim enerji transdüksiyonunda ve biyolojik süreçlerde elektron taşıyıcıları olarak işlev görmektedir [104].



Şekil 1.14. NAD^+ yapısı

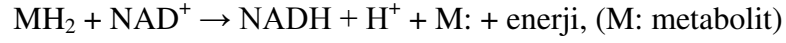
Proliferasyon, farklılaşma ve ölüm gibi birçok hücresel süreç hücrenin redoks durumuna bağlıdır. Hücresel NAD(H) seviyeleri transkripsiyonu doğrudan ya da dolaylı olarak etkilemektedir [105]. NAD (NAD^+) veya onun redükte formu olan NADH, biyolojik sistemlerde kofaktörlerdir (Şekil 1.15) [106]. NAD^+ ve NADPH'nin farklı biyokimyasal işlevleri vardır (Şekil 1.15). NAD^+ glikoliz ve sitrik asit döngüsünde büyük miktarda kullanılmaktadır. NADP pentoz fosfat yolu ile üretilmekte ve nükleik asit ile yağ asitlerinin biyosentezinde gereklidir.



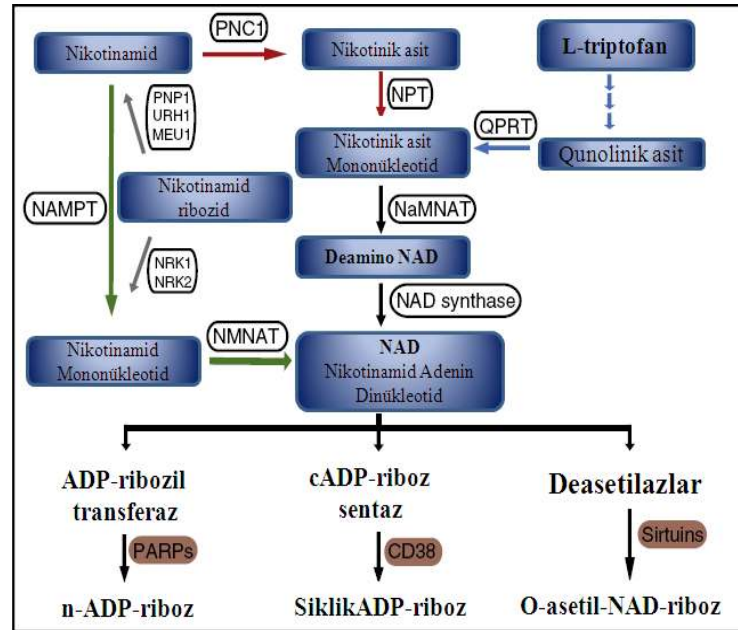
Şekil 1.15. Fizyolojide NAD'ın merkezi rolü

Organizmalarda NAD *de novo* olarak triptofan ve aspartik amino asitlerinden sentezlenmektedir. *De novo* NAD biyosentezi, hayvanlarda ve bazı bakterilerde ya L-triptofandan yada bitkiler ve yine bazı bakterilerde L-aspartattan QA(qunolinik asit) üretmek için birçok basamağı içermektedir (Şekil 1.16). Hem NAD^+ hem NADP^+ messenger moleküllerin öncülleri olarak sinyal iletiminde gereklidirler [104-105].

Hücrelerde NAD^+ , niyasinden üretilir ve oksidasyon-redüksüyon tepkimelerinde elektron taşımaktadır. Bu süreçte NAD^+ bir elektron ve bir çift proton elde eder, kendisi NADH'ye indirgenir ve bir proton da salınır:



NADH'de depolanan indirgeme potansiyeli, aerobik elektron taşıma zinciri aracılığıyla ATP üretiminde veya anabolik metabolizmada kullanılabilir. ATP hücrelerde yaygın olarak kullanılan bir enerji kaynağıdır ve aerobik şartlarda NADH'nin ATP sentezi için gerekli enerjiye olan katkısı çok önemlidir. Ancak oksijen eksikliğinde (örneğin hipoksia) NADH'den NAD^+ 'nin yeniden üretimi hücrenin ATP gereksinimini karşılamaya yeterli değildir. Buna karşın glikoliz oksijen gerektirmez ama NAD^+ 'nin yeniden üretimini gerektirir.



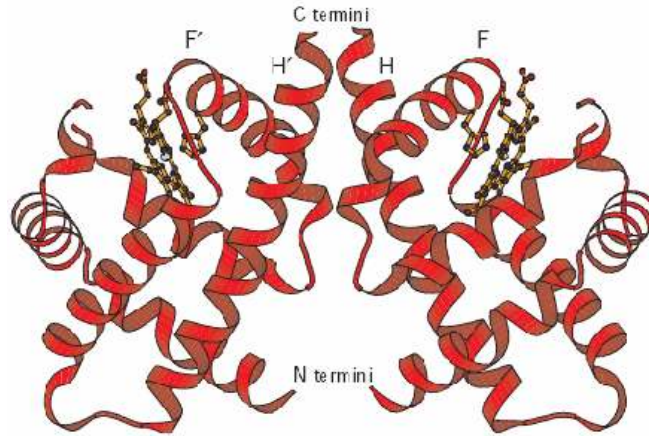
Şekil 1.16. NAD metabolizması, dört farklı öncüden NAD biyosentezi: nikotinamid, nikotinik asit, triptofan ve nikotinamid ribozid

1.7 *Vitreoscilla* Hemoglobini (VHb)

Son on yılda mikrobiyal hemoglobinler arasında büyük bir yapısal ve işlevsel çeşitlilik keşfedilmiştir. 1986 yılına kadar hemoglobinler ökaryotik orijinli proteinler olarak bilinmekteydi. Fakat Dr. Webster ve arkadaşları gram-negatif bir bakteri olan *Vitreoscilla stercoraria*'nın doğal olarak hemoglobin (VHb) içerdiğini saptamışlardır [107-108]. *Vitreoscilla*, aerobik veya mikroaerofilik bir genus olan *Beggiatoa* familyasına ait ipliksi bir bakteridir. *Beggiatoa* cinsi tatlı su sedimentleri gibi oksijenin

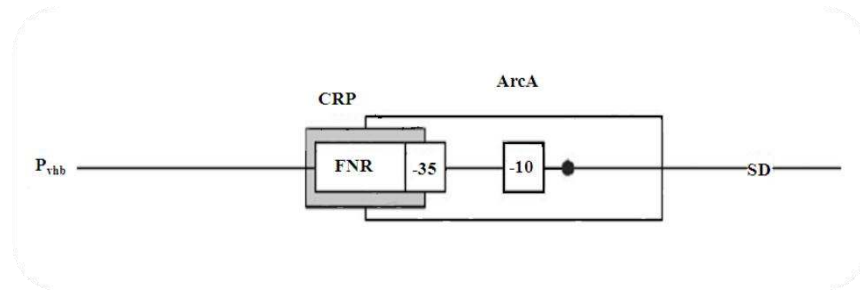
sınırlı olduğu yerlerde bulunurlar. Bir tür (*Vitreoscilla stercoraria*) tam anlamıyla aerobik bir türdür ve hipoksik koşullarda yaşamını sürdürebilmek için çözünebilir bir hemoglobin (VHb) sentezler [109].

VHb'nin yapısı klasik globin katlanmasına uymakta ve ökaryotik hemoglobinleri ile yüksek bir homoloji göstermekte olup klasik 8-helikse (A-H) sahip olup, globin katlanması göstermektedir (Şekil 1.17). Monomerik VHb'nin 146 amino asit uzunluğundaki dizisinden hesaplanan moleküler büyüklüğü 15,775 Dalton olarak belirlenmiştir. VHb iki benzer alt üniteye sahip ve her molekülde iki tane *b hem* taşıyan homodimerik bir yapıdır. Molekül ağırlığı 616 Dalton olan hem grubu ($C_{34}H_{32}FeN_4O_4$)'nun yapıya katılması ile toplam moleküler kütle 16,931 Dalton'u bulmaktadır [145-146]. Klasik bir globin katlanması sergileyen *Vitreoscilla* hemoglobini proksimal ve distal *hem* ceplerinde sıra dışı yapılara sahiptir [108, 110]. Benzersiz yapısal organizasyonu ve farklı konformasyon durumlarında kalma yeteneği VHb'nin birden fazla işlevi gerçekleştirmesine olanak tanımaktadır. VHb, birçok heterolog konakçının enerji metabolizması mühendisliği için özellikle yararlıdır ve çeşitli biyoteknolojik uygulamalar için çok yönlü bir araç olarak işlev görmektedir [108]. Şekil 1.17'de VHb'nin yapısı gösterilmiştir.



Şekil 1.17. VHb'nin yapısı. İki benzer alt üniteye sahip ve her molekülde iki tane *b hem* taşıyan homodimerik yapıda, “hem” grubunun lokalize olduğu yer sarı renk ile gösterilmiştir. Ökaryotik hemoglobinler ile yüksek bir homoloji gösteren VHb'nin yapısı 8-heliksli (A-H) klasik globin katlanmasına uymaktadır [145-146]

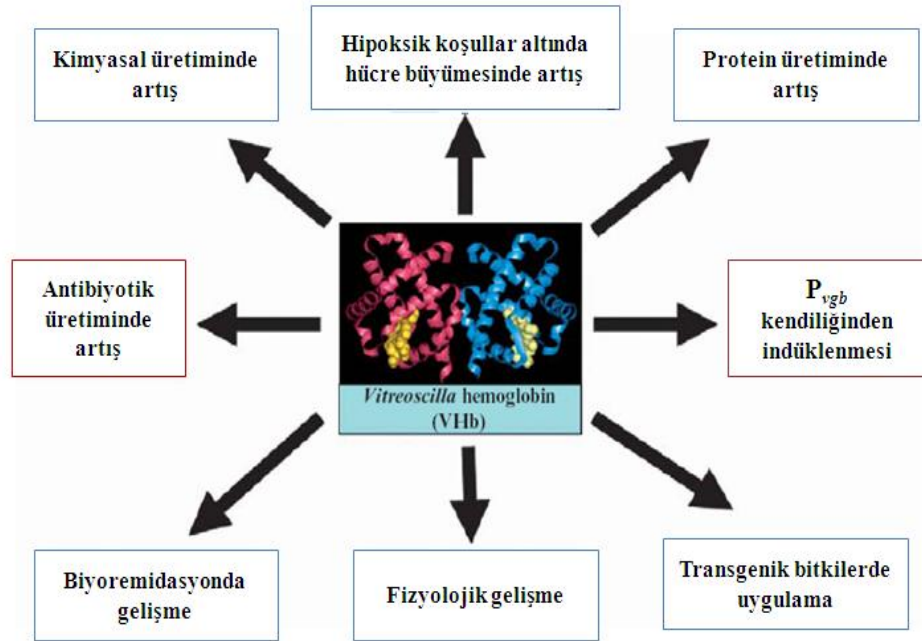
Vitreoscilla hemoglobin geni (*vgb*) promotor-operatör bölge ve hemoglobini kodlayan bölge ile toplam 648 nükleotidden oluşmaktadır. Genin promotoru oksijene duyarlı bir promotordur ve aynı zamanda katabolit baskılanma gösterir. Promotorun oksijene duyarlı olmasını üzerinde taşıdığı FNR ve ArcAB proteinlerine özgü dizilerden sağlar. Katabolit baskılanmayı ise promotor üzerinde bulunan cAMP-CRP bağlanma bölgesi sağlar [111]. Güçlü bir promotor olan *vgb* promotoru -35 korunmuş dizisi taşımaz. Ancak pribnow kutusundan 20 nükleotid geride katabolit aktivatör protein bağlanma bölgesine benzer bir bölge vardır (Şekil 1.18) [17, 112-113].



Şekil 1.18. *E. coli* transkripsiyon sistemi tarafından tanınan *vgb* promotoru. Shine-Dalgarno (SD) bölgesi, transkripsiyon başlama bölgesi (●), -10 ve -35 dizileri, ArcA, CRP ve FNR bağlanma bölgeleri. Yatay çizgi (—) promotorun AUG başlama kodonununun akış-yukarı 150 nükleotidlik fragmanı göstermektedir

Oksijene bağımlı *vgb* promotoru (P_{vgb}) oksijenin sınırlı olduğu koşullar altında indüklenmektedir. P_{vgb} , transkripsiyonel seviyede regüle olmakla beraber, mikroaerobik koşullar altında ve çözünmüş oksijen seviyesi doymuş havanın % 2'sinden daha az olduğu zaman hem *E. coli* hem de *Vitreoscilla*'da maksimum seviyede indüklenmektedir. *E. coli* 'de P_{vgb} 'nin transkripsiyonel aktivitesi CRP (cAMP reseptör proteini) ve FNR (fumarat nitrat redüksiyon regülatörü) tarafından pozitif şekilde ayarlanmaktadır. FNR, *E. coli* 'de çevredeki mevcut oksijeni takip eden global bir transkripsiyonel regülatördür. FNR sistemi, hücre içi oksijen seviyeleri değiştiği zaman, oksijenle regüle olan birçok genin transkripsiyonunu regüle ederek, aerobik metabolizmadan anaerobik metabolizmaya bağlantıyı kontrol eder. ArcA, P_{vgb} 'nin pozitif regülasyonunda bulunan diğer bir önemli oksijen sensörüdür. Düşük oksijen seviyelerinde maksimum indüksiyona ulaşmak için hem ArcA hem de FNR sistemlerine ihtiyaç duyulur. Ayrıca P_{vgb} 'nin indüksiyonu, ortama kompleks bir azot kaynağının

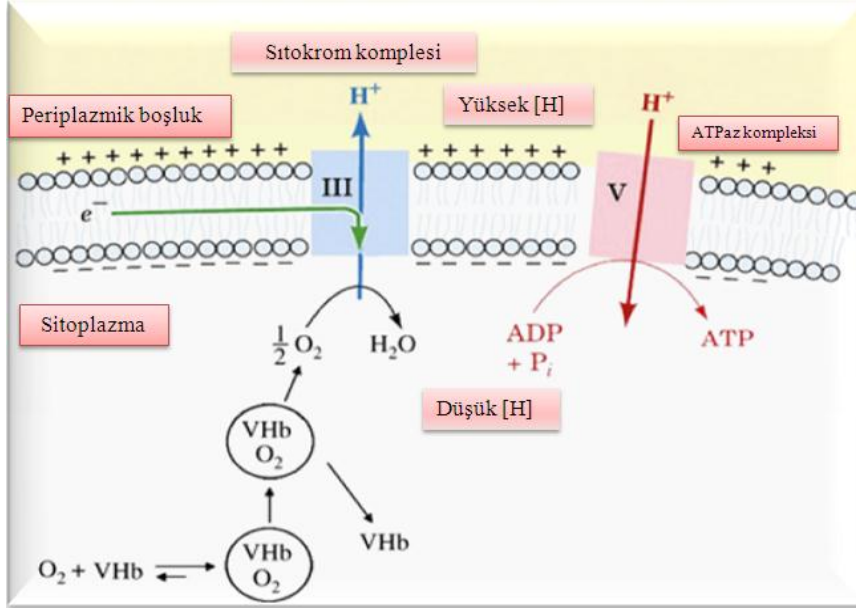
(örneğin maya ekstratı gibi) ilave edilmesiyle baskılanabilir. Protein mühendisliği, biyoteknolojiksel uygulamalarında VHb'nin özelliklerini geliştirmek için yeni yöntemler sağlamaktadır (Şekil 1.19) [114-115].



Şekil 1.19. *Vitreoscilla* hemoglobininin (VHb) potansiyel uygulamaları

1.7.1 VHb fonksiyonunun Mekanizmaları

Oksijen bağlama ve taşıma ajanı olarak rol alan *Vitreoscilla* hemoglobinin, mikroaerobik koşullar altında çözünmüş oksijen konsantrasyonunda intrasellüler etkisi artmakta ve çözünmüş oksijendeki artış hem sitokrom *o* hem de sitokrom *d* aktivitesini arttırmaktadır. Öte yandan sitokrom *o* spesifik aktivitesi sitokrom *d*'den daha hızlı bir şekilde arttırarak proton pompasında artışa sebep olmaktadır (Şekil 1.20). Böylece sitoplazmadaki ATPaz yoluyla bu proton gradiyenti sayesinde ATP üretilmektedir [116]. Hem sitokrom *o* hem de sitokrom *d* terminal oksidazlardan yoksun VHb geni aktarılmış iki *E. coli* mutantının karbon kaynakları olarak sukkinat ve laktat'ın bulunduğu aerobik substratlarda gelişebildikleri gösterilmiş ve VHb'nin kendisinin bir terminal oksidaz fonksiyonu barındırdığı kabul edilmiştir [117].

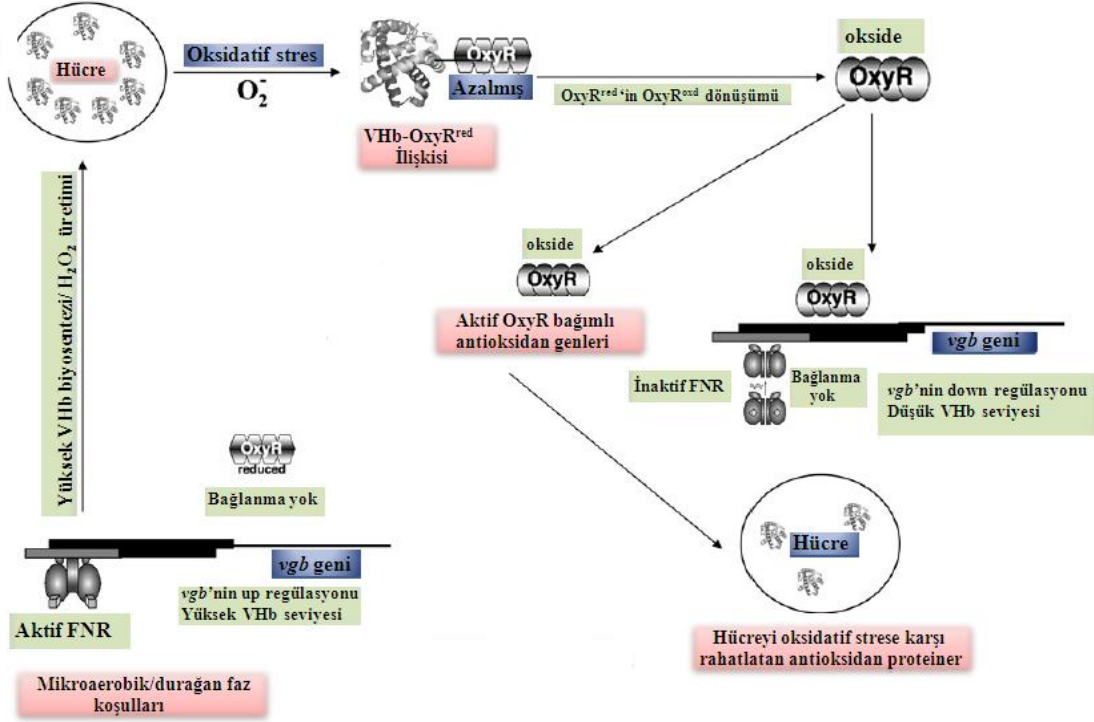


Şekil 1.20. Düşük oksijen yoğunluğunda *Vitreoscilla* hemoglobinin rolü

Bu proteini bulunduran hücrelerin daha oksitlenmiş durumda bulunmaları, VHb'nin hücrelerin karbon metabolizması akış şemalarında önemli yeniden düzenlemelere sebep olması ile ilgilidir. Her ne kadar bunun nasıl sağlandığı kesin olarak ortaya konmamışsa da, NAD^+/NADH ve ATP/ADP oranlarında olan önemli değişimlerin esas teşkil ettiği sanılmaktadır. VHb içeren hücrelerde NADH seviyesinde düşüş ATP miktarında ise artış gözlenmektedir. Dolayısı ile NAD^+/NADH ve ATP/ADP oranlarında meydana gelen önemli değişimler hücrenin karbon bileşiklerini kullanımı yollarında önemli değişime neden olur. Bu bağlamda VHb ekspresyonu yapan *Enterobacter aerogenes*'de gözlenen % 80 artışın bu tür bir metabolik akış şeması değişikliğinden olabileceği bildirilmiştir [27, 118].

Ayrıca ribozom ve tRNA içeriğinin araştırılması neticesinde, VHb ekspresyonu yapan hücrelerin kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığında önemli oranda yüksek ribozom ve tRNA seviyelerine ulaştığı ortaya çıkmıştır. Bu sonuç kültürasyonun sonunda VHb ifade eden hücrelerin VHb-negatif kontrole göre iki kat daha fazla 70S ribozom ve tRNA'lar içerdiğini gösteren önceki çalışmayla uyum göstermektedir. Bu etki VHb vasıtasıyla translasyonel komponentlerin artmasından kaynaklanıyor olabilir [117].

Son zamanlarda VHb ve transkripsiyon faktörü OxyR (oksidatif strese gerekli bir regülasyonu kontrol eder) arasında bir ilişki olduğu rapor edilmiştir (Şekil 1.21).



Şekil 1.21. VHb ve OxyR arasındaki ilişki. VHb seviyelerinin OxyR'nin okidize durumuna dönüşümünü kontrol etmektedir

VHb hem endojen oksidatif türlerin üretimine hem de eksojen hidrojen peroksite karşı savunma sağladığı ve aynı zamanda süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) seviyelerini artırmakla ilişkili olduğu belirtilmiştir. Bu sonuçlar oksidatif strese karşı VHb'nin koruyucu etkisiyle ilgili ilk çalışmaları desteklemektedir. VHb'nin oksidatif strese karşı koruyucu etkisi, heterolog hücrelerdeki üretkenliğin artırma yeteneğinden kaynaklanıyor olabileceği belirtilmiştir [119].

1.7.2 VHb Metabolik Mühendislikteki Uygulamaları

1991 yılında, James Bailey “metabolik mühendislik” olarak adlandırılan yeni bilim ile “Rekombinant DNA teknolojisini, hücresel aktivitesindeki fonksiyonların düzenlenmesi, taşınması ve enzimatik kullanımı” olarak tanımlamıştır [120]. Son yıllarda yaygın olarak kullanılmaya başlanılan “*metabolomik*” terimi, belli zaman ve ortamda organizmadaki veya hücredeki metabolik olayların bir bütün olarak nasıl etkilendiğini ifade etmek için ortaya atılmıştır [5].

Çizelge 1.1’de 2005 yılından önceki yıllarda VHb’nin metabolik mühendislikteki uygulamaları verilmiştir. vgb/VHb teknolojisinin son yıllardaki (2005’ten sonrası) uygulamaları ise Çizelge 1.2 ile Çizelge 1.6 arasındaki çizelgelerde verilmiştir.

Çizelge 1.1. VHb'nin metabolik mühendislikteki uygulamaları

Kategori	Organizma	VHb Etkisi
Protein üretimi	<i>S. occidentalis</i>	α -amilaz aktivitesinde ve total protein içeriğinde artış, L-laktamaz aktivitesinde % 61 artış
	<i>E.coli</i>	Toplam hücre proteininde % 30, CAT aktivitesinde % 80, L-galaktozidaz aktivitesinde 40% artış
	<i>B.subtilis</i>	Proteaz (%30) ve α -amilaz aktivitesinde (% 1 5) artış ve protein salınımında 1.5 kat artış
	<i>P. pastoris</i>	Büyümede ve heterolog protein üretiminde artış
Kimyasal üretimi	<i>G. amarae</i>	Biyosüpfektan üretiminde artış
	<i>E. aerogenes</i>	Aseton ve 2,3-bütandiol üretiminde % 80 artış, hücrelerin böyle bir ortamda daha uzun süre canlı kalmaları,
	<i>E.coli</i>	Poli-beta-hidroksi bütirat (PBH) birikimi ve büyümede gelişme,
	<i>Saccharomyces sp.</i>	D-arabitol üretkenliği ve ürün gelişimi
Antibiyotik üretimi	<i>A. chrysogenum</i>	Sefalosporin C üretiminde 3.2 kat artış
	<i>S. erythraea</i>	Eritromisin üretiminde artış
	<i>S. cinnamomensis</i>	Monensin ve büyümede artış
	<i>S. aureofaciens</i>	Klorotetrasiklin (CTC) ürününde artış
Biyoremidasyon	<i>P.aeruginosa</i>	2,4-dinirotoluen (DNT) yıkımı, büyümede artış,
	<i>X. maltophila</i>	Canlı hücre sayısında % 15 artış, benzoik asitin yıkımında artış
	<i>Burkholderia sp.</i>	Biyomasta % 15, 2,4-dinirotoluen DNT parçalanmasında 2 kat, 2-klorobenzoat (2-CBA) ve benzoik asitin yıkımında artış
Gelişme	<i>T. fuciformis</i>	Büyümede artış
	<i>E.coli</i>	Bakır alınımında ve ferritin üretiminde artış
	<i>E. aerogenes</i>	Civa ve kadmiyuma duyarlılıkta artış, oksijen alımı ve büyümede artış
	<i>P. pastoris</i>	Beta galaktozidaz aktivitesinde artış,
	<i>S. lividans</i>	Kültür sonu hücre yoğunluğunda % 50 artış

Çizelge 1.2. Biyoremediasyonda vgb/VHb teknolojisinin son uygulamaları

Organizma	Biyoremediasyon	Çalışma
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Benzen, tolüen, ksilen	[121]
<i>Burkholderia cepacia</i>	2-klorbenzoat	[122-123]
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Kadmium	[124]
<i>Gordonia amarae</i>	Biyosülfaktan	[125]
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Dibenzotiofen; sülfür (dizel yağından)	[126]
<i>Pseudomonas putida</i>	Benzen, tolüen, klorobenzen	[127]
<i>Pseudomonas delafieldii</i>	Sülfür (dizel yağından)	[128]

Çizelge 1.3. Antibiyotik üretiminde vgb/VHb teknolojisinin son uygulamalar

Organizma	Antibiyotik	Çalışma
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Penisilin	[129]
<i>Saccharopolyspora erythraea</i>	Eritromisin	[130]
<i>Amycolatopsis mediterranei</i>	Rifamsin b	[36]
<i>Tolypocladium niveum</i>	Siklosporin A	[131]
<i>Acremonium chrysogenum</i>	Sefalosporin C	[132]
<i>Phellinus igniarius</i>	Flavonlar, eksopolisakkaritler	[133]

Çizelge 1.4. Polimer üretiminde vgb/VHb teknolojisinin son uygulamaları

Organizma	Polimer	Çalışma
<i>Escherichia coli</i>	Hidroksibütirat-hidroksihekzonat karışım polimeri	[134]
<i>Acetobacter xylinum</i>	Bakteriyel sellüloz	[135]
<i>Acetobacter xylinum</i>	Bakteriyel sellüloz	[136]
<i>Acetobacter xylinum</i>	Bakteriyel sellüloz	[136]
<i>Escherichia coli</i>	Polihidroksibütirat	[137]

Çizelge 1.5. Çeşitli biyokimyasal üretiminde vgb/VHb teknolojisinin son uygulamaları

Organizma	Biyokimyasal	Çalışma
<i>Schwanniomyces occidentalis</i>	α -amilaz	[138]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	L-asparaginaz	[139]
<i>Bacillus thuringiensis</i>	İnsektisidal kristal protein	[140]
<i>Bacillus subtilis</i>	Hiyaluronik asit	[141]
<i>Pichia pastoris</i>	S-adenosilmetionin	[142]
<i>Escherichia coli</i>	Midyedeki adhezyon proteini	[143]
<i>Escherichia coli</i>	D-amino asit oksidaz	[144]
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	L-glutamat, L-glutamin	[145]
<i>Citrobacter freundii</i> and <i>Erwinia herbicola</i>	L-DOPA, dopamin	[34]
<i>Bacillus subtilis</i>	Poly γ -glutamik asit	[146]
<i>Gluconobacter oxydans</i>	Dihidroksiaseton	[132]
<i>Escherichia coli</i>	Etanol	[147]

Çizelge 1.6. Yüksek bitkilerde strese toleranslık, üretim, çimlenme ve büyümede

Organizma	Gelişmiş özellikler	Çalışma
Pirinç	Büyüme, üretim	[148]
Lahana	Çimlenme; su altı stres toleransı	[149]
Kavak	Büyüme	[150]
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Çimlenme; su altı stres toleransı, nitrosatif, oksitativ stres	[151]

Bu çalışma, gram negatif bir bakteri olan *E. herbicola* bakterisi ile onun *vgb*⁻ (Eh[pUC8]) ve *vgb*⁺ (Eh[pUC8:15]) rekombinant suşlarındaki indol-3-asetik asit (IAA), β -karoten, likopen gibi önemli karotenoidlerin, fenazin ve karbapenem gibi antibiyotiklerin ve C vitamininin farklı besiyeri ortamlarındaki üretimlerini içermektedir. Ayrıca bahsi geçen bu metabolitlerin üretimi üzerine katabolik represyon ve VHB'nin etkisini kapsamaktadır.

Yukarıda bahsi geçen tüm ikincil metabolitlerin sentezinin genetik faktörlerin yanında çevresel şartlardan da (ör. karbon kaynağı ve oksijen gibi) önemli derecede etkilendiği rapor edilmiştir [8, 152-153]. Bu çalışmada VHB gibi önemli bir oksijen alım ajanını endojen olarak ifade eden rekombinant *E. herbicola*'da ana metabolik aktivitelerin ve yukarıda bahsi geçen ikincil metabolitlerin sentezinin nasıl düzenlendiği ilk defa araştırılmıştır. Bütün bunların bakterinin bitki ile ilişkisinde ne anlama geldiğinin çalışılmasının yanında, etkin bir oksijen alım sisteminin bakterinin büyüme ve çoğalması ile oksijen alımı üzerindeki etkisi de araştırılmıştır. Ayrıca bu bakterilerin hücre metabolizmasının enerjetik durumunun anlaşılması açısından ATP ve NAD üretimlerindeki değişimleri de çalışılmıştır. Endüstriyel açıdan önemli ürünler olan IAA, β -karoten, likopen, C vitamini, fenazin ve karbapenemin VHB/*vgb* sistemini içeren rekombinant mikroorganizmalar kullanılarak mikrobial üretimi bu çalışmada ilk kez araştırılmıştır. Diğer bir deyimle, *E. herbicola*'da değişik genetik (*vgb*) ve çevresel (oksijen, glukoz, fruktoz, sükroz gibi) şartlar altında ana metabolik yolların akış şemalarının nasıl etkilendiği ve bunların endüstriyel öneme haiz ikincil metabolit sentezindeki rolü detaylı bir şekilde ilk defa ortaya konulmuştur.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Genetik mühendislik ile ilgili yapılan çalışmaların hızla ilerlemesi ilaç üretimi için yeni çözümleri de beraberinde getirmiştir. Bakteriler tarafından herhangi bir genetik manipülasyona gerek duyulmadan endüstriyel boyutlarda üretilen birçok ürün bulunduğu gibi, bakterilerin kendileri tarafından yapılamayan ancak çeşitli endüstrilerde yüksek kullanım potansiyeli olan birçok ürün rekombinant teknikler kullanılarak başarılmaktadır. Bakteriyel fermentasyonlarla üretilen birçok ikincil metabolitin sentezinde başlıca sınırlayıcı faktörün ortam oksijen seviyesi olduğu ve ileri kültür fazlarında oksijenin hücreler tarafından alımı ve etkin kullanımının belirleyici rol oynadığı iyi bilinmektedir. Diğer bir deyimle, biyofermantasyonların ileri fazlarında ürün birikimi ve hücrelerin yaşlanmasına bağlı olarak kritik oksijen seviyesinin korunamaması hem biyokütle hem de ürün oluşumu üzerinde negatif etki yaratmaktadır.

Bilindiği üzere β -laktam antibiyotikleri prokaryotik ve ökaryotik organizmalar tarafından üretilmektedir. Yapılan bir çalışmada β -laktam biyosentezinden sorumlu olan genlerin kümeler halinde organize olduğu, ancak farklı genlerin yerlerinin tanımlanamadığı bildirilmiştir. Prokaryotlarda biyosentez genlerinin, antibiyotik (*cmcT*) akışı için direnç genleri (*bla*, *PBP*) ile birlikte kümelendiği belirtilmiştir [154]. Karbapenem ailesinden imipenem ve meropenem, insanlarda sistemik kullanım için en geniş kullanılan aktif antibiyotiklerdir. İmipenem ve meropenem dirençliliğinin, *P. aeruginosa* enfeksiyonu tedavisi sırasında ortaya çıktığı rapor edilmiştir. Ayrıca *Stenotrophomonas maltophilia*'nın hem imipeneme hem de meropeneme karşı tipik olarak dirençlilik gösterdiği bildirilmiştir. Penisilin gibi karbapenemler *Enterococ*'a karşı inhibitör aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir. Genelde, aerobik gram negatif *Basil*'e karşı *in vitro* meropenemin aktivitesinin, imipenemden daha fazla olmasına karşın, aerobik gram pozitif *Cocci*'ye karşı *in vitro* imipenem aktivitesinin meropenemden daha fazla etki gösterdiği ortaya konmuştur [96].

Yapılan bir çalışmada, bakteriler kullanılarak β -laktam içeren moleküllerin üretimi gerçekleştirilmiştir. *Serratia* ve *Erwinia* türlerinin kullanıldığı çalışmada basit bir karbapenem olan SQ27860'ın izolasyonunun ve yapısal tayininin yapıldığı rapor edilmiştir [155]. Başka bir çalışmada *Erwinia carotovora*'nın, β -laktam antibiyotiği olan karbapenemleri, bir sinyal algılama molekülü olan N-(3-oksoheksanol)-L-

homoserin laktone (OHHL) yanıt olarak ürettiği bildirilmiştir. OHHL bağımlı ilk biyosentetik promotor genin üst bölgesinde, *carA* haritasının bulunduğu belirtilmiştir. Doğal karbon kaynakları ve karbapenem üretimini etkileyen büyüme sıcaklığı, OHHL sinyal molekülünün düzeyi ile değişmekte ve böylece bakteri çoğunluğu algılama sisteminin fiziksel olarak ayarlandığı ortaya konmuştur [156]. Diğer bir çalışmada, Gram-negatif bakterilerden *Serratia* ve *Erwinia*'nın bir β -laktam antibiyotiği olan 1-karbapen-2-em-3-karboksilik asiti ürettiği bildirilmiştir. *Erwinia carotovora*'da bu karbapenemi üreten genlerin sırasının belirlendiği ve klonlanmasının yapıldığı rapor edilmiştir. Bu genlerin, *carR* gen kodları ve LuxR-tip transkripsiyon aktivatörüyle kontrol edildiği belirtilmiştir ve *carA-H* operonu olarak düzenlendiği rapor edilmiştir. [157]. Ayrıca *Erwinia carotovora* GS101 suşunun da karbapenem antibiyotiği olan 1-karbapen-2-em-3-karboksilik asiti ürettiği bildirilmiştir [158]. Yine bitki patojeni olan *Erwinia carotovora*'nın, N-3-oksoheksanol-L-homoserin laktone (3-okso-C6-HSL) üzerinden, virulans faktörlerin ekspresyonunu ve antibiyotik üretimini düzenlediği ortaya konmuştur. *Erwinia carotovora* ATCC 39048'nin karbapenem antibiyotiği olan 1-karbapen-2-em-3-karboksilik asiti ürettiği rapor edilmiştir. *Erwinia carotovora* ATCC 39048'de karbapenem antibiyotiğinin biyosentezinde N-(3-oksoheksanol)-L-homoserin laktone (HSL), otoregulator kontrol sağladığı bildirilmiştir [159].

β -laktam grubu antibiyotiklerin üretimi, karbon kaynakları, nitrojen, amino asitler, pH ve oksijen gibi çevresel faktörler tarafından kontrol edilmektedir. Yapılan bir çalışmada sıcaklık, oksijen limitasyonu, farklı karbon kaynakları, fosfat, azot ve NaCl gibi çeşitli çevresel faktörlerin karbapenem sentezi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. 30, 32 ve 34°C derecelerde karbapenem üretimi gerçekleşirken, sıcaklık 36°C yükseltildiğinde üretimde büyük bir düşüş olduğu, 37°C ise tamamen durduğu rapor edilmiştir. Kullanılan karbon kaynağının farklı olmasının karbapenem üretiminde de farklılıklara yol açtığı bildirilmiştir. Karbon kaynağı olarak fruktoz içeren ortamda antibiyotik üretimi daha fazla miktarda olduğu, aynı şekilde farklı tuz konsantrasyonlarının da antibiyotik üretimini etkilediği ortaya konmuştur. Çalışmada, karbapenem üretiminin sadece genetik faktörlerin kontrolü altında olmadığını aynı zamanda çeşitli çevresel faktörlerin de üretimde etkili olduğu vurgulanmıştır [160].

Fenazinerler, hücrelerel redoks durumunu modifiye etmek için gen ekspresyonunu düzenleyen, biyofilm oluşumuna katkı sağlayan ve hücrelerin canlılığını arttıran hücre sinyalleri olarak davranırlar ve terminal alıcıları değiştirmek için elektron mekikleri

olarak işlev görürler. Fenazinler ökaryotik konaklarda ve konak oldukları üzerinde çok sayıda konak hücrel cevapların modifikasyonlarında içeren çok çeşitli etkilere sahiptir. Fenazinler ayrıca bitkilerde gelişimi etkileyebilir ve sistemik direncin uyarılmasına yol açabilir [83, 161].

Fenazin üretimine yönelik bir çalışmada, farklı artropodların bağırsaklarından izole edilen *Streptomyces anulatus* 9663'ün fenazin 1-karboksilik asitin prenilenmiş türevlerini ürettiği tespit edilmiştir. Bu organizmada *ppzP* geninin belirlendiği ve bu genin, *Pseudomonas* suşlarında fenazin 1-karboksilik asit biyosentezi sırasında işe karıştığı bilinen genlerin kümesinde bulunduğu belirtilmiştir. Bunun, *Streptomyces*'lerden elde edilen doğal fenazin bileşiğinin ilk tam gen kümesi olduğu belirtilmiştir. *Streptomyces coelicolor* M512'de bu gen kümesinin heterolog ifadesi, fenazin 1-karboksilik asitin prenilenmiş türevlerinin oluşumuyla sonuçlandığı bildirilmiştir [161].

Başka bir çalışmada, *Pseudomonas fluorescens* 2-79 (NRRL B-15132) suşunun 2-79 fenazin-1-karboksilat antibiyotik ürettiği rapor edilmiştir. Fenazinin, *Pythium aphanidermatum*'un misel gelişiminin % 35.55 oranında inhibe ettiği rapor edilmiştir. Fenazinin, *P. aphanidermatum*'un hif morfolojisi üzerinde ve *Botryodiplodia theobromae* ve *Alternaria solani*'nin spor gelişimi üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu belirtilmiştir. Diğer bir çalışmada, üç çeşit fenazin pigmenti sentezleyebilme yeteneğine sahip olan *Pseudomonas aeruginosa*'nın alışılmamış bir suşunun izole edildiği rapor edilmiştir [162].

Yapılan bir çalışmada *Pseudomonas* ve *Streptomyces* spp. tarafından üretilen fenazinlerin antibiyotik, antitümör ve antiparazitik aktiviteye sahip heterosiklik azot içeren metabolitler olduğu bildirilmiştir. *Pseudomonas aeruginosa* tarafından üretilen piyosiyanın antibiyotik özelliklerinin, insan hastalıklarında virülans bir faktör olduğu bilinmesine rağmen, ancak 1890'larda tanımlandığı rapor edilmiştir. *Pseudomonas*ların fenazin ürettikleri bilinmektedir. Bunların küçük bir grubu çeşitli fizyolojik fonksiyonlara sahip redoks aktiviteli bileşiklerdir. Ayrıca *Pseudomonas aeruginosa* PA14 suşunun fenotipleri ile akış hücresinde ve koloni biyofilmlerinde fenazin sentezleyemeyen bir mutan nicel olarak karşılaştırılmıştır. Fenazin üretiminin *Pseudomonas chlororaphis*'de gösterildiği gibi PA14'ün yüzeylere yapışma yeteneğini etkilememesine rağmen biyofilmlerin yüzey-hacim oranını ve yığılma hareketliliğini

etkilediği bildirilmiştir. Çalışmaya göre, fenazinlerin geniş bir ölçek aralığı boyunca biyofilm gelişimini etkilediğini göstermiştir [163].

Oksinler ilk keşfedilen bitki hormonları arasında yer almaktadır. Son derece önemli bir oksin olan indol-3-asetik asit (IAA), bitki gelişiminin her evresinin düzenlenmesinden sorumlu önemli bir fitohormondur. Günümüzde sadece yüksek organizasyonlu bitkilerin değil fungusların, likenlerin, alglerin ve bakterilerin de indol-3-asetik asit (IAA) oluşturdukları saptanmıştır. Bitki büyüme ve gelişmesinde rol oynayan en önemli içsel faktörlerden biri olan bitki hormonlarının keşfi ile bitki büyümesini ve büyüme ile ilgili birçok faaliyetleri kontrol altına almak mümkün olmuştur. Yapılan bir çalışmada *Gibberella fujikuroi* kullanılarak bitki büyüme maddelerinden indol-3-asetik asit üretimi doğal olarak sağlanmış ve mikroorganizma tarafından üretilen bu hormonun miktarı spektrofotometrik yöntemle tayin edilmiştir. *Gibberella fujikuroi* tarafından üretilen IAA miktarının inkübasyon boyunca önce kademeli olarak artmış ve 5. günde en fazla üretime ulaştığı gözlenmiştir. 5. günden sonra ise IAA üretimleri hızla azalarak, başlangıç değerlerine yakın düzeyde belirlenmiştir [164]. *Pa agglomerans* gibi fitopatojenik bakterilerde, *Bradyrhizobium*, *Azospirillum*, *Rhizobium* ve *Enterobacter cloacae* gibi faydalı bakterilerde ve siyanobakterilerde IAA biyosentezinin IPyA yolu üzerinden gerçekleştiği rapor edilmiştir. Yapılan çalışmalarda IAA üretiminde indol-3-asetamid (IAM) yolağının bakterilerde en iyi karakterize edilmiş bir yolak olduğu rapor edilmiştir. İki basamaklı bu yolakta triptofanın, öncelikle *iaaM* geni tarafından kodlanan triptofan-2-monooksijenaz (IaaM) enzimi aracılığı ile IAM'ye ve ikinci basamakta ise *iaaH* geni tarafından kodlanan IAM hidrolaz (IaaH) enzimi sayesinde de IAA'ya dönüştürüldüğü bildirilmiştir. *iaaM* ve *iaaH* genleri *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas syringae*, *Pantoea agglomerans*, *Rhizobium* ve *Bradyrhizobium* gibi bakterilerden karakterize edilip ve klonlandığı rapor edilmiştir. IAM'nin sentezinde görev alan ilgili genlerin *Pa. agglomerans*'ın pPATH plazmidleri üzerinde bulunmasının yanı sıra farklı *Pseudomonas* türlerinde ise kromozom üzerinde de bulundukları bildirilmiştir [58].

Yapılan başka bir çalışmada L-triptofan ile desteklenmiş kültür ortamlarında *Erwinia herbicola* 299R'nin indol-3-asetik asiti (IAA) çok miktarda ürettiği rapor edilmiştir [63]. Yine L-triptofan ile desteklenmiş kültür ortamlarında *Erwinia herbicola* 299R'nin indol-3-asetik asiti (IAA) çok miktarda ürettiği rapor edilmiştir. Epifitik uyumda, IAA üretiminin katkısını değerlendirmek için yabancı suşlar ve IAA'dan

yoksun mutant suşların yaprakları üzerindeki popülasyon dinamiklerinin araştırıldığı bildirilmiştir [55].

Başka bir çalışmada ise çeşitli ot türlerinin rizosferinde bulunan ve azot fiksasyonu yapan bir bakteri olan *Azospirillum brasilense* tarafından üretilen büyüme maddelerinin bitki üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmaya göre *A. brasilense* 'nin triptofandan indol asetik asit (IAA) ve indol laktik asit ürettiği ve triptofan konsantrasyonunun artışına bağlı olarak (1 ile 100 µg/ml arasında) IAA üretiminin de arttığı rapor edilmiştir. Aynı zamanda bakteriler durağan faza gelene kadar IAA konsantrasyonun bakteri yaşı ile birlikte arttığı ve bunun yanı sıra IAA üretimi için özellikle azot kaynaklı çalkalamalı ortamların tercih edildiği de belirtilmiştir [165].

Endüstriyel öneme sahip önemli beyaz çürükçül bir fungus olan *Lentinus sajor-caju* 'da IAA'nın optimal biyosentezi için gerekli fiziksel ve kimyasal koşulların belirlendiği bir çalışmada karbon ve enerji kaynağı olarak glukoz kullanımının IAA üretimini daha çok arttırdığı belirtilmiştir. Azotsuz veya düşük eksternal fosfatlı ortamda IAA'nın sentezinin önemli ölçüde azaldığı saptanmıştır. Ayrıca statik koşullarda ve ışığa maruz bırakılan kültürlerdeki IAA üretiminin, çalkalamalı ve karanlık koşullardakine göre daha az olduğu tespit edilmiştir. "En yüksek IAA seviyesinin (0.18 mg/ ml) glukoz içeren ortamda (pH 7.5) 150 rpm, 30 °C ve karanlıkta elde edildiği bildirilmiştir [166].

Karotenoidlerin, antioksidan olarak kalp-damar hastalıkları, kanser ve diğer kronik hastalıkların engellenmesinde önem arz ettiği ve son yıllarda bu yönde yoğun araştırmaların yapıldığı rapor edilmektedir. Yapılan bir çalışmada *Erwinia* türleri gibi karotenogenik bakterilerden ve deniz bakterisi olan *Agrobacterium aurantiacum* 'dan izole edilen *crt* gen kümelerinin, β -karoten, astaksantin ve likopen gibi karotenoidlerin biyosentezinden sorumlu olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca bireysel genlerin fonksiyonlarının tespit edildiği de bildirilmiştir. *Erwinia crt* kümeleri ile kodlanmış olan enzimin, ilk substratı olan farnesil pirofosfatın karotenoid biyosentezi için öncül olduğu belirtilmiştir [167].

Başka bir çalışmada, bir laktoz negatif maya olan *Rhodotorula rubra* GED2 ve diğeri homofermentatif *Lactobacillus casei* subsp. *casei* HA1 olmak üzere iki suş seçilerek karotenoidlerin aktif sentezini araştırılmıştır. Yoğun havalandırma koşulları altında (1.0 l /L dak, 220 devir/dak), ve 30 °C sıcaklıkta, 55.0 g laktoz ve başlangıç pH'sı 5.5 olan kültür ortamının durağan fazındaki maya hücrelerinin karotenoid

içeriğinin maksimuma ulaştığı rapor edilmiştir. 5 ve 6. gündeki kuru hücre birikiminin maksimum (27.0 g/l) olduğu ve karotenoid oluşumunun (besiyeri 12,1 mg/l) bu durum ile örtüşmediği bildirilmiştir. Karotenoid sentezleme özelliği olan *Rh. rubra* GED2 şusu ve *L. casei* HA1'in % 46.6 oranında yüksek β -karoten, % 10.7 torulen ve % 36.9 torularhodin karotenoidlerini ürettiği rapor edilmiştir [168].

Bazı mikroorganizmalardan yararlanılarak endüstriyel atık maddelerin değerlendirilmesi ve besin ve ilaç endüstrisinde A vitaminin öncül maddesi olarak kullanılan beta karotenin üretilmesi amaçlanmıştır. Çalışmada beta karoten sentezleyen ve özellikle biyoteknolojik araştırmalarda sıkça kullanılan *Phycomyces blakesleeanus* NRRL 1465, *Blakesleea trispora* NRRL 2456, *Phycomyces nites* NRRL 2245 ve *Mucor mucedo* NRRL 3654 fungusları kullanılmıştır. Endüstriyel atık madde olarak melas, şilempe ve peyniraltı suyu ile sentetik besi ortamı olarak YPK (5 g/l pepton, 2 g/l maya ekstraktı, 20 g/l glukoz, 5 g/l KH₂PO₄ ve 1 mg/l tiamin) ve malt ekstrakt ortamı kullanılmıştır. Melas, şilempe ve peyniraltı suyu ortamları kullanılmadan önce ön işlemlerden geçirilmiştir. Beta karoten miktarı YPK ortamında 1.8-12.1 mg/l, malt ekstrakt ortamında 7.9-27 mg/l, melas ortamında 6.1-43.3 mg/l, şilempe ortamında 3-9.9 mg/l ve peyniraltı suyu ortamında 4.4-12.5 mg/l arasında değiştiği tespit edilmiştir. Sonuç olarak, melas, şilempe ve peyniraltı suyu gibi bazı endüstriyel atık maddelerin beta karoten üretiminde kullanılabileceği görülmüştür [169].

Toplam karotenoid miktarı yüksek olan *Rhodotorula glutinis* (15,14, 19, 26, 27, 28), *Rhodotorula mucilaginosa* (16, 25), *Rhodotorula minuta* (23, 31)'nin karotenoid üretimlerini artırmak amacı ile yapılan MNNG ve UV mutasyon uygulamalarında en yüksek toplam karotenoid miktarı, *Rhodotorula mucilaginosa* 16 mutant suşunda 3,94 mg/l olarak belirlenmiştir. Karotenoid üretimi ile ilgili yapılan optimizasyon çalışmalarında ise, *Rhodotorula mucilaginosa* 16 mutant suşunun, % 2 inokülasyon oranında, pH=5,5-6,0'da ve karbon kaynağı olarak glikoz kullanımında en yüksek miktarda karotenoid üretimi gerçekleştirdiği belirlenmiştir [170].

Yapılan bir çalışmada, *Erwinia* karotenoid biyosentez genlerini (*crtE*, *crtB*, *crtI*, ve *crtY*) ifade eden *Escherichia coli*'de β -karoten varlığından dolayı yeşil renkli koloniler oluştuğu rapor edilmiştir. Bu konak *E. coli*'nin izoprenoid biyosentezinde regülatör sistemlerin düzenlenmesini değerlendirmek için görünür bir marker olarak kullanılmıştır. Metabolik mühendislikle endüstriyel olarak yararlı izoprenoidlerin üretim için *E. coli*'nin kullanıldığı ortaya konmuştur [171].

C vitamininin biyosentetik üretimi için genetiği değiştirilmiş olan fermentasyon mikroorganizmalar ve bitkiler kullanılmaktadır. Özellikle, askorbik asitin biyosentezik yolağına katılan enzimin aktivasyonunun arttırılması için genetik modifikasyonun kullanımı ile ilgilidir. C vitamini sentezi, genellikle Reichenstein süreci olarak tanımlanan altı aşamalı karmaşık bir prosedürdür. Bu aşamalardan biri fermentasyondur: genelde mikroorganizmalar (*Acetobacter*) kullanılmaktadır. Literatürde, ABD'de bir şirketin genetiği değiştirilmiş mikroorganizmaları (*Erwinia herbicola*, *Erwinia citreus*) kullanarak yeni bir üretim tekniği geliştirdiği bildirilmiştir. Bununla birlikte, bunun üretim sürecini iki adım azalttığı da ortaya konmuştur. Ayrıca genetiği değiştirilmiş mikroorganizmaların yardımı ile doğrudan C vitamini ve askorbik asit üretiminin artık mümkün hale geldiği rapor edilmiştir [172].

ATP, hücrede dinamik bir dönüşüm içindedir; biyosentetik tepkimeleri gerçekleştirebilmek için sürekli yıkıma uğramaktadır ve katabolik tepkimeler sırasında tekrar sentezlenmektedir. Yapılan bir çalışmada, VHb içeren hücrelerde NADH seviyesinde düşüş ATP miktarında ise artış olduğu kaydedilmiştir. Dolayısı ile NAD^+/NADH ve ATP/ADP oranlarında meydana gelen önemli değişimler hücrenin karbon bileşiklerini kullanımı yollarında önemli değişime neden olduğu ifade edilmiştir. Bu bağlamda VHb ekspresyonu yapan *E. aerogenes*'de gözlenen % 80 artışın bu tür bir metabolik akış şeması değişikliğinden olabileceği bildirilmiştir [27, 118]. Başka bir çalışmada, *E. coli*'de solunum zinciri boyunca elektron akışı üzerinde VHb'nin etkisi araştırılmış. Azalan oksijen gerilimi altında VHb varlığının, net NAD(P)H üretim oranını 2.4 kata kadar azalttığı, diğer taraftan toplam $\text{NAD(P)}^+/\text{NAD(P)H}$ havuzunda önemli bir fark belirlenmediği ortaya konmuştur [173].

Yapılan bir çalışmada, psikofilik bir deniz bakterisi olan *Vibrio* sp. ABE-1 suşunda ATP sentezinin araştırıldığı bildirilmiştir. Ayrıca naerobik hücre süspansiyonuna oksijen sağlanmasıyla endojen solunumun başlatılmasından sonra, pH 6.5 ve 8.5'teki ATP sentezi araştırılmıştır. ATP sentezinin pH 6.5'da gerçekleştiği fakat pH 8.5'te sentezin inhibe edildiği ve dolayısı pH 8.5'te ATP sentezinin gerçekleşmediği bildirilmiştir [174]. NAD ve onun redükte formu olan NADH biyolojik sistemlerde önemli kofaktörlerdir. Yapılan bir çalışmada farklı karbon kaynakları kullanılarak hem aerobik hem de anaerobik büyüyen kültürlerde NAD^+ ve NADH seviyeleri ölçülmüştür [175].

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Araştırmada Kullanılan Kimyasallar, Ayıraçlar ve Besiyerleri

Bu çalışmada kültürlerin yapıldığı besiyerlerinin hazırlanmasında kullanılan kimyasallar; plazmid izolasyonu, agaroz jel elektroforezi uygulamalarında kullanılan kimyasallar ve çeşitli tamponların hazırlanmasında kullanılan kimyasallar, antibiyotiklerin analizi için gerekli kimyasallar ve standartlar, Salkowsky Ayırıcı kimyasalları olan H_2SO_4 ve $FeCl_3$ analitik saflık derecesinde olup Sigma şirketinden temin edildi. Karotenoid ve vitaminlerin analizinde kullanılan kimyasallar, standartlar ve bu metabolitlerin HPLC analizi için kullanılan mobil fazlar Fırat Üniversitesi Kimya Bölümünden temin edilmiştir.

Bu çalışmada zengin besiyeri olarak Luria-Bertani (LB) (pH 7.0) besi ortamı kullanılırken, minimal besiyeri ortamı olarak sınırlı bir besinsel içeriğe sahip olan M9 kullanıldı. Bu besiyerlerinin içeriği sırası ile Çizelge 3.1 ve Çizelge 3.2’de verilmiştir. İnokülasyon için kullanılacak gece kültürleri için 20 mL besi yerinin bulunduğu 100 mL’lik erlenler kullanılırken, örnek alımı için inokülasyonun yapıldığı deney erlenlerinde ise 150 mL’lik erlenlerde 50 mL besi ortamı olacak şekilde bakteri kültürleri yapıldı. Rekombinant bakterilerin üretileceği LB sıvı besiyerine otoklav sonrasında besiyerlerinin sıcaklığı 50 °C’nin altına indiğinde son konsantrasyon 100 µg amp/mL besiyeri olacak şekilde amfisilin eklendi. Gece kültürlerinden bu erlenlere 1/100 dilüsyon olacak şekilde (500 µl) inokülasyon yapıldı.

Minimal ortama (yani, M9) eklenen azot ve karbon kaynakları, karamelizasyonu önlemek için stok solüsyonlar olarak ayrı otoklav edildi ve oda sıcaklığına gelen besiyerlerine istenen son konsantrasyonları verecek şekilde eklendiler.

M9 ortamları düşük (% 0.1) ve yüksek (% 1) konsantrasyonda farklı karbon kaynağı (glukoz, fruktoz ve sükroz) ile desteklendi. Ayrıca M9 ortamlarında inkübasyon süresi 24 saat olarak belirlendi.

Çizelge 3.1 LB Besiyerinin İçeriği (g L⁻¹)

NaCl	10
Pepton	10
Maya özütü	5

Çizelge 3.2 M9 Besiyerinin İçeriği (g L⁻¹)

Na ₂ HPO ₄	6
KH ₂ PO ₄	3
NaCl	0.5
NH ₄ Cl	1
Otoklav Sonrası Eklenen Stok Solusyonların İçeriği (mL L ⁻¹)	
0.01 M MgSO ₄ .7H ₂ O	10
0.01M CaCl ₂	10

3.2 Kullanılan Bakteriler

Erwinia herbicola (NRRL B-3466) Gram-negatif, kendine özgü metabolik yolları ile çeşitli antibiyotik (karbapenem, fenazin), karotenoid, indolasetik asit (IAA) ve L-DOPA gibi çeşitli endüstrilerde kullanımı bulunan ürünleri sekonder metabolizmasının bir parçası olarak sentezleyen nadir bakterilerden biri olup, Amerikan Tarım Bakanlığı Kültür Koleksiyonundan (USDA Culture Collection, Peoria, Illinois, USA) bakteri stok kültürlerinden sorumlu küratör Dr. Alejandro Rooney tarafından sterilize vakumlanmış ampüller içinde toz kültür olarak tarafımıza sağlanmıştır.

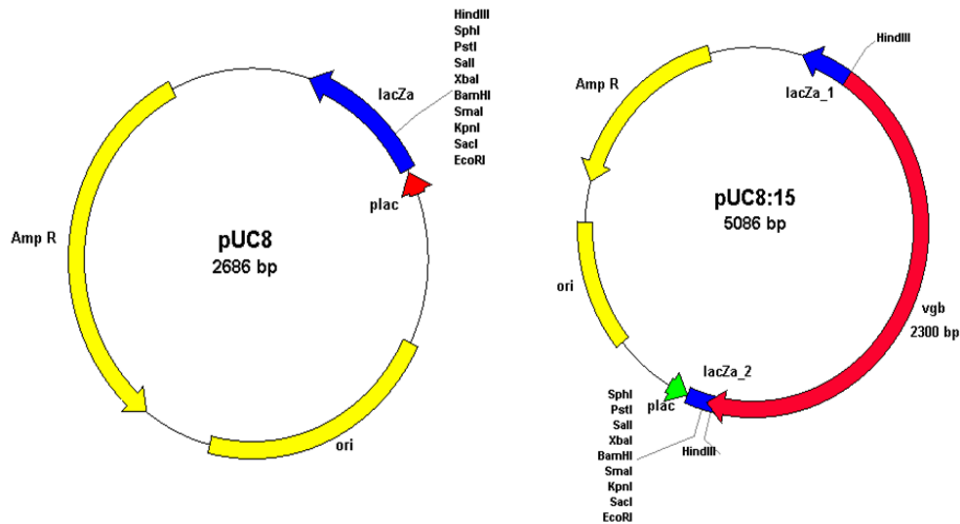
Bu çalışmada, yukarıdaki bakteri ve onun tarafımızdan *Vitreoscilla* hemoglobin geni (*vgb*) klonlanmış rekombinantı (*E. herbicola* [pUC8:15]) ve kontrol olarak da *vgb*⁻ rekombinant suşu (*E. herbicola* [pUC8]) kullanıldı. Çalışmanın bundan sonraki bölümlerinde dönüşümlü olarak *vgb*⁺ ve *E. herbicola* [pUC8:15] aynı bakteri suşunu ifade etmek için kullanılırken, *vgb*⁻ ve *E. herbicola* [pUC8] dönüşümlü olarak aynı suşu yani pozitif kontrolü ifade etmek için kullanılmıştır. Herhangi bir genetik manipülasyonun yapılmadığı orijinal suş (*E. herbicola*) ise negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Çalışmanın bundan sonraki bölümlerinde *E. herbicola* NRRL B-3466 yerine kısaca *E. herbicola* kullanılmıştır.

3.3 Bakteri Stoklarının Hazırlanması

Çalışmada kullanılan bakterilerin uzun süreli stokları % 20 gliserol (v/v) içeren LB sıvı besiyerinde yapıldı. Bunun için, logaritmik fazdaki kültürlerden 1 mL alınarak Eppendorf tüplerine transfer edildi ve 10,000 rpm’de 5 dakika oda sıcaklığında santrifüj edilerek, peletlere 800 µl LB ve 200 µl gliserol eklenerek hafifçe vorteks yapıldı. Bu şekilde hazırlanmış olan hücre süspansiyonları -20 °C’de muhafaza edildi. Ancak, her çalışmada kullanılan bakteriler bu stok kültürlerden değil, LB ve rekombinantlar için amfisilin içeren LB agar plaklar üzerine ekilen hücrelerden taze pasajlar alınarak yapıldı. Tüm çalışmalar sıvı besiyerine ekilen taze kültürler kullanılarak yapıldı. *Erwinia herbicola*, LB ortamında çoğaltılırken, bu bakterinin rekombinantları olan *vgb*⁺ ve *vgb*⁻ 100 µg/mL amfisilin içeren LB ortamında inkübe edildi.

3.4 *vgb* Klonları

Bu çalışmada kullanılan *E. herbicola*’nın *vgb*⁺ rekombinantı *vgb* genini bir pUC plazmidi üzerinde taşıırken, *vgb*⁻ rekombinantı *vgb* geniden yoksun olan pUC plazmidini taşımaktadır (Şekil 3.1). *E. herbicola*’nın *vgb*⁺ rekombinantının çeşitli tablo ve grafiklerdeki gösterimi “Eh[pUC8:15]” olarak verilirken, *vgb*⁻ rekombinantı “Eh[pUC8]” şeklinde verilmiştir. pUC8 plazmidi yaklaşık 2.7 kb büyüklüğünde olup işlevsel bir *lacZ* geni taşıırken, yaklaşık 5 kb büyüklüğünde olan pUC8:15 plazmidinde *lacZ* geninin okuma çerçevesi içinde bulunan multi klonlama bölgesine 2.3 kb uzunluğundaki işlevsel *vgb* geni yerleştirilerek bu gen (*lacZ*) deaktive edilmiştir [34].



Şekil 3.1. pUC8 ve pUC8:15 plazmidlerinin fiziki haritası

3.5 *E. herbicola*'nın genetik manipülasyonu

Çalışmada plazmid izolasyonu ve restriksiyon haritalaması için standart protokoller kullanıldı. *E. herbicola*'nın *vgb* klonlanmış rekombinant suşlarından plazmidler izole edildi. Plazmidlerin restriksiyon haritalarından bu vektörlerin istenen vektörler olup olmadığı araştırıldı. Bu transformantlardan elde edilen plazmidlerin minipreplerinden onların uygun plazmidi içerdikleri kanıtlandı.

Bu çalışmada kullanılan ana vektör pUC plazmidi olup yaygın bir genetik araç olarak kullanılmaktadır. Oluşturulan *E. herbicola*'nın *vgb* rekombinantı bu geni bir pUC8 plazmidi üzerinde taşımakta ve yeni plazmid pUC8:15 olarak adlandırılmaktadır.

3.5.1 Plazmid izolasyonu için bakterilerin kültürü

Vitreoscilla hemoglobin (VHb) geninin (*vgb*) kaynağı olarak bu geni plazmid vektörler üzerinde taşıyan *E. herbicola*'nın rekombinant suşu kullanıldı. Negatif kontroller elde etmek için aynı plazmidin *vgb*⁻ (yani *vgb* geni taşımayan) formunu taşıyan rekombinantlarından bu plazmidler izole edildi. Bunun için bakterilerin pasaj yapıldığı plaklardan koloniden öze ile alınarak 100 µg mL⁻¹ amfisilin içeren 20 mL sıvı LB besiyerine ekilerek gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Bu gece kültürlerinden 1.5

mL alınarak santrifüj edilmiştir ve elde edilen peletler plazmid izolasyonu için kullanıldı.

3.5.2 Plazmid izolasyonu

Kültürü yapılan *E. herbicola*'nın *vgb*⁺ ve *vgb*⁻ rekombinantlarından plazmid izolasyonu standart alkali-lizis yöntemi kullanılarak yapıldı [176]. Bu yöntemle yaklaşık 1 µg plazmid DNA'sı ile $5 \cdot 10^6$ - $2 \cdot 10^7$ transformant elde edilebildiği saptanmıştır. Ayrıca *E. herbicola*'da bulunan doğal plazmidlerin (megadalton plazmidlerin) izolasyonu başka bir yöntemle yapılmıştır. İzlenen standart protokol aşağıdaki gibidir:

1. Gece boyunca inkübasyonu yapılan kültürlerden 1.5 mL alınıp bir Eppendorf tüpe aktararak 10,000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant atılarak pelet plazmid izolasyonu için muhafaza edildi.
2. Pelet 100 µl soğuk *Çözelti I* (GTE) ile sulandırılıp 30 saniye vortekslendikten sonra 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
3. Taze olarak hazırlanmış 200 µl *Çözelti II* (NaOH/SDS) eklenip tüp alt-üst edildikten sonra 5 dakika buz içinde bekletildi.
4. Karışıma 150 µl oda sıcaklığındaki *Çözelti III* (potasyum asetat) eklenerek tekrar vortekslenmiş ve 5 dakika buzda bekletildi.
5. Karışım 10,000 rpm'de +4 °C'de 3 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant temiz bir tüpe aktarıldı ve 0.8 mL % 95 etanol eklenerek 2 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 3 dakika 10,000 rpm'de santrifüj edilip süpernatant atıldı.
6. Peletin üzerine 1 mL % 70 etanol eklenerek yıkama işleminden sonra tekrar santrifüj edildi ve pelet inkübatörde 37 °C'de yarım saat kurumaya bırakıldı.
7. Yukarıdaki pelete 30 µl steril TE tamponu eklenerek çözölmüş ve DNA solüsyonu ileriki çalışmalar için +4 °C'de muhafaza edildi.

Buradaki alkali-lizis yöntemi ile plazmid izolasyonu için kullanılan solüsyonların stokları:

GTE solüsyonu (Glukoz/Tris.HCl/EDTA)

50 mM glukoz

25 mM Tris-HCl, pH 8.0

10 mM EDTA

GTE solüsyonu hazırlandıktan sonra otoklav edildi ve 4°C de muhafaza edildi.

NaOH/SDS solüsyonu

0.2 N NaOH

% 1 (w/v) SDS

Bu solüsyonun taze hazırlanması gerekir.

Potasyum asetat solüsyonu (5 M, pH 4.8)

29.5 mL glasiyel asetik asit

KOH peletleri (pH 4.8 oluncaya kadar)

70.5 mL H₂O

TE (Tris/EDTA) Tamponu

10 mM Tris.HCl, pH 8.0

1 mM EDTA, pH 8.0

TE solüsyonu otoklav edildikten sonra 4°C de muhafaza edildi.

3.5.3 Plazmid miniprepleri

HindIII restriksiyon enzimi ile muamele edilerek kesilen yukarıdaki plazmidlerin restriksiyon haritaları agaroz jel elektroforezi ile belirlendi. Jellerin hazırlanmasında ve yürütülmesinde 50X stok TAE tamponu kullanıldı.

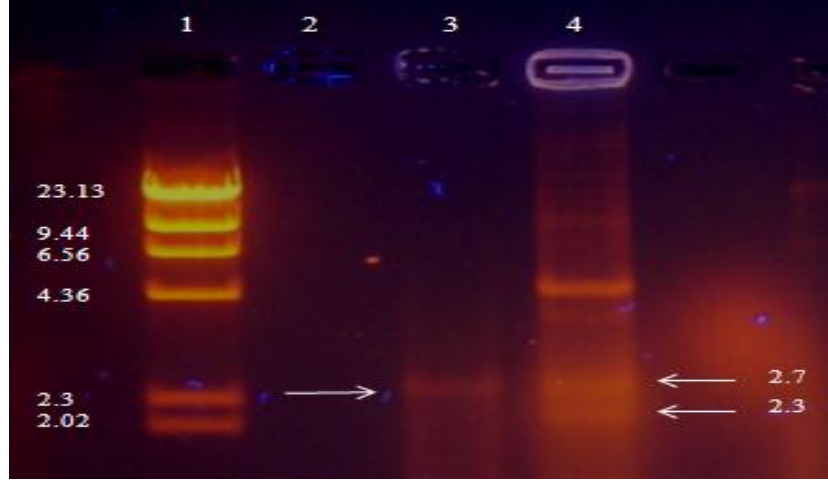
50X TAE tamponu (L⁻¹):

- 242 g Tris baz (pH 8.5)
- 57.1 g glasiyel asetik asit
- 37.2 g EDTA (pH 8.0)

Jeller ve yürütme tamponu bu stokun 1X'e seyreltilmiş solüsyonu ile hazırlandı. Jellerin hazırlanması ve yürütülmesi genel olarak aşağıdaki protokole göre yapıldı [176].

1. Jeller toplam 100 mL jel solüsyonu ile yapıldı. Bunun için 98 mL dH₂O'ya 2 mL 50X TAE tamponu eklendi ve agarozun jeldeki konsantrasyonu % 1.25 (w/v) olarak hazırlandı. Bu karışım mikrodalga fırında agaroz tamamen eriyip solüsyon berraklaşınca kadar kaynatıldı ve solüsyonun ısısı yaklaşık 60–70 °C'ye düşünce etidyum bromidin stok (10 mg/mL) solüsyonundan 5 µl eklenerek hava kabarcığı veya köpürme olmayacak şekilde hafifçe karışması sağlandı.
2. Yukarıdaki jel solüsyonu jel yürütme tankına tarak dişlerini kapatacak kalınlıkta dökülerek yaklaşık 30 dakika beklendi.
3. Taraklar çıkarılmış ve jeli yaklaşık 0.5 cm kapatacak miktarda jel yürütme tamponu tanka dolduruldu.
4. Bu esnada plazmidlerin restriksiyon muameleleri yapıldı. 100 µl TE tamponu içerisindeki eritilmiş plazmid örneklerinden 10 µl alınıp steril eppendorflara konuldu ve üzerine 2 µl HindIII tamponu ve 2 µl HindIII enzimi eklendi.
5. Karışım 37 °C de 2 saat su banyosunda bekletildikten sonra içinde izleme boyası olarak brom fenol blue bulunan yükleme tamponundan 5 µl eklendi.
6. Restriksiyon enzimi ile muamele görmüş plazmid DNA'sı ve yine HindIII restriksiyon enzimi ile önceden kesilmiş ve standart markır olarak kullanılan lambda (λ) DNA'sı uygun kuyucuklara eklenerek jel elektroforezi sabit voltajda (70 Volt) 2 saat yürütüldü.
7. Jeldeki DNA bantlaşma motifi UV ışık altında floresan ışık yayan etidyum bromür ile belirlendi ve elektroforetogramları yapıldı.
8. Plazmidlerin restiksiyon bantlaşmasından istediğimiz DNA fragmanlarının bulunup bulunmadığı λ DNA'sının bilinen fragmanları ile oluşturulan standart eğriler yardımı ile tespit edildi.

Yukarıdaki şekilde hazırlanan jelin fotoğrafları çekilerek, jel üzerindeki plazmid DNA fragmanları bantlarının büyüklükleri (baz çifti sayısı veya kilobaz olarak), restriksiyon fragman büyüklüğü bilinen λ DNA'sı standardının logaritmik eğrisinden tespit edildi (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. HindIII ile kesilmiş λ (1), *E. herbicola* [pUC8] plazmidi (3) ve *E. herbicola* [pUC8:15] plazmidinin (4) agaroz jeldeki restriksiyon fragmanları

3.6 *E. herbicola*'daki Doğal (megadalton) Plazmid İzolasyonu

E. herbicola'dan doğal plazmid izolasyonu yapmak için QIAGEN kiti kullanıldı. İzlenen protokol aşağıdaki gibidir:

1. Gece boyunca inkübasyonu yapılan kültürlerden 1.5 mL alınıp bir Eppendorf tüpe aktararak 10,000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atılarak pelet plazmid izolasyonu için kullanıldı.
2. Peletler 250 μ l saf su ile süspansiyon haline getirildi. Bu süspansiyondan 200 μ l alınarak temiz eppendorflara aktarıldı.
3. Süspansiyonun üzerine 20 μ l Proteinaz K eklendi.
4. Karışıma 200 μ l AL tamponu eklendikten hemen sonra 30 saniye vortekslendi ve 10 saniye santrifüj yapıldı.
5. Elde edilen karışım 56 °C'de 10 dakika inkübasyona bırakıldı.
6. İnkübasyon işleminden sonra yine 10 saniye santrifüj yapıldı.
7. Karışıma 200 μ l etanol (% 96'lık) ilave edilerek 30 saniye vortekslendi ve 10 saniye santrifüj yapıldı.
8. Oluşan son karışım spin kolonlara aktarıldı ve 8,000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
9. Santrifüjden sonra spin kolonların alt tüpleri değiştirildi ve daha sonra 500 μ l AW-1 tamponu eklenerek 8,000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.

10. Spin kolonların alt tüpleri tekrar değiştirildi, yeni alt tüpler konuldu ve 500 µl AW-2 tamponu eklenerek 14,000 rpm’de 4 dakika santrifüj edildi.
11. Spin kolonlar 1,5 mL’lik ependorfların içine geçirildi ve 50 µl AE tamponu eklendi ve 1 dakika bekletildi. Daha sonra 8,000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi.
12. Spin kolonlar atıldı ve Eppendorf tüplerdeki DNA solüsyonu daha sonraki çalışmalarda jel elektroforezinde yürütülmek için +4 °C’ de muhafaza edildi.

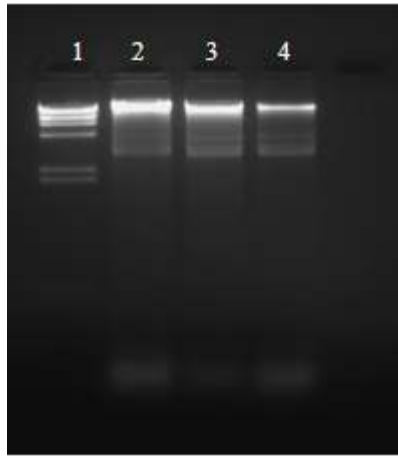
3.6.1 *E. herbicola*’daki Doğal Plazmidlerin Jel Elektroforezi

Hazırlanması ve yürütülmesi için 50X stok TAE tamponunun 1X seyreltilmiş solüsyonunun kullanıldığı jel elektroforezi aşağıdaki protokole göre yapıldı [176].

1. Minijeller toplam 50 mL jel solüsyonu ile hazırlandı. Bunun için 49 mL dH₂O’ya 1 mL 50X TAE tamponu eklendi ve agarozun jeldeki konsantrasyonu % 1.25 (w/v) olarak hazırlandı. Bu karışım mikrodalga fırında agaroz tamamen eriyip solüsyon berraklaşınca kadar kaynatıldı ve solüsyonun ısısı yaklaşık 60–70 °C’ye düşünce etidyum bromidin stok (10 mg/mL) solüsyonundan 3 µl eklenerek hava kabarcığı veya köpürme olmayacak şekilde hafifçe karışması sağlandı.
2. Yukarıdaki jel solüsyonu jel yürütme tankına tarak dişlerini kapatacak kalınlıkta dökülerek yaklaşık 30 dakika beklendi.
3. Taraklar çıkarıldı ve jeli yaklaşık 0.5 cm kapatacak miktarda jel yürütme tamponu tanka dolduruldu.
4. Bu esnada 50 µl AE tamponu içerisindeki DNA solüsyonundan 30 µl alınıp steril ependorflara konuldu ve içinde izleme boyası olarak brom fenol blue bulunan yükleme tamponundan 5 µl eklendi.
5. Plazmid DNA’sı ve yine uygun restriksiyon enzimleri ile önceden kesilmiş ve standart markır olarak kullanılan lambda (λ) DNA’sı uygun kuyucuklara eklenerek jel elektroforezi sabit voltajda (50 Volt) 1 saat 15 dakika gerçekleştirildi.
6. Jeldeki DNA bantlaşma motifi UV ışık altında floresan ışık yayan etidyum bromür ile belirlendi.

7. Plazmidlerin bantlaşmasından istediğimiz DNA fragmanlarının bulunup bulunmadığı λ DNA'sının bilinen fragmanları ile oluşturulan standart eğriler yardımı ile tespit edildi.

Yukarıdaki şekilde hazırlanan jelin fotoğrafları çekilerek, jel üzerindeki plazmid DNA fragmanları bantlarının büyüklükleri (baz çifti sayısı veya kilobaz olarak), restriksiyon fragman büyüklüğü bilinen λ DNA'sı standardının logaritmik eğrisinden belirlendi (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. HindIII ile kesilmiş λ (1), *E. herbicola* doğal plazmidinin (2,3,4) agaroz jeldeki restriksiyon fragmanları

3.7 Kültür Ortamındaki Toplam Biomas ve Canlı Hücre Sayısının Belirlenmesi

Hücre kültürlerinde çoğalma indikatörü olarak hem birim miktardaki canlı hücre sayısı hem de toplam biyokütle belirlendi. Bakteri üreme değişimi spektrofotometrik olarak izlendi. Bunun için belirlenenen kültür fazlarında kültürün optik yoğunluğu 600 nm dalga boyunda kaydedildi. $OD_{600} > 0.5$ olduğu zaman kültürler uygun şekilde (1/5 veya 1/10) dilüsyon yapılarak değerleri kaydedildi. Optik yoğunluğun yanı sıra kültür fazlarından ayrıca canlı hücre sayımı da yapıldı. Canlı hücre sayımı için, seçilmiş kültür fazlarında % 0.9 serum fizyolojik solüsyonunda uygun sayıda dilüsyonlar yapıldı. Son dilüsyon tüpünden 50 veya 100 μ l alınarak petrilere ekim yapıldı 37 °C'de 1 gece

inkübasyona bırakıldı. Gözle görülebilir büyüklüğe erişen koloniler sayılarak o fazdaki kültür ortamında bulunan canlı hücre sayısı belirlendi.

3.8 Bakterilerin oksijen alımı

Hücrelerin oksijen alımı için öncelikle oksijen içeriği bilinen bir tampon sistemi (0.1 M potasyum fosfat, pH 7.6) hazırlandı. Bu tampon bir manyetik karıştırıcı aracılığı ile yaklaşık 400 rpm hızda gece boyunca karıştırılarak havaya doyuruldu. Oksijen ölçüm sisteminde (YSI marka) hücrelerin konduğu küvetlerin etrafını saran 37 °C sabit ısıdaki bir su banyosu ile desteklendi. Bakteri süspansiyonları ve kalibrasyon tamponunun konduğu küvetlerdeki ısı bu küvetlerin etrafında sirkülasyon yapan suyun ısısı ile aynı oluncaya kadar bu küvetlerin içindeki manyetik karıştırıcılarla karıştırıldı. Bakterilerin oksijen tüketim hesapları havaya doyurulmuş 4 mL potasyum fosfat tamponunun bulunduğu kontrol küvetine göre yapıldı. Bu küvette oksijen seviyesi % 100 kabul edildiğinden bakterilerin eklendikleri ortamda sebep oldukları % oksijen düşüşü onların oksijen alım güçleri olarak ifade edilmektedir.

Hücrelerin oksijen kullanımlarının tespiti için inkübasyonun 6., 9. ve 12. saatlerinde kültürlerden 5'er mL alındı ve oda ısısında 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Peletler su banyosu ile aynı ısıda olan ve gece boyunca oksijene doyurulmuş 0.1 M potasyum fosfat tamponunda süspanse edilerek A_{600} değerleri eşitlendi. Bu süspansiyondan 1 mL alınarak probun küvetine konmuş olan havaya doyurulmuş 3 mL potasyum fosfat tamponuna eklendi. Kalibrasyon probuna (4 mL potasyum fosfatın bulunduğu küvette bulunan prob) göre, örneklerin yani bakteri süspansiyonlarının bulunduğu küvetteki belli zaman aralığındaki (genellikle 5 dakika) % oksijen azalması kaydedildi ve bakterilerin oksijen alım oranları hesaplandı. Havaya doyurulmuş yukarıdaki potasyum fosfat tamponunun oksijen konsantrasyonu 25 °C'de 250 $\mu\text{mol/L}$, 32 °C'de 233 $\mu\text{mol/L}$, 37 °C'de 218 $\mu\text{mol/L}$ 'dir. *E. herbicola*'nın *vgb* içeren (*vgb*⁺) ve *vgb* içermeyen (*vgb*⁻) suşları ile yabanıl suşunun oksijen alım yetenekleri aşağıdaki formüle göre belirlendi [177].

$$R = N \mu\text{mol} / \text{Litre} \cdot (4/1000)L \cdot D/VT$$

R= Bakteri başına tüketilen oksijen miktar

N= Bakteriye özgü sıcaklık derecesinde tamponun içerdiği oksijen konsantrasyonu

D= % Oksijen azalma oranı

V= Canlı hücre sayısı

T= D'deki oksijen oranının tüketilmesi için geçen zaman

3.9 IAA Üretimi

IAA'nın bakteriyel üretimi için zengin bir besiyeri olan LB (pH 7.0) ile bu ortamın % 0.1 ve % 0.5 triptofan [178] içeren formları kullanıldı. Ayrıca % 0.1 (düşük) ve % 1 (yüksek) konsantrasyonda farklı karbon kaynağının (glukoz, fruktoz ve sükroz) bulunduğu ve M9 ortamı kullanıldı.

3.9.1 Bakteri Kültürlerinin Hazırlanması

Besiyerleri 20 mL/100 mL erlenlerde olacak şekilde hazırlandı ve 121°C'de 1 atm basınç altında 20 dakika otoklav edildi. Bakterilerin pasaj yapıldığı plaklardan koloninin bir kısmı alınarak LB içeren 20 mL/100 mL erlenlere ekim yapıldı ve gece boyunca çalkalamalı koşullarda (200 rpm) 37 °C'de inkübe edildi. Bu gece kültürlerinden yeni besiyerine % 1 inokulum (örn., 20 mL LB içeren erlenlere 200 µl gece kültürü) transfer edilerek inkübasyona (72 saat, 200 rpm, 37°C) bırakıldı. IAA, triptofan ile indüklendiği için bazı çalışmalarda bakteriler inoküle edilmeden önce besiyerine % 0.1 ve % 0.5 konsantrasyonda triptofan eklendi.

3.9.2 Kültür Supernatantlarının Saklanması

Kültürler belli zaman sürelerince inkübe edildikten sonra 1.5 mL'si santrifüj tüplerine transfer edildi ve 14,000 rpm'de +4 °C'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen supernatantlardan 1'er mL alındı ve alüminyum folyo ile kaplanmış Eppendorf tüplerine konularak IAA tayini için spektrofotometrik ölçüm yapılana kadar +4 °C'de muhafaza edildi [179].

3.9.3 IAA Tayini

IAA'nın belirlenmesi yaygın olarak kullanılan Salkowsky reaksiyonu ile yapıldı. Salkowsky ayırıcı 150 mL konsantre H₂SO₄, 250 mL distile su ve 7.5 mL 0.5 M FeCl₃ solüsyonlarından oluşmaktadır [66, 179-180].

- Farklı zaman aralıklarında kültürlerden 1.5 mL Eppendorf tüplerine aktararak 10,000 rpm'de +4 °C'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatandan 1 mL alınarak üzerine 2 mL Salkowsky ayırıcı ilave edildi.
- Elde edilen karışım oda sıcaklığında 30 dakika karanlıkta inkübasyona bırakıldı.
- Bu süre sonunda oluşan renk yoğunluğu değerleri o renge özgü olan 530 nm dalga boyunda köre karşı okunarak kayıt edildi.
- Her kültür ortamındaki IAA konsantrasyonu, daha önce sentetik IAA ile hazırlanan standart eğri yardımı sayesinde hesaplandı. Bu metodla IAA belirleme alt sınırının yaklaşık 5 µg/mL olarak saptanmıştır [180].

3.10 β-karoten, Likopen ve C Vitamini Üretimi

Besiyerleri 150 mL kapasiteli erlenlerde 50 mL olacak şekilde hazırlandı ve 121°C'de 1 atm basınç altında 20 dakika otoklav edildi.

Bakterilerin pasaj yapıldığı plaklardan bir koloninin küçük bir kısmı alınarak 20 mL/100mL erlenlere ekim yapıldı ve gece boyunca çalkalamalı (200 rpm) koşullarda 37 °C'de inkübe edildi. Bu gece kültürlerinden yeni besi ortamlarına % 1 inokulum (ör., 50 mL LB içeren erlenlere 500 µl gece kültürü) transfer edilerek 200 rpm, 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı.

Kültürleri yapılan hücreler belli zaman sürelerince inkübe edildikten sonra santrifüj tüplerine transfer edilip 6,000 rpm'de +4 °C'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen peletler yaklaşık 0.5 g olacak şekilde ayarlandı ve bu peletler β-karoten ve likopen tayininin yapılması için kullanıldı. C vitamininin tayini için de benzer şekilde 0.5 g pelet olacak şekilde ayarlandı [181-182].

3.10.1 β -karoten ve Likopen Tayini İçin Ekstratların Hazırlanması

Yukarıdaki santrifügasyon sonrası elde edilen kültürlerin pelletleri bu bölümde hücre içi β -karoten ve likopen tayininin yapılması için kullanıldı. Bu metabolitlerin HPLC ile tayininin yapılması için peletlere ekstraksiyon işlemi uygulandı [181].

1. Peletlerin üzerine 0.05 M KPi tamponundan (pH 8.6) 3 mL eklenerek bir süspansiyon hazırlandı.
2. Bu süspansiyondan 2 mL alınarak temiz bir tüpe aktarıldı ve -4°C 'de dondurulup tekrar çözündürüldü.
3. Çözdürme işleminden sonra süspansiyonun üzerine 250 μl % 15'lik TCA ilave edildi.
4. Ektraktın üzerine 730 μl % 70'lik HClO_4 eklenerek vortekslendi.
5. Ekstrakt vortekslendikten sonra 3 mL etil alkol eklendi.
6. 1.5 mL n-hekzan ilave edildi ve 2 dakika vorteks yapıldı.
7. 4500 rpm'de 8 dakika santrifüj yapıldı.
8. Tüpün içindeki karışımının üst kısmında kalan hekzan fazı temiz bir tüpe aktarıldı.
9. Tekrar 250 μl n-hekzan ilave edildi ve 2 dakika vorteks yapıldı.
10. 4500 rpm'de 8 dakika santrifüj yapıldı.
11. Tüpün üst kısmında kalan hekzan fazı aynı tüpe aktarıldı.
12. Daha sonra temiz bir tüpe aktarılmış olan hekzan fazları azot gazı ile buharlaştırıldı.
13. Tüplere 150 μl mobil faz eklendi ve 4-5 saniye vorteks yapıldı.
14. Tüpün içindeki solüsyon insert viallere aktarıldı.
15. Insert vialler HPLC viallerinin içine yerleştirildikten sonra enjeksiyonun yapılması için HPLC cihazına yerleştirildi.
16. β -karoten analizi için 450 nm, likopen için 470 nm dalga boylarında 5 dakika boyunca okuma yapıldı.

3.10.2 C Vitamini Tayini İçin Ekstratlarının Hazırlanması

C vitamini üretimi için yine zengin besiyeri ortamı olan LB ve % 0.1 ve % 1 konsantrasyonda farklı karbon kaynağı (glukoz, fruktoz ve sükroz) içeren M9 ortamları kullanıldı. LB ortamındaki hücreler 37 °C', 200 rpm'de 48 saat; M9 ortamında ise 24 saat inkübe edildi. Kültürleri yapılan hücreler belli zaman sürelerince inkübe edildikten sonra santrifüj tüplerine transfer edildi ve 6,000 rpm 'de +4 °C'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen peletler HPLC cihazına verilmeden önce aşağıdaki ekstraksiyon işlemi uygulandı [182].

1. Yukarıdaki şekilde inkübasyonu yapılan kültürlerin santrifüj işleminden sonra elde edilen peletlere 0.05 M KPi tamponundan (pH 8.6) 3 mL eklenerek bir süspansiyon hazırlandı.
2. Elde edilen süspansiyon yaklaşık 1 saat -20 °C'de donduruldu.
3. Daha sonra donmuş olan süspansiyon oda sıcaklığında çözündürüldü.
4. Çözünmüş olan bu süspansiyondan 1 mL alınıp tüpe konuldu.
5. Üzerine 250 µl % 15'lik TCA solüsyonundan ilave edildi ve 3 dakika vorteks yapıldı.
6. Karışımın üzerine 250 µl perklorikasit eklendi ve 5 dakika vorteks yapıldı.
4500 rpm'de 30 dakika santrifüj yapıldı.
7. Tüpün üst kısmında oluşan faz alınıp viallere aktarıldı ve HPLC cihazında 250 nm dalga boyunda analizi yapıldı.

3.10.3 β-karoten, Likopen ve C Vitaminin HPLC ile Analizi

β-karoten, likopen ve C vitamininin tayini Shimadzu DGU- 20A₅ HPLC cihazı ile ölçüldü. Analizler Fırat Üniversitesi Kimya Bölümü, HPLC laboratuvarında yapıldı. Karotenoid ve vitaminlerin analizleri Çizelge 3.4'de verilen cihaz parametrelerine göre gerçekleştirildi. Burada 1500 mg/L (1500 ppm)'lik stok β-karoten çözeltisinden, kalibrasyon için gerekli standartlar 25–150 mg/L (25; 50; 75; 150 ppm) aralığında hazırlandı. Likopen kalibrasyonu için 350 ppm stok çözeltisinden 0.75-6 mg/L (0.75; 1.5; 3.0; 6.0 ppm) aralığında standart çözeltiler hazırlandı. Vitamin C'nin kalibrasyonu

için 1000'er mg/L (1000 ppm)'lik stok çözeltisinden 1.5; 3.0; 6.0; 12.0; 24.0 ppm olacak şekilde seyreltme yapıldı. Kalibrasyon eğrileri dış standart kullanılarak elde edildi. Bu kalibrasyon eğrileri için korelasyon katsayıları genel olarak ≥ 0.99 düzeyinde bulunmuştur [181-182].

Analizlerde her bir örneğin üç tekrarı hazırlanarak ölçüldü ve elde edilen verilerin aritmetik ortalamaları alınarak sonuçlar hesaplandı ve HPLC parametreleri çizelgede verildi (Çizelge 3.3 ve Çizelge 3.4).

Çizelge 3.3 β -karoten ve likopen tayini için HPLC cihazı analiz parametreleri

Parametre	
<i>Kolon</i>	Nucleosil C18 (4.6 • 150 M9.5 μ m)
<i>Dedektör</i>	CBM-20A ve SPD-M20A Diyod Array Dedektör (DAD)
<i>Mobil faz (mL)</i>	1 L diklorometan, 350 mL asetonyitril, 350 mL metanol, 8mL 20 mM amonyum asetat
<i>Mobil faz hızı (mL/dk)</i>	1.2
<i>Kolon sıcaklığı (°C)</i>	30
<i>Analiz süresi</i>	5 dakika
<i>Tayin yapılan dalga boyu (nm)</i>	450 ve 470 nm
<i>Hesaplama kriteri</i>	Pik alanı

Çizelge 3.4 Vitamin C tayini için HPLC cihazı analiz parametreleri

Parametre	Özellik
<i>Kolon</i>	Nucleosil C18 (4.6 • 150 M9.5µm)
<i>Dedektör</i>	CBM-20A ve SPD-M20A Diyod Array Dedektör
<i>Mobil faz (mL)</i>	500 mL KH ₂ PO ₄ , 6 mL metanol, 40 µl H ₃ PO ₄ ve pH 4.0
<i>Mobil faz hızı (mL/dk)</i>	1.2
<i>Kolon sıcaklığı (°C)</i>	30
<i>Analiz süresi</i>	7 dakika
<i>Analizin yapıldığı dalga boyu (nm)</i>	250 nm
<i>Hesaplama kriteri</i>	Pik alanı

3.11 Fenazin Üretimi ve Tayini

Fenazinin bakteriyel üretimi için zengin bir besi ortamı olan Luria-Bertani (LB) (pH 7.0) ve % 0.1 ve % 1 konsantrasyonda farklı karbon kaynağı (glukoz, fruktoz ve sükroz) ile desteklenmiş M9 ortamları kullanıldı (Çizelge 3.1 ve 3.2). Besiyerleri 150 mL kapasiteli erlenlerde 50 mL olacak şekilde hazırlandı ve 121°C’de 1 atm basınç altında 20 dakika otoklav edildi.

Bakterilerin pasaj yapıldığı plaklardan öze ile koloniden alınarak 20mL/100 mL erlenlere ekim yapıldı ve gece boyunca çalkalamalı koşullarda (200 rpm) 37 °C’de inkübe edildi. Bu gece kültürlerinden yeni besi ortamlarına % 1 inokulum (Ör; 50 mL LB içeren erlenlere 500 µl gece kültürü) transfer edilerek 200 rpm, 30°C’de 48 saat inkübasyona bırakıldı.

3.11.1 Fenazin Tayini İçin Ekstraktların Hazırlanması

Kültürleri yapılan hücreler belli zaman sürelerince inkübe edildikten sonra santrifüj tüplerine transfer edildi ve 6.000 rpm’de +4 °C’de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen peletlere aşağıdaki ekstraksiyon işlemleri uygulandı [161].

1. Farklı zaman parametrelerinde inkübasyonu yapılan kültürlerin 20 mL’si 6.000 rpm’de +4 °C’de 10 dakika santrifüj edildi.

2. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra peletlerin üzerine 4 mL metanol eklenerek 2 dakika vorteks yapıldı.
3. Ekstratların üzerine 4 mL 1 M sodyum asetat tamponu (pH 4.0) ilave edildi.
4. Karışımın üzerine 2 mL diklorometan eklenerek biri organik biri solvent iki faz oluşması beklendi.
5. Organik faz uzaklaştırıldıktan sonra, tüpün dibinde kalan solvent temiz tüplere aktarıldı ve solvent buharlaştırıldı.
6. Geriye kalan kalıntının üzerine 0.3 mL metanol eklenerek 3-4 saniye vortekslendi.
7. Tüpün içindeki solüsyon viallere aktarılarak enjeksiyonun yapılması için HPLC cihazına yerleştirildi ve fenazin tayini 252 nm'de yapıldı.

3.11.2 Fenazinin HPLC ile Analizi

Bakteriyal fenazinin tayini HPLC cihazı ile yapıldı (Agilent 1100 Series; C18 (4.6 x 250 M9)). Analizler Çizelge 3.5’de verilen cihaz parametrelerine göre gerçekleştirildi. Burada 1000 mg/L (1000 ppm)’lik stok fenazin çözeltisinden 50 mg/L (50 ppm) olacak şekilde standart solüsyon ve kalibrasyon için gerekli standartlar 5–50 mg/L (5; 10; 20; 30; 40; 50 ppm) aralığında 50 mg/L (50 ppm) stoğundan dilüsyonlar yapılarak hazırlandı. Kalibrasyon eğrileri dış standart kullanılarak elde edildi. Bu kalibrasyon eğrileri için korelasyon katsayıları genel olarak ≥ 0.99 düzeyinde elde edildi.

Çizelge 3.5 Fenazin tayini için HPLC cihazı analiz parametreleri

Parametre	Özellik
<i>Kolon</i>	Agilent 1100 Series; C18 (4.6 x 250 mm)
<i>Dedektör</i>	DAD (Diyod Array Dedector)
<i>Mobil faz (mL)</i>	Solvet A: Fosforik asit/distile su (999:1) Solvent B: Asetonitril
<i>Mobil faz hızı (mL/dk)</i>	2.0
<i>Kolon sıcaklığı (°C)</i>	20
<i>Analiz süresi</i>	20 dk
<i>Analiz yapıldığı dalga boyu (nm)</i>	252 nm
<i>Hesaplama kriteri</i>	Pik alanı

3.12 Meropenem Üretimi ve Tayini

Bu kısımda *E. herbicola* tarafından sentezlenen ve önemli bir karbapenem olan meropenemin üretimi ve tayini çalışmaları yapıldı. Meropenemin bakteriyel üretimi için LB (pH 7.0) ve farklı karbon kaynakları ihtiva eden M9 (pH 7.0) ortamları kullanıldı (Çizelge 3.1 ve 3.2). Besiyerleri 50 mL/150 mL kapasiteli erlenlerde hazırlandı ve 121 °C’de 1 atm basınç altında 20 dakika otoklav edildi.

Bakterilerin pasaj yapıldığı plaklardan öze ile koloniden alınarak 20 mL/100 mL kapasiteli erlenlere ekim yapıldı ve gece boyunca 200 rpm’de 37 °C’de inkübe edildi.

Bu gece kültürlerinden 50 mL LB içeren 150 mL hacimli erlenlere % 1 inokulum transfer edilerek 200 rpm, 30 °C’de 72 saat inkübasyona bırakıldı. M9 ortamları için optimal faz 24 saat olarak belirlendi.

3.12.1 Meropenemin HPLC ile Analizi

Kültürler belli zaman sürelerince inkübe edildikten sonra santrifüj tüplerine 1.5 mL transfer edildi ve 6,000 rpm ’de +4 °C’de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatandan 1’er mL alındı. Alınan süpernatantlar meropenemin HPLC ile ölçümü yapılana kadar +4 °C’de muhafaza edildi.

Bakteriyal meropenemin tayini HPLC ile yapıldı. Analizler Çizelge 3.6’da verilen cihaz parametrelerine göre gerçekleştirildi. Meropenem analizi için öncelikle 1000 mg/L (1000 ppm)’lik stok meropenem çözeltisinden 100 mg/L (100 ppm) olacak şekilde ara standart solüsyon hazırlandı. Kalibrasyon için gerekli standartlar 5–50 mg/L (5; 10; 20; 30; 40; 50 ppm) aralığında 100 mg/L (100 ppm) ara stok solüsyonundan dilüsyonlar yapılarak hazırlandı. Kalibrasyon eğrileri saf meropenem’in değişik konsantrasyonları ile elde edildi. Bu kalibrasyon eğrileri için korelasyon katsayıları genel olarak ≥ 0.99 düzeyinde bulundu.

Çizelge 3.6 Meropenem tayini için HPLC analiz parametreleri

Parametre	Özellik
<i>Kolon</i>	Agilent 1100 Series; C18 (4.6 x 250 mm)
<i>Dedektör</i>	DAD
<i>Mobil faz (mL)</i>	Fosfat tamponu (KH ₂ PO ₄) pH:4.0 ve Metanol (80:20, V/V) karışımı
<i>Mobil faz hızı (mL/dk)</i>	2.0
<i>Kolon sıcaklığı (°C)</i>	20
<i>Tayin yapılan dalga boyu (nm)</i>	298 nm
<i>Hesaplama kriteri</i>	Pik alanı

3.13 ATP Tayini

Çalışmanın bu aşamasında hücrelerin içinde bulunduğu enerjetik durum hakkında bilgi edinmek amacıyla *E. herbicola*'nın yabanıl suşu ile rekombinant suşlarının farklı kültür koşullarındaki hücre içi ATP miktarları belirlendi. LB (pH 7.0) ile farklı karbon kaynakları ihtiva eden M9 (pH 7.0) ortamında hücrelerin ürettikleri ATP miktarları karşılaştırıldı. Besiyerleri 50 mL besi ortamı içeren 150 mL kapasiteli erlenlerde hazırlandı ve 121 °C'de 1 atm basınç altında 20 dakika otoklav edildi.

Gece kültürleri için bir koloninin bir kısmı alınarak 20 mL LB içeren 100 mL kapasiteli erlenlere ekim yapıldı ve gece boyunca 200 rpm'de 37 °C'de inkübe edildi. Bu gece kültürlerinden yeni besi ortamlarına % 1 inokulum transfer edilerek 200 rpm, 30° C'de ve 37°C'de 72 saat inkübasyona bırakıldı. Farklı karbon kaynağının (glukoz, fruktoz ve sükroz) kullanıldığı M9 ortamları için yine 30 °C'de ve 37°C'de optimal faz 24 saat olarak belirlendi.

3.13.1 ATP'nin HPLC ile Analizi

Bakteri kültürlerinin tamamı belli büyüme fazlarında santrifüj tüplerine transfer edilip 6.000 rpm'de +4 °C'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen peletlerin ağırlığı 0.5 g olacak şekilde ayarlandı ve üzerlerine 2.5 mL perklorik asit ilave edilip 1 dakika buzda bekletildi. Ekstraksiyon karışımı 6.000 rpm'de +4 °C'de 10 dakika santrifüj edilerek, süpernatanın 2 mL'si 1 M KOH ile pH'sı 6.5-6.8 olacak şekilde nötralize edildi. Nötralize süpernatant 30 dakika buzda bekletildi, böylece oluşan potasyum perkloratın çöktürülmesi sağlanmış oldu. Süpernatant filtreden geçirildi ve HPLC analizi için 20 µl enjeksiyon yapılarak 254 nm'de ölçüm yapıldı [101].

Hücrelerdeki ATP miktarı tayini parametreleri Çizelge 3.7'de verilen HPLC yöntemi ile yapıldı. Kalibrasyon için gerekli standartlar 0.2–4 mg/L (0.2; 0.5; 1; 2; 4 ppm) aralığında 1000 mg/L (1000 ppm)'lik stok çözeltinin 10 kez dilüe edilmiş ara stok solüsyonundan (100 mg/L, 100 ppm) dilüsyonlar yapılarak hazırlandı. Standart kalibrasyon eğrisi ticari ATP kullanılarak elde edildi. Bu kalibrasyon eğrileri için korelasyon katsayısı genel olarak ≥ 0.99 düzeyinde bulundu.

Çizelge 3.7 ATP tayini için HPLC cihazı analiz parametreleri

Parametre	Özellik
Kolon	Agilent 1100 Series; ACE 5 C18 (4.6 x 250 mm)
Dedektör	DAD
Mobil faz (mL)	A: Fosfat tamponu (KH ₂ PO ₄ -K ₂ HPO ₄) pH:7.0; B: Asetonitril
Mobil faz hızı (mL/dk)	1.2
Kolon sıcaklığı (°C)	20
Tayin yapılan dalga boyu (nm)	254 nm
Hesaplama kriteri	Pik alanı

3.14 NAD⁺ (Nikotinamid Adenin Dinükleotid) Tayini

Burada hücrelerin enerjetik durumu hakkında bilgi edinmek amacıyla başka bir parametre olan hücre içi NAD⁺ üretimine bakıldı. *E. herbicola* ve rekombinantlarının farklı kültür koşullarındaki hücre içi NAD⁺ miktarları hem LB (pH 7.0) hem de farklı karbon kaynağı ihtiva eden M9 (pH 7.0) ortamlarında belirlendi.

Gece kültürleri için koloninin bir kısmı alınarak 20 mL LB içeren 100 mL kapasiteli erlenlere ekim yapıldı ve gece boyunca çalkalamalı koşullarda (200 rpm) 37 °C’de inkübe edildi. Bu kültürlerinden yeni besi ortamlarına % 1 inokulum transfer edilerek 200 rpm, 30°C’de ve 37°C’de 72 saat inkübasyona bırakıldı. Ayrıca % 0.1 ve % 1 konsantrasyonda farklı karbon kaynağının (glukoz, fruktoz ve sükroz) kullanıldığı M9 30°C ve 37°C’de inkübasyonu yapılan kültürlerin NAD⁺ üretim karakteristikleri araştırıldı.

3.14.1 NAD⁺’ın HPLC ile Analizi

E. herbicola’nın ve rekombinant suşlarının kültürleri tamamı alınarak 6.000 rpm’de +4 °C’de 10 dakika santrifüj edildi. Peletlerin ağırlığı 0.5 g olacak şekilde ayarlandı ve üzerlerine 1 mL serum fizyolojik eklenerek 4.500 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Bu yıkama işlemi bir kez daha tekrarlandıktan sonra peletlerin üzerine 0.5 mL % 20’lik TCA eklendi. Oluşan süspansiyonlar ultrasonifikatör (*Soniks Vibra Cell*) ile 40 saniye sonifikasyon, 20 saniye buz üzerinde inkübasyon olacak şekilde toplam 3 dakika sonifiye edilerek ultrasonik hücre ekstraktları hazırlandı. Hücre ekstraktları 60 °C’lik su

banyosunda 45 dakika bekletildi. Daha sonra bu karışım 13.000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatanın tamamı (0.5 mL) temiz Eppendorf tüplerine aktarıldı. Bu süpernatantlar 20 mM Tris-HCl ile 50 kat sulandırıldı ve HPLC’de 254 nm’de analizi yapıldı [183].

Hücrelerin ürettikleri NAD^+ miktarının tayini HPLC cihazı ile ölçüldü (Agilent 1100 Series; C18 (4.6 x 250 mm)). Analizler Çizelge 3.8’de verilen cihaz parametrelerine göre gerçekleştirildi. NAD^+ analizi için öncelikle 1000 mg/L (1000 ppm)’lik stok çözelti hazırlandı. Kalibrasyon için gerekli standartlar 2–10 mg/L (2; 4; 6; 8; 10 ppm) aralığında 100 mg/L (100 ppm) ara stok solüsyonundan dilüsyonlar yapılarak hazırlandı. Kalibrasyon eğrileri ticari NAD^+ standart olarak kullanılarak elde edildi. Kalibrasyon eğrileri için korelasyon (r^2) katsayıları genel olarak ≥ 0.99 düzeyinde bulundu.

Çizelge 3.8 NAD tayini için HPLC cihazı analiz parametreleri

Parametre	
<i>Kolon</i>	Agilent 1100 Series; ACE 5 C18 (4.6 x 250 mm)
<i>Dedektör</i>	DAD
<i>Mobil faz (mL)</i>	A: Asetonitril; B: 50 mM Amonyum asetat
<i>Mobil faz hızı (mL/dk)</i>	1.2
<i>Kolon sıcaklığı (°C)</i>	20
<i>Tayin yapılan dalga boyu (nm)</i>	254 nm
<i>Hesaplama kriteri</i>	Pik alanı

3.15 Bakterilerin Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) Görüntüleri

Bakterilerin pasajlarının yapıldığı plaklardan koloninin bir kısmı alınarak 20 mL LB içeren 100 mL kapasiteli erlenlere ekim yapıldı ve gece boyunca çalkalamalı koşullarda (200 rpm) 37 °C’de inkübe edildi. Bu gece kültürlerinden 20 mL LB besiyerine % 1 inokulum yapılarak inkübasyona (24 saat, 200 rpm, 37°C) bırakıldı. Kültürleri yapılan hücreler belli zaman sürelerince inkübe edildikten sonra santrifüj tüplerine 1.5 mL edildi ve 10.000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen peletlere aşağıdaki işlemler uygulandı [184-185]:

1. Peletlere 1.5 mL glutaraldehit eklenip vortekslenerek 1.5 saat fiksasyon yapıldı.
2. Glutaraldehit fiksasyonunu takiben 0.1 M fosfat tamponu ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Ph 7.2) ile 4 defa 15’er dakika yıkandı.
3. Yıkama işleminden % 1 lik osmonium tetraoksit ile 2 saat süre ile postfiksasyon yapıldı.
4. Postfiksasyonu takiben 0.1 M fosfat tamponu ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, pH 7.2) ile 4 defa 15’er dakika yıkandı.
5. Yıkama işleminden sonra sırasıyla % 30, % 50, % 70, % 90, % 96, % 100 aseton ile dehidratasyon işlemi yapıldı. Örnekler her aseton aşamasında 20 dakika bekletildi.
6. Bakteri peletleri araldit CY212 (reçine) içerisinde 1 gece bekletildikten sonra jelatin kapsülleri içerisine bloklandı.
7. Araldit bloklardan ultramikrotom ile 60 nm kalınlığında kesitler alındı.
8. Bakır gridler üzerine alınan ince kesitlere, uranil asetat ve kurşun sitrat ile kontrastlama işlemi yapıldı.
9. Kesitler Zeis Libra 120 TEM ile incelenerek farklı büyütme ölçeklerinde görüntüler çekildi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

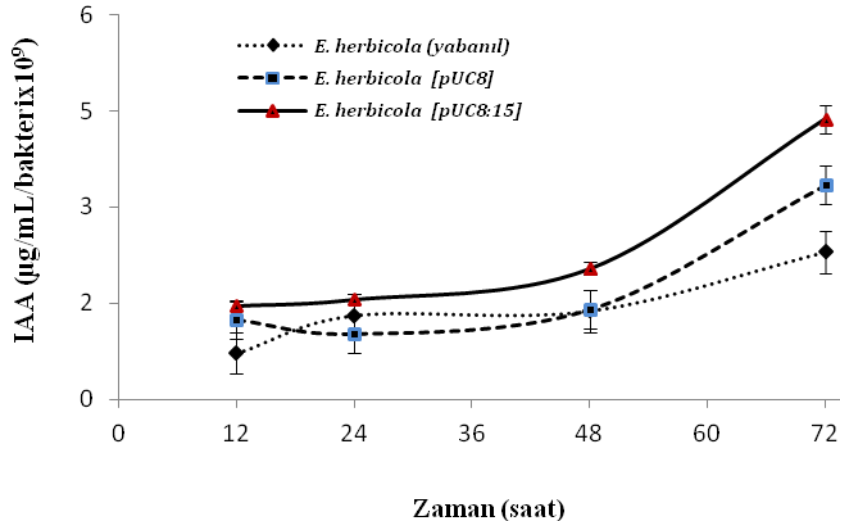
4.1 LB Kültürlerinde IAA Üretimi

E. herbicola ve rekombinantlarının (vgb^+ ve vgb^-) IAA üretim karakteristikleri araştırıldı. Hücre kültürleri zengin bir besiyeri olan LB ortamı ile aynı ortamın % 0.1 ve % 0.5 triptofan ile desteklenmişinde yapıldı.

LB ortamında her üç suşun zamana bağlı olarak artan IAA üretim profili Şekil 4.1’de görülmektedir. IAA seviyesinin ilk örneklerin alındığı 12 saat kültürlerinde, son örneklerin alındığı 72 saat kültürlerine kadar tedricen artışı belirlendi. İlk kültür örnekleri (yani 12 saat) ile son kültür örnekleri (yani 72 saat) arasında IAA seviyesinde vgb^- ’de % 50, konakçı ve vgb^+ ’de ise sırası ile yaklaşık 2 ve 3 kat artış görüldü.

Tüm inkübasyon periyotlarında *Vitreoscilla* hemoglobin genini (vgb) taşıyan suşun (vgb^+) diğer iki suşa (konakçı ve vgb^-) göre genel olarak daha yüksek bir IAA seviyesine sahip olduğu saptandı. Bu farkın, ileri kültür fazlarında daha büyük olduğu ve özellikle 72 saat kültürlerinde vgb^+ suşunun IAA seviyesinin, konakçı ve vgb^- suşlarından sırası ile yaklaşık 2 ve 1.3 kat fazla olduğu belirlendi.

Bunun yanı sıra LB ortamında inkübasyon süresi boyunca kültür ortamındaki canlı hücre sayısı ve pH’daki değişiklikler de ölçülmüştür ve bu değerler çizelge 4.1’de verilmiştir. Başlangıç pH’sı 7.0 olan kültür ortamlarının zamanla bazik olarak değiştiği kaydedildi. Canlı hücre sayısının yabancıl suşta 12 saatte, rekombinantlarda ise 24 saatte maksimum değere ulaştığı ve ilerleyen fazlarda azalış gösterdiği belirlendi.



Şekil 4.1. LB ortamında IAA üretimi. Her veri noktası üç bağımsız deneyin ortalaması olup, hata çubukları standart hataları (σ_{n-1}) ifade etmektedir

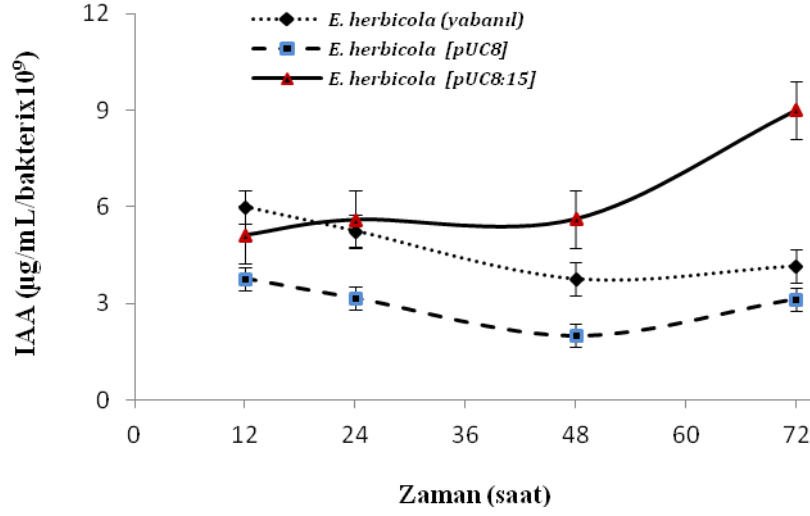
Çizelge 4.1 LB ortamında canlı hücre sayısı ve pH değişimi. Her veri noktası üç bağımsız deneyin ortalaması olup, standart sapmalar (σ_{n-1}) canlı hücre sayımında ilgili verinin % 10'undan, pH değerlerinde ise % 1'inden daha küçüktür (bu nedenle, açıklık için $\pm$ değerler verilmemiştir)

Suş	Canlı Hücre Sayısı/mL			
	12. saat	24. saat	48. saat	72. saat
<i>E. herbicola</i>	$12.05 \cdot 10^9$	$8.16 \cdot 10^9$	$7.30 \cdot 10^9$	$4.21 \cdot 10^9$
<i>Eh[pUC8]</i>	$3.65 \cdot 10^9$	$7.34 \cdot 10^9$	$5.76 \cdot 10^9$	$3.68 \cdot 10^9$
<i>Eh[pUC8:15]</i>	$4.80 \cdot 10^9$	$6.88 \cdot 10^9$	$6.24 \cdot 10^9$	$4.00 \cdot 10^9$

pH Değerleri				
<i>E. herbicola</i>	8.51	8.40	8.55	8.74
<i>Eh[pUC8]</i>	7.65	8.25	8.75	8.82
<i>Eh[pUC8:15]</i>	7.54	8.38	8.71	8.93

Kültürlere % 0.1 oranında triptofan eklenmesinin IAA üzerindeki indükleyici etkisi sadece *vgb*⁺ suşunda görüldü. Bu suшта IAA üretiminde zamana bağlı bir artış gözlenirken, en yüksek IAA seviyesinin kaydedildiği 72 saat kültürlerinde başlangıç (12 saat) kültürüne göre yaklaşık 2 kat artış belirlendi. Diğer iki suшта ise tersine IAA üretiminde genel olarak zamana bağlı bir düşüş gözlemlendi (Şekil 4.2). Tüm kültür

periyotlarında *vgb*⁺ suşunun diğer iki suşa göre yaklaşık 3 kata varan yüksek IAA seviyelerine sahip olduğu belirlendi.



Şekil 4.2. Triptofan destekli LB ortamında IAA üretimi. Triptofan kültür ortamına 6. saatte % 0.1 oranında eklenmiştir. Her veri noktası üç bağımsız deneyin ortalaması olup, hata çubukları standart hataları (σ_{n-1}) ifade etmektedir

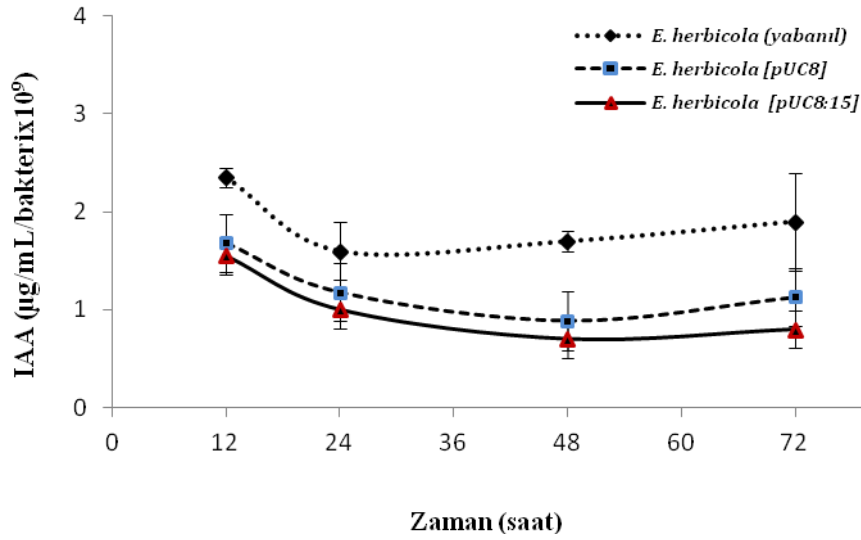
Çizelge 4.2. Triptofan destekli LB ortamında canlı hücre sayısı ve pH değişimi. Triptofan kültür ortamına 6. saatte % 0.1 oranında eklenmiştir. Her veri noktası üç bağımsız deneyin ortalaması olup, standart sapmalar (σ_{n-1}) canlı hücre sayımında ilgili verinin % 10'undan, pH değerlerinde ise % 1'inden daha küçüktür (bu nedenle, açıklık için $\pm$ değerler verilmemiştir)

Suş	Canlı Hücre Sayısı/mL			
	12.saat	24.saat	48.saat	72.saat
<i>E. herbicola</i>	$10.16 \cdot 10^9$	$10.24 \cdot 10^9$	$8.05 \cdot 10^9$	$3.68 \cdot 10^9$
<i>Eh[pUC8]</i>	$1.68 \cdot 10^9$	$3.48 \cdot 10^9$	$6.08 \cdot 10^9$	$3.84 \cdot 10^9$
<i>Eh[pUC8:15]</i>	$1.86 \cdot 10^9$	$2.72 \cdot 10^9$	$4.80 \cdot 10^9$	$2.56 \cdot 10^9$
	pH Değerleri			
	12.saat	24.saat	48.saat	72.saat
<i>E. herbicola</i>	8.25	8.45	8.55	8.64
<i>Eh[pUC8]</i>	8.10	8.56	8.45	8.82
<i>Eh[pUC8:15]</i>	8.15	8.48	8.71	8.93

Bu kültürlerde konakçı hücre genel olarak diğer iki rekombinanta göre daha yüksek hücre yoğunluğu gösterdi (Çizelge 4.2). Bu farkın 12 ve 24 saat kültürlerinde daha bariz olduğu görüldü. Başlangıç 12 saat kültürleri hariç, tüm kültür periyotlarında

vgb⁺ rekombinantının canlı hücre sayısı diğer iki suşa göre daha düşük gözlemlendi. Ortam asiditesinin değişiminin bir göstergesi olarak alınan kültür pH'larında ise kültür boyunca önemli bir değişiklik kaydedilmedi.

Triptofanın % 0.5 oranında kullanıldığı kültürlerde ise bu amino asitin etkisi *vgb*⁺ suşu dahil her üç suşta da IAA üretimini baskılayıcı rol oynamıştır (Şekil 4.3). Bu ortamda konakçı canlı hücre sayısı özellikle 12 ve 24 saat kültürlerinde daha yüksek bulunurken, en düşük hücre yoğunluğu tüm kültür fazlarında *vgb*⁻ suşunda gözlemlendi (Çizelge 4.3). Kültür pH'larındaki değişim, en açık şekilde pH değeri 7.0 olan başlangıç kültürlerinin pH değeri 8'lerin üzerine çıktığı 12 saat kültürlerinde görüldü ve bu kültür fazından sonra pH değerlerinde çok az bir artış kaydedildi.



Şekil 4.3. Triptofan destekli LB ortamında IAA üretimi. Triptofan kültür ortamına 6. saatte % 0.5 oranında eklenmiştir. Her veri noktası üç bağımsız deneyin ortalaması olup, hata çubukları standart hataları (σ_{n-1}) ifade etmektedir

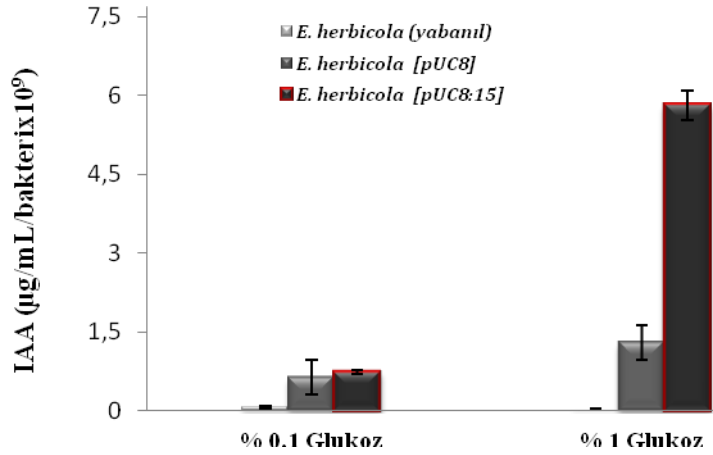
Çizelge 4.3. Triptofan destekli LB ortamında canlı hücre sayısı ve pH değişimi. Triptofan kültür ortamına 6. saatte % 0.5 oranında eklenmiştir. Her veri noktası üç bağımsız deneyin ortalaması olup, $\pm$ değerler standart sapmaları (σ_{n-1}) göstermektedir

Suş	Canlı Hücre Sayısı/mL			
	12.saat	24.saat	48.saat	72.saat
<i>E. herbicola</i>	$4.48 \cdot 10^9 \pm 0.90$	$7.52 \cdot 10^9 \pm 1.02$	$4.80 \cdot 10^9 \pm 0.51$	$3.52 \cdot 10^9 \pm 0.49$
<i>Eh[pUC8]</i>	$1.60 \cdot 10^9 \pm 0.41$	$3.20 \cdot 10^9 \pm 1.12$	$3.04 \cdot 10^9 \pm 0.64$	$2.40 \cdot 10^9 \pm 0.41$
<i>Eh[pUC8:15]</i>	$2.24 \cdot 10^9 \pm 0.73$	$4.80 \cdot 10^9 \pm 0.48$	$4.96 \cdot 10^9 \pm 0.50$	$3.20 \cdot 10^9 \pm 0.89$
Suş	pH Değerleri			
	12.saat	24.saat	48.saat	72.saat
<i>E. herbicola</i>	8.52 ± 0.09	8.67 ± 0.07	8.96 ± 0.03	9.24 ± 0.05
<i>Eh[pUC8]</i>	8.60 ± 0.05	8.86 ± 0.08	8.93 ± 0.07	9.11 ± 0.09
<i>Eh[pUC8:15]</i>	8.57 ± 0.04	8.78 ± 0.04	9.11 ± 0.17	9.18 ± 0.04

4.2 M9 Kültürlerinde IAA Üretimi

Çalışmanın bu kısmında hem düşük (% 0.1) hem de yüksek (% 1) konsantrasyonda glukoz, fruktoz ve sükrozun bulunduğu M9 ortamındaki kültürlerin IAA üretim karakteristikleri araştırılmıştır. Bu ortamlarda sadece 24 saat kültürlerinde IAA üretimleri çalışıldı.

Glukoz içeren ortamlarda, konakçı hücre kültürleri hariç, glukozun farklı konsantrasyonları IAA üretimi üzerinde oldukça farklı etki gösterdi. Özellikle *vgb*⁺ suşunda % 1 glukoz içeren M9 ortamında, % 0.1 glukoz içeren ortama göre 8 kat IAA artışı gözlemlendi (Şekil 4.4). Canlı hücre sayısı konakçı hücre kültürlerinde diğer iki suşa göre yaklaşık 5 kata varan oranlarda yüksek bulundu. Yüksek glukoz konsantrasyonu rekombinantların hücre sayısı üzerinde negatif bir etki yarattığı görüldü. Bu ortamlarda pH değeri düşük glukoz ortamında nispeten değişmezken, yüksek glukoz ortamında dramatik bir düşüş gösterdi (Çizelge 4.4).



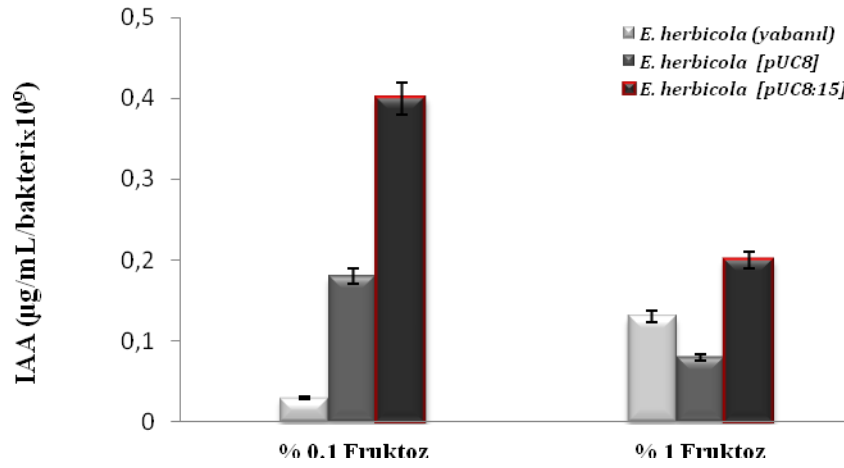
Şekil 4.4. Glukoz destekli M9 ortamında 24 saat kültürlerinde IAA üretimi. Her veri noktası üç bağımsız deneyin ortalaması olup, hata çubukları standart hataları (σ_{n-1}) ifade etmektedir

Çizelge 4.4 Glukozla desteklenmiş M9 ortamında 24 saat kültürlerinde canlı hücre sayısı ve ortam asiditesindeki değişim. Her suş için, üstteki değerler % 0.1, alttaki değerler ise % 1 glukoz içeren ortamı ifade etmektedir. Her veri noktası üç bağımsız deneyin ortalaması olup, $\pm$ değerler standart sapmaları (σ_{n-1}) belirtmektedir.

Suş	Canlı Hücre/mL	pH Değerleri
<i>E. herbicola</i>	$3.30 \cdot 10^9 \pm 0.40$	6.64 ± 0.01
	$3.46 \cdot 10^9 \pm 0.24$	4.29 ± 0.01
<i>Eh[pUC8]</i>	$1.60 \cdot 10^9 \pm 0.32$	6.73 ± 0.02
	$1.38 \cdot 10^9 \pm 0.33$	4.42 ± 0.02
<i>Eh[pUC8:15]</i>	$1.54 \cdot 10^9 \pm 0.48$	6.70 ± 0.03
	$0.80 \cdot 10^9 \pm 0.09$	4.18 ± 0.02

Kültür ortamına fruktozun eklenmesi, konakçı ile rekombinantlar üzerinde farklı etki ile kendini gösterdi. Yüksek fruktoz konsantrasyonu konakçı hücrede yüksek IAA seviyesine sebep olurken, rekombinantlarda tersi durum görüldü. Konakçı hücrede IAA seviyesi yüksek fruktoz ortamında düşük fruktoz ortamına göre yaklaşık 5 kat yüksek belirlendi. *vgb⁻* ve *vgb⁺* suşlarında ise, yüksek fruktoz ortamında IAA seviyesinde sırası ile 2.3 ve 2 kat azaldığı saptandı (Şekil 4.5).

Aynı ortamda canlı hücre sayılarında fruktozun yüksek konsantrasyonlarında genel olarak bir artış görüldü. Bu ortamlarda sadece konakçı hücrenin ortam pH'sı yüksek fruktozda önemli oranda düşerken, diğer iki suşta bariz bir fark görülmedi (Çizelge 4.5).



Şekil 4.5. Fruktozla desteklenmiş M9 ortamında 24 saat kültürlerinde IAA üretimi. Her veri noktası üç bağımsız deneyin ortalaması olup, hata çubukları standart hataları (σ_{n-1}) ifade etmektedir

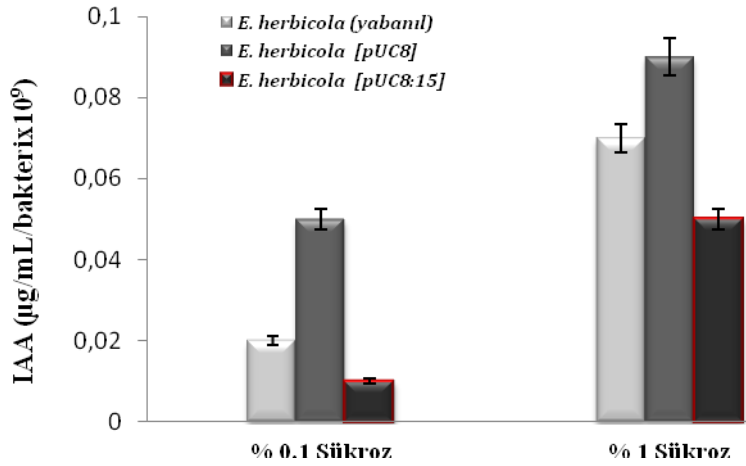
Çizelge 4.5 Fruktozla desteklenmiş M9 ortamında 24 saat kültürlerinde canlı hücre sayısı ve ortam asiditesindeki değişim. Her suş için üstteki değerler % 0.1, alttaki değerler ise % 1 fruktoz içeren ortamı ifade etmektedir. Her veri noktası üç bağımsız deneyin ortalaması olup, $\pm$ değerler standart sapmaları (σ_{n-1}) belirtmektedir.

Suş	Canlı Hücre/mL	pH Değerleri
<i>E. herbicola</i>	$3.04 \cdot 10^9 \pm 0.57$	6.66 ± 0.01
	$3.68 \cdot 10^9 \pm 0.64$	4.49 ± 0.07
<i>Eh[pUC8]</i>	$2.02 \cdot 10^9 \pm 0.57$	6.74 ± 0.02
	$2.40 \cdot 10^9 \pm 0.59$	6.67 ± 0.04
<i>Eh[pUC8:15]</i>	$1.17 \cdot 10^9 \pm 0.56$	6.79 ± 0.01
	$2.13 \cdot 10^9 \pm 0.56$	6.72 ± 0.01

Sükroz içeren M9 ortamında, sükroz konsantrasyonuna bağlı olarak her üç suşta da IAA seviyesinde önemli artış gözlemlendi. Sükrozu % 0.1 oranında içeren ortam ile kıyaslandığında, % 1 sükroz içeren ortamda IAA seviyesi konakçı, *vgb⁻* ve *vgb⁺* suşlarında sırası ile 3.5, 1.8 ve 5 kat daha fazla olduğu tespit edildi. En yüksek IAA

seviyesi, vgb^- suşunda görülürken, vgb^+ suşunun nispeten düşük bir IAA düzeyine sahip olduğu belirlendi (Şekil 4.6).

Bu ortamın yüksek ve düşük konsantrasyonda sükröz içeren kültürlerinde canlı hücre sayısı genel olarak büyük bir değişiklik görülmedi. Konakçının kültür pH'sı yüksek sükrözde dramatik bir şekilde düşerken, diğer iki suşta pH'da önemli bir değişiklik gözlenmedi (Çizelge 4.6).



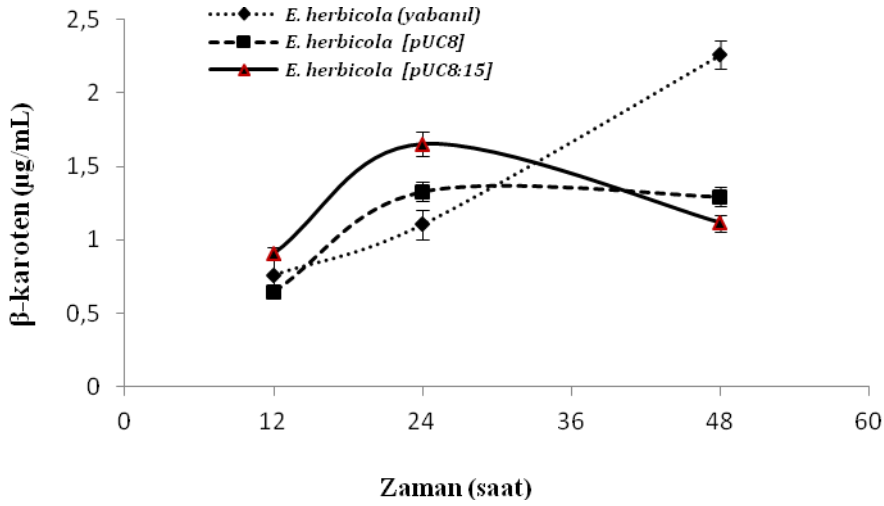
Şekil 4.6. Sükröz destekli M9 ortamında 24 saat kültürlerinde IAA üretimi. Her veri noktası üç bağımsız deneyin ortalaması olup, hata çubukları standart hataları (σ_{n-1}) ifade etmektedir

Çizelge 4.6 Sükrözle desteklenmiş M9 ortamında 24 saat kültürlerinde canlı hücre sayısı ve ortam asiditesindeki değişim. Her suş için üstteki değerler % 0.1, alttaki değerler ise % 1 fruktoz içeren ortamı ifade etmektedir. Her veri noktası üç bağımsız deneyin ortalaması olup, $\pm$ değerler standart sapmaları (σ_{n-1}) belirtmektedir

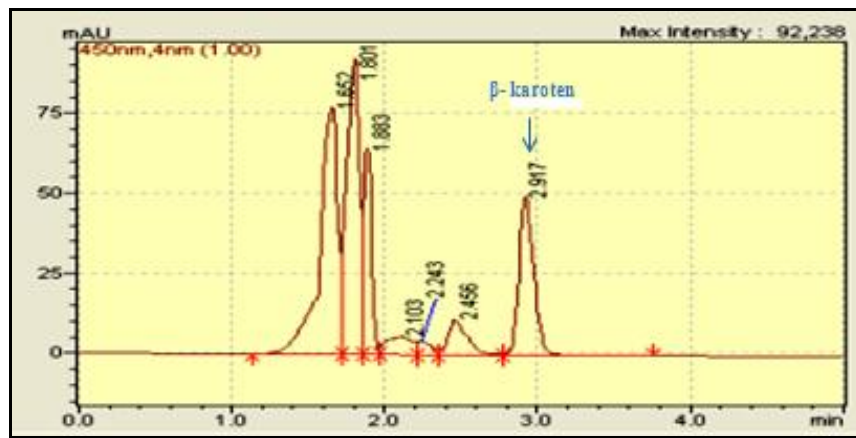
Suş	Canlı Hücre/mL	pH Değerleri
<i>E. herbicola</i>	$3.30 \cdot 10^9 \pm 0.24$	6.65 ± 0.07
	$4.21 \cdot 10^9 \pm 0.48$	4.56 ± 0.02
<i>Eh[pUC8]</i>	$3.30 \cdot 10^9 \pm 0.51$	6.82 ± 0.03
	$2.66 \cdot 10^9 \pm 0.40$	6.75 ± 0.01
<i>Eh[pUC8:15]</i>	$2.02 \cdot 10^9 \pm 0.25$	6.87 ± 0.02
	$2.40 \cdot 10^9 \pm 0.70$	6.78 ± 0.01

4.3 LB Kültürlerinde β -karoten Üretimi

Çalışmanın bu aşamasında, LB ortamında farklı inkübasyon zamanlarındaki β -karoten üretimi araştırıldı. Konakçının en yüksek β -karoten üretimi 48 saat kültürlerinde görülürken, rekombinant suşlarda 24 saat kültürlerinde kaydedildi. Konakçı hücrenin başlangıç (12 saat) kültürlerine göre, 48 saat kültürlerinde yaklaşık 3 kat daha fazla β -karoten belirlendi. vgb^+ rekombinant suşunun ürettiği β -karoten miktarı 24 saat kültürlerinde, yabanıl suştan ve vgb^- rekombinant suşundan sırası ile yaklaşık 1.5 ve 1.2 kat daha yüksek kaydedildi (Şekil 4.7).



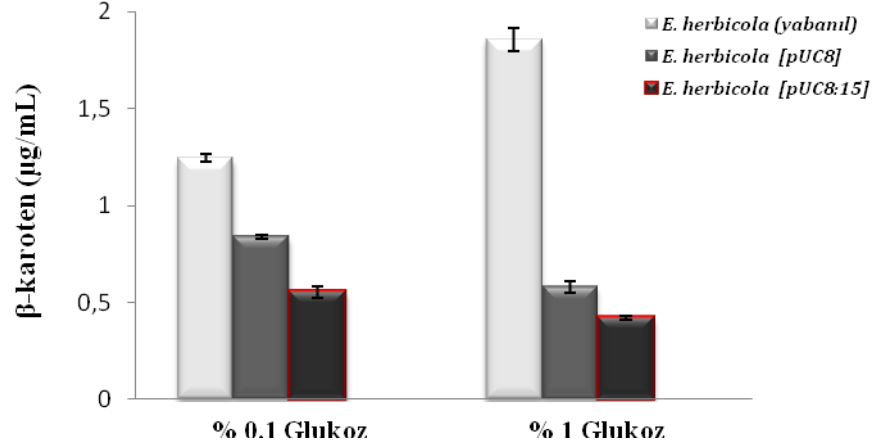
Şekil 4.7. LB ortamında β -karoten üretimi. Her veri noktası üç bağımsız deneyin ortalaması olup, hata çubukları standart hataları (σ_{n-1}) ifade etmektedir



Şekil 4.8. β -karoten için HPLC kromatogramı

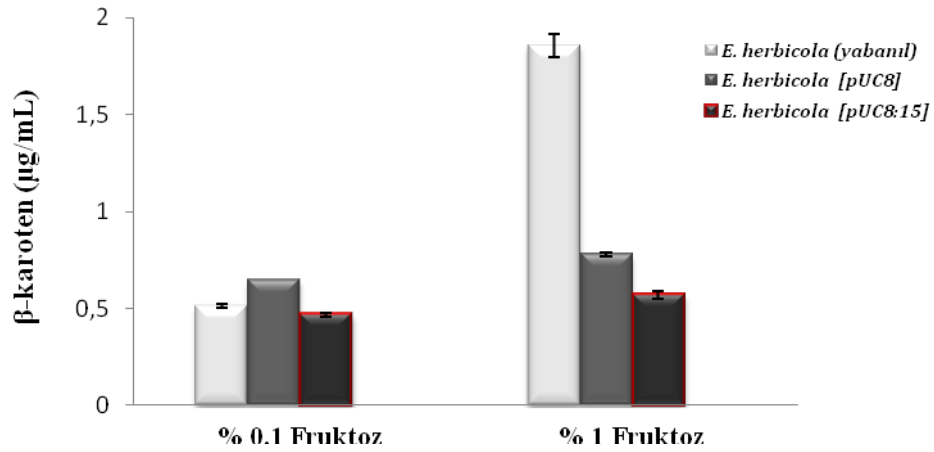
4.4 M9 Kùltürlerinde β -karoten Üretimi

M9 kùltürlerinde yüksek konsantrasyonda glukoz, konakçı hücrede β -karoten üretiminde yaklaşık 1.5 artışa neden oldu. Rekombinant suşlarda ise β -karoten üretiminin yüksek glukoz ortamında nispeten azaldığı gözlemlendi (Şekil 4.9).



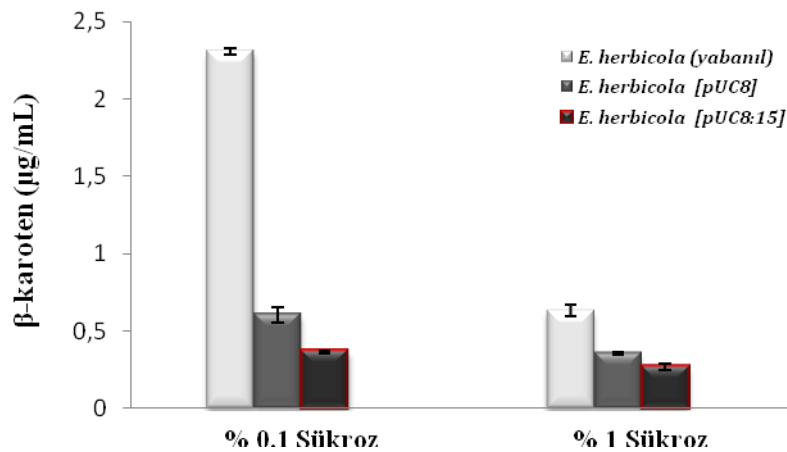
Şekil 4.9. Glukoz destekli M9 ortamında 24 saat kùltürlerinde β -karoten üretimi. Her veri noktası üç bağımsız deneyin ortalaması olup, hata çubukları standart hataları (σ_{n-1}) ifade etmektedir

Fruktoz ile desteklenmiş M9 kùltürlerinde her üç suşta da β -karoten üretiminin yüksek fruktoz konsantrasyonunda arttığı belirlendi. Yüksek konsantrasyonda fruktozun konakçıda β -karoten üretimini yaklaşık 3.6 kat artırırken, vgb^- ve vgb^+ rekombinant suşlarında ise sırasıyla 1.3 ve 1.2 kat artırdığı gözlemlendi (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Fruktoz destekli M9 ortamında 24 saat kültürlerinde β -karoten üretimi. Her veri noktası üç bağımsız deneyin ortalaması olup, hata çubukları standart hataları (σ_{n-1}) ifade etmektedir

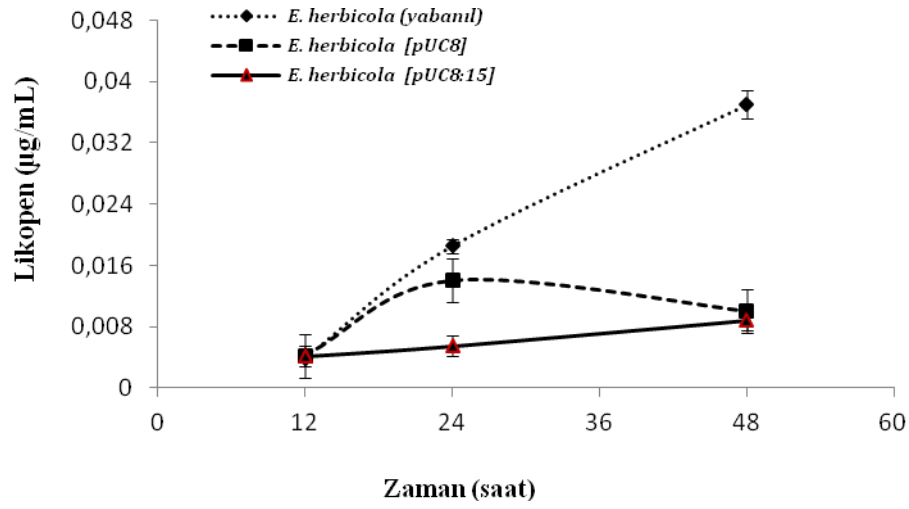
Karbon kaynağı olarak M9 ortamına sükrozun kullanılması diğer karbon kaynakları (glukoz ve fruktoz) gibi düşük ve yüksek konsantrasyonda β -karoten üretimi üzerinde farklı etkiler gösterdi. Sükrozun yüksek konsantrasyonu her üç suşta da negatif bir etki gösterdi. Özellikle bu durum konakçıda daha belirgindi. Konakçı hücre kültüründe yüksek sükroz β -karoten üretiminin yaklaşık olarak 3.7 kat azalmasına sebep olurken, vgb^- ve vgb^+ rekombinant suşlarında sırasıyla yaklaşık 1.7 ve 1.4 kat bir azalmaya neden oldu (Şekil 4.11).



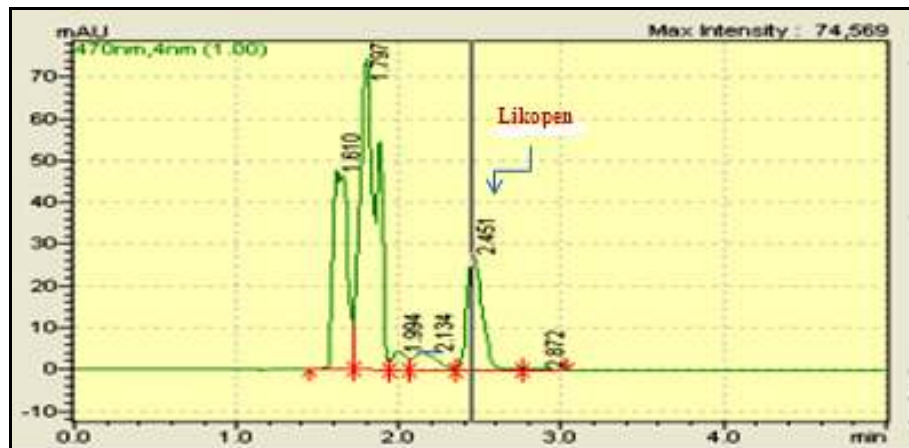
Şekil 4.11. Sükroz destekli M9 ortamında 24 saat kültürlerinde β -karoten üretimi. Her veri noktası üç bağımsız deneyin ortalaması olup, hata çubukları standart hataları (σ_{n-1}) ifade etmektedir

4.5 LB Kültürlerinde Likopen Üretimi

LB ortamında likopen üretimine bakıldığında konakçı hücrede üretimin genel olarak daha fazla olduğu saptandı. Konakçının 48 saat kültürlerindeki likopen miktarının, 12 saat kültürlerine göre yaklaşık 10 kat yüksek olduğu tespit edildi. vgb^- ve vgb^+ rekombinant suşlarının likopen seviyesi ise 12 saat kültürlerine göre 48 saat kültürlerinde sırasıyla yaklaşık 2.4 ve 2.1 kat daha yüksekti (Şekil 4.12).



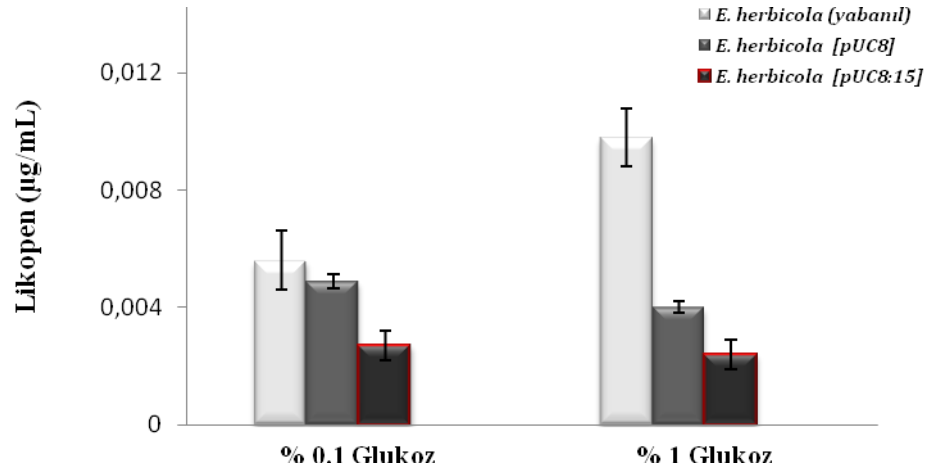
Şekil 4.12. LB ortamında likopen üretimi. Her veri noktası üç bağımsız deneyin ortalaması olup, hata çubukları standart hataları (σ_{n-1}) ifade etmektedir



Şekil 4.13. Likopen için HPLC kromotogramı

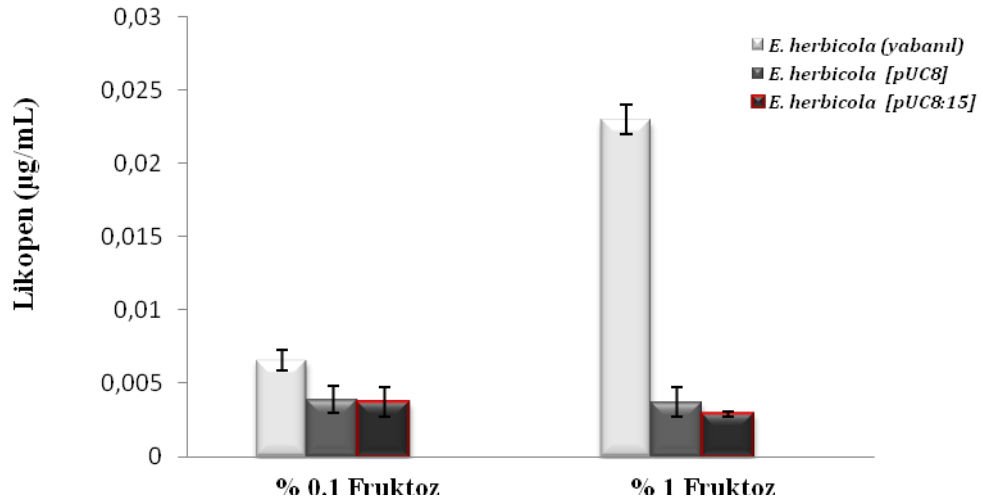
4.6 M9 Kùltürlerinde Likopen Üretimi

Bu kısımda M9 ortamında düşük ve yüksek konsantrasyonda glukoz eklenmiş kùltürlerde likopen üretimi araştırıldı. Yüksek konsantrasyonda glukoz konakçı hücrede likopen üretimini yaklaşık 1.8 kat arttırırken, vgb^- ve vgb^+ rekombinant suşlarında tersine sırası ile 1.3 ve 1.2 kat azalma kaydedildi (Şekil 4.14).



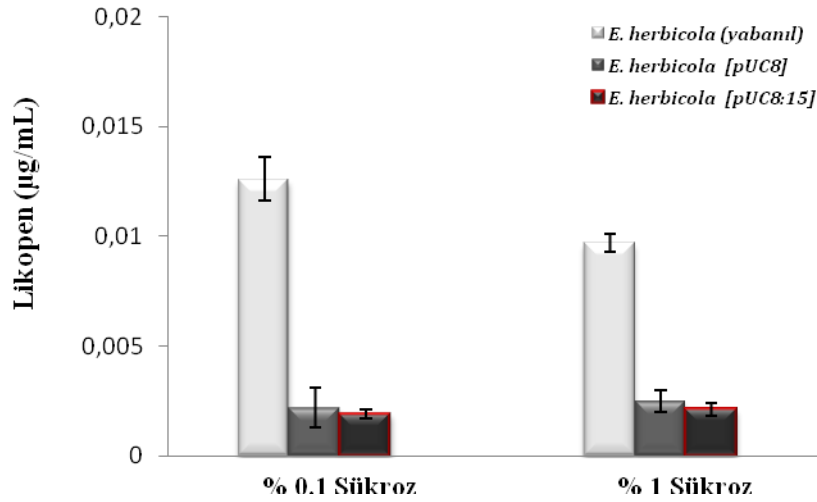
Şekil 4.14. Glukoz destekli M9 ortamında 24 saat kùltürlerinde likopen üretimi. Her veri noktası üç bağımsız deneyin ortalaması olup, hata çubukları standart hataları (σ_{n-1}) ifade etmektedir

Yüksek konsantrasyonda fruktoz ile desteklenmiş konakçı hücre M9 kùltürlerinde likopen üretiminin düşük fruktoz ortamına göre yaklaşık 3.5 kat arttığı gözlenirken rekombinant suşlarda ise nispeten bir azalma kaydedildi (Şekil 4.15)



Şekil 4.15. Fruktoz destekli M9 ortamında 24 saat kültürlerinde likopen üretimi. Her veri noktası üç bağımsız deneyin ortalaması olup, hata çubukları standart hataları (σ_{n-1}) ifade etmektedir

M9 ortamına yüksek sükröz, konakçı hücrede likopen üretiminin yaklaşık 1.3 kat azalmasına neden olurken, rekombinant suşlarda ise bu artış çok daha düşük oranlarda oldu (Şekil 4.16).

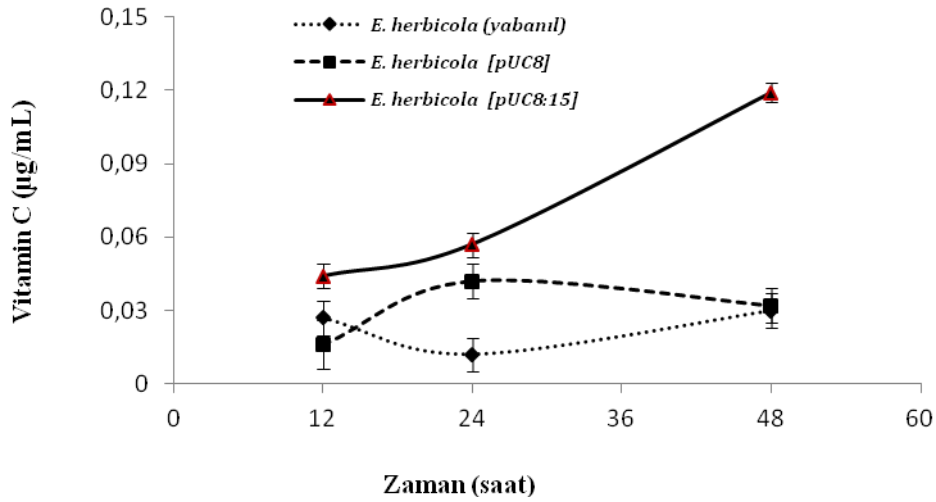


Şekil 4.16. Sükröz destekli M9 ortamında 24 saat kültürlerinde likopen üretimi. Her veri noktası üç bağımsız deneyin ortalaması olup, hata çubukları standart hataları (σ_{n-1}) ifade etmektedir

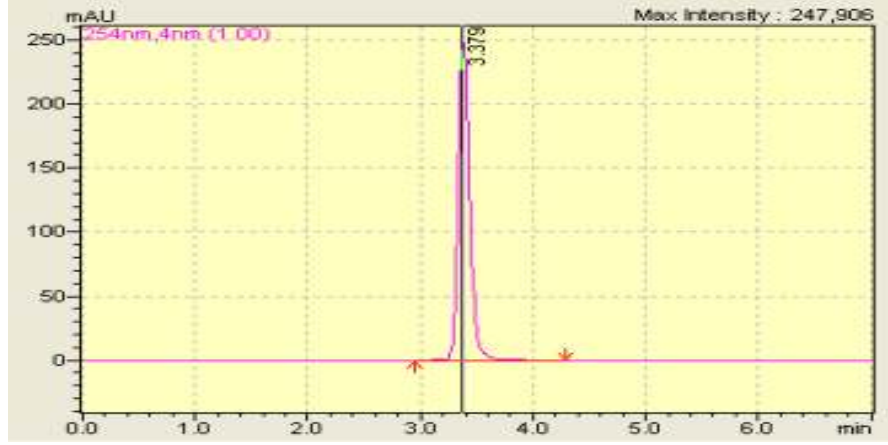
4.7 LB Kültürlerinde C Vitamini Üretimi

LB kültürlerinde C vitamini üretiminin özellikle vgb^+ rekombinant suşunda diğer iki suşa göre daha yüksek olduğu saptandı. vgb^+ rekombinant suşunun 48 saat kültürlerinde C vitamini seviyesi, kültürün başlangıç (12 saat) fazına göre yaklaşık 3 kat yüksek belirlendi. Konakçı ve vgb^- rekombinant suşlarında ise C vitamini 48 saat kültürlerinde benzer seviyede iken, başlangıç kültürüne göre 24 saat kültürlerinde konakçıda azalış vgb^- rekombinantında ise bir artış gözlemlendi (Şekil 4.17).

Aynı ortamın 12 ve 24 saat kültürlerinde konakçı hücrenin canlı hücre sayısının rekombinant suşlara göre daha fazla olduğu kaydedildi. Ancak, vgb^+ suşunun 48 saat kültürlerinde canlı hücre sayısının diğer iki suştan nispeten yüksek olduğu saptandı. Başlangıç pH'sı 7.0 olan büyüme ortamının zamanla bazik olarak değiştiği saptandı (Çizelge 4.7).



Şekil 4.17. LB ortamında C vitamini üretimi. Her veri noktası üç bağımsız deneyin ortalaması olup, hata çubukları standart hataları (σ_{n-1}) ifade etmektedir



Şekil 4.18. C vitamini için HPLC kromatogramı

Çizelge 4.7. LB ortamında canlı hücre sayısı ve pH değişimi. Her veri noktası üç bağımsız deneyin ortalaması olup, standart sapmalar (σ_{n-1}) çizelgede verilmiştir

Canlı Hücre Sayısı/mL			
Suş	12.saat	24.saat	48.saat
<i>E. herbicola</i>	$8.16 \cdot 10^9 \pm 0.54$	$7.52 \cdot 10^9 \pm 0.23$	$4.80 \cdot 10^9 \pm 0.51$
<i>Eh[pUC8]</i>	$4.88 \cdot 10^9 \pm 0.24$	$6.40 \cdot 10^9 \pm 0.44$	$3.04 \cdot 10^9 \pm 0.47$
<i>Eh[pUC8:15]</i>	$3.20 \cdot 10^9 \pm 0.31$	$5.60 \cdot 10^9 \pm 0.37$	$4.96 \cdot 10^9 \pm 0.28$

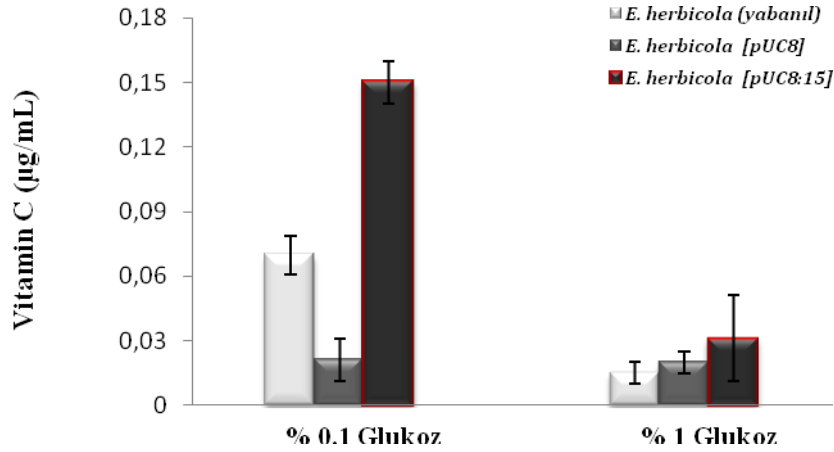
pH Değerleri			
<i>E. herbicola</i>	8.06 ± 0.03	8.27 ± 0.02	8.65 ± 0.03
<i>Eh[pUC8]</i>	8.25 ± 0.01	8.36 ± 0.04	8.61 ± 0.01
<i>Eh[pUC8:15]</i>	8.17 ± 0.02	8.39 ± 0.04	8.70 ± 0.01

4.8 M9 Kültürlerinde C Vitamini Üretimi

Çalışmanın bu kısmında düşük ve yüksek konsantrasyonda glukoz, fruktoz ve sükrozla desteklenmiş M9 ortamındaki kültürlerin C vitamini üretimi araştırıldı. Farklı karbon kaynaklarının C vitamini üretimi üzerinde farklı etkileri olduğu saptandı.

Yüksek glukoz her üç suşta da C vitamin üretimini azalttı. Bu durumun, sırası ile 4.7 ve 5 kat azalmanın olduğu konakçı ve *vgb⁺* suşunda daha bariz olduğu görüldü. *vgb⁻* suşunda ise C vitamini seviyesinde her iki glukoz konsantrasyonunda da bariz bir değişiklik görülmedi (Şekil 4.19).

Yüksek konsantrasyonda glukoz ortamında konakçının canlı hücre sayısı artarken, rekombinant suşlarda azaldığı görüldü. Kültürlerdeki pH'nın da yüksek glukoz ortamında önemli oranda azaldığı belirlendi (Çizelge 4.8).



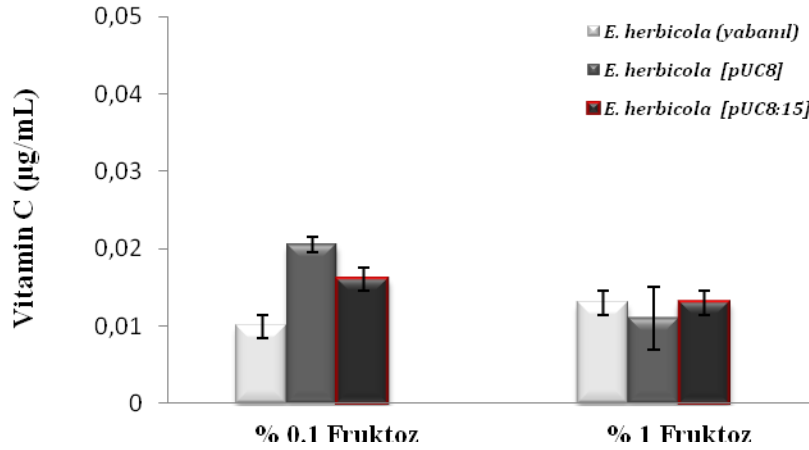
Şekil 4.19. Glukoz destekli M9 ortamında 24 saat kültürlerinde C vitamini üretimi. Her veri noktası üç bağımsız deneyin ortalaması olup, hata çubukları standart hataları (σ_{n-1}) ifade etmektedir

Çizelge 4.8 Glukozla desteklenmiş M9 ortamında 24 saat kültürlerinde canlı hücre sayısı ve ortam asiditesindeki değişim. Her suş için, üstteki değerler % 0.1, alttaki değerler ise % 1 glukoz içeren ortamı ifade etmektedir. Her veri noktası üç bağımsız deneyin ortalaması olup, $\pm$ değerler standart sapmaları (σ_{n-1}) belirtmektedir

Suş	Canlı Hücre/mL	pH Değerleri
<i>E. herbicola</i>	$3.73 \cdot 10^9 \pm 0.24$	6.65 ± 0.01
	$4.16 \cdot 10^9 \pm 0.16$	4.48 ± 0.01
<i>Eh[pUC8]</i>	$2.08 \cdot 10^9 \pm 0.32$	6.72 ± 0.01
	$1.70 \cdot 10^9 \pm 0.24$	5.32 ± 0.01
<i>Eh[pUC8:15]</i>	$1.81 \cdot 10^9 \pm 0.33$	6.72 ± 0.02
	$1.38 \cdot 10^9 \pm 0.18$	4.08 ± 0.01

M9 ortamına % 1 oranında ilave edilen fruktoz, konakçada C vitamini üretiminde 1.3 katlık bir artış sağlarken, *vgb⁻* ve *vgb⁺* suşlarında sırasıyla 2 ve 1.3 kat oranında bir azalmaya neden oldu (Şekil 4.20).

Yüksek fruktoz içeren ortamda konakçının canlı hücre sayısı arttarken, rekombinant suşlarda azaldı. Hem yüksek hem düşük fruktoz içeren ortamlarda, genel olarak ortam pH'sı hemen hemen nötr kalırken, sadece yüksek konsantrasyondaki fruktoz ortamında konakçı hücrede asidik pH değerleri kaydedildi (Çizelge 4.9).



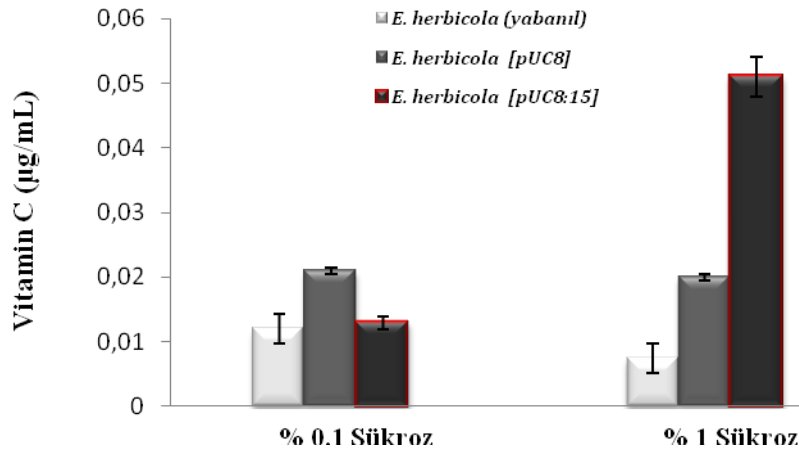
Şekil 4.20. Fruktozla desteklenmiş M9 ortamında 24 saat kültürlerinde C vitamini üretimi. Her veri noktası üç bağımsız deneyin ortalaması olup, hata çubukları standart hataları (σ_{n-1}) ifade etmektedir

Çizelge 4.9 Fruktozla desteklenmiş M9 ortamında 24 saat kültürlerinde canlı hücre sayısı ve ortam asiditesindeki değişim. Her suş için, üstteki değerler % 0.1, alttaki değerler ise % 1 glukoz içeren ortamı ifade etmektedir. Her veri noktası üç bağımsız deneyin ortalaması olup, $\pm$ değerler standart sapmaları (σ_{n-1}) belirtmektedir

Suş	Canlı Hücre/mL	pH Değerleri
<i>E. herbicola</i>	$4.37 \cdot 10^9 \pm 0.40$	6.67 ± 0.02
	$4.69 \cdot 10^9 \pm 0.29$	4.50 ± 0.07
<i>Eh[pUC8]</i>	$2.56 \cdot 10^9 \pm 0.27$	6.77 ± 0.01
	$2.08 \cdot 10^9 \pm 0.33$	6.68 ± 0.03
<i>Eh[pUC8:15]</i>	$2.29 \cdot 10^9 \pm 0.56$	6.78 ± 0.01
	$1.86 \cdot 10^9 \pm 0.25$	6.70 ± 0.01

Yüksek konsantrasyonda sükröz, konakçı ve *vgb⁻* suşunda C vitamini üretimini sırası ile 1.7 ve 1.1 kat azalma yaratırken, *vgb⁺* rekobinant suşunda yaklaşık 4 kat artışa sebep oldu (Şekil 4.21).

Her üç suşun canlı hücre yoğunluğunun yüksek süktrozda arttığı kaydedildi. Bu fark, 1.4 kat artışın olduğu *vgb⁺* rekobinantında daha açık görüldü. Süktrozun her iki konsantrasyonu her üç suşun kültür pH'sında nispeten düşüşe sebep olurken, bu düşüş konakçıda yüksek süktrozla daha barizdi (Çizelge 4.10).



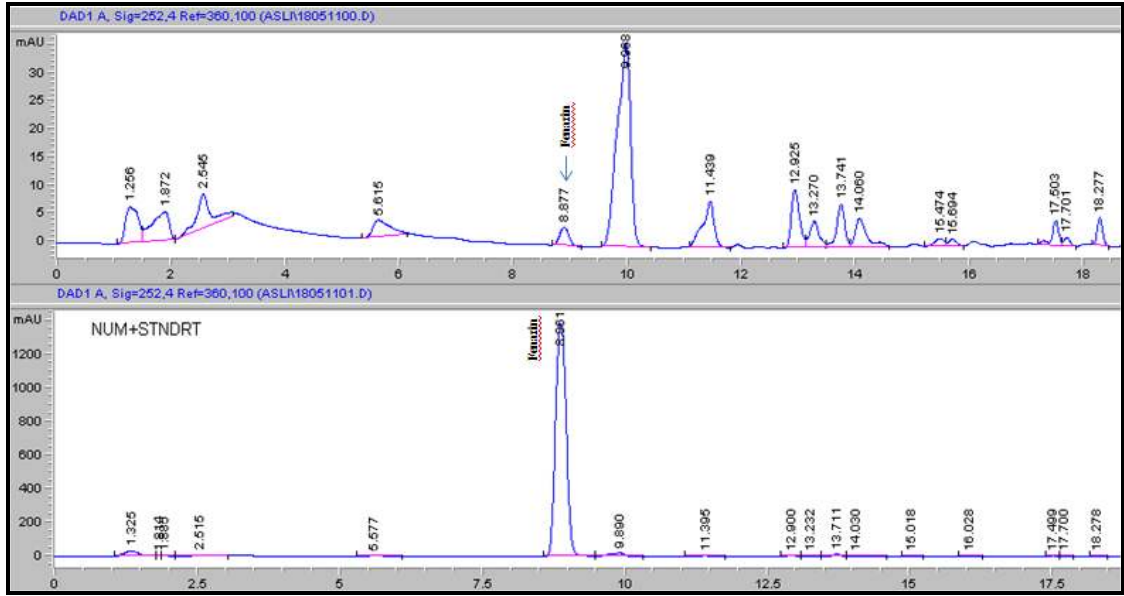
Şekil 4.21. Süktrozla desteklenmiş M9 ortamında 24 saat kültürlerinde C vitamini üretimi. Her veri noktası üç bağımsız deneyin ortalaması olup, hata çubukları standart hataları (σ_{n-1}) ifade etmektedir

Çizelge 4.10 Süktrozla desteklenmiş M9 ortamında 24 saat kültürlerinde canlı hücre sayısı ve ortam asiditesindeki değişim. Her suş için, üstteki değerler % 0.1, alttaki değerler ise % 1 glukoz içeren ortamı ifade etmektedir. Her veri noktası üç bağımsız deneyin ortalaması olup, $\pm$ değerler standart sapmaları (σ_{n-1}) belirtmektedir

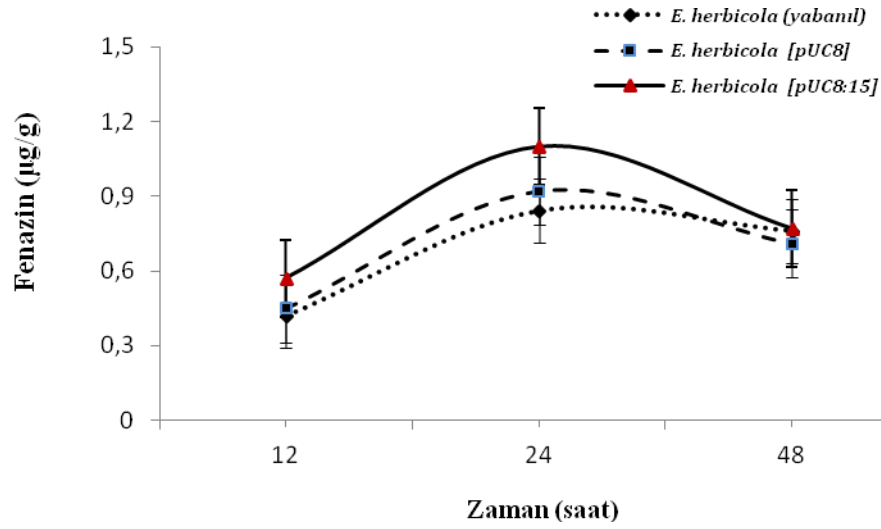
Suş	Canlı Hücre/mL	pH Değerleri
<i>E. herbicola</i>	$3.14 \cdot 10^9 \pm 0.24$	6.67 ± 0.04
	$3.52 \cdot 10^9 \pm 0.16$	4.57 ± 0.02
<i>Eh[pUC8]</i>	$2.13 \cdot 10^9 \pm 0.18$	6.80 ± 0.03
	$2.66 \cdot 10^9 \pm 0.41$	6.76 ± 0.02
<i>Eh[pUC8:15]</i>	$1.71 \cdot 10^9 \pm 0.32$	6.83 ± 0.02
	$2.40 \cdot 10^9 \pm 0.69$	6.78 ± 0.01

4.9 LB Kùltürlerinde Fenazin Üretimi

LB ortamında *vgb⁺* suşunun ürettiğı fenazin miktarının bütün kùltür fazlarında diğerk iki suşag göre daha fazla olduğı belirlendi. En yüksek fenazin üretimi *vgb⁺* rekombinantının 24 saat kùltürlerinde kaydedildi. Bu kùtlùlerde *vgb⁺* suşunun ürettiğı fenazin miktarının, 12 ve 48 saatteki kùltùrlere göre sırasıyla 2 kat ve 1.5 kat fazla olduğı saptandı (Şekil 4.23).



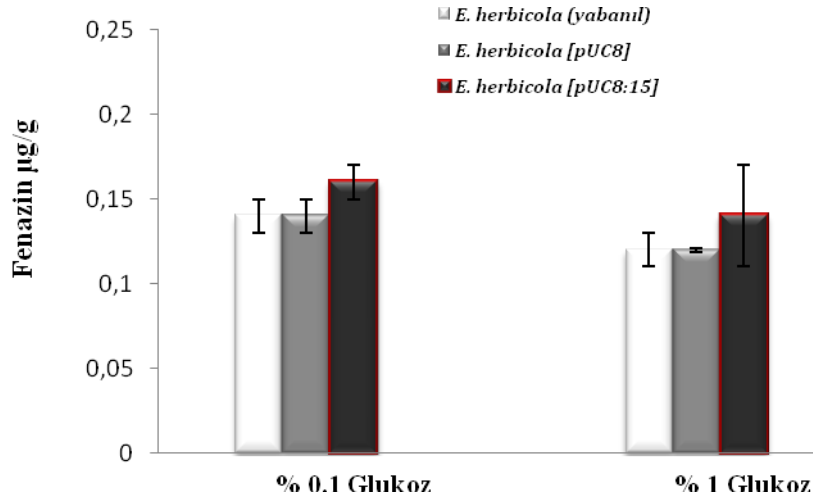
Şekil 4.22. Fenazin eklenmiş numune standardı (alttaki pik) ve örnekteki fenazinin aynı yerde pik veren (üstteki pik) HPLC diyagramı



Şekil 4.23. LB ortamında fenazin üretimi. Her veri noktası üç bağımsız deneyin ortalaması olup, hata çubukları standart hataları (σ_{n-1}) ifade etmektedir

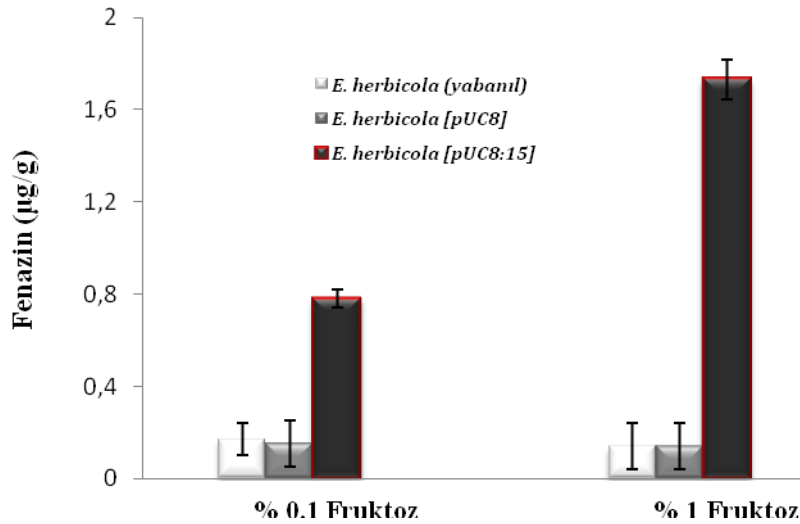
4.10 M9 Kültürlerinde Fenazin Üretimi

Burada farklı karbon kaynağı (glukoz, fruktoz ve sükroz) ile desteklenmiş M9 ortamında kültürlerin fenazin üretimi araştırıldı. Yüksek konsantrasyonlu glukoz ortamında her üç suşun ürettiği fenazin miktarlarında kısmi bir azalma görüldü (Şekil 4.24). Konakçı ve vgb^- suşu benzer fenazin seviyelerine sahipken, en yüksek fenazin değerleri vgb^+ suşunda kaydedildi.



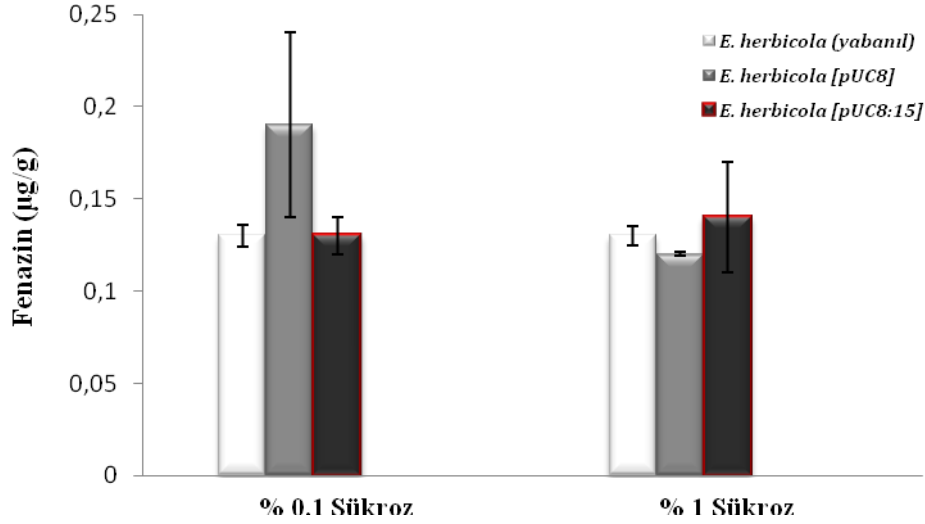
Şekil 4.24. Glukozla desteklenmiş M9 ortamında 24 saat kültürlerinde fenazın üretimi. Her veri noktası üç bağımsız deneyin ortalaması olup, hata çubukları standart hataları (σ_{n-1}) ifade etmektedir

Hem düşük hem de yüksek konsantrasyondaki fruktozun *vgb*⁺ rekombinant suşunda fenazın üretimini önemli oranda indüklediği görüldü. Fenazın üretimi fruktozun her iki konsantrasyonunda da konakçı ve *vgb*⁻ suşunda önemli bir değişiklik yapmazken, yüksek fruktoz *vgb*⁺ rekombinant suşunda bu antibiyotiğin 2 kat artışına sebep oldu (Şekil 4.5).



Şekil 4.25. Fruktozla desteklenmiş M9 ortamında 24 saat kültürlerinde fenazın üretimi. Her veri noktası üç bağımsız deneyin ortalaması olup, hata çubukları standart hataları (σ_{n-1}) ifade etmektedir

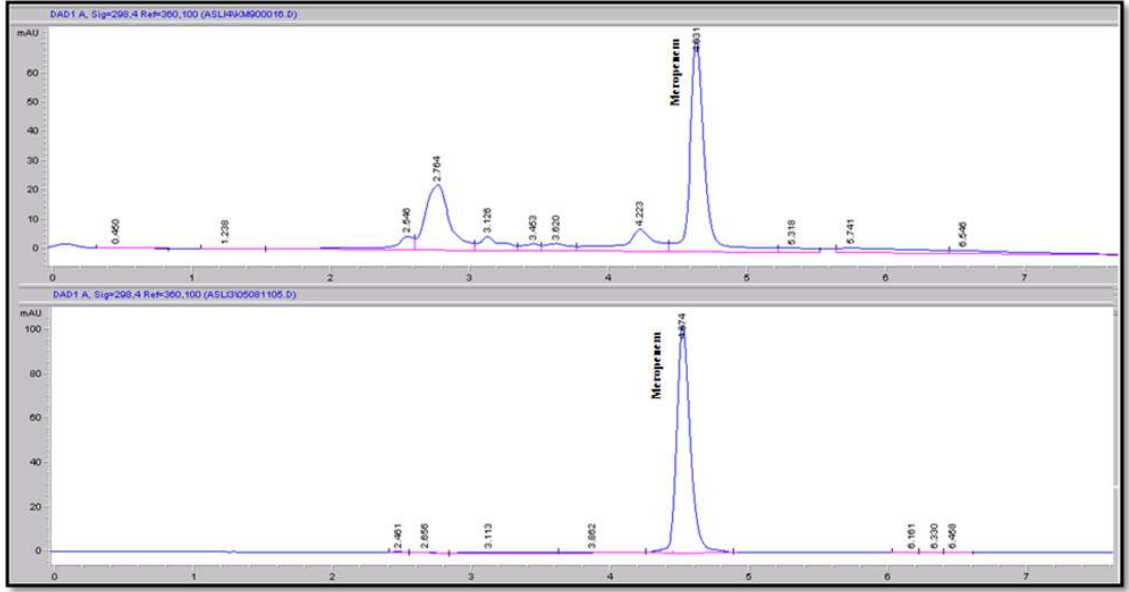
Hem düşük hem yüksek konsantrasyonda sükrözün, konakçı ve *vgb*⁺ rekombinant suşunda fenazin üretimini önemli oranda değiştirmedığı, diğer taraftan *vgb*⁻ suşunda ise yüksek konsantrasyonda sükrözün fenazin üretimini azalttığı kaydedildi (Şekil 4.26).



Şekil 4.26. Sükrözle desteklenmiş M9 ortamında 24 saat kültürlerinde fenazin üretimi. Her veri noktası üç bağımsız deneyin ortalaması olup, hata çubukları standart hataları (σ_{n-1}) ifade etmektedir

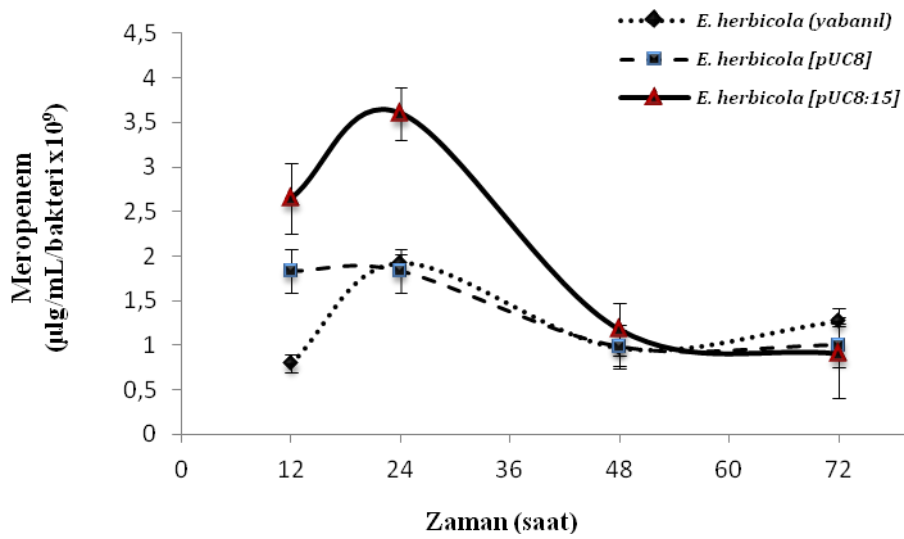
4.11 LB Kültürlerinde Meropenem Üretimi

Bu bölümde önemli bir karbapenem olan meropenem antibiyotiğinin LB kültürlerindeki üretimi araştırıldı. LB ortamında kültür ortamına salınan en yüksek meropenem düzeyinin 24 saat kültürlerinde ve *vgb*⁺ rekombinant suşunda olduğu kaydedilirken, diğer iki suşta bu antibiyotiğin seviyesi kültür boyunca bezer seviyelerde seyretti (Şekil 4.28).



Şekil 4.27. Meropenem standardı (alttaki pik) ve örnekteki meropenem aynı yerde pik veren (üstteki pik) HPLC diyagramı

Bu ortamda yabanıl suşun canlı hücre sayısı inkübasyon süresi boyunca, rekombinant suşlara göre daha yüksek gözlemlendi. Kültür ortamlarının 7.0 olan başlangıç pH'sının inkübasyon periyodu boyunca bazik yönde değiştiği görüldü (Çizelge 4.11).



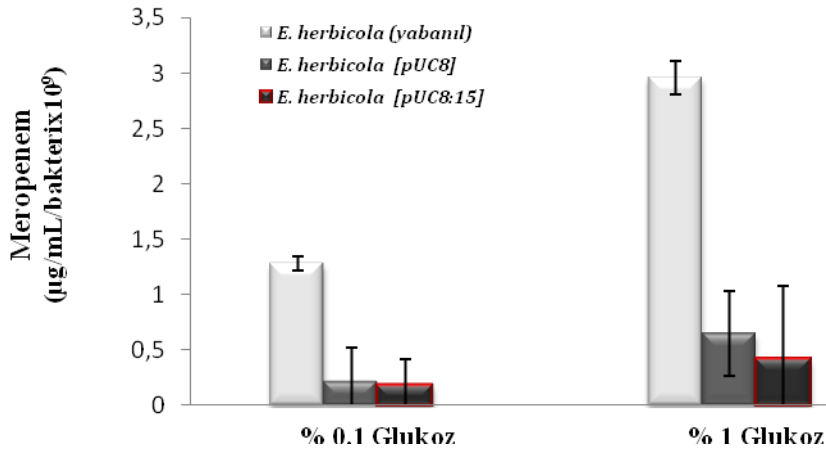
Şekil 4.28. LB ortamında üretilen meropenem üretimi. Her veri noktası üç bağımsız deneyin ortalaması olup, hata çubukları standart hataları (σ_{n-1}) ifade etmektedir

Çizelge 4.11 LB ortamında canlı hücre sayısı ve pH değişimi. Her veri noktası 3 bağımsız deneyin ortalaması olup parantez içindeki değerler $\pm$ standart sapmaları (σ_{n-1}) ifade etmektedir

	Canlı Hücre Sayısı/mL			
	12.saat	24.saat	48.saat	72.saat
<i>E. herbicola</i>	$10.34 \cdot 10^9 \pm 0.23$	$6.99 \cdot 10^9 \pm 0.64$	$7.68 \cdot 10^9 \pm 0.34$	$4.42 \cdot 10^9 \pm 0.48$
<i>Eh[pUC8]</i>	$3.79 \cdot 10^9 \pm 0.64$	$4.80 \cdot 10^9 \pm 0.56$	$4.05 \cdot 10^9 \pm 0.66$	$2.02 \cdot 10^9 \pm 0.33$
<i>Eh[pUC8:15]</i>	$3.73 \cdot 10^9 \pm 0.24$	$6.02 \cdot 10^9 \pm 0.60$	$3.41 \cdot 10^9 \pm 0.89$	$2.08 \cdot 10^9 \pm 0.63$
	pH Değerleri			
	12.saat	24.saat	48.saat	72.saat
<i>E. herbicola</i>	8.57 ± 0.06	8.60 ± 0.03	8.55 ± 0.04	8.73 ± 0.05
<i>Eh[pUC8]</i>	7.75 ± 0.08	8.34 ± 0.08	8.75 ± 0.14	8.81 ± 0.06
<i>Eh[pUC8:15]</i>	7.73 ± 0.07	8.47 ± 0.05	8.71 ± 0.12	8.92 ± 0.07

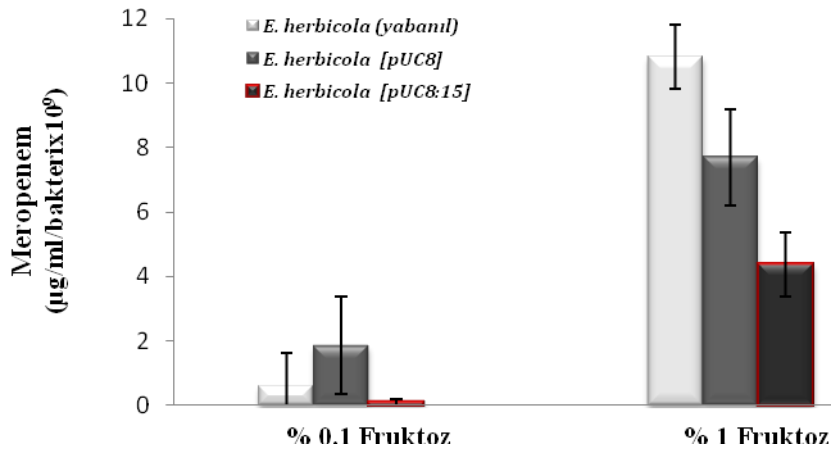
4.12 M9 Kültürlerinde Meropenem Üretimi

Değişik konsantrasyonlarda (% 0.1 ve % 1) farklı karbon kaynakları (glukoz, fruktoz ve sükroz) içeren M9 ortamında 30 °C kültürlerin meropenem üretimi bu bölümde araştırıldı. Düşük glukoz içeren M9 ortamı ile kıyaslandığında, meropenem üretiminin yüksek glukoz konsantrasyonunda daha yüksek olduğu belirlendi. Her iki konsantrasyonda da glukozun özellikle yabancı suşta yüksek pozitif bir etki yarattığı, yüksek glukozun konakçı hücrede meropenem üretimini yaklaşık 2.3 kat arttırdığı saptandı (Şekil 4.29).



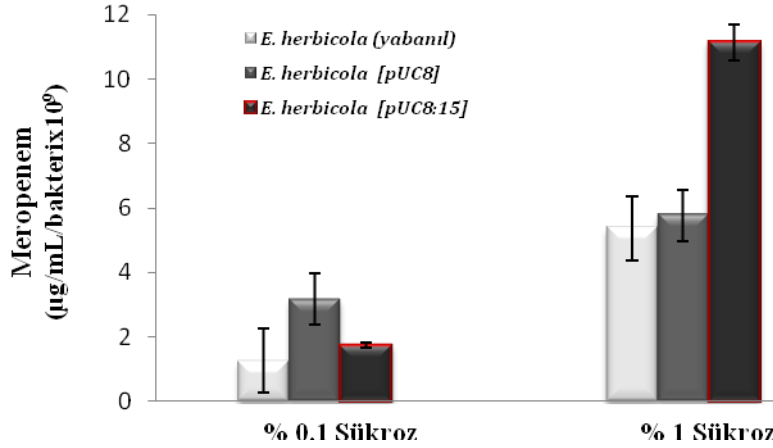
Şekil 4.29. Glukozla desteklenmiş M9 ortamında 24 saat kültürlerinde meropenem üretimi. Her veri noktası üç bağımsız deneyin ortalaması olup, hata çubukları standart hataları (σ_{n-1}) ifade etmektedir

Yüksek konsantrasyonda fruktozun her üç suşta meropenem üretimini pozitif yönde etkilediği görüldü. Yüksek konsantrasyonda fruktoz, düşük konsantrasyondaki fruktoza göre meropenem üretimini, vgb^+ rekombinant suşunda yaklaşık 43.6 kat, vgb^- suşunda 4.2 ve yabanıl suşta ise yaklaşık 18 kat arttırdı (Şekil 4.30).



Şekil 4.30. Fruktozla desteklenmiş M9 ortamında 24 saat kültürlerinde meropenem üretimi. Her veri noktası üç bağımsız deneyin ortalaması olup, hata çubukları standart hataları (σ_{n-1}) ifade etmektedir

Sükrozlu M9 ortamında kültürü yapılan hücrelerin meropenem miktarının yüksek sükroz ortamında daha fazla olduğu saptandı. Yüksek sükroz, konakçı hücre, *vgb⁻* ve *vgb⁺* rekombinant suşlarında meropenem üretimini düşük konsantrasyona göre sırasıyla 4.3, 2 ve 6.4 kat arttırdı (Şekil 4.31).



Şekil 4.31. Sükrozla desteklenmiş M9 ortamında 24 saat kültürlerinde meropenem üretimi. Her veri noktası üç bağımsız deneyin ortalaması olup, hata çubukları standart hataları (σ_{n-1}) ifade etmektedir

Değişik konsantrasyonlarda farklı karbon kaynakları içeren M9 ortamında 30°C kültürlerin meropenem üretimi burada araştırıldı. Farklı karbon kaynaklarını % 0.1 konsantrasyonda içeren M9 ortamında 24 saat kültürlerin canlı hücre sayısı ve pH değerleri Çizelge 4.12’de verilmiştir. Birim kültür miktarı başına konakçı her üç karbon kaynağı ile benzer düzeyde canlı hücreye sahipken, *vgb⁻* rekombinantında en yüksek hücre yoğunluğunun sükroz, *vgb⁺* rekombinantında ise glukoz ortamında olduğu görüldü. Düşük konsantrasyonda karbon kaynağının kullanıldığı kültürlerde her üç suştaki ortam pH’sının, başlangıç pH’sına (7.0) göre 0.5 pH değerini bulan oranlarda düştüğü kaydedildi (Çizelge 4.12).

Yukardaki ortamın % 1 konsantrasyonda glukoz, fruktoz ve sükroz ilave edilmiş kültürlerinde canlı hücre sayısının konakçı hücrede fruktoz ve sükrozdaki kültürlerde yüksek olduğu, *vgb⁻* ve *vgb⁺* rekombinantlarında ise en yüksek hücre yoğunluğunun

glukoz ortamında olduğu görüldü. Yüksek konsantrasyonda glukoz içeren ortam kültür pH'sının her üç suşta 4'lere kadar düştüğü gözlemlendi (Çizelge 4.13).

Çizelge 4.12. M9 ortamında 24 saat kültürlerinde canlı hücre sayısı ve pH değişimi. Karbon kaynakları % 0.1 oranında kullanılmıştır. Her veri noktası 3 bağımsız deneyin ortalaması olup parantez içindeki değerler $\pm$ standart sapmaları (σ_{n-1}) ifade etmektedir

Suş	Canlı Hücre/mL	pH Değerleri	C Kaynağı
<i>E. herbicola</i>	$3.52 \cdot 10^9 \pm 0.16$	6.45 ± 0.02	Glukoz
<i>Eh[pUC8]</i>	$1.97 \cdot 10^9 \pm 0.40$	6.60 ± 0.05	
<i>EH[PUC8:15]</i>	$2.08 \cdot 10^9 \pm 0.32$	6.63 ± 0.02	
<i>E. herbicola</i>	$3.41 \cdot 10^9 \pm 0.24$	6.66 ± 0.01	Fruktoz
<i>Eh[pUC8]</i>	$1.60 \cdot 10^9 \pm 0.27$	6.74 ± 0.03	
<i>Eh[pUC8:15]</i>	$1.12 \cdot 10^9 \pm 0.32$	6.79 ± 0.02	
<i>E. herbicola</i>	$3.84 \cdot 10^9 \pm 0.16$	6.55 ± 0.04	Sükroz
<i>Eh[pUC8]</i>	$3.36 \cdot 10^9 \pm 0.42$	6.56 ± 0.03	
<i>Eh[pUC8:15]</i>	$1.76 \cdot 10^9 \pm 0.42$	6.63 ± 0.02	

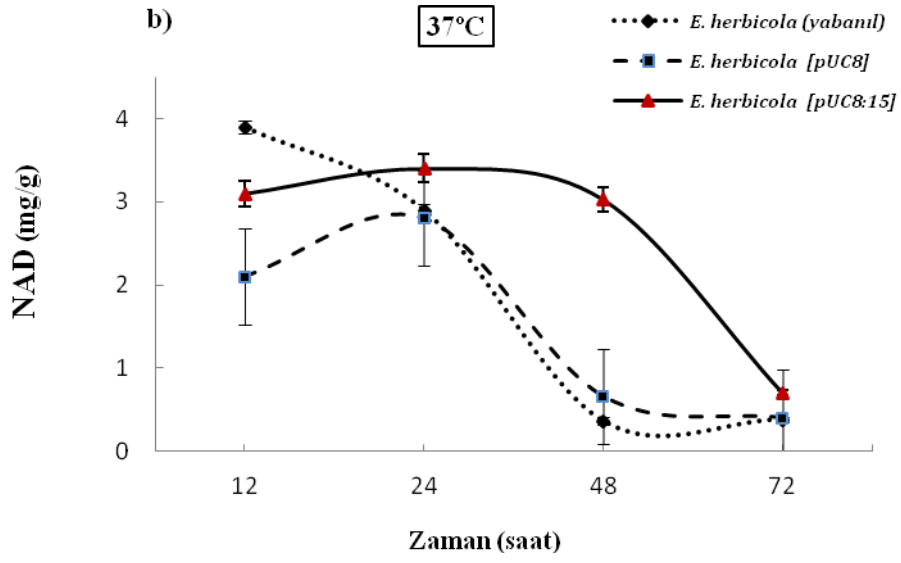
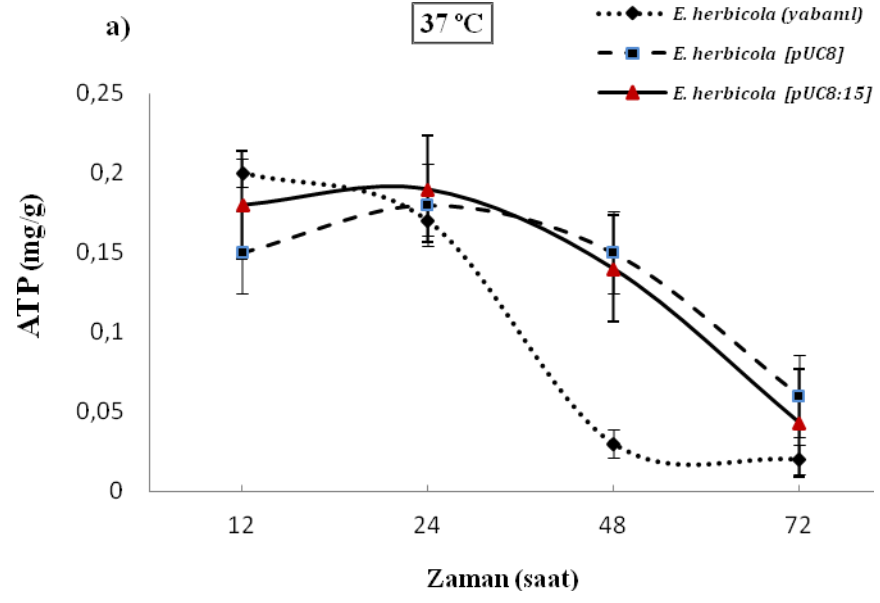
Çizelge 4.13. M9 ortamında 24 saat kültürlerinde canlı hücre sayısı ve pH değişimi. Karbon kaynakları % 1 oranında kullanılmıştır. Her veri noktası 3 bağımsız deneyin ortalaması olup parantez içindeki değerler $\pm$ standart sapmaları (σ_{n-1}) ifade etmektedir

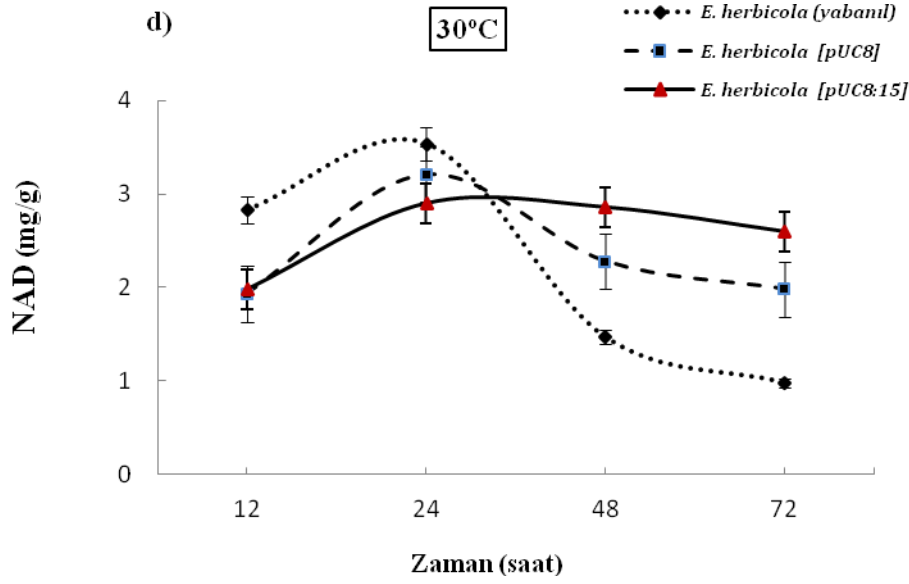
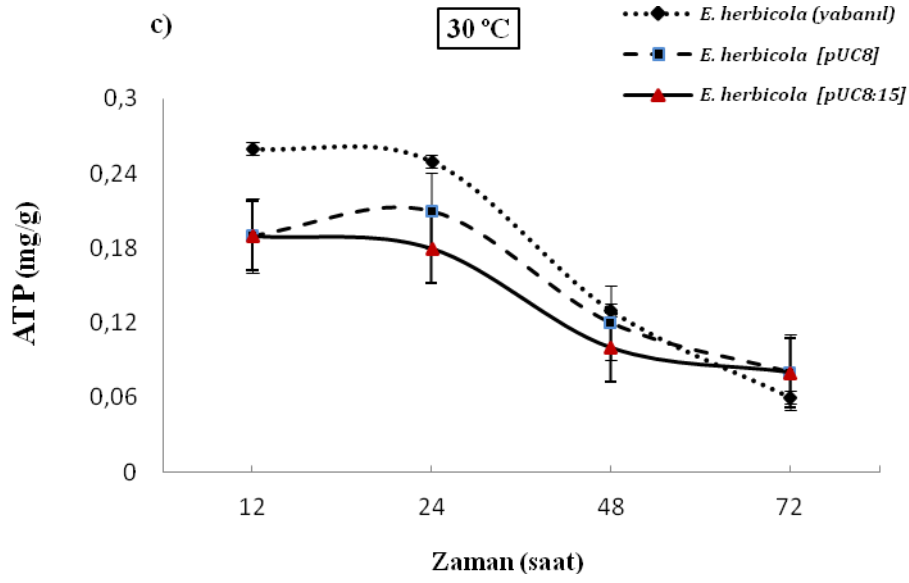
Suş	Canlı Hücre/mL	pH Değerleri	C Kaynağı
<i>E. herbicola</i>	$3.78 \cdot 10^9 \pm 0.66$	4.17 ± 0.21	Glukoz
<i>Eh[pUC8]</i>	$2.45 \cdot 10^9 \pm 0.60$	4.46 ± 0.04	
<i>Eh[pUC8:15]</i>	$3.46 \cdot 10^9 \pm 0.40$	4.21 ± 0.21	
<i>E. herbicola</i>	$4.05 \cdot 10^9 \pm 0.40$	4.21 ± 0.09	Fruktoz
<i>Eh[pUC8]</i>	$2.02 \cdot 10^9 \pm 0.33$	6.56 ± 0.03	
<i>Eh[pUC8:15]</i>	$1.97 \cdot 10^9 \pm 0.34$	6.63 ± 0.02	
<i>E. herbicola</i>	$4.21 \cdot 10^9 \pm 0.48$	4.56 ± 0.02	Sükroz
<i>Eh[pUC8]</i>	$2.08 \cdot 10^9 \pm 0.16$	6.75 ± 0.02	
<i>Eh[pUC8:15]</i>	$1.06 \cdot 10^9 \pm 0.24$	6.78 ± 0.01	

4.13 LB Kùltürlerinde ATP ve NAD Üretimi

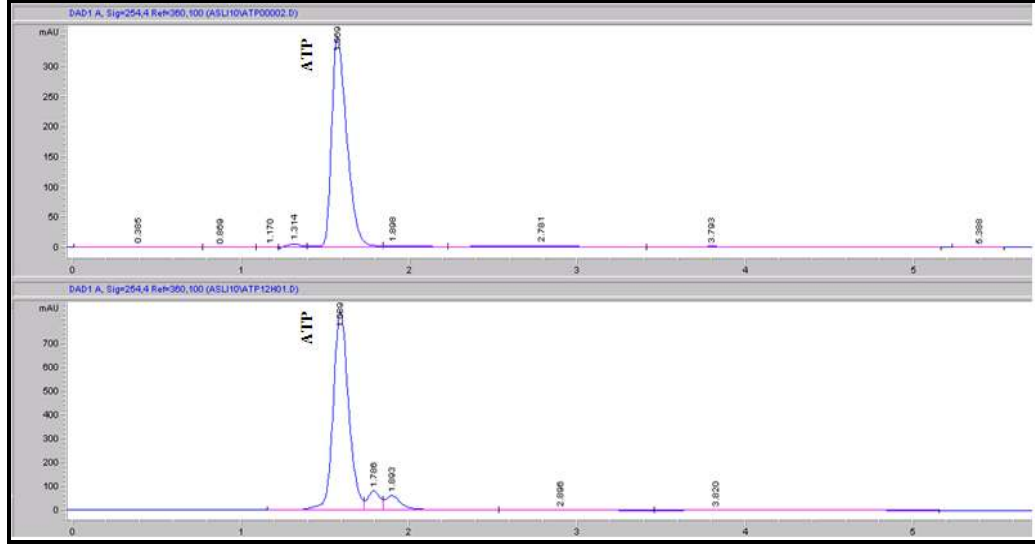
LB ortamında 37 °C’de, *vgb⁻* ve *vgb⁺* suşundaki hücre içi ATP değerlerinin birbirine yakın olduğu ve genel olarak ATP düzeyinin konakçı hücreye göre daha yüksek olduğu kaydedildi. Rekombinant suşlarda 24 saat kùltürlerinde ATP düzeyi maksimum değere ulaştı ve kùltürün daha sonraki safhalarında giderek azaldı. Konakçı, *vgb⁻* ve *vgb⁺* suşlarının 72 saat kùltürlerinde ürettiği ATP düzeyinin, 24 saat kùltürlerine göre sırasıyla 8.5, 3 ve 4.4 kat azaldı (Şeki 4.32 (a)). *vgb⁺* rekombinant suşun 30 °C’de, ürettiği ATP miktarının diğer iki suşa göre genel olarak düşük olduğu görüldü. Her üç sušta en yüksek ATP düzeyi 12 saat kùltürlerinde, en düşük ATP düzeyinin ise 72 saat kùltürlerinde saptandı. Konakçı 72 saat kùltürlerindeki ATP düzeyinin 4.3 kat, rekombinant suşlarında ise yaklaşık 2.4 kat azaldı (Şeki 4.32 (c)).

Rekombinant suşlarda 37 °C’de NAD seviyesi 24 saat kùltürlerinde, yabanıl sušta ise 12 saat kùltürlerinde en yüksek değerine ulaştı. *vgb⁺* rekombinantının 12 saat kùltürleri hariç, bütün kùltür fazlarında diğer iki suşa göre daha fazla NAD ürettiği belirlendi. En düşük NAD seviyeleri her üç sušta da 72 saat kùltürlerinde gözlendi (Şeki 4.32 (b)). NAD düzeyinin 30 °C’de, 24 saat kùltürlerinde her üç suş için en yüksek değerine ulaştığı ve 72 saate doğru gidildikçe üretimin azaldığı tespit edildi. *vgb⁺* rekombinantının 12 saat kùltürlerinde ürettiği NAD düzeyi, yabanıl suşa göre 1.4 kat düşük iken, 72 saat kùltürlerinde ise yaklaşık 2.7 kat daha yüksek olduğu saptandı (Şeki 4.32 (d)).

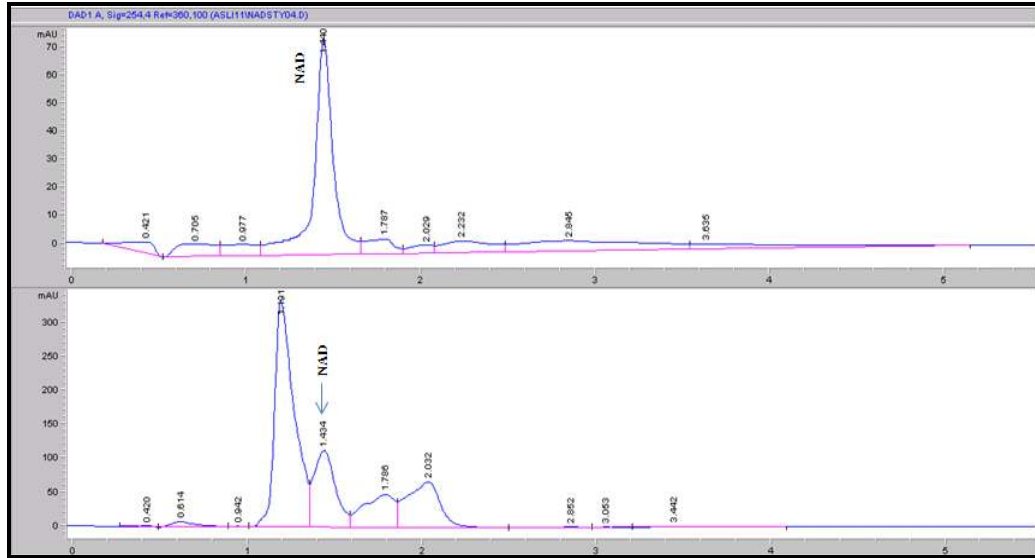




Şekil 4.32. LB ortamında 37°C'deki ATP (a) ve NAD (b) ile 30°C'deki ATP (c) ve NAD (d) üretimi. Her veri noktası üç bağımsız deneyin ortalaması olup, hata çubukları standart hataları (σ_{n-1}) ifade etmektedir



Şekil 4.33. ATP için HPLC kromotogramı. Standart (üstteki pik) ve örnekteki ATP (alttaki pik)

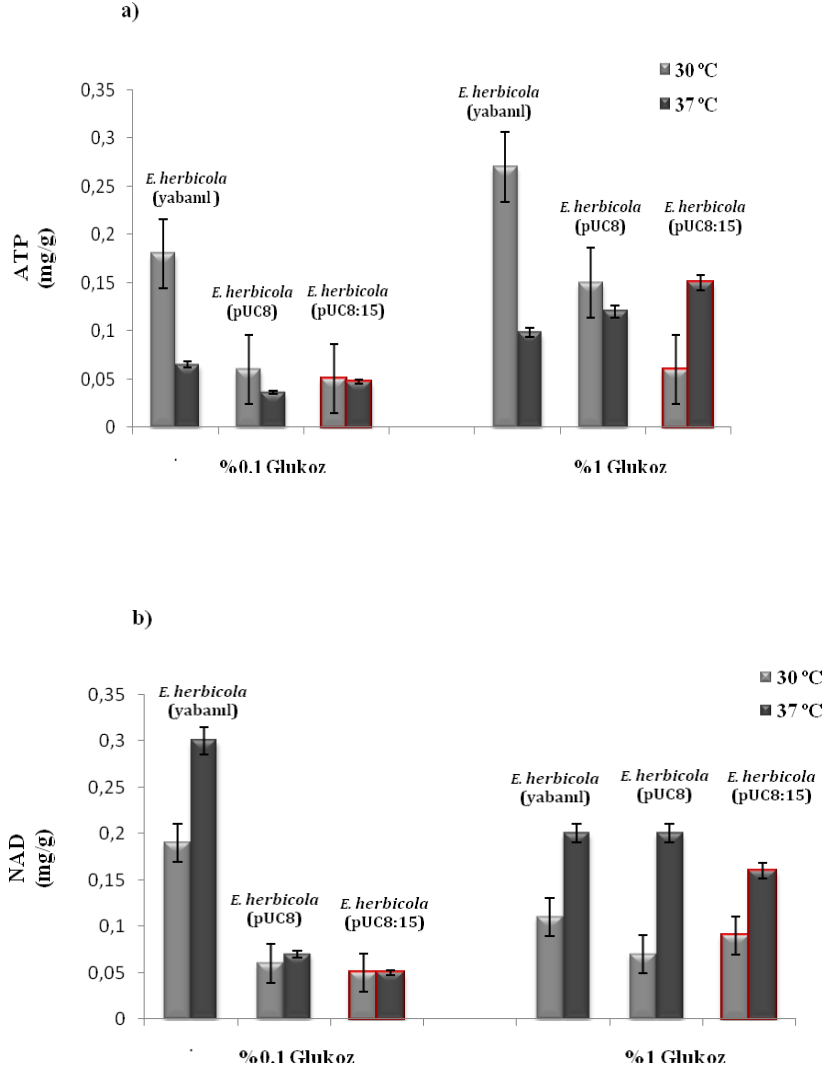


Şekil 4.34. NAD için HPLC kromotogramı. Standart (üstteki pik) ve örnekteki NAD (alttaki pik)

4.14 M9 Kùltürlerinde ATP ve NAD Üretimi

Burada konakçı ve onun rekombinant suşlarının % 0.1 ve % 1 glukoz, fruktoz ve sükröz ile desteklenmiş M9 ortamında 37°C ve 30°C'deki ATP ve NAD üretimleri araştırıldı.

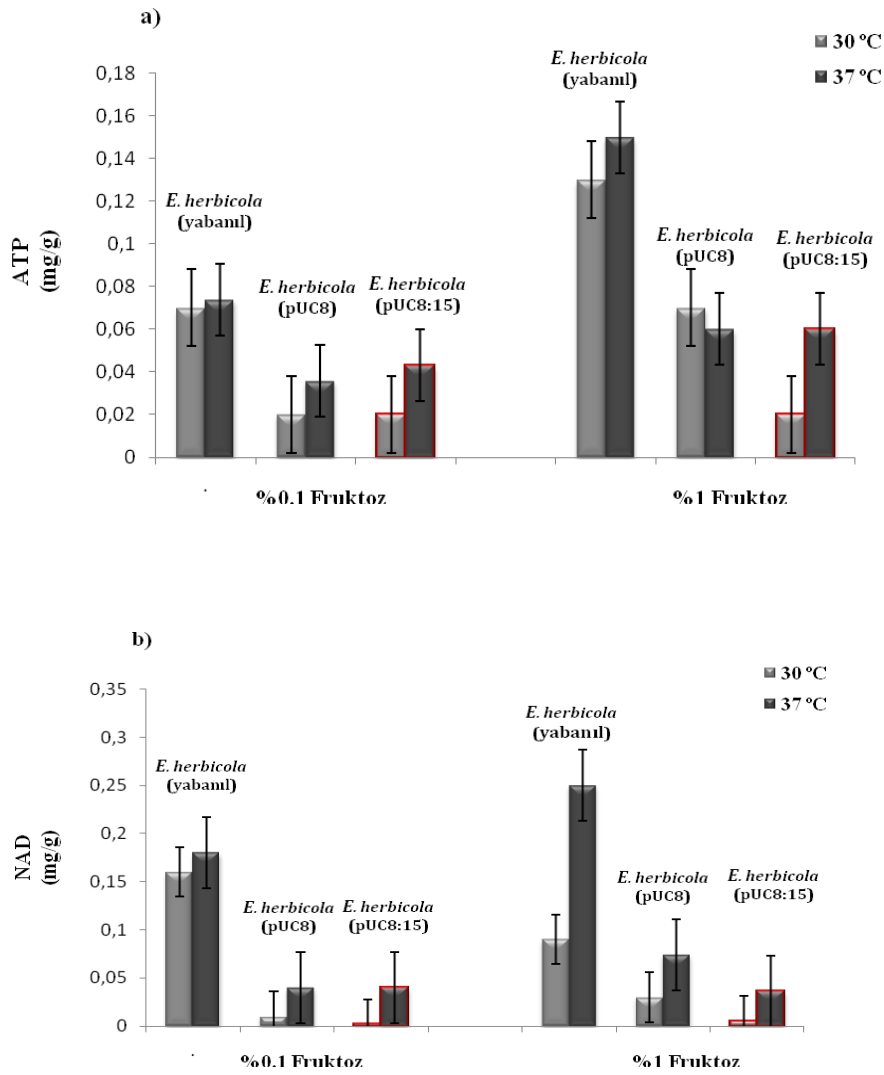
Yüksek konsantrasyonda glukozun 37°C'de her üç suşun ATP seviyesini arttırdığı görölmüştür. *vgb⁺* rekombinant suşunda % 1 oranında glukoz, ATP üretimini 3 kat artırırken, konakçı hücrenin ATP seviyesini ise 1.5 kat arttırmıştır. Yüksek konsantrasyonda glukozun, 30°C'de de benzer şekilde ATP seviyesini arttırdığı ve bu artışın konakçı, *vgb⁻* ve *vgb⁺* suşunda sırası ile 1.5, 3.2 ve 1.2 kat olduğu saptandı (Şekil 35 (a)). Yüksek konsantrasyonda glukozun 37°C'de rekombinant suşlarda NAD seviyesini arttırdığı kaydedildi. *vgb⁺* rekombinant suşunda bu artış oranının 3.2 kat olduğu görülürken, diğer taraftan aynı konsantrasyondaki glukozun, konakçıdaki NAD seviyesini ise yaklaşık 1.5 kat azalttığı kaydedildi. Bununla birlikte 30°C'de konakçıda yüksek konsantrasyonda glukozun, yine rekombinant suşunda NAD düzeyini arttırdığı, konakçıda ise yaklaşık 1.7 kat azalttığı belirlendi (Şekil 35 (b)).



Şekil 4.35. Glukoz destekli M9 ortamında 30°C ve 37°C’de 24 saatteki ATP (a) NAD üretimi (b). Her veri noktası üç bağımsız deneyin ortalaması olup, hata çubukları standart hataları (σ_{n-1}) ifade etmektedir

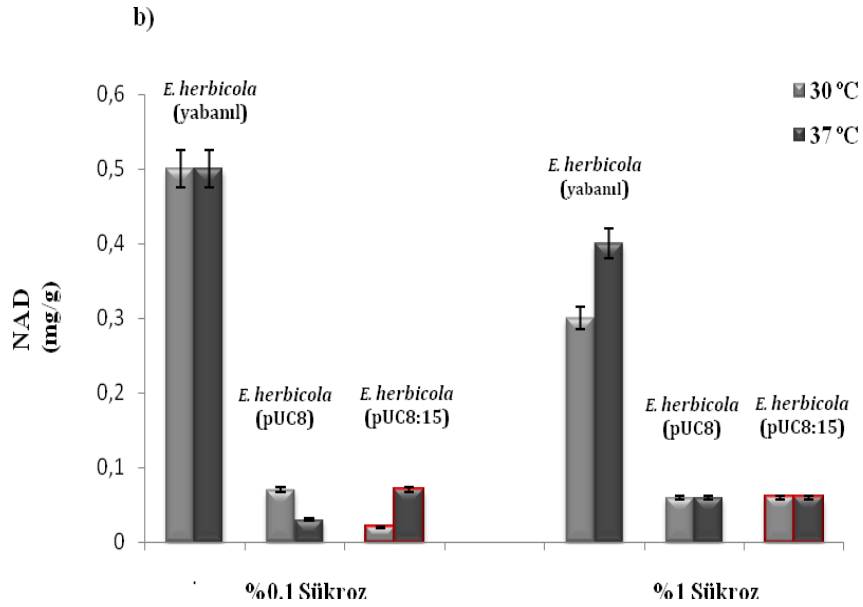
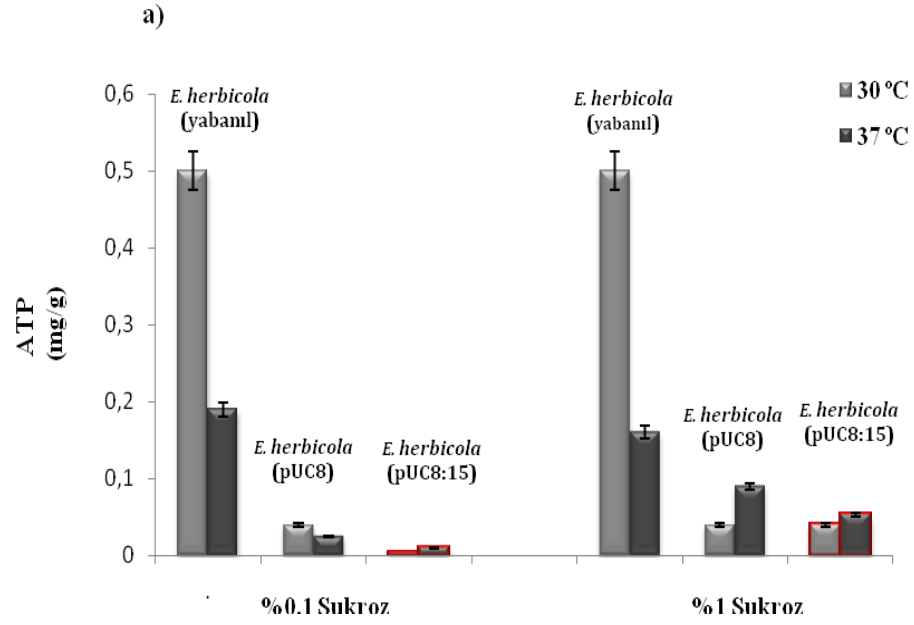
Fruktoz ilave edilen M9 ortamında 37°C’deki kültürlerde, yüksek konsantrasyonda fruktozun, ATP düzeyleri üzerinde pozitif bir etkisi sağladığı görüldü. Yüksek fruktoz, konakçıda ATP seviyesinin yaklaşık 2.2 kat, *vgb*⁺ suşunda ise 1.5 kat artmasına sebep oldu. Benzer şekilde yüksek fruktoz, 30°C’deki M9 kültürlerinde her üç suşun ATP seviyesinin artmasına neden oldu. *vgb*⁻ suşunda yüksek fruktoz, ATP üretimini 3.5 kat daha fazla arttırdı. *vgb*⁺ suşunda ise ATP üretiminin değişmediği belirlenmiştir (Şekil 36 (a)). M9 ortamında 37°C’deki kültürlerde, yüksek konsantrasyonda fruktozun, NAD düzeyleri üzerinde de pozitif bir etkisi sağladığı

görülmüştür. Yüksek oranda fruktozun, konakçı hücredeki NAD seviyesini yaklaşık 1.4 kat artarken, *vgb*⁺ suşunda bariz bir değişim yapmadığı saptandı (Şekil 36 (a)). Benzer şekilde yüksek fruktoz, 30°C’de ise NAD üretimini 3 kat arttırdı. *vgb*⁺ suşunda aynı konsantrasyonda NAD üretiminin 2.5 kat arttığı görüldü (Şekil 36 (b)).



Şekil 4.36. Glukoz destekli M9 ortamında 30°C ve 37°C’de 24 saatteki ATP (a) NAD üretimi (b). Her veri noktası üç bağımsız deneyin ortalaması olup, hata çubukları standart hataları (σ_{n-1}) ifade etmektedir

M9 kültürlerinde 37°C’de, yüksek süktroz, konakçıda ATP seviyesinin yaklaşık 1.3 kat azalmasına sebep olurken, rekombinant suşlarda bir artışa sebep oldu. Bu ortamdaki *vgb⁻* suşunda ATP düşük süktroz konsantrasyonuna göre 3 kat kat arttı. Diğer taraftan *vgb⁺* rekombinantında yüksek konsantrasyonda süktroz, ATP seviyesini 5 kat arttırdığı kaydedildi. M9 kültürlerinde 30°C’de ise yüksek konsantrasyonda süktrozun konakçıda ve *vgb⁻* suşunda ATP düzeyini değıştirmedığı görüldü. *vgb⁺* rekombinantında ise yüksek süktroz konsantrasyonu, ATP düzeyini 10 kat arttırdı (Şekil 37 (a)). Yüksek konsantrasyonda süktroz, 37°C’de konakçıda NAD seviyesinin yaklaşık 1.3 kat azalmasına sebep olurken, rekombinant suşlarda bir artışa sebep oldu. Bu ortamdaki *vgb⁻* suşunda NAD üretimi düşük süktroz konsantrasyonuna göre 2 kat arttı. Diğer taraftan *vgb⁺* rekombinantında yüksek konsantrasyonda süktroz, NAD üretiminde bariz bir değışim yapmadı. 30°C’de ise yüksek konsantrasyonda süktrozun konakçıda hücredeki NAD seviyesinde kısmi bir artışa sebep olduğu görüldü. *vgb⁻* suşunda ise yüksek süktrozun NAD üretimini değıştirmedığı saptandı. *vgb⁺* rekombinantında ise yüksek süktroz konsantrasyonunun, NAD seviyesini 3 kat arttırdığı görüldü (Şekil 37 (b)).

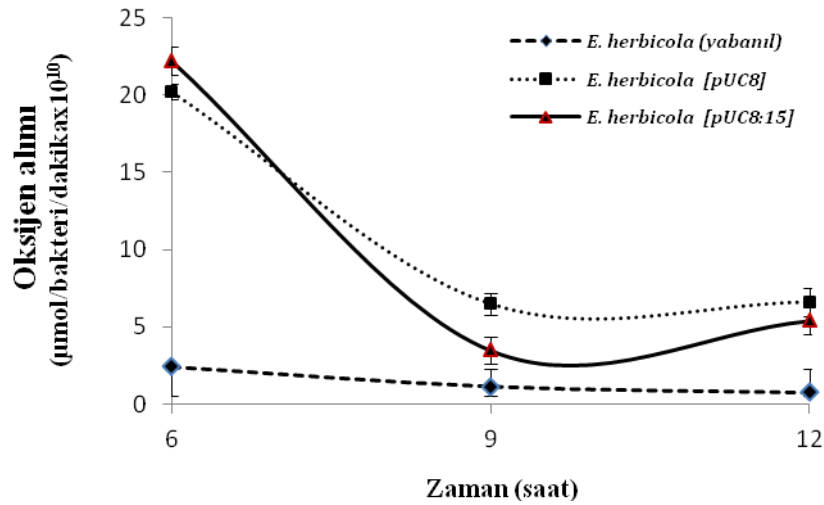


Şekil 4.37. Sükroz destekli M9 ortamında 30°C ve 37°C’de 24 saatteki ATP (a) NAD üretimi (b). Her veri noktası üç bağımsız deneyin ortalaması olup, hata çubukları standart hataları (σ_{n-1}) ifade etmektedir

4.15 Bakterilerin Oksijen Tüketim Karakteristikleri

Bakterilerin oksijen tüketim karakteristikleri Şekil 4.36'da gösterilmiştir. *E. herbicola* ve bu bakterinin rekombinant suşlarının oksijen kullanım karakteristikleri karşılaştırıldığında, vgb^- ve vgb^+ rekombinantların üç kültür fazında da konakçı hücreye göre daha fazla oksijen tükettiği görüldü. vgb^- ve vgb^+ suşlarının oksijen alımının 6 saat kültürlerinde en yüksek olduğu ve 9 ile 12 saatteki kültürlerle doğru gidildiğinde bir azalma olduğu görüldü. Rekombinant suşların 12 saat kültürlerindeki oksijen tüketimi 6 saat kültürlerine göre yaklaşık 4 kat düştü.

Özellikle kültürlerin erken logaritmik fazlarında (6 saat) vgb^+ suşunun bariz biçimde daha fazla oksijen tükettiği belirlendi. Bu fazda (6 saat) vgb^+ rekombinantının konakçı hücreden 9.2 kat fazla oksijen tükettiği belirlendi. Ancak, vgb^- suşunun da konakçı hücreden 8.1 kat daha fazla oksijen tükettiği görüldü.



Şekil 4.38 LB ortamında değişik kültür fazlarında oksijen alımı

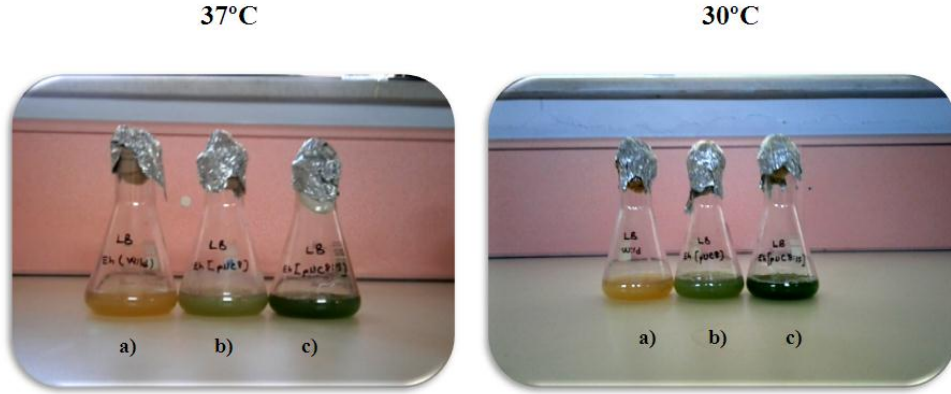
Kültür fazındaki uzama (9 ve 12 saat) ile birlikte konakçı ve rekombinantlarının oksijen kullanımında azalma olduğu gözlemlendi. Bu fazlarda rekombinant suşlar, benzer düzeyde oksijen tüketim değerleri gösterdi. Buna tek istisna konakçıda en düşük oksijen tüketiminin 12 saat kültürlerinde olması idi. Konakçının ortam canlı hücre sayısının 9 ve 12 saatlerde rekombinant suşlardan belirgin biçimde fazla olduğu gözlemlendi (Çizelge 4.14).

Çizelge 4.14. Değişik kültür fazlarındaki oksijen alımında LB ortamında biyokütle oluşumu, canlı hücre sayısı ve pH değişimi

	Canlı Hücre Sayısı/mL		
	6. saat	9. saat	12. saat
<i>E. herbicola</i>	$7.72 \cdot 10^9 \pm 0.24$	$8.16 \cdot 10^9 \pm 0.33$	$12.05 \cdot 10^9 \pm 0.48$
<i>Eh[pUC8]</i>	$1.60 \cdot 10^9 \pm 0.13$	$3.04 \cdot 10^9 \pm 0.42$	$4.80 \cdot 10^9 \pm 0.27$
<i>Eh[pUC8:15]</i>	$2.24 \cdot 10^9 \pm 0.20$	$4.80 \cdot 10^9 \pm 0.31$	$4.96 \cdot 10^9 \pm 0.55$
	pH Değerleri		
	6. saat	9. saat	12. saat
<i>E. herbicola</i>	7.2 ± 0.13	7.9 ± 0.04	8.5 ± 0.02
<i>Eh[pUC8]</i>	7.3 ± 0.07	7.5 ± 0.11	7.7 ± 0.08
<i>Eh[pUC8:15]</i>	7.2 ± 0.05	7.4 ± 0.08	7.6 ± 0.15

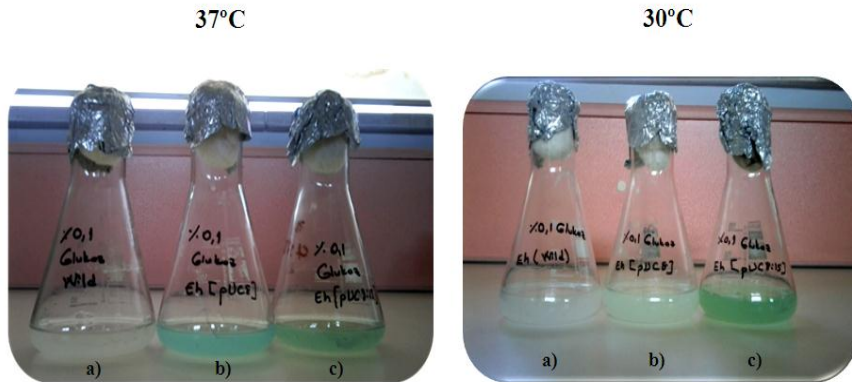
4.16 Farklı Kültür Ortamlarındaki Bakterilerin Morfolojik Görünümleri

E. herbicola ve rekombinantlarının LB besiyerinde farklı sıcaklıklarda ve çalkalamalı koşullarda kültürleri yapıldı. LB ortamında 37°C ve 30°C, kültürü yapılan bu hücrelerin farklı pigmentasyon yaptığı gözlemlendi. Konakçı hücrenin sarı, *vgb*⁻'nin açık yeşil ve *vgb*⁺'nin ise koyu yeşil bir pigmentasyon gösterdiği saptandı (Şekil 4.39).

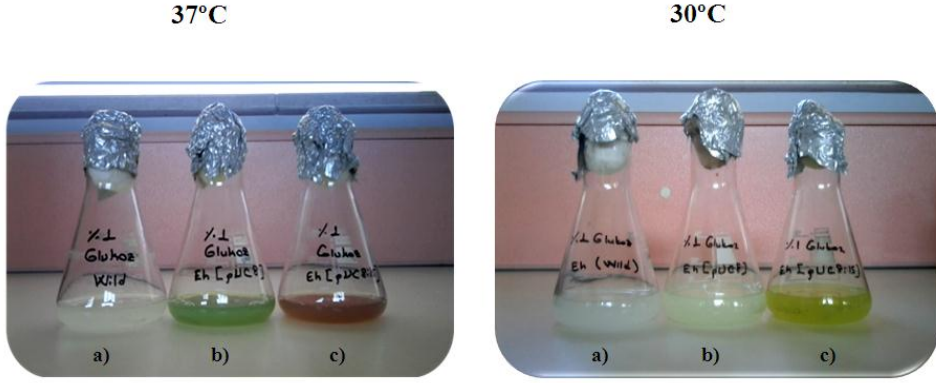


Şekil 4.39. LB ortamında değişik sıcaklıklarda kültürü yapılan *E. herbicola*-yabanıl (a), *E. herbicola* [pUC8] (b) ve *E. herbicola* [pUC8:15] (c)'nin morfolojik görünüşleri

Bakterilerin glukoz içeren M9 kültürlerinde 200 rpm, 24 saat kültürleri hem 37°C ve hem de 30°C'de yapıldı. Her iki sıcaklıkta % 0.1 glukoz içeren kültür ortamında yabanıl suşun pigmentasyon yapmadığı, rekombinant suşların ise yine yeşil pigmentasyon gösterdiği gözlemlendi (Şekil 4.40). Düşük glukozda 37°C'de yeşil bir pigmentasyon gösteren *vgb*⁺ rekombinant suşunun, yüksek glukozda (yani, % 1 glukozda) kiremit kırmızı bir pigmentasyon gösterdiği saptandı (Şekil 4.41).

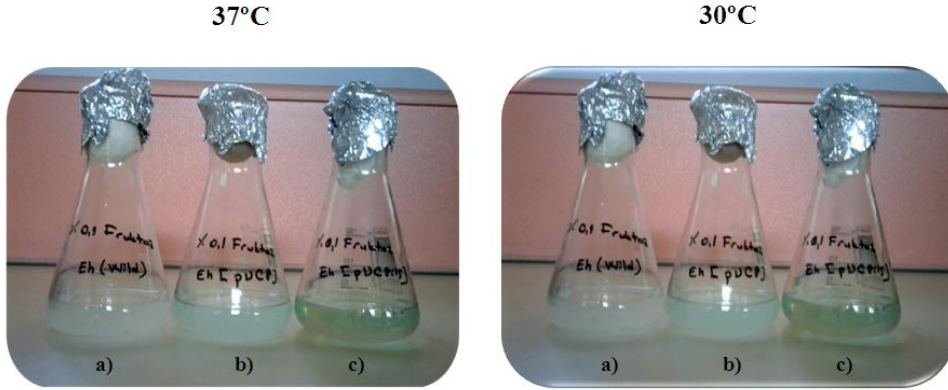


Şekil 40. Glukoz destekli M9 ortamında değişik sıcaklıklarda kültürü yapılan *E. herbicola* (a), *E. herbicola* [pUC8] (b) ve *E. herbicola* [pUC8:15] (c)'nin morfolojik görünüşleri. Glukoz ortama % 0.1 oranında ilave edilmiştir

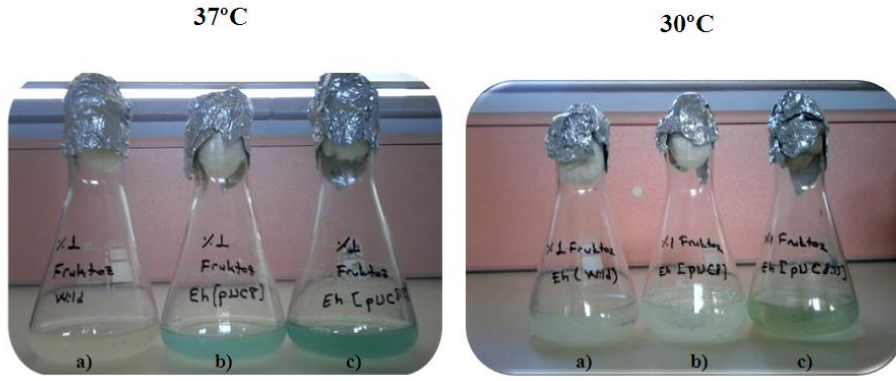


Şekil 4.41. Glukoz destekli M9 ortamında değişik sıcaklıklarda kültürü yapılan *E. herbicola* (a), *E. herbicola* [pUC8] (b) ve *E. herbicola* [pUC8:15] (c)'nin morfolojik görünüşleri. Glukoz ortama % 1 oranında ilave edilmiştir

Fruktoz içeren kültür ortamında ise hem düşük ve hem de yüksek fruktoz ortamında yukarıda glukoz için görülen pigmentasyon derecesinin azaldığı saptandı (Şekil 4.42 ve Şekil 4.43).

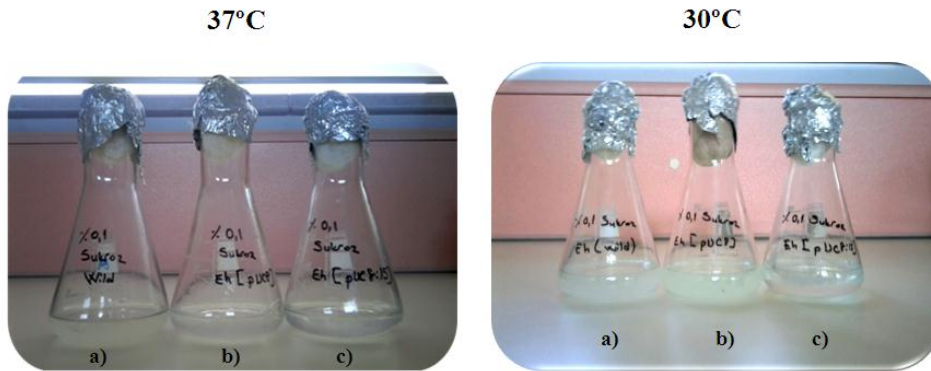


Şekil 4.42. Fruktoz destekli M9 ortamında değişik sıcaklıklarda kültürü yapılan *E. herbicola* (a), *E. herbicola* [pUC8] (b) ve *E. herbicola* [pUC8:15] (c)'nin morfolojik görünüşleri. Glukoz ortama % 0.1 oranında ilave edilmiştir

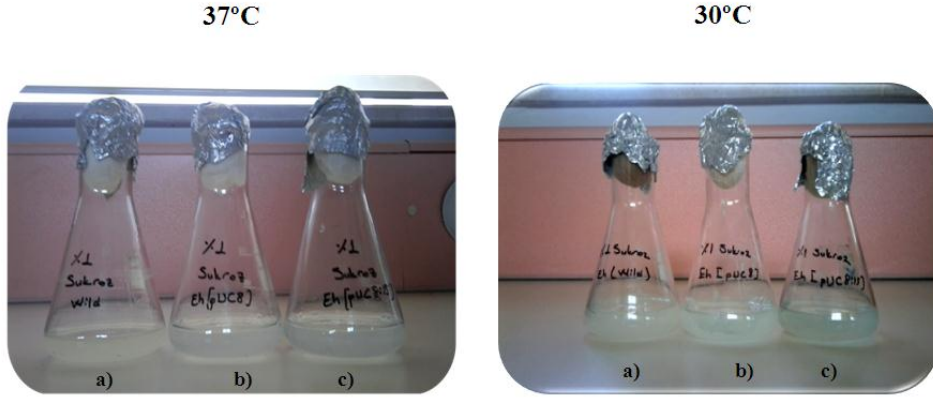


Şekil 4.43. Fruktoz destekli M9 ortamında değişik sıcaklıklarda kültürü yapılan *E. herbicola* (a), *E. herbicola* [pUC8] (b) ve *E. herbicola* [pUC8:15] (c)'nin morfolojik görünüşleri. Fruktoz ortama % 1 oranında ilave edilmiştir

Sükroz içeren M9 ortamında ise 37°C her üç suşun pigmentasyonun oldukça düşük olduğu ve benzer seviyelerde görüldüğü kaydedildi. Aynı kültürlerin 30°C'de, ise bira daha pigmentasyon gösterdikleri belirlendi (Şekil 4.44 e Şekil 4.45).



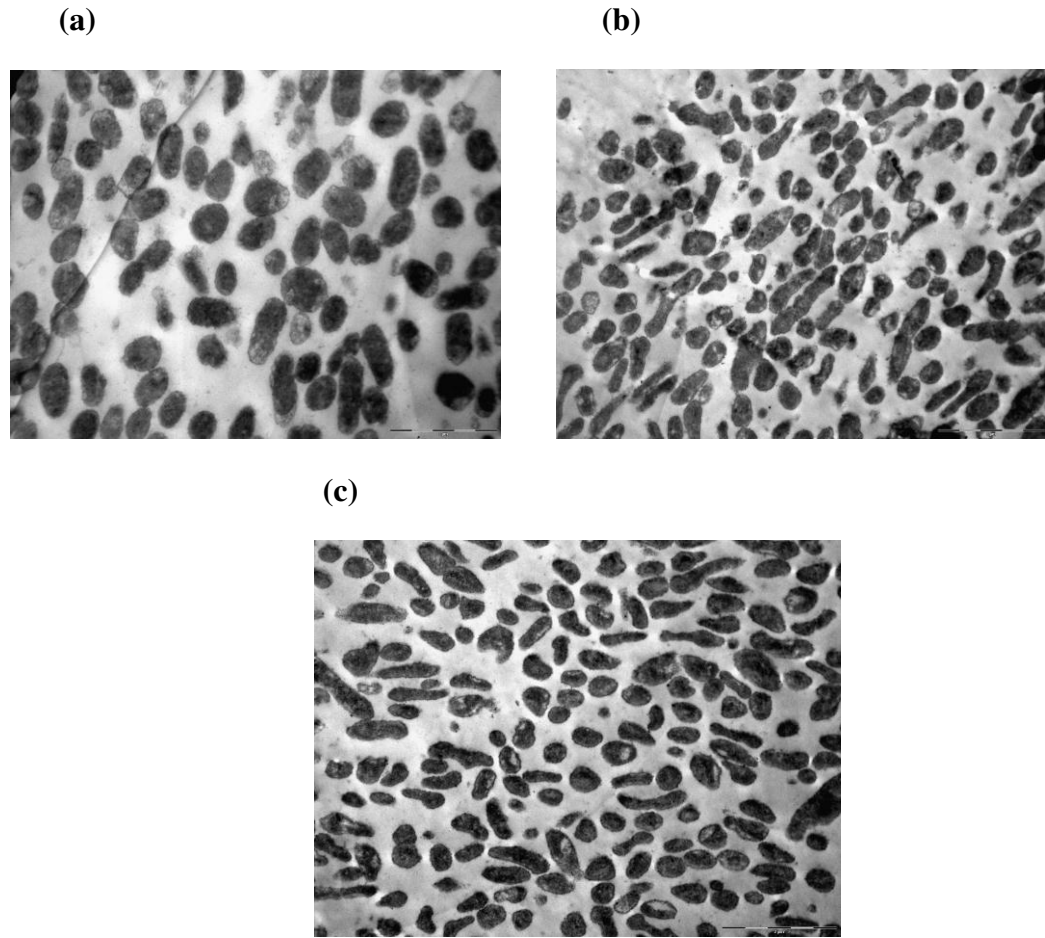
Şekil 4.44. Sükroz destekli M9 ortamında değişik sıcaklıklarda kültürü yapılan *E. herbicola* (a), *E. herbicola* [pUC8] (b) ve *E. herbicola* [pUC8:15] (c)'nin morfolojik görünüşleri. Sükroz ortama % 0.1 oranında ilave edilmiştir



Şekil 4.45. Sükroz destekli M9 ortamında değişik sıcaklıklarda kültürü yapılan *E. herbicola* (a), *E. herbicola* [pUC8] (b) ve *E. herbicola* [pUC8:15] (c)'nin morfolojik görünüşleri. Sükroz ortama % 1 oranında ilave edilmiştir

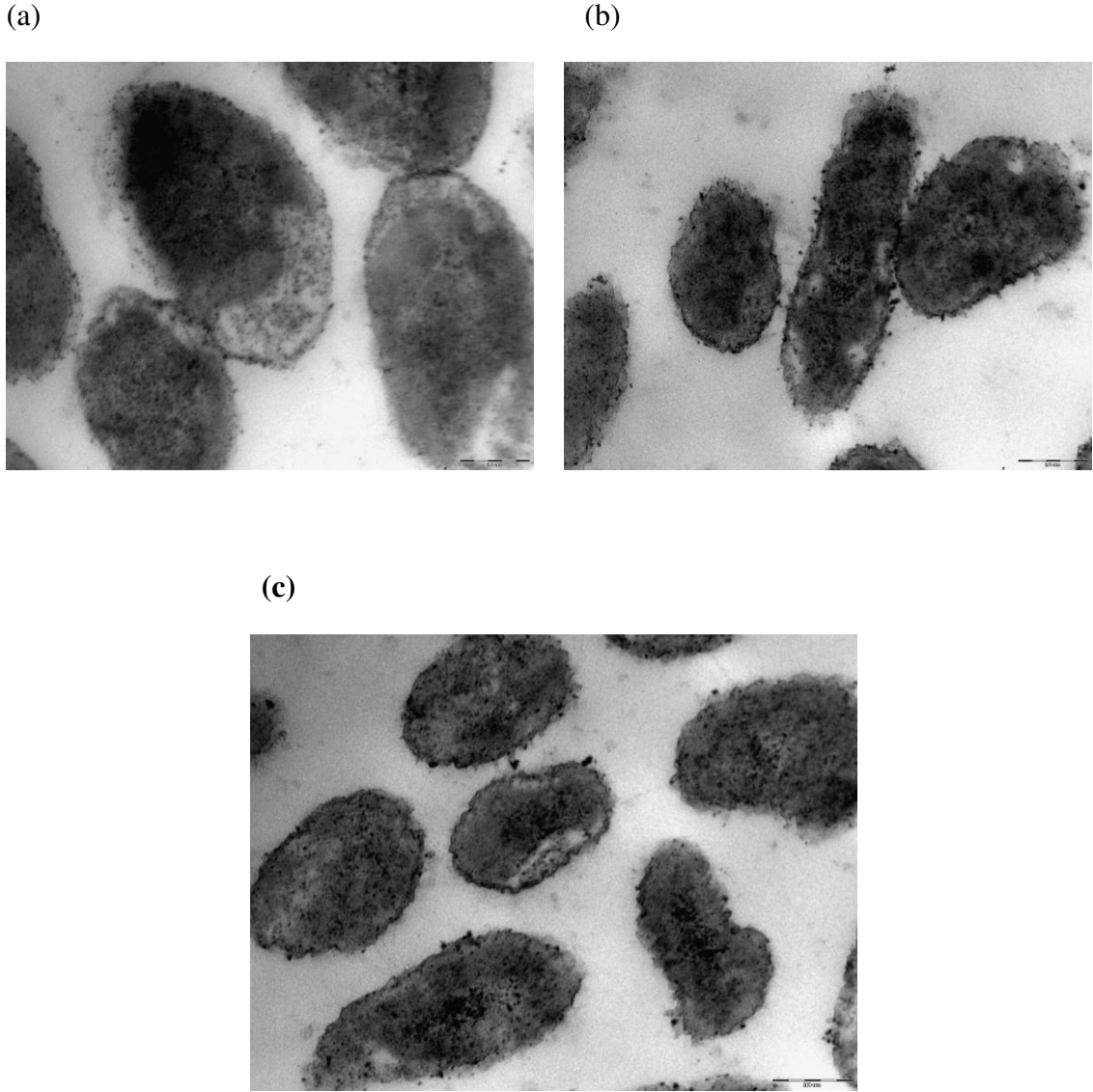
4.17 LB Kùltüründe Üretilen Bakterilerin TEM Görüntüleri

LB ortamında kùltürü yapılan *E. herbicola* ve rekombinantlarının TEM görüntüleri Şekil 4.46'da ve Şekil 4.47'de gösterilmiştir. Aynı büyütmelerde yabanıl suş ile rekombinant suşlar arasında büyüklük bakımından bir farklılık olduğu, yabanıl suşların rekombinant suşlara göre daha büyük olduğu gözlemlendi.



Şekil 4.46. *E. herbicola* (a), Eh[pUC8] (b) ve Eh[pUC8:15] suşunun (c) TEM görüntüleri (10,000 büyütme)

Yabani suştaki hücrelerin belirli bölgelerinde koyu ve açık kısımlar olduğu görüldü (Şekil 4.47). Açık görünen bölgeler yabani suşta daha fazla iken, rekombinant suşlarda bu bölgelerin daha az olduğu saptandı. Ayrıca rekombinant suşlarda membranın daha belirgin olduğu ve bu hücrelere genel olarak bakıldığında koyu bölgelerin homojen olarak dağıldığı gözlemlendi (Şekil 4.47 (b) ve (c)).



Şekil 4.47. *E. herbicola* (a), Eh[pUC8] (b) ve Eh[pUC8:15] suşunun TEM görüntüleri (c) (63.000 büyütme)

5. TARTIŞMA SONUÇ

Bu çalışmada *E. herbicola*, bu bakterinin pUC8 plazmidi taşıyan (Eh[pUC8] ve aynı plazmid üzerinde *vgb* geni taşıyan (Eh[pUC8:15]) rekombinant suşlarının çeşitli ikincil metabolitleri üretim karakteristikleri çalışıldı. Burada, *E. herbicola* tarafından doğal olarak üretilen ve çeşitli endüstrilerde önemli kullanımları ikincil metabolitler IAA, β -karoten, likopen, C vitamini, fenazin ve meropenem çalışılmıştır. Ayrıca bu bakterilerin hücre metabolizmasının enerjetik durumunun anlaşılması için ATP/NAD seviyesindeki değişimler, oksijen tüketim özellikleri ve canlı hücre yoğunlukları karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır.

VHb/*vgb* sisteminin, ortam oksijenini tamponlamadaki rolü ve kültürün ileri fazlarında oksijeni membran transferazlarına aktararak yaşlı hücrelere daha iyi bir solunum, büyüme ve çoğalma yeteneği kazandırarak özellikle ikincil metabolit üretiminde yardımcı olduğu bilinmektedir [30, 186]. IAA, β -karoten, likopen, C vitamini, fenazin ve meropenemin VHb/*vgb* sistemini içeren rekombinant mikroorganizmalar kullanılarak üretimi ilk kez bu çalışmada araştırılmıştır.

VHb'nin *E. herbicola*'da farklı metabolitler için farklı etkilerle kendini gösterdiği saptandı. Bazı metbolitlerin üretiminde VHb varlığında önemli artış gözlenirken diğer metabolit sentezinin ise neredeyse tamamen baskılandığı görüldü. Benzer şekilde, bu hücrelerin ATP, NAD seviyesi ve oksijen tüketim özelliklerinin de farklı olduğu ortaya kondu.

Hem LB ortamında ve hem de üç karbon kaynağının (glukoz, fruktoz, sükroz) iki farklı konsantrasyonda (% 0.1 ve % 1) kullanıldığı M9 ortamında *E. herbicola* ve bu rekombinantlarının kendine özgü bir metabolit profili gösterdikleri belirlendi. Sonuçlar, aerobik ve mikroaerofilik şartlarda belli global transkripsiyon regülatörleri (ArcAB, FNR ve CRP) tarafından düzenlendiği bilinen *vgb* geninin etkisi ile uyumlu bulunmuştur [114]. *vgb* ve aynı zamanda plazmid varlığının biyokütle oluşturmaya, oksijen tüketimine, farklı pigmentasyona ve ortam pH'sının farklılık göstermesine genel olarak yansdığı görüldü.

5.1 IAA Üretimi

İndol-3-asetamid (IAM) yolağı, bakterilerde iyi karakterize edilmiş olan bir yoldur. İki basamaklı bu yolda triptofan öncelikle *iaaM* geni tarafından kodlanan *triptofan-2-monooksijenaz* (IaaM) enzimi tarafından IAM'ye dönüştürülür. *Triptofan-2-monooksijenaz* enziminin katalizlediği bu reaksiyonda 1 mol triptofan ve 1 mol O₂ tüketilirken, 1 mol IAM ve 1 mol CO₂ üretilmektedir. İkinci basamakta IAM, *iaaH* geni tarafından kodlanan IAM hidrolaz (IaaH) enzimi tarafından IAA'ya dönüştürülür [62].

LB ortamında *vgb*⁺ rekombinantının genel olarak diğer her iki suştan da yüksek IAA seviyelerine sahip bulunduğu belirlenirken, bu farkın 72 saat kültürlerinde bariz biçimde artarak konakçı ve *vgb*⁻ rekombinantına göre sırasıyla 2 kat ve 1.3 kat olduğu gözlemlendi. L-triptofanın, IAA oluşumunda öncül olması ve IAA biyosentezinde rol oynayan enzim sistemlerini indüklemesi sebebiyle LB besiyerlerine bu amino asitin L-formu düşük (% 0.1) ve yüksek konsantrasyonda (% 0.5) eklenmiştir. Düşük triptofan ortamında IAA seviyesinde her üç suşta da genel bir artış görülürken, LB ortamında görüldüğü gibi *vgb*⁺ rekombinantı kültür boyunca diğer iki suşa göre daha yüksek IAA üretimi sergiledi. LB ve düşük triptofan ortamlarında *vgb*⁺ suşunda IAA seviyesinin özellikle 72 saat kültürlerinde diğer iki suşa göre yüksek olması, ortam oksijeni ile regüle olan böyle bir metabolitin [62, 187] yine hücrelere yüksek bir oksijen alım kapasitesi sunan Vhb/*vgb* sisteminden pozitif yönde etkilendiği görülmüştür. Düşük bir hücre yoğunluğu ile kendini gösteren *vgb*⁺ rekombinantının bu yüksek IAA seviyesi, hücre yoğunluğu ile IAA üretimi arasında önemli bir korelasyon olduğunu bildiren çalışma ile örtüşmemektedir [188]. Ancak tersine, yüksek triptofan ortamında bu suşun (yani *vgb*⁺ rekombinantı) IAA seviyesinin oldukça baskılandığı görüldü. Bakteriyel IAA sentezinde triptofanın temel bir öncül olduğu bilinmekte olup, bu amino asitin yüksek konsantrasyonlarının IAA üretimini olumsuz etkilediği rapor edilmiştir [42, 188-189]. Bunun nedeni, ortamdaki IAM birikiminin L-triptofan ↔ IAM dönüşümünü katalizleyen enzim sistemini inhibe etmesi olabilir.

Mikroorganizmaların besinsel ve çevresel ihtiyaçlarının belirlenmesi biyoproses çalışmaları için en önemli adımı oluşturur. Düşük ve yüksek konsantrasyonda glukoz, fruktoz ve sükrozun, IAA üretimini farklı düzeylerde etkilediği görülmüştür. Bu çalışmada gerek düşük gerekse yüksek konsantrasyonda glukoz ve fruktoz ortamında

vgb⁺ rekombinantı konakçıya göre daha yüksek IAA üretimi sergilerken, sükroz ortamında tersi bir durum gözlenmiştir. Farklı kültür koşullarında *vgb*⁺ rekombinant suşunda en fazla IAA üretimin görüldüğü ortam yüksek konsantrasyonlu glukoz ortamı olmuştur. *vgb*⁺ suşundaki bu üretimin fruktoz ortamına göre 30 kat; sükroz ortamına göre 116 kat ve LB ortamına göre ise yaklaşık 6 kat fazla olduğu belirlenmiştir. Buradan yola çıkarak *vgb*⁺ rekombinant suşunda IAA üretimi için en ideal karbon kaynağının glukoz olduğunu söylemek mümkündür. Yapılan bir çalışmada, karbon kaynağı olarak glukozun kullanıldığı M9 ortamında kültürü yapılan hücrelerde IAA üretiminin daha yüksek olduğu rapor edilmiştir [166]. Bu durum, bizim çalışmamızdaki bulgular bulgular ile örtüşmektedir.

5.2 β -karoten Üretimi

LB ortamındaki 12 saat ve 24 saat kültürlerinde *vgb*⁺ rekombinant suşunun diğer iki suşa göre önemli oranda yüksek β -karoten seviyesine sahip olduğu belirlendi. Özellikle, hücre başına üretilen β -karoten miktarına bakıldığı zaman, 12 saat kültürlerde *vgb*⁺ rekombinantının diğer iki bakteri suşuna göre 4 kata varan oranlarda daha yüksek β -karoten sentezlediği saptandı. Ancak, kültürün bundan sonraki fazlarında her üç suşun da ortam hücre yoğunluğu benzer olmasına rağmen rekombinant suşlara kıyasla, konakçıda β -karoten sentezinde önemli artış olduğu belirlenmiştir. Kültür pH'larında başlangıç pH'sına göre 2 üniteye varan artışlar görülürken, oksijen tüketimin özellikle rekombinantlarda erken kültür fazında genç hücrelerde oldukça yüksek olduğu görüldü. Kültürlerin 6 saat fazında benzer oksijen tüketimi gösteren rekombinantlarla konakçı hücre arasında yaklaşık 10 kat bir fark görülmüştür. Ancak, yüksek oksijen alımının yüksek β -karoten üretimi ile ilişkisi sadece *vgb*⁺ rekombinantında görüldü. Bu da erken faz (yani 12 ve 24 saat) kültürlerinde, β -karoten üretiminin, plazmidin hücreye uyguladığı yükten değil, VHb'nin pozitif etkisinden kaynaklandığını göstermektedir.

Genel olarak bakıldığında farklı karbon kaynağının bulunduğu M9 ortamında kültürü yapılan rekombinant suşların sentezlediği β -karotenin, LB ortamına göre düşük olduğu, düşük fruktozlu M9 hariç konakçı hücrede β -karoten üretiminin M9 ortamında genel olarak yüksek olduğu kaydedilmiştir. M9 kültürlerinde konakçıda β -karoten üretiminin en yüksek, vgb^+ rekombinant suşunda ise en düşük değerde olduğu görülmüştür. Her ne kadar rekombinantların hücre sayısı konakçıya göre 2 kata varan oranlarda daha düşükse de, özellikle vgb^+ rekombinant suşunun oldukça düşük olan β -karoten seviyesi sadece bu faktöre bağlanamaz. Bu da göstermektedir ki, VHb/ vgb sistemi β -karoten üzerinde baskılayıcı bir rol oynamaktadır. Bu durum, glukozun vgb üzerindeki katabolit baskılanması ile de uyumludur [190]. Yüksek konsantrasyonda glukoz ve fruktoz, konakçı hücrede β -karoten sentezinde indükleyici bir etki gösterirken, aynı konsantrasyondaki sükroz aksine baskılayıcı bir durum sergilemiştir. Ayrıca yüksek glukoz konsantrasyonunda her üç suşta ortam pH'sının asidikleştiği görülmüştür. Bu durum, ortamda hücre büyümesi ve enerji ihtiyacından fazla bulunan glukozun fermentatif yollarla asidik bileşiklere dönüştürüldüğünü göstermektedir. Benzer şekilde, *Vitreoscilla* hemoglobin geninin kullanıldığı bir çalışmada yüksek konsantrasyonda glukozun ortam pH'sını düşürdüğü rapor edilmiştir [186].

5.3 Likopen Üretimi

Likopen, yüksek antioksidan özelliği ile bilinen önemli bir karotenoid moleküldür [72]. Endüstriyel açıdan önemli kullanım alanlarına sahip likopenin üretiminde, doğal bir kaynak olarak mikroorganizmaların ve ucuz substratların kullanılması oldukça önemlidir. LB ortamında konakçıdaki likopen üretimi, diğer iki suşa göre daha yüksek iken, bu fark vgb^+ ile kıyaslandığında daha belirgindir. Birbirine dönüşebilen pigmentler olan likopen ve β -karotenin LB kültürlerinde VHb/ vgb sisteminden etkilenmeleri benzer olmuştur. Bu da, göstermektedir ki yüksek oksijen alım özelliği gösteren rekombinantlarda bu durum, en azından ileri kültür fazlarında düşük pigment oluşumuna sebep olmaktadır. Konakçı hücrede zaman içinde her ikisinin seviyesinde bir artış gözlenirken, rekombinantlarda ise en yüksek değere 24 saat kültürlerinde ulaşmış ve daha sonra her iki pigmentin seviyesinde kısmi düşüşler gözlenmiştir. Konakçının 48 saat kültürlerindeki likopen miktarının, 12 saat kültürlerine göre yaklaşık 10 kat fazla olduğu tespit edilmiştir. Diğer taraftan düşük ve yüksek konsantrasyonda glukoz, fruktoz ve sükrozun konakçı ve rekombinantlardaki likopen

sentezini oldukça farklı etkilediği saptanmıştır. Genel olarak bakıldığında LB ortamında likopen üretimi M9 ortamlarına göre rekombinantlarda daha fazla iken, konakçıda LB ve farklı karbon kaynağı taşıyan M9 ortamlarında bu pigmentin seviyesi benzerlik göstermiştir. M9 ortamlarındaki kültürlerde likopen üretimi konakçı suşta diğer iki suşa kıyasla oldukça yüksek bulunmuştur. Sükrozlu M9 ortamındaki glukoz ve fruktozun her iki konsantrasyonunda üretilen likopenin ise *vgb⁺* rekombinant suşunda birbirine yakın olduğu ve bu değer, yüksek konsantrasyonda konakçıya göre sırası ile 4 ve 8 kat düşük kaydedilmiştir. Buradan da anlaşıldığı üzere, yüksek konsantrasyonda glukoz ve fruktoz, *vgb⁺* rekombinant suşunda likopen üretiminde bariz bir baskılamaya neden olmuştur.

VHb sentezinin düşük oksijenli şartlar altında global regülatör faktörler olan FNR (Fumarat nitrat redüksiyon) ve cAMP reseptör protein (CRP) aracılığı ile indüklendiği bilinmektedir [191]. Buna bağlı olarak sentezi oksijenle regüle olan birçok metabolitin üretiminin VHb aktarılan heterolog organizmalarda üretimin arttığı rapor edilmiştir [192]. Buna karşın β -karoten ve likopen gibi karotenoidlerin, yüksek oksijen koşulları altında oksidasyona uğradıkları bilinmektedir [193].

5.4 C Vitamini Üretimi

LB kültürlerinde C vitamini seviyesinin *vgb⁺* rekombinant suşunda kültürün bütün fazlarında diğer iki suşa göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. *vgb⁺* rekombinant suşunun ürettiği C vitamini miktarının 48 saat kültürlerinde en yüksek düzeyine ulaştığı ve bu üretim oranının benzer vitamin seviyeleri gösteren diğer iki suşa göre 4 kat yüksek olduğu görülmüştür. Diğer iki suşa göre 12 ve 24 saat kültürlerinde daha az canlı hücre sayısına sahip olan *vgb⁺* rekombinantının, bu inkübasyon periyodunda (yani 48 saat kültürlerinde) hücre yoğunluğunun diğer iki suşa göre yüksek olduğu kaydedilmiştir. Kültür ortamlarının pH'sının, başlangıç pH'sına göre nispeten bazik yönde değişmesi hücre sayısının kültür boyunca yüksek seyretmesini sağlamıştır. Bunun tersine, yüksek konsantrasyonda karbon kaynağının kullanıldığı M9 ortamında zamana bağlı pH düşüşü ise hücre yoğunluğu üzerinde oldukça negatif bir etki yaratmıştır. M9 ortamındaki maksimum C vitamini üretiminin düşük glukoz ortamında görülmüş olup yüksek glukoz konsantrasyonunda vitamin üretiminin baskılandığı saptanmıştır. Bu durum, yüksek glukoz konsantrasyonundaki kültürlerin ortam pH'sının

düşmesi ile ilgili olabilir. Düşük glukozlu ortamda özellikle *vgb*⁺ rekombinantının ürettiği C vitamini miktarı, hem LB hem de fruktoz ve sükroz ortamlarına göre bariz şekilde yüksek kaydedilmiştir. Yüksek konsantrasyonda glukoz ve fruktoz içeren M9 ortamında *vgb*⁺ suşunun ürettiği C vitamini, düşük konsantrasyona göre sırasıyla 5 ve 1.2 kat baskılanırken, yüksek konsantrasyonda sükrozun bu suştaki C vitamini üretimini 4 kat indüklediği belirlenmiştir. Dolayısı ile *vgb*⁺ suşunda en fazla C vitamini üretiminin düşük glukoz ortamında ve en yüksek baskılanmanın da yüksek glukoz ortamında olduğu gözlenmiştir. Glukoz bakterilerde enzim ve metabolit üretiminde en yaygın kullanılan karbon kaynağı olmasına rağmen, özellikle bazı bakterilerde bu karbonhidratın yüksek bir katabolit inhibisyona neden olduğu gösterilmiştir. Yüksek glukozlu ortamlarda metabolit sentezinin inhibisyonunun sadece glukozun katabolit represyonundan kaynaklanmadığı, aynı zamanda glukozun metabolizması sonucu ortam pH'sının düşmesinden dolayı olabileceği rapor edilmiştir. [194-195]. Bu bağlamda, bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar ile bizim çalışmamızdaki buldular örtüştüğü görülmektedir. Benzer şekilde çalışmamızda konakçı, *vgb*⁻ ve *vgb*⁺ suşlarının C vitamin biyosentezinin yüksek glukoz ortamında baskılandığı belirlenmiştir. Böyle bir etkinin nedeni yüksek glukoz konsantrasyonunda ortam pH'sının başlangıç pH'sına göre düşük olmasına bağlanabilir. *Enterobacteriaceae* dahil birçok bakterinin oksijenin sınırlandığı ileri kültür fazlarında fermentasyon asitleri ürettiği ve buna bağlı ortam pH'sının düşmesinin zar geçirgenliğinden ATP üretimine kadar hücrenin birçok metabolik ve fizyolojik özelliğini etkileyerek büyüme ve çoğalmayı etkilediği beilinmektedir [196-198].

5.5 Fenazin Üretimi

Fenazinler çok çeşitli uygulamalarda elektron alıcısı ve vericisi olarak, yakıt hücrelerinin bileşenleri olarak, çevre sensörleri ve biyosensörler olarak, antitümör bileşiklerin merkezi bileşenleri olarak kullanılmaktadır [82]. Son zamanlarda yapılan çalışmalar fenazin antibiyotiklerinin *E. herbicola* (*Pantoea agglomerans*) tarafından da sentezlendiğini göstermiştir. *E. herbicola* tarafından sentezlenen fenazinlerin, geniş spektrumlu antimikrobiyal aktiviteye sahip oldukları ve özellikle Gram-pozitif patojenlere karşı aktivite gösterdikleri rapor edilmiştir [199]. Çalışmamızda, LB ortamında *vgb*⁺ rekombinant suşunun kültürün bütün fazlarındaki hücre yoğunluğunun, konakçıya göre 3 kata kadar varan oranlarda daha düşük olduğu bulunmuştur. Buna

rağmen aynı ortamda *vgb*⁺ suşunun fenazin üretiminin diğer iki suşa göre yüksek olduğu bulunmuştur. *vgb*⁺ suşunun ürettiği maksimum fenazin miktarının 24 saat kültürlerinde olduğu saptanmıştır. Ayrıca, LB ortamındaki kültür pH'sının zamanla bazikliğe kaydığı görülmüştür. Bakterilerde fenazin üretimin ortam asiditesi ile etkilendiği ve ortam havalandırmasının bu antibiyotik üretimi arttırdığı rapor edilmiştir [200].

M9 ortamında hem düşük hem de yüksek konsantrasyondaki fruktozun, *vgb*⁺ rekombinant suşunda fenazin üretimini önemli oranda indüklediği görülürken, diğer iki suşun fenazin seviyesi glukoz ve sükrozdakine benzer biçimde düşük seviyelerde kaydedilmiştir. Özellikle yüksek konsantrasyondaki fruktoz ortamındaki fenazin miktarının LB ortamındakine göre yaklaşık 1.6 kat yüksek olduğu belirlenmiştir. Düşük konsantrasyonda fruktoz ortamında, *vgb*⁺ rekombinant suşunun hücre yoğunluğu konakçıya göre 3 kat, yüksek konsantrasyonda ise 2 kat yüksek kaydedilirken, diğer taraftan *vgb*⁺ rekombinant suşunun düşük ve yüksek fruktoz ortamındaki fenazin üretiminin konakçıya göre sırasıyla 4.6 ve 12.4 kat yüksek olduğu kaydedilmiştir. Bu sonuçlar bize, fenazin üretiminde VHb hemoglobini açısından önemli bir pozitif regülasyon gösterildiğini ortaya koymaktadır. Yapılan çalışmalarda VHb/*vgb* sistemine sahip bakterilerde antibiyotik üretiminin arttığı rapor edilmiştir [36, 129]. Ayrıca VHb aktarılan hücrelerin, konakçılarına oranla daha yüksek oksijen alınımına sebep olduğu bildirilmiştir [201]. Bu bulgular, bizim çalışmamızla örtüşmektedir. Dolayısı ile *E. herbicola*'nın da benzer şekilde VHb/*vgb* sistemine sahip olması, fenazin antibiyotik üretiminin biyosentezi lehinde bir durum sergilemekte olup, fenazin antibiyotik üretiminin bu koşullar altında pozitif yönde bir regülasyon gösterdiği görülmüştür.

5.6 Meropenem Üretimi

Meropenem bir karbapenem antibiyotik olup Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere karşı geniş spektrumlu bir aktiviteye sahiptir [202]. Karbapenem antibiyotik üretimi çalışmalarında hızlı üremeleri ve genetik çalışmalara yatkın olmaları nedeniyle *Serratia* ve *Erwinia* türlerini cazip hale getirmiştir [80]. Bu açıdan bakıldığında *E. herbicola*'nın hızlı üreyen ve üretimi son derece kolay olan bir bakteri olup endüstriyel açıdan önemli böyle antibiyotiklerin sentezinde rahatlıkla kullanım potansiyeli olan model bir bakteri olabileceğini düşünmektedir. LB ortamında kültürün geç (48 saat) fazlarına kadar meropenem üretiminin *vgb*⁺ rekombinantında diğer iki suşa

göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Kültürün ileri fazlarında (24 saat) meropenem miktarının her üç suşta en yüksek değerlerini aldığı ve özellikle *vgb*⁺ rekombinant suşunda bu artışın daha bariz olduğu görülmüştür. Dolayısıyla LB ortamında meropenem üretimi üzerinde VHb'nin pozitif bir etki sağladığı kaydedilmiştir. Kültürün bu fazında *vgb*⁺ rekombinantının ürettiği antibiyotik miktarı, diğer iki suşa göre yaklaşık 2 kat yüksek bulunmuştur. Kültürün bundan sonraki fazlarında ise meropenem üretiminin azaldığı ve 48 saatten sonra her üç suştaki antibiyotik üretimin benzer düzeylere ulaştığı gözlenmiştir. Daha önceki çalışmalar antibiyotik üretiminin hücre yoğunluğunun en yüksek düzeyde olduğu logaritmik fazın sonu ile durgun fazın başlarında gerçekleştiğini göstermiştir [100]. Diğer bir çalışmada ise *E. herbicola*'da karbapenem üretiminin, ortamdaki bakteri yoğunluğuna bağlı olduğu rapor edilmiştir [99]. Yine başka bir çalışmada ise *Erwinia* MS1 suşunda aerobik ve anaerobik koşullar altında karbapenem üretimi araştırılmış ve oksijenli koşullardaki kültür süpernatantlarında karbapenem üretimi görülürken, oksijenin sınırlandırıldığı koşullarda ise üretiminin görülmediği rapor edilmiştir [203]. Bu çalışmalarla uyumlu olarak, çalışmamızda LB ortamında 24 saat kültürlerinde maksimum meropenem üretiminin olduğu ve kültürün bundan sonraki fazlarında ise bu antibiyotiğin üretiminin azaldığı belirlenmiştir. Oksijenin sınırlı olduğu kültürlerde hücre yoğunluğu düşük olduğu için buna bağlı olarak antibiyotik üretiminin de azaldığı görülmüştür. Ayrıca, düşük oksijen koşullarında aktif olarak çalışan *vgb* geni, kültürün ileri fazlarında oksijenin azaldığı durumlarda daha iyi ifade edilmekte ve hücrelere daha iyi solunum olanağı sağlamaktadır. Meropenemin oksijenle regüle olduğu göz önüne alındığında, bu antibiyotiğin üretiminin özellikle VHb ekspresyonu yapan suşta daha yüksek olması, VHb'nin meropenem üretimini olumlu yönde etkilediğini göstermektedir. Ancak, kültürün geç fazlarında VHb ekspresyonu yapan suşta oksijen alımı yüksek olsa dahi hücre yoğunluğu azaldığından meropenem üretiminin de buna bağlı olarak azalma göstermiştir.

Farklı karbon kaynaklarının meropenem üretimi üzerindeki etkisinin ise farklı şekillerde olduğu görülmüştür. Her üç suşta özellikle yüksek konsantrasyonda fruktoz ve sükrozun meropenem üretimini LB ortamına göre bariz bir şekilde arttırdığı görülmüştür. Yine her üç suşta glukoz ortamındaki meropenem üretiminin, LB ortamındaki ile benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Yüksek glukoz ortamında *vgb*⁺

rekombinant suşun ürettiği meropenem miktarının, konakçıya göre yaklaşık 6 kat daha az olduğu saptanmıştır. Bu durum, VHb'nin glukoz ortamında baskılandığını ve dolayısıyla meropenem antibiyotığının üretimin de bu durumdan olumsuz etkilendiğini göstermektedir. Yapılan çalışmalarda glukozun, antibiyotik üretebilen bakterilerin üremesi için en uygun karbon ve enerji kaynağı olarak iş görmesine rağmen birçok antibiyotığın sentezini olumsuz yönde etkilediği de bildirilmiştir. Bu bağlamda, *P. chrysogenum*'da aşırı glukoz kullanımının penisilin miktarında önemli oranda azalmaya sebep olduğu rapor edilmiştir [204]. Benzer bir durum *C. acremonium*'da sefalosporin üretiminde de görüşmüş ve glukoz ve gliserol gibi karbon kaynaklarının sefalosporin üretimini olumsuz yönde etkilediği belirlenmiştir [205]. Bu çalışmalarla uyumlu olarak, bu çalışmada da hem düşük hem de yüksek konsantrasyonda glukozun, rekombinant suşlarda meropenem üretimini azalttığı gözlenmiştir.

Karbapenem biyosentezinin sadece genetik faktörler tarafından değil aynı zamanda çeşitli çevresel faktörler (sıcaklık, karbon kaynağı ve NaCl gibi) tarafından da etkilendiği belirtilmiştir [160]. Ayrıca karbon kaynağı olarak kullanılan maltoz ve gliserolün karbapenem üretimini negatif yönde etkilediği, fruktozun ise karbapenem üretimini teşvik ettiği rapor edilmiştir. Ayrıca, fruktoz içeren besiyerinde antibiyotik üretiminin glukoz ve sükroz içeren ortamlara göre daha fazla olduğu saptanmıştır. Yine kısıtlı oksijen koşullarında bakteri gelişiminin çok yavaş olduğu, buna bağlı olarak da karbapenem üretiminin olmadığı rapor edilmiştir [160]. Bu çalışmadan elde edilen bulgularla bizim sonuçlarımız örtüşmektedir. Çalışmamızda yüksek konsantrasyonda fruktozun konakçı, *vgb⁻* ve *vgb⁺* suşlarındaki meropenem üretimini pozitif yönde regüle ettiği ve LB ortamındaki meropenem üretimi ile kıyaslandığında sırasıyla yaklaşık 5.6, 1.2 ve 4.2 kat yüksek olduğu belirlenmiştir. Bununla beraber yüksek fruktoz ortamındaki meropenem üretiminin, düşük ortama göre özellikle *vgb⁺* rekombinant suşunda yaklaşık 44 kat arttığı kaydedilmiştir. Dolayısı ile yüksek konsantrasyonda fruktozun meropenem üretiminde indükleyici rol oynadığı ve bu konsantrasyondaki fruktozun VHb ekspresyonunu pozitif yönde regüle ettiği söylenebilir.

Çalışmamızda karbon kaynağı olarak sükrozun kullanılması halinde her üç suşta da meropenem üretiminin arttığı, özellikle yüksek sükroz konsantrasyonunda bu üretimin bariz şekilde yüksek olduğu görülmüştür. *vgb⁺* suşunun yüksek sükroz ortamında ürettiği meropenem miktarının, yine yüksek fruktoz ortamındakine göre

yaklaşık 2.6 kat, yüksek glukoz ortamına göre 27 kat ve LB ortamına göre ise yaklaşık 3 kat daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Diğer iki suş için de benzer durumda üretimler gözlenmiştir. Bu durum bize, meropenem üretiminde farklı karbon kaynakları içerisinde özellikle yüksek konsantrasyonda sükrozun, daha sonra fruktozun özellikle VHb ekspresyonu yapan suşta pozitif yönde etki yarattığını göstermiştir. İlgili bir çalışmada karbapenem sentezinde sükrozun, glukoz ve gliserole göre etkili olduğu ortaya konuştur. Sükroz ortamında daha fazla karbapenem üretildiği rapor edilmiştir [203].

İlk kez tarafımızdan bu çalışma için oluşturulmuş olan Eh[pUC8:15] rekombinantında VHb/*vgb* sisteminin, kültürün ileri fazlarında hücrelerin ortamdaki oksijeni membran transferazlarına aktarılmasında yardımcı olduğu ve yaşlı hücrelere daha iyi bir solunum, büyüme ve çoğalma yeteneği kazandırarak meropenem antibiyotikinin üretimi pozitif yönde düzenlediği belirlenmiştir.

5.7 ATP ve NAD Seviyeleri

Kültürlerin ortam besinlerini enerjetik amaçlamı kullandıkları yoksa biyokütle oluşturmamayı yönlendirdikleri, hücrelerin içinde bulundukları metabolik durumla ilgilidir. Enerji ihtiyacı biyokütle oluşturmadan önce gelir ve sınırlı miktarda besin taşıyan ortamlarda hücreler yavaş büyüyüp çoğalırken, besinin önemli kısmı enerji üretimine yönlendirilir ve bu enerjetik yollarda ikincil metabolitlerin yapımı esas metabolitlere göre daha yoğun olur. Beslenme ve biyoenerjitiğin anlaşılması, laboratuvar ortamında mikroorganizmaları üretmek ve hücrelerin kendi doğal habitatlarında nasıl bir yaşam sürdürdüklerini anlamak için gereklidir. Bu bağlamda, bu çalışmada gerek genetik (*vgb*) ve çevresel koşullarının ATP ve NAD üretimindeki etkisi araştırılmıştır. LB ortamında 37 °C’de, *vgb*⁺ rekombinant suşunun ATP seviyesinin konakçı hücreye göre genel olarak daha yüksek olduğu kaydedilmiştir. Bu durum bize ATP seviyesi bakımından VHb ekspresyonu yapan suşun daha avantajlı olduğunu göstermekte olup önceki çalışmalarla da desteklenmektedir [116, 206]. Ancak, *vgb*⁺ rekombinant suşun 30 °C’de ürettiği ATP düzeyinin ise diğer iki suşa göre genel olarak düşük olduğu görülmüştür. Düşük ortam sıcaklığının *vgb*⁺ rekombinant suşunda sebep olduğu bu durumun nedeni henüz anlaşılamamıştır.

Rekombinant suşlarda 37 °C’de NAD düzeyinin, 24 saat kültürlerinde en yüksek değerine ulaştığı ve ilerleyen fazlarda genel olarak her üç suşta da bir azalma olduğu

kaydedilmiştir. Ayrıca vgb^+ rekombinantının 12 saat kültürleri hariç, bütün kültür fazlarında diğer iki suşa göre daha fazla NAD ürettiği belirlenmiştir. NAD düzeyinin 30 °C’de ise yine 24 saat kültürlerinde her üç suş için en yüksek değerine ulaştığı ve 72 saate doğru üretimin azaldığı tespit edilmiştir.

Çalışmamızdan LB ortamında farklı sıcaklıklarda (37°C ve 30°C) kültürü yapılan *E. herbicola* ve rekombinant suşların ürettiği NAD düzeylerinin genel olarak ATP seviyesinden çok daha fazla olduğunu göstermiştir. Bu durum, hücrelerin enerji (ATP)’den çok ortam besinlerini biyosentetik yollara sokarak hücreleri büyüme ve çoğalmaya teşvik ettiğini göstermektedir. Aktif olarak büyümekte olan hücrelerde ATP konsantrasyonunun oldukça düşük olduğu (2 mM) rapor edilmiştir [103]. Çalışmamızdaki *E. herbicola* ve rekombinant suşlarında ATP konsantrasyonunun düşük olması, bu hücrelerde ATP’nin fazlasının yapım yönünde kullanıldığını söyleyebiliriz. Bizim yaptığımız çalışmada özellikle LB ortamında başlangıç pH’sı 7.0 olan büyüme ortamlarının zamanla bazik olduğu kaydedilmiştir. Bu açıdan bakıldığında gerek 37°C’de gerekse 30°C’de LB ortamındaki ATP ve NAD sentezinin zamana bağlı olarak azalmasının nedeni, hücrelerin yaşlanması ve pH’daki artışa bağlı olabilir. Yapılan benzer bir çalışmada, ATP sentezinin pH 6.5’de gerçekleştiği fakat pH 8.5’te sentezin önemli derecede inhibe olduğu bildirilmiştir [174].

Bir çok biyoproseste oksijen konsantrasyonunun belli kritik seviyelerin altına düşmesi kritik bir faktör olup, böyle sistemlerde hücrelere etkin bir oksijen alım ve tamponlama özelliği kazandıran *Vitreoscilla* hemoglobininin kullanılmasının önemli avantaj sağlayacağı düşünülmüştür [29, 190, 207]. Genel olarak değerlendirildiğinde LB ortamında NAD düzeyinin farklı karbon kaynağı ile desteklenmiş M9 ortamlarına göre bariz derecede yüksek olduğu kaydedilmiştir. VHb’nin *E. herbicola*’da ATP ve NAD düzeylerini farklı şekillerde etkiledi görülmüştür. Yüksek konsantrasyonda glukozlu M9 kültürlerinde her üç suşın ürettiği ATP seviyelerinin arttığı görülmüştür. Bu çalışmada yükek konsantrasyonda glukozun özellikle 37°C’deki kültürlerde vgb^+ rekombinant suşunda ATP düzeyini pozitif yönde regüle ettiği kaydedilmiştir. Diğer taraftan yine yüksek glukoz ortamında rekombinant suşların NAD düzeylerinin arttığı, ancak konakçıda ise azaldığı gözlenmiştir. Yüksek konsantrasyonda fruktozun ise, her üç suştaki hem NAD ve hem de ATP düzeyini pozitif yönde etkilediği belirlenmiştir. Sükroz ortamında hem ATP hem de NAD düzeylerinin özellikle yabancı suşta yüksek

olduğu, rekombinant suşlarda bariz derecede düşük olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, *E. herbicola* ve onun rekombinantlarında genel olarak en düşük ATP ve NAD seviyelerinin 30°C'deki sıcaklıklarda görüldüğü saptanmıştır. Bu durum, mezofilik bir bakteri olan *E. herbicola*'da belli sıcaklıkların altında düşük ATP ve NAD seviyelerine sahip olduğu ile açıklanabilir.

5.8 Bakterilerin Oksijen Tüketim Karakteristikleri

İyi bir havalandırmanın, bazı bakterilerde sekonder metabolit sentezini indüklerken bazılarında ise inhibe ettiği bilinmektedir. VHb/*vgb* sisteminin, ortam oksijenini tamponlamadaki rolü ve kültürün ileri fazlarında membran transferazlarına aktarılacak yaşlı hücrelere daha iyi bir solunum, büyüme ve çoğalma yeteneği sağladığı bilinmektedir. Çeşitli biyo üretimlerde oksijen konsantrasyonunun belli kritik seviyelerin altına düşmesi en önemli belirleyicisi olup, böyle sistemlerde hücrelere etkin bir oksijen alım ve tampon özelliği kazandıran *Vitreoscilla* hemoglobininin kullanılmasının önemli avantaj sağlayacağı düşünülmüştür.

E. herbicola ve bu bakterinin rekombinant suşlarının oksijen kullanım karakteristikleri karşılaştırıldığında, *vgb*⁻ ve *vgb*⁺ rekombinantların üç kültür fazında da konakçı hücreye göre daha fazla oksijen tükettiği görülmektedir. Özellikle kültürlerin erken logaritmik fazlarında (6 saat) *E. herbicola*'nın *Vitreoscilla* hemoglobini sentezleyen suşunda bariz biçimde daha fazla oksijen tükettiği görülmektedir. Bu fazda (6 saat) *E. herbicola*'nın *vgb* içeren (*vgb*⁺) ve *vgb* içermeyen (*vgb*⁻) rekombinant suşlarının oksijen tüketimi yabanıl suş ile kıyaslandığında sırası ile 9.2 kat ve 8.1 kat daha fazla olduğu görülmüştür. Bu durumun rekombinantlarda sadece VHb ile sağlanmadığını aynı zamanda plazmid tarafından yüklenmiş olan ekstra metabolik yüklerle ilgili olabilmektedir [208-210]. Yapılan çalışmalarda VHb ekspresyonu yapan rekombinant bakterilerde oksijen alımının konakçısına göre daha fazla olduğu ortaya konmuştur [177]. VHb'nin oksijenin sınırlı olduğu koşullar altında daha çok sentezlendiği, ancak tamamen oksijensiz koşullarda ise sentezinin durduğu bilinmektedir [28, 212]. *E. herbicola*'da oksijenle regüle olan metabolitlerin sentezinin gerçekleşebilmesi için kritik seviyede bir oksijene gereksinim vardır. Çünkü bu koşullarda, bu VHb hemoglobin genini (*vgb*) regüle eden global regülatör faktörler olan FNR ve cAMP reseptör protein (CRP) indüklenmektedir [108, 115, 190, 211].

Çalışmamızda, canlı hücre sayısında ise, *E. herbicola*'nın yabanıl suşunun 6 saat kültürlerinde *vgb*⁺ rekombinant suşundan yaklaşık 3.5 kat daha fazla hücre yoğunluğuna ulaştığı kaydedilmiştir.

Bu çalışma sonuçları göstermiştir ki, aktarılmış olduğu hücrelere etkin bir oksijen alım yeteneği kazandıran VHb'nin *E. herbicola*'da sekonder metabolitlerin sentezini kullanılan karbon kaynağı ya da besi ortamına bağlı olarak ya baskınladığı ya da indüklediği görülmüştür. VHb ile sağlanan fazla oksijen bazı durumlarda bakteride metabolit üretimi için bir dezavantaj yaratıp metabolit sentezini baskımlarken, bazı durumlarda ise daha yüksek metabolit sentezinin gerçekleşmesine imkan tanımıştır. *E. herbicola*'da metabolik akış profilinin farklı şekillerde regüle olması, bu bakteride karbon akışının regülasyonunun ve indükleyici kontrolün farklı olmasından kaynaklanabilir. Bu tür bakterilerin glukoz metabolizması için alternatif glikolitik yolları kullandığı bilinmektedir [212].

Çalışmamızda *E. herbicola* konakçısı ve onun *vgb*⁻ ve *vgb*⁺ rekombinant suşlarının TEM görüntüleri bize yabanıl suş ile rekombinant suşlar arasında büyüklük bakımından önemli farklılık olduğunu, yabanıl suşların rekombinant suşlara göre daha büyük olduğunu göstermiştir. Prokaryotik hücrelerin boyutları ve hacimlerinin büyük ölçüde değişiklik gösterdiği bilinmektedir. Difüzyon ve metabolizmadaki sınırlamalar, prokaryotik hücre boyutlarının üst sınırını belirlemektedir. Bir hücrenin metabolik hızı, onun büyüklüğünün karesi ile ters olarak değişmektedir. Dolayısıyla çok büyük bir hücrede difüzyon olayı metabolizmayı kısıtlayabilir. Böyle bir hücrenin daha uzun süre rekabet edebilmesi mümkün değildir. Birçok prokaryotun çok küçük olmasının en muhtemel nedeni, küçük olmanın bazı önemli avantajlarının olmasıdır. Örneğin, besin maddeleri ve atık ürünler küçük hücrelerde büyük hücrelere göre, içeri ve dışarı doğru daha hızlı geçmektedir. Böylece hücre metabolizması ve büyüme hızlanmış olur. Ayrıca bu durum hücrelerin değişen ortam koşullarına çabuk adapte olmalarını sağlamaktadır [103].

Bu çalışmada, VHb'nin seçilmiş olan metabolitlerin üretimi üzerine etkisinin değişik kültür şartlarında değişik olduğunu, bazı koşullarda beklendiği gibi metabolit üretiminde önemli artış gözlenirken bazı durumlarda metabolit sentezinin neredeyse tamamen baskımlandığını göstermiştir. Aşağıdaki çizelge bu çalışmanın bir özetini teşkil

etmektedir ve VHb hemoglobininin farklı kültür koşullarında metabolit üretimi ve oksijen alımı üzerindeki etkisi verilmiştir. Metabolit artış ve azalışları yabancı suş ile karşılaştırılmıştır ve artışlar (+) ile azalışlar ise (-) ile belirtildi. *vgb*⁺ rekombinantında metabolit üretiminin LB ortamında pozitif etkelediği kaydedildi. Yine *vgb*⁺ suşunda, C vitamini ve fenazın üretimi üzerinde tabloda belirtilen kültür ortamlarının olumlu etkisi olduğu görülmüştür.

Çizelge 5.1. *E. herbicola*’da *vgb*/VHb’nin metabolit üretmi üzerine etkisi

Farklı Karbon ve Konsantrasyonlarında VHb’nin Etkisi							
Metabolit	LB	% 0.1 Glukoz	% 1 Glukoz	% 0.1 Fruktoz	% 1 Fruktoz	% 0.1 Sükroz	% 1 Sükroz
<i>IAA (İndol-3-asetik asit)</i>	+	+	-	+	+	-	-
<i>β-karoten</i>	+	-	-	-	-	-	-
<i>Likopen</i>	+	-	-	-	-	-	-
<i>C vitamini</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Fenazın</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Meropenem</i>	+	-	-	-	-	+	+
<i>ATP</i>	+	-	-	-	-	-	-
<i>NAD</i>	+	-	-	-	-	-	-

Sonuç olarak, VHb/*vgb* sistemini içeren rekombinant mikroorganizmalar kullanılarak çeşitli metabolitlerin (IAA, β-karoten, likopen, C vitamini, fenazın, karbapenem) üretimi ve enerjetik moleküllerin (ATP ve NAD üretimlerindeki değişimler) seviyesi ilk kez bu çalışmada araştırılmış olup, *vgb*/VHb’nin üzerindeki etkisinin ortam koşullarına bağlı bir seyir gösterdiğini ve büyük ölçeklerde yapılacak her çalışma için bu şartların ilgili metabolit için optimize edilmesi gerektiğini ortaya koymuştur.

6. KAYNAKLAR

- [1] W.B. Whitman, D.C. Coleman, and W.J. Wiebe, *Prokaryotes: The unseen majority*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 95:12 (1998) p. 6578-6583.
- [2] J.C. Wooley, A. Godzik, and I. Friedberg, *A Primer on metagenomics*. **Plos Computational Biology**, 6:2 (2010) p 228-234.
- [3] S. Anderson, et al., *A Novel Process for L-ascorbate synthesis production of 2-keto-L-gulonate by a recombinant Erwinia herbicola*, **Abstracts of Papers of the American Chemical Society**,. 190 (1985) p. 71.
- [4] U. Sauer et al., *Metabolic flux ratio analysis of genetic and environmental modulations of Escherichia coli central carbon metabolism*, **Journal of Bacteriology**, 180:21 (1999) p. 6679-6688.
- [5] D.B. Kell, et al., *Metabolic footprinting and systems biology: The medium is the message*. **Nature Reviews Microbiology**, 3:7 (2005) p. 557-565.
- [6] R. Goodacre, et al., *Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data*. **Trends in Biotechnology**, 22:5 (2004) p. 245-252.
- [7] M.L. Mo, B.O. Palsson, and M.J. Herrgard, *Connecting extracellular metabolomic measurements to intracellular flux states in yeast*, **Bmc Systems Biology**, 3 (2009).
- [8] B. Ruiz, et al., *Production of microbial secondary metabolites: regulation by the carbon source*. **Crit Rev Microbiol**, 36:2 (2010) p. 146-67.
- [9] Z.H. Zhang, et al., *Effects of oxygen limitation on xylose fermentation, intracellular metabolites, and key enzymes of Neurospora crassa AS31602*, **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 145:1-3 (2008) p. 39-51.
- [10] M.L. Wei, D.A. Webster, and B.C. Stark, *Metabolic engineering of Serratia marcescens with the bacterial hemoglobin gene: Alterations in fermentation pathways*, **Biotechnology and Bioengineering**,. 59: 5 (1998) p. 640-646.
- [11] C. Khosla, and J.E. Bailey, *Heterologous expression of a bacterial hemoglobin improves the growth-properties of recombinant Escherichia coli*, **Nature**, 331: 6157 (1988) p. 633-635.
- [12] S. Wakabayashi, H. Matsubara, and D.A. Webster, *Primary Sequence of a Dimeric Bacterial Hemoglobin from Vitreoscilla*. **Nature**, 322:6078 (1986) p. 481-483.
- [13] K.L. Dikshit, and D.A. Webster, *Cloning, characterization and expression of the bacterial globin gene from vitreoscilla in Escherichia coli*, **Gene**, (1988) 70(2): p. 377-386.
- [14] Khosla, C. and J.E. Bailey, *Characterization of the oxygen dependent promoter of the Vitreoscilla Hemoglobin gene in Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, 171:11 (1989) p. 5995-6004.
- [15] P.M.H. Kroneck, et al., *Studies on the bacterial hemoglobin from vitreoscilla redox properties and spectroscopic characterization of the different forms of the hemoprotein*, **Biology of Metals**, 4: 2 (1991) p. 119-125.
- [16] W.R. Strohl, et al., *Characterization of Vitreoscilla-Beggiatoides and Vitreoscilla-Filiformis and comparison with Vitreoscilla-Stercoraria and Beggiatoa-Alba*, **International Journal of Systematic Bacteriology**, 36:2 (1986) p. 302-313.

- [17] K.L. Dikshit, et al., *Oxygen inhibition of globin gene-transcription and bacterial hemoglobin-synthesis in Vitreoscilla*, **Journal of General Microbiology**, 135: (1989) p. 2601-2609.
- [18] B. Ates, et al., *Production of L-asparaginase, a chemotherapeutic enzyme, in bacteria expressing Vitreoscilla haemoglobin*, **Febs Journal**, 273: (2006) p. 139-139.
- [19] S. Aydin, D.A. Webster, and B.C. Stark, *Nitrite inhibition of Vitreoscilla hemoglobin (VHb) in recombinant E. coli: Direct evidence that VHb enhances recombinant protein production*, **Biotechnology Progress**, 16:6 (2000) p. 917-921.
- [20] R.E. Buddenhagen, D.A. Webster, and B.C. Stark, *Enhancement by bacterial hemoglobin of amylase production in recombinant E. coli occurs under conditions of low O₂*, **Biotechnology Letters**, 18:6 (1996) p. 695-700.
- [21] H.X. Chen, et al., *Intracellular expression of Vitreoscilla hemoglobin improves S-adenosylmethionine production in a recombinant Pichia pastoris*, **Applied Microbiology and Biotechnology**, 74:6 (2007) p. 1205-1212.
- [22] L.J. Chien, et al., *Enhancement of cellulose pellicle production by constitutively expressing Vitreoscilla hemoglobin in Acetobacter xylinum*, **Biotechnology Progress**, 22:6 (2006) p. 1598-1603.
- [23] L.J. Chien, and C.K. Lee, *Enhanced hyaluronic acid production in Bacillus subtilis by coexpressing bacterial hemoglobin*, **Biotechnology Progress**, 23:5 (2007) p. 1017-1022.
- [24] J.A. Demodena, et al., *Intracellular expression of Vitreoscilla Hemoglobin improves cephalosporin-c production by acremonium-chrysogenum*. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society**, 205 (1993).
- [25] J.A. Demodena, et al., *The production of cephalosporin-c by acremonium-chrysogenum is improved by the intracellular expression of a bacterial hemoglobin*, **Bio-Technology**, 11:8 (1993) p. 926-929.
- [26] I. Dogan, et al., *Expression of Vitreoscilla hemoglobin in Gordonia amarae enhances biosurfactant production*, **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, 33:8 (2006) p. 693-700.
- [27] H. Geckil, et al., *Enhanced production of acetoin and butanediol in recombinant Enterobacter aerogenes carrying Vitreoscilla hemoglobin gene*, **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 26:5 (2004) p. 325-330.
- [28] H. Geckil, and S. Gencer, *Production of L-asparaginase in Enterobacter aerogenes expressing Vitreoscilla hemoglobin for efficient oxygen uptake*, **Applied Microbiology and Biotechnology**, 63:6 (2004) p. 691-697.
- [29] H. Geckil, S. Gencer, B. Ates, et al., *Effect of Vitreoscilla hemoglobin on production of a chemotherapeutic enzyme, L-asparaginase, by Pseudomonas aeruginosa*, **Biotechnology Journal**, 1 (2006) p. 203-208.
- [30] N. Holmberg, et al., *Transgenic tobacco expressing Vitreoscilla hemoglobin exhibits enhanced growth and altered metabolite production*, **Nature Biotechnology**, 15:3 (1997) p. 244-247.
- [31] P.T. Kallio, and J.E. Bailey, *Intracellular expression of Vitreoscilla hemoglobin (VHb) enhances total protein secretion and improves the production of alpha-amylase and neutral protease in Bacillus subtilis*, **Biotechnology Progress**, 12:1 (1996) p. 31-39.

- [32] K.M. Khleifat, et al., *Effects of carbon source and Vitreoscilla hemoglobin (VHb) on the production of beta-galactosidase in Enterobacter aerogenes*. **Current Microbiology**, 53: 4 (2006) p. 277-281.
- [33] M. Khosravi, D.A. Webster, and B.C. Stark, *Presence of the bacterial hemoglobin gene improves alpha-amylase production of a recombinant Escherichia coli strain*. **Plasmid**, 24:3 (1990) p. 190-194.
- [34] A.G. Kurt, et al., *Production of L-DOPA and dopamine in recombinant bacteria bearing the Vitreoscilla hemoglobin gene*, **Biotechnol J**, 4:7 (2000) p.1077-88.
- [35] Q. Liu, et al., *Microbial production of L-glutamate and L-glutamine by recombinant Corynebacterium glutamicum harboring Vitreoscilla hemoglobin gene vgb*, **Applied Microbiology and Biotechnology**, 77:6 (2008) p.1297-1304.
- [36] G. Priscila, et al., *Expression of the bacterial hemoglobin gene from vitreoscilla stercoraria increases rifamycin b production in amycolatopsis mediterranei*, **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 106:5 (2008) p. 493-497.
- [37] W.S. Shin, et al., *Enhanced production of itaconic acid by transformed fungal cells of Aspergillus terreus harboring Vitreoscilla hemoglobin gene*, **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 108: (2009) p. 123-123.
- [38] L.Tao, et al., *Expression of bacterial hemoglobin genes to improve astaxanthin production in a methanotrophic bacterium Methylomonas sp.*, **Applied Microbiology and Biotechnology**, 74: 3 (2007) p. 625-633.
- [39] J.M.Wu, T.A. Hsu, and C.K. Lee, *Expression of the gene coding for bacterial hemoglobin improves beta-galactosidase production in a recombinant Pichia pastoris*, **Biotechnology Letters**, 25: 17 (2003) p. 1457-1462.
- [40] S. Zelasco, et al., *Expression of the Vitreoscilla hemoglobin (VHb)-Encoding gene in transgenic white poplar: plant growth and biomass production, biochemical characterization and cell survival under submergence, oxidative and nitrosative stress conditions*, **Molecular Breeding**, 17:3 (2006) p. 201-216.
- [41] J. Handelsman, and W.J. Brill, *Erwinia herbicola isolates from alfalfa plants may play a role in nodulation of alfalfa by Rhizobium meliloti*, **Applied and Environmental Microbiology**, 49:4 (1985) p. 818-821.
- [42] S. Spaepen, J. Vanderleyden and R. Remans, *Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling*, **Fems Microbiology Reviews**, 31:4 (2007) p. 425-448.
- [43] S.R. Giddens, G.J. Houlston, and H.K. Mahanty, *The influence of antibiotic production and pre-emptive colonization on the population dynamics of Pantoea agglomerans (Erwinia herbicola) Eh1087 and Erwinia amylovora in planta*, **Environmental Microbiology**, 5:10 (2003) p. 1016-1021.
- [44] J. L. Vanneste, J. Yu and S.V. Beer, *Role of antibiotic production by Erwinia herbicola Eh252 in biological control of Erwinia amylovora*, **Journal of Bacteriology**, 174:9 (1992) p. 2785-2796.
- [45] S. Anderson, et al., *Production of 2-keto-l-gulonate, an intermediate in l-ascorbate synthesis, by a genetically modified Erwinia herbicola*, **Science**, 230:4722 (1985) p. 144-149.
- [46] S. Koul, et al., *Physical characterization of a glucose dehydrogenase-bearing plasmid from ketoacid-producing Erwinia herbicola*, **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 11:2 (1995) p. 234-235.
- [47] S.T. Liu, et al., *Cloning of an Erwinia herbicola gene necessary for gluconic acid production and enhanced mineral phosphate solubilization in Escherichia-Coli Hb101 - nucleotide-sequence and probable involvement in biosynthesis of*

- the coenzyme pyrroloquinoline quinone*, **Journal of Bacteriology**, 174:18 (1992) p. 5814-5819.
- [48] N. Sharma, and G.N. Qazi, *Inhibition of glucose-oxidation in Erwinia herbicola by a High-Concentration of Dissolved O₂*, **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 10:4 (1994) p. 393-395.
 - [49] S.R. Giddens, Y.J. Feng, and H.K. Mahanty, *Characterization of a novel phenazine antibiotic gene cluster in Erwinia herbicola Eh1087*, **Molecular Microbiology**, 45:3 (2002) p. 769-783.
 - [50] S.F. Brady, et al., *Pantocin B, an antibiotic from Erwinia herbicola discovered by heterologous expression of cloned genes*, **Journal of the American Chemical Society**, 121:50 (1999) p. 11912-11913.
 - [51] G. Winkelmann, R. Lupp, and G. Jung, *Herbiccolins: new peptide antibiotics from Erwinia herbicola*, **Journal of Antibiotics**, 33:4 (1980) p. 353-358.
 - [52] M.A. Elgoorani, F.M. Hassanein, and A.A. Shoeib, *Antibacterial and Antifungal Spectra of Antibiotics Produced by Different Strains of Erwinia-Herbicola (=Pantoea agglomerans)*, **Journal of Phytopathology-Phytopathologische Zeitschrift**, 136:4 (1992) p. 335-339.
 - [53] C.A. Ishimaru, E.J. Klos, and R.R. Brubaker, *Multiple antibiotic production by Erwinia herbicola*, **Phytopathology**, 78:6 (1988) p. 746-750.
 - [54] 54. M. Brandl, E.M. Clark, and S.E. Lindow, *Characterization of the indole-3 acetic acid (IAA) biosynthetic pathway in an epiphytic strain of Erwinia herbicola and IAA production in vitro*, **Canadian Journal of Microbiology**, 42:6 (1996) p. 586-592.
 - [55] M.T.Brandl, and S.E. Lindow, *Contribution of indole-3-acetic acid production to the epiphytic fitness of Erwinia herbicola*. **Applied and Environmental Microbiology**, 64:9 (1998) p. 3256-3263.
 - [56] M.T. Brandl, and S.E. Lindow, *Environmental signals modulate the expression of an indole-3-acetic acid biosynthetic gene in Erwinia herbicola*, **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 10:4 (1997) p. 499-505.
 - [57] M.T. Brandl, and S.E. Lindow, *Cloning and characterization of a locus encoding an indolepyruvate decarboxylase involved in indole-3-acetic acid synthesis in Erwinia herbicola*, **Applied and Environmental Microbiology**, 62:11 (1996) p. 4121-4128.
 - [58] S. Stijn, V. Jos, and R. Roseline, *Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling*, **FEMS Microbiol Rev**, (2000) p. 1-24.
 - [59] S. Manulis, , et al., *Differential involvement of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in pathogenicity and epiphytic fitness of Erwinia herbicola pv. gypsophylae*, **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 11:7 (1998) p. 634-642.
 - [60] F. Gürel and T. Şerbetçi, *Production of n-(3-oxo-hexanoyl)-l-homoserine lactones (ohhl) responsible for "quorum-sensing" In Pseudomonas syringae Pv. Savastanoi*, **Turkish Microbiological Society**, 39:3-4 (2009) p. 58-61.
 - [61] L. Chalupowicz, et al., *Regulatory Interactions Between Quorum-Sensing, Auxin, Cytokinin, and the Hrp Regulon in Relation to Gall Formation and Epiphytic Fitness of Pantoea agglomerans pv. gypsophylae*, **The American Phytopathological Society** 22:7(2009) p. 849–856.
 - [62] T. Kosque, M. G. Heskett, and E.E. Wilson, *Microbial Synthesis and Degradation of Indole-3-acetic Acid "The conversion of l-tryptophan to indole-3-acetamide by an enzyme system from Pseudomonas Savastanoi*, **The Journal of Biological Chemistry**, 241:16 (1966) p. 3738-3744.

- [63] S. Pollmann, et al., *Occurrence and formation of indole-3-acetamide in Arabidopsis thaliana*, **Planta Med**, 216: (2002) p. 155–161.
- [64] M. Piotrowski, S. Schonfelder, and E.W. Weiler, *The Arabidopsis thaliana isogene NIT4 and its orthologs in tobacco encode beta-cyano-L-alanine hydratase/nitrilase*, **J Biol Chem**, 276: (2000) p. 2616–2621.
- [65] S. Pollmann, D. Neu, and E.W. Weiler, *Molecular cloning and characterization of an amidase from Arabidopsis thaliana capable of converting indole-3-acetamide into the plant growth hormone, indole-3-acetic acid*, **Phytochemistry**, 63: (2003) p. 293–300.
- [66] S. Yang, et al., *Global effect of indole-3-acetic acid biosynthesis on multiple virulence factors of Erwinia chrysanthemi*, **Applied and Environmental Microbiology**, 73:4 (2007) p. 1079–1088.
- [67] S. Georg, M. Norihiko, and S. Gerhard, *Expression, purification and properties of Erwinia uredovora*, **Biochem. J.**, 315: (1996) p. 869–874
- [68] L.Y. Lee, and S.T. Liu, *Characterization of the Yellow-Pigment Genes of Erwinia-Herbicola*. **Molecular Microbiology**, 5:1 (1991) p. 217–224.
- [69] B.V. Gantotti and S.V. Beer, *Plasmid-borne determinants of pigmentation and thiamine prototrophy in Erwinia herbicola*, **Journal of Bacteriology**, 151:3 (1982) p. 1627–1629.
- [70] D. Iwata-Reuyl, et al., *Bacterial phytoene synthase: Molecular cloning, expression, and characterization of Erwinia herbicola phytoene synthase*. **Biochemistry**, 42:11 (2003) p. 3359–3365.
- [71] A.V. Raoa and R. L.G., *Carotenoids and human health*. *Pharmacological Research*, 55: (2007) p. 207–216.
- [72] J. Johnson, *Do carotenoids serve as transmembrane radical channels?* **Free Radic Biol & Med Free Radic Biol & Med** 47: (2009) p. 321–23.
- [73] M. Kahyaoğlu and M. Kıvanç, *Endüstriyel Atık Maddelerden Mikrobiyal Yolla Beta Karoten Üretimi*, **J. Agric. Sci.**, 17:2 (2007) p. 61–66.
- [74] O. Nrihoko, et al., *Elucidation of pathway the Erwinia uredovora carotenoid biosynthetic by functional analysis of gene products expressed in Escherichia coli*, **Journal of Bacteriology**, 172:12 (1990) p. 6704–6712.
- [75] P.C. Lee and C. Schmidt-Dannert, *Metabolic engineering towards biotechnological production of carotenoids in microorganisms*, **Appl Microbiol Biotechnol**, 60: (2002) p. 1–11.
- [76] C. Bremus, et al., *The use of microorganisms in l-ascorbic acid production*, **Journal of Biotechnology**, 124: (2006) p. 196–205.
- [77] S.M. Berstenhorsta, H.P. Hohmannb, and K.P. Stahmannc, *Vitamins and vitamin-like compounds: microbial production*, **Encyclopedia of Microbiology**, (2009) p. 549–561.
- [78] A. Berry, et al., *Vitamine C production in microorganisms and plants*, **Patent Application Publication**, (2002).
- [79] M. Greiner, and G. Winkelmann, *Fermentation and isolation of herbicolin A, a peptide antibiotic produced by Erwinia herbicola strain A 111*, **Appl Microbiol Biotechnol**, 34: (1991) p. 565–569.
- [80] W.L. Parker, et al., *A simple carbapenem produced by species of Serratia and Erwinia*, **J. Antibiotics**, 35: (1982) p. 653–660.
- [81] A.E. Sutton, and J. Clardy, *Synthesis and Biological Evaluation of Analogues of the Antibiotic Pantocin B*, **J. Am. Chem. Soc.**, 123: (2001) p. 9935–9946.

- [82] S.P.I. Leland, and A.P. Elizabeth, *Metabolism and function of phenazines in bacteria: impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes*, **Appl Microbiol Biotechnol** 86: (2010) p.1659-1670.
- [83] C.A. Whistler, and L.S. Pierson, *Repression of Phenazine Antibiotic Production in Pseudomonas aureofaciens Strain 30-84 by RpeA*, **Journal of Bacteriology**, 185:13 (2003) p. 3718–3725.
- [84] Z. Zhongge, and S. Pierson Leland , *A Second quorum-sensing system regulates cell surface properties but not phenazine antibiotic production in Pseudomonas aureofaciens*, **Applied and Enviromental Microbiology**, 67:9 (2001) p. 4305-4315.
- [85] R.B. Sykes, et al., *Monocyclic beta-lactam antibiotics produced by bacteria*. **Nature**, 291:5815 (1981) p. 489-491.
- [86] Aharonowitz, Y. and G. Cohen, *Penicillin and cephalosporin biosynthesis genes: structure, organization, regulation, and evolution*, **Annu. Rev. Microbiol.**, 46: (1992) p. 461-495.
- [87] T. Matsumoto, J. Kumazawa, and A. Nagayama, *Sensitivities to four carbapenems of bacteria isolated from patients with refractory complicated urinary tract infections and the detection of carbapenemase-producing Pseudomonas aeruginosa*, **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 38(2): (1996) p. 322-324.
- [88] G.P. Bodey, *Penicillins, monobactams, and carbapenems*, **Texas Heart Institute Journal**, 17:4 (1990)p. 315-329.
- [89] S.S. Jean, et al., *In vitro activities of doripenem and other carbapenems against clinically important bacteria isolated in intensive care units: nationwide data from the SMART Programme*, **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, 29:4 (2010) p. 471-475.
- [90] S. Bland, et al., *In-Vitro activity of carbapenems (biapenem, imipenem and meropenem) and some other antibiotics on anaerobic bacteria*, **Pathologie Biologie**, 43(4): (1995) p. 289-293.
- [91] S. Xytsas, et al., *Carbapenems and aminoglycosides susceptibility rates of frequently isolated Gram-negative bacteria from ICU patients*, **International Journal of Infectious Diseases**, 12: (2008) p. 41-42.
- [92] Chambers, S.T., *Carbapenems, monobactams and quinolones*, **New Zealand Medical Journal**, 102:860 (1989): p. 6-7.
- [93] N.M. Amin, *New Antibiotics - carbapenems, monobactams and quinolones*. **American Family Physician**, 38:4 (1988) p. 125-134.
- [94] C.Harold Neu, R. Novelli, and N.X. Chin, *In Vitro Activity and ,3-Lactamase Stability of a New Carbapenem, SM-7338*, **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, (1989) p. 1009-1018.
- [95] J.M. Williamson, et al., *Biosynthesis of the beta-lactam antibiotic, thienamycin, by streptomyces-cattleya*, **Journal of Biological Chemistry**, 260:8 (1985) p. 4637-4647.
- [96] W.C. Hellinger, and N.S. Brewer, *Carbapenems and monobactams: imipenem, meropenem, and aztreonam*. mayo clinic proceedings, 74:4 (1999) p. 420-434.
- [97] F.M. Kahan, et al., *Thienamycin - development of imipenem cilastatin*, **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 12: (1983) p. 1-35.

- [98] R.C. Moellering, G.M. Eliopoulos, and D.E. Sentochnik, *The carbapenems: new broad spectrum beta-lactam antibiotics*, **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 24: (1989) p. 1-7.
- [99] S.J. McGowan, et al., *Molecular genetics of carbapenem antibiotic biosynthesis*, **Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology**, 75:1-2 (1999) p. 135-141.
- [100] S. McGowan, et al., *Carbapenem antibiotic production in *Erwinia carotovora* is regulated by *CarR*, a homologue of the *LuxR* transcriptional activator*. **Micfobiology**, 141: (1995) p. 541-550.
- [101] H. Liu, et al., *A Simple and Rapid Determination of ATP, ADP and AMP Concentrations in Pericarp Tissue of Litchi Fruit by High Performance Liquid Chromatography*, **Food Technol. Biotechnol.** 44:4 (2006) p. 531-534.
- [102] H. Lodish, et al., *Molecular Cell Biology*, (2011) p. 479.
- [103] M.T. Madigan and J.M. Martinko, *Brock-Mikroorganizmaların Biyolojisi, Onbirinci Baskıdan Çeviri.*, 2010: p. 117.
- [104] N. Pollak, C.D. Olle, and M. Ziegler, *The power to reduce: pyridine nucleotides small molecules with a multitude of functions*, **Biochem. J.**, 402: (2007) p. 205-218.
- [105] S. Ghosh, et al., *NAD: A master regulator of transcription*, **Biochimica et Biophysica Acta**, (2010) p. 681-693.
- [106] Y. Zhou, et al., *Biotechnology: Determining the extremes of the cellular NAD(H) level by using an *Escherichia coli* NAD⁺ auxotrophic mutant*, **Appl. Environ. Microbiol.**, 77: (2011) p. 6133-6140.
- [107] S. Wakabayashi, H. Matsubara, and D.A. Webster, *Primary sequence of a dimeric bacterial haemoglobin from *Vitreoscilla**, **Nature**, 322:6078 (1986) p. 481-3.
- [108] A. Anand, et al., *Redox-mediated interactions of VHb (*Vitreoscilla* haemoglobin) with *OxyR*: novel regulation of VHb biosynthesis under oxidative stress*, **Biochemical Journal**, 426: (2010) p. 271-280.
- [109] Chi, P.Y., D.A. Webster, and B.C. Stark, *Vitreoscilla hemoglobin aids respiration under hypoxic conditions in its native host*. **Microbiol Res**, 164:3 (2009) p. 267-75.
- [110] T. Sanny, et al., *Engineering of ethanolic *E. coli* with the *Vitreoscilla* hemoglobin gene enhances ethanol production from both glucose and xylose.*, **Appl Microbiol Biotechnol**, 88: (2010) p. 1103-1112.
- [111] S.J. Boerman, and D.A. Webster, *Control of heme content in vitreoscilla by oxygen*, **Journal of General and Applied Microbiology**, 28:1 (1982) p. 35-43.
- [112] C. Khosla, and J.E. Bailey, *Evidence for partial export of vitreoscilla hemoglobin into the periplasmic space in *Escherichia coli* implications for protein function*, **Journal of Molecular Biology**, 210:1 (1989) p. 79-89.
- [113] T. Koskenkorva, A.D. Frey, and P.T. Kallio, *Characterization of heterologous hemoglobin and flavohemoglobin promoter regulation in *Escherichia coli**, **J. Biotechnol.**, 122 (2006) p. 161-175.
- [114] X. X. Wei and G.Q. Chen, *Applications of the VHb gene *vgb* for improved microbial fermentation processes*, **Methods Enzymol.**, 436: (2008) p. 273-87.
- [115] J.G. Yang, D.A. Webster, and B.C. Stark, *ArcA works with Fnr as a positive regulator of *Vitreoscilla* (bacterial) hemoglobin gene expression in *Escherichia coli**, **Microbiological Research**, 160:4 (2005) p. 405-415.

- [116] P.T. Kallio, et al., *Intracellular expression of vitreoscilla hemoglobin alters escherichia-coli energy-metabolism under oxygen-limited conditions*, **European Journal of Biochemistry**, 219:1-2 (1994) p. 201-208.
- [117] L. Zhang, et al., *Recent developments and future prospects of Vitreoscilla hemoglobin application in metabolic engineering*, **Biotechnology Advances**, 25:2 (2007) p. 123-136.
- [118] L. Bulow, V. Roos, and C.I.J. Andersson, *Gene expression profiling of Escherichia coli expressing double Vitreoscilla haemoglobin*, **Journal of Biotechnology**, 114:1-2 (2004) p. 107-120.
- [119] M. Y. Akbas, et al., *Further investigation of the mechanism of Vitreoscilla hemoglobin (VHb) protection from oxidative stress in Escherichia coli*, **Section Cellular and Molecular Biology**, 66:5 (2011) p. 735-740.
- [120] L. Bulow, et al., *The metabolic effects of native and transgenic hemoglobins on plants*, **Trends in Biotechnology**, 17:1 (1999) p. 21-24.
- [121] H. Kahraman, and H. Geckil, *Degradation of benzene, toluene and xylene by Pseudomonas aeruginosa engineered with the Vitreoscilla hemoglobin gene*, **Engineering in Life Sciences**, 5:4 (2005) p. 363-368.
- [122] M.U. Demirtas, , B. Stark, and K. Pagilla, *2-Chlorobenzoate biodegradation by recombinant Burkholderia cepacia under hypoxic conditions in a membrane bioreactor*. **Water Environ Res**, 77:5 (2005) p. 511-8.
- [123] M.U. Demirtas, B.C. Stark, and K. R. Pagilla, *Comparison of 2-chlorobenzoic acid biodegradation in a membrane bioreactor by B. cepacia and B. cepacia bearing the bacterial hemoglobin gene*, **Water Res**, 40:16 (2006) p. 3123-30.
- [124] K.M. Khleifat, M.M. Abboud, and A.H. Al-Mustafa, *Effect of Vitreoscilla hemoglobin gene (vgb) and metabolic inhibitors on cadmium uptake by the heterologous host Enterobacter aerogenes*, **Process Biochemistry**, 41:4 (2006) p. 930-934.
- [125] I. Dogan, et al., *Expression of Vitreoscilla hemoglobin in Gordonia amarae enhances biosurfactant production*, **J. Ind Microbiol Biotechnol**, 33:8 (2006) p. 693-700.
- [126] X. Xiong, et al., *Enhancement of biodesulfurization in two-liquid systems by heterogeneous expression of vitreoscilla hemoglobin*. **Appl Environ Microbiol**, 73:7 (2007) p. 2394-7.
- [127] S.P. Ouyang, et al., *Genetic engineering of Pseudomonas putida KT2442 for biotransformation of aromatic compounds to chiral cis-diols*, **Journal of Biotechnology**, 132:3 (2007) p. 246-250.
- [128] Li, H., et al., *Expression of Vitreoscilla hemoglobin gene in Pseudomonas delafieldii R-8 and its application to diesel desulfurization*, **Acta microbiologica Sinica**, 49:8 (2009) p. 1026-32.
- [129] B. Li , et al., *Cloning and expression of Vitreoscilla hemoglobin gene (vgb) in Penicillium chrysogenum*, **Zhongguo Kangshengsu Zazhi**, 31: (2006) p.400-402.
- [130] Y. Wu, et al., *Expression of Vitreoscilla hemoglobin gene in Saccharopolyspora erythraea and its effect on erythromycin production*, **Zhongguo Kangshengsu Zazhi**, 32: (2007) p. 599-601.
- [131] M.J. Lee, et al., *Combination strategy to increase cyclosporin A productivity by Tolypocladium niveum using random mutagenesis and protoplast transformation*, **J Microbiol Biotechnol**, 19:9 (2009) p. 869-72.

- [132] M. Li, et al., *Expression of Vitreoscilla hemoglobin enhances cell growth and dihydroxyacetone production in Gluconobacter oxydans*, **Curr Microbiol.**, 61:5 (2010) p. 370-5.
- [133] H. Zhu, S. Sun, and S. Zhang, *Enhanced production of total flavones and exopolysaccharides via Vitreoscilla hemoglobin biosynthesis in Phellinus igniarius*, **Bioresour Technol**, 102:2 (2011) p. 1747-51.
- [134] X.Y. Lu, et al., *Molecular cloning of polyhydroxyalkanoate synthesis operon from Aeromonas hydrophila and its expression in Escherichia coli*, **Biotechnol Prog**, 20:5 (2004) p. 1332-6.
- [135] L.J. Chien, et al., *Enhancement of cellulose pellicle production by constitutively expressing vitreoscilla hemoglobin in Acetobacter xylinum*, **Biotechnol Prog**, 22:6 (2006) p. 1598-603.
- [136] M.I. Setyawati, L.J. Chien, and C.K. Lee, *Expressing Vitreoscilla hemoglobin in statically cultured Acetobacter xylinum with reduced O₂ tension maximizes bacterial cellulose pellicle production*, **J Biotechnol.**, 132:1 (2007) p. 38-43.
- [137] Y.T. Horng, et al., *Enhanced polyhydroxybutyrate (PHB) production via the coexpressed phaCAB and vgb genes controlled by arabinose P promoter in Escherichia coli*, **Lett Appl Microbiol**, 50:2 (2010) p. 158-67.
- [138] D.H. Suthar, and B.B. Chattoo, *Expression of Vitreoscilla hemoglobin enhances growth and levels of alpha-amylase in Schwanniomyces occidentalis*. **Appl Microbiol Biotechnol**, 72:1 (2006) p. 94-102.
- [139] H. Geckil, et al., *Effect of Vitreoscilla hemoglobin on production of a chemotherapeutic enzyme, L-asparaginase, by Pseudomonas aeruginosa*, **Biotechnol J**, 1:2 (2006) p. 203-8.
- [140] F. Liang, et al., *Expression of Vitreoscilla hemoglobin in Bacillus thuringiensis improve the cell density and insecticidal crystal proteins yield*, **Appl Microbiol Biotechnol**, 74:2 (2007) p. 390-7.
- [141] L.J. Chien and C. Lee, *Enhanced hyaluronic acid production in Basillus subtilis by coexpressing bacterial hemoglobin*, **Biotechnol Prog**, 23: (2007) p. 1017-1022.
- [142] H. Chen, et al., *Intracellular expression of Vitreoscilla hemoglobin improves S-adenosylmethionine production in a recombinant Pichia pastoris*, **Appl Microbiol Biotechnol**, 74:6 (2007) p. 1205-12.
- [143] D. Kim, et al., *Enhancement of mussel adhesive protein production in Escherichia coli by co-expression of bacterial hemoglobin*. **Biotechnol Prog**, 24:3 (2008) p. 663-6.
- [144] Yu, H., et al., *[Fusion expression of D-amino acid oxidase from Trignoposis variabilis with maltose binding protein and Vitreoscilla hemoglobin*, **Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao**, 24:6 (2008) p. 1004-9.
- [145] Liu, Q., et al., *Microbial production of L -glutamate and L -glutamine by recombinant Corynebacterium glutamicum harboring Vitreoscilla hemoglobin gene vgb*, **Appl Microbiol Biotechnol**, 77:6 (2008) p. 1297-304.
- [146] Y. Su, et al., *Improved poly-gamma-glutamic acid production by chromosomal integration of the Vitreoscilla hemoglobin gene (vgb) in Bacillus subtilis*, **Bioresour Technol**, 101:12 (2010) p. 4733-6.
- [147] T. Sanny, et al., *Engineering of ethanolic E. coli with the Vitreoscilla hemoglobin gene enhances ethanol production from both glucose and xylose*, **Appl Microbiol Biotechnol**, 88:5 (2010) p. 1103-12.

- [148] M.X. Cao, et al., *engineering higher yield herbicide resistance in rice by Agrobacterium- mediated multiple gene transformation*, **Crop Sci**, 44: (2007) p. 2206-2213.
- [149] X. Li, et al., *Vitreoscilla hemoglobin overexpression increases submergence tolerance in cabbage*, **Plant Cell Rep**, 23:10-11 (2005) p. 710-5.
- [150] S. Zelasco, et al., *Expression of the Vitreoscilla hemoglobin (VHb) encoding gene in transgenic white poplar: plant growth and biomass production, biochemical characterization and cell survival under submergence, oxidative and nitrosative stress conditions*, **Mol Breed**, 17: (2006) p. 201-216.
- [151] Z. Wang, et al., *Functional expression of Vitreoscilla hemoglobin (VHb) in Arabidopsis relieves submergence, nitrosative, photooxidative stress and enhances antioxidants metabolism*, **Plant Sci**, 176: (2009) p. 66-77.
- [152] G.N. Qazi, N. Sharma, and R. Parshad, *Role of dissolved-oxygen as a regulator for the direct oxidation of glucose by Erwinia herbicola and gluconobacter- oxydans*, **Journal of Fermentation and Bioengineering**, 76:4 (1993) p. 336-339.
- [153] D.M. Kiick, and R.S. Phillips, *Mechanistic deductions from kinetic isotope effects and pH studies of pyridoxal-phosphate dependent carbon carbon lyases - Erwinia herbicola and Citrobacter freundii tryosine phenol lyase*, **Biochemistry**, 27:19 (1988) p. 7333-7338.
- [154] P. Liras, A. Rodriguez-Garcia, and J.F. Martin, *Evolution of the clusters of genes for beta-lactam antibiotics: a model for evolutive combinatorial assembly of new beta-lactams*, **Int Microbiol**, 1:4 (1998) p. 271-8.
- [155] W.L. Parker, et al., *A simple carbapenem produced by species of Serratia and Erwinia*, **Journal of Antibiotics**, 35:6 (1982) p. 653-660.
- [156] S.J. McGowan, et al., *Carbapenem antibiotic biosynthesis in Erwinia carotovora is regulated by physiological and genetic factors modulating the quorum sensing-dependent control pathway*, **Molecular Microbiology**, 55:2 (2005) p. 526-545.
- [157] S.J. McGowan, , et al., *Analysis of the carbapenem gene cluster of Erwinia carotovora: definition of the antibiotic biosynthetic genes and evidence for a novel beta-lactam resistance mechanism*, **Mol Microbiol**, 26:3 (1997) p. 545-56.
- [158] S. McGowan, et al., *Carbapenem antibiotic production in Erwinia carotovora is regulated by CarR, a homologue of the LuxR transcriptional activator*, **Microbiology**,. 141:3 (1995) p. 541-50.
- [159] . Manefield, et al., *Halogenated furanones from the red alga, Delisea pulchra, inhibit carbapenem antibiotic synthesis and exoenzyme virulence factor production in the phytopathogen Erwinia carotovora*, **Fems Microbiology Letters**, 205:1 (2001) p. 131-138.
- [160] D. Çavuşoğlu, *Çeşitli fiziksel ve çevresel faktörlerin erwinia carotovora subsp. carotovora'da karbapenem antibiyotiği sentezine etkilerinin incelenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, 2004.
- [161] O. Saleh, et al., *Aromatic prenylation in phenazine biosynthesis dihydrophenazine-1-carboxylate dimethylallyltransferase from streptomyces anulatus*, **Journal of Biological Chemistry**, 284:21 (2009) p. 14439-14447.
- [162] K. Kumaresan, et al., *Broad spectrum action of phenazine against active and dormant structures of fungal pathogens and root knot nematode*, **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, 38:1 (2005) p. 69-76.

- [163] W. Blankenfeldt, et al., *Structure and function of the phenazine biosynthetic protein PhzF from Pseudomonas fluorescens*, **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 101:47 (2004) p. 16431-16436.
- [164] N. Çetin, *Mikrobiyal yolla üretilen indol asetik asidin zeytin hasadında kullanılma olanakları*, Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, (2004).
- [165] T. M. Tien, M. H. Gaskins, and D. H. Hubbell, *Plant Growth Substances Produced by Azospirillum brasilense and Their Effect on the Growth of Pearl Millet (Pennisetum americanum L.)*, **Applied and Environmental Microbiology**, 37:5 (1979) p. 1016-1024.
- [166] F. Yürekli, H. Geckil, and F. Topçuoğlu, *The synthesis of indole-3-acetic acid by the industrially important white-rot fungus Lentinus sajor-caju under different culture conditions*, **Mycol. Res.**, 107:3 (2003) p. 305-309.
- [167] N. Misawa, and H. Shimada, *Metabolic engineering for the production of carotenoids in non-carotenogenic bacteria and yeasts*, **Journal of Biotechnology**, 59:3 (1998) p. 169-181.
- [168] G. I. Frengova, D. E. Simova, and D.M. Beshkova, *Carotenoid production by lactose-negative yeasts co-cultivated with lactic acid bacteria in whey ultrafiltrate*, **Z. Naturforsch.**, 58: (2003) p. 562-567.
- [169] M. Kahyaoğlu and M. Kivanç, *Endüstriyel Atık Maddelerden Mikrobiyal Yolla Beta Karoten Üretimi*. Tarım Bilimleri Dergisi, 17:2 (2007) p. 61-66.
- [170] E. Aksan, *Çeşitli mayalardan karotenoidlerin elde edilmesi ve sucukta renklendirici olarak kullanım olanaklarının araştırılması*, Doktora tezi, (2005).
- [171] S. Kajiwara, et al., *Expression of an exogenous isopentenyl diphosphate isomerase gene enhances isoprenoid biosynthesis in Escherichia coli*, **Biochem J**, 324:2 (1997) p. 421-6.
- [172] D. Pham Huy, L. Moachon, and J.P. Giroud, *Properties of nonsteroidal anti-inflammatory drugs*, **Inf Dent**, 70:26 (1988) p. 2423-8.
- [173] L. Zhang, et al., *Recent developments and future prospects of Vitreoscilla hemoglobin application in metabolic engineering*, **Biotechnol Adv**, 25:2 (2007) p. 123-36.
- [174] Y. Takada, N. Fukunaga, and S. Sasaki, *Na⁺ driven ATP synthesis of a psychrophilic marine bacterium, Vibrio sp. strain ABE-1*, **FEMS Microbiology Letters**, 82:2 (1991) p. 225-228.
- [175] R.L. Michael, D. Yves, and David P.C., *Role of NAD in Regulating the adhE Gene of Escherichia coli*, **Journal of Bacteriology**, 178:20 (1996) p. 6013-6018.
- [176] K.A. Armstrong, *Molecular cloning a laboratory manual maniat*, **J. Quarterly Review of Biology**, 58:2 (1983) p. 234-234.
- [177] H. Geçkil, *Effect of bacterial hemoglobin on microorganisms and butanediol production by Enterobacter aerogenes*, PhD Thesis, 1995.
- [178] S. Mannulis, et al., *Identification of a plasmid DNA probe for detection of strains of Erwinia herbicola pathogenic on Gypsophila paniculata*, **Phytopathology**, 81: (1991) p. 54-57.
- [179] A. Vasanthakumar and P.S. McManus, *Indole-3-acetic acid-producing bacteria are associated with cranberry stem gall*, **Phytopathology**, 94:11 (2004) p. 1164-1171.

- [180] J.H. J. Leveau and Steven E. Lindow, *Utilization of the Plant Hormone Indole-3-Acetic Acid for Growth by Pseudomonas putida Strain 1290*, **Applied and Environmental Microbiology**, 71:5 (2005) p. 2365–2371.
- [181] G. Catignani, *Simultaneous determination of retinol and α -tocopherol in serum of plazma by liquid chromatography*, **Clin Chem**, 29:14: (1983) p. 708-712.
- [182] M. Karatepe, et al., *Simultaneous determination of ascorbic acid and free malondialdehyde in human serum by HPLC/UV*, **LC-GC North America**, 22: (2004) p. 362-5.
- [183] W. Xie, *Determination of NAD⁺ and NADH level in a single cell under H₂O₂ stress by capillary electrophoresis*, Master Thesis, Iowa State University Ames, Iowa. 2008.
- [184] M.Gül, et al., *The beneficial effects of pentoxifylline on caerulein-induced acute pancreatitis in rats*, **Dig Dis Sci.**, 54:3 (2009) p. 555-63.
- [185] J.J. Bozda and L.D.Russel, *Electron Microscopy*,. 18-19, 1999.
- [186] Z.N.Wang, et al., *Functional expression of Vitreoscilla hemoglobin (VHb) in Arabidopsis relieves submergence, nitrosative, photo-oxidative stress and enhances antioxidants metabolism*, **Plant Science**, 176:1 (2009) p. 66-77.
- [187] I. S. Bilkay, Ş. Karakoç, and N. Aksöz, *Indole-3-acetic acid and gibberellic acid production in Aspergillus niger*, **Turk J Biol**, 34: (2010) p. 313-318.
- [188] S. Khamna, J. F. Peberdy, S. Lumyong, *Indole-3-acetic acid production by Streptomyces sp. isolated from some Thai medicinal plant rhizosphere soils*, **EurAsia J BioSci**, 4: (2010) p. 23-32.
- [189] J, H.G., et al., *Indole-3-acetic acid (IAA) production by Arthrobacter species isolated from Azolla*, **Journal of General Microbiology**, 138: (1992) p.377-381.
- [190] H. Geckil, S. Gencer, and M. Uckun, *Vitreoscilla hemoglobin expressing Enterobacter aerogenes and Pseudomonas aeruginosa respond differently to carbon catabolite and oxygen repression for production of L-asparaginase, an enzyme used in cancer therapy*, **Enzyme and Microbial Technology**, 35:2-3 (2004) p. 182-189.
- [191] C.D. Georgiou, and D.A. Webster, *Identification of b-cytochrome, c-cytochrome, and d-cytochrome in the membrane of Vitreoscilla*, **Archives of Microbiology**, 148:4 (1987) p. 328-333.
- [192] B. C. Stark, K. L. Dikshit, and K. R. Pagilla, *Recent advances in understanding the structure, function and biotechnological usefulness of the hemoglobin from the bacterium Vitreoscilla*, **Biotechnol Lett**, 33:9 (2011) p. 1705-1714.
- [193] N. Misawa and H.Shimada, *Metabolic engineering for the production of carotenoids in non-carotenogenic bacteria and yeasts*, **Journal of Biotechnology**, 59 (1998) p. 169-181.
- [194] S. Gencer, *Vitreoscilla hemoglobin geni klonlanmış Enterobacter aerogenes: bazı endüstriyel uygulamalar*, Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,, 2004.
- [195] Ş.Ö. Erenler, *L-asparaginaz geninin (ansB) farklı gram-negatif bakterilere klonlanması, izolasyonu ve ekspresyonu*, Doktora tezi, İnönü Üniversitesi, 2007.
- [196] IJ.B. Russell, and F. DiezGonzalez, *The effects of fermentation acids on bacterial growth*, **Advances in Microbial Physiology**, 39 (1998) p. 205-234.
- [197] P. Small, et al., *Acid and base resistance in Escherichia coli and Shigella flexneri role of rpos and growth Ph*, **Journal of Bacteriology**, 176:6 (1994) p. 1729-1737.

- [198] J.W. Foster, *Escherichia coli* acid resistance: Tales of an amateur acidophile, **Nature Reviews Microbiology**, 2:11 (2004) p. 898-907.
- [199] S.R. Giddens and D.C. Bean, *Investigations into the in vitro antimicrobial activity and mode of action of the phenazine antibiotic D-alanylgriseoluteic acid*, **International Journal of Antimicrobial Agents**, 29: (2007) p. 93-97.
- [200] E.T. Van Rij, et al., *Influence of environmental conditions on the production of phenazine-1-carboxamide by Pseudomonas chlororaphis PCL1391*, **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 17:5 (2004) p. 557-566.
- [201] H. Geckil, et al., *Genetic engineering of Enterobacter aerogenes with the Vitreoscilla hemoglobin gene: cell growth, survival, and antioxidant enzyme status under oxidative stress*, **Research in Microbiology**, 154:6 (2003) p. 425-431.
- [202] A.D. Özşahin, M. Dıǧrak, and Ö.E. Kıran, *Escherichia coli*'nin Beta-Laktam Grubu Antibiyotiklere Karşı Direnç Kazanmasının Araştırılması, **KSU Journal of Science and Engineering**, 8:2 (2005)
- [203] J. M. Simon, et al., *Carbapenem antibiotic biosynthesis in Erwinia carotovora is regulated by physiological and genetic factors modulating the quorum sensing-dependent control pathway*, **Molecular Microbiology**, 55:2 (2005) p.526-545.
- [204] S.E.Jensen and A.L. Demain, *In Genetics and biochemistry of antibiotic production*, **Leo C. Vinning and Colin Stuart (eds)**, 8: (1995) p. 239-268.
- [205] J.F. Martin, A. and Y. Anharonowitz, *Regulation of biosynthesis of β -lactam antibiotics. In Antibiotics containing the Beta-lactam Structure,.* **Demain and N. A. Solomon (eds)**, 7: (1983) p. 229-254.
- [206] R.Z. Chen, and J.E. Bailey, *Energetic Effect of Vitreoscilla Hemoglobin Expression in Escherichia-Coli - an Online P-31 Nmr and Saturation-Transfer Study*. **Biotechnology Progress**, 10:4 (1994) p. 360-364.
- [207] S. Aydin, *Menadione knocks out Vitreoscilla haemoglobin (VHb): the current evidence for the role of VHb in recombinant Escherichia coli*, **Biotechnology and Applied Biochemistry**, 38: (2003) p. 71-76.
- [208] C.A. Mason, and J.E. Bailey, *Effects of plasmid presence on growth and enzyme-activity of Escherichia coli Dh5-Alpha*, **Applied Microbiology and Biotechnology**, 32:1 (1989) p. 54-60.
- [209] S. Birnbaum, and J.E. Bailey, *Plasmid presence changes the relative levels of many host-cell proteins and ribosome components in recombinant Escherichia coli*, **Biotechnology and Bioengineering**, 37:8 (1991) p. 736-745.
- [210] L. Andersson, et al., *Impact of plasmid presence and induction on cellular responses in fed batch cultures of Escherichia coli*, **Journal of Biotechnology**, 46:3 (1996) p. 255-263.
- [211] P.S. Tsai, P.T. Kallio, and J.E. Bailey, *Fnr, a global transcriptional regulator of escherichia-coli, activates the vitreoscilla hemoglobin (vhb) promoter and intracellular vhb expression increases cytochrome-d promoter activity*, **Biotechnology Progress**, 11:3 (1995) p. 288-293.
- [212] S.O. Erenler, , et al., *Cloning and expression of the Vitreoscilla hemoglobin gene in Enterobacter aerogenes: Effect on cell growth and oxygen uptake*, **Applied Biochemistry and Microbiology**, 40:3 (2004) p. 241-248.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Aslı GİRAY KURT
Doğum Yeri ve Tarihi : Doğanşehir/ MALATYA - 01.09.1978

EĞİTİM DURUMU

İlkokul :Atatürk İlköğretim Okulu (Malatya, 1985–1990)
Ortaokul : Atatürk İlköğretim Okulu (Malatya,1990–1993)
Lise : Doğanşehir Lisesi (Malatya, 1993–1996)
Lisans : İnönü Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji
Bölümü, (Malatya, 1997–2001)
Yüksek Lisans : İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji
Anabilim Dalı, (Malatya, 2003–2007)
Doktora : İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji
Anabilim Dalı, (Malatya, 2007–2012)

YAYINLANMIŞ ESERLER

1. **Kurt AG**, Aytan E, Ozer U, Ates B and Geckil H. 2009. Production of L-DOPA and dopamine in bacteria bearing *Vitreoscilla* hemoglobin gene. **Biotechnology Journal** **4**: 1077-1088.
2. **Giray Kurt A.**, Geckil H., Proteini kristallere büyütme, Science in School, Issue 11, Ağustos 2010.
3. Celik V., Icen I., Pelle R., **Kurt AG**, Geckil H., A new candidate for antitubercular target: isolation, cloning and sequence analysis of gene encoding the enolase enzyme from *Theileria parva*, June 25-30, 2011, 36th FEBS Congress, Torino, ITALY.
4. Kahraman H, Aytan E, **Kurt AG**. Production of methionine γ - lyase in recombinant *Citrobacter freundii* bearing the hemoglobin gene. Korean Society for Biochemistry and Molecular Biology, 44(9): 590-594, 2011.
5. Aytan E, **Kurt AG**, Geckil H., *Vitreoscilla* hemoglobin geninin *Erwinia herbicola*'ya klonlanması ve L-DOPA üretimi üzerine etkisi. Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR, 3(9): 8-13, 2011

BİLİMSEL FAALİYETLER

1. **Giray Kurt A.**, Yiğit E., Beker Akbulut G., Callisto herbisitinin zea mays L. (mısır)'ın martha F1 kültür formunda total glutatyon, glutatyon redüktaz ve glutatyon-s-transferaz aktivitesi üzerine etkileri, VII. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi (2007, Malatya)
2. Ufuk Özer, **Aşlı Giray Kurt**, Emel Aytan, Hikmet Geçkil, L-DOPA ve Dopamin'in bakteriyel sentezi, 19. Ulusal Biyoloji Kongresi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, 23-27 Haziran 2008 Trabzon
3. Emel Aytan, **Aşlı Giray Kurt**, Hikmet Geçkil *Vitreoscilla* Hemoglobin Geninin *Erwinia herbicola*'ya Klonlanması ve L-DOPA Üretimi Üzerine Etkisi, 13-16 Aralık 2009, 16. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, Antalya
4. Hüseyin Kahraman, Emel Aytan, **Aşlı Giray Kurt**, Hikmet Geçkil, *Citrobacter freundii*'de *Vitreoscilla* hemoglobin geninin kemoterapotik bir enzim olan metiyonin γ -liyazın üretimine etkisi, 21-25 Haziran 2010, 20. Ulusal Biyoloji Kongresi, Denizli
5. Hikmet Geçkil, **Aşlı Giray Kurt**, Emel Aytan ve Özgür Yılmaz, Moleküler yaşam bilimlerinde Ph.D. derecesi için standartlar, 29-30 Mart 2012, FEBS Workshop on Biochemistry and Molecular Biology Education, İzmir
6. “Klinik Araştırmacı Eğitimi” sertifikası 17 Mart 2010, Malatya

7. “ I. Kök Hücre Kursu ve V. Kök Hücre Sempozyumu” sertifikası 25-26 Haziran 2010, Ankara
8. TS EN ISO/IEC 17025 Deney ve Kalibrasyon Laboratuvarlarının Yeterliliği İçin Genel Şartlar Eğitimi Sertifikası, 06-07 Mayıs 2011, Türk Standartları Enstitüsü Kalibrasyon Merkezi Başkanlığı.
9. Allelopati ve Bitkiler (Yüksek Lisans Semineri, 2006)
10. Astrobiyoloji: Çok Çok Uzaklardaki Canlılık, (Doktora semineri, 2008)
11. Faj görüntüleme yöntemiyle klonlama, (Doktora semineri, 2009)

PROJELER

1. Callisto herbisitinin *zea mays* L. (mısır)’ın martha F1 kültür formunda total glutatyon, glutatyon redüktazglutatyon-s-transferaz ve pigment içeriği üzerine etkileri **İ.Ü.A.F. 2004/ 12 Güz Projesi (Yüksek Lisans)**
2. *Vitreoscilla* hemoglobini ekspresyonu yapan bakterilerde L-DOPA ve dopamin üretimi, **(2007-2009) TÜBİTAK**
3. *Pseudomonas aeruginosa* ve rekombinantının üzerine ağır metal stresinin etkileri, **İ.Ü.BAP, (2010-2011)**
4. Bir kemoterapi enzimi olan metiyonin gama liyazın atık ortamında üretimi ve aktivite tayini, **İ.Ü.BAP, (2010-...)**
5. Yeni Selenofen Türevli Bileşiklerin Antitümöral özelliklerinin hücre kültür sisteminde araştırılması, **İ.Ü.BAP, (2011-...)**