

Vitreoscilla hemoglobin geni aktarılmış *Erwinia herbicola*'da indol-3-asetik asit (IAA) üretimi

Aslı Giray^{1*}, Hikmet Geçkil²

¹Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, Alanya, Türkiye

²İnönü Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Malatya, Türkiye

*Corresponding author : asli.giray@alanya.edu.tr
Orcid No: <https://orcid.org/0000-0002-5374-3727>

Received : 06/05/2020
Accepted : 24/12/2020

Abstract: Indole-3-acetic acid (IAA) is an important natural auxin hormone found in plants. IAA biosynthesis is a common condition among plant-related bacteria and there are different biosynthetic ways to produce this hormone. In this study was investigated the production of IAA in *E. herbicola* carrying the Vitreoscilla hemoglobin (VHb) gene. The effect of endogenous recombinant oxygen intake system on the production of IAA was studied for the first time. The production of IAA in the recombinant strain carrying the VHb gene (vgb+) in rich and poor medium was noted to be higher than in the wild and vgb- control strains. The recombinant strains had significantly higher oxygen uptake than the host. The highest IAA level was observed in the stationary phase cultures rich in L-tryptophan.

Keywords: *Erwinia herbicola*, vitreoscilla hemoglobin, Indol-3-acetic acid(IAA), recombinant DNA technology

Production of indole-3-acetic acid (IAA) using Erwinia herbicola with vitreoscilla hemoglobin gene transferred

Özet: İndol-3-asetik asit (IAA) bitkilerde bulunan önemli bir doğal oksin hormonudur. IAA biyosentezi, bitki ile ilişkili bakteriler arasında yaygın bulunan bir durum olup, bu hormonun üretimi için farklı biyosentetik yollar bulunmaktadır. Bu çalışmada, *Vitreoscilla* hemoglobinin (VHb) geni taşıyan rekombinat *Erwinia herbicola*'da IAA üretimi araştırılmıştır. *E. herbicola*'da bu şekilde endojen rekombinant bir oksijen alım sisteminin IAA üzerindeki etkisi ilk defa çalışılmıştır. VHb geni (vgb+) taşıyan rekombinant suşun zengin ve minimal besiyelerinde ürettiği IAA seviyelerinin yabancıl ve vgb- kontrol suşularından daha yüksek olduğu kaydedildi. Rekombinant suşların konakçıdan önemli derecede yüksek oksijen alımına sahip oldukları belirlendi. En yüksek IAA'nın seviyesi geç kültür fazında L-triptofan içeren kültürlerde saptandı.

Anahtar Kelimeler: *Erwinia herbicola*, Vitreoscilla hemoglobini, Indol-3-asetik asit (IAA), rekombinant DNA teknolojisi

© EJBCS. All rights reserved.

1. Giriş

Enterobacteriaceae familyasının bir üyesi olan *Erwinia herbicola* patojen olmayan, bitkilerin hava ile temas eden yüzeylerinde bulunan gram negatif bir bakteridir (Giddens ve ark., 2003; Handelsman ve ark., 1985; Spaepen ve ark., 2007). Ana metabolizması diğer birçok bakteriye benzese de, kendine özgü metabolik yolları ile L-DOPA, çeşitli antibiyotikler ve karotenoidler gibi çeşitli endüstrilerde kullanımı bulunan ürünleri sekonder metabolizmasının bir parçası olarak sentezleyen nadir bakterilerden biridir (Anderson ve ark., 1985; Koul ve ark., 1995). Bakterinin

diğer bir özelliği de önemli bir fitohormon olan indolasetik asiti (IAA, bir çeşit oksin) üretme özelliğidir (Spaepen ve ark., 2007; Brandl ve ark., 1996; Brandl ve Lindow, 1997; Brandl ve Lindow, 1998). IAA, bitki büyümesini teşvik eden bir hormon olup, sürekli üretimi oldukça önemlidir (Ozdal ve ark., 2017). Bakterinin bu hormonu, bitkinin mikrobiyal savunma stratejisini bypass etmek için kullandığı ileri sürülmekle birlikte, IAA'nın bir sinyal molekülü olarak davrandığı ve bakteri fizyolojisi üzerinde doğrudan etkili olduğu sanılmaktadır (Brandl ve ark., 1996; Spaepen ve ark., 2007). Günümüzde sadece yüksek

organizasyonlu bitkilerin değil fungusların, likenlerin, alglerin ve bakterilerin de indol-3-asetik asit (IAA) oluşturdukları saptanmıştır (Stijn ve ark., 2000). Toprak mikroflorası içinde yer alan pek çok mikroorganizma IAA oluşturma yeteneğine sahiptir. 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 (Manulis ve ark., 1998). *E. herbicola*'da IAA biyosentezinde, ortamdaki bakteri yoğunluğu ve quorum-sensing (QS) sinyal molekülleri arasında önemli bir korelasyon bulunduğu bildirilmiştir (Gurel ve Serbetci, 2009). IAA üreten bakteri ve bitkiler arasındaki etkileşimler bitki lehinde olan bir durumdur ve patojenezden fitostimülasyona kadar çeşitli sonuçlara yol açmaktadır. Bakteriyel IAA sentezinde triptofan temel bir öncüdür. 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 (Stijn ve ark., 2000; Ozdal ve ark., 2017). *E. herbicola* IAA üretiminde indol-3-asetamid (IAM) ve indol-3-pirüvat (IPyA) yolunu kullanmaktadır (Stijn ve ark., 2000).

Bu çalışmada Vhb/vgb sisteminin IAA üretimi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. *Vitreoscilla* hemoglobini (Vhb), bakteriyel orjinli bir hemoglobindir (Wakabayashi ve ark., 1986; Dikshit ve ark., 1988; Khosla ve Biley, 1989; Kroneck ve ark., 1991; Strohl ve ark., 1986). Bu proteinin esas fonksiyonunun düşük konsantrasyonlarda bulunan ekstraselüler oksijeni bağlayarak onu terminal solunum oksidazlarına vermek ve böylece hipoksik şartlarda hücre solunuma katkıda bulunduğu sanılmaktadır (Dikshit ve ark., 1988). *vgb* geni oksijenle negatif regüle olan bir promotora sahip olup, oksijen seviyesinin düşük olduğu (yaklaşık %2 O₂ içeren) ortamlarda genin ekspresyon düzeyi 50 kate varan oranlarda artmaktadır (Dikshit ve ark., 1989). 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 (Ates ve ark., 2006; Zelasco ve ark., 2006). Bu çalışmada, Vhb/*vgb* sisteminin IAA üretimi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bunun için, *Erwinia herbicola* ve onun *Vitreoscilla* hemoglobini (Vhb) geni klonlanmış suşu (*vgb*⁺) ile *vgb* içermeyen (*vgb*⁻) rekombinant suşları kullanılmıştır.

2. Materyal ve Method

2.1. Araştırmada Kullanılan Kimyasallar, Ayraçlar 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 H₂SO₄ ve FeCl₃ analitik saflık

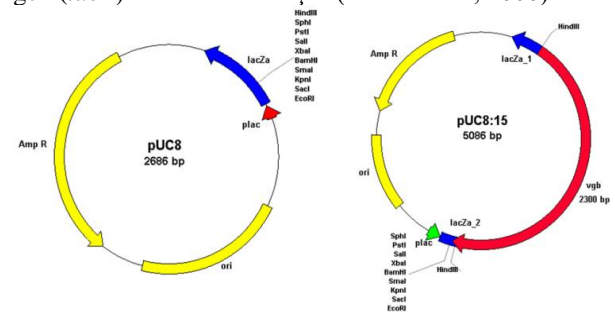
derecesinde olup Sigma şirketinden temin edildi. Bu çalışmada zengin besiyeri olarak Luria-Bertani (LB) (pH 7.0) besi ortamı kullanılırken, minimal besiyeri ortamı olarak sınırlı bir besinsel içeriğe sahip olan M9 kullanıldı. M9 ortamları düşük (%0.1) ve yüksek (%1) konsantrasyonda farklı karbon kaynağı (glukoz, fruktoz ve sükröz) ile desteklendi. Ayrıca M9 ortamlarında inkübasyon süresi 24 saat olarak belirlendi.

2.2. Kullanılan Bakteriler

Erwinia herbicola (NRRL B-3466), 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. *Erwinia herbicola*'nın *Vitreoscilla* hemoglobin geni (*vgb*) klonlanmış rekombinantı (*E. herbicola* [pUC8:15]) ve kontrol olarak da *vgb* rekombinant suşu (*E. herbicola* [pUC8]) tarafımızdan oluşturuldu.

2.3. *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 1). *E. herbicola*'nın *vgb*⁺ rekombinantının 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 (Kurt ve ark., 2000).



Şekil 1. pUC8 ve pUC8:15 plazmidlerinin fiziki haritası

2.4. *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 plazmidini içerdikleri kanıtlandı.

2.5. Plazmid izolasyonu

Kültürü yapılan *E. herbicola*'nın *vgb*⁺ ve *vgb*⁻ rekombinantlarından plazmid izolasyonu standart alkali-lizis yöntemi kullanılarak yapıldı (Armstrong, 1983; Kurt

ve ark., 2000). Bu yöntemle yaklaşık 1 µg plazmid DNA'sı ile 5.10^6 - 2.10^7 transformant elde edilebildiği saptanmıştır. Gece boyunca inkübasyonu yapılan kültürlerden 1.5 ml alınıp 10,000 rpm'de 3 dak santrifüj edildi. Pelet 100 µl soğuk *Çözelti I* (GTE) ile sulandırılıp 30 san vortekslenildi ve 5 dak oda sıcaklığında bekletildi. Taze olarak hazırlanmış 200 µl *Çözelti II* (NaOH/SDS) eklenip tüp alt-üst edildikten sonra 5 dak buz içinde bekletildi. Karışıma 150 µl oda sıcaklığındaki *Çözelti III* (potasyum asetat) eklendi ve tekrar vortekslenip 5 dak buzda bekletildi. Karışım 10,000 rpm'de +4 °C'de 3 dak santrifüj edildikten sonra süpernatant temiz bir tüpe aktarıldı ve 0.8 ml % 95 etanol eklenerek 2 dak oda sıcaklığında bekletildi ve santrifüj edildi. Peletin üzerine 1 ml % 70 etanol eklendi, sonra tekrar santrifüj edildi ve pelet inkübatörde 37 °C'de yarım saat kurumaya bırakıldı. Pelete 30 µl steril TE tamponu eklendi (Armstrong, 1983; Kurt ve ark., 2000).

2.6. 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. Agarozun jeldeki konsantrasyonu % 1.25 (w/v) olarak hazırlandı. Restriksiyon enzimi ile muamele görmüş plazmid DNA'sı ve HindIII restriksiyon enzimi ile önceden kesilmiş ve standart markır olarak kullanılan lambda (λ) DNA'sı uygun kuyucuklara yüklenerek jel elektroforezi sabit voltajda (70 Volt) 2 saat yürütüldü. Jeldeki DNA bantlaşma motifi UV ışık altında floresan ışık yayan etidyum bromür ile belirlendi ve elektroforetogramları yapıldı. Plazmidlerin restriksiyon bantlaşmasından istediğimiz DNA fragmanlarının bulunup bulunmadığı λ DNA'sının bilinen fragmanları ile oluşturulan standart eğriler yardımı ile tespit edildi (Armstrong, 1983; Kurt ve ark., 2000).

2.7. IAA üretimi

IAA'nın bakteriyel üretimi için zengin bir besiyeri olan LB (pH 7.0) ile bu ortamın % 0.1 ve % 0.5 triptofan (Mannulis ve ark., 1991) içeren formları kullanıldı. Ayrıca % 0.1 (düşük) ve % 1 (yüksek) konsantrasyonda farklı karbon kaynağının (glukoz, fruktoz ve sükroz) bulunduğu ve M9 ortamı kullanıldı. Kültürler belli zaman sürelerince inkübe edildikten sonra 1.5 ml'si santrifüj tüplerine transfer edildi ve 14,000 rpm'de +4 °C'de 5 dak santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen supernatantlardan 1'er ml alındı ve alüminyum folyo ile kaplanmış Eppendorf tüplerine konularak IAA tayini için spektrofotometrik ölçüm yapılabildi kadar +4 °C'de muhafaza edildi (Vasanthakumar ve McManus 2004).

2.8. IAA Tayini

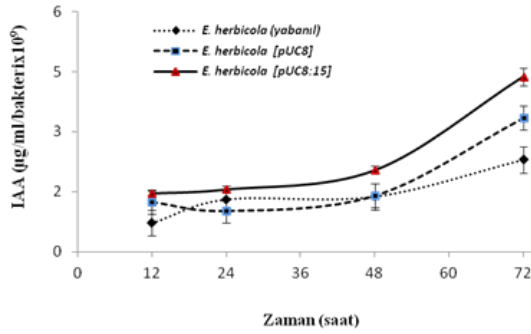
IAA'nın belirlenmesi yaygın olarak kullanılan Salkowsky reaksiyonu ile yapıldı. Salkowsky ayırıcı 150 ml konsantre H₂SO₄, 250 ml distile su ve 7.5 ml 0.5 M FeCl₃ solüsyonlarından oluşmaktadır (Vasanthakumar ve McManus 2004; Leveau ve Lindow, 2005). IAA tayini için, süpernatandan 1 ml alınarak üzerine 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 (Leveau ve Lindow, 2005).

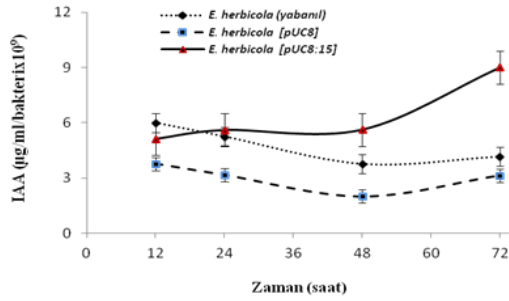
3. Bulgular

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 desteklenerek yapıldı. LB ortamında her üç suşun zamana bağlı olarak artan IAA üretim profili Şekil 2'de görülmektedir. IAA seviyesinin ilk örneklerin alındığı 12 saat kültürlerinde, son örneklerin alındığı 72 saat kültürlerine kadar tedricen arttığı belirlendi. 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. 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. Kültürlere % 0.1 oranında triptofan eklenmesinin IAA üzerindeki indükleyici etkisi sadece *vgb*⁺ suşunda görüldü. Bu suşta 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 suşta ise tersine IAA üretiminde genel olarak zamana bağlı bir düşüş gözlemlendi (Şekil 3). Tüm kültür periyotlarında *vgb*⁺ suşunun diğer iki suşa göre yaklaşık 3 kate varan yüksek IAA seviyelerine sahip olduğu belirlendi. 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). 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. 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. 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 5). Canlı hücre sayısı konakçı hücre kültürlerinde diğer iki suşa göre yaklaşık 5 kate varan oranlarda yüksek bulundu. Yüksek glukoz konsantrasyonu rekombinantların hücre sayısı üzerinde negatif bir etki yarattığı görüldü. Kültür ortamına fruktozun eklenmesi, konakçı ile rekombinantlar üzerinde farklı etki ile kendini gösterdi. 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 6). Sükrozu % 0.1 oranında içeren

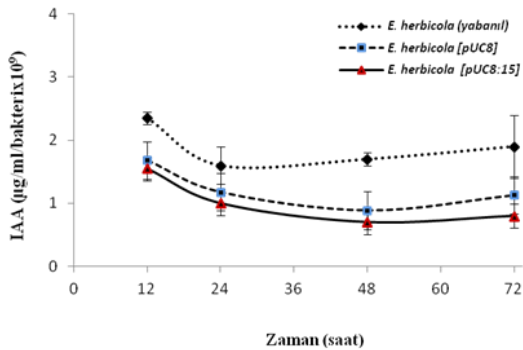
ortam ile kıyaslandığında, % 1 sükröz içeren ortamda IAA seviyesi konakçı, *vgb⁻* ve *vgb⁺* suşlarında sırası ile 3.5, 1.8 ve 5 kat daha fazla olduğu tespit edildi. En yüksek IAA seviyesi, *vgb⁻* suşunda görülürken, *vgb⁺* suşunun nispeten düşük bir IAA düzeyine sahip olduğu belirlendi (Şekil 7).



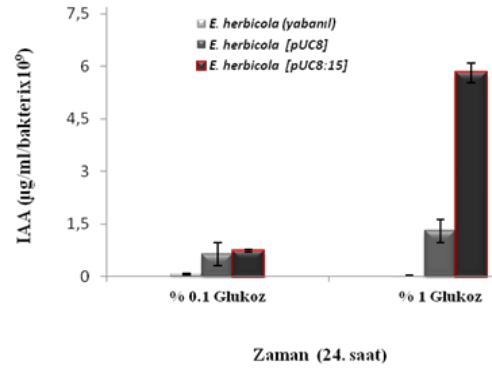
Şekil 2. LB ortamında IAA üretimi. Her veri noktası üç bağımsız deneyin ortalaması olup, hata çubukları standart hataları (σ_{n-1}) ifade etmektedir.



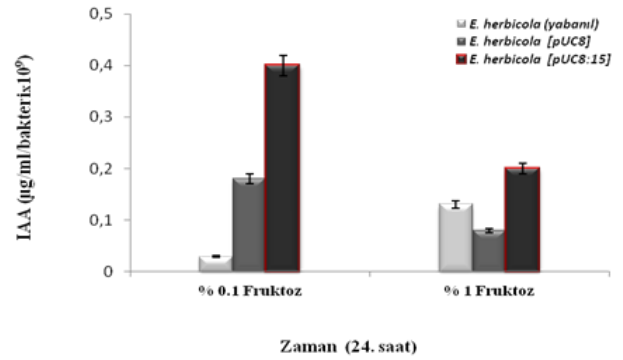
Şekil 3. Triptofan destekli LB ortamında IAA üretimi. Triptofan kültür ortamına 6. saatte % 0.1 oranında eklenmiştir. Her veri noktası üç bağımsız deneyin ortalaması olup, hata çubukları standart hataları (σ_{n-1}) ifade etmektedir.



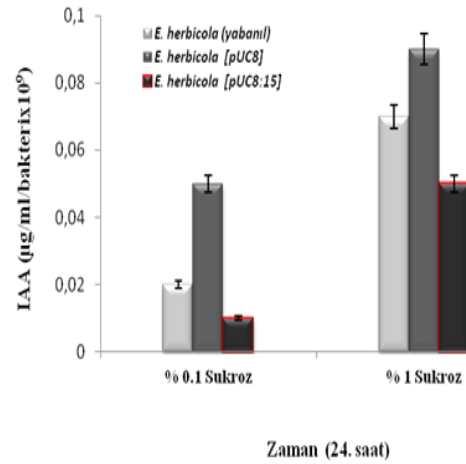
Şekil Hata! Belgede belirtilen stilde metne rastlanmadı.. Triptofan destekli LB ortamında IAA üretimi. Triptofan kültür ortamına 6. saatte % 0.5 oranında eklenmiştir. Her veri noktası üç bağımsız deneyin ortalaması olup, hata çubukları standart hataları (σ_{n-1}) ifade etmektedir



Şekil 5. 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



Şekil 6. 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.



Şekil 7. 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.

4. Tartışma

IAA'in VHB/vgb sistemini içeren rekombinant mikroorganizmalar kullanılarak üretimi ilk kez bu çalışmada araştırılmıştır. LB ortamında vgb⁺ rekombinantının genel olarak diğer her iki suştan da yüksek IAA seviyelerine sahip olduğu belirlendi. L-triptofanın, IAA oluşumunda öncül olup, IAA biyosentezinde rol oynayan enzim sistemlerini indüklediği bilinmektedir. Bu nedenle, L-triptofanın IAA üretimindeki rolünü ortaya koymak amacıyla LB ortamına bu amino asitin hem düşük (%0.1) hemde yüksek konsantrasyonda (%0.5) eklenmiştir. Düşük triptofan ortamında IAA üretiminde her üç suşta da genel bir artış görülürken, vgb⁺ rekombinantında kültür boyunca diğer iki suşa göre daha yüksek IAA üretimi sergilediği görülmüştür. LB ve düşük triptofan ortamlarında vgb⁺ suşunda IAA üretiminin özellikle 72 saat kültürlerinde diğer iki suşa göre yüksek olması, ortam oksijeni ile regüle olan böyle bir metabolitin yine hücrelere yüksek bir oksijen alım kapasitesi sunan VHB/vgb sisteminden pozitif yönde etkilendiği görülmüştür. Düşük triptofan ortamında, özellikle kültürün ilerleyen fazlarında düşük bir hücre yoğunluğu ile kendini gösteren vgb⁺ rekombinantının, yüksek IAA üretimi sergilemesi, hücre yoğunluğu ile IAA üretimi arasında önemli bir korelasyon olabileceğini işaret etmektedir. Ancak tersine, yüksek triptofan ortamında bu vgb⁺ rekombinantında IAA üretiminin oldukça baskılandığı görülmüştür. Bakteriyel IAA sentezinde triptofanın temel bir öncül olmasına rağmen, bu amino asitin yüksek konsantrasyonlarının IAA üretimini baskılamasının 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 oluşturmaktadır. Bu çalışmada, düşük ve yüksek konsantrasyonda glukoz, fruktoz ve sükrozun, IAA üretimini farklı düzeylerde etkilediği görülmüştür. Gerek düşük gerekse yüksek konsantrasyonda glukoz ve fruktoz ortamında vgb⁺ rekombinantı konakçıya göre daha yüksek IAA üretimi sergilerken, sükroz ortamında tersi bir durum sergilediği gözlenmiştir. Farklı kültür koşullarında vgb⁺ rekombinant suşunda en fazla IAA üretiminin 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 (Yürekli ve ark., 2003). Bu durum, bizim çalışmamızdaki bulgular ile örtüşmektedir.

5. Sonuç

Bu çalışmada *E. herbicola*, bu bakterinin pUC8 plazmid taşıyan (Eh[pUC8]) ve aynı plazmid üzerinde vgb geni taşıyan (Eh[pUC8:15]) rekombinant suşlarının IAA üretim karakteristikleri çalışıldı. 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 (Wang ve ark., 2009; Holmberg ve ark., 1997). 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.

Teşekkür

2011/10 nolu proje kapsamında bu çalışmayı destekleyen İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne ve vermiş olduğu her türlü desteğinden dolayı Doktora Tez Danışmanım Prof. Dr. Hikmet GEÇKİL'e teşekkür ederim.

Kaynaklar

- Armstrong KA. 1983. Molecular cloning a laboratory manual maniat. Q Rev Biol. 58(2):234-234.
- Ates B, Gencer S, Ozalp Erenler S, Geçkil H. 2006. Production of L-asparaginase, a chemotherapeutic enzyme, in bacteria expressing *Vitreoscilla* hemoglobin. Febs J. 273:139-139.
- Brandl M, Clark EM, Lindow SE. 1996. Characterization of the indole-3 acetic acid (IAA) biosynthetic pathway in an epiphytic strain of *Erwinia herbicola* and IAA production in vitro. Can J Microbiol. 42(6):586-592.
- Brandl MT, Lindow SE. 1997. Environmental signals modulate the expression of an indole-3-acetic acid biosynthetic gene in *Erwinia herbicola*. Mol Plant Microbe In 10(4):499-505
- Brandl MT, Lindow S. 1998. Contribution of indole-3-acetic acid production to the epiphytic fitness of *Erwinia herbicola*. Appl Environ Microbio. 64(9):3256-3263.
- Dikshit KL, Webster DA. 1988. Cloning, characterization and expression of the bacterial globin gene from *Vitreoscilla* in *Escherichia coli*. Gen. 70(2):377-386.
- Dikshit KL, Spaulding D, Braun A, Webster DA. 1989. Oxygen inhibition of globin gene-transcription and bacterial hemoglobin-synthesis in *Vitreoscilla*. J Gen Microbiol. 135:2601-2609.
- Giddens SR, Houliston GJ, Mahanty HK. 2003. The influence of antibiotic production and pre-emptive colonization on the population dynamics of *Pantoea agglomerans* (*Erwinia herbicola*) Eh1087 and *Erwinia amylovora* in plant. Environ Microbiol. 5(10):1016-1021.
- Gurel F, Serbetci T. 2009. Production of n-(3-oxo-hexanoyl)-l-homoserine lactones (ohhl) responsible for "quorum-sensing" In *Pseudomonas syringae* Pv. Savastanoi. Turk Microbiol Soc. 39(3):58-61.
- Handelsman J, Brill WJ. 1985. *Erwinia herbicola* isolates from alfalfa plants may play a role in nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. Appl Environ Microbiol. 49(4):818-821.

- Holmberg N, Lilius G, James E, Bailey B, Leif B. 1997. Transgenic tobacco expressing *Vitreoscilla* hemoglobin exhibits enhanced growth and altered metabolite production. *Nat Biotech.* 15(3):244-247.
- Khosla C, Bailey J. 1989. Characterization of the oxygen dependent promoter of the *Vitreoscilla* Hemoglobin gene in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 171(11):5995-6004.
- Koul S, Johri S, Verma V, Nabi Qazi G. 1995. Physical characterization of a glucose dehydrogenase-bearing plasmid from ketoacid-producing *Erwinia herbicola*. *World J Microb Biot.* 11(2):234-235.
- Kroneck PMH, Jakob W, Webster DA, DeMaio R. 1991. Studies on the bacterial hemoglobin from *Vitreoscilla*-redox properties and spectroscopic characterization of the different forms of the hemoprotein. *Biol Met.* 4(2):119-125.
- Kurt AG, Aytan E, Ozer U, Ates B, Geçkil H. 2009. Production of L-DOPA and dopamine in bacteria bearing *Vitreoscilla* hemoglobin gene. *Biotech J.* 4(7):1077-1088.
- Leveau JHJ, Lindow SE. 2005. Utilization of the Plant Hormone Indole-3-Acetic Acid for Growth by *Pseudomonas putida* Strain. *Appl Environ Microbiol.* 71(5):2365-2371.
- Manulis S, Gafni Y, Clark E, Zutra D, Ophir Y, Barash I. 1991. Identification of a plasmid DNA probe for detection of strains of *Erwinia herbicola* pathogenic on *Gypsophila paniculata*. *Phytopathol.* 81(1):54-57.
- Manulis S, Chesner AH, Brandl MT, Lindow SE, Barash I. 1998. Differential involvement of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in pathogenicity and epiphytic fitness of *Erwinia herbicola* pv. *gypsophila*. *Mol Plant Microbe In.* 11(7):634-642.
- Ozdam M, Ozdam OG, Sezen A, Algur OF, Kurbanoglu EB. 2017. Continuous production of indole-3-acetic acid by immobilized cells of *Arthrobacter agilis*. *Biotech.* 7:23.
- Spaepen S, Vanderleyden J, Remans R. 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *Fems Microbiol Rev.* 31(4):425-448.
- Stijn S, Jos V, Roseline R. 2000. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *Fems Microbiol Rev.* 1-24.
- Strohl WR, Schmidt TM, Lawry NH, Mezzino MJ, Larkin JM. 1986. Characterization of *Vitreoscilla*-*Beggiatoidea* and *Vitreoscilla*-*Filiformis* and comparison with *Vitreoscilla*-*Stercoraria* and *Beggiatoa*-*Alba*. *Int J Syst Bacteriol.* 36(2):302-313.
- Vasanthakumar A, McManus PS. 2004. Indole-3-acetic acid-producing bacteria are associated with cranberry stem gall. *Phytopathol.* 94(11): 164-1171.
- Yurekli F, Geçkil H, Topcuoglu F. 2003. 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): 305-309.
- Zelasco S, Reggi S, Calligari P, Balestrazzi A, Bongiorni C, Quattrini E, Delial G, Bisoffi S, Fogher C, Confalonieri M. 2006. 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(3):201-216.
- Wakabayashi S, Matsubara H, Webster DA. 1986. Primary Sequence of a Dimeric Bacterial Hemoglobin from *Vitreoscilla*. *Nat.* 322(6078):481-483.
- Wang ZN, Xiao Y, Wansheng C, Tanga K, Zhang L. 2009. Functional expression of *Vitreoscilla* hemoglobin (VHb) in *Arabidopsis* relieves submergence, nitrosative, photo-oxidative stress and enhances antioxidants metabolism. *Plant Sci.* 176(1): 66-77.