

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

**REKOMBİNANT ALDO/KETO REDÜKTAZ VE
GLUKOZ DEHİDROGENAZ TEMELLİ ENZİMATİK
KOFAKTÖR REJENERASYON SİSTEMLERİNİN
TASARLANMASI KİRALALKOLLERİN ELDESİNE
YÖNELİK UYGULAMALAR**

Taylan Kurtuluş ÖZTÜRK

Danışman : Prof. Dr. Ali KILINÇ

Biyokimya Anabilim Dalı
Biyokimya Doktora Programı

İzmir
2019

Taylan Kurtuluş ÖZTÜRK tarafından Doktora tezi olarak sunulan “**Rekombinant Aldo/Keto Redüktaz ve Glukoz Dehidrogenaz Temelli Enzimatik Kofaktör Rejenerasyon Sistemlerinin Tasarlanması Kiral Alkollerin Eldesine Yönelik Uygulamalar**” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve **5 Mart 2019** tarihinde saat 13:00’da yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

Jüri Başkanı

: Prof. Dr. Ali KILINÇ

İmza


Raportör Üye

: Prof. Dr. Figen ZİHNİOĞLU



Üye

: Prof. Dr. Şenol ALPAT



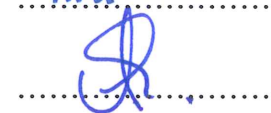
Üye

: Doç. Dr. Serap EVRAN



Üye

: Doç. Dr. Ayşe DİNÇER



EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI**

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi / Doktora Tezi olarak sunduğum “Rekombinant Aldo/Keto Redüktaz ve Glukoz Dehidrogenaz Temelli Enzimatik Kofaktör Rejenerasyon Sistemlerinin Tasarlanması Kiral Alkollerin Eldesine Yönelik Uygulamalar” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

28 / 12 / 2018



Taylan Kurtuluş ÖZTÜRK

ÖZET

REKOMBİNANT ALDO/KETO REDÜKTAZ VE GLUKOZ DEHİDROGENAZ TEMELLİ ENZİMATİK KOFAKTÖR REJENERASYON SİSTEMLERİNİN TASARLANMASI KİRAL ALKOLLERİN ELDESİNE YÖNELİK UYGULAMALAR

ÖZTÜRK, Taylan Kurtuluş
Doktora Tezi, Biyokimya Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ali KILINÇ
Mart 2019, 86 sayfa

İndirgenme reaksiyonlarını katalizleyen ketoredüktazlar (KRED) enantiyoselektif yeşil kimya alanında ilgi uyandırmaktadır. kofaktör bağımlı KRED enzimleri kiral alkollerin sentezinde çok sayıda aromatik ve alifatik prokiral ketonun stereoseçimli olarak indirger. Kiral bileşikler saf kiral bileşiklerin sentezinde başlangıç maddesi olarak değerlidir. KRED enzimlerinin en önemli özelliği NADPH bağımlı olmalarıdır. İndirgenmiş NADPH'nın yüksek maliyeti ve stokiyometrik miktarlarda gerekliliği, enantiyomerik saflıkta ürünlerin elde edilmesi, kofaktör rejenerasyon sistemlerinin birlikte kullanımını zorunlu kılmaktadır.

Bu amaçla Glukoz dehidrojenaz (GDH; NAD(P)H bağımlı) enzimatik kofaktör rejenerasyon sistemi olarak endüstriyel sistemlerde kullanılmaktadır. Endüstriyel bakışla immobilize enzimlerin rağbet görmesinin sebebi, verimlilik ve stabilitelerinin serbest enzimlere kıyasla çok daha yüksek olmasıdır. Bu araştırma projesi kapsamında NADPH bağımlı aldo/keto-redüktaz (EC: 1.1.1.2") ve NADPH rejenerasyonu için, glukoz-1-dehidrojenaz (EC: 1.1.1.47") enzimlerine ait gen bölgeleri *B. subtilis* 168'ten başarıyla klonlanarak *E.coli* BL21 hücrelerinde üretildi, saflaştırıldı ve kiral katalizlerde karakterize edildi. Endüstriyel bakış açısıyla immobilize enzimler verimlilikleri ve stabiliteleri nedeniyle serbest enzimlere tercih edilmektedir. Bu tez kapsamında KRED ve GDH enzimlerinin immobilize elde edilebilmesi amacıyla, doğal fonksiyonu silika biyomineralizasyonu katalizlemek olan R5 peptid dizisini taşıyan füzyon enzimleri, KRED-R5 ve GDH-R5 tasarlandı. Böylelikle, R5 peptid dizisinin doğal yeteneği olan biyometetik silika mineralizasyon, enzimlere başarıyla transfer edildi. R5 füzyon proteinleri kullanılarak, nano yapıli silika matris içerisine yüksek verimlilikle immobilizasyonları gerçekleştirildi. İmmobilize KRED ve GDH enzim sistemi asetofenon ve etil piruvattan ($e_p > 99$) saflıkta kiral alkollerin sentezinde etkin biçimde kullanılabildiği gösterildi.

Anahtar Kelimeler: Ketoredüktaz, Glukoz dehidrojenaz, Kofaktör rejenerasyonu, Biyosilika immobilizasyon, Kiral Alkoller.



ABSTRACT

DESIGNING RECOMBINANT ALDO/KETO REDUCTASE AND GLUCOSE DEHYDROGENASE BASED ENZYMATIC COFACTOR REGENERATION SYSTEMS APPLICATIONS FOR THE SYNTHESIS OF CHIRAL ALCOHOLS

ÖZTÜRK, Taylan Kurtuluş

PhD in Biochemistry, Supervisor: Prof. Dr. Ali KILINÇ

March 2019, 86 pages

Ketoreductases (KREDs) capable of catalyzing reduction reactions are of special interest across the field of enantioselective green reactions. For the synthesis of chiral alcohols, cofactor dependent KREDs reduce broad range of prochiral aromatic and aliphatic ketones stereoselectively. An important characteristic of KREDs is their dependence on $\text{NADPH} + \text{H}^+$ as cofactor. Given the high cost of expensive NADPH stoichiometric necessity for reduction reactions, a suitable cofactor regeneration method has to be combined for the production of enantiomerically pure compounds.

Whit this purpose Glucose dehydrogenases (GDH; accept NAD(P)H as cofactor) used for the enzymatic regeneration of NAD(P)H cofactors in industry. Within the scope of the thesis, glucose dehydrogenase (EC: 1.1.1.47) as a cofactor recycling enzyme and NADPH dependent aldo/ketoreductase (EC: 1.1.1.2) coding genes were successfully isolated, cloned and expressed in the *Escherichia coli* BL21 from *Bacillus subtilis* 168 and coupled for chiral synthesis. From an industrial point of view, immobilized enzymes find approval in contrast with free enzyme due to their efficiency and stability. This doctorate study was also aimed at immobilization of these enzymes, which involved the construction of recombinant fusion proteins between R5 peptide has a natural ability to catalyse silicate bio. R5 peptide transfers the natural characteristics of biomimetic silica mineralization to a desired enzyme. Furthermore, purified and characterized fusion proteins (KRED-R5 and GDH-R5) and their immobilization in biosilica successfully achieved. Not only the encapsulation but also the activity yield was high ranging over 90% after immobilization with R5 fusion for both enzymes. Immobilized KRED/GDH system exhibited excellent enantioselectivity (>99% ee) in the reduction acetophenon and ethyl pyruvate ester.

Keywords: Ketoreductase, Glucose dehydrogenase, Bio-silica encapsulation, Kofactor regeneration, Chiral alcohols.



ÖNSÖZ

“Sevgi, çalışma ve bilgi yaşamımızın tükenmez kaynaklarıdır. Yaşamı onların yönetmesi de gerekir.”

Wilhelm Reich



İzmir-05/04/2019

Taylan Kurtuluş ÖZTÜRK



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ	xi
ŞEKİL DİZİNİ.....	xviii
ÇİZELGE DİZİNİ	xx
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİN	xxi
1. GİRİŞ.....	1
1.1. BİYOMİNARİLİZASYON VE BİYOSİLİKA	2
1.2. BİYOSİLİKA VE ENZİM İMMOBİLİZASYONU.....	5
1.3. BİYOKATALİZ.....	6
1.1.1 Biyokatalitik keton reaksiyonları.....	10
1.1.2 Kiral alkollerin üretimi	12
1.1.3 Prokiral ketonların izole enzimler ile indirgenmesi.....	14
1.1.4 Üretimi nzimatik kofaktör rejenerasyonu	16
1.2 PROTEİN MÜHENDİSLİĞİ	23

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

1.3	ENZİM İMMOBİLİZASYONU	25
1.3.1	Enzim immobilizasyon yöntemleri	27
1.3.2	Nanopartiküller ve immobilizasyon	30
1.3.3	Biyosilika immobilizasyonu.....	31
2.	MATERYAL VE YÖNTEM	35
2.1.	BAKTERİLER	35
2.2.	PET-24A(+) VEKTÖRÜ	35
2.3.	PET-21A(+) VEKTÖRÜ	36
2.4.	PCR PRİMERLERİ.....	36
2.5.	KİTLER VE SARF MALZEMELER	37
2.6.	ENZİMLER.....	37
2.7.	KİMYASALLAR.....	38
2.8.	MİKROBİYOLOJİK BÜYÜME ORTAMLARI	38
2.9.	TAMPONLAR VE ÇÖZELTİLER	39
3.	METODLAR	41
3.1.	MİKROBİYOLOJİK YÖNTEMLER	41
3.1.1.	E. Coli Hücrelerinin İnkübasyon Ve Saklama Koşulları	41

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.1.2. Kimyasal kompetent E. coli hazırlanması ve transformasyon.....	41
3.2. MOLEKÜLER TENİKLER.....	42
3.2.1. Plazmid DNA İzolasyonu	42
3.2.2. Genomik DNA İzolasyonu	42
3.2.3. PCR reaksiyonu	43
3.2.4. DNA'nın Restriksiyon Endonükleazlarla Kesimi.....	43
3.2.5. Ligasyon.....	44
3.2.6. Koloni PCR.....	44
3.2.7. Agaroz jel elektroforezi	45
3.2.8. DNA dizi analizi	45
3.3. REKOMBİNANT PROTEİN ÜRETİMİ VE SAFLAŞTIRILMASI.....	45
3.4. METAL AFİNİTE KROMOTOGRAFI İLE ENZİMLERİN SAFLAŞTIRILMASI	46
3.5. POLİAKRİLAMİD JEL ELEKTROFOREZİ (SDS-PAGE).....	47
3.6. ENZİM AKTİVİTE ÖLÇÜMLERİ	47
3.6.1. Glukoz-1-Dehidrojenaz aktivitesi.....	47
3.6.2. Ketoredüktaz aktivitesi	47
3.6.3. Kiral gaz kromatografisi	48

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.7. ENZİMATİK KOFAKTÖR REJENERASYONU İLE AKTİVİTE ÖLÇÜMÜ	49
3.8. pH VE SICAKLIĞIN ETKİSİ	49
3.9. BİYOSİLİKA İMMOBİLİZASYON	49
3.9.1. Gdh-R5 immobilizasyonu	49
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	51
4.1. KLONLAMA ÇALIŞMALARI.....	53
4.1.1. R5 GEN DİZİSİNİN KLONLANMASI.....	53
4.1.2. GDH KLONLARININ ELDE EDİLMESİ	54
4.1.3. KETON REDÜKTAZ KLONLARININ ELDESİ	55
4.2. Enzim Üretimi ve Saflaştırma	56
4.2.1. Glukoz Dehidrojenaz.....	56
4.2.1.1. GdH Enziminin Afinite Saflaştırılması.....	57
4.2.2. GDH-R5 FÜZYONU.....	58
4.2.2.1. GdH-R5 Enziminin Afinite Saflaştırılması.....	58
4.2.3. Keton Redüktaz	60
4.2.3.1. KreD ekspresyonu.....	60
4.2.3.2. KreD Afinite saflaştırılması.....	60

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

4.2.4. KreD Karakterizasyonu	61
4.3. İMMOBİLİZE KOFAKTÖR REJENERASYON SİSTEMİ TASARIMI	62
4.3.1. GdH-R5 İMMOBİLİZASYONU	64
4.3.2. GdH-R5 VE KRED'İN BİRLİKTE İMMOBİLİZASYONU	64
4.4. KOFAKTÖR REJENERASYONU VE KİRAL BİYOKATALİZ	65
4.4.1. SERBEST ENZİM ÇİFTİ İLE KİRAL BİYOKATALİZ	65
4.4.2. İMMOBİLİZE ENZİM ÇİFTİ İLE BİYOKATALİZ	68
5. TARTIŞMA	69
KAYNAKLAR DİZİNİ	70
TEŞEKKÜRLER	83
ÖZGEÇMİŞ	84
EKLER	

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil	Sayfa
1.1. Farklı diatom türlerine ait hücre duvarlarının taramalı elektron mikroskopisi görüntüleri (Kröger 2007). a) <i>Cylindrotheca fusiformis</i> ; b,c) <i>Coscinodiscus asteromphalus</i> ; d,e) <i>Thalassiosira pseudonana</i>	3
1.2 <i>Cylindrotheca fusiformis</i> 'teki Silaffin 1A ₁ yapısının ve modifikasyonların şematik gösterimi (Schroder, Brandt vd. 2007).	4
1.3. Doğal silaffin peptidi yapısında bulunan poliamin grupları tarafından silisik asidin polimerizasyonu (Coradin and Lopez 2003).	5
1.4. Silikatein kataliz mekanizması ve silisik asit kondenzasyonu.	5
1.5. Biyokatalizör kullanımı.	7
1.6. Canlı hücreler ile kiral biyokatalize endüstriyel üretim örnekleri.	8
1.7. Penisilin türevlerinin sentezinde kimyasal ve enzimatik sentez karşılaştırılması.	9
1.8. Alkol dehidrojenaz-glukoz dehidrojenaz kofaktör rejenerasyon sistemi.	11
1.9. Karbonil redüktaz enzimi ile prokiral ketonların indirgenmesi	14
1.10. Enzimatik kofaktör rejenerasyon sistemleri a) çift enzim çift substrat sistemi, b) çift substrat tek enzim sistemi.	19
1.11 Substrat çifti ile kofaktör rejenerasyonu,	22
1.12 İmmobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması (Karlheinz ve Herbert, 2002).	27

ŞEKİL DİZİNİ (devam)ŞekilSayfa

1.13. Protein moleküllerinin biyomimetik silika immobilizasyonu.	32
1.14. Enzim immobilizasyonu a) PEG Kuyruk ile Sarılı Enzim b) Silika Yüzeyle Bağlanmış Enzim c) Biyosilika Nanokafese Hapsedilmiş Enzim.	34
2.1. pET-24a(+) vektörü. Polilinker bölgesinde restriksiyon enzim kesim bölgeleri şematize edilmiştir.	36
3.1. Etil piruvatın ve asetofenonun enzimatik oksidasyonu sonucu oluşan kiral ürünler.	48

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Yeşil kimyanın temel ilkeleri (Anastas and Warner 1998).....	2
1.2. Çeşitli immobilizasyon yöntemlerinin karşılaştırılması (KarlheinzveHerbert, 2002).....	28
2.1. Glukoz dehidrojenaz ve keton redüktaz enzimlerinin klonlanmasında kullanılan primerler.	37

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
C	Derişim (Molar)
<u>Kısaltmalar</u>	
GdH	Glukoz dehidrojenaz (B. Subtillis)
KreD	Keton redüktaz (B. Subtillis)
R5	Biyosilisifikasyon Peptid Dizisi



1. GİRİŞ

Moleküler biyoloji ve protein mühendisliği yöntemlerindeki teknolojik gelişim, enzimlerin yeteneklerinin ve kullanım alanlarının sayısını hızla arttırmıştır. Rekombinant teknolojinin olanaklarıyla yeniden tasarlanabilen ve endüstriyel ölçeklerde üretilebilen enzimlerin doğal reaksiyonlarının dışında yeni ve sentetik reaksiyonlarda da sürdürülebilir katalizörler oldukları anlaşılmıştır. Enzimler genellikle yüksek spesifiklik ve ürün saflığı gerektiren süreçlerde kimyasal katalizörler yerine kullanılmaktadır. Biyokataliz, organik bileşiklerin sentezi için doğal ve biyolojik katalizörlerin kullanılmasıdır.

Biyokatalizörler, çok sayıda aktif farmasötik bileşiğin endüstriyel sentezlerinde başarıyla kullanılmaktadır (Sheldon and Woodley 2018). Protein mühendisliği ile sentetik reaksiyonlar için enzimler tasarlanırken, enzim immobilizasyonu ile daha iyi performans ve stabilite gibi sorunlarının aşılması amaçlanmaktadır (Hanefeld, Gardossi et al. 2009, Moehlenbrock and Minter 2017). İmmobilize biyokatalizörlerin reaksiyonlarda defalarca kullanılabilir olması, değerli organik bileşiklerin sentezinde enzimlerin ticari uygulama şansı bulmalarına olanak vermektedir (Madhavan, Sindhu et al. 2017, Sheldon and Brady 2018). Enzimler tarafından gerçekleştirilen reaksiyonlar, kimyasal kataliz yöntemlerine kıyasla daha yeşil ve sürdürülebilir yöntemler olarak değerlendirilmelidir.

Yeşil kimya, 1998 yılında Anastas ve Warner tarafından zehirli maddelerin kullanımını ve oluşumunu azaltmak veya elimine etmek için kimyasal ürün ve süreçlerin tasarlanması olarak tanımlanmıştır (Anastas and Warner 2000). Yeşil kimya konsepti Tablo 1.1’de sıralanan oniki ilke ile tanımlanabilir ve kimyasal süreçlerin temiz ve sürdürülebilir olması için yol haritası niteliğindedir.

Tablo 1.1. Yeşil kimyanın temel ilkeleri (Anastas and Warner 1998).

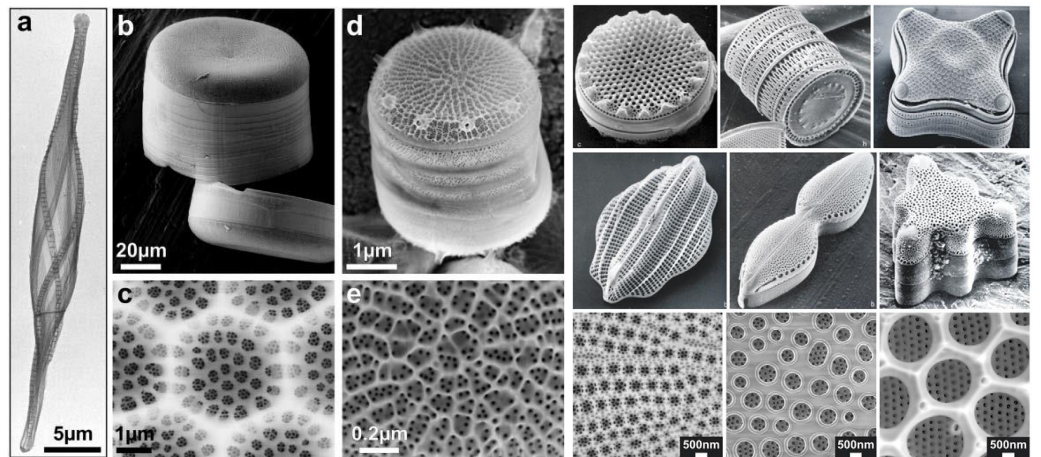
Önleme	Atıkların oluştuktan sonra temizlenmesi veya atıkların temizlenmesi yerine atık oluşumunun baştan önlenmesi.
Atom ekonomisi	Sentetik metotlar, proseste kullanılan tüm materyallerin son ürüne dahil edilmesini maksimize edecek şekilde tasarlanmalıdır.
Az tehlikeli kimyasal sentez	İnsan sağlığı ve çevre için toksisitesi az veya hiç olmayan maddeler üretmek ve üretmek için sentetik yöntemler tasarlanmalıdır.
Daha güvenli kimyasallar tasarlamak	Kimyasal ürünlerin toksisitesini en aza indirgeyerek arzu edilen işlevin daha üzerinde yeni kimyasallar tasarlanmalıdır.
Güvenli çözücüler ve yardımcı maddeler:	Yardımcı maddeler (örn. Çözücüler, ayırıcılar, vb.) en aza indirilmeli, mümkün olduğunda ve gerektiğinde kullanılmalı.
Enerji verimliliği için tasarım	Kimyasal süreçlerin enerji gereksinimleri, çevresel ve ekonomik etkileri açısından değerlendirilmeli, Mümkünse, sıcaklık ve basınç ortam koşullarında olmalıdır.
Yenilenebilir hammaddelerin kullanımı	Bir hammadde, teknik ve ekonomik açıdan mümkün olduğunca yenilenebilir olmalıdır.
Türevleri azaltın	Mümkünse, gereksiz türevlendirmeler mümkün olduğunca engellenmelidir, çünkü bu adımlar ilave reaktifler gerektirir ve atık üretebilir.
Kataliz	Katalitik reaktifler (mümkün olduğunca seçici olarak) stoikometrik reaktiflerden üstündür.
Bozunma için tasarım	Kimyasal ürünler, işlevlerinin sona ermesiyle zararsız bozunma ürünlerine bölünecek ve çevreye kalmayacak şekilde tasarlanmalıdır.
Kirliliğin önlenmesi için gerçek zamanlı analiz	Tehlikeli maddeler oluşmadan önce gerçek zamanlı, süreç içi izleme ve kontrol için analitik yöntemlerin geliştirilmesi gerekir.
Kazanın önlenmesi için daha güvenli bir kimya	Kimyasal süreçlerde kullanılan maddeler kimyasal kazaların olasılığını en aza indirmek için seçilmelidir.

1.1. Biyomineralizasyon ve Biyosilika

Deniz kabukları, kemikler, dişler gibi inorganik yapıların canlı organizmalar tarafından sentezlenen organik yapıtaşları üzerinde oluşumu, biyomineralizasyon olarak tanımlanmaktadır (Prasad Shastri 2015). Dünyada ikinci sırada ve evrende en sık bulunan sekizinci element silikondur. Silikon nadiren saf formda bulunurken, doğada silika olarak adlandırılan saf silikon dioksit mineralleri şeklinde bulunmaktadır (Gonçalves 2018). Canlılar inorganik silikayı biyosilisifikasyon olarak bilinen süreçlerle şekillendirmenin yollarını keşfetmişlerdir. Bitkiler alemi içerisinde, özellikle monokotiladon ailesinde, çok sayıda amorf silika yapının organizmanın farklı kısımlarında özellikle de hücre

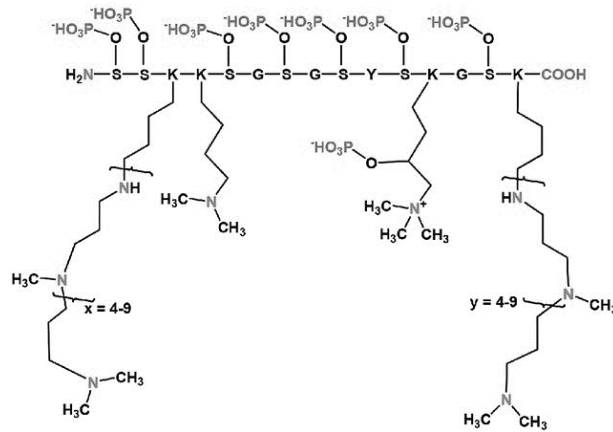
duvarının üzerinde yoğunlaşmasının, bu oluşumların böceklerle karşı savunma mekanizmasının bir parçası olduğu görüşü savunulmaktadır (Wang, Wang et al. 2002, Sato, Ozaki et al. 2017). Hayvanlar aleminde vatoz balıkları ailesinden *Psammobatis extenta*'danın elektrik organlarında otofloresan özellikte nano-kristal yapıda silikatlar keşfedilmiştir (Prado Figueroa, Barrera et al. 2008). Bununla birlikte, organize olmuş yapıları nedeniyle en etkileyici biyosilisifikasyon örnekleri diatomlar ve ışınılılar (Radiolaria) gibi tek hücreli basit sucul canlılarda ve süngerlerde (Porifera) gözlenmektedir. Sünger ailesinde pek çok tür silika temelli iğneler oluşturmaktadır. Derin deniz süngerinin, (*Monorhaphis chuni*) 3 metreyi bulan ve dünyanın en büyük biyojenik silika yapılarını oluşturduğu keşfedilmiştir (Wang, Wang et al. 2002, Jochum, Wang et al. 2012). Materyal bilimleri alanında yaşanan diğer bir önemli gelişme ise biyomineralizasyon süreçlerine ilginin artışıdır (Patwardhan 2011). Bu gelişmeler ışığında diatom ve süngerler tarafından gerçekleştirilen biyomineralizasyon reaksiyonlarında hiyerarşik biçimli, organize mikro ve nano yapıların oluşum mekanizmaları merak uyandırmaya devam etmektedir (Elsharkawy and Mata 2018).

Diatomların hücre duvarını oluşturan biyosilika yapılarda, tekrarlayan kompleks yapılar şeklinde pore ve kanal paternleri, türe özgü olarak karakterize edilir (Şekil 1.1). Bu canlılardaki organize yapı çeşitliliği, biyosilisifikasyonun genetik olarak kontrol edildiğini göstermektedir (Kroger, Lorenz et al. 2002).



Şekil 1.1. Farklı diatom türlerine ait hücre duvarlarının taramalı elektron mikroskopisi görüntüleri (Kröger 2007). a) *Cylindrotheca fusiformis*; b,c) *Coscinodiscus asteromphalus*; d,e) *Thalassiosira pseudonana*.

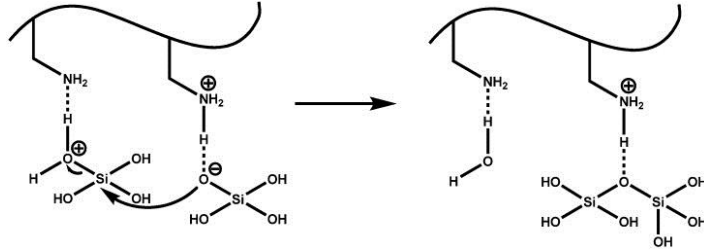
Diatomlarda, silika temelli hücre duvarından izole edilerek, hücre duvarının biyomineralizasyonunun sorumlu proteinler, silaffinlerdir (Kroger, Deutzmann et al. 1999). Silaffinler, hem polikasyonik (poliamin) hem de polianyonik (fosforilasyon) yapıları tek bir molekül üzerinde bulunduran ve diatom türlerinde silika yapının oluşumu için gerekli moleküler süreçleri gerçekleştirmesini sağlayan proteinlerdir (Kroger, Lorenz et al. 2002, Marner, Shaikh et al. 2009, Lechner and Becker 2015). Doğal silaffin peptidlerinin üzerindeki benzersiz poliamin modifikasyonlarının (Şekil 1.3) silika kondenzasyonu ve siliokzan bağı oluşturduğu gösterilmiştir (Kroger, Deutzmann et al. 1999). Bununla birlikte silaffin dizisinde, tekrarlayan bir peptid dizisi olan R5 peptidinin (SSKKSGSYSGSKGSKRRIL), polikasyonik modifikasyonları taşımayan sentetik analokları ile yapılan çalışmalar, monosilik asit varlığında silika kondenzasyonunun gerçekleştiği gösterilmiştir. R5 dizisi üzerinde yapılan mutasyonlar sonucunda dizide yer alan RRIL motifinin silika oluşumu için zorunlu olduğu belirlenmiştir (Knecht and Wright 2003, Lechner and Becker 2014).



Şekil 1.2 *Cylindrotheca fusiformis*'teki Silaffin 1A₁ yapısının ve modifikasyonların şematik gösterimi (Schroder, Brandt vd. 2007).

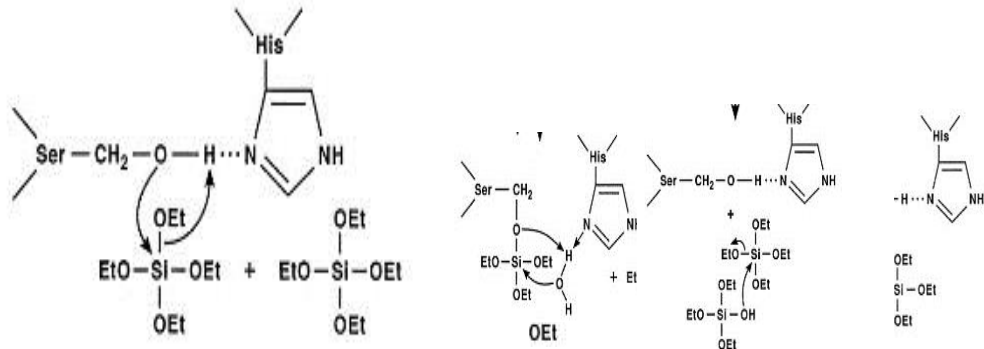
Kasyonik polimerlerin kalıplarının, elektrostatik etkileşimler ve hidrojen bağları ile silisik asitleri biraraya getirerek silika kondenzasyonunu sağladığı belirlenmiştir. Silika kondenzasyonu için önerilen reaksiyon mekanizması Şekil Pozitif yüklü biyolojik makromoleküllerin yanı sıra, polietilenimin, dendrimer

veya polipeptidler (poli-L-Lizin, poli-L-Histidin vb.) gibi katyonik polimerlerin *in vitro* silika polimerizasyon yeteneği taşıdığı gösterilmiştir (Patwardhan and Clarson 2002, Patwardhan, Clarson et al. 2005, Demadis, Pachis et al. 2009, Lechner and Becker 2015).



Şekil 1.3. Doğal silaffin peptidi yapısında bulunan poliamin grupları tarafından silisik asidin polimerizasyonu (Coradin and Lopez 2003).

Süngerlerde hücre duvarından izole edilen silikatein proteini hidrolitik bir enzim olan katepsin dizisine homoloji göstermektedir. Katepsinin aktif merkezde bulunan sistein-histidin çifti silikateinde serin-histidin çiftine değişmiştir (Shimizu, Cha et al. 1998). Serin hidroksilinin bulunması, alkoksililikat molekülünün bağlanması ve aktivasyonu için gerekliken, histidin imidazol halkasının elektronları hidrolizi gerçekleşmesi nükleofilik aktivasyon ve kondenzasyonla devam eder (Şekil 1.4) (Brutchey and Morse 2008, Baccile, Babonneau et al. 2009). Protein yüzeyinde gerçekleşen bu reaksiyonlar silikateinlerin Si-OR hidrolizi katalizleyen enzimler olarak kabul görmesini sağlamıştır (Schroder, Brandt et al. 2007).



Şekil 1.4. Silikatein kataliz mekanizması ve silisik asit kondenzasyonu.

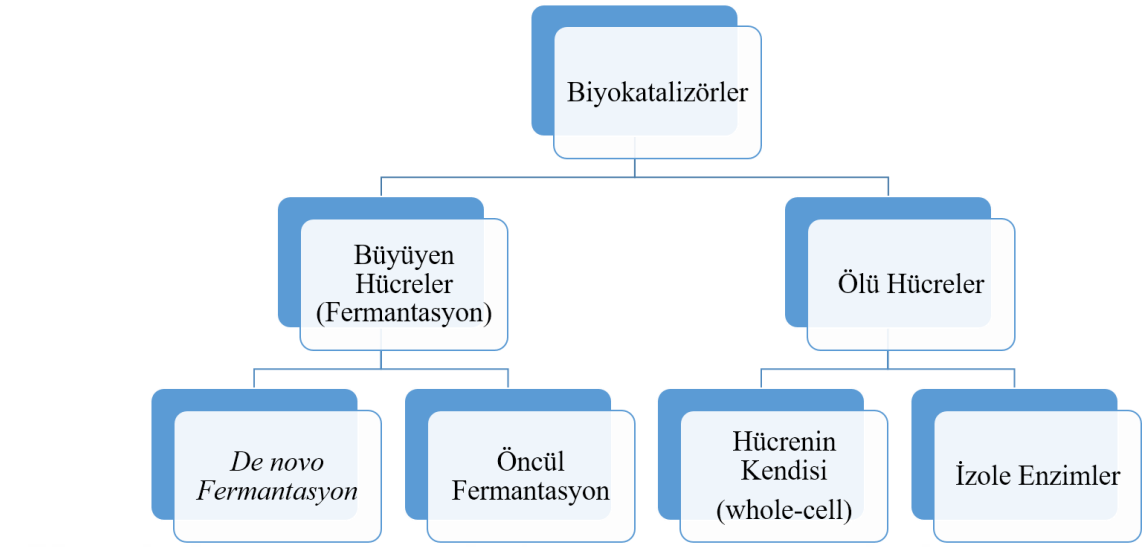
1.2. Biyosilika ve enzim immobilizasyonu

Silaffin yapısında bulunan peptid dizisinin sentetik türevlerinin silika kondenzasyonunu nötral ve ılımlı koşullarda gerçekleştirdiğinin aydınlatılmasıyla, bu güne kadar yapılan çeşitli enzimlerin immobilizasyonunda kullanımı gösterilmiştir (Garcia-Galan, Berenguer-Murcia et al. 2011, Cipolatti, Silva et al. 2014). Enzim immobilizasyonundaki verimliliği açısından hemen her alanda örneklerinin sayısı artmaktadır (Gonçalves 2018).

Benzer süreçler, sentetik peptidler ile *in vitro* koşullarda silika nanoyapıların elde edilmesi için tekrarlanabilmektedir (Patwardhan, Clarson et al. 2005, Tajuddin, Voelcker et al. 2007). Biomineralizasyon temelli silika polimerizasyonu sırasında ortamda bulunan diğer proteinler veya enzimler oluşan çözünmez silika mimarisi içerisinde tutuklu kalırlar (Luckarift, Spain et al. 2004, Edwards, Kumbhar et al. 2011, Lechner and Becker 2015).

1.3. Biyokataliz

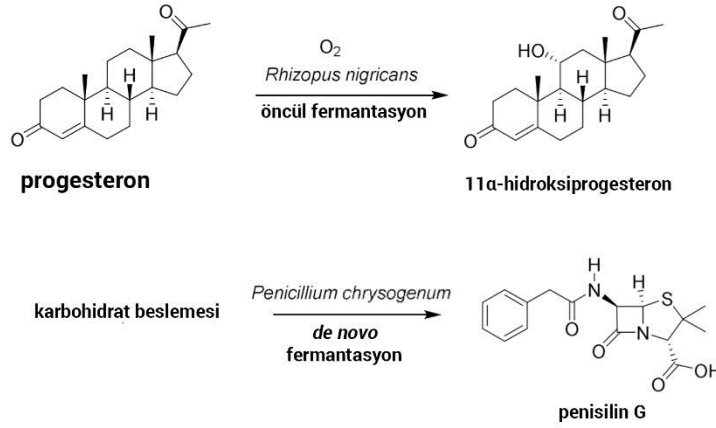
Biyokataliz, katalitik dönüşümlerde izole edilmiş enzimlerin veya mikrobiyal hücrelerin kendisinin kullanılmasını ifade etmektedir. Bunlar iki tipe ayrılmaktadır (Sheldon 1993). Birincisi, reaktantın hem üretim hem de biyokatalizörün rejenerasyonu için, substratınsa katalitik dönüşüm için kullanıldığı mikrobiyal hücrelerde gerçekleşen büyüme ile ilgili dönüşümleri kapsar ve bu süreçler fermantasyon olarak adlandırılır. Fermantasyonun birinci işlemi, hücresel gelişim için gerekli olan proteinleri, polisakkaritleri veya birincil metabolitleri üreterek daha fazla mikrobiyal hücre oluşumunu sağlamaktır (Şekil 1.5). Alternatif olarak, bunlar hücresel büyüme için gerekli olmayan fakat organizmanın hayatta kalması için önemli olan sekonder metabolitleri üretmek için de kullanılabilir. Karbohidratlardan primer ve sekonder metabolitlerin üretilmesi genellikle *de novo* fermentasyon olarak adlandırılmaktadır. Anabolik veya katabolik yollarda gerçekleştirilen tüm reaksiyonlar için gerekli enzimler ve gerekli kofaktörler hücresel olarak kontrol edilmektedir (Sheldon and Brady 2018).



Şekil 1.5. Biyokatalizör kullanımı.

İkinci tür biyokatalitik dönüşüm, enzimleri içeren izole edilmiş/saflaştırılmış enzimler ya da enzimleri içeren "ölü" veya "dinlenme halindeki" hücrelerin kullanılmasını içermektedir. Enzim üretimi ve enzimatik dönüşüm birbirinden ayrı süreçlerdir (Sheldon and Woodley 2018). Fermantasyonların aksine, gerekli kofaktörler bağımsız olarak *in situ* rejenere edilmeli ve deaktive enzimler taze olanlarıyla değiştirilmelidir.

Fermantasyonun kökeni antik çağlara kadar dayanmaktadır. Varlıklarından habersiz olan atalarımız, yiyecek ve içecek üretiminde (peynir yapımı, bira yapımı, şarap yapımı, ekmek mayalama vb.) mikropları kullanmışlardır. Fermantasyon ile kasıtlı olarak üretilen ilk organik aktif bileşik 19. yüzyılda üretilmiş olan laktik asittir. 1928'de Alexander Fleming tarafından yapılan gözlem, 1940'lı yıllarda Penicillin G'nin (*Penicillium chrysogenum*) ticari üretimine olanak sağlamıştır. Bu gelişme, geniş bir yelpazede penisilin G'den elde edilen yarı sentetik β -laktam antibiyotiklerin (Şekil 1.6) üretimine olanak sağlayarak, antibiyotik alanının ortaya çıkmasına neden olmuştur (Bruggink 2011).



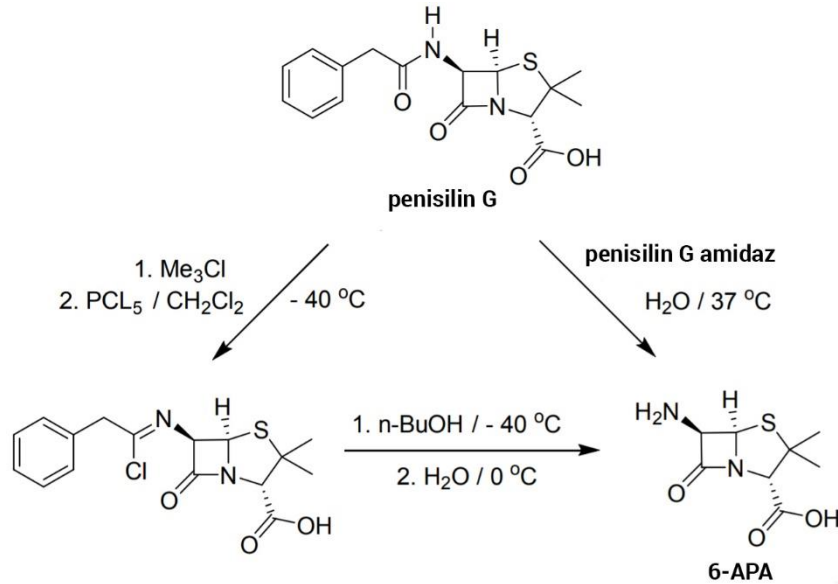
Şekil 1.6. Canlı hücreler ile kiral biyokatalize endüstriyel üretim örnekleri.

Yirminci yüzyılın ikinci yarısında, fermentasyon teknolojisinin gelişimiyle, amino asitler, vitaminler, hormonlar ve daha birçok doğal ve sentetik moleküllerin üretiminde rekombinant teknoloji sınırları genişletmiştir. Steroid bir ilaç olan kortizon, artrit tedavisi için 1944 yılında ilaç endüstrisi tarafından piyasaya tanıtılmıştır. Bir sonraki buluş, Peterson ve Murray tarafından yapılmıştır ve progesteronun 11α-hidroksipregesteron'a regio-spesifik ve enantiyo-spesifik mikrobiyal hidrosiklasyonunu gerçekleştirmiştir (Şekil 1.6). Bu keşif, safra asidinden yapılan 31 adımlı kimyasal sentezin yerini alan ticari olarak uygulanabilir kortizon sentezinin geliştirilmesine ilham vermiştir ve gebelik kontrolünde steroid hormonların gelişiminin yolunu açmıştır (Sheldon and Brady 2018).

İzole edilmiş enzimlerin organik sentezde kullanılmalarına dair örnekler, geçen yüzyılın başlangıcına kadar uzanmaktadır, ancak bunlar sadece endüstriyel süreçlerde düzensiz olarak uygulanmışlardır. 1970'lerde rekombinant DNA teknolojisinin ortaya çıkışı, geleneksel hayvan ve bitki kaynaklarından izolasyonun yerine rekombinant mikroorganizmalar kullanarak çok daha verimli ve uygun maliyetli saf enzimlerin üretilmesine geçişi sağlamıştır. Ancak yine de izole edilmiş enzimlerin endüstriyel organik sentezde yaygın olarak kullanılmasını yaygınlaştıramamıştır. İzole edilmiş enzimlerin başlıca uygulamaları, geleneksel gıda ve içeceklerin işlenmesinde ve deterjan formülasyonlarında da bulunmaktadır (DiCosimo, McAuliffe et al. 2013). Endüstriyel organik sentezde biyokataliz kullanımını teşvik etmek için başka bir çözüme ihtiyaç duyulmuştur ve bu çözüm

1980'lerin ortalarında ortaya çıkmıştır. 1980'lerin ikinci yarısında, genel olarak katalizör uygulaması ve özellikle biyokataliz, kimyasal maddelerin üretiminde, toplumsal ve endüstriyel önemi olan iki gelişmenin birleşmesiyle desteklenmiştir. İlk olarak, klasik “stokiyometrik” metodolojilerle üretilen atık miktarlarının yeşil ve sürdürülebilir kimya ile uyumlu olmaması, zehirli ve tehlikeli reaktiflerin ve çözücülerin kullanılmasını önleyen daha temiz katalitik alternatiflere ihtiyaç duyulduğunu ortaya çıkarmıştır. Enzimatik yollar kullanılarak gerçekleştirilen gerek *in vivo* gerekse *in vitro* biyokataliz, sınırsız sayıda sürdürülebilir ve yeşil teknolojileri barındırmaktadır.

Bunun en önemli örneği, yarı sentetik penisillerin üretiminde en önemli ara madde olan 6-aminopenikil asidinin (6-APA) endüstriyel sentezidir 1919'ların ortalarına kadar 6-APA, fenilasetil penisilin G yan zincirinin kimyasal olarak bölünmesiyle üretilmiştir. Bu, çevresel olarak zararlı reaktiflerin ve çözücülerin kullanımını içermektedir. 1 kilogram 6-APA üretimi için; 0,6 kg Me_3SiCl , 1.2 kg PCl_5 , 1.6 kg PhNMe_2 , 0.2 kg NH_3 , 8.4 L $n\text{-BuOH}$ ve 8.4L CH_2Cl_2 reaktiflerine ihtiyaç duymaktadır ve $-40\text{ }^\circ\text{C}$ reaksiyon sıcaklığı gerektirmektedir (Şekil 1.7) (Sheldon and Rantwijk 2004).



Şekil 1.7. Penisilin türevlerinin sentezinde kimyasal ve enzimatik sentez karşılaştırılması.

Kimyasal katalizin aksine bu reaksiyonu katalizleyen enzim ile 37°C'de sulu ortamda gerçekleştirilebilir olmasına rağmen, enzimlerin üretim maliyetleri, 1980'lerde rekombinant teknolojinin gelişine kadar temiz reaksiyonlar pahalı bulunmuştur. Enzim immobilizasyonu ve tekrar tekrar kullanılabilir biyokatalizörlerin tasarımı ile enzimlerin endüstriyel kullanım alanı önemini ortaya koymuştur (Sheldon and Brady 2018).

Enzimatik biyokataliz reaksiyonlarının uygulama alanlarının genişlemesine yol açan diğer bir önemli gelişme, biyoaktif bileşenlerin stereoizomer kompozisyonu ve kiralitenin ilaç etken maddelerin sentezindeki potansiyelinin farkına varılmasıdır. FDA gibi belirleyici otoritelerin ilaç etken maddelerinin satışına getirdiği düzenlemeler enantiyomerik saflıkta ürünlerin üretimini zorunlu kılmaktadır (De Camp 1993, Brooks, Guida et al. 2011, Chhabra, Aseri et al. 2013). Saf enantiyomerlerin sentezi için temiz, uygun maliyetli yöntemler için acil bir ihtiyaç ortaya çıkmıştır. Bu boşluk, kiral ligandlar içeren metal kompleksleri ile asimetrik hidrojenasyon gibi organometalik kataliz ile veya genellikle yüksek ölçüde enantioselektif oldukları bilinen enzimlerin kullanıldığı biyokatalitik yöntemlerle doldurulabilmektedir.

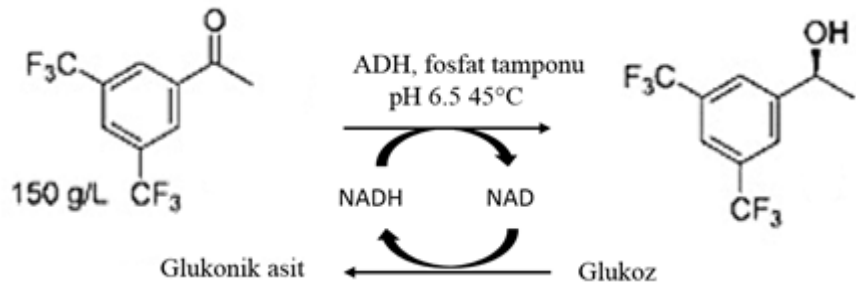
Protein mühendisliğinin gelişimine paralel olarak, oldukça önemli metabolik işlevleri olan enzimlerin, günümüzde endüstride ve tıptaki kullanım alanları hızla yaygınlaşmaktadır. Enzimler yeni nesil ilaçlar olarak nitelendirilmekte ve birçok hastalığın tedavisinde dikkat çekici stratejiler geliştirmeye olanak sağlamaktadır (Brady and Jordaan 2009).

1.1.1 Biyokatalitik keton reaksiyonları

Önemli sayıda farmasötik ürün, en az bir merkezde kiraldir ve birçok bileşik, birden fazla kiral merkeze sahiptir. Bu kiral merkezlerin verimli sentezleri, enantio ve regioselektif katalizörleri gerektirir ve enzimler, mevcut olan en seçici katalizörlerdir. Organik kimya için biyokatalitik keton reaksiyonları çok ilgi çekici ve önemlidir. Çünkü enzimler, asimetrik katalizör olarak da çok önemli yer tutarlar. Keton indirgenmelerini katalize eden enzimler, kimyasal katalizörlerin aynı reaksiyonları yapma kabiliyetini aşan güvenilir bir yüksek

enantiomerik fazla kiral alkollerin üretimini sağlamaktadırlar. Bu durumda hibrid donorü olarak NADH veya NADPH (nikotinamid adenin dinükleotid) kofaktörlerin en azından bir ekivalentini eklemek gerekir (Berenguer-Murcia and Fernandez-Lafuente 2010). Ayrıca mikrobiyolojik yöntemlerden de son yıllarda, özellikle asimetrik sentezlerde yararlanılmaktadır (Blank, Ebert et al. 2010, Huisman, Liang et al. 2010).

Keton indirgenme reaksiyonları, biyokatalitik keton reaksiyonlarından en önemlileridir ve ketoredüktazlar (KRED) bu indirgenme reaksiyonları için kullanılan önemli bir enzim sınıfıdır. KRED, NAD(P)H bağımlıdır ve aromatik ve alifatik ketonların indirgenmesini katalizler (Şekil 1.8). Farklı kaynaklardan izole edilen çok sayıda karbonil redüktaz doğada tanımlanmış ve endüstriyel süreçlerde kullanım alanı bulmuştur (Brady and Jordaan 2009). Geçtiğimiz birkaç yıl boyunca, ketoredüktazlar kütüphanesi, birkaç yapısal sınıftaki ketonları indirgemek için başarıyla kullanılmıştır. Asetofenonlar, keton substratları olarak en önemli yapısal sınıflardan birini oluşturur ve redüksiyon, kemokataliz ile açıkça kanıtlanmıştır (Noyori 2002). Ancak, yapılan çalışmalar sonucunda biyokatalizörlerin kullanıldığı reaksiyonların kemokataliz ile eşit derecede başarılı olduğu hatta çoğu kez önemli ölçüde daha yüksek seçiciliğe sahip olduğu belirlenmiştir (Zhu, Rios et al. 2005). Mevcut ketoredüktaz kütüphanesinin çoğu, asetofenon üzerinde oldukça aktiftir. Bu kütüphanenin asetofenon sınıfı üzerindeki etkisinin bir örneği olarak; 3,5-bistriflorometilasetofenon'un (S)-3,5-bistriflorometilfenil etanol (Şekil 1.4) 'ya indirgenmesidir (Pollard, Truppo et al. 2006).



Şekil 1.8. Alkol dehidrojenaz-glukoz dehidrojenaz kofaktör rejenerasyon sistemi.

Bu biyokatalitik yol, ketoredüktazların gösterdiği üstün seçiciliğin bir sonucu olarak ortaya çıkmıştır ve kemokatalitik yöntemlere üstün gelmiştir. Bunun yanında; KRED-112 ve KRED-130 enzimleri ile asetofenon yapısı üzerinde bir halojenür veya kısa alkil halojenür eklenerek yapılan değişiklikler, alkolün her iki enantiyomerinin de ayrı ayrı eldesine imkan sağlamaktadır (Zhu, Mukherjee et al. 2005).

Enzimler ayrıca para-diketon ve diğer bazı substratlarda, değerli kemoseneselektivite ve diastereoselektivite göstermektedir. Enzimler, kemokatalitik muadilleri kadar hızlı bir şekilde taranabilmekte ve ölçeklendirilebilmektedir. Büyük ölçekte kullanım maliyetleri ve çevresel zararları kimyasal katalizlere kıyasla daha düşük olmaktadır. Merck'te, mükemmel bir verimle kilogram miktarlarda kiral ara ürün üretmek için kullanılmışlardır. Sonuç olarak, ketoredüktazlar Merck'te keton indirgemelerinde tercih edilen katalizörlerdir (Moore, Pollard et al. 2007).

1.1.2 Kiral alkollerin üretimi

Kiral sekonder alkoller; kiral merkezin farmasötikler, aromalar, tarım kimyasalları ve bazı özel materyallere dâhil olabilmesi için önemli ara ürünler sunmaktadırlar. Enantiyoselektif keton indirgemesi prosesi; optikçe aktif alkollerin eldesinde güvenilir, ölçeklendirilebilir ve basit bir yoldur. Biyokatalitik asimetrik indirgenme reaksiyonu, geleneksel kimyasal proseslere kıyasla seçimlidir ve enerji verimliliği yüksektir aynı zamanda prosese çevre dostu bir yaklaşım sunmaktadır. Bu nedenle biyokatalitik reaksiyonlar oldukça ilgi çekicidir, ancak büyük ölçekte düşük hacimsel verimliliğe sahip olmaları ticari kullanımlarında hala sınırlayıcı bir etmendir. Ticari perspektiften bakıldığında, büyük ölçekli biyotransformasyonlarda ekonomik fizibilitenin sağlanması ve diğer yöntemlerle rekabet edilebilirliğin arttırılması için ideal biyokatalizörlerin elde edilmesi oldukça önemli bir odak noktası haline gelmiştir. Son zamanlarda, yeni enzimlerin keşfi ve enzim mühendisliği çalışmaları bu enzimleri organik sentezde, özellikle kiral sentezde, çok yönlü ve güçlü bir araç haline getirmiştir (Ni and Xu 2012).

Prokiral ketonların enantiyoseçimli indirgenmesiyle optikçe aktif alkollerine dönüşmesi, asimetrik sentezlerde yararlanılan çok önemli metodlardan birisidir. Bu reaksiyonlar genel olarak, öncelikle bir izomer oluşturma eğiliminde olan karbonil grubunun sadece bir yüzüne hidrojenin katılmasıyla gerçekleştirilir (Holsch and Weuster-Botz 2010). Enantiyomerlerden birinin seçimli indirgenmesini başarmak için, genellikle kimyacılar optikçe aktif ligandlarla klasik reaktifleri modifiye etmişlerdir. Bunun dışında da iyi bir enantiyoseçimlilik için geliştirilen çeşitli yöntemler vardır (Ni, Li et al. 2011).

Birçok biyolojik aktif molekül optikçe aktiftir ve bu biyolojik aktivite moleküllerin optikçe saflığına, yani enantiomerik zenginliğine bağlı bir özelliktir. Asimetrik indirgemenin, endüstriyel kimyada da kullanılan birçok teknik arasında en yararlı tekniklerden bir tanesi olduğu kanıtlanmıştır. Özellikle ketonların asimetrik indirgenmesi sonucu elde edilen kiral sekonder alkoller ilaç ürünleri başta olmak üzere birçok tabii maddenin sentezinde kiral başlangıç maddeleri olarak kullanılmaktadır (Yan, Nie et al. 2011).

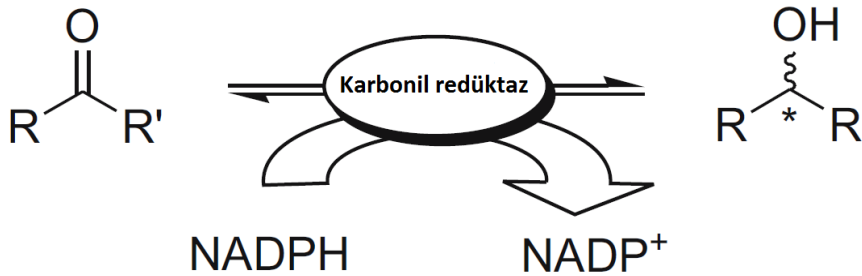
İlaç moleküllerinin hazırlanmasında bu teknolojinin ilk kullanımı, çeşitli önemli ilaçların sentezlerini yayınlayan Corey tarafından gerçekleştirilmiştir. İlk başarılı örnek fluoksetinin (fluoxetine) saf bir enantiyomerinin sentezidir (Corey and Reichard 1989). Bu ürün *Prozac* marka adı altında pazarlanan bir antidepresandır. Corey, kalp rahatsızlıklarında kullanılan bir β -adrenoreseptör öncüsü ve rasemik denopamin karşılığı olan rasemik iso-proterenolün her iki enantiyomerinin eldesini de yayınlamıştır (Corey and Reichard 1989). Haloaril ketonlar, siklizasyon ile uygun epoksistirenleri vermektedirler. Bu ürünler de obezite ve diyabet hastalıklarının tedavisinde kullanılan ilaçların sentezinde yer alan optikçe aktif öncül bileşiklere dönüştürülmektedirler (Demir, Talpur et al. 2011)

Antimitotik ajanlar arasında kompleks, polisiklik bir diterpen olan paklitaksel, hücre bölünmesi sırasında mikro tüp proteinler üzerinde benzersiz bir etki şekli sergiler. Çeşitli kanser türleri, paklitaksel ile tedavi edilmiştir ve yumurtalık kanseri ve metastatik meme kanseri tedavisinde FDA tarafından kullanılması onaylanmıştır (Patel 2013). Paklitakselin yarı sentetik üretimi için

anahtar bir öncül prekürsör, (2R,3S)-N-benzoil-3-fenil izoserin etil esterin 2-keto-3- (N-benzoilamino) -3-fenil propiyonik asit etil ester'den mikrobiyal indirgenmesi enantioselektif gerçekleştirilmektedir (Patel, Banerjee et al. 1993). Truppo ve arkadaşları, benzofenon ve benzoilpiridin türevlerinin ticari KRED enzimi ile indirgenmesi yoluyla bir dizi diarilmetanolün, yüksek verimlilikle, sentezini göstermişlerdir (Himmelberger, Cole et al. 2018). Güncel literatürde sayısız molekülün kiral enzimatik sentezi gösterilmiştir (Sheldon and Brady 2018). Bu çalışmalar günümüzde yeni ilaç ve önemli bileşenlerin prekürsörü olma niteliğindedirler (A. Magnus, Scott Coffey et al. 2011).

1.1.3 Prokiral ketonların izole enzimler ile indirgenmesi

Günümüzde, kimya ve farmasötik endüstrisinde en önemli yapı taşlarından bir tanesi kiral bileşiklerdir. Kiral bileşiklerin üretimindeki en etkili yol ise biyokatalizörleri içeren tekniklerdir. Keton redüktazlar prokiral ketonların belirgin kemo-, regio- ve stereoseçimli indirgenmesini katalizlerler (Şekil 1.9) (Wandrey 2004).



Şekil 1.9. Karbonil redüktaz enzimi ile prokiral ketonların indirgenmesi

İzole edilmiş enzimlerin biyokatalizörler olarak kullanımı, hücrenin kendisinin kullanımı ile karşılaştırıldığında üstünlük ve zayıflıklar taşımaktadır. Saf enzimlerin kullanılması, metabolik yan reaksiyonların gerçekleşmemesinden dolayı ürün verimi ve saflığı açısından üstünlük taşır. Bu sayede saflaştırma ve izolasyon gibi alt akım işlemleri sadeleştirilebilmektedir. Hücrelerin kendileri tarafından katalize edilen süreçler değerlendirildiğinde, enzimlerin kullanıldığı süreçlerde hücre membranı bir diğer anlamla difüzyon bariyeri bulunmaz.

Canlı hücrelerin kullanıldığı reaksiyonlarda indirgenmiş kofaktörler metabolik reaksiyonlar sonucu doğal yollarla sentezlenir ve dışardan kofaktör ilavesi gerekli değildir. Ancak saf enzimlerin, kullanıldığı indirgenme veya yükseltgenme reaksiyonlarında, reaksiyon ortamına indirgenmiş nikotinamid kofaktörlerinin sitokiyometrik miktarlarda ilave edilmesi gereklidir. (Liese, Zelinski et al. 1998, Schmid, Dordick et al. 2001, Villela Filho, Stillger et al. 2003). İzole enzimler veya tüm hücrelerin kullanımı maliyet ve verimlilik açısından karşılaştırılarak değerlendirilmelidir (Faber and Faber 1992, Patel 2000, Hummel, Abokitse et al. 2003).

Kimyasal ve enzimatik indirgenme reaksiyonlarında prokiral aromatik keton, asetofenon, kiral alkol türevlerinin sentezinde kullanılan model bir substrattır. (Yan, Nie et al. 2011). Matsuda ve arkadaşları (Matsuda, Harada et al. 2000) *Geotrichum candidum* hücresinin ve bir (R) -selektif ya da bir (S) -selektif izole bir ADH kullanılarak asetofenonun indirgenmesini karşılaştırmışlardır (Groger, Hummel et al. 2003). Reaksiyonlar, substrat bağımlı kofaktör rejenerasyonu için bir NADPH veya NADP^+ ve ek olarak siklopentanolun aşırı miktarda kullanımları ile gerçekleştirilmiştir. Seçilen koşullara bağlı olarak, verim %0 ile %86 arasında, enantiyoseçilimse sırasıyla %22 ile >%99 (S) veya (R) arasında belirlenmiştir. Hildebrandt ve arkadaşları asetofenon ve türevlerinin (R) -alkollere indirgenmesi için *Pseudomonas fluorescens*'ten (PF-ADH) bir rekombinant NAD'a bağlı ADH kullanmışlardır (Hildebrandt, Riermeier et al. 2001). Çalışmalarında enantiyoseçilim ve biyotransformasyon veriminin farklı optimum sıcaklıklarda en yüksek seviyelere ulaştığını belirlemişlerdir. 10°C'de ve 40°C'de enantiyo seçilimde >%99 olacak şekilde iki maksimum değer bulunurken, biyotransformasyon veriminin 20°C'de en yüksek seviyeye ulaştığını ve %95 olduğunu belirlemişlerdir. Benzer durumun enantiyoseçilim ve biyotransformasyonun, kofaktör rejenerasyonu için kullanılan 2-propanol konsantrasyonuna bağımlılığı için de geçerli olduğunu belirlemişlerdir. En fazla biyotransformasyon %20 (h/h) konsantrasyonunda bulunmuştur. En yüksek enantiyoseçilim (>%99), %35 ve %40 (h/h) konsantrasyonları arasında gerçekleşmiştir. Reaksiyon koşullarının optimizasyonunun gerekliliği, Inoue ve ark. (Inoue, Makino et al. 2005) tarafından da araştırılmıştır. *Leifsonia* sp. S749

ADH'nın (LS-ADH), en küçük prokiral keton olarak 2-pentanon içeren geniş bir substrat aralığında çalıştığını göstermişlerdir. Substratların çoğu, 2-pentanon ve asetofenon dahil ee>%99 olan (R)-alkollere dönüştürülmüştür. 2-propanol ve NAD^+ ve pH konsantrasyonlarına bağlı olarak 2,2,2-trifloro asetofenonun dönüşümü için reaksiyon şartları optimize edilmiştir. Optimize koşullarda, neredeyse kantitatif dönüşüm gözlenmiştir. Zhu ve arkadaşları ayrıca, ADH katalizli reaksiyonların enantioseçilim ve aktivitesinin reaksiyon koşullarına bağımlılığı hakkında da çalışmışlardır (Zhu, Malik et al. 2006). Çalışmaları sonucunda; enantioseçilimin sıcaklık değişimlerinden etkilenmediğini ancak enzim aktivitesinin sıcaklığın artırılması ile arttığını belirlemişlerdir. Ayrıca, substratın enantioseçilim açısından önemini gösteren çalışmalar yayınlamışlardır (Zhu, Malik et al. 2006).

Asetofenon türevleri, birçok enzim için uygun substratlardır. *Sporobolomyces salmonicordan*'dan elde edilen bir ADH ile yapılan araştırmalar, asetofenonun 1-sübstitüentine güçlü bir aktivite ve enantioselektiflik bağımlılığının varlığını ortaya çıkarmıştır (Zhu and Hua 2006). Enzim-substrat bağlanma mekanizması üzerinde yapılan *in silico* docklama (docking) çalışmaları, substrata bağlı olarak, ADH'nin farklı aktif bölgelerinin reaksiyonlarda kullanılabildiğini göstermişlerdir (Zhu, Yang et al. 2006).

1.1.4 Üretimi nziematik kofaktör rejenerasyonu

Birçok enzimatik reaksiyonunun kofaktör bağımlı olduğu düşünüldüğünde enzime bağlı, kendini rejenere edebilen kofaktörler (biyotin veya flavinler) ve serbest kofaktörler (piridin nükleotidler ve nükleozid trifosfatlar) ayrı değerlendirilmelidir. Nikotinamid kofaktörler katalitik reaksiyon sırasında transport ajanları olarak hareket eder ve rejenerasyon katalizörün kendisi tarafından gerçekleştirilemez. Kofaktörlerin stokiometrik miktarlarda kullanılmasının oldukça maliyetli olduğu öngörüldüğünde, *in situ* rejenerasyon için stratejiler geliştirilmiştir. Verimli ve ekonomik olarak uygun bir kofaktör rejenerasyon yöntemi için birkaç gereklilik yerine getirilmelidir. Reaktiflerin (enzimler, kimyasal bileşikler) ve ekipmanın katalitik reaksiyon sırasında kolay ulaşılabilir, ucuz ve stabil olması gerekmektedir. Biyokimyasal sistem ile

uyumluluk kritik bir konudur. Ne reaktifler ne de kofaktör rejenerasyon yönteminin yan ürünü, katalitik reaksiyona veya ürün izolasyonuna girişim yapmamalıdır. Rejenerasyon metodu, istenilen ürün lehine kinetik ve termodinamiksel olarak istemli olmalıdır. En önemlisi ise, total turnover sayısının olabildiğince yüksek olması gerekmektedir. Total turnover sayısı, oluşan ürünün molar miktarı başına harcanan kofaktörün molar miktarı olarak tanımlanmaktadır (van der Donk and Zhao 2003).

Bütün kofaktör tipleri arasında piridin nükleotidleri (NAD(P)⁺/NAD(P)H) endüstriyel biyokatalizde en önemli kofaktörler olarak değerlendirilmektedir. Bu önem ekonomik açıdan önemli bileşiklerin sentezinde oksidoredüktaz sınıfı kofaktör bağımlı enzimlerin katalizlediği kiral reaksiyonlarda yer almalarından kaynaklanmaktadır. Oksidoredüktaz sınıfı enzimler özellikle organik kimyada oldukça etkin olarak kullanılmaktadırlar. Bu enzim sınıfının organik kimyaya önemli katkısı ketoredüktazlar (KREDs) tarafından sağlanmaktadır. Oksidoredüktazların endüstriyel uygulamalardaki kullanımını kısıtlayan faktör ise nikotinamid kofaktörlerine olan ihtiyaçtır (Wang, Saba et al. 2017). Ek olarak, bu kofaktörler daha ekonomik insan yapımı herhangi bir kimyasal ile yer değiştirememektedir (Eckstein, Daubmann et al. 2004).

Genellikle piridin nükleotidlerinin okside formu (NAD(P)⁺), indirgenmiş formu olan NAD(P)H ile kıyaslandığında daha ucuz ve daha kararlıdır. Buna ek olarak, NADP(H) ile karşılaştırıldığında NAD(H) kullanım maliyetleri 4-8 kat daha düşüktür ve NADH, pH ve iyonik şiddete bağlı olarak NADPH'ye kıyasla yedi kat daha yüksek kararlılık (yarı ömür) sergilemektedir (Wu and Knight 1986). Hem maliyetin yüksek olması hem de kararlılık problemleri kofaktör rejenerasyon metodlarının geliştirilmesinde itici güç olmaktadır. Başarılı metodlar ile kofaktör, sadece katalitik miktarlarda gerekli hale gelmektedir bu da maliyette büyük bir düşüşe yol açmaktadır (Chenault and Whitesides 1987).

Kimyasal (fotokimyasal ve elektrokimyasal) yöntemler ya da hücre temelli ve enzimatik yöntemler kofaktör rejenerasyonu için uygulanabilmektedir. Ditiyonit ve elektrotlar gibi basit kimyasal veya elektrokimyasal indirgeyiciler, NAD(P)H rejenerasyonunda uygulanabilirliği açısından karşılaştırılmıştır. B

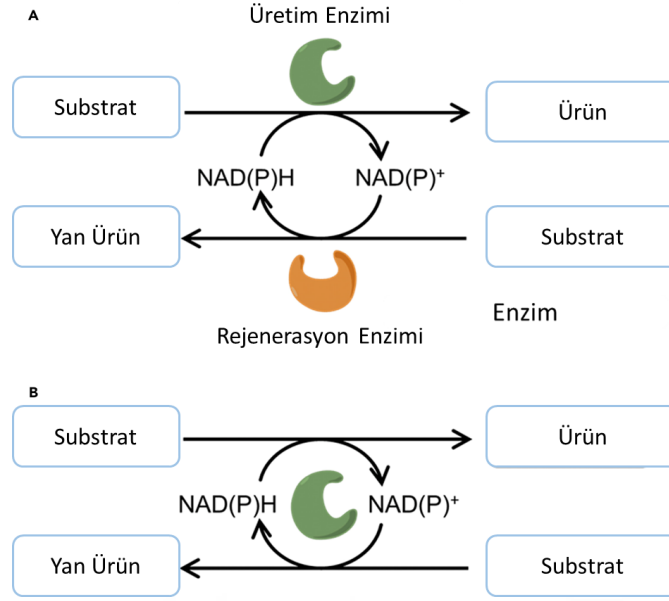
organometalik kompleks $[Cp * Rh (bpy) (H_2O)]_2C$, NADH rejenerasyonu için tek enzimatik olmayan katalizördür. Rodyum kompleksinin katalitik olarak aktif formu, kimyasal, elektrokimyasal veya fotokimyasal olarak yeniden üretilmektedir. Bununla birlikte, nispeten düşük spesifik aktivitesi ve inhibisyon problemleri bu uygulamayı sınırlandırmaktadır (Liu and Wang 2007).

Kimyasal yöntemlerin yanında, büyüyen hücreler mikrobiyal metabolizmalarını, NAD(P)H kofaktör rejenerasyonu için kullanmaktadırlar. Karbohidratlar indirgeme eşdeğerleri için kaynak olarak kullanılır (Haberland, Hummel et al. 2002). Ancak, enzim aktiviteleri belirli bir değeri aşarsa doğal kofaktör rejenerasyon sistemi sınırlayıcı olabilmektedir. Sonuç olarak, ek enzimatik kofaktör rejenerasyonu gerekli hale gelebilmektedir (Duetz, van Beilen et al. 2001). Hücre temelli sistemler uygulanabilir değilse, enzimatik metodlar kimyasal olanlara kıyasla daha çok tercih edilmektedir çünkü enzimatik sistemler ile daha yüksek biyoyumlulukta ve daha yüksek seçicilikte istenen total turnover sayısına ulaşılabilir.

Genel olarak, enzimatik kofaktör rejenerasyonu gelişmekte olan bir konudur. Daha fazla optimizasyonun NAD(P)H turnover sayısını dramatik bir şekilde arttıracakı düşünülmektedir ki bu da ekonomik fizibilite için gereklidir (van der Donk and Zhao 2003). Enzimatik kofaktör rejenerasyonu yöntemleri farklı iki yaklaşımı içinde barındırır bunlar, substrat çiftli ve enzim çiftli kofaktör rejenerasyonu olarak adlandırılmaktadırlar.

1.1.5 Enzim çifti ile kofaktör rejenerasyonu

Kofaktör rejenerasyonu ikinci bir enzim tarafından gerçekleştirilir (Şekil 3.1). En sık kullanılan enzimatik kofaktör rejenerasyonları; format dehidrojenaz (EC 1.2.1.2, FDH), glukoz dehidrojenaz (EC 1.1.1.47, GDH) ve glukoz-6-fosfat dehidrojenaz (EC 1.1.1.49, G6PDH) enzimleri kullanılarak gerçekleştirilmektedir (Şekil 1.10) (Liu and Wang 2007, Berenguer-Murcia and Fernandez-Lafuente 2010, Yan, Nie et al. 2011, Wang, Saba et al. 2017).



Şekil 1.10. Enzimatik kofaktör rejenerasyon sistemleri a) çift enzim çift substrat sistemi, b) çift substrat tek enzim sistemi.

Kofaktör rejenerasyonu için GdH kullanıldığında, glukoz kendiliğinden glukonik asidin hidroliz ürünü olan glukonolaktone dönüşmektedir. G(6P)DH (glukoz-6-fosfat dehidrojenaz)'nin kullanıldığı durumlarda enzim glukoz-6-fosfatın oksitlenmesini gerçekleştirmektedir ki bu da substratın hücre membranından alınmasını kolaylaştırmaktadır. Sonuç olarak bu enzim hücrenin tamamının kullanıldığı proseslerin kullanımını uygun hale getirmektedir (Şekil 1.6a, 1.6b) (Faber and Faber 1992, Kratzer, Pukl et al. 2008). Rejenerasyon enziminin NAD^+ veya NADP^+ 'ya karşı ilgisinin biyotransformasyonun verimi üzerinde etkisi vardır. Canlı hücreler ile gerçekleştirilen biyokataliz reaksiyonlarında, hangi sistem seçilirse seçilsin, ürün izolasyonundaki maliyet ve zorluklar veya ikincil üründen kaynaklanan inhibisyonlar (pH, ürün vb.) proseslerde aşılması gereken sorunlardır (Hilt, Pfeleiderer et al. 1991, Lee and Levy 1992).

Bristol-Myers Squibb, *Acinetobacter calcoaceticus*'a ait ADH'yi antikolesterol ilaçları için anahtar bir kiral ara ürün olan 6-benziloksi-(3R, 5S)-dihidroksi-heksanoik asit etil esterin üretimi için katalizör olarak kullanmıştır. Kofaktör NAD^+ , NADH rejenerasyonunu katalizleyen GdH ile birlikte reaksiyon ortamına eklenmiştir. ADH, ham hücre ekstraktları olarak uygulanmıştır. İşlem

%92'lik bir verimle ve %99'luk bir enantiyoseçilim (ee) ile gerçekleştirilmiştir (Patel, Banerjee et al. 1993). Buna ek olarak, Codexis çalışmasında, etil-(S)-4-kloro-3-hidroksibutirat üretimi için ADH ve GDH kullanımını araştırmıştır. Reaksiyon neredeyse tam verimle (>% 99.5) ve %99.9'dan daha büyük bir enantiyoseçilim ile gerçekleştirilmiştir. Bu durumda, enzimlerin süreç hedeflerine ulaşmak için yönlendirilmiş evrimle optimize edilmiştir (Davis, Grate et al. 2006).

GDH, kofaktör olarak hem NADP^+ 'nin NADPH 'ye hem de daha az sayıda örnekte olduğu gibi NAD^+ 'nın NADH 'ye eşzamanlı olarak indirgenmesiyle, β -D-glukozun β -D-glukon-1,5-laktona oksitlenmesini katalize etmektedir. Enzim, *Bacillus megaterium* (Pauly and Pfeleiderer 1975, Jany, Ulmer et al. 1984, Mitamura, Urabe et al. 1989), *Bacillus subtilis* (Fujita, Ramaley et al. 1977, Lampel, Uratani et al. 1986, Hilt, Pfeleiderer et al. 1991), *Gluconobacter suboxydans* (Adachi, Matsushita et al. 1980), *Halobacterium mediterranei* (Bonete, Pire et al. 1996), *Thermoplasma acidophilum* (Smith, Budgen et al. 1989, Bright, Byrom et al. 1993) ve *Sulfolobus solfataus* (Giardina, de Biasi et al. 1986) gibi çeşitli organizmalardan izole edilebilmektedir. Glukoz dehidrojenaz, NADP^+ 'nin yanı sıra NAD^+ 'ı da kofaktör olarak kabul etmektedir. Bu nedenle, bu enzim hem NADPH hem de NADH 'nin rejenerasyonu için iyi bir alternatiftir.

Kiral ilaçların sentezinde temel yapı taşları ve başlangıç materyalleri olan kiral hidroksitler, amino asitler veya alkollerin, prokiral keton bileşiklerinin asimetric indirgenmeleri ile üretimleri saf enantiyomerlerin eldesinde önemlidir. Hali hazırda kullanım alanı bulan oksidoredüktazların çoğunluğu nikotinamid koenzimlerine bağlıdır. NADH için, format/format dehidrojenaz (FDH) temelli rejenerasyon geliştirme aşamasında en çok yol katedilmiş olandır (Hummel 1999). Bununla birlikte, FDH'nin orta dereceli kararlılığı ve düşük spesifik aktivitesi, özellikle endüstriyel uygulamalar için kritik sorunlara sebep olmaktadır. Protein mühendisliği, immobilizasyonu yöntemleri ve yeni mikrobiyal enzimlerin karakterizasyonu ile bu sorunlar engellenebilir.

GDH'nin uygulama alanlarından biri NADH 'nin yenilenmesidir. Sığırcı karaciğeri glutamat dehidrojenazı kullanılarak, 2-keto-6-hidroksiheksanoik asidin sentezinde *Bacillus* sp.'den elde edilen enzim NADH 'yi rejenere etmede

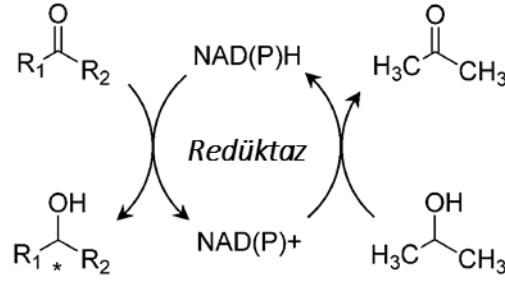
kullanılmıştır (Hanson, Schwinden et al. 1999). Başka bir çalışmada *Bacillus* sp.'den elde edilen GDH, *Pseudomonas putida* IAM12014'den elde edilen L-karnitin dehidrojenaz ile birlikte kullanılarak 3-dehidrokarnitininin L-karnitine dönüşümü amacıyla kullanılmıştır (Lin, Miyawaki et al. 1999).

NADPH spesifik GDH enzimlerinin kullanılması NADPH kofaktörlerin rejenerasyonunu gerçekleştirebilmektedir (Richter, Neumann et al. 2010, Corpas and Barroso 2014). NADPH bağımlı oksidoredüktaz sınıfı enzimlerin kiral katalizde *in vitro* kullanım alanı bulabilmesi NADPH rejenerasyon sisteminin etkinliğine bağlıdır (Wang, Saba et al. 2017). Etil 4-kloro-3-oksobutanoatın asimetrik indirgemesi için, *Sporobolomyces salmonicolor*'dan bir aldehit redüktaz ve NADPH rejenerasyonunu için *Bacillus megaterium*'den GDH ile birleştirilmiştir ve birlikte eksprese edilmişlerdir (Kataoka, Yamamoto et al. 1999). *Gluconobacter scleroides* GD3613'ten GDH, L-leucovorin üretiminde kofaktör rejenerasyonu için kullanılmıştır (Eguchi, Kuge et al. 1992). Glikoz-6-fosfat dehidrojenaz ayrıca NADPH'yi de rejenere edebilmektedir. Ticari olarak temin edilebilen glukoz-6-fosfat dehidrojenaz, NADPH'yi (Hummel 1990) ve ayrıca *Leuconostoc mesenteroides*'den elde edilen glukoz-6-fosfat dehidrojenazı yenilemek için de kullanılmıştır (Wong and Whitesides 1981).

1.1.6 Substrat çifti ile kofaktör rejenerasyonu

Substrat çifti ile kofaktör rejenerasyonu gerçekleştirmek için kullanılan enzim, hedef substratı indirgerken, aynı enzim ucuz ikinci bir substratı okside ederek indirgenmiş kofaktörü rejenere eder. Belirgin bir örnek olarak, keton indirgenmesinde alkol dehidrojenazların kullanımı verilebilir (Şekil 1.11). Bu keton indirgenmesi reaksiyonunda ucuz bir kosubstrat olarak izopropanolün indirgenmesi ve NADPH oksidasyonu gerçekleşmektedir (Goldberg, Edegger et al. 2006). Substrat çiftli kofaktör rejenerasyonlu biyotransformasyon işlemlerinde izole edilmiş enzimlerin kullanılabilmesi için, enzimin yüksek kosubstrat konsantrasyonlarına dirençli olması gerekmektedir. *Lactobacillus brevis*'ten elde edilen at ciğeri alkol dehidrojenazı (HLADH) ve ADH enzimleri kısmen daha yüksek alkol konsantrasyonuna dayanabilmektedir (Hummel 1997). Bu sebeple, bu enzimler propargil alkollerin enantioselektif sentezlerinde katalizör olarak

kullanılmaktadırlar ve substrat çiftli kofaktör rejenerasyonu uygulamasıdır (Schubert, Hummel et al. 2002). Kosjek ve arkadaşları (2004), *Rhodococcus ruber* DSM 44541'den saflaştırdıkları ve karakterize ettikleri ADH-‘A’ enziminin 50% (v/v) aseton konsantrasyonuna ve neredeyse 80% (v/v) 2-izopropanol konsantrasyonuna dayandığını kanıtlamışlardır.



Şekil 1.11 Substrat çiftli ile kofaktör rejenerasyonu,

Bu özelliklerinden dolayı bu enzimler substrat çiftli kofaktör rejenerasyonu proseslerinde oldukça dikkat çekici biyokatalizörlerdir (Hummel, Abokitse et al. 2003, Kosjek, Stampfer et al. 2004). Biyokatalizörleri organik çözücülere karşı daha stabil hale getirmek için başarılı çalışmalar gerçekleştirilmiştir. HLADH, NADH varlığında kristalleştirilmiş ve elde edilen kristaller çapraz bağlanmış enzim kristallerini elde etmek için glutardialdehit ile muamele edilmiştir. İmmobilizasyon stratejisinin serbest HLADH'ye kıyasla 2-propanol gibi organik çözücülere karşı yüksek stabilite kazandırdığı gösterilmiştir (St Clair, Wang et al. 2000).

Kofaktör rejenerasyonunda propanolün asetona oksidasyonu sırasında enzim inhibisyonunu yavaşlatmak için açığa çıkan aseton reaksiyondan vakumla uzaklaştırılması gerekmiştir (Stillger, Bönitz et al. 2002). Bu uygulama endüstriyel proseslerde de önemli bir yer tutmaktadır. Wacker Fine Chemicals, ton ölçeğinde β -keto ester üretiminde, saf *Lactobacillus brevis* ADH'ını biyokatalizör olarak kullanırken (R)-etil-3-hidroksibutiratın sentezini gerçekleştirmektedir. Reaksiyon ortamına eklenen 2-propanolün asetona oksidasyonu sırasında aynı enzim kofaktör rejenerasyonunu gerçekleştirmektedir. Açığa çıkan asetonun inhibisyon etkisini engellemek için aseton sürekli olarak ortamdan vakumla

uzaklaştırılmaktadır, bu strateji denge reaksiyonunu tam dönüşüme doğru kaydırmış ve alt akım işlemlerini kolaylaştırmıştır (Winkler, Tasnádi et al. 2012).

Prokiral ketonların indirgenmesinde enzimlerin biyokatalizörler olarak kullanılmasındaki ana problem, birçok ketonun sulu çözeltilerdeki düşük çözünürlüğüdür. Bu nedenle, bazı hidrofobik substratların indirgenmesi için bifazik bir sistemin oluşturulması tercih edilmektedir. Sıvı-sıvı ara yüzeyin oluşması, suda bulunan solvent kalıntılarının biyokatalizin deaktivasyonuna sebep olması ve düşük enzim stabilizasyonu bifazik enzimatik reaksiyonlarda görülen önemli bir dezavantajdır (Villela Filho, Stillger et al. 2003).

1.2 Protein Mühendisliği

Enzimler özgün biyolojik katalizörler oldukları için, metabolik hastalıkların tedavisinde kullanılan terapötik maddelerin en başarılılarını yaratmaları beklenir. Ancak bu makromoleküllerin vücut içinde etkinliklerini hızla kaybetmesi, hedef bölgeye ulaşamaması ve bağışıklık sisteminde istenmeyen yan etkiler; enzimlerin ve diğer proteinlerin klinik kullanımlarını sınırlamaktadır. Kan dolaşımındaki yarı ömür ya da bulundurdıkları yerdeki yarı ömür özellikle de proteolitik aktivite sebebiyle, protein yapılı enzimlerin kullanımını sınırlayan başlıca etmendir. Bu engellerin aşılabilmesi amacıyla terapötik proteinler, protein mühendisliği yöntemleri kullanılarak geliştirilebilmektedir. Bir proteinin özelliklerinin geliştirilmesi amacıyla yapısının değiştirilmesine yönelik işlemler protein mühendisliği olarak tanımlanmaktadır (de Carvalho 2011). Protein mühendisliği yöntemleri enantiyoselektivite gibi temel enzim özelliklerinin geliştirilmesi değiştirilmesi ve sentetik reaksiyonlarda kullanım amacıyla yeşil ve vazgeçilmez yeni fırsatlar sunmaktadır (Ueda and Tanaka 2000, Arnold 2001, Holsch and Weuster-Botz 2010).

Rekombinant DNA teknolojisinin ilerlemesi, bir proteinin amino asit sekansının uygulamalarını doğrudan etkilemektedir. Bölgesel yönlendirilmiş mutajenez ya da protein mühendisliği olarak ifade edilen bu süreç, ilgili polipeptit için nükleotid sekans kodlamada kontrollü değişimlere yol açar ve amino asit diziliminde belirli, önceden tasarlanmış değişimler sunmaktadır. Bu farklılıklar

ekleme, silme ya da yer deşiştirmeleri içerebilmektedir (Gumulya, Baek et al. 2018). Bölgesel yönlendirilmiş mutajenez, değiştirilmiş nükleotid sekanslarının primerlerinin PCR reaksiyonları için kullanıldığı, "overlap PCR" olarak bilinen, temel PCR'ın bir türevinin kullanılmasıyla uygulanmaktadır.

Protein mühendisliği, bir polipeptitin amino asit sekansı ve yapısı arasındaki bağlantıya yönelik çok daha geniş bir bilgi sağlamaktadır. Ayrıca yapı ve işlevi arasındaki ilişki üzerinde çalışmak için güçlü bir metot sunmaktadır. Benzer şekilde, bu tekniğin, çok araştırılan fakat hala çok geride olan “novo protein” tasarımı hedefinde de çok büyük ölçüde yardımcı olacağı öngörülmektedir. Protein mühendisliği ayrıca terapötik ve diğer ticari olarak önemli enzimlerin yapısal ve işlevsel özelliklerinin uygun hale getirilmesi için kullanılmaktadır.

Genel medikal kullanım konusunda onay alan terapötik enzimlerin gittikçe artan bir kısmı, daha önceden belirlenmiş terapötik bir hedefe daha kolay ulaşmak adına değiştirilmiştir ve bu mühendisliğin ürünü olan amino asit sekanslarına sahiptir. Protein mühendisliğine alternatif bir yaklaşım da, belirli moleküllerin/grupların, polipeptit omurgasına veya polipeptit omurgasının üstüne kovalent bağlanmasına veya değişimine yol açmaktadır.

Rekombinant DNA teknolojisinin yanı sıra, protein mühendisliği yöntemleri arasında, immobilizasyon yöntemleri: kovalent bağlama, adsorbsiyon ve enkapsülasyon sıralanabilir (Wohlgemuth 2010, Cassimjee, Kourist et al. 2011). Enzimlerin endüstriyel kullanım potansiyelleri immobilizasyon yöntemleri kullanılarak sağlanabilmektedir. Bunun yanında enkapsülasyon yöntemleri, enzimleri etkin biçimde ortam koşullarından korumak için ideal yöntemler olarak değerlendirilebilir (Pavlidis, Vorhaben et al.).

Enzim üretiminde rekombinant DNA teknolojisinin varlığı sayesinde, daha önce çok zor ve pahalı olan, büyük miktarlardaki farmasötik proteinlerin üretimi sağlanmaktadır. Rekombinant DNA teknolojisi sayesinde birçok modifikasyon yapılarak protein üretiminde karşılaşılan aktivite kaybı, düzenlenmenin gerekliliği, istenmeyen yan etkiler gibi sorunların üstesinden gelinebilmektedir.

Terapötik enzimlerin üretimi için kullanılan rekombinant DNA teknolojisi, protein için DNA klonlama, ekspresyon vektörünün içine yerleştirme ve bu vektörün uygun konak canlıya transformasyonu, daha sonrasında ise büyük ölçekte ekspresyon ve saflaştırma olarak özetlenebilir (Schmidt, Hasenpusch et al. 2006, Chemler, Fowler et al. 2010, de Carvalho 2011).

Keton indirgeme reaksiyonları, katalizörün yapısını değiştirilmesi, katalizörü iyileştirmek ve reaksiyon mühendisliği veya genel proses mühendisliği yoluyla prosesin değiştirilmesi de dahil olmak üzere çeşitli yollarla tasarlanabilmektedir (Jemli, Ayadi-Zouari et al. 2016, Himmelberger, Cole et al. 2018). Termostabilite, enantiyoseçimlilik ve kofaktör spesifikliği, açısından, doğal ve enzim mühendisliği teknikleri ile iyileştirilmiş, keton redüktaz enzimi endüstriyel amaçlar için çok iyi karakterize edilmiştir (Sheldon and Rantwijk 2004, Asako, Shimizu et al. 2008, Zhu, Yang et al. 2008, Zhang, Xu et al. 2009). Enzimlerin özelliklerini geliştirmek amacıyla kullanılan yöntemlerin başında yönlendirilmiş evrim teknikleri gelmektedir (Wang, Si et al. 2012, Arnold 2018).

Farmasötiklerin kompleks ve optikçe aktif moleküller olması göz önüne alındığında; kiral öncül bileşiklerin sentezinde karbonil redüktaz temelli biyokataliz reaksiyonları, saf enantiyomerlerin üretimini verimli, ölçeklenebilir yollarla tasarlamak ve iyileştirmek için sınırsız fırsatlar sağlamaktadır. Enzim mühendisliği ve reaksiyon mühendisliği, saf ve yeşil üretim proseslerinin hayatımızda daha çok yer alması mümkün olacaktır.

1.3 Enzim İmmobilizasyonu

Katalitik aktivitesi durdurularak uzayın kesin ve tanımlı bir bölgesinde fiziksel olarak hapsedilmiş veya lokalize edilmiş, tekrar tekrar ve devamlı olarak kullanılabilen enzimler, immobilize enzimler olarak tanımlanmaktadır. Enzimler doğaları gereği çözünebilen biyomoleküller olduklarından; serbest enzim kullanımı, ürünün kirlenmesi, reaksiyon karışımından ayırmakta karşılaşılan zorluklar, düşük stabilite ve sınırlı yeniden kullanım gibi problemlere sebep olabilmektedir. Enzimleri çözünmez hale getirmek ise bu sorunların aşılmasını

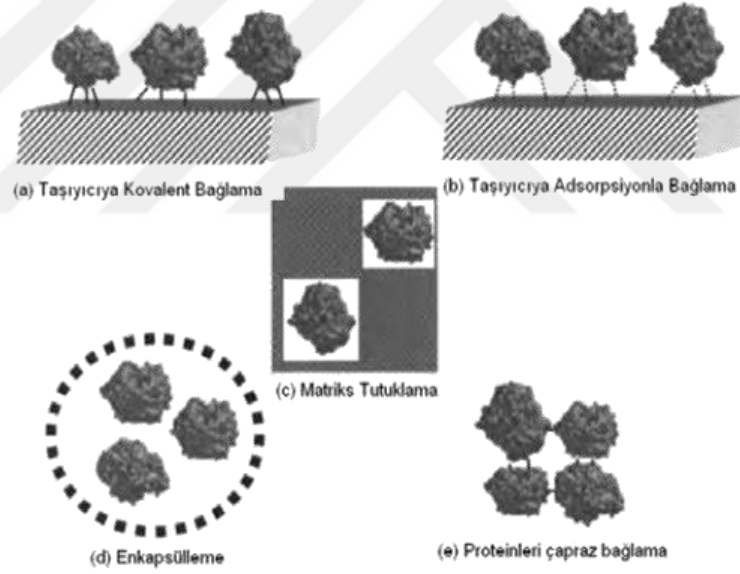
sağlamaktadır (de Poulpiquet, Ciaccafava et al. 2014). Enzim immobilizasyonu, kısmen bilim ve kısmen sanat içeren geniş bir konudur (Cao 2005).

İmmobilize enzimler çeşitli birçok uygulama alanına sahiptirler (Hanefeld, Gardossi et al. 2009, Cipolatti, Silva et al. 2014). Enzimlerin ticarileştirilebilmesi için stabilizasyonu sağlamak oldukça önemli bir faktördür, çünkü enzimlerin nakliye ve depolama sırasında aktivitelerindeki değişimi önlemek için stabilize edilmesi gerekmektedir. Bu nedenle, küçük moleküllü katkı maddelerinin eklenmesi, farklı miktardaki enzimlerin ticari üretimi ve satışı için ortaktır. Bununla birlikte, stabilizasyonu sağlamak endüstriyel proseslerde çok daha zordur. Reaktörlerin içinde veya paketlenmiş yataklı bir reaktörde desteklerin üzerinde enzimin immobilize edilmesini gerektiren biyoproseslerde, tipik olarak dağıtım ve dopalama için yapılan işlemlerle bir enzimi stabilize etmekten daha zordur. Biyoproses uygulamaları, gıda uygulamalarından (glukoz izomerazın yüksek fruktoz içeren mısır şurubu üretiminde) farmasötik uygulamalara (ilaç uygulamalarında istenen kiraliteyi yakalama ve butanolün enzimatik üretimi) kadar geniş bir alanı kapsamaktadır (Moehlenbrock and Minter 2017). Bu prosesler, “hücreless biyoteknoloji” veya “hücreless biyoproses” olarak adlandırılabilir, çünkü enzimler hücre içi bileşenlerdir (Moore, Akers et al. 2004).

İmmobilize enzimler, çeşitli reaktörlerde tekrar tekrar ve sürekli kullanılabilirler. Bir reaksiyon sonunda ortamdan kolayca ayrılabilirler ve böylece son ürünün enzim tarafından kirletilmesi gibi problemler oluşmamış olur. Ayrıca immobilize enzimler pH ve sıcaklık gibi çevre koşullarına karşı daha dayanıklıdır, kararlılıkları doğal enzimlere kıyasla oldukça yüksektir. Immobilizasyon bunun gibi pek çok avantaj sağlamaktadır (Cipolatti, Silva et al. 2014). Bununla birlikte, immobilize enzim uygulamalarının, protein bağlama verimi, maliyet, enzim aktivitesinde düşüş gibi dezavantajları da mevcuttur. Ancak bu dezavantajlara rağmen, teraziye avantajların bulunduğu kefe ağır basmakta, dolayısıyla immobilizasyon yöntemlerinin biyoteknoloji ve endüstride kullanım alanları ve yapılan çalışmalar her geçen gün daha da artmaktadır.

1.3.1 Enzim immobilizasyon yöntemleri

Bir enzim immobilizasyon stratejisi seçerken göz önünde bulundurulması gereken birkaç faktör vardır, bunlar; immobilizasyon sonrası oluşan kimyasal ve fiziksel ortama enzimin toleransı, protein üzerindeki yüzey fonksiyonel grupları, enzimin büyüklüğü, protein / pI'nin yükü, proteinin polaritesi (hidrofobik / hidrofilik bölgeler) ve substrat / ürün taşınımıdır. Enzimlerin immobilizasyon yöntemleri genel olarak non-kovalent adsorbsiyon, kovalent bağlama, çapraz bağlama, tutuklama ve enkapsülasyon olmak üzere 4 ana başlık altında incelenmektedir (Şekil 1. 12). Bu dört grubun avantaj ve dezavantajları Tablo 1.1'de özetlenmiştir.



Şekil 1.12 İmmobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması (Karlheinz ve Herbert, 2002)

Tablo 1.2. Çeşitli immobilizasyon yöntemlerinin karşılaştırılması (KarlheinzveHerbert, 2002)

İmmobilizasyon Yöntemi	Avantaj	Dezavantaj
Adsorbsiyon	- Kolay - Enzimin kimyasal modifikasyonuna gerek yoktur - Tersinirdir - Genellikle ucuzdur	- Zayıf bağlanma ve enzim kaçıışı - Zayıf ya da olmayan stabilite - Spesifik olmayan bağlanma - Kütle transferini önleyebilir
Kovalent Bağlama	- Sıkı bağlanma - Çok sayıda destek materyali ve kovalent bağlayıcı - Enzim miktarının mikro çevrenin rasyonel olarak kontrolü	-Enzimlerin kimyasal modifikasyonu - Genellikle pahalı - Taşıyıcı ile aktivitenin düşmesi - Kütle transferini önleyebilir - Zayıf ya da olmayan stabilite
Tutuklama	- Enzimin kimyasal modifikasyonuna gereksinim yoktur	-Çevresel koşullara bağımlıdır
Enkapsülasyon	- Basit - Hücreler için uygunluk	-Genellikle kütle transferinin önlenmesi
Çapraz Bağlama	-Yüksek hacimsel aktivite -Yüksek sıcaklık ve organik çözücülere uygunluk - Taşıyıcı gerektirmez - Sıkı bağlanma - Hücreler için uygunluk	- Enzimlerin kimyasal modifikasyonu - Partikül özelliklerinin kontrolünün zor oluşu - Enzimlerin kristalizasyonunu gerektirmesi - Kütle transferini önleyebilir

Farklı enzimler için gereksinimlerin değişmesine ve belirli bir uygulama için belirli koşullar gerekmesine rağmen, belirli karakteristik özellikler genellenebilir. Örneğin çok noktalı kovalent bağlama, immobilize edilmiş enzimlerin termal stabilizasyonu için en etkili yöntemlerden biridir. Çok noktalı immobilize edilmiş enzim molekülünün yapısı daha stabil olur ve sonunda konformasyonel değişime ve enzim inaktivasyonuna yol açabilecek moleküler hareketleri engellemektedir. Bununla beraber, bir enzimi desteğe bağlarken stabil kovalent bağ kullanmanın enzim aktivitesi için zararlı olduğu ve biyokatalistin aktivitesini azaltabilmektedir. İyonik ve hidrofobik etkileşimle oluşan immobilizasyon, kovalent bağlamadan daha az kalıcı bir birleşme sağlar, fakat geri döndürülebilir olma avantajına sahiptir, böylece enzim inaktive olduğunda destek yeniden kullanılabilir. İyonik ve hidrofobik etkileşimler ayrıca fizyolojik olmayan ortamlarda doğal yapının bozulmasına karşı fazladan stabilite sağlayabilir ve biyokatalistin katalitik özelliklerini artırabilecek korumalı bir mikroortam yaratabilmektedir. Fakat enzim ve destek arasındaki zayıf bağın şöyle bir dezavantajı olabilir: absorbe edilmiş enzim reaksiyon ortamında pH, iyonik güç veya sıcaklık gibi değişimlerde desteğinden süzulebilmektedir.(Illanes, Cauerhff et al.)

Enzim immobilizasyonunda hedef, immobilizasyonun diğer avantajlarını (daha yüksek stabilite gibi) yok etmeden yüksek aktivite elde etmektir. Son yıllarda daha yüksek hacimsel aktivite sağlayan birçok yöntem rapor edilmiştir, bunların en etkililerinden biri enzimlerin fiziksel olarak agregatlaşması ve bunu takip eden kimyasal çapraz bağlamadır. CLEA'ların (çapraz bağlı enzim agregatları) hazırlanması kolaydır ve desteksiz biyokatalistler olarak pahalı desteklerin kullanımına alternatif sunmaktadırlar. Birçok enzim CLEA tekniklerinin kullanımıyla başarılı bir şekilde immobilize edilmiştir. Fakat aktif CLEA oluşturabilecek enzim çeşitliliği, kimyasal çapraz bağlamaya karşı koyma yetenekleri sebebiyle kısıtlanabilir (Illanes, Cauerhff et al.).

Tutuklama, hücreyi ya da enzim molekülünü belli bir ortamda durmaya zorlamak olarak tanımlanabilir. Hücre ya da enzim bulunduğu çevreden dışarı çıkamaz. Bu yöntemi kovalent bağlama ve çapraz bağlama ile immobilizasyondan ayıran en önemli özellik enzim molekülünün fiziksel ya da kimyasal olarak her

hangi bir taşıyıcıya bağlanmamış olmasıdır. Tutuklama matrisinin yoğunluğuna göre proteinin mikro çevresi çok az değişebilir ve bu sayede katalitik aktivitedeki kayıp minimize edilebilmektedir. Tutuklama için kullanılan matrisin gözenek yapısı substrat ya da ürün gibi küçük moleküllerin geçmesine izin verirken enzimin difüzyonuna izin vermeyecek şekildedir. Gözenek çapının hassas kontrolü çoğunlukla mümkün olmadığından kütle transferinin kısıtlanması tutuklanmış enzim ve hücreler için önemli bir problem olabilmektedir. Enkapsülasyon ise; katı, sıvı veya gaz halindeki gıda bileşenlerinin, enzimlerin, hücre ve diğer maddelerin, mikroorganizmaların protein veya karbohidrat esaslı bir kaplama materyaliyle paketlenmesi şeklinde tanımlanabilir. Kısaca enkapsülasyon, biyokatalistin yarı geçirgen bir membran içinde tutuklanmasını ifade etmektedir.

1.3.2 Nanopartiküller ve immobilizasyon

Enzimler ve enzim immobilizasyonu, oldukça geniş, sürekli yeni araştırmalara ev sahipliği yapan ve zaman geçtikçe daha da büyüyen bir konudur. Ancak terapötik amaçlı kullanımları, henüz oturmamış ve daha fazla araştırılması gereken, önü açık bir daldır. Örneğin, özellikle yeni enzimlerin bu amaçla kullanımları sınırlıdır ve bunların etkin bir şekilde dokulara veya hücreye taşınması konusundaki araştırmaların artması gerekmektedir. Bu taşınım için kullanılması gereken, kullanılan ya da önerilen yöntemler arasında immobilizasyon teknikleri standart ve rutin olarak ön plana çıkmıştır. Bu ön plana çıkan immobilizasyon yöntemlerinin de daha etkili olabilmesi için, nano boyutlarda olması avantaj sağlar.

Nanoteknolojideki son gelişmeler, potansiyel olarak enzim immobilizasyonunu destekleyebilecek nano iskelelerin çeşitliliğinin zenginleşmesini sağlamıştır. Son çalışmalarda, enzimlerin, küreler, lifler ve tüpler gibi nano boyutlu iskelelere immobilizasyonu rapor edilmiştir. (Illanes, Cauerhff et al.)

İmmobilizasyon için nanoiskelet yapıların kullanılmasının, difüzyon limitini azaltacağı ve enzim yüklemesini artırmak için fonksiyonel yüzey alanını en üst

düzeğe çıkaracağı öngörülmektedir. Buna ek olarak, bu nanopatiküllerin; artırılmış yayılma karakteristikleri ve tanecik hareketliliği gibi fiziksel özellikleri, bağılı enzimlerin kendi doğal katalitik aktivitelerini etkileyebilir (Ansari and Husain 2011). Nano boyutlardaki immobilizasyonlar için nanotaşıyıcıların geliştirilmesinin yanı sıra, enzimlerin de mümkün olan en küçük yapılarda elde edilebilmesi gerekir. Bunun için kullanılan yöntemlere bakıldığında ise, bir nano malzeme üzerine enzimin kovalent modifikasyonu, kovalent olarak bağlanması ve adsorbsiyon en sık karşılaşılan ve önerilen stratejilerin arasındadır (Kim and Grate 2003).

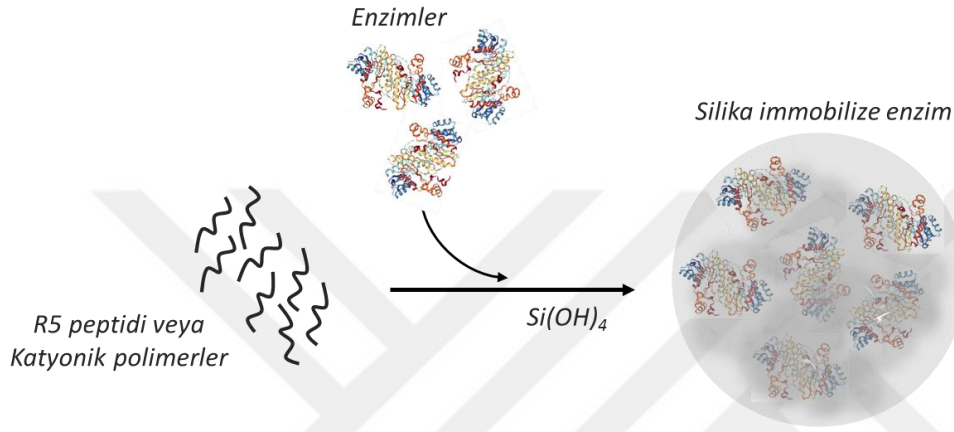
Bunların yanı sıra, CLEA, CLEC, ya da biyosilika gibi kendi kendine immobilizasyon olarak nitelendirilen yöntemler, terapötik kullanım amacı taşıyan nano boyutlarda proteinlerin, enzimlerin elde edilebilmesi için önemli bir aşamadır. Çünkü CLEA, CLEC ve biyosilika enkapsülasyona bakıldığında, yapılan çalışmalarda elde edilen malzemelerin genellikle 100-200 nm altında tutulabildiği gözlenmiştir.(Vrieling, Sun et al. 2005)

CLEA ve biyosilika nanoenkapsülasyon, self immobilizasyonun bir türüymüş gibi durmasa bile, enzimin kendisinin, kendi kendini immobilize edebilme yeteneği kazanması üzerine tasarlandığı için, kendi kendine immobilizasyon olarak adlandırılmalıdır. Bu yöntemler kullanılarak, nano yapıda immobilize ve enkapsüle biyokatalizörler elde edilebilmektedir. CLEA enkapsülasyon olarak kabul edilemez ancak kendi kendine immobilizasyonun bir türüdür ve nano boyutlarda çapraz enzim agregatları elde etmeye olanak sağlar.

1.3.3 Biyosilika immobilizasyonu

Enzim immobilizasyonu ve biyoteknolojik uygulama alanları dikkate alındığında silika ve türevlerinin kullanıldığı çok sayıda uygulama vardır (Brandstadt 2005, Sheldon 2007, Baccile, Babonneau et al. 2009, Min and Yoo 2014). Biyokataliz, in-vitro ve in-vivo diyagnostik, tarım, enerji, gıda gibi sayısız alanda bilimsel çalışmalar günümüzde popüler konular arasında yer almaya devam etmektedir (Min and Yoo 2014).

Silaffin yapısını oluşturan alt birimlerden 19 amino asitlik “R5” peptidinin in vitro koşullarda fizyolojik pH’da silika kondenzasyonunu katalizleyebildiği gösterilmiştir (Tajuddin, Voelcker et al. 2007, Chien and Lee 2008, Emond, Guieysse et al. 2012).



Şekil 1.13. Protein moleküllerinin biyomimetik silika immobilizasyonu.

R5 peptidi temelli silika jel oluşumu, pH 7-8 arasında gerçekleşirken beraberindeki diğer proteinler veya makromolekülleri de sol-jel içerisinde tutuklayarak, dakikalar içerisinde birlikte çökmektedir (Kroger, Deutzmann et al. 2001, Marner, Shaikh et al. 2007). Biyomimetik silika oluşumu ve enzim immobilizasyonu sırasında silika ağ içerisinde tutuklanma verimi %95’ler seviyesine ulaşabilmektedir.

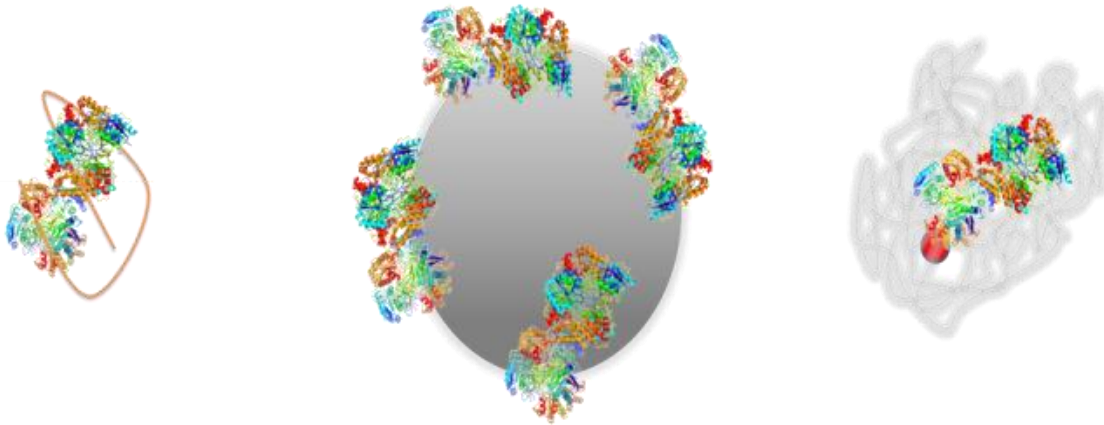
Biyosilisifikasyon ile silika nanopartiküllerin sentezini doğanın yaptığı gibi enzimlere oksidoredüktaz, hidrolaz ve izomeraz enzim yelpazesi için incelenmiştir. R5 peptid, tarafından katalize edilmiş silika oluşumunun, birçok monomerik ve multimerik enzim enkapsülasyonu denemesinde yüksek aktivite geri kazanımıyla enzimlerin immobilizasyonuna olanak verdiği gösterilmiştir (Betancor and Luckarift 2008, Cao, Ye et al. 2010).

Silika kapsül içine hapsetme, hem çalışma stabilitesi (kataliz boyunca yeniden kullanım) hem de doğal katalitik stabilite (denatürasyona direnç) açısından kapsüllenen enzime dikkate değer bir stabilite kazandırmaktadır (Kroger, Deutzmann et al. 2001, Kroger, Lorenz et al. 2002).

Silaffin polipeptidinin tekrarlayan birimi olan R5 peptid (H₂N-SSKKSGSYSGSKGSKRRIL-COOH) bütirilkolinesteraz'ı immobilize etmek için değerlendirildiğinde, yüksek aktivite gösteren ve stabil biyosilika partikülleri elde etmişlerdir (Luckarift, Spain et al. 2004).

Enzim ve silisik asit içeren çözeltiye R5 peptid'in eklenmesi, oda sıcaklığında ve ılımlı kimyasal reaksiyon koşullarında biyosilisifikasyonu başlattığı gsterilmiştir (Naik, Tomczak et al. 2004, [Anon] 2004). R5 füzyonların kullanılmasında ise, fosfodiesteraz ve organofosfat hidrolaz peptidleri E. coli'de immobilize enzim preparatları olarak yakın zaman önce üretilmiştir. Her bir füzyon protein, silika polimerlerinin oluşumunu başlatmış ve sonuçta oluşan silika kürelerinde enzim aktivitesi %69-97 oranında korunmuştur. Bu noktadan hareketle, R5 peptidinin herhangi bir proteinin yapısına eklenmesi, proteine silika nanokafes oluşturabilme yeteneği kazandırır ve kafese hapsedilen enzim ise aktivitesini serbest enzime kıyasla daha uzun süre korumaktadır.

Çeşitli metabolik öneme sahip ve terapötik amaçla kullanılan enzimlere uygulanabilecek bu yöntemde nanokafesler boyut ve şekilleri, metabolitlerin giriş-çıkışı ve nanoparçacıkların hedef bölgeye ulaştırılması için istenen özelliklerde tasarım avantajları taşımaktadır. Bununla birlikte enzim taşıyan biyosilika nanokafes yüzeyinin kolay modifiye edilebilmesi, Biyosilika -sol-jelin-konvansiyonel silika partiküllere kıyasla çok daha geniş poröz yapıda (2-50 nm) olması; birden fazla enzimin birarada immobilizasyonu ile çok fonksiyonlu nanobiyokatalizörlerin tasarımını mümkün kılar (Şekil 1.11).



Şekil 1.14. Enzim immobilizasyonu a) PEG Kuyruk ile Sarılı Enzim b) Silika Yüzeye Bağlanmış Enzim c) Biyosilika Nanokafese Hapsedilmiş Enzim.

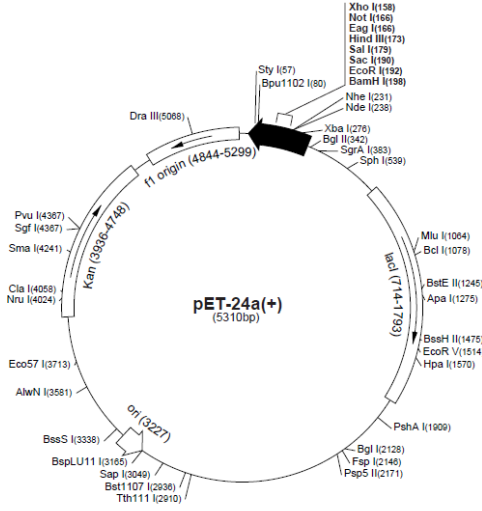
2. MATERYAL ve YÖNTEM

2.1. Bakteriler

Klonlama çalışmalarında *E. coli DH5a* (New England Biolabs, Frankfurt) hücreleri kullanıldı. Protein ekspresyonu çalışmaları ise *E. coli* BL21 (DE3) hücreleri kullanılarak gerçekleştirildi.

2.2. pET-24a(+) vektörü

pET vektör sisteminde (Novagen, Darmstadt), *E.coli* promotorlarına dayalı sistemlerden (lac, tac, pL) farklı olarak T7 promotoru bulunur ve hedef genin transkripsiyonu *E. coli* RNA polimeraz yerine T7 RNA polimeraz tarafından gerçekleştirilir. Bu amaçla kromozomunda T7 RNA polimeraz genini taşıyan özel *E.coli* suşları geliştirilmiştir. Bu türlerde, T7 RNA polimeraz geni lac promotorun downstream bölgesine klonlanmıştır ve transkripsiyon izopropil- β -Dtiyogalaktopiranozid (IPTG) indüksiyonu sonucu gerçekleşir. Hedef genin transkripsiyonu vektördeki lac operatörü, lacI ve büyüme ortamına eklenen IPTG tarafından kontrol edilir. Polilinker bölgenin 3' bölgesinde altı histidin kodonu bulunmaktadır. C-terminalde altı histidin artığı (His₆-tag) ile ifade edilen protein, nikel afinite kromatografisiyle saflaştırıldı. pET24a(+) vektörü beta-laktamaz kodlayan kanamisin dirençlilik geni (bla) içermektedir ve vektörü taşıyan hücreler bu şekilde seçilebilir (Şekil 2.1).R5 peptid dizisinin eklendiği füzyon proteinleri pET24a(+) vektörü üzerinde planlanarak tasarlandı.



Şekil 2.1. pET-24a(+) vektörü. Polilinker bölgesinde restriksiyon enzim kesim bölgeleri şematize edilmiştir.

2.3. pET-21a(+) vektörü

pET24a vektöründen farklı olarak sadece antibiyotik dirençliliği farklıdır. İki enzimin aynı hücrede birlikte ekspresyonu için glukoz dehidrojenaz geni pET21a(+) vektörüne transfer edilmiştir.

2.4. PCR Primerleri

Gerekli DNA kesim enzimlerinin tanıma bölgelerini ve amino asit değişikliklerini içerecek şekilde tasarlanan primerler Metabion (Martinsried, Almanya) firmasından temin edildi. Aşağıda listelenen 5'T7 Promotor, 3'T7 Terminatör koloni PCR'da ve klonlanan genin dizi analizinde kullanıldı. *B. subtilis* 168 hücrelerinden izole edilen DNA kalıp olarak kullanıldı; Glukoz dehidrojenaz ve keton redüktaz enzimleri için belirlenen gen erişim numaraları ve kullanılan primer çiftleri aşağıdaki tabloda sıralanmıştır.

Tablo 2.1. Glukoz dehidrojenaz ve keton redüktaz enzimlerinin klonlanmasında kullanılan primerler.

Gen Dizisi	Primer dizisi	Kesim
NC_000964.3	gdh-n-f ggaattccatgtatccggatttaaaagg	NdeI
(445344..446129)	gdh-x-r ccgctcgagttatgtttaaccgcggc	XhoI
nc_000964 region:	kred-b-f gcggatccatgacaacacatttacaagcaaaag	NdeI
445344...446129	kred-n-r gcggccgcttaaaatcaaagttgtccggatc	BamHI

Koloni PCR denemelerinde pET sisteminde kullanılan T7 ekspresyon sisteminin vektör üzerindeki ilgili dizilerine uyan dizileri için: T7-Promotor-taatacgactcactataggg ve T7-Terminatör-gctagttattgctcagcgg primerleri kullanıldı.

2.5. Kitler ve Sarf Malzemeler

B. subtilis 168'den genomik DNA izolasyonu için GeneJET Genomik DNA Saflaştırma Kiti ve E. Coli hücrelerinden plazmid DNA izolasyonu için GeneJET Plazmid Miniprep Kit Thermo Fisher (ABD) temin edildi. PCR ürünlerinin ve kesim ürünlerinin saflaştırılması için PureLink PCR Micro Kit Invitrogen (Almanya) satın alınarak kullanıldı. Restriksiyon kesiminden sonra elde edilen DNA parçalarının agaroz jelden izolasyonu için GeneJET Gel Extraction Kit Thermo Fisher (ABD) kullanıldı.

Santrifüj tipi ultrafiltrasyon tüpü Amicon Ultra 15-50; MWCO: 10 kDa, steril enjektör tipi 0,2 ve 0,45 µm por çaplı hidrofilik selüloz ester veya polietersulfon membran Merck Millipore (Almanya) satın alınarak kullanıldı. DNA ve protein kütle standartları Fermentas ve Pierce (Almanya) temin edildi. Saflaştırma reçineleri ve kolonlar Amersham Pharmacia (Almanya) firmalarından satın alınarak kullanıldı.

2.6. Enzimler

Koloni PCR reaksiyonları için, “DreamTaq DNA-Polimeraz” ve plazmid ligasyonu için “T4- DNA ligaz”, Thermo Scientific; klonlamada kullanılan “Pfu DNA-Polimeraz”, Promega (Almanya), restriksiyon endonükleazlar NdeI, XhoI,

BamHI, NheI NEW ENGLAND BIOLABS (İngiltere)'den satın alınarak ürün kullanım klavuzlarındaki protokoller dikkate alınarak kullanıldı.

2.7. Kimyasallar

Çalışmalarda kullanılan yüksek saflıktaki kimyasallar şu firmalardan temin edildi: Sigma-Aldrich (Almanya), Merck (Almanya), Fluka (Almanya) temin edilerek kullanıldı. Diğer kimyasallar analitik saflıkta temin edilerek kullanıldı.

2.8. Mikrobiyolojik Büyüme Ortamları

Hazırlanan büyüme ortamlarının sterilizasyonu otoklavda gerçekleştirildi. Seçici katı ortamların hazırlanması için ortamların sıcaklığı yaklaşık 60 °C'ye getirildi ve 1000X stok konsantrasyonda hazırlanmış ve steril filtreden geçirilmiş uygun derişimde ve türde antibiyotik çözeltisi eklendi. Kullanılan zengin besiyeriler ve içerikleri (Sambrook vd., 1989) aşağıda listelenmiştir.

Luria-Bertani (LB): 0,5 % (w/v) Yeast ekstrakt, 1,0 % (w/v) NaCl, 1,0 % (w/v) Tripton içeren çözelti otoklavlanarak tüm ekspresyon çalışmalarında kullanıldı.

LB-Agar: LB-Medium ve 1,5 % (w/v) Agar içeren çözelti otoklav ile sterilize edilerek ilgili antibiyotik ilavesinden sonra plakalar laminar flow altında hazırlandı ve tüm klonlama çalışmalarında seçici besiyeri ve stok petri olarak kullanıldı.

SOB: 0,5 % (w/v) Yeast ekstrakt, 0,05 % (w/v) NaCl, 2,0 % (w/v) Tripton; otoklavlandıktan sonra 10 mM MgSO₄, 10 mM MgCl₂ ve 2,5 mM KCl steril filtre edilerek kullanıldı.

SOC: Otoklavlanmış SOB ortamına 20 mM olacak biçimde steril glukoz çözeltisi eklenerek hazırlandı. Transformasyon sonrasında hücrelerin ilk inkübasyonlarında kullanılmak üzere hazırlandı ve 4 °C'de saklandı.

2.9. Tamponlar ve Çözeltiler

Kullanılan temel tampon ve çözeltiler 0.45 µm membranı filtre edilerek oda sıcaklığında saklandı. Çözeltilerin hazırlanmasında ultra saf su kullanıldı. Kromatografik ve elektroforetik uygulamalarda kullanılan tamponlar 0,2 µm membrandan geçirilerek oda sıcaklığında saklandı. Steril filtrasyon gerektiren çözeltiler steril filtreden geçirildikten sonra steril eppendorflarda porsiyonlanarak -20 °C’de saklandı.

Hücre kültürü çalışmalarında sık gereksinim duyulan çözeltiler:

Ampisilin stok çözeltisi (1000×): 150 mg/ml ampisilin (Na-tuzu) suda çözüldü ve steril filtre edilerek -20 °C’de stoklandı. Kanamisin stok çözeltisi (1000×): 30 mg/ml kanamisin suda çözüldü ve steril filtre edilerek 30 µg/mL olacak biçimde kullanıldı.

Protein ekspresyonu için İzopropil-β-D-tiyogalaktopiranozid stok çözeltisi: 1 M IPTG suda çözülerek steril filtre edildi -20 °C’de saklandı. Ekspresyon çalışmalarında 1 mM final derişimde kullanıldı. Kompetan hücre hazırlamakta kullanılan RbCl yöntemi(Green and Rogers 2013) için gerekli RF1 ve RF2 tamponları kullanıldı.

Metal-şelat afinite kromatografisi tamponları:

Metal afinite kromatografisinde kullanılan kolon reçinesinin dengelenmesi ve temizliği için gerekli çözeltiler hazırlandı. Yürütme tamponu: 25 mM KP, pH 7,5, 300 mM NaCl, 5 mM İmidazol; Elüsyon tamponu: 25 mM KP, pH 7,5, 300 mM NaCl, 500 mM İmidazol çözeltileri ile gradiyent elüsyon kullanılarak saflaştırma çalışmalarında kullanıldı.

SDS-PAGE elektroforez çözeltileri:

Protein ekspresyonu ve saflığının kontrolü için sık kullanılan stok çözeltiler hazırlandı. Amonyum persülfat (APS) stok çözeltisi (10%), -20 °C’de saklandı.

0,2 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-G250, 50 % (v/v) etanol, 10 % (v/v) asetik asit içerisinde hazırlandı.

A/B Jel Polimerizasyon özeltisi: 30 % (v/v) akrilamid, 0,8 % (v/v) bisakrilamid , 4 °C’de filtre edilerek koyu renk şişede saklandı.

Düzenleme jeli stok tamponu: 0,4 % (w/v) SDS, 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8;
Ayırma jeli stok tamponu: 0,4 % (w/v) SDS, 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8; SDS-PAGE yürütme tamponu: 0,1 % (w/v) SDS, 0,025 M Tris, 0,2 M Glisin;

SDS-PAGE örnek tamponu (6×):2 % (w/v) SDS, 10 % (w/v) Sorbitol, 5 % (v/v) β-Merkaptoetanol, 1 mM DTT; 0,01 % (w/v) Bromfenol mavisi, 1,25 M Tris/HCl, pH 6,8 olacak biçimde hazırlandı.

3. METODLAR

3.1. Mikrobiyolojik Yöntemler

Mikrobiyal büyüme ortamları kullanılmadan önce otoklavlandı. Besiyeri için gerekli özel bileşenler steril filtre edilerek steril olarak stoklandı. Pipet uçları ve mikrotüpler otoklavlandıktan sonra 65 °C’de kurutuldu. Protein üretimi çalışmaları dışında gerçekleştirilen tüm çalışmalar aseptik tekniğe uygun olarak mikrobiyolojik kabin içerisinde gerçekleştirildi.

3.1.1. E. Coli Hücrelerinin İnkübasyon Ve Saklama Koşulları

E. coli hücreleri protein ekspresyonu için 37 °C’de sıvı LB besiyerinde inkübe edildi. Karıştırma hızı 180 rpm (500 mL /3 Litrelik erlen) ve 200 rpm (5 mL’lik tüpler ve 250 mL erlenler) kullanıldı. Plazmid taşıyan hücreler için büyüme ortamına ilgili antibiyotikler (150 µg/ml ampicillin, 50 µg/ml kanamisin, 12,5 µg/ml tetrasiklin) eklendi. Hücre süspansiyonu ilgili antibiyotiği içeren LB-Agar petrilere yayıldı, gece boyunca 37 °C’de inkübe edildi. Tek düşen koloniler belirlendi. Kısa süreli (3-6 ay) hücre saklama için petrilere 4 °C’de buzdolabında saklandı. Uzun süreli depolama için hücreler %15 gliserol içeren porsiyonlar halinde -80 °C’de saklandı. Gliserol stok elde edilmesi amacıyla sıvı kültürden steril tüpe alınan örnek 1:1 oranında gliserin oranı % 15 olacak biçimde steril gliserin eklendi.

3.1.2. Kimyasal kompetent E. coli hazırlanması ve transformasyon

Kimyasal kompetent hücre hazırlanması için şu işlemler uygulandı (Inoue vd., 1990): 500 ml SOB besi ortamına ($OD_{600} = 0,05$) inokule edilen E.coli hücreleri OD_{600} 0,5-0,6’ya ulaşana dek 37 °C ve 200 rpm’de inkübe edildi. Buzda 15 dakika bekletilerek soğutulan kültür 50 ml’lik steril falkon tüplerine aktarıldı. 3.000 x g’de 10 dakika 4 °C’de santrifüjlendi. Hücre pelleti 10 ml soğuk RF I tamponunda süspanse edildi ve aynı koşullarda santrifüj tekrarlandı. Hücre pelleti 2 ml soğuk RF II tamponunda süspanse edildi. Hücre süspansiyonu, eppendorf

tüplerine (1,5 mL) 50 µL'lik hacimlerde aktarıldı ve sıvı azot dondurulduktan sonra -80 °C'de saklandı.

-80 °C'de depolanan kimyasal kompetent hücre buz üzerine 15 dakika inkübasyonun ardından 2µl (10-100 ng) plazmid DNA ilave edildi. Buzda 5 dakika; 42°C'de 30 saniye; ikinci kez buzda 2 dakika inkübasyon adımları sırasıyla uygulandı. 200 µl SOC besi ortamı eklendi ve 37 °C'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından hücre süspansiyonu seçici antibiyotik içeren petrilere (LB-Agar) yayılarak ekimi yapıldı ve gece boyu 37 °C'de inkübe edildi. Pozitif klonlar koloni pcr ile doğrulanarak replika petrilere çizgi ekim yapılarak çoğaltıldı.

3.2. Moleküler Teknikler

3.2.1. Plazmid DNA İzolasyonu

E. coli'den plazmid DNA izolasyonu için GeneJET™ Plazmid Miniprep kit protokolleri ve çözeltileri kullanılarak gerçekleştirildi. Gece boyu inkübe edilen 5 ml hücre süspansiyonu 3000 x g'de 10 dakika santrifüjlendi. Santrifüj tipi kolondan elüsyon için 50 µl steril H₂O veya uzun süreli saklamalar için Tris EDTA tamponu kullanıldı. İzole edilen plazmid DNA -20 °C'de saklandı.

3.2.2. Genomik DNA İzolasyonu

Enzimlerin konlanması için ihtiyaç duyulan *Bacillus subtilis* 168 genomik DNA Ankara üniversitesinden temin edildi. Genomik DNA'sının elde edilmesi için B. subtilis 168 hücreleri LB ortamında 30 °C, 200 rpm ile gece boyu inkübe edildi ve ertesi sabah genomik DNA kit içeriğindeki çözeltiler ve verilen protokole uygun olarak izole edildi. DNA agaroz jel ile görüntülendi.

3.2.3. PCR reaksiyonu

Klonlama için izole edilen *B. subtilis* genomik DNA'sı kalıp olarak kullanıldı. Glukoz dehidrojenaz ve keton redüktaz primerlerinin en iyi çalıştığı PCR koşulları belirlendi. Gen bölgelerini klonlamak amacıyla tamir aktivitesine sahip Pfu DNA Polymerase (Promega) kullanıldı. Pfu DNA polimeraz tamponu kullanılarak kurulan PCR reaksiyon karışımı: 0,1 µg kalıp DNA, 200µM dNTP, 0,2 µM primer çifti ve 1.25 U Pfu polimeraz kullanılarak hazırlandı ve PCR aşağıdaki koşullarda programlandı.

Başlangıç denatürasyonu 95 °C'de 2 dakika; arkasından 30 döngü;		
95 °C	30 saniye	Denatürasyon
45-65 °C	30 saniye	Primer Bağlanması
73 °C	60 saniye	Uzama
Final uzatma 73 °C 5 dakika ve 4 °C'de soğutuldu.		

Klonlama için izole edilen *B. subtilis* genomik DNA'sı kalıp olarak kullanıldı. Glukoz dehidrojenaz ve keton redüktaz primerlerinin en iyi çalıştığı koşullar 45-65 °C'de gradient PCR ile belirlendi. Reaksiyon sonrasında sonuçlar agaroz jel elektroforezinde etidyumbromür kullanarak UV görüntülendi. Elde edilen DNA fragmantları saflaştırılarak restriksiyon kesimi için hazırlandı.

3.2.4. DNA'nın Restriksiyon Endonükleazlarla Kesimi

Toplam reaksiyon hacmi 50 µl olacak şekilde en fazla 1 µg DNA örneği veya 2 µg vektör, ilgili restriksiyon enzim çifti kullanılarak (20 U) 16 saat 37 °C'de inkübe edildikten sonra 65 °C'de restriksiyon enzimleri inhibe edildi. Kullanılan restriksiyon enzimlerinin toplam hacmi, reaksiyon hacminin % 10'unu aşmayacak şekilde ve ürün kullanım protokollerine bağlı kullanıldı (Fermentas). Bu şekilde restriksiyon enzimlerinin depolanması için kullanılan gliserinin aktiviteyi etkilemesi engellendi. UV ışık altında görüntülenen ilgili DNA parçaları ligasyonda kullanılmak üzere jel ekstraksiyon kiti ile jelden ekstrakte edildi.

3.2.5. Ligasyon

Ligasyon için restriksiyon enzimleri ile muamele edilmiş DNA fragmenti ve vektör, 1:0, 1:1 ve 1:3 mol oranında ligasyon reaksiyon gerçekleştirildi. Reaksiyon 20 µl hacimde gerçekleştirildi. Reaksiyon karışımı toplam 100ng/20µL plazmid ve insert DNA, 1U T4-DNA-Ligaz (Fermentas, St.-Leon-Rot) ile gerçekleştirildi. Termal cycler'da 16 °C'den +4 °C'ye kadar 16 saatlik gradiyent soğutma ile gece boyu inkübe edilen örnekler 65 °C'de 15 dakika ısıl denatürasyon ardından transformasyonda doğrudan kullanıldı. Ligasyon karışımının 5 µl'si kimyasal kompetent E.coli hücrelerine transforme edildi. PCR ile elde edilen KRED ve GDH enzimlerinin DNA fragmentleri Ligasyon karışımı kompetent E.coli hücrelerine transforme edildi. Petriler 37 °C'de gece boyu inkübe edildi ve büyüyen koloniler ile koloni PCR ile pozitif klonlar belirlenerek petri ve gliserin stoklar halinde ilerleyen çalışmalarda kullanılmak üzere saklandı.

3.2.6. Koloni PCR

DNA fragmentini içeren vektörü taşıyan hücrelerin taranmasında koloni PCR kullanıldı. Transformasyonun ardından seçici antibiyotik ortamı içeren petrilere hücreler inkübe edildi. Tek düşen koloniler pipet ucu yardımıyla ayrı PCR tüplerine alındı ve standart PCR karışımından 10 µl eklendi. Pozitif kolonilerin büyümesi için replika plaka ekimleri gerçekleştirildi.

Hücrelerin lizis etkinliğini arttırmak için standart PCR programında ilk denatürasyon basamağı 95 °C'de 10 dakika olarak değiştirildi ve vektöre spesifik primerler (pET vektörleri için 5'T7 Promotor, 3'T7 Terminatör primerleri) ile reaksiyon karışımları hazırlandı. 10 µl reaksiyon hacminde 10× DreamTaq tamponu, 0,5 U DreamTaq ® DNA polimeraz, dNTP 0,2 mM ve 0,1 µM primer kullanıldı. Amplifikasyon için standart PCR programı uygulandı. 1. Denatürasyon (95 °C, 5 dak) 2. Denatürasyon (95 °C, 45 sn) 3. Primer bağlanması (55°C, 45 sn) 4. Uzama (72 °C, 45 sn) 5. Son uzama (72 °C, 5 dak) 6. 4°C, ∞. 2-3-4. Adımlar 35 kez tekrarlandı. Agaroz jelde PCR ürünlerinin boyutlarının değerlendirilmesi ile klonlanan geni içeren vektörleri taşıyan hücreler belirlendi. PCR sonucunda hedef geni taşımayan kendi üzerine katlanmış vektör taşıyan hücreler yaklaşık 226 bp

büyükliğünde fragmentler oluşmaktadır. Hedef geni almış vektörler ise daha büyük fragmentler (örneğin KRED için yaklaşık 1363 bp) vermektedir.

3.2.7. Agaroz jel elektroforezi

Agaroz jel elektroforezinde DNA fragmentleri boyutlarına göre ayrılır ve etidyum bromür eklenmesiyle UV ışık altında görünür hale gelirler (Sharp vd., 1973). Agaroz (% 1, w/v), 500 ml 0,5 x TBE tamponunda kaynatılarak çözüldü. 50-60 °C'ye soğutulmasının ardından her 1 ml agaroz için 0,2 µl olmak üzere 10 mg/ml stok EtBr çözeltisinden eklendi. DNA örnekleri DNA yükleme tamponu ile karıştırıldı ve jele uygulandı. Elektroforez 100 V.ayarlandı. DNA fragmentleri 320 nm dalga boyundaki UV ışıktaki dijital kamera ile görüntülendi.

3.2.8. DNA dizi analizi

Vektörlere klonlanan genlerin dizi analizleri İYTE gerçekleştirildi. ABI-formatında alınan diziler Genious-Pro programı yardımıyla analizlendi.

3.3. Rekombinant Protein Üretimi ve Saflaştırılması

Ekspresyon vektörüne klonlanan genlerin optimum ekspresyon şartlarının belirlenmesi (E.coli suşu, büyüme ortamı ve koşulları vb.) amacıyla küçük ölçekte “test” ekspresyonu yapıldı. Vektörün transformasyonun ardından petriden alınan pozitif koloniler 5 mL LB besiyerine inokule edildi ve 37 °C’de gece boyu inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün test protein ekspresyonu için 50 mL’lik LB ortamına OD₆₀₀ =0,05 olacak şekilde taze kültür aşılandı. Büyüme ortamı OD₆₀₀ = 0,5-0,6 ulaşınca son derişimi 1 mM olacak biçimde IPTG eklendi ve 37 °C’de 200 rpm’de 3 saat süreyle inkübe edildi.

Ekspresyon ortamından alınan ve eşit sayıda hücre içeren örnekler, yıkanmalarının ardından ultrasonik homojenizatör ile parçalanarak çözünür fraksiyonda protein ekspresyonunun artışı elektroforetik olarak belirlendi. MS73 prob takılı ultrasonik homojenizasyon cihazı ile (Sonopuls HD3200, Bandelin, Almanya) hücreler parçalandı. Hücre süspansiyonu toplam 10 dakikada, ısı

denatürasyondan korunmak için sonikasyon 5 saniye açık; 5saniye kapalı olacak biçimde gerçekleştirildi. Lizat santrifüjlenerek (20.000 x g, 15 dak, 4 °C) süpernetant aktivite, protein tayini, elektroforez veya afinite saflaştırma için kullanıldı.

3.4. Metal afinite kromatografi ile enzimlerin saflaştırılması

Metal şelat afinite kromatografisi (Porath vd., 1975) HisTrap™ FF crude kolon (GE HEALTHCARE; kolon hacmi: 1 ml ve 5 ml; maksimum basınç: 0.3 MPa) kullanılarak ÄKTA purifier 10 (GE, Almanya) sisteminde gerçekleştirildi. Bu kolonlarda matriks olarak Sefaroz 6'ya (fast flow) kovalent bağlı iminodiasetik asit (IDA) kullanılmaktadır. İminodiasetik asit, metal iyonunu (Ni^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} veya Fe^{3+}) şelatlar ve bu şekilde metal iyonu immobilize edilir. N- veya C- terminalde (His)₆-tag bulunan rekombinant proteinler kolona uygulandığında metal iyonu (bu çalışmada Ni^{2+} iyonu) ile etkileşim sonucu kolonda spesifik olarak tutunurlarlar. Proteinlerin elüsyonu, imidazolün artan derişimi ile sağlanır.

UV dedektör, gradiyent mikser ve peristaltik pompadan oluşan, düşük basınçlı kromatografi sistemi ile (BioLogic LP, BioRad, ABD) akış hızı dakikada 1 mL olarak ayarlandı. Saflaştırma adımları 2 kolon hacmi tampon A (20 mM KP, pH 7,4, 300 mM NaCl, 5 mM imidazol) ile kolonun dengelenmesi ve ardından elde edilen homojenat kolona uygulandı. Bağlanmayan veya zayıf bağlanan hücresel proteinlerin uzaklaştırılması amacıyla kolon, 5 kolon hacmi tampon A ile yıkandı. 5-250 mM aralığındaki imidazol gradienti, tampon A ve tampon B'nin (20 mM KP, pH 7,4, 300 mM NaCl, 500 mM imidazol) uygun oranlarda karıştırılmasıyla sağlandı ve 1 mL'lik fraksiyonlar toplandı. Proteinlerin elüsyonu 280 nm dedektör ile izlendi ve kromatogramlar kaydedildi. Rekombinant protein içeren fraksiyonlar SDS-PAGE'e uygulandı ve seçilen fraksiyonlar 5 L, 20 mM KP pH 7,4, 300 mM NaCl tamponuna karşı diyalizlendi. Küçük ölçekli test ekspresyonu çalışmalarında santrifüj tipi 10 kDa MWCO ultrafiltrasyon tüpleri ile diyafiltrasyon tekniği ile tuzlar uzaklaştırıldı.

Kolon sonrası proteinlerin deriştirilmesi ve imidazol uzaklaştırılması amacıyla santrifüj tipi ultrafiltrasyon tüpüne (Amicon Ultra 4 ve/veya 15; moleküler cut off: 10 kDa) alınan örnekler 4.000 x g, 4 °C'de santrifüjlendi. Santrifüj süresi, protein örneğinin hacmine göre belirlendi. Saflaştırılan ve deriştirilen protein çözeltileri -80 °C'de %30 gliserol ile 1:1 seyreltilerek saklandı.

3.5. Poliakrilamid Jel Elektroföresi (SDS-PAGE)

SDS-PAGE'e uygulanacak örnekler 5:1 oranında 6x SDS-PAGE örnek yükleme tamponu ile karıştırıldı ve 95 °C'de 5 dakika inkübe edildi. SDS-PAGE kuyucuklarına 15 µl örnek yüklendi ve 200 V sabit akım altında 30-45 dakika jelde yürütüldü. Örnekler CBB boya yöntemi ile boyanarak görüntüldendi.

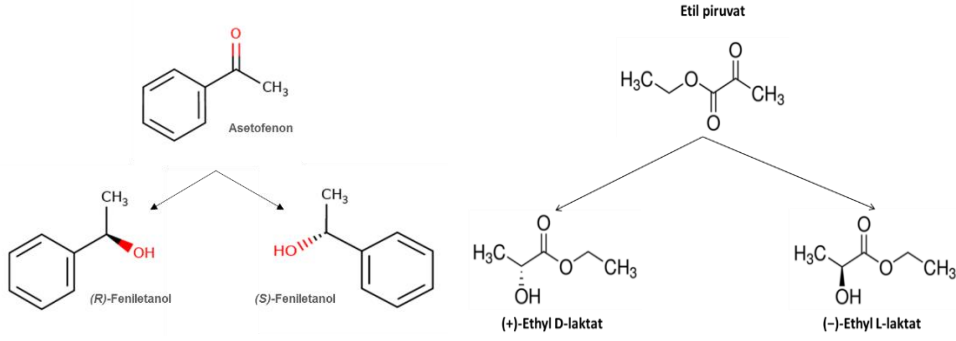
3.6. Enzim Aktivite Ölçümleri

3.6.1. Glukoz-1-Dehidrojenaz aktivitesi

Elde edilen örneklerdeki Glukoz dehidrojenaz aktivitesi spektrofotometrik yöntemle kullanılarak gerçekleştirildi. Enzim aktivite ölçümleri 100 mM fosfat pH 7,0 tamponunda kofaktör olarak 0,5 mM NADP⁺ veya NAD⁺ ve 200 mM glukoz içeren ortamda kinetik olarak 340 nm'deki absorbansın artışı ile izlenmiştir. Bir unite Glukoz dehidrojenaz aktivitesi 25 °C'de dakikada 1 µmol NADPH oluşumu için gerekli olan enzim miktarı olarak belirlendi.

3.6.2. Ketoredüktaz aktivitesi

Keton redüktaz aktivitesi, NADP⁺ indirgenmesinin spektrofotometrik olarak 340 nm'deki değişim ($\epsilon_{340} = 6220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) izlenmesiyle belirlendi. NADPH bağımlı aktivite ölçümü 0,5 mM NADPH varlığında pH 7,0 100 mM fosfat tamponu içerisinde, 10 mM prokiral etil piruvat (alifatik keto-ester) olacak biçimde ilavesi ile kinetik olarak 25°C sıcaklıkta spektrofotometrik izlendi. Bir unite enzim aktivitesi dakikada 1 µmol NADPH'ın oksidasyonunu sağlayan enzim miktarı olarak belirlendi. Enzimin spektrofotometrik enzim kinetiği çalışlarında substrat olarak etilpiruvat kullanıldı (Bkz. Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Etil piruvatın ve asetofenonun enzimatik oksidasyonu sonucu oluşan kiral ürünler.

Aromatik keton asetofenon (Bkz. Şekil 3.1) indirgenme reaksiyonu için 1 ml 50 mM TEA pH 7,0 tamponu içerisinde 1 Unit/50 μ L KreD, 10 mM asetofenon, 0,5 mM NADPH olacak biçimde reaksiyon karışımı hazırlandı ve 340 nm, 25°C sıcaklıkta 5 dakika süreyle spektrofotometrik izlenerek belirlendi.

3.6.3. Kiral gaz kromatografisi

Keton redüktaz ile gerçekleştirilen biyokataliz reaksiyon sonucunda açığa çıkan ürünler ve enantiyomerik miktarlarının analizi için gaz kromatografisi kullanıldı. Enantiyomerlerin ayrımı HYDRODEX β -3P (MACHEREY-NAGEL, Almanya) 0,25mm iç çaplı, 25 metre uzunluğunda kiral gaz kromatografisi kolonu kullanılarak gerçekleştirildi. Gaz kromatografisi cihazının enjeksiyon portu sıcaklığı 250 °C’de, taşıyıcı gaz 1 mL/dk hızla H₂ ve FID dedektör 250 °C’de ayarlandı. Enantiyomerlerin ayrımı 100 °C’de izokritik olarak gerçekleştirildi.

Reaksiyon ortamından belirli zaman aralıklarında alınan örnekler etilasetat ile ekstrakte edilerek, reaksiyon ortamındaki substrat ve ürünlerin dönüşüm oranı ve enantiyomerik miktarları belirlendi. Substrat ve ürün pikleri toplamı %100 kabul edilmiştir. Enantiyomerik oran (E değeri), ürünün enantiyomerik oranı (ee_p) ve dönüşüm miktarı Chen (Chen, Fujimoto et al. 1982) tarafından önerilen formüller kullanılarak hesaplandı.

3.7. Enzimatik kofaktör rejenerasyonu ile aktivite ölçümü

Tez süresince gerçekleştirilen enzimatik reaksiyonlarda model substrat olarak, alifatik prokiral etil piruvat ve aromatik asetofenon, substrat olarak belirlendi. Saflaştırılan NADPH bağımlı KreD enziminin katalizlediği indirgenme reaksiyonu sonucunda oluşan laktat esterlerinin enantiyomerik oranları (enantiomeric excess; *ee*) ve oluşan ürün miktarı kiral gaz kromatografisi ile belirlendi.

Bu amaçla toplam hacim 1 mL olacak biçimde, 1 mM NADP⁺, 100 mM Glukoz ve 10 mM etil piruvat veya 1 mM asetofenon içeren, 100 mM pH 7,0 potasyum fosfat tamponu içerisine; 1 Unite saf KreD ve 0.5 Unite saf GdH eklenerek reaksiyon 25 °C’de orbital karıştırıcıda inkübe edildi. Reaksiyon sonunda reaksiyon karışımı 1 mL etil asetat ile iki kez ekstrakte edildi. Ekstraktlar birleştirilerek sodyum sülfat ile kurutulduktan sonra, her bir biyokataliz reaksiyonu sonucu açığa çıkan ürünler kiral-GC enjekte edilerek analizlendi.

3.8. pH ve Sıcaklığın etkisi

pH’ın keton substratların indirgenme reaksiyonuna etkisi 0,1 M potasyum fosfat (pH 5,0-8,0) tamponları kullanılarak test edildi. Ketoreduktaz için optimum sıcaklığın belirlenmesi amacıyla değişen sıcaklıklarda reaksiyonlar izlenmiştir. Serbest ve immobilize keton reduktazın termal stabilitesinin belirlenmesi için 1 saat süreyle su banyosunda inkübe edilen örnekler ile reaksiyon spektrofotometrik olarak belirlenmiştir.

3.9. Biyosilika İmmobilizasyon

3.9.1. Gdh-R5 immobilizasyonu

E.coli’de eksprese edilerek saflaştırılan GdH-R5 kullanılarak biyosilika enkapsülasyon ile kofaktör rejenerasyon enziminin immobilizasyonu

gerçekleştirildi. Bu amaçla 2 mg/mL GdH-R5 içeren 100 mM pH 8.0 potasyum fosfat tamponuna, 25 mM silisik asit ilave edilerek 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Silisik asit, 0.1 M tetraetil ortosilikatın (TEOS) 10 mM HCl içerisinde 15 dakika hidrolizlenmesi ile elde edildi. R5 peptid dizisi taşımayan GdH klonunda silika sol oluşumu gerçekleşmedi. Biyosilika matris içerisinde tutuklanan enzimi taşıyan silika (sol-jel) oda sıcaklığında 5 dakika 9.000 x g 'de santrifüjlenerek oluşan pellet toplandı. Elde edilen pellet saf su ile iki kez yıkandı. Enkapsülasyon verimi toplam aktivite ve protein üzerinden hesaplandı. Elde edilen R5 peptid katalizli biyosilika immobilize enzim, tamponda süspanse edilerek aktivite ölçümleri (NADPH tüketimi) spektrofotometrik izlenerek gerçekleştirildi.

3.10. GdH-R5 ve KreD Enzim Çiftinin İmmobilizasyonu

GdH-R5 immobilizasyonu için kullanılan protokole ek olarak immobilizasyonu ortamına R5 füzyonu taşımayan saf KreD enzimi bire bir miktarlarda eklenerek elde edilen sol içine tutuklu çift enzim immobilizasyonu gerçekleştirildi. Kofaktör rejenerasyon enzimi hem de immobilizasyonu aracı olarak 2 mg/mL GdH-R5 ve saf 0-2 mg/ml olacak KreD enzim karışımı 50 mM pH 8.0 fosfat tamponunda hazırlandı. 25 mM silisik asit ilavesi ile immobilizasyonu gerçekleştirdi. Oluşan sol santrifüj ile ayrıldıktan sonra, üst fazda kalan enzim aktiviteleri spektrofotometrik belirlenerek enzim immobilizasyonu verimlilikleri hesaplandı.

3.11. Optimum pH ve Termal Kararlılık

pH ve sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkileri incelendi. Standart aktivite ölçüm koşullarında aktiviteler belirlendi. Optimum pH için pH 5.5-8.0 tamponlarında 25 °C'de aktivite ölçümleri gerçekleştirildi. Optimum sıcaklık ve termal kararlılık 25 °C, 30°C, 40°C, ve 50°C'de 1 saat süreyle inkübe edilmelerinin ardından standart aktivite ölçüm koşullarında aktivite ölçümleri gerçekleştirildi.

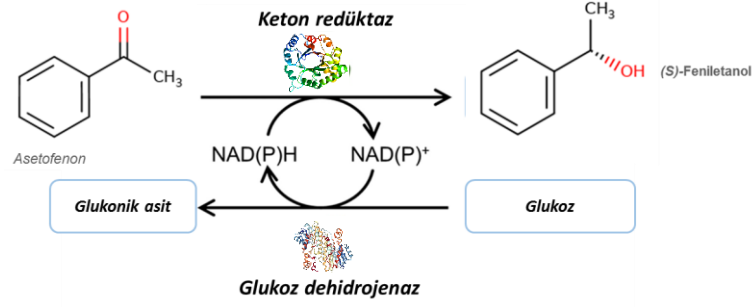
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Prokiral keton bileşikelerin enzimatik asimetric indirgenme reaksiyonları, özellikle kiral hidroksiller, amino asitler veya alkol türevlerinden elde edilen deerli kiral ilaçların sentezinde kullanılmaktadır. Glukoz dehidrojenaz NADP^+ ve NAD^+ kofaktörlerinin her ikisinde kullanabilen ve indirgenmiş NADPH veya NADH kofaktörlerin sürekli rejenerasyonu için iyi bir adaydır (Demir, Talpur et al. 2011, Wang, Saba et al. 2017). Enzim temelli NADH rejenerasyonu için farklı kaynaklardan izole edilen, rekombinant veya doğrudan doğruya doğal hücrelerin biyokataliz reaksiyonlarında kullanıldığı çok sayıda enzimatik kofaktör rejenerasyon uygulaması yayınlanmıştır. Örneğin *Bacillus* sp. GdH ve L-carnitin dehidrojenaz (*Burkholderia gladioli*) enzim çiftinin kullanıldığı L-carnitin sentezi, NADH rejenerasyonu ile gerçekleştirilmiştir (Chen, Liu et al. 2016). Enzimatik kofaktör rejenerasyonu amacıyla kullanılan teknikler ve farklı kofaktör rejenerasyon sistemleri aşağıda Tablo 4.1’de karşılaştırılmıştır.

GdH enziminin diğer bir uygulaması NADPH rejenerasyonudur. (R)-etil-4-kloro-3-hidroksibutanoat sentezi için, NADPH spesifik *S.cerevisiae* redüktaz enzimi, rekombinant olarak *E.coli* hücrelerinde eksprese edilerek, kofaktör rejenerasyonu için *Bacillus megaterium* glukoz dehidrojenaz enzimi ile birlikte kullanılmıştır (Choo and Kim 2015). Glukoz dehidrojenaz (GdH, EC 1.1.1.47) β -D-glukozun β -D-glukono-1,5-laktona indirgenmesi reaksiyonunu, NADP^+ veya NAD^+ kofaktörleri aracılığıyla katalizlemektedir. Her iki kofaktörü de kullanabilen bu enzim indirgenmiş kofaktörlerin rejenerasyonu için tercih edilmektedir. İmmobilize kofaktör rejenerasyon sisteminde, keton redüktaz enziminin ihtiyaç duyduğu NADPH kofaktörünün sitokiyometrik oranlarda rejenerasyonu için kullanılmak üzere. Enzimatik kofaktör rejenerasyonu ile kiral alkollerin sentezine, aşağıda keton redüktaz ve glukoz dehidrojenaz enzim çifti üzerinde Şekil 4.1’de şematize edilmiştir.

Tablo 4.1 Kofaktör rejenarsyon sistemleri karşılaştırılması (Carballeira, Quezada et al. 2009, Berenguer-Murcia and Fernandez-Lafuente 2010, Yan, Nie et al. 2011).

Biyokatalizör	İndirgen/Ürün	Avantajlar	Dezavantajlar
Tüm hücreler	Glukoz/ Glukonik asit	Tersinmez reaksiyon. Tek enzim sistemi. Gerek NADH gerekse NADPH bağımlı enzimlere uygulanabilir.	Metabolik enzimler nedeniyle olası yan ürün oluşumu. Canlı hücre duyarlılıkları dikkate alınmalı.
Glukoz dehidrojenaz	Glukoz/ Glukonik asit	Tersinmez reaksiyon. Yüksek aktivite. Gerek NADH gerekse NADPH bağımlı enzimlere uygulanabilir.	Ortam pH'sının düşüşü pH kontrol sistemi gerektirir.
Format dehidrojenaz	CO ₂	Uçucu ürün oluşumu, çalışma kolaylığı.	Düşük aktivite ve stabilite. NAD bağımlı.
Karbonil redüktaz	İso-propanol/ Aseton	Aynı enzimin kofaktör rejenerasyonu için kullanıldığı sistem. Gerek NAD gerekse NADO kullanılabilir.	Asetonun uzaklaştırılması gereklidir.
Fosfit dehidrojenaz	Sodyum fosfit/ Sodyum fosfat	Tersinmez reaksiyon. Mutantlar NAD ve NADP kullanılabilir. Kabuledilebilir aktivite.	Reaksiyon ortamının yüksek iyon şiddeti. Yüksek fosfat kofaktör stabilitesine olumsuz etkileri. İki enzim gerektirir.
Hidrojenaz	H ₂	Tersinmez reaksiyon. Basit reaktifler.	Zararlı. Çift enzim prosesi.
Elektrokimyasal	Rodyum kompleks	Temiz. Sürdürülebilir.	Düşük ürün verimi. Yetersiz stabilite.
Fotokimyasal	Fotosentetik M.O.	Sürdürülebilir.	Düşük verim

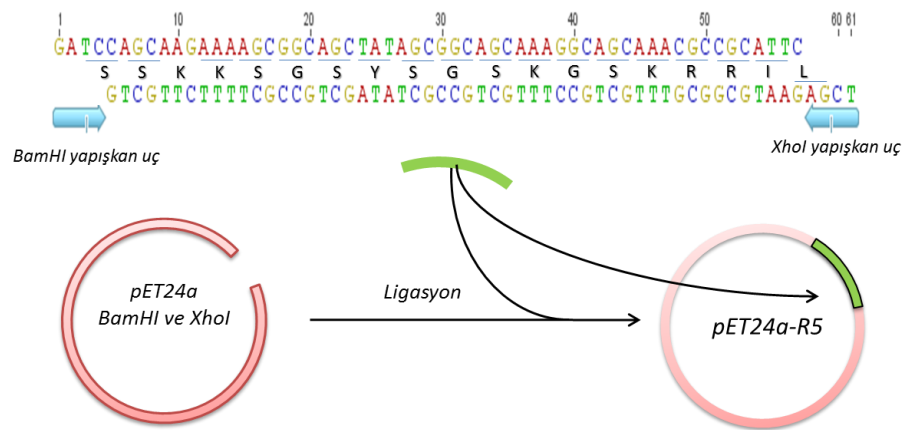


Şekil 4.1 Keton redüktaz ve glukoz dehidrojenaz enzim çifti ile kofaktör rejenerasyonu. ve (s)-feniletanol eldesi.

4.1. Klonlama Çalışmaları

4.1.1. R5 Gen Dizisinin Klonlanması

19 amino asitlik R5 peptid dizisini kodlayan gen dizisini elde etmek amacıyla, eşleştiginde BamHI ve XhoI yapışkan uçları bırakan bir çift primer tasarlandı. Eşit (10 μ mol) miktarda karıştırıldıktan sonra 95 °C’de 15 dakika ısıtıldı ve soğutulurak primerlerin eşleşmesi sağlandı. pET24a vektörü BamHI ve XhoI kesim enzimleri ile kesildi. Sentetik R5 dizisi, önceden kesilmiş pET24a ile ligasyonu gerçekleştirildi ve DH5 α hücrelerine transformasyonu yapıldı. Gerçekleştirilen çalışmalar Şekil 4.3’te şematize edilmiştir.

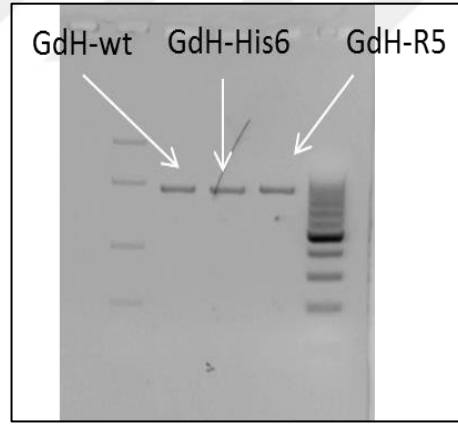


Şekil 4.2. BamHI ve XhoI restriksiyon enzim ile kesilmiş biçimde yapışkan uçlar taşıyan eşleştirilmiş komplementer primer çifti ligasyonla pET24a plasmid içerisine yerleştirilmesi.

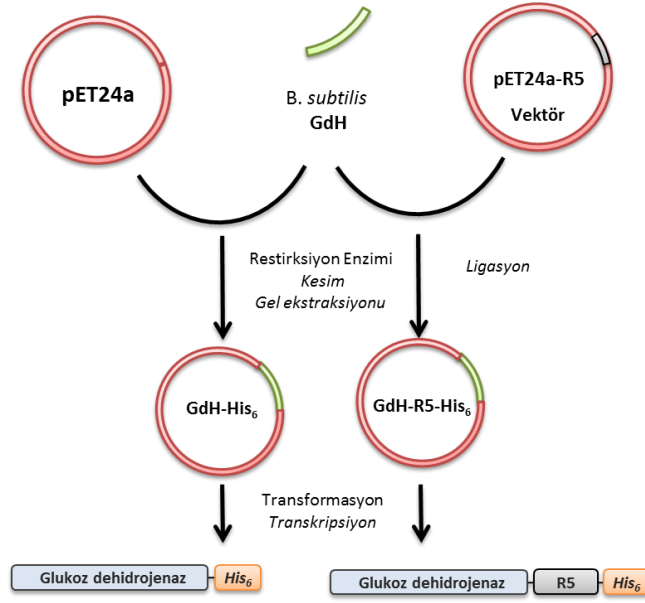
R5 kanamisin dirençli klonlar, koloni PCR yöntemi ile belirlendi. Seçilen 5 ayrı koloniden plazmid DNA izolasyonu yapıldı ve DNA dizi analizi ile R5 dizisini taşıyan pET24a vektörü (pET24a-R5) elde edildi. Takip eden çalışmalarda bu vektör, C-terminal R5 peptid dizisini taşıyan füzyon enzimlerin üretilmesi amacıyla tasarlandı ve aynı zamanda ekspresyon vektörü olarak kullanıldı.

4.1.2. GdH Klonlarının elde edilmesi

Bacillus subtilis 168 suşundan, genomik DNA izolasyonu gerçekleştirildi. Glukoz Dehidrojenaz (EC 1.1.1.47; P12310) enzimine ait gen dizi için tasarlanan üç ayrı primer çiftti kullanılarak, GdH gen dizisi PCR reaksiyonları çoğaltıldı (Şekil 4.4). Restriksiyon enzim çiftleri ile kesimleri yapıldı. PCR ürünlerinin, enzim çiftleri ile (pET24a-R5 vektörüne ligasyon için NdeI/BamHI ve pET24a vektörüne His tag'li veya doğal tip eldesi için NdeI/XhoI) kesimlerinin ardından, planlanan vektörlere ligasyonları gerçekleştirildi. Böylece GdH klonları pET24a ve pET24a-R5 vektörlerine transfer edildi (Şekil 4.5).

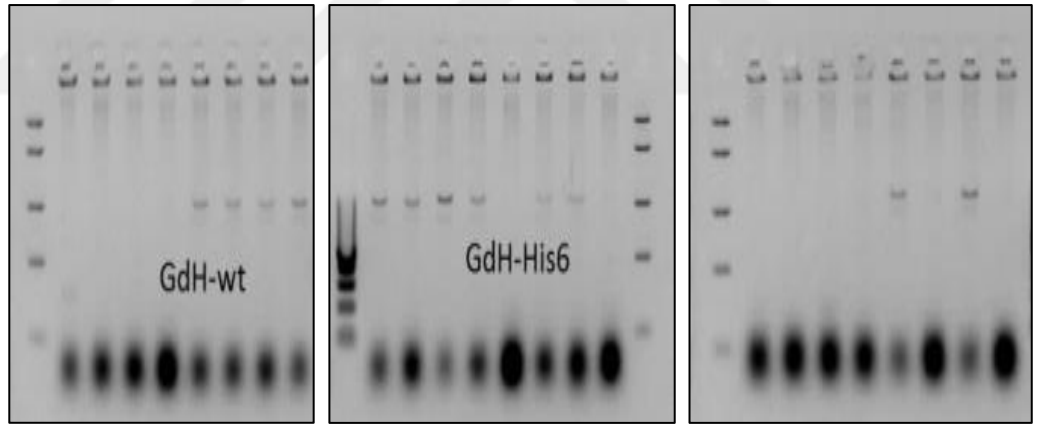


Şekil 4.3. *Bacillus subtilis* 168 GdH enzimi için primer setleri ile gerçekleştirilen PCR ürünlerinin BamHI ve NdeI ile kesim sonrası agaroz jel görüntüsü.



Şekil 4.4. GdH ve GdH-R5 klonlarının eldesi.

Ligasyon ürünleri E.coli B121 hücrelerine transforme edilerek, pozitif klonlar koloni PCR yöntemi ile belirlendi (Şekil 4.5).

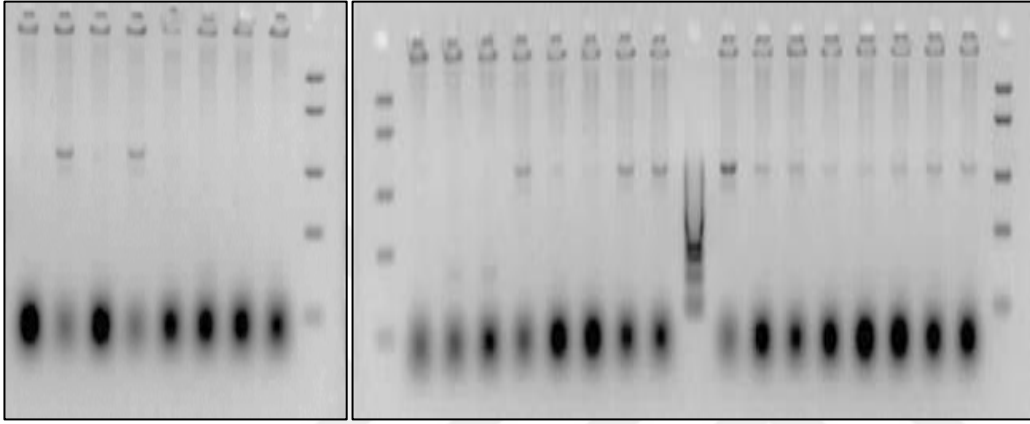


Şekil 4.5. a) Koloni PCR sonucunda pozitif klonlar belirlenmiştir. GdH-wt için 5 ve 8. Koloni; b) GdH-His6 için 3. Koloni; c) GdH-R5 mutant enzimi için 5. ve 7. sütunlardaki koloniler seçilmiştir.

4.1.3. Keton Redüktaz Klonlarının Eldesi

KreD enzimine ait gen dizisinin klonlanabilmesi için *Bacillus subtilis* 168 suşundan genomik DNA izolasyonu gerçekleştirildi. Doğal ve R5-modifiye enzimin elde edilebilmesi amacıyla her bir enzim için belirli kesim enzimi tanıma

dizilerini taşıyan primerler tasarlandı. Bu primer setleri ile PCR reaksiyonları gerçekleştirildi. PCR ürünlerinin, BamHI ve XhoI kesim enzimleri çiftleri ile kesimlerinin ardından, önceden planlanan pET24a ve pET24a-R5 vektörüne ligasyonları gerçekleştirildi. Bu çalışmalar sonucunda keton redüktaz (KreD) enzimini üç farklı varyasyonda; KreD-His₆ ve KreD-R5 enzimlerini taşıyan vektörler elde edildi. Pozitif klonlar koloni PCR yöntemi ile belirlendi (Şekil 4.6) ve klonlar DNA dizi analizine gönderildi.

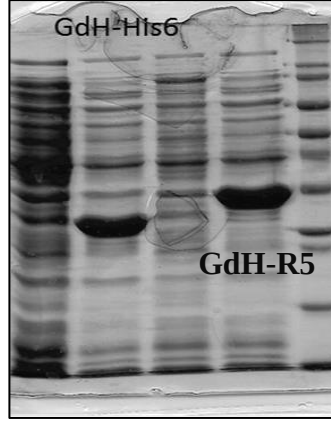


Şekil 4.6. Keton redüktaz koloni PCR jel görüntüsü. a) doğal enzim için 2. ve 4. Koloniler seçilmiştir; b) KRED -His₆ için 4, 7 ve 8. Koloni c) KreDR5 mutant enzimi için 1. ve 8. sütunlardaki koloniler seçilmiştir.

4.2. Enzim Üretimi ve Saflaştırma

4.2.1. Glukoz Dehidrojenaz

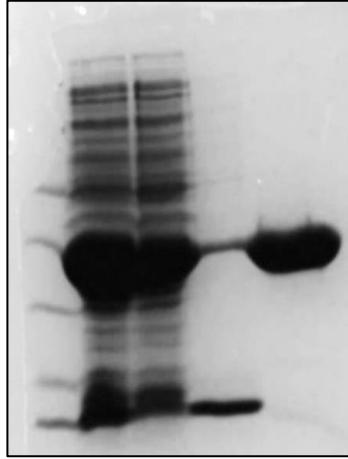
GdH geninin, *Bacillus subtilis* 168'ten klonlama çalışmalarının tamamlanmasının ardından enzimler saflaştırılarak enzim aktivite tayinleri gerçekleştirildi. GdH geninin ekspresyonu için *E. Coli* BL21 (DE3) hücrelerinde ekspresyon yapıldı. Bu amaçla farklı sıcaklık ve süreler ve besi ortamları ile test ekspresyonları gerçekleştirildi. Çalışmalar sonucunda GdH enzim ekspresyonunun çözünürlük ve protein verimi değerlendirildiğinde, Luria-Bertani (LB) ortamında, 20 °C'de 1 mM IPTG indüksiyonu ile 16 saat ekspresyonun en yüksek aktivite ve çözünür protein üretim koşulları nedeniyle tercih edildi.



Şekil 4.7. GdH ve GdH-R5 enzim ekspresyonları ve molekül kütle farklılıkları SDS-PAGE üzerinde gösterilmiştir.

4.2.1.1. GdH Enziminin Afinite Saflaştırılması

Klonlama ve üretimin ardından rekombinant GdH enziminin ve R5 mutantının saflaştırma ve karakterizasyon çalışmaları tamamlanmıştır. Saflaştırma nikel afinite kromatografisi ile His-Trap FF kolon kullanılarak gerçekleştirildi. Şekil 4.5 E. Coli BL21 hücresinde eksprese edilerek saflaştırılan örneğin SDS-PAGE görüntüsünde 5. sütunda 29 kDa boyutunda saf GDH bandı Şekil 4.8’de gösterilmiştir.



Şekil 4.8. GdH-His₆ afinite saflaştırılması ve elektroforetik saflık analizi; 1. kütle standardı; 2. homojenat; 3,4 Kolon yıkama; 5. Fraksiyon saf GdH.

Tablo 4.2. GdH enziminin spesifik aktivitesi ve saflaştırma katsayısı

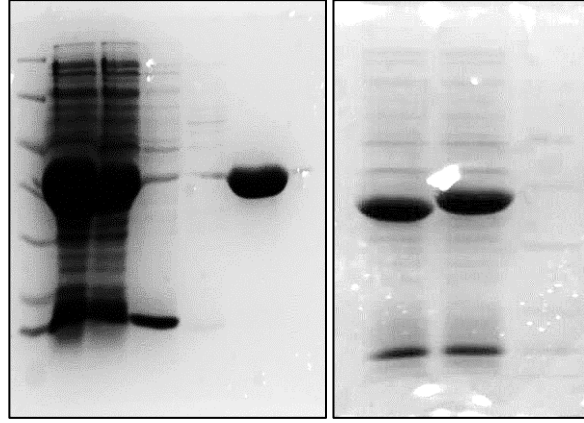
	GdH		
	Lizat	Saf	SK
Protein (mg)	412.3	51.7	-
Aktivite (U·mg ⁻¹)	2.5	12.4	5.1

4.2.2. GdH-R5 Füzyonu

Klonlama ardından GdH-R5 geninin ekspresyonu için *E. Coli* BL21 hücrelerinde ekspresyon çalışmaları gerçekleştirildi. Farklı sıcaklık ve süreler ve besi ortamları ile test ekspresyonları gerçekleştirildi. Çalışmalar sonucunda GdH-R5 enzim ekspresyonunun çözünürlük ve protein verimi değerlendirildiğinde, Luria-Bertani (LB) ortamında, 20 °C’de 1 mM IPTG indüksiyonu ile 16 saat ekspresyonun uygun koşulları sağladığı belirlendi.

4.2.2.1. GdH-R5 Enziminin Afinite Saflaştırılması

Klonlama ve üretimin ardından rekombinant GdH-R5 mutant enziminin saflaştırma ve karakterizasyon çalışmaları tamamlanmıştır. Saflaştırma nikel afinite kromatografisi ile His-Trap FF kolon kullanılarak tamamlanmıştır. Saflık analizleri SDS-PAGE yöntemiyle gerçekleştirildi. Elde edilen enzimlerin karakterizasyonu sonucunda (Tablo 4.4) elde edilen mutant enzim aktivitesi 10.6 U/mg olarak belirlenmiştir. Enzimin ilave diziye rağmen çözünür ve orijinal aktivitesinin % 85’ini koruduğu belirlendi.



Şekil 4.9. GdH-R5 mutantının afinite saflaştırılması ve elektroforetik saflık analizi; 1. kütle standardı; 2. homojenat; 3,4,5. Kolon yıkama; 5. Afinite elüsyon. Sağdaki jel görüntüsünde lizat ekspresyon profili; 18 saat 20 °C; 5/OD₆₀₀ 10 uL örnek GdH-His₆ ve GdH-R5-His₆ gösterilmiştir.

Biyosilisifikasyon yeteneğinin enzime kazandırılması amacıyla, gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda elde edilen pET24a-R5 vektörü kullanılarak, C-terminal R5 gen dizisi, GdH gen dizisine proteinin C-Terminal ucundan eklendi. Saflaştırma ardından elde edilen aktivite değerleri Tablo 4,3'te özetlenmiştir. Saflaştırma sonrasında yüksek saflıkta GdH-R5 füzyon proteini elde edildi. saflaştırılan GdH-R5 ve GdH enzimleri arasındaki kütle farkı SDS-PAGE ile gösterilmiştir (Şekil 4.9).

GdH enzimin ve C-terminal R5 füzyonu ile elde edilen mutant enzimlerin aktivitesi ve karakterizasyonu saflaştırılmalarının ardından gerçekleştirildi. Biyosilisifikasyon yeteneğini barındıran ve R5 dizisini taşıyan GdH-R5 enziminin aktivitesinin %85'ini koruduğu belirlendi (Tablo 4.3). Enzimin aktif ve C terminalde yer alan peptidin otosilisifikasyon yeteneğini taşıması immobilize kofaktör rejenerasyonu tasarımı mümkün kılmıştır.

Tablo 4.3. GdH-R5 ve GdH enzimlerinin spesifik aktivitelerinin karşılaştırılması.

	GdH-R5		GdH-wt	
	<i>Lizat</i>	<i>Saf</i>	<i>Lizat</i>	<i>Saf</i>
Protein (mg)	440,9	42,6	412,3	51,7
Aktivite (U·mg ⁻¹)	2,0	10,6	2,5	12,4

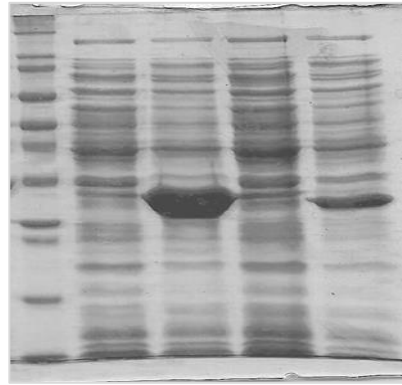
4.2.3. Keton Redüktaz

4.2.3.1. KreD ekspresyonu

Keton redüktaz ekspresyonu *E.coli* BL21 hücrelerinde gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla farklı sıcaklık ve süreler ve besi ortamları ile test ekspresyonları gerçekleştirilmiştir. Çalışmalar sonucunda KreD ve KreD-R5 füzyon enzimlerinin üretimi için 20 °C, 1 mM IPTG varlığında LB ortamında 16 saat ekspresyon gerçekleştirildi. Elde edilen hücreler sonikasyon ile homojenize edilerek, afinite kromatografisi ile saflaştırıldı.

4.2.3.2. KreD Afinite saflaştırılması

Klonlama ve üretimin ardından rekombinant KreD enziminin saflaştırma çalışmaları tamamlanmıştır. Saflaştırma nikel afinite kromatografisi ile His-Trap FF kolon kullanılarak gerçekleştirildi. Şekil 4.10'da *E.coli* BL21 kullanarak üretilen ve saflaştırılan KreD enziminin SDS-PAGE sonuçları gösterilmiştir.



Şekil 4.10. KreD ve KreD-R5 çözümlerinin ekspresyonu, 1.Standart; 2.Ekspresyon öncesi; 3.Sütun.KreD-His₆ ekspresyonu; 4.Kred-R5 indüksiyon öncesi; 5. Sütun KreD-R5 ekspresyonu.

Biyosilisifikasyon yeteneğinin keton redüktaz enzime kazandırılması amacıyla enzimin C-terminal ucuna rekombinanat eklenen R5 dizisi, enzimin ekspresyonu düşürmüştür (Şekil 4.10). Füzyon öncesi ve sonrası elde edilen protein ve aktivite değerleri Tablo 4.4'te özetlenmiştir. KreD enziminin aktivitesi etil piruvatın indirgenmesi sırasında tüketilen NADPH'nin spektrofotometrik olarak izlenmesiyle belirlendi.

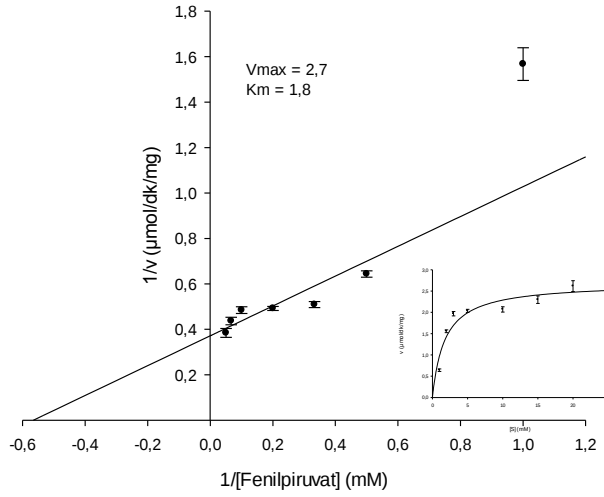
Tablo 4.4. Kred-R5 füzyonu ve KreD enzimlerinin saflaştırılması ve aktiviteleri 10 mM etilpiruvat ve 0.5 mM NADPH

	KreD-R5		KreD	
	<i>Lizat</i>	<i>Saf</i>	<i>Lizat</i>	<i>Saf</i>
Protein (mg)	310,90	6,60	302,20	36,50
Aktivite (U·mg ⁻¹)	0,43	1,34	0,54	2,73

KreD-R5 füzyon enziminin ekspresyonu sonucunda, çözünür fraksiyondan saflaştırılan enzim miktarı, doğal enzime kıyasla 6 kat daha düşüktür. Bununla birlikte rekombinant R5 füzyonu enzimin çözünürlüğünü düşürmesinin yanı sıra, ilave amino asitler enzim aktivitesini %80 oranında inhibe etmiştir (Tablo 4.4). Aktivite ve çözünürlüğün R5 peptid dizisi ve sonrasında yer alan his₆ tag'ın protein üzerinde aktif merkeze ve kofaktör bağlama bölgesine erişebilir uzunlukta olmasından kaynaklandığı değerlendirilmiştir.

4.2.4. KreD Karakterizasyonu

KreD enzimlerinin aktiviteleri etil piruvat (β -keto Ester) substrat olarak enzim kinetik parametrelerin belirlenebilmesi amacıyla substrat olarak kullanıldı. Ketoredüktaz aktivitesi 25 °C'da NADPH'nin spektrofotometrik olarak 340 nm'de soğurum değişimi kinetik olarak belirlendi. Taşıdığı C terminal His₆ dizisi aracılığı ile Ni²⁺ metal afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzimin K_m ve V_{max} sırasıyla $1,8 \pm 0.32$ U·mg⁻¹ ve $2,7 \pm 0.12$ mM olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.11. Keton redüktaz füzyon proteinin, etilpiruvat substarat ve 0,5 mM NADPH varlığında kinetik parametrelerin belirlenmesi.

4.3. İmmobilize Kofaktör Rejenerasyon Sistemi Tasarımı

Enzimlerin spesifiklikleri ve enantiyoselektiviteleri ilaç sektörü için kritik öneme sahiptir. Bu alanda sentezlenen yeni kiral ürünlerin üçte ikisi enzimler tarafından gerçekleştirilmektedir. Örneğin Lipitor (atorvastatin) dünya marketinde tek başına 11.9 milyar dolarlık satış rakamlarına ulaşmıştır. 2020 yılında ilaçların %95'inin kiral ürünlerdenn oluşacağı ve ilaç marketinin 1 trilyon dolar seviyesine ulaşacağı tahmin edilmektedir. Enzimlerin kiral bileşiklerin sentezinde büyük bir pay sahibi olması kaçınılmaz görünmektedir.

Oksidoredüktazlar bilinen tüm enzimlerin dörtte birini oluşturan en geniş enzim sınıflarından biridir ve karbonil grupları, asitler, C=C çift bağları, nitro grupları ve C-N bağlarının indirgenmesi reaksiyonlarında endüstri ve araştırmalarda daha çok önem ve anlam kazanmaktadır. Bununla birlikte bu enzimler, reaksiyon sırasında tüketilen bir veya daha fazla kofaktöre gerek duyarlar. Örneğin enzimatik indirgenme reaksiyonları indirgenmiş nikotin adenin dinükleotid (NADH) ve bunun fosforillenmiş formu NADPH koenzimlerini, hidrojen (hidrid) kaynağı olarak gerektirmektedir. Bilinen oksidoredüktazların %10'u NADPH kullanırken %80'i NADH gerektirmektedir. Enzimatik bir indirgenme reaksiyon döngüsünde substrat ilgili ürüne okside olurken, NAD(P)H

indirgeyici olarak görev alarak NAD(P)^+ 'ya okside olur. Kofaktörler, yüksek maliyetleri nedeniyle (3,000 \$/mol NADH; 215,000 \$/mol NADPH) stokiyometrik oranlarda kullanılması, ekonomik ve sürdürülebilir değildir. Oksidasyon temelli biyokataliz reaksiyonlarında kofaktörlerin canlı hücreler tarafından rejenere edildiği biyotransformasyon reaksiyonları tercih edilmektedir. İzole enzimlerle etkili kofaktör rejenerasyon sistemlerinin kullanılabilir ve uygulanabilir olması enzim immobilizasyonunun başarısını bağlıdır.

Doktora çalışmaları kapsamında *B. subtilis 168'ten elde edilen* Glukoz dehidrojenaz enzimi enzimatik kofaktör rejenerasyonunda görevli enzim olarak, keton redüktaz enzimi ile birlikte asetofenonun asimetrik indirgenmesinde kullanılmıştır. GdH enziminin rekombinant R5 füzyon proteini üretilerek, enzime biyosilisifikasyon yeteneği kazandırılması böylece enzim çifti temelli immobilize kofaktör rejenerasyon sistemlerinin tasarımında oksidaz sınıfı tüm enzimlerle birlikte immobilizasyonu enzimi olarak kullanılabilir olması sağlanmıştır.

Silaffin yapısında bulunan R5 peptidinin keton redüktaz ve glukoz dehidrojenaz enzimlerine rekombinant füzyonu ile bu enzimlere biyosilika immobilizasyon yeteneği kazandırmak amaçlandı.

GdH-R5 sol oluşumunu hızla katalizleyebildiği ve protein immobilizasyonunun %90 üzerinde değerlerde sağlandığı gösterildi. Ancak KreD-R5 enzimi biyominerilizasyon yeteneğini göstermemiştir. R5 peptidi üzerinde bulunan dizideki esansiyel amino asitlerin tersiyer yapıya katılarak silisik asit mobilizasyonunu engellediği tahmin edilmektedir. R5 dizisinin serbestlik derecesi yeni füzyon tasarımları ile aşılabileceği değerlendirilmiştir.

Kiral alkollerin eldesine yönelik olarak enzim çiftinin birarada immobilizasyonu amacıyla, biyosilisifikasyon yeteneği taşıyan GdH-R5 enzimi, doğal KreD ile birlikte tutuklanması gerçekleştirildi

İn-vitro biominerilizasyon klasik sol-jel yöntemlerine benzemesine rağmen biyolojik makroromoleküllerin tutuklanması için önemli avantajlar barındırmaktadır. Sol-jel metodların aksine biomimetik reaksiyonlar 2-50 nm

boyutlarında mezopor yapıları partiküller elde edilebilmektedir (Cardoso, Luckarift et al. 2010). Bu açıklıklar substrat moleküllerinin difüzyonunu kolaylaştırarak, tutuklanan enzimin daha yüksek katalitik aktivitelerde kullanımına olanak sağlamaktadır. Saatlere kıyasla, dakikalar içinde protein enkapsülasyonu verimi ile gerçekleşen immobilizasyon, fizyolojik pH koşullarında gerçekleşmektedir. Biosilisifikasyon reaksiyonu sırasında başlangıçta 8 nm'lik yapılar oluşurken, daha sonra bu yapılar bir araya gelerek dut görünümüne sahip yapılar halinde çökmektedir.

4.3.1. GdH-R5 immobilizasyonu

E.coli'de eksprese edilerek saflaştırılan GdH-R5, taşıdığı R5 dizisinin sayesinde dakikalar içerisinde biyosilika immobilizasyonu %97 aktivite verimiyle gerçekleştirildi.

Bu amaçla 2 mg/mL GdH-R5 içeren 100 mM pH 8.0 potasyum fosfat tamponuna, 25-100 mM silisik asit ilave edilerek 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Silisik asit, 1 M tetraetil ortosilikatın (TEOS) 10 mM HCl içerisinde 15 dakika hidrolizlenmesi ile elde edildi. R5 peptid dizisi taşımayan GdH klonunda 24 saatin sonunda silika sol oluşumu gözlenmedi. Biyosilika matris içerisinde tutuklanan enzimi taşıyan silika (sol-jel) oda sıcaklığında 5 dakika 9.000 x g 'de santrifüjlenerek immobilize enzim pelleti toplandı. Elde edilen pellet saf su ile iki kez yıkandı. Enkapsülasyon verimi toplam aktivite ve protein üzerinden hesaplandı.

4.3.2. GdH-R5 ve KreD'in birlikte immobilizasyonu

GdH-R5 immobilizasyonu için kullanılan protokole ek olarak immobilizasyonu ortamına R5 füzyonu taşımayan saf KreD enzimi artan miktarda eklenerek elde edilen biyosilika sol içerisinde tutuklu enzim çift immobilizasyonu gerçekleştirildi. GdH-R5 enziminin immobilizasyonu için gerekli optimum silisik asit miktarı sabit enzim derişimine karşı test edildi (Tablo 4.5). GdH-R5 enziminin silisik asit miktarına bağlı olarak immobilizasyonu veriminin belirlenmesi amacıyla, 2 mg/mL GdH-R5 içeren çözelti ortamına 10-100 mM

arasında silisik asit ilavesine bağı olarak immobilizasyon verimi belirlendi. Sol oluşumunun tamamlanması için 60 dakika süreyle inkübasyonun ardından enzim aktivitesi standart koşullarda belirlendi.

Tablo 4.5. Silisik asit miktarının GdH-R5 enzim enkapsülasyonuna etkisinin incelenmesi.

<i>GdH-R5</i> <i>mg/mL</i>	<i>Si(OH)₄</i> <i>(mM)</i>	<i>İmmobilizasyon</i> <i>Verimi %</i>
2	0	-
2	10	23
2	25	64
2	50	87
2	75	93
2	100	95

GdH-R5 enziminin otosilisifikasyonu sırasında kendisi ile birlikte tutuklayabileceği maksimum KreD enzim miktarının belirlenmesi amacıyla artan miktarlarda KreD varlığında, 0-2 mg/mL protein, koimmobilizasyon gerçekleştirildi (Tablo 4.6). olarak 2 mg/mL GdH-R5 ve saf 0-2 mg/ml KreD enzim 50 mM pH 8.0 fosfat tamponuna eklendi. 100 mM silisik asit ilavesi ile immobilizasyonu gerçekleştirildi. Tablo 4.6’da kullanılan KreD miktarı 8 kat arttırıldığında (eşit miktarda 2/mg/mL protein) GdH-R5 enkapsülasyonu ile KreD immobilizasyonu verimi %9 azalmıştır.

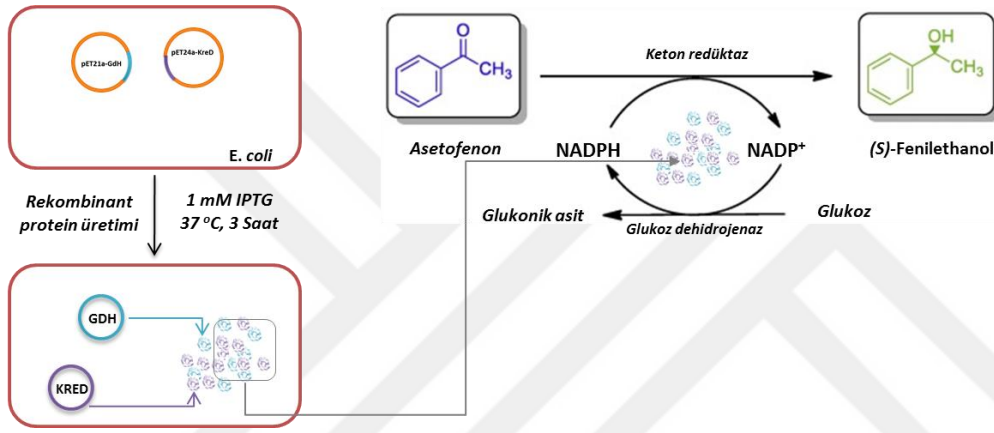
Tablo 4.6. GdH-R5 ve KreD koimmobilizasyonun optimizasyonu.

	1	2	3	4	5
<i>Toplam GdH-R5 (Unit)</i>	21,2	21,2	21,2	21,2	21,2
<i>Toplam KreD (Unit)</i>	0	0,65	1,3	2,6	5,2
<i>GdH-R5 (%)</i>	95	95	95	95	95
<i>KreD (%)</i>	-	93	90	87	81

4.4. Kofaktör Rejenerasyonu ve Kiral Biyokataliz

4.4.1. Serbest enzim çifti ile kiral biyokataliz

Serbest enzim çifti ile biyokataliz reaksiyonu 37 °C'da pH 7.0 fosfat tamponunda 1 mL lizat üzerine 0.5 mM NADPH, 200 mM glukoz ve 20 mM acetofenon eklenmesiyle başlatıldı. 24 saat sonunda alınan örneklerde asetpfenonun indirgenmesi sonucu enantiyomerik oran ve reaksiyon verimi belirlendi (Şekil 4.12). Tablo 4.5'te herhangi bir modifikasyon olmaksızın eksprese edilen *B. subtilis* enzim çiftinin aynı hücre içerisinde ko-ekspresyonu gerçekleştirildi. Bu amaçla 3 saat 37 °C'da 1 mM IPTG indüksiyonu sonrasında elde edilen lizatlar kullanılarak standart koşullar altında 340 nm'de NADPH izlenerek enzim aktiviteleri belirlendi.



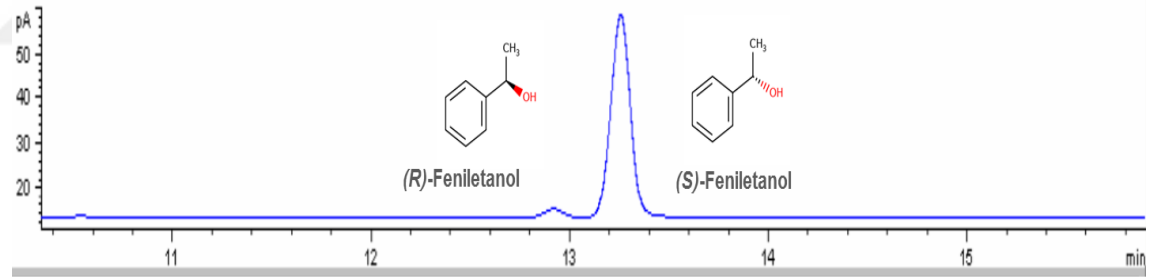
Şekil 4.12. Rekombinant *B. subtilis* GdH ve KreD ko-ekspresyonu enantiyoselektif kiral alkol eldesi.

Ko-ekspresyon gerçekleştirilen hücrede GdH ve KreD enzim aktivitesi 8,6 U/mg (0,5 mM NADPH) ve KreD aktivitesi (Etilpyruvat) indirgenmesi ile 9,2 U/mg (mg yaş hücre) olarak belirlendi. Elde edilen lizatlarda ayrıca kiral alkol sentezi gerçekleştirildi (Tablo 4.7)

Tablo 4.7. Rekombinant E.coli hücre lizatlarında GdH ve KreD aktiviteleri. Enzim aktivitesi mg yaş hücre için spektrofotometrik yöntemle ölçüldü. Kiral biyokataliz asetofenon indirgenmesi GC ile analizlendi.

Rekombinant Hücre	Enzim Aktiviteleri		Biyokataliz	
	Keton redüktaz Aktivitesi U/mg	Glukoz Dehidrojenaz U/mg	Verim %	ee %
E. coli KreD	6,9±0,8	-	17,4	99,0
E. coli GdH	-	6,80	2,6	99,0
E. coli GdH - KreD	9,20	8,60	91,0	99,0
E. coli pet24a	-*	-*	-	-

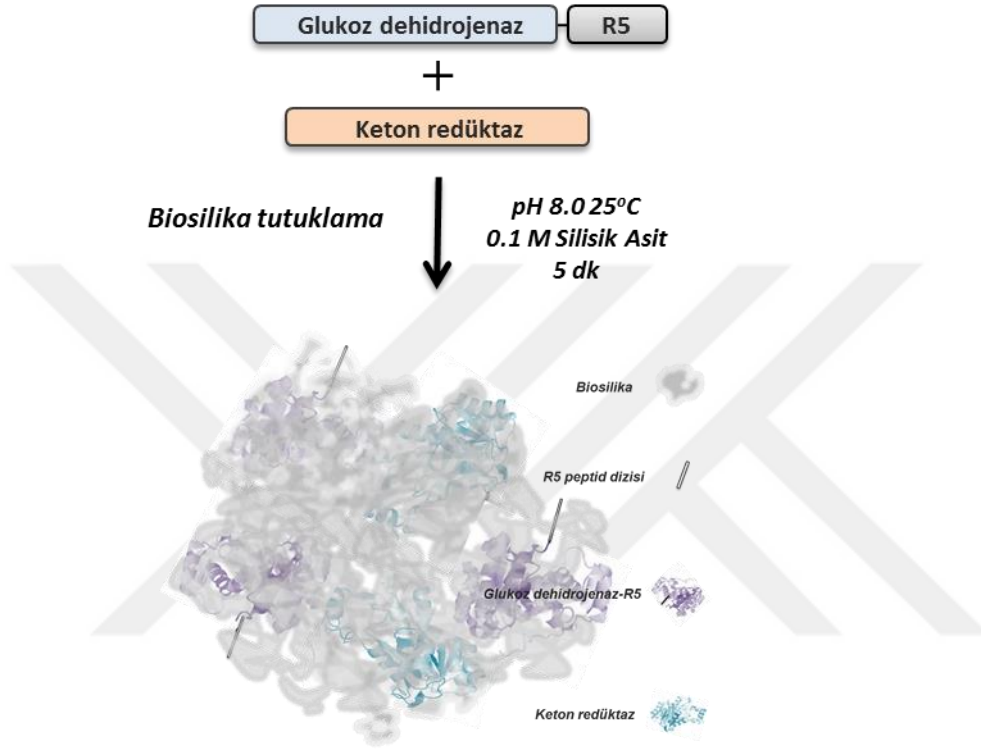
GdH ve KreD enzimlerinin birlikte üretildiği hücreden elde edilen lizatın, asetofenonun (S)-1-feniletanole indirgeme reaksiyonunu yüksek seçicilikle ($ee_p > 99\%$) katalizleyebildiği gösterildi (Tablo 4.5). Çift enzim eksprese edilen hücre lizatlarında çalışılan derişimlerde 24 saat sonunda %91 dönüşüm oranına ulaşıldı (Tablo 4.5). Biyokataliz sonucu oluşan S ve R enantiyomerlerin kirale GC ile ayrımı Şekil 4.16’da örnek kromatogramda gösterilmiştir.



Şekil 4.13 Asetofenon indirgenmesi sonucu oluşan ürünlerin kirale GC ile feniletanol enantiyomerlerinin ayrımı.

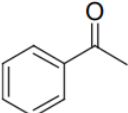
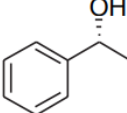
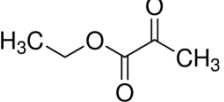
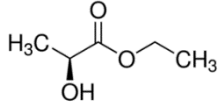
4.4.2. İmmobilize Enzim Çifti ile Biyokataliz

Koimmobilizasyonu GdH-R5'in biyosilisifikasyon yeteneği ile elde edilen KreD (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. GdH-R5 biyosilisifikasyonu sırasında KreD ko-immobilizasyonu.

Tablo 4.8. NADPH rejenerasyonu için immobilize GdH-R5 ve KreD enzim çifti ile kiral kataliz.

Substrat	Substrat Derişimi [mM]	Süre [dakika]	Dönüşüm [%]	ee [%]	Ürün
	10	120	>91	> 99 (S)	
	10	120	100	> 99 (S)	

5. TARTIŞMA

Oksidoredüktaz sınıfına bağlı ketoredüktazlar (KRED) NADPH bağımlı çok sayıda aromatik ve alifatik prokiral ketonunun redüksiyonunu stereoseçimli olarak katalizleyen yeşil biyokatalizörlerdir. Kiral sekonder alkollerin sentezinde kimya ve ilaç sanayinde her geçen gün yeni sentezlerde endüstriyel kullanım alanı bulmuştur. NADPH bağımlı bu enzimler rekombinant teknolojinin imkanlarına paralel olarak hızla küçük ve büyük ölçeklerde sentezlerde tercih edilmektedir. Ürün miktarına sitokiyometrik oranda gereksinim duyulan ve indirgenmiş kofaktör gereksinimi, canlı hücrelerin kullanıldığı biyotransfotrmayon reaksiyonları ile sağlanabilmektedir. Canlı hücre sistemlerinin reaksiyon verimliliklerinin izole enzimlere kıyasla düşük ve ürünlerin safsızlıklara kirlenmesi maliyetleri arttırmaktadır. Saf enzimlerin kullanılması kiral reaksiyonların çeşitliliği, verimliliği ve uygulanabilirliği açısından önemlidir. Verimli ve enantiyo-seçimli ketoredüktazların ve enzimatik kofaktör rejenerasyon sistemlerinin geliştirilebilmesi amacıyla araştırmaların sayısı hızla artmaktadır. Saf enzimlerin biyokataliz reaksiyonlarında daha çok yer bularak kullanılabilmesi, immobilizasyon stratejilerinin geliştirilmesini gerekli kılmaktadır.

Doktora tezi kapsamında keton-redüktaz (EC ="1.1.1.2") ve kofaktörü NADPH'ın rejenerasyonu için, glukoz-1-dehidrogenaz (GDH; EC ="1.1.1.47") enzimlerine ait gen bölgeleri *B. subtilis* 168'ten klonlanarak, *E.coli* BL21 hücrelerinde üretildi, saflaştırıldı ve karakterize edildi. Bu enzimlere biomimetik silika minerilizasyon yeteneği kazandırılabilmesi ve bu enzimlerin immobilizasyonlarının gerçekleştirilebilmesi amacıyla *Cylindrotheca fusiformis* diatomlarında karakterize edilen R5 peptid dizisi sentetik DNA primerleri kullanılarak C-terminal uçlara rekombinant tekniklerle transfer edildi. KreD ve GdH enzimlerinin R5 füzyon proteinleri üretilerek, nano yapılı silika sol matris içerisine iki enzim birarada immobilizasyonu gerçekleştirildi. Biomimetik silika içerisine immobilize KreD ve Glukoz/GdH kofaktör rejenerasyon sistemi ile asetofenon ve etil piruvat substratları kullanılarak kiral alkollerin üretimi $e_p > 99$ etkin biçimde kullanılabildiği gösterildi.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- A. Magnus, N., et al.** (2011). Diarylketone Ketoreductase Screen and Synthesis Demonstration to Access mGlu2 Receptor Potentiators.
- Adachi, O., et al.** (1980). "Crystallization and characterization of NADP-dependent D-glucose dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans*." Agricultural and Biological Chemistry **44**(2): 301-308.
- Anastas, P. T. and J. C. Warner** (1998). Green chemistry: Theory and practice. Oxford, Oxford University Press.
- Anastas, P. T. and J. C. Warner** (2000). Green Chemistry: Theory and Practice, Oxford University Press.
- Ansari, S. A. and Q. Husain** (2011). "Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: A review." Biotechnology Advances(0).
- Arnold, F. H.** (2001). "Combinatorial and computational challenges for biocatalyst design." Nature **409**: 253.
- Arnold, F. H.** (2018). "Directed Evolution: Bringing New Chemistry to Life." Angewandte Chemie International Edition **57**(16): 4143-4148.
- Asako, H., et al.** (2008). "Engineering of NADPH-dependent aldo-keto reductase from *Penicillium citrinum* by directed evolution to improve thermostability and enantioselectivity." Appl Microbiol Biotechnol **80**(5): 805-812.
- Baccile, N., et al.** (2009). "Introducing ecodesign in silica sol–gel materials." Journal of Materials Chemistry **19**(45): 8537-8559.
- Berenguer-Murcia, A. and R. Fernandez-Lafuente** (2010). "New trends in the recycling of NAD(P)H for the design of sustainable asymmetric reductions catalyzed by dehydrogenases." Curr. Org. Chem. **14**(Copyright (C) 2011 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 1000-1021.
- Betancor, L. and H. R. Luckarift** (2008). "Bioinspired enzyme encapsulation for biocatalysis." Trends in Biotechnology **26**(10): 566-572.
- Blank, L. M., et al.** (2010). "Redox Biocatalysis and Metabolism: Molecular Mechanisms and Metabolic Network Analysis." Antioxidants & Redox Signaling **13**(3): 349-394.
- Bonete, M. J., et al.** (1996). "Glucose dehydrogenase from the halophilic Archaeon *Haloferax mediterranei*: enzyme purification, characterisation and N-terminal sequence." FEBS Lett **383**(3): 227-229.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Brady, D. and J. Jordaan** (2009). "Advances in enzyme immobilisation." Biotechnology Letters **31**(11): 1639-1650.
- Brandstadt, K. F.** (2005). "Inspired by nature: an exploration of biocatalyzed siloxane bond formation and cleavage." Current Opinion in Biotechnology **16**(4): 393-397.
- Braun, S., et al.** (1990). "Biochemically active sol-gel glasses: the trapping of enzymes." Materials Letters **10**(1): 1-5.
- Bright, J. R., et al.** (1993). "Cloning, sequencing and expression of the gene encoding glucose dehydrogenase from the thermophilic archaeon *Thermoplasma acidophilum*." Eur J Biochem **211**(3): 549-554.
- Brinker, C. J.** (1988). "Hydrolysis and condensation of silicates: Effects on structure." Journal of Non-Crystalline Solids **100**(1): 31-50.
- Brooks, W. H., et al.** (2011). "The significance of chirality in drug design and development." Current topics in medicinal chemistry **11**(7): 760-770.
- Bruggink, A.** (2011). Synthesis of β -lactam antibiotics: chemistry, biocatalysis & process integration, Springer Science & Business Media.
- Brutchey, R. L. and D. E. Morse** (2008). "Silicatein and the Translation of its Molecular Mechanism of Biosilicification into Low Temperature Nanomaterial Synthesis." Chemical Reviews **108**(11): 4915-4934.
- Cao, A., et al.** (2010). "A Facile Method To Encapsulate Proteins in Silica Nanoparticles: Encapsulated Green Fluorescent Protein as a Robust Fluorescence Probe." Angewandte Chemie International Edition **49**(17): 3022-3025.
- Cao, L.** (2005). "Immobilised enzymes: science or art?" Current Opinion in Chemical Biology **9**(2): 217-226.
- Carballeira, J. D., et al.** (2009). "Microbial cells as catalysts for stereoselective red-ox reactions." Biotechnol. Adv. **27**(Copyright (C) 2011 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 686-714.
- Cardoso, M. B., et al.** (2010). "Protein Localization in Silica Nanospheres Derived via Biomimetic Mineralization." Advanced Functional Materials **20**(18): 3031-3038.
- Cassimjee, K. E., et al.** (2011). "One-step enzyme extraction and immobilization for biocatalysis applications." Biotechnology Journal **6**(4): 463-469.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Chemler, J. A., et al.** (2010). "Improving NADPH availability for natural product biosynthesis in *Escherichia coli* by metabolic engineering." Metabolic Engineering **12**(2): 96-104.
- Chen, C. S., et al.** (1982). "Quantitative analyses of biochemical kinetic resolutions of enantiomers." Journal of the American Chemical Society **104**(25): 7294-7299.
- Chen, X., et al.** (2016). "Efficient biosynthesis of ethyl (R)-4-chloro-3-hydroxybutyrate using a stereoselective carbonyl reductase from *Burkholderia gladioli*." BMC Biotechnology **16**(1): 70.
- Chenault, H. K. and G. M. Whitesides** (1987). "Regeneration of nicotinamide cofactors for use in organic synthesis." Applied Biochemistry and Biotechnology **14**(2): 147-197.
- Chhabra, N., et al.** (2013). "A review of drug isomerism and its significance." International journal of applied & basic medical research **3**(1): 16-18.
- Chien, L.-J. and C.-K. Lee** (2008). "Biosilicification of dual-fusion enzyme immobilized on magnetic nanoparticle." Biotechnology and Bioengineering **100**(2): 223-230.
- Choo, J. W. and H. K. Kim** (2015). "Production of (R)-Ethyl-4-Chloro-3-Hydroxybutanoate Using *Saccharomyces cerevisiae* YOL151W Reductase Immobilized onto Magnetic Microparticles." J Microbiol Biotechnol **25**(11): 1810-1818.
- Cipolatti, E. P., et al.** (2014). "Current status and trends in enzymatic nanoimmobilization." Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic **99**: 56-67.
- Coradin, T. and P. J. Lopez** (2003). "Biogenic silica patterning: simple chemistry or subtle biology?" ChemBiochem **4**(4): 251-259.
- Corey, E. and G. Reichard** (1989). Enantioselective and practical syntheses of R- and S-fluoxetine.
- Corpas, F. J. and J. B. Barroso** (2014). "NADPH-generating dehydrogenases: their role in the mechanism of protection against nitro-oxidative stress induced by adverse environmental conditions." Frontiers in Environmental Science **2**: 55.
- Davis, S. C., et al.** (2006). Enzymatic processes for the production of 4-substituted 3-hydroxybutyric acid derivatives and vicinal cyano, hydroxy substituted carboxylic acid esters, Google Patents.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- De Camp, W. H.** (1993). "Chiral drugs: The FDA perspective on manufacturing and control." Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis **11**(11): 1167-1172.
- de Carvalho, C.** (2011). "Enzymatic and whole cell catalysis: Finding new strategies for old processes." Biotechnology Advances **29**(1): 75-83.
- de Poulpiquet, A., et al.** (2014). "New trends in enzyme immobilization at nanostructured interfaces for efficient electrocatalysis in biofuel cells." Electrochimica Acta **126**: 104-114.
- Demadis, K. D., et al.** (2009). "Bioinspired control of colloidal silica in vitro by dual polymeric assemblies of zwitterionic phosphomethylated chitosan and polycations or polyanions." Advances in Colloid and Interface Science **151**(1): 33-48.
- Demir, A. S., et al.** (2011). "Selective oxidation and reduction reactions with cofactor regeneration mediated by galactitol-, lactate-, and formate dehydrogenases immobilized on magnetic nanoparticles." Journal of Biotechnology **152**(4): 176-183.
- DiCosimo, R., et al.** (2013). "Industrial use of immobilized enzymes." Chem Soc Rev **42**(15): 6437-6474.
- Duetz, W. A., et al.** (2001). "Using proteins in their natural environment: potential and limitations of microbial whole-cell hydroxylations in applied biocatalysis." Curr Opin Biotechnol **12**(4): 419-425.
- Eckstein, M., et al.** (2004). "Recent Developments in NAD(P)H Regeneration for Enzymatic Reductions in One- and Two-Phase Systems." Biocatalysis and Biotransformation **22**(2): 89-96.
- Edwards, J. S., et al.** (2011). "Immobilization of active human carboxylesterase 1 in biomimetic silica nanoparticles." Biotechnology Progress **27**(3): 863-869.
- Eguchi, T., et al.** (1992). "NADPH regeneration by glucose dehydrogenase from *Gluconobacter scleroides* for l-leucovorin synthesis." Biosci Biotechnol Biochem **56**(5): 701-703.
- Elsharkawy, S. and A. Mata** (2018). "Hierarchical Biomineralization: from Nature's Designs to Synthetic Materials for Regenerative Medicine and Dentistry." Advanced Healthcare Materials **7**(18): 1800178.
- Emond, S., et al.** (2012). "Alteration of enzyme activity and enantioselectivity by biomimetic encapsulation in silica particles." Chemical Communications **48**(9): 1314-1316.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Faber, K. and K. Faber** (1992). Biotransformations in organic chemistry, Springer.
- Fujita, Y., et al.** (1977). "Location and properties of glucose dehydrogenase in sporulating cells and spores of *Bacillus subtilis*." J Bacteriol **132**(1): 282-293.
- Garcia-Galan, C., et al.** (2011). "Potential of Different Enzyme Immobilization Strategies to Improve Enzyme Performance." Advanced Synthesis & Catalysis **353**(16): 2885-2904.
- Giardina, P., et al.** (1986). "Glucose dehydrogenase from the thermoacidophilic archaeobacterium *Sulfolobus solfataricus*." Biochem J **239**(3): 517-522.
- Goldberg, K., et al.** (2006). "Overcoming the thermodynamic limitation in asymmetric hydrogen transfer reactions catalyzed by whole cells." Biotechnol Bioeng **95**(1): 192-198.
- Gonçalves, C. M.** (2018). "Sol-Gel Silica Nanoparticles in Medicine: A Natural Choice. Design, Synthesis and Products." Molecules **23**(8).
- Green, R. and E. J. Rogers** (2013). "Transformation of chemically competent *E. coli*." Methods in enzymology **529**: 329-336.
- Groger, H., et al.** (2003). "Practical asymmetric enzymatic reduction through discovery of a dehydrogenase-compatible biphasic reaction media." Org Lett **5**(2): 173-176.
- Gumulya, Y., et al.** (2018). "Engineering highly functional thermostable proteins using ancestral sequence reconstruction." Nature Catalysis **1**(11): 878-888.
- Haberland, J., et al.** (2002). "New Continuous Production Process for Enantiopure (2R,5R)-Hexanediol." Organic Process Research & Development **6**(4): 458-462.
- Hanefeld, U., et al.** (2009). "Understanding enzyme immobilisation." Chemical Society Reviews **38**(2): 453-468.
- Hanson, R. L., et al.** (1999). "Enzymatic synthesis of L-6-hydroxynorleucine." Bioorg Med Chem **7**(10): 2247-2252.
- Hildebrandt, P., et al.** (2001). "Efficient resolution of prostereogenic arylaliphatic ketones using a recombinant alcohol dehydrogenase from *Pseudomonas fluorescens*." Tetrahedron: Asymmetry **12**(8): 1207-1210.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hilt, W., et al.** (1991). "Glucose dehydrogenase from *Bacillus subtilis* expressed in *Escherichia coli*. I: Purification, characterization and comparison with glucose dehydrogenase from *Bacillus megaterium*." Biochim Biophys Acta **1076**(2): 298-304.
- Himmelberger, J. A., et al.** (2018). Chapter 3.14 - Biocatalysis: Nature's Chemical Toolbox. Green Chemistry. B. Török and T. Dransfield, Elsevier: 471-512.
- Holsch, K. and D. Weuster-Botz** (2010). "Enantioselective reduction of prochiral ketones by engineered bifunctional fusion proteins." Biotechnology and Applied Biochemistry **56**: 131-140.
- Huisman, G. W., et al.** (2010). "Practical chiral alcohol manufacture using ketoreductases." Current Opinion in Chemical Biology **14**(2): 122-129.
- Hummel, W.** (1990). "Enzyme-catalyzed synthesis of optically pure R (+)-phenylethanol." Biotechnology Letters **12**(6): 403-408.
- Hummel, W.** (1997). New alcohol dehydrogenases for the synthesis of chiral compounds. New Enzymes for Organic Synthesis: Screening, Supply and Engineering. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg: 145-184.
- Hummel, W.** (1999). "Large-scale applications of NAD(P)-dependent oxidoreductases: recent developments." Trends Biotechnol **17**(12): 487-492.
- Hummel, W., et al.** (2003). "Towards a large-scale asymmetric reduction process with isolated enzymes: Expression of an (S)-alcohol dehydrogenase in *E. coli* and studies on the synthetic potential of this biocatalyst." Advanced Synthesis & Catalysis **345**(1-2): 153-159.
- Illanes, A., et al.** "Recent trends in biocatalysis engineering." Bioresource Technology(0).
- Inoue, K., et al.** (2005). "Production of (R)-chiral alcohols by a hydrogen-transfer bioreduction with NADH-dependent *Leifsonia* alcohol dehydrogenase (LSADH)." Tetrahedron: Asymmetry **16**(15): 2539-2549.
- Jany, K. D., et al.** (1984). "Complete amino acid sequence of glucose dehydrogenase from *Bacillus megaterium*." FEBS Lett **165**(1): 6-10.
- Jemli, S., et al.** (2016). "Biocatalysts: application and engineering for industrial purposes." Critical Reviews in Biotechnology **36**(2): 246-258.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kataoka, M., et al.** (1999). "Stereoselective reduction of ethyl 4-chloro-3-oxobutanoate by *Escherichia coli* transformant cells coexpressing the aldehyde reductase and glucose dehydrogenase genes." Appl Microbiol Biotechnol **51**(4): 486-490.
- Kim, J. and J. W. Grate** (2003). "Single-enzyme nanoparticles armored by a nanometer-scale organic/inorganic network." Nano Letters **3**(9): 1219-1222.
- Knecht, M. R. and D. W. Wright** (2003). "Functional analysis of the biomimetic silica precipitating activity of the R5 peptide from *Cylindrotheca fusiformis*." Chemical Communications(24): 3038-3039.
- Kosjek, B., et al.** (2004). "Purification and characterization of a chemotolerant alcohol dehydrogenase applicable to coupled redox reactions." Biotechnol Bioeng **86**(1): 55-62.
- Kratzer, R., et al.** (2008). "Whole-cell bioreduction of aromatic alpha-keto esters using *Candida tenuis* xylose reductase and *Candida boidinii* formate dehydrogenase co-expressed in *Escherichia coli*." Microb Cell Fact **7**: 37.
- Kroger, N., et al.** (1999). "Polycationic peptides from diatom biosilica that direct silica nanosphere formation." Science **286**(5442): 1129-1132.
- Kroger, N., et al.** (2001). "Silica-precipitating peptides from diatoms - The chemical structure of silaffin-1A from *Cylindrotheca fusiformis*." Journal of Biological Chemistry **276**(28): 26066-26070.
- Kroger, N., et al.** (2002). "Self-assembly of highly phosphorylated silaffins and their function in biosilica morphogenesis." Science **298**(5593): 584-586.
- Kröger, N.** (2007). "Prescribing diatom morphology: toward genetic engineering of biological nanomaterials." Current Opinion in Chemical Biology **11**(6): 662-669.
- Lampel, K. A., et al.** (1986). "Characterization of the developmentally regulated *Bacillus subtilis* glucose dehydrogenase gene." J Bacteriol **166**(1): 238-243.
- Lechner, C. and C. Becker** (2015). "Silaffins in Silica Biomineralization and Biomimetic Silica Precipitation." Marine Drugs **13**(8): 5297.
- Lechner, C. C. and C. F. W. Becker** (2014). "A sequence-function analysis of the silica precipitating silaffin R5 peptide." Journal of Peptide Science **20**(2): 152-158.
- Lechner, C. C. and C. F. W. Becker** (2015). "Immobilising proteins on silica with site-specifically attached modified silaffin peptides." Biomaterials Science **3**(2): 288-297.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Lee, W. T. and H. R. Levy** (1992). "Lysine-21 of *Leuconostoc mesenteroides* glucose 6-phosphate dehydrogenase participates in substrate binding through charge-charge interaction." Protein Sci **1**(3): 329-334.
- Liese, A., et al.** (1998). "A novel reactor concept for the enzymatic reduction of poorly soluble ketones." Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic **4**(1-2): 91-99.
- Lin, S. S., et al.** (1999). "Continuous production of L-carnitine with NADH regeneration by a nanofiltration membrane reactor with coimmobilized L-carnitine dehydrogenase and glucose dehydrogenase." J Biosci Bioeng **87**(3): 361-364.
- Liu, W. and P. Wang** (2007). "Cofactor regeneration for sustainable enzymatic biosynthesis." Biotechnology Advances **25**(4): 369-384.
- Luckarift, H. R., et al.** (2004). "Enzyme immobilization in a biomimetic silica support." Nat Biotech **22**(2): 211-213.
- Madhavan, A., et al.** (2017). "Strategies for design of improved biocatalysts for industrial applications." Bioresource Technology **245**: 1304-1313.
- Marner, W., et al.** (2009). "Enzyme Immobilization via Silaffin-Mediated Autoencapsulation in a Biosilica Support." Biotechnology Progress: 417-423.
- Marner, W. D., et al.** (2007). "Morphology of Artificial Silica Matrices Formed via Autossilification of a Silaffin/Protein Polymer Chimera." Biomacromolecules **9**(1): 1-5.
- Matsuda, T., et al.** (2000). "Mechanism for improving stereoselectivity for asymmetric reduction using acetone powder of microorganism." Tetrahedron Letters **41**(21): 4135-4138.
- Min, K. and Y. J. Yoo** (2014). "Recent progress in nanobiocatalysis for enzyme immobilization and its application." Biotechnology and Bioprocess Engineering **19**(4): 553-567.
- Mitamura, T., et al.** (1989). "Enzymatic properties of isozymes and variants of glucose dehydrogenase from *Bacillus megaterium*." Eur J Biochem **186**(1-2): 389-393.
- Moehlenbrock, M. J. and S. D. Minter** (2017). "Introduction to the Field of Enzyme Immobilization and Stabilization." Methods Mol Biol **1504**: 1-7.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Moore, C. M., et al.** (2004). "Improving the environment for immobilized dehydrogenase enzymes by modifying Nafion with tetraalkylammonium bromides." Biomacromolecules 5(4): 1241-1247.
- Moore, J. C., et al.** (2007). "Advances in the Enzymatic Reduction of Ketones." Accounts of Chemical Research 40(12): 1412-1419.
- Naik, R. R., et al.** (2004). "Entrapment of enzymes and nanoparticles using biomimetically synthesized silica." Chemical Communications(15): 1684-1685.
- Ni, Y., et al.** (2011). "Highly stereoselective reduction of prochiral ketones by a bacterial reductase coupled with cofactor regeneration." Organic & Biomolecular Chemistry 9(15): 5463-5468.
- Ni, Y. and J.-H. Xu** (2012). "Biocatalytic ketone reduction: A green and efficient access to enantiopure alcohols." Biotechnology Advances 30(6): 1279-1288.
- Noyori, R.** (2002). "Asymmetric catalysis: science and opportunities (Nobel lecture)." Angew Chem Int Ed Engl 41(12): 2008-2022.
- Patel, R. N.** (2000). Stereoselective biocatalysis, CRC Press.
- Patel, R. N.** (2013). "Biocatalytic synthesis of chiral alcohols and amino acids for development of pharmaceuticals." Biomolecules 3(4): 741-777.
- Patel, R. N., et al.** (1993). "Microbial synthesis of (2R,3S)-(-)-N-benzoyl-3-phenyl isoserine ethyl ester-a taxol side-chain synthon." Tetrahedron: Asymmetry 4(9): 2069-2084.
- Patel, R. N., et al.** (1993). "Enantioselective microbial reduction of 3, 5-dioxo-6-(benzyloxy) hexanoic acid, ethyl ester." Enzyme and microbial technology 15(12): 1014-1021.
- Patwardhan, S. V.** (2011). "Biomimetic and bioinspired silica: recent developments and applications." Chemical Communications 47(27): 7567-7582.
- Patwardhan, S. V. and S. J. Clarson** (2002). "Silicification and Biosilicification. Part 4. Effect of Template Size on the Formation of Silica." Journal of Inorganic and Organometallic Polymers 12(3): 109-116.
- Patwardhan, S. V., et al.** (2005). "On the role(s) of additives in bioinspired silicification." Chemical Communications(9): 1113-1121.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Pauly, H. E. and G. Pfeleiderer** (1975). "D-glucose dehydrogenase from *Bacillus megaterium* M 1286: purification, properties and structure." Hoppe Seylers Z Physiol Chem **356**(10): 1613-1623.
- Pavlidis, I. V., et al.** "Development of effective nanobiocatalytic systems through the immobilization of hydrolases on functionalized carbon-based nanomaterials." Bioresource Technology(0).
- Pollard, D., et al.** (2006). "Effective synthesis of (S)-3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl ethanol by asymmetric enzymatic reduction." Tetrahedron: Asymmetry **17**(4): 554-559.
- Prasad Shastri, V.** (2015). "Biomaterialization: A confluence of materials science, biophysics, proteomics, and evolutionary biology." MRS Bulletin **40**(6): 473-477.
- Richter, N., et al.** (2010). "Characterization of a whole-cell catalyst co-expressing glycerol dehydrogenase and glucose dehydrogenase and its application in the synthesis of L-glyceraldehyde." Biotechnology and Bioengineering **106**(4): 541-552.
- Schmid, A., et al.** (2001). "Industrial biocatalysis today and tomorrow." Nature **409**(6817): 258.
- Schmidt, M., et al.** (2006). "Directed Evolution of an Esterase from *Pseudomonas fluorescens* Yields a Mutant with Excellent Enantioselectivity and Activity for the Kinetic Resolution of a Chiral Building Block." ChemBioChem **7**(5): 805-809.
- Schroder, H. C., et al.** (2007). "Enzymatic production of biosilica glass using enzymes from sponges: basic aspects and application in nanobiotechnology (material sciences and medicine)." Naturwissenschaften **94**(5): 339-359.
- Schubert, T., et al.** (2002). "Highly Enantioselective Preparation of Multifunctionalized Propargylic Building Blocks." Angewandte Chemie International Edition **41**(4): 634-637.
- Sheldon, R. A.** (1993). Chirechnology: industrial synthesis of optically active compounds, CRC press.
- Sheldon, R. A.** (2007). "Enzyme immobilization: The quest for optimum performance." Advanced Synthesis & Catalysis **349**(8-9): 1289-1307.
- Sheldon, R. A. and D. Brady** (2018). "The limits to biocatalysis: pushing the envelope." Chemical Communications **54**(48): 6088-6104.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sheldon, R. A. and F. v. Rantwijk** (2004). "Biocatalysis for Sustainable Organic Synthesis." Australian Journal of Chemistry **57**(4): 281-289.
- Sheldon, R. A. and J. M. Woodley** (2018). "Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry." Chemical Reviews **118**(2): 801-838.
- Shimizu, K., et al.** (1998). "Silicatein α : cathepsin L-like protein in sponge biosilica." Proceedings of the National Academy of Sciences **95**(11): 6234.
- Smith, L. D., et al.** (1989). "Purification and characterization of glucose dehydrogenase from the thermoacidophilic archaebacterium *Thermoplasma acidophilum*." Biochem J **261**(3): 973-977.
- St Clair, N., et al.** (2000). "Cofactor-Bound Cross-Linked Enzyme Crystals (CLEC) of Alcohol Dehydrogenase." Angew Chem Int Ed Engl **39**(2): 380-383.
- Stillger, T., et al.** (2002). "Überwindung von thermodynamischen Limitierungen in substratgekoppelten Cofaktorregenerierungsverfahren." Chemie Ingenieur Technik **74**(7): 1035-1039.
- Tajuddin, I., et al.** (2007). Silica nanostructure formation from synthetic R5 peptide - art. no. 64130q. Smart Materials IV. N. H. Voelcker. Bellingham, Spie-Int Soc Optical Engineering. **6413**: Q4130-Q4130.
- Ueda, M. and A. Tanaka** (2000). "Genetic immobilization of proteins on the yeast cell surface." Biotechnology Advances **18**(2): 121-140.
- van der Donk, W. A. and H. Zhao** (2003). "Recent developments in pyridine nucleotide regeneration." Curr Opin Biotechnol **14**(4): 421-426.
- Villela Filho, M., et al.** (2003). "Is logP a convenient criterion to guide the choice of solvents for biphasic enzymatic reactions?" Angew Chem Int Ed Engl **42**(26): 2993-2996.
- Villela Filho, M., et al.** (2003). "Is log P a convenient criterion to guide the choice of solvents for biphasic enzymatic reactions?" Angewandte Chemie International Edition **42**(26): 2993-2996.
- Vrieling, E. G., et al.** (2005). "Controlled silica synthesis inspired by diatom silicon biomineralization." Journal of Nanoscience and Nanotechnology **5**(1): 68-78.
- Wandrey, C.** (2004). "Biochemical reaction engineering for redox reactions." The Chemical Record **4**(4): 254-265.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wang, M., et al.** (2012). "Biocatalyst development by directed evolution." Bioresource technology **115**: 117-125.
- Wang, X., et al.** (2017). "Cofactor NAD(P)H Regeneration Inspired by Heterogeneous Pathways." Chem **2**(5): 621-654.
- Winkler, C., et al.** (2012). Asymmetric bioreduction of activated alkenes to industrially relevant optically active compounds.
- Wohlgemuth, R.** (2010). "Biocatalysis - key to sustainable industrial chemistry." Current Opinion in Biotechnology **21**(6): 713-724.
- Wong, C.-H. and G. M. Whitesides** (1981). "Enzyme-catalyzed organic synthesis: NAD (P) H cofactor regeneration by using glucose-6-phosphate and the glucose-5-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides*." Journal of the American Chemical Society **103**(16): 4890-4899.
- Wu, J. T. and J. A. Knight** (1986). "Stability of NADPH: effect of various factors on the kinetics of degradation." Clinical Chemistry **32**(2): 314-319.
- Yan, Z., et al.** (2011). "Biocatalytic reduction of prochiral aromatic ketones to optically pure alcohols by a coupled enzyme system for cofactor regeneration." Tetrahedron Letters **52**(9): 999-1002.
- Zhang, R., et al.** (2009). "Ser67Asp and His68Asp substitutions in candida parapsilosis carbonyl reductase alter the coenzyme specificity and enantioselectivity of ketone reduction." Appl Environ Microbiol **75**(7): 2176-2183.
- Zhu, D. and L. Hua** (2006). "Enantioselective enzymatic reductions of sterically bulky aryl alkyl ketones catalyzed by a NADPH-dependent carbonyl reductase." The Journal of organic chemistry **71**(25): 9484-9486.
- Zhu, D., et al.** (2006). "Asymmetric ketone reduction by a hyperthermophilic alcohol dehydrogenase. The substrate specificity, enantioselectivity and tolerance of organic solvents." Tetrahedron: Asymmetry **17**(21): 3010-3014.
- Zhu, D., et al.** (2005). "'Green' synthesis of important pharmaceutical building blocks: enzymatic access to enantiomerically pure α -chloroalcohols." Tetrahedron: Asymmetry **16**(19): 3275-3278.
- Zhu, D., et al.** (2005). "Evaluation of substituent effects on activity and enantioselectivity in the enzymatic reduction of aryl ketones." Tetrahedron: Asymmetry **16**(8): 1541-1546.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Zhu, D., et al.** (2006). "Stereoselective ketone reduction by a carbonyl reductase from *Sporobolomyces salmonicolor*. Substrate specificity, enantioselectivity and enzyme-substrate docking studies." Organic & biomolecular chemistry **4**(14): 2690-2695.
- Zhu, D., et al.** (2008). "Inverting the enantioselectivity of a carbonyl reductase via substrate– enzyme docking-guided point mutation." Org Lett **10**(4): 525-528.
- [Anon]** (2004). "Biosilica method aids enzyme efficiency." Chemical & Engineering News: 26-26.



TEŞEKKÜRLER

Bu çalışma süresince bilgisini, deneyimlerini ve sabrını paylaşmaktan çekinmeyen Prof.Dr. Ali KILINÇ'a ve anahtarlarını paylaştığı için Prof.Dr. Azmi TELEFONCU'ya, merakını paylaşan Figen ZİHNİOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım. Maceramızda beraber olduğum, ilham kaynağım güzel insanlara sevgilerinin varlığı için teşekkür ederim. Burada yazamadıklarına ve Kardeşime, babama ve rüzgar olan anneme teşekkürler.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel bilgiler

Ad / Soyad

Taylan Kurtuluş ÖZTÜRK

Adres

Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü

Telefon

İş +902323438624

Cep +905433639118

Faks

+902323438624

e-posta

taylan.ozturk@ege.edu.tr

Doğum tarihi

12 Eylül 1980

Medeni Durum

Bekar

İş deneyimi

Tarihler

01 Ekim 2007 →

Kurum

Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü

Ana faaliyetler ve sorumluluklar

Biyokimya Bölümü, Uzman

İşverenin adı ve adresi

Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyokimya Bölümü
35100 Bornova, İzmir

Eğitim ve öğretim

Tarihler

Şubat.2009-2019

Doktora Programı

Biyokimya

Eğitim ve öğretim veren kurum

Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyokimya Bölümü

Tarihler

2006 - 2009

Yüksek Lisans Programı

Biyokimya

Eğitim ve öğretim veren kurum

Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyokimya Bölümü

Tarihler

1999 - 2005

Lisans Programı

Biyokimya

Eğitim ve öğretim veren kurum

Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyokimya Bölümü

Akademik Eğitim Bilgileri

Doktora Tezi	“Rekombinant Aldo/Keto Redüktaz ve Glukoz Dehidrojenaz temelli enzimatik kofaktör rejenerasyon sistemlerinin tasarlanması kiral alkollerin eldesine yönelik uygulamalar”
Yüksek Lisans Tezi	“Lipaz Enziminin Polivinil Alkol (Pva) Üzerine İmmobilizasyonu ve Bazı Organik Çözgenlerde Kullanım Olanaklarının Araştırılması” Ege Üniversitesi Araştırma Fonu (2005-Fen-13)
Yurt Dışı Çalışmalar	1.Mart-09.Eylül 2010 Greifswald Üniversitesi, Prof.Dr. Uwe Bornscheuer, “ Enzyme design and biocatalysis: practical investigations ” ERASMUS
Yurt içi Çalışmalar	19 Tem-1 Eyl. 2009 Sabancı Üniversitesi, Doç. Dr. Uğur Sezerman, “ Protein Moleküler Modelleme, Moleküler Dinamik, Moleküler Mekanik ”
TÜBİTAK Proje Bursu	Bazı ($\beta\alpha$)8-barrel enzimlerin ilişkisinin rasyonel ve evlusioner protein tasarımı ile belirlenmesi (Proje No: TÜBİTAK-106M111) 10 Ay
Uygulamalı kurslar	14–16 Şubat, 2007 “Temel Moleküler Biyolojik Teknikler” Uygulamalı Kurs, Türk Biyokimya Derneği, Ege Üniversitesi / İzmir; 18-28 Haziran, 2007, “Biyokimya ve Moleküler Biyolojide Modern Teknikler Yaz Okulu” Didim / Aydın;
Kongre, Sempozyum ve Yaz Okulları	19-25 Haz. 2011 “ Metabolizma Mühendisliği ” Lisansüstü Yaz Okulu, Muğla; 18-22 May. 2011 “ International Congress on Bioinformatics and Biomics ” Kuşadası 20-26 Eyl. 2009 “ Protein Analitiği ” Lisansüstü Yaz Okulu, Muğla; 01-05 Ekm. 2008 “ International Enzyme Engineering Symposium ” Aydın; 21-31 Ekm. 2007 “ XV. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi ” Antalya; 18-28 Haz. 2007 “ Biyokimya ve Moleküler Biyolojide Modern Teknikler ” Lisansüstü Yaz Okulu, Muğla; 26-Ağs.-1 Eyl. 2007 “ Protein Mühendisliği ” Lisansüstü Yaz Okulu, Aydın; 17-20 May. 2007 “ Drug Research and Development: From Chemistry to Medicine ” Antalya; 24-29 Haz. 2006, “ Molecules in Health & Disease ” 31. FEBS, İstanbul; 20-26 Haz. 15-21 Ağs. 2004 “ Biyoinformatik-I ” “ Biyoinformatik-II ” Lisansüstü Yaz Okulu, Antalya; Lisansüstü Yaz Okulu, İstanbul; 13-14 Haz. 2002, EBILTEM “ Biyoteknolojide Hızlı Yöntemler ve Çalışma Prensipleri ” İzmir;

Yayınlar	
SCI	"Immobilization of lipase in organic solvent in the presence of fatty acid additives" Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic Volume 67, Issues 3-4, December 2010, Pages 214-218
SCI	"Glycoalkaloid isolation from Solanum linnaeanum berries" Fruits, Volume 70, Issues 6, 2015, Pages 371-375
SCI	"Optimizing subcritical water extraction of Morus nigra L. fruits for maximization of tyrosinase inhibitory activity" The Journal of Supercritical Fluids, Volume 127, September 2017, Pages 15-22
Uluslar Arası Bildiriler	
Poster "En iyi Poster"	"Nano encapsulation of L-asparaginase in Biosilica support" Support" International "Enzymes for Biocatalysis" Workshop, 03rd - 05th of June 2014, ISTANBUL
Sözlü	"Autoencapsulation PFEI using R5 fusion" 18-22 May. 2011 "International congress on bioinformatics and biomics" Muğla
Poster	"Lysozyme mediated synthesis of silica for Candida rugosa lipase immobilization" 16-19 Haz. 2010 "Vth. International bioengineering congress" İzmir
Poster	"Immobilization of Porcine Pancreatic Lipase on Crosslinked PVA in the Precense of Fatty Acids" 01-05 Ekm 2008, "International Enzyme Engineering Symposium" Aydın
Poster	"Enhanced enzyme activity of immobilized lipase as biocatalyst for synthesis of esters in organic media" 17-20 May. 2007 "International Symposium of Drug Research &Development: From Chemistry to Medicine"
Ulusal Bildiriler	
Poster	"İmmobilize pankreatik lipazın susuz ortamda esterifikasyon aktivitesinin incelenmesi" 21-31 Ekm, 2007 "XV. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi" Antalya
Poster	"Circinella Sp.'den hücre dışı lipazın saflaştırılması karakterizasyonu" 21-31 Ekm, 2007 "XV. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi" Antalya
Uluslararası organizasyon görevleri	
Teknik Komite	7-11 Sept. 2014 "The International Seminar on Lab on A Chip Biosensor Systems"
Teknik Komite	18-22 May. 2011 "International Congress on Bioinformatics and Biomics" Kuşadası
Teknik Komite	01-05 Ekim 2008 "International Enzyme Engineering Symposium"
Referanslar	Prof. Dr. Azmi TELEFONCU; Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü e-Posta: azmi.telefoncu@ege.edu.tr Mobil: +905332614863 İş: +902323438624



EKLER

Ek 1 Keton Redüktaz Enziminin DNA Dizisi

>gnl|BSUB|BSU29050 ytbE "BSU29050-MONOMER" 2970038..2970880
Bacillus subtilis subtilis 168

```
atgACAACAC ATTTACAAGC AAAAGCAACA CTTCATAATG GGGTAGAAAT GCCTTGGTTC
GGCCTCGGCG TGTTCCAAGT GGAAGAAGGA TCTGAACTGG TAAACGCAGT TAAAACTGCC
ATTGTTCACG GGTACCGCAG TATTGATACT GCAGCAATCT ATGGAAATGA AGCTGGAGTC
GGAGAAGGGA TTCGGAAGG CATTGAAGAA GCAGGCATTT CAAGAGAGGA TCTGTTTATC
ACATCGAAAG TATGGAATGC GGATTTAGGC TACGAAGAAA CACTCGCCGC GTTTGAAACA
AGTCTGTCCA AACTCGGTCT GGATTATTTG GATCTATACC TCATCCACTG GCCTGTAGAA
GGAAAGTATA AAGAAGCTTG GAGAGCGCTT GAAACGCTGT ATAAAGAAGG CCGTATCAAA
GCGATTGGCG TAAGCAACTT CCAAATTCAC CATCTTGAAG ATCTGATGAC GGCAGCTGAA
ATTAAGCCTA TGATTAACCA AGTGGAATTT CACCCGCGCC TCACACAAAA AGAGTTGATA
AGATACTGCC AAAATCAGGG CATCCAGATG GAGGCTTGGT CACCTTTAAT GCAGGGACAG
CTGCTGGATC ACCCTGTATT GGCTGACATC GCTCAAACAT ATAATAAATC TGTCGCACAA
ATTATTTTGC GCTGGGATCT GCAGCATGGC ATTATAACGA TTCCTAAATC AACGAAGGAA
CACCGCATTA AAGAAAATGC AAGCGTATTT GACTTTGAAT TAACGCAGGA TGACATGAAC
CGAATCGATG CACTGAATGA AAAC TTGCGC GTCGGTCCTG ATCCGGACAA CTTTGATTTT
taa
```

Ek 2 Keton redüktaz enziminin Protein Dizisi (His tag birlikte)

10	20	30	40	50
MTTHLQAKAT	LHNGVEMPWF	GLGVFQVEEG	SELVNAVKTA	IVHGYRSIDT
60	70	80	90	100
AAIYGNEAGV	GEГИREGIEE	AGISREDLFI	TSKVWNADLG	YEETLAAFET
110	120	130	140	150
SLSKLGLDYL	DLYLIHWPVE	GKYKEAWRAL	ETLYKEGRIK	AIGVSNFQIH
160	170	180	190	200
HLEDLMTAAE	IKPMINQVEF	HPRLTQKELI	RYCQNQGIQM	EAWSPLMQGQ
210	220	230	240	250
LLDHPVLADI	AQTYNKSVAQ	IILRWDLQHG	IITIPKSTKE	HRIKENASVF
260	270	280		
DFELTQDDMN	RIDALNENLR	VGPDPDNFDF	GHHHHHH-	

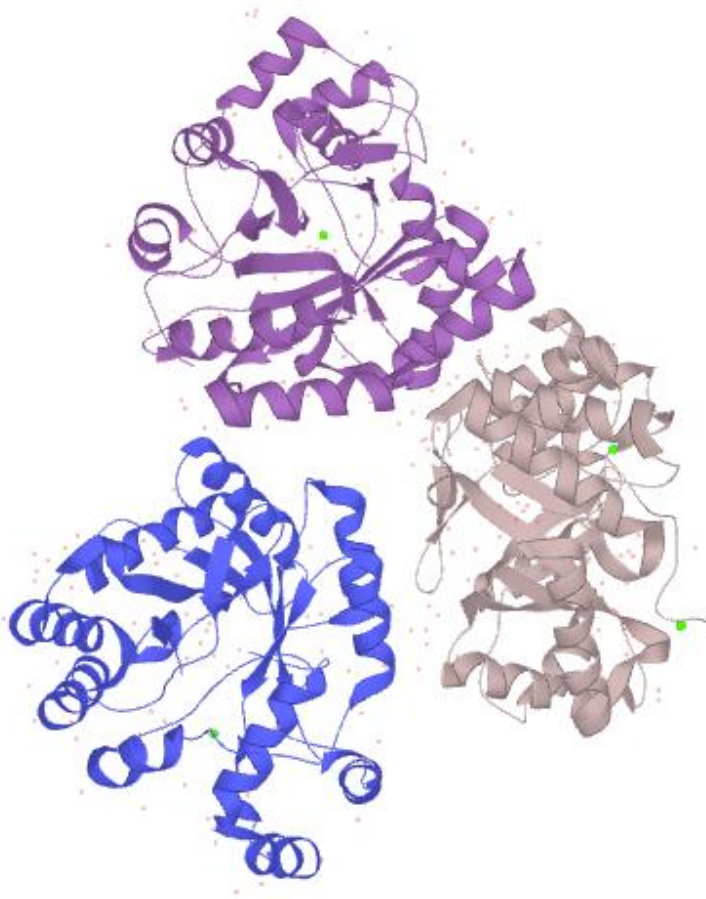
Ek 3 Keton redüktaz enziminin Protein Dizisi (R5 peptid dizisi ve His tag ile birlikte)

10	20	30	40	50
MTTHLQAKAT	LHNGVEMPWF	GLGVFQVEEG	SELVNAVKTA	IVHGYRSIDT
60	70	80	90	100
AAIYGNEAGV	GEGIREGIEE	AGISREDLFI	TSKVWNADLG	YEETLAAFET
110	120	130	140	150
SLSKLGLDYL	DLYLIHWPVE	GKYKEAWRAL	ETLYKEGRIK	AIGVSNFQIH
160	170	180	190	200
HLEDLMTAAE	IKPMINQVEF	HPRLTQKELI	RYCQNQGIQM	EAWSPLMQGQ
210	220	230	240	250
LLDHPVLADI	AQTYNKVAQ	IILRWDLQHG	IITIPKSTKE	HRIKENASVF
260	270	280	290	300
DFELTQDDMN	RIDALNENLR	VGPDPDNFDF	GSSKKSGSYS	GSKGSKRRIL

HHHHHH

PDB id: 3B3D

B.subtilis YtbE



Ek 3 Glukoz 1 Dehidrojenaz Enziminin DNA Dizisi

```
>gnl|BSUB|BSU03930 gdh "BSU03930-MONOMER" 445344..446129 Bacillus subtilis subtilis 168
```

```
atgTATCCGG ATTTAAAAGG AAAAGTCGTC GCTATTACAG GAGCTGCTTC AGGGCTCGGA
AAGGCGATGG CCATTCGCTT CGGCAAGGAG CAGGCAAAAG TGGTTATCAA CTATTATAGT
AATAACAAG ATCCGAACGA GGTAAAAGAA GAGGTCATCA AGGCGGGCGG TGAAGCTGTT
GTCGTCCAAG GAGATGTCAC GAAAGAGGAA GATGTAAAAA ATATCGTGCA AACGGCAATT
AAGGAGTTCG GCACACTCGA TATTATGATT AATAATGCCG GTCTTGAAAA TCCTGTGCCA
TCTCACGAAA TGCCGCTCAA GGATTGGGAT AAAGTCATCG GCACGAACCT AACGGGTGCC
TTTTTAGGAA GCCGTGAAGC GATTAAATAT TTCGTAGAAA ACGATATCAA GGGAAATGTC
ATTAACATGT CCAGTGTGCA CGAAGTGATT CCTTGGCCGT TATTTGTCCA CTATGCGGCA
AGTAAAGGCG GGATAAAGCT GATGACAGAA ACATTAGCGT TGGAATACGC GCCGAAGGGC
ATTCGCGTCA ATAATATTGG GCCAGGTGCG ATCAACACGC CAATCAATGC TGAAAAATTC
GCTGACCCTA AACAGAAAGC TGATGTAGAA AGCATGATTC CAATGGGATA TATCGGCGAA
CCGGAGGAGA TCGCCGCAGT AGCAGCCTGG CTTGCTTCGA AGGAAGCCAG CTACGTCACA
GGCATCACGT TATTCGCGGA CGGCGGTATG ACACAATATC CTTTATTCCA GGCAGGCCGC
GGTtaa
```

Ek 4 Glukoz 1 Dehidrojenaz Enziminin Protein Dizisi (His-Tag ile birlikte)

```
>sp|P12310|DHG_BACSU Glucose 1-dehydrogenase OS=Bacillus subtilis
(strain 168) OX=224308 GN=gdh PE=2 SV=2
```

10	20	30	40	50
MYPDLKGKVV	AITGAASGLG	KAMAIRFGKE	QAKVVINYYS	NKQDPNEVKE
60	70	80	90	100
EVIKAGGEAV	VVQGDVTKEE	DVKNIVQTAI	KEFGTLDIMI	NNAGLENPVP
110	120	130	140	150
SHEMPLKDWD	KVIGTNLTGA	FLGSREAIKY	FVENDIKGNV	INMSSVHEVI
160	170	180	190	200
PWPLFVHYAA	SKGGIKLMTE	TLALEYAPKG	IRVNNIGPGA	INTPINAЕКF
210	220	230	240	250
ADPKQKADVE	SMIPMGYIGE	PEEIAAVAAW	LASKEASYVT	GITLFADGGM
260				
TQYPSFQAGR	GH	HHHHHH		

Ek 3 Glukoz 1 Dehidrojenaz Protein Dizisi (R5 peptid dizisi füzyonu ve His tag)

10	20	30	40	50
MYPDLKGKVV	AITGAASGLG	KAMAIRFGKE	QAKVVINYYS	NKQDPNEVKE
60	70	80	90	100
EVIKAGGEAV	VVQGDVTKEE	DVKNIVQTAI	KEFGTLDIMI	NNAGLENPVP
110	120	130	140	150
SHEMPLKDWD	KVIGTNLTGA	FLGSREAIKY	FVENDIKGNV	INMSSVHEVI
160	170	180	190	200
PWPLFVHYAA	SKGGIKLMTE	TLALEYAPKG	IRVNNIGPGA	INTPINAKEF
210	220	230	240	250
ADPKQKADVE	SMIPMGYIGE	PEEIAAVAAW	LASKEASYVT	GITLFADGGM
260				
TQYPSFQAGR	G	SSKKSGSYS	GSKGSKRRIL	HHHHHH

