Glutamil tRNA reduktaz geninin *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001’te heterologus ekspresyonu

**Özet**

Tıp, tarım ve biyoteknoloji alanlarında çok önemli uygulamaları olan 5-aminolevulinik asit (ALA) yüksek katma değerli bir üründür. Bu çalışmanın kapsamında *Rhodospirullum rubrum* dan elde edilen glutamil tRNA redüktaz geninin *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 te heterologus ekspresyonunu gerçekleştirilecektir. Böylece daha fazla 5-ALA üretimi hedeflenmiştir. Bunun için, *Rhodospirullum rubrum*’dan elde edilen glutamil tRNA redüktaz geni bir ekspresyon vektörüne klonlanarak *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001’e aktarıldı. Oluşan mutant suş 25.9 mg 5-ALA/g kuru hücre ağırlığı üretirken, yaban suş 12.4 mg 5-ALA/g kuru hücre ağırlığı üretmiştir. Sonuç olarak *R sphaeroides*’e gen aktarımı ile daha fazla 5-ALA üretilmiştir.

Anahtar Kelimeler: 5-Aminolevulinik asit, *Rhodospirullum rubrum*, Biyorafineri, Biyohidrojen, Melas

**Heterologous Expression of Glutamyl tRNA Reductase Gene In *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001**

**Abstract**

5-Aminolevulinic acid (ALA) having very important application areas in medicine, agriculture and biotechnology is a high value-added product. The scope of this study includes heterologous expression of glutamyl tRNA reductase gene from *Rhodospirullum rubrum* in *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001. Thus, more 5-ALA production was targetted. For this purpose, glutamyl tRNA reductase gene from *Rhodospirullum rubrum* was cloned into an expression vector and delivered to *R. sphaeroides*. The modified strain produced 25.9 mg 5-ALA/g dry cell weight (DCW) whereas wild type strain produced 12.4 mg 5-ALA/g DCW. As a result more 5-ALA production was achieved upon a gene transfer.

Key Words: 5-Aminolevulinic acid, *Rhodospirullum rubrum*, Biorefinery, Biohydrogen, Molasses

**1.** **Kısaltmalar ve Semboller**

|  |  |
| --- | --- |
| Fe-Hyd | : Demir hidrojenaz |
| Mo-N2ase | : Molibden içeren nitrojenaz |
| Ca | : Kalsiyum |
| Zn | : Çinko |

**2. Giriş**

5-Aminolevulinik asit (5-ALA) ya da 5-amino-4-oxo-pentanoik asit, porfirin, B12 vitamini ve klorofil gibi tetrapirollerin biyosentezinde prekürsör madde olarak kullanılmaktadır (Sasaki et al., 2002). Canlılarda ALA biyosentezi iki farklı yolakla gerçekleşmektedir: (1) Süksinil-CoA ve Glisin kullanılarak (Shemin pathway, C-4 yolağı) ve (2) glutamat kullanılarak (C-5 yolağı) (Miyachi et al., 1998; Kamiyama et al., 2000). Bu iki yolak Şekil 1’de gösterilmektedir. Ayrıca, genom dizi veritabanlarından elde edilen verilere göre C-5 yolağı enzimleri (Genleri) bulunan bazı bakteriler Tablo 1’de verilmektedir. 5-ALA’ nın kimyasal sentezi birçok karmaşık basamakları içermekte, yüksek maliyet gerektirmekte ve düşük verimle gerçekleşmektedir. Ancak *R. sphaeroides* gibi bazı fotosentetik bakterilerle daha düşük maliyetle ve verimli ALA üretimi mümkün olmaktadır ………………………......

**3. Materyal ve Metot**

*3.1. Mikroorganizma Temini ve Aktivasyonu*

*Rhodospirillum rubrum* (DSM 467, ATCC 11170), *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 (DSM 5864) ve çeşitli *E.coli* suşları laboratuvarımızda mevcuttur. ………………………….

*3.2. Glutamil-trna Redüktaz Geni İçeren Ekspresyon Vektörünün Tasarımı ve Bakteriye Aktarımı*

ALA üretimi Glutamil-tRNA redüktaz geni aktarılmış *R. sphaeroides* ile yapılacaktır. Bu nedenle öcelikle bu geni içeren ekspresyon vektörü tasarımlanıp bakteriye aktarılacaktır. …………………………………

**4. Araştırma Sonuçları ve Tartışma**

*4.1. Glutamil-tRNA Redüktaz Geninin Ekspresyon Vektörüne Klonlanması*

1453 bp uzunlugundaki glutamil-tRNA redüktaz geni ve regülatör gen bölgesi PZR başarılı bir şekilde çoğaltılmıştır………………….

*4.2. Mutant Suşla 5-ALA Üretimi*

Ekspresyon vektörünün *R. sphaeroides*’e konjugasyonla ile aktarılmasından sonra glutamil tRNA redüktaz geninin transkripsiyonu RT-PZR ile tespit edildi. Sonrasında, mutant suşun ürettiği ALA miktarının yaban tip suşun ürettiği miktara göre daha fazla olduğu bulunmuştur. Oluşan mutant suş 25.9 mg 5-ALA/g kuru hücre ağırlığı üretirken, yaban suş 12.4 mg 5-ALA/g kuru hücre ağırlığı üretmiştir…………………

……………………

…………………….

Sonuç olarak, yeni bir ALA üretim yolağı başarılı bir şekilde *R. sphaeroides*’te oluşturulmuştur. Böylece, yüksek miktarlarda ALA üretimi olanağı ortaya çıkmıştır. Bununla birlikte………………………………

**Teşekkür**

Bu çalışma 111T000 No’lu TÜBİTAK ve Selçuk Üniversitesi 110154 No’lu BAP projeleri ile desteklenmiştir.

**Kaynaklar**

Kamiyama H, Hotta Y, Tanaka T, Nishikawa S, Sasaki K (2000). Production of 5-aminolevulinic acid by a mutant strain of a photosynthetic bacterium. *Seibutsu Kogaku Kaishi* **78:** 48-55.

Miyachi N, Tanaka T, Nishikawa S, Takeya H, Hotta Y (1998). Preparation and chemical properties of 5-aminolevulinic acid and its derivatives. *Porphyrins* **7:** 342–347.

Sasaki K, Watanabe M, Tanaka T, Tanaka T (2002). Biosynthesis, biotechnological production and applications of 5- aminolevulinic acid. *Applied* *Microbiology and Biotechnology* **58:** 23-29.

**…………..**

**……….**

**ŞEKİLLER**



**Şekil 1. 5-ALA biyosentez yolakları.**

*The pathways of 5-ALA biosynthesis.*

**TABLOLAR**

**Tablo 1. Genom dizi veritabanlarından elde edilen verilere göre C-5 yolağı enzimleri (Genleri) bulunan bazı bakteriler.**

*The bacteria which have the enzymes (genes) of the C-5 pathway according to the genome databeses.*

|  |  |
| --- | --- |
|  | **C-5 Yolağı Enzimleri** |
| **Mikroorganizma** | **1.Glutamil-tRNA** **Sentetaz** | **2. Glutamil-tRNA** **redüktaz**  | **3. GSA amino transferaz**  |
| *R.sphaeroides 2.4.1* | Var | Yok | Var |
| *R. capsulatus* | Var | Yok | Var |
| *R. palustris BisB5* | Var | Yok | Var |
| *R. rubrum 11170* | Var | Var | Yok |
| *E.coli* | Var | Var | Var |
| *C.saccharolyticus* | Var | Var | Var |
| *C. glutamicum R* | Var | Var | Var |