

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK ve FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İKİLİ ENZİM SİSTEMİ İLE
ÖNEMLİ ALKOL BİLEŞİKLERİ SENTEZİ

FATİH AKTAŞ
DOKTORA TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

GEBZE
2013

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK ve FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İKİLİ ENZİM SİSTEMİ İLE
ÖNEMLİ ALKOL BİLEŞİKLERİ
SENTEZİ

FATİH AKTAŞ
DOKTORA TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
DOÇ. DR. AYHAN ÇELİK

GEBZE
2013



**GEBZE YÜKSEK
TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA JÜRİ ONAY FORMU

G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve/..... sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 05/08/2013 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Fatih AKTAŞ'ın tez çalışması Kimya Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) :Doç. Dr. Ayhan ÇELİK (GYTE, Kimya Anabilim Dalı)

ÜYE

:Prof. Dr. Aziz TANRISEVEN (GYTE, Kimya Anabilim Dalı)

ÜYE

:Prof. Dr. Bülent KESKİNER (GYTE, Çevre Mühendisliği)

ÜYE

:Doç. Dr. M. Fatih ABASIYANIK (FÜ, Genetik ve Biyomühendislik)

ÜYE

:Doç. Dr. Ali TÜRKAN (GYTE, Kimya Anabilim Dalı)

ONAY

G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/...../2013 tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

Protein mühendisliği çalışmaları ilerledikçe biyokatalistlerin endüstriyel önemi artmaktadır. Bu artışın sebebi biyokatalistlerin yüksek oranda seçici ve temiz ürün eldesinde kullanılma potansiyelidir. Buna bağlı olarak endüstriye uygun özellikte enzimlere olan ihtiyaç her geçen gün artmaktadır. Son yıllardaki genom sekanslama teknolojisinin gelişmesi ve zengin veri tabanlarının oluşması sebebiyle önemli enzim dizileri taranarak tahmini enzim analogları içeren veri bankaları zenginleştirilmektedir. Bu tahmini enzimler klonlama teknikleriyle elde edilmekte ve yüksek saflıkta rekombinant olarak sentezlenebilmektedir. Sentezlenen enzimlerin karakterizasyonu ve yapı-fonksiyon çalışmaları yapılarak amaca uygun enzimlere ulaşılabilmektedir.

Bu tez çalışmasında farmösotik kimyada ve ince kimyasallar sentezinde öncü madde olarak kullanılan önemli alkol bileşiklerinin biyosentezi için ikili enzim sistemi çalışması yapılmıştır. Enzimlerden birincisi olan alkol dehidrogenaz (*BtADH*) *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* organizmasından klonlandı. Klonlanan enzim rekombinant olarak *E.coli* BL21(DE3) hücrelerine aktararak laboratuvar ölçeğinde üretimi sağlandı. Saf ve aktif olarak elde edilen *BtADH* fiziksel ve biyokimyasal karakterizasyonu çalışmaları yapıldı. Bu yeni enzim peptid uzunluğu bakımından orta ölçekte (340 amino asit), çinko içeren ve mezofilik özelliktedir. İlaveten, *BtADH* primer alkollerin kısa ve orta uzunluktaki üyelerini tercih etmekle birlikte sekonder alkoller, aldehid ve keton bileşiklerinin de biyodönüşümünü sağlamaktadır. *BtADH*'ın aktivitesi için gerekli olan kofaktör (NADH) rejenerasyonu ikinci bir enzim olan *Candida methylica* kaynaklı format dehidrogenaz (*CmFDH*) yardımıyla gerçekleştirildi.

İkili enzim sisteminin endüstriyel kullanımı için *BtADH* ve *CmFDH* kovalent olarak Eupergit C 250 L'ye immobilize edildi. Immobilizasyon karakterizasyonu her iki enzim için yapıldı. *BtADH*'ın aktivite gösterdiği tüm substratların kararlı hal kinetik çalışmaları spektroskopik olarak ve ürün analizleri gaz kromatografi (GC) kullanılarak yapıldı.

Anahtar Kelimeler: Alkol dehidrogenaz (ADH), kofaktör rejenerasyonu, ikili enzim sistemi, biyoindirgenme, biyoyükseltgenme, enzim immobilizasyonu.

SUMMARY

The use of biocatalysts in industrial applications has been rising sharply. The reason for this increase is due to inherent properties of enzymes being highly selective and environmentally benign; resulting in clean reaction products. Application of enzymes for the synthesis of high-value compounds requires suitable biocatalysts for relevant industries. Developments in genome sequencing technology have resulted in creation of rich data bases. To exploit such rich sources, many studies performed using recombinant DNA technology to access enzymes in the recombinant forms.

In this thesis, a coupled enzyme system was developed for the synthesis of important alcohol compounds in which a novel alcohol dehydrogenase and formate dehydrogenase have been utilized. Alcohol dehydrogenase (named as *BtADH*) was cloned from *Bacillus thuringiensis serovar israelensis*, and high level of expression was achieved in the recombinant form. *BtADH* was investigated for physical and biochemical properties, and found to be a zinc-containing and being a medium-chain length of dehydrogenase. This enzyme shows remarkable activities with the members of primary alcohols short to medium-length. *BtADH* also shows activity with secondary alcohols, aldehydes and ketones.

Cofactor (NADH) that is required for the activity of *BtADH* was regenerated by the second enzyme of formate dehydrogenase from *Candida methylica* (*CmFDH*). For the purpose of industrial use, coupled enzyme system of *CmFDH* and *BtADH* were co-immobilized to Eupergit C-250L by covalent linking. Characterization of the coupled enzyme system was completed in both free and immobilized forms. Steady-state kinetics and product analysis were performed by Uv-vis spectrophotometer and gas chromatography (GC) respectively for many substrates of interest.

Keywords: Alkol dehydrogenase (ADH), cofactor recycling, coupled enzyme system, bioreduction, biooxidation, enzyme immobilization.

TEŞEKKÜR

Öncelikle konu belirlenmesi ve tezin tamamlanmasında destekleri olan danışman hocam Doç. Dr. Ayhan ÇELİK'e,

İmmobilizasyon çalışmalarında ve tezdeki desteklerinden dolayı Prof. Dr. Aziz TANRISEVEN ve Doç. Dr. Ali TÜRKAN'a,

Tez izleme jüri üyem Doç.Dr. Fatih ABASIYANIK'a,

Tez çalışmamda enzimin metal içeriğinin belirlenmesinde GYTE Çevre mühendisliği bölümü öğretim üyesi Doç. Dr. Salim ÖNCEL'e,

MALDI-TOF analizlerin gerçekleşmesini sağlayan Dr. Bünyamin Çoşut'a,

GC analizleri için bize yardımcı olan Gıda mühendisliğindeki araştırma görevlilerine,

Laboratuar arkadaşlarım Aişe ÜNLÜ, Fatma ERTAN, Gülden AŞÇI, Betül GENÇ, Arzu GÜRBÜZ, Dr. Mahmut PARLAK ve Dr. Zehra ÖLÇER'e,

Hayatım boyunca ve özellikle stresli doktora sürecinde karşılaştığım her türlü sıkıntıda yanımda olan ve beni destekleyen aileme ve canım EŞİME,

sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iv
SUMMARY	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	2
2. BİYOKATALİSTLER VE KULLANIM ALANLARI	4
2.1. Biyokatalistler (Enzimler) ve Biyokataliz	4
2.2. Enzimlerin Sınıflandırılması	6
2.3. Oksidoredüktazlar	6
2.4. Kofaktör Rejenerasyonu	7
2.5. Kiral Bileşikler	9
2.6. Format Dehidrogenaz	12
2.7. Alkol Dehidrogenaz	13
2.7.1. <i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>israelensis</i> Kaynaklı ADH (BtADH)	18
2.8. Enzim İmmobilizasyonu	18
3. FORMAT DEHİDROGENAZ (FDH) EKSPRESYONU VE KİNETİK ÇALIŞMALARI	22
3.1. Materyal	22
3.1.1. Kimyasallar	22

3.1.2. Cihazlar	22
3.1.3. Plazmidler ve Bakteri Suşları	22
3.2. Metod	22
3.2.1. <i>CmFDH</i> 'ın Ekspresyonu	23
3.2.2. <i>E.coli</i> Kompetent Hücrelerin Hazırlanması	23
3.2.3. Transformasyon	23
3.2.4. Plazmid DNA Saflaştırılması	24
3.2.5. SDS PAGE (Sodyumdodesilsülfat-Poliakrilamidjel) Analizi	24
3.2.6. <i>E.coli</i> (Rosetta BL21 DE3) Ekimi ve IPTG İndüksiyonu	25
3.2.7. Studier Otoindüksiyonu Enzim Üretimi	25
3.2.8. <i>CmFDH</i> 'ın Saflaştırılması	26
3.2.9. Bradford Yöntemi ile Protein Konsantrasyonu Tayini	26
3.2.10. PD-10 Kolon Yardımıyla İmidazolün Uzaklaştırılması	26
3.2.11. <i>CmFDH</i> Aktivite Tayini	27
3.3. Sonuçlar ve Tartışma	27
3.3.1. <i>CmFDH</i> 'ın Ekspresyonu ve Saflaştırılması	27
3.3.2. <i>CmFDH</i> 'ın Kinetik Değerleri	28
3.3.3. IPTG İndükleme ve Studier Otoindüksiyonu	28
3.3.4. <i>CmFDH</i> 'ın Spesifik Aktivitesinin Hesaplanması	31
3.3.5. <i>CmFDH</i> 'ın Amonyum Sülfat Çöktürmesi ile Saflaştırılması	32
4. ALKOL DEHİDROGENAZ (<i>BtADH</i>) ENZİMİNİN KLONLANMASI, EKSPRESYONU VE KARAKTERİZASYONU	34
4.1. Materyal	34
4.1.1. Kimyasallar ve Organizmalar	34
4.2. Metod	34
4.2.1. Dizi Analizi	34
4.2.2. <i>BtADH</i> Geninin Klonlanması	35

4.2.3. <i>BtADH</i> 'ın Ekspresyonu ve Saflaştırılması	36
4.2.4. Protein Tayini	36
4.2.5. Protein Kütle Spektrometresi	37
4.2.6. Kofaktör Tercihi	37
4.2.7. Metal İçeriği ve <i>BtADH</i> 'ın Aktivitesine Metal İyonlarının Etkileri	38
4.2.8. Katalitik Özelliklerin Belirlenmesi (pH, Sıcaklık, Kararlılık)	38
4.2.9. Enzim Hız Ölçümü ve Kararlı Hal Kinetikleri	39
4.3. Deney Sonuçları ve Tartışma	40
4.3.1. <i>BtADH</i> Geninin Klonlanması	41
4.3.2. <i>BtADH</i> Protein Dizisi	41
4.3.3. His ₆ - <i>BtADH</i> 'ın Üretilmesi	42
4.3.4. Protein Kütle Spektrometresi	43
4.3.5. Kofaktör Tercihi	43
4.3.6. Metal İçeriği ve <i>BtADH</i> Aktivitesine Metal İyonlarının Etkisi	43
4.3.7. Katalitik Özelliklerin Belirlenmesi	48
4.3.8. Substrat Spesifitesi	53
4.3.9. Primer Alkollerin Oksidasyonunun Kinetik Çalışmaları	56
4.3.10. <i>BtADH</i> Aktivitesine DMSO Etkisi	58
4.3.11. <i>BtADH</i> 'ın Subunitlerinin (Altbirimleri) Belirlenmesi	58
4.3.12. <i>BtADH</i> Aktivitesine İyonik Direnç (Strenght) Etkisinin Belirlenmesi	58
5. <i>CmFDH</i> ve <i>BtADH</i> 'IN İMMOBİLİZASYONU	63
5.1. GİRİŞ	63
5.2. Materyal	66
5.3. Metod	66
5.3.1. Enzimin Eupergit C 250 L Üzerine İmmobilizasyonu	66
5.4. Sonuçlar ve Tartışma	69
5.4.1. <i>CmFDH</i> ın Eupergit C 250 L Üzerine İmmobilizasyonu	69

5.4.2. <i>BtADH</i> 'ın Eupergit C 250 L Üzerine İmmobilizasyonu	82
5.5. İmmobilizasyon Genel Değerlendirme	94
6. İKİLİ ENZİM SİSTEMİ REAKSİYONLARI	98
6.1. Materyal	98
6.2. Metod	98
6.2.1. İkili Enzim Sistemi ile Keton ve Aldehitlerin İndirgenmesi	98
6.2.3. Alkollerden Keton ve Aldehit Eldesi veya Alkollerin Yükseltgenmesi	99
6.2.4. <i>CmFDH</i> ve <i>BtADH</i> 'ın Eupergit C 250 L Üzerine İkili İmmobilizasyonu	99
6.2.5. İmmobilize Enzimlerle Kofaktör Rejenerasyonu Reaksiyonu ve Aktivite Ölçümü	101
6.2.6. Serbest Enzimlerle Kofaktör Rejenerasyonu Reaksiyonu ve Aktivite Ölçümü	101
6.2.7. <i>BtADH</i> oksidasyon ve Redüksiyon Reaksiyonları Gaz Kromatografisi (GC) Analizi	102
6.3. Deney Sonuçları ve Tartışma	103
7. SONUÇLAR VE YORUMLAR	122
KAYNAKLAR	131
ÖZGEÇMİŞ	138
EKLER	139

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve Kısaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
°C	: Derece santigrat
Da	: Dalton
g	: Gram
kDa	: Kilo dalton
M	: Molar
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
μM	: Mikromolar
pH	: Hidrojen iyonu konsantrasyonunun negatif logaritması
μg	: Mikrogram
ADH	: Alkol dehidrogenaz
APS	: Amonyum persulfat
BSA	: Bovine serum albumin
BtADH	: <i>Bacillus thuringiensis</i> kaynaklı ADH
CmFDH	: <i>Candida methylica</i> kaynaklı FDH
EDTA	: Etilen diamidin tetraasetik asit
FDH	: Format Dehidrogenaz
GLY	: Glisin
IPTG	: İzopropil β-D-1-thiogalaktopiranosid
MALDI-TOF	: Matriks-yardımlı lazer desorbsiyonu/ionizasyonu-‘Time off
NADH	: Nikotinamid adenin dinükleotid (indirgenmiş)
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (indirgenmiş)
OD ₆₀₀	: 600nm’de optiksel yoğunluk
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PMSF	: Fenilmethilsulfonil florid
PBtADH	: BtADH genini taşıyan pET14b plazmidi
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel eletroforezi

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
1.1: Kiral bileşiklerin sentezi için ikili substrat sistemi.	2
1.2: Kofaktör rejenerasyonu için ikili enzim sistemi.	2
2.1: İzopropanol, formik asit ve hidrojen ile kofaktör rejenerasyonu.	10
2.2: Kofaktör rejenerasyonunda redoks eşitliğinde her bir mol için US\$ maliyetleri.	11
2.3: L-tert'in üretimi için sürekli kofaktör rejenerasyonu.	11
2.4: Bacillus stearothermophilus LLD-R soyundan (htADH) elde edilen NAD ⁺ bağımlı alkol dehidrogenazın X ışını kristal yapısı.	17
3.1: Ni-afiniti kolon sonrası saflaştırılan CmFDH enziminin SDS-PAGE görüntüsü.	30
3.2: CmFDH enziminin nikel-afinite kolon saflaştırması SDS-PAGE görüntüsü.	30
3.3: CmFDH'in Michaelis-Menten kinetiği.	31
4.1: BtADH geni PCR ürünü, pET14b ve BtADH- pET14b plazmid DNA restriksiyon enzimleri kesimi agaroz jel (%0.8) görüntüsü.	42
4.2: pBtADH plazmidinin aktarıldığı E.coli BL21 (DE3) kültürünün tüm hücre ekstraktının SDS-PAGE analizi.	44
4.3: His ₆ -bağlı BtADH'ın MALDI-TOF MS analizi.	45
4.4: BtADH tarafından katalizlenen 2-propanolün NAD ⁺ ve NADP ⁺ bağı reaksiyonları için Michaelis-Menten grafiği.	46
4.5: BtADH'ın metal içeriğinin ICP-EOS ile belirlenmesi.	47
4.6: BtADH'ın aseton kullanarak oksidasyon reaksiyonlarının Aktivite pH profili.	50
4.7: BtADH'ın izopropanol kullanarak redüksiyon reaksiyonlarının Aktivite pH profili.	51
4.8: BtADH'ın izopropanol kullanarak redüksiyon reaksiyonlarının pH kararlılık (●) ve pH -aktivite (○) profili.	51
4.9: BtADH'ın katalizlediği 2-propanol oksidasyonunun aktivite-sıcaklık profili.	52
4.10: BtADH'ın sıcaklık kararlılığı	53

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
4.11: BtADH'ın 2-propanol oksidasyonu aktivitesine DMSO'nun etkisi.	60
4.12: BtADH'ın Native Gel görüntüsü.	60
4.13: BtADH'ın aktivitesine tamponun iyonik direnç etkisi.	61
5.1: İmmobilize enzim aktivitesine glisin muamele süresi etkisi.	74
5.2: Sıcaklığın serbest (○) ve immobilize (●) CmFDH aktivitesine etkisi.	76
5.3: pH'ın Serbest (○) ve immobilize (●) CmFDH aktivitesine etkisi.	78
5.4: İmmobilize CmFDH'ın Michaelis Menten kinetiği.	79
5.5: Serbest (●) ve immobilize (○) CmFDH'ın sıcaklık kararlılığı.	80
5.6: Serbest (●) ve immobilize (○) CmFDH'ın pH kararlılığı.	80
5.7: İmmobilize CmFDH'ın saklama kararlılığı.	81
5.8: İmmobilize CmFDH'ın tekrar kullanımı.	81
5.9: İmmobilize BtADH aktivitesine glisin etkisi.	86
5.10: Serbest (○) ve immobilize (●) BtADH'ın 2-propanol oksidasyonunun optimum sıcaklığı.	88
5.11: Serbest (○) ve immobilize (●)BtADH'ın 2-propanol oksidasyonunun optimum pH'sı.	88
5.12: İmmobilize BtADH'ın 2-propanol oksidasyonunun Michaelis-Menten kinetiği.	89
5.13: Serbest BtADH'ın 2-propanol oksidasyonunun Michaelis-Menten kinetiği.	90
5.14: Serbest (○) ve immobilize (●) BtADH'ın 2-propanol oksidasyonunun sıcaklık kararlılığı.	91
5.15: Serbest (○) ve immobilize (●) BtADH'ın 2-propanol oksidasyonunun pH kararlılığı.	92
5.16: İmmobilize BtADH'ın 2-propanol oksidasyonunun saklama kararlılığı.	93
5.17: İmmobilize BtADH'ın 2-propanol oksidasyonunun tekrar kullanım sayısı.	94
6.1: İkili enzim sistemi ile kofaktör rejenerasyonu gerçekleştirilerek etil metil ketonun redüksiyonu.	105
6.2: İkili enzim sistemi ile kofaktör rejenerasyonu gerçekleştirilerek metil propil ketonun redüksiyonu.	105
6.3: İkili enzim sistemi ile kofaktör rejenerasyonu gerçekleştirilerek 2,3 bütandion redüksiyonu.	106
6.4: İkili enzim sistemi ile kofaktör rejenerasyonu gerçekleştirilerek benzaldehid redüksiyonu.	106

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
6.5: İkili enzim sistemi ile kofaktör rejenerasyonu gerçekleştirilerek asetaldehid redüksiyonu.	108
6.6: Farklı oranlarda serbest CmFDH (0,004 mg), BtADH (0,04 mg) kullanılarak İkili enzim sistemi ile kofaktör oluşumu takibi.	109
6.7: Farklı oranlarda serbest CmFDH (0,004 mg), BtADH (0,06 mg) kullanılarak ikili enzim sistemi ile kofaktör oluşumu takibi.	110
6.8: Farklı oranlarda serbest CmFDH (0,004 mg), BtADH (0,07 mg) kullanılarak ikili enzim sistemi ile kofaktör oluşumu takibi.	111
6.9: Farklı oranlarda serbest CmFDH (0,004 mg), BtADH (0,09 mg) kullanılarak ikili enzim sistemi ile kofaktör oluşumu takibi.	111
6.10: 1 (■), 2 (□), 3 (●) ve 4 (○) nolu ikili immobilizasyonu 60 dakikalık reaksiyonu kofaktör dönüşümü takibi.	112
6.11: 5 (■), 6 (□), 7 (●) ve 8 (○) nolu ikili immobilizasyonu 60 dakikalık reaksiyonu kofaktör dönüşümü takibi.	113
6.12: A) Etil metil ketonun ikili enzim sistemi ile 3 saatlik reaksiyonunun ve B) standartının GC analizi.	114
6.13: 2-bütanol'ün 4,5 saatlik reaksiyonunun GC analizi.	115
6.14: A) Metil propil keton standartının ve B) ikili enzim sistemi ile 20 saatlik reaksiyonunun GC analizi.	117
6.15: A) 2-propanol standartının ve B) 20 saatlik reaksiyonunun GC analizi.	118
6.16: Siklopentanonun ikili enzim sistemi ile 3 saatlik reaksiyonunun GC analizi.	119
6.17: A) Siklopentanon standartının ve B) 20 saatlik ikili enzim sistemi reaksiyonunun GC analizi.	119
6.18: 1) nolu ikili immobilize enzim sistemi ile metil propil keton substratının 1 ve 20 saatlik reaksiyonlarının GC analizi.	121
9.1: Asetaldehid'in ikili enzim sistemi ile 3 saatlik reaksiyonunun GC analizi.	139
9.2: A) Asetaldehid'in ikili enzim ile 20 saatlik reaksiyonunun ve B) standartının GC analizi.	140
9.3: A) 2,3 bütandion standartının ve ikili enzim ile B) 20 saatlik reaksiyonunun GC analizi.	141
9.4: Asetonun ikili enzim sistemi ile 4,5 saatlik reaksiyonunun GC analizi.	142
9.5: 2-pentanol standardının GC analizi.	142

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
9.6: A) Aseton standartının ve B) ikili enzim sistemi ile 20 saatlik reaksiyonunun GC analizi.	143
9.7: 2-pentanol'ün 4,5 saatlik reaksiyonunun GC analizi.	144
9.8: 1-dekanol'ün 20 saatlik reaksiyonunun GC analizi.	144
9.9: A) 1-propanol standartının ve B) 20 saatlik reaksiyonunun GC analizi.	145
9.10: A) 1,3 propandiol standartının ve B) 4,5 saatlik reaksiyonunun GC analizi.	146
9.11: A) 1,6 hekzandiol standartının ve B) 4,5 saatlik reaksiyonunun GC analizi.	147
9.12: A) 1-bütanol 20 saatlik reaksiyonunun ve B) standartının GC analizi.	148
9.13: A) 1-heptanol standartının ve B) 20 saatlik reaksiyonunun GC analizi.	149
9.14: A) 1-hekzanol standartının ve B) 20 saatlik reaksiyonunun GC analizi.	150
9.15: A) 1-nonanol 20 saatlik reaksiyonunun ve B) standartının GC analizi.	151
9.16: A) 1-oktanol 20 saatlik reaksiyonunun ve (B) standartının GC analizi.	152
9.17: A) 1-pentanol standartının ve B) 20 saatlik reaksiyonunun GC analizi.	153
9.18: 2-nonanol'ün 4,5 saatlik reaksiyonunun GC analizi.	154
9.19: Benzaldehid'in ikili enzim sistemi ile 3 saatlik reaksiyonunun GC analizi.	154
9.20: A) Benzaldehid standartının ve B) ikili enzim ile 20 saatlik reaksiyonunun GC analizi.	155
9.21: A) Benzil alkol standartının ve B) 4,5 saatlik reaksiyonunun GC analizi.	156
9.22: A) Siklopentanol standartının ve B) 4,5 saatlik reaksiyonunun GC analizi.	157
9.23: 1) Etanol standartının ve 2) 4,5 saatlik reaksiyonunun GC analizi.	158
9.24: 2) nolu ikili immobilize enzim sistemi ile metil propil keton substratının 1 A) ve 20 saatlik B) reaksiyonlarının GC analizi.	159
9.25: 3) nolu ikili immobilize enzim sistemi ile metil propil keton substratının 1 B) ve 20 saatlik A) reaksiyonlarının GC analizi.	160
9.26: 4) nolu ikili immobilize enzim sistemi ile metil propil keton substratının 1B) ve 20 saatlik A) reaksiyonlarının GC analizi.	161
9.27: 4) nolu ikili immobilize enzim sistemi ile metil propil keton substratının 1B) ve 20 saatlik A) reaksiyonlarının GC analizi.	162
9.29: 6) nolu ikili immobilize enzim sistemi ile metil propil keton substratının 1B) ve 20 saatlik A) reaksiyonlarının GC analizi.	163
9.29: 7) nolu ikili immobilize enzim sistemi ile metil propil keton substratının 1B) ve 20 saatlik A) reaksiyonlarının GC analizi.	164

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
9.30: 8) nolu ikili immobilize enzim sistemi ile metil propil keton substratının 1 B) ve 20 saatlik A) reaksiyonlarının GC analizi.	165
9.31: BtADH'ın etanol oksidasyonu Michaelis-Menten grafiği.	166
9.32: BtADH'ın 1-propanol oksidasyonu Michaelis-Menten grafiği.	167
9.33: BtADH'ın 1-bütanol oksidasyonu Michaelis-Menten grafiği.	167
9.34: BtADH'ın 1-pentanol oksidasyonu Michaelis-Menten grafiği.	168
9.35: BtADH'ın 1-hekzanol oksidasyonu Michaelis-Menten grafiği.	168
9.36: BtADH'ın 1-heptanol oksidasyonu Michaelis-Menten grafiği.	169
9.37: BtADH'ın 1-oktanol oksidasyonu Michaelis-Menten grafiği.	169
9.38: BtADH'ın 1-nonanol oksidasyonu Michaelis-Menten grafiği.	169
9.39: BtADH'ın 1-dekanol oksidasyonu Michaelis-Menten grafiği.	170
9.40: BtADH'ın 1,3 propandiol oksidasyonu Michaelis-Menten grafiği.	170
9.41: BtADH'ın 1,6 hekzandiol oksidasyonu Michaelis-Menten grafiği.	171
9.42: BtADH'ın benzil alkol oksidasyonu Michaelis-Menten grafiği.	171
9.43: BtADH'ın 2-propanol oksidasyonu Michaelis-Menten grafiği.	172
9.44: BtADH'ın 2-nonanol oksidasyonu Michaelis-Menten grafiği.	172
9.45: BtADH'ın asetaldehid redüksiyonu Michaelis-Menten grafiği.	173
9.46: BtADH'ın benzaldehid redüksiyonu Michaelis-Menten grafiği.	173
9.47: BtADH'ın aseton redüksiyonu Michaelis-Menten grafiği.	174
9.48: BtADH'ın metil propil keton redüksiyonu Michaelis-Menten grafiği	174
9.49: BtADH'ın siklopentanon redüksiyonu Michaelis-Menten grafiği.	175
9.50: BtADH'ın etil metil keton redüksiyonu Michaelis-Menten grafiği.	175
9.51: BtADH'ın 2,3 bütandion redüksiyonu Michaelis-Menten grafiği.	176

TABLÖLAR DİZİNİ

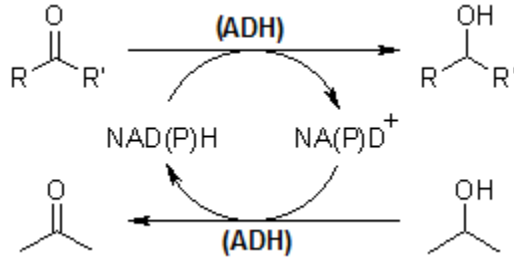
<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Biyokatalistlerin kimyasal katalistlere göre avantaj ve dezavantajları.	6
2.2: Enzimlerin sınıflandırılması.	8
3.1: IPTG indüksiyon ve Studier besiyerinin protein ekspresyonuna etkisi.	31
3.2: CmFDH'nin saflaştırılma ve aktivite değerleri.	32
4.1: BtADH aktivitesine farklı metal iyonlarının etkisi (EDTA ilaveli)	48
4.2: BtADH'nin değişik aldehid redüksiyonu kinetik değerleri.	54
4.3: BtADH'nin değişik alkollerin oksidasyonu kinetik değerleri.	55
4.4: BtADH'nin değişik ketonların redüksiyonu kinetik değerleri.	57
4.5: BtADH'nin maya ADH (YADH) ve at karaciğer ADH (HLADH) kinetik değerleri.	59
5.1: İmmobilizasyon verimliliğine tampon çözeltisi pH'sının etkisi.	70
5.2: İmmobilizasyon verimliliğine tampon çözeltisi konsantrasyonunun etkisi.	72
5.3: Sıcaklığın immobilizasyon verimliliğine etkisi.	72
5.4: İmmobilizasyonun verimliliğine immobilizasyon süresi etkisi.	73
5.5: İmmobilizasyon verimliliğine süktroz etkisi.	75
5.6: Serbest ve immobilize CmFDH'nin kinetik değerleri.	79
5.7: İmmobilizasyon verimliliğine tampon çözelti pH'sı etkisi.	83
5.8: İmmobilizasyon verimliliğine tampon çözeltisi konsantrasyonu etkisi.	84
5.9: İmmobilizasyon verimliliğine sıcaklık etkisi.	84
5.10: İmmobilizasyon verimliliğine immobilizasyon süresi etkisi.	85
5.11: İmmobilizasyon verimliliğine süktroz etkisi.	87
5.12: Serbest ve immobilize BtADH'nin 2-propanol oksidasyonunun kinetik değerleri.	90

1.GİRİŞ

Endüstriyel biyokataliz prosesleri birçok alanda ilgi odağı olmaktadır [Koeller and Wong, 2001], [Schmid et al., 2001]. Bu ilgi daha seçici, güvenli ve temiz reaksiyonlara olan ihtiyaçla birlikte genomik ve genetik mühendisliği alanlarındaki son gelişmelerden kaynaklanmaktadır. Biyokatalistler endüstriyel proseslerin ihtiyaçlarının çoğunu karşılamaktadırlar. Şu anda kullanılan biyokatalistlerin çoğu, basit kimyasal aktivite gösteren hidrolazlar gibi kofaktör bağımsız enzimlerle sınırlanmıştır. Buna karşın oksidoredüktaz ve transferazlar gibi kofaktör bağımlı enzimler daha kompleks kimyasal reaksiyonları katalizlerler. Bu reaksiyonların çoğu sentez çalışmaları yönünden faydalıdır. Örneğin alkol ve aminlerdeki karbonil gruplarının asimetrik indirgenmesini katalizleyen NADH bağımlı oksidoredüktazlardır [Li et al., 2002], [Stewart, 2001]. Ama bu enzimlerin kofaktöre ihtiyaç duyması sebebiyle büyük ölçekli uygulamalarda daha az kullanılmaktadır.

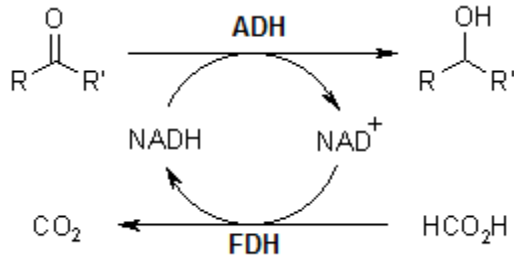
NAD gibi kofaktörler düşük molekül ağırlığına sahiptirler ve çoğu enzimatik reaksiyonlar için gereklidirler. Adenosilkobalamin, pridokal fosfat, biyotin ve flavinler enzimlere sıkıca bağlıdırlar ve çoğu durumda kendi kendine regenere olurlar. Ama pridin dinükleotidler (NAD(P)(H)) ve nükleozidtrifosfat (NTP) gibi diğer kofaktörler daha çok yardımcı substrat olarak davranırlar. 1 mmol NAD'nin 30 \$ gibi yüksek maliyeti sebebiyle bu kofaktöre bağlı reaksiyonlar endüstride sınırlı kullanıma sahiptir. Bu yüksek maliyet kofaktörlerin sitokiyometrik olarak kullanılmasını imkânsız kılar. Böylece herhangi büyük ölçekli reaksiyon için *in situ* regenere edilmelidir. Kofaktör rejenerasyonu, sentez maliyetlerinin azaltılmasına, kofaktör inhibisyonunun önlenmesine ve ürün izolasyonunun kolaylaşmasına imkân sağlamaktadır [Chenault and Whitesides, 1987].

Kiral bileşikler; kimyasal ve farmösotik endüstride kimyasal katalistler, sıvı kristaller, aromalar, tarım kimyasalları ve/veya ilaç gibi maddelerin üretimi için kullanılan çok önemli yapı elemanlarıdır. Kiral bileşiklerin sentezinde oksidoredüktazlar veya ketoredüktazlar gibi indirgeyici enzimler görev almaktadır [Goldberg et al., 2007].



Şekil 1.1: Kiral bileşiklerin sentezi için ikili substrat sistemi.

Bu enzimlerde kofaktör bağımlı olduklarından ortamda sürekli kofaktör bulunması gerekir. Bu ise pahalı bir prosesi gerektirmektedir. Reaksiyon maliyetlerinin düşürülmesi amacıyla ya Şekil 1.1’de görüldüğü gibi ikili substrat veya Şekil 1.2’de görüldüğü gibi ikili enzim metodu kullanılmaktadır. Alkol dehidrogenaz (ADH) grubu enzimler alkol-keton/keton-alkol reaksiyonlarını ileri ve geri yönlü olarak gerçekleştirebilirler. Eğer ortama kofaktör rejenerasyonu için ucuz bir ikinci substrat (izopropanol) ilave edilirse tek bir enzimle ortamda kofaktör ihtiyacı çözülmüş olmaktadır. Aynı zamanda izopropanol sayesinde substratların çözünürlüğüde artmaktadır.



Şekil 1.2: Kofaktör rejenerasyonu için ikili enzim sistemi.

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Bu tezde ikili enzim sistemi ile kiral bileşik sentezi için iki farklı enzim kullanılması amaçlanmıştır. Tezin önemli amaçlarından biri de kullanılan enzimlerin kofaktör bağımlılıkları sebebiyle, redüktif reaksiyonları için proses geliştirilmesinde kofaktör rejenerasyonu için etkili bir yöntem bulmaktır. FDH, NAD^+ kofaktörüne hidrat (H^+) transferi yapmaktadır. Bunun için gerekli olan proton ve elektronlar,

format (HCOOH) tan karşılanmakta, format karbon dioksite dönüştürülürken, NADH sentezlenmektedir (şekil 1.2).

Candida methylica'dan elde edilmiş format dehidrogenaz genini taşıyan plazmid Dr. Clarke'dan (Bristol  niversitesi) temin edildi.

 kinci enzim olan alkol dehidrogenaz GYTE moleküler biyoloji bölümünden temin edilen *Bacillus thuringiensis serovar israelensis* organizmasından klonlanarak, fiziksel ve biyokimyasal karakterizasyonu gerçekleştirildi. Klonlanan *BtADH*'ın substrat spesifitesinin ayrıntılı olarak belirlenmesi için hem ileri hem geri yönlü reaksiyonlar birçok substratla çalışıldı. Aktivite gözlenen substratların ürün analizleri gaz kromatografi cihazı yardımıyla yapıldı.

Elde edilen ikili enzim sisteminin endüstriyel olması ve verimliliğinin artırılması için Eupergit C 250 L matriksine immobilize edilerek karakterizasyonları gerçekleştirildi. Kovalent immobilizasyon tekniğı ile ortamdan enzim kaybı minimuma indirilerek tekrarlı aktivite deneylerinde aktivite ve immobilizasyon verimi artırılarak endüstriyel kullanım için uygun hale getirildi.

2. BİYOKATALİSTLER ve KULLANIM ALANLARI

2.1. Biyokatalistler (Enzimler) ve Biyokataliz

Enzimler ekonomik değeri yüksek olan organik maddelerin sentezlemesinde ve daha birçok alanda kullanılabilen biyokatalizörlerdir (Slade and Kennedy, 1986)]. Hücrelerde gerçekleşen biyokimyasal reaksiyonlar enzimler tarafından katalizlenir. Enzimler, endüstriyel ölçekli çalışmalarda yüksek seçicilik, yan ürün oluşumunun engellenmesi ve ılımlı şartlarda reaksiyon verebilme gibi özellikleri nedeniyle de kullanım alanı bulmaktadırlar. Günümüzde birçok enzim, büyük ölçekli sentez proseslerinde kullanılmaktadır [Stephanie et al., 2002].

Biyokataliz genellikle endüstriyel sentetik kimya için biyokatalist olarak enzim veya tüm hücre uygulamalarının kullanımı olarak tanımlanmaktadır. Biyokatalistler süt proteinlerinin enzimatik parçalanmasıyla peynir ve fermantasyon yoluyla da alkol üretiminde yüz yıllardır kullanılmaktadır. Geçen birkaç on yıl boyunca protein yapı-fonksiyon ilişkisini anlamamızdaki büyük ilerlemeler biyokatalitik uygulamaların oranını artırmıştır. Özellikle rasyonel dizayn ve yönlendirilmiş mutasyon gibi protein dizayn araçlarındaki yeni gelişmeler özel kimyasal prosesler için hızlı bir şekilde biyokatalistlerin modifiye edilmesini sağlamaktadır. Stabilite, aktivite, selektivite ve substrat spesifitesi gibi enzim özellikleri laboratuvarlarda rutin olarak mühendislik uygulamaları ile şekillendirilmektedir. Günümüzde 100 farklı biyokatalitik proses besin endüstrisi, tarım, kimyasal ve ilaç sanayinde kullanılmaktadır [Zaks, 2001]. Araştırma kimyasallarından hammadde kimyasallarına kadar değişen oranlarda ürünler ve bunların uygulamaları hızlı bir şekilde artmaktadır. Bu başarıya rağmen biyokatalizin büyük potansiyeli hala tamamen fark edilmemiştir [Johannes et al., 2006].

Diğer katalistler gibi biyokatalistler reaksiyonun termodinamiklerini değiştirmeden reaksiyonu hızlandırırlar. Ama onların diğer geleneksel katalistlere göre bazı karakteristik özellikleri bulunmaktadır (Tablo 2.1). Biyokatalistlerin en büyük avantajı yüksek seçiciliğe sahip olmasıdır. Bu seçicilik genellikle kiral (örneğin, stereoselektivite), pozisyonel (regioselektivite), fonksiyonel grup özel (kemoselektivite) olmaktadır. Bu gibi yüksek seçicilik daha az çevresel problem,

kolay ayırma, minimize olmuş yan reaksiyonlar, indirgenmiş veya koruyucu grupların kullanılmaması gibi birkaç faydalı özellikler sunması sebebiyle kimyasal sentezde çok tercih edilmektedir. Diğer avantajları yüksek katalitik verimlilik, ılıman operasyonel şartları ve ticari uygulamalarda çok çekici olmalarıdır.

Biyokatalistlerin sınırlı operasyonel sakıncaları ise substrat ve ürün inhibisyonu ve reaksiyonların sulu çözeltilerde olması sıklıkla rastlanan en ciddi engelleri olarak görülmektedir. Fakat bu engellerin çoğu yanlış ve önyargı olarak ortaya çıkmaktadır [Faber, 1997], [Rozzell, 1999]. Örneğin çoğu ticari olarak kullanılan enzimler proses şartlarında aylarca hata yıllarca yarı ömrünü koruyarak mükemmel stabilite göstermektedirler. Çoğu enzim doğal olmayan substratları kabul eder ve onları istenen ürüne dönüştürür. Daha da önemlisi biyokatalistlerin bütün bu karakteristikleri istenen proses şartlarında metabolik mühendislik metodları ve protein mühendisliği ile değiştirilebilmesidir.

Günümüzde antibiyotik amoksisilin ve düşük kalorili tatlandırıcı olan aspartam olarak çok iyi bilinen ürünler gibi beşyüzden fazla ticari ürünün sentezinde enzimler kullanılmaktadır. Endüstriyel enzimlerin çoğunluğu (yaklaşık %65) hidrolitik etki göstermektedirler ve yaygın olarak tekstil, nişasta, meyve özü, kağıt, deri, kişisel bakım ve deterjan endüstrilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Geriye kalanlar ise gıda işleme (%25) veya hayvan besin katkıları (%10) üretiminde kullanılmaktadır [Johannes and Zhao, 2006]]. Enzimler biyobozunur olma, yüksek selektivite, (stereoselektivite, regioselektivite ve kemoselektivite; böylece enantiyomerik olarak saf ürün elde edilir.) ılımlı sıcaklık, pH ve basınçta çalışabilme özellikleri sebebiyle geleneksel kimyasal katalistlerden bazı önemli avantajlara sahiptirler. Sahip oldukları potansiyele rağmen hala kullanılmayan birçok enzim bulunmaktadır; bu durum enzimlerin stabilite, aktivite, spesifite ve kofaktör rejenerasyonu gibi gereksinimlerinden kaynaklanmaktadır.

Tablo 2.1: Biyokatalistlerin kimyasal katalistlere göre avantaj ve dezavantajları.

Avantajlar	Dezavantajlar
Genellikle daha verimli (düşük enzim konsantrasyonlarında)	Substrat veya ürün inhibisyonu
Stabilite, seçicilik ve aktiviteyi artırmak için modifiye edilebilmesi	Solvent olarak su kullanılması (yüksek kaynama noktası ve ısı buharlaşması)
Daha seçici olması (kemo-selektivite, regio-selektivite, distereoselektivite ve enantiyoselektivite)	Doğada bulunan enzimlerin sadece bir enantiyomerik formda bulunması
Daha ılımlı reaksiyon şartlarında çalışabilme (tipik olarak pH 5-8 ve sıcaklık 20-40 °C)	Operasyon bölgesi sınırlanması (Enzimler tipik olarak yüksek pH ve sıcaklıkta bozunurlar.)
Çevreye dost olma (çevrede tamamen bozunabilme)	Enzimlerin alerjik reaksiyonlara sebep olması

2.2. Enzimlerin Sınıflandırılması

Enzimler altı ana sınıfa ayrılmıştır. Bu sınıflar oksidoredüktazlar, transferazlar, hidrolazlar, liyazlar, izomerazlar, ve ligazlar'dır. Enzimler normalde fonksiyonel grupların, elektron veya atomların transferini gerçekleştirirler. Enzim gruplarına verilen isim katalizlediği reaksiyon tipinden kaynaklanmaktadır. Her enzim tanımlanabilmek için bir EC (Enzyme Commission) numarasına sahiptir. Sınıflandırılma yapılmadan önce enzimin gerçekleştirdiği reaksiyon bilinmelidir [Berg, 2007].

2.3. Oksidoredüktazlar

Oksidoredüktazlar elektron transfer ile oksidasyon redüksiyon reaksiyonlarını katalizlerler. Bu elektronlar genellikle hidrojen atomları veya hidrid iyonları şeklinde olur. Substrat okside olduğunda hidrojen verir. En çok dehidrogenaz olarak bilinirler bazen redüktaz olarak da kullanılabilirler. Oksidaz oksijen atomunun akseptör olduğu anlamına gelmektedir. Oksidoredüktazlar, kiral bileşiklerin (kiral alkollerin) ve

polimerlerin sentezinde, biyosensör yapımında ve çevresel kirliliklerin yıkımında görev alan, kofaktör bağımlı enzimlerdir. Çeşitli organik bileşiklerin hidroksilasyonu ve fonksiyonlandırılması ile kiral olmayan bileşiklerden kiral bileşiklerin sentezi gibi birçok reaksiyonu, yüksek bölgesel, enantiyo ve stereo seçicilik göstererek gerçekleştirirler. Aktiviteleri için kofaktör moleküllerine ihtiyaç duymaları ve bu kofaktörlerin pahalı olması, oksidoredüktazların endüstriyel anlamda kullanımlarını sınırlamaktadır. Kullanılacak kofaktör molekülleri, çoğu kez sentezlenmek istenilen üründen daha pahalı olmakta, üretim maliyetini artırmaktadır. Bu sorunun aşılmasına yönelik olarak çeşitli kofaktör mühendisliği çalışmaları (fotokimyasal, elektrokimyasal, kofaktör immobilizasyonu vb) olmakla birlikte, en çok tercih edilen protein mühendisliği (enzimatik kofaktör rejenerasyon) yöntemidir.

2.4. Kofaktör Rejenerasyonu

Kofaktör rejenerasyonu için enzimatik, kimyasal, elektrokimyasal ve fotokimyasal gibi birçok metod bulunmaktadır (Wichmann and Vasic-Racki, 2005)]. Enzimatik metod genellikle laboratuvar ölçeğinde, kimyasal metod ise pilot ölçekli reaksiyonlarda kullanılmaktadır. Reaksiyonu kurarken ikinci bir enzim ve kofaktör rejenerasyonu için yardımcı substrat kullanılmaktadır. Kofaktör rejenerasyonu için format dehidrogenaz (Gröger et al., 2004; Rissom et al., 1999)], NADH oksidaz (Riebel et al., 2002)], alkol dehidrogenaz (Findrik et al., 2005)], fosfit dehidrogenaz (Johannes et al., 2007)], glukoz dehidrogenaz (Kosjek et al., 2008)], glutamat dehidrogenaz (El-Zahab et al., 2008)] gibi enzimler kullanılmaktadır. Bu enzimler arasında en fazla kullanılan format dehidrogenazdır.

Ürün olarak sadece karbondioksit üretmesi sebebiyle ürünlerin ayrılmasına gerek yoktur ve yüksek rejenerasyon verimliliğine sahiptir. İkili enzim reaksiyonlarında kofaktör rejenerasyonu için kullanılabilen bu reaksiyonlarda enzimler görev almaktadırlar. Fakat enzimatik kofaktör rejenerasyonunun sınırlı reaksiyon şartları, enzim stabilizasyon kaybı ve yüksek enzim maliyeti gibi dezavantajları vardır.

Tablo 2.2: Enzimlerin sınıflandırılması.

Enzimler	Reaksiyon tipleri	Altsınıflar
Oksidoredüktazlar	Bir substrattan diğer bir substrata hidrojen veya oksijen; atom veya elektron transferi gerçekleştirme	Oksidazlar, oksijenazlar, peroksidsazlar, dehidrogenazlar
Transferazlar	Grup transfer reaksiyonları gerçekleştirme	Glikoziltransferazlar, transketolazlar, metiltransferazlar, transaldolazlar, açıltransferazlar, transaminazlar
Hidrolazlar	Hidrolitik reaksiyonları gerçekleştirme	Esterazlar, lipazlar, proteazlar, glikozidazlar, fosfatazlar
Liyazlar	İzomerizasyon reaksiyonlarını gerçekleştirme	Dekarboksilazlar, aldolazlar, ketolazlar, hidratazlar, dehidratazlar
İzomerazlar	İzomerizasyon reaksiyonlarını gerçekleştirme	Rasemazlar, epimerazlar, izomerazlar
ligazlar	Enerji taşıyan moleküllerin yardımıyla çeşitli bağların sentezini gerçekleştirme	Sentetazlar, karboksilazlar

Elektrokimyasal kofaktör rejenerasyonu elektrokimyasal bir aparat gerektirmesine karşın basit ve etkili proses maliyetine sahiptir. Kofaktör rejenerasyonu için enzim yerine ucuz elektrik kullanılır. Yardımcı substrat gerektirmemesi sebebiyle istenen ürünün geri kazanılmasını kolaylaştıran bu sistemde herhangi bir yan ürün elde edilmez. Bu avantajlarının yanında elektrokimyasal aracılı sistemlerin bazı problemleri vardır. Örneğin enzimin deaktivasyonuna yol açan bazı aracı (mediator) çeşitlerinin enzimler için toksik olduğu bilinmektedir. Ayrıca araçların stabilizasyonu bütün reaksiyon prosesinin stabilitesini ve performansını etkilemektedir [Hollmann and Schmid, 2004]].

Doğada kiral bileşikler genellikle prokiral merkezlerin (ketonların kiral indirgenmesi, keto fonksiyonların indirgeyici aminasyonu) indirgenmesiyle oluşturulur. Eğer gerekli olan kofaktörün (NADH_2) stokiyometrik miktarları kullanılırsa bu gibi reaksiyonlar ekonomik değildir. Kofaktör rejenerasyonu başarmak zorundadır. Doğada bunun için bir çok imkan mevcuttur (Şekil 2.1)

Bu gibi indirgenmeler kimyacılar için klasik olarak bilinirler. İndirgeyici ajan olarak izopropanolün kullanımı Meerwein-Ponndorf indirgenmesi olarak bilinir

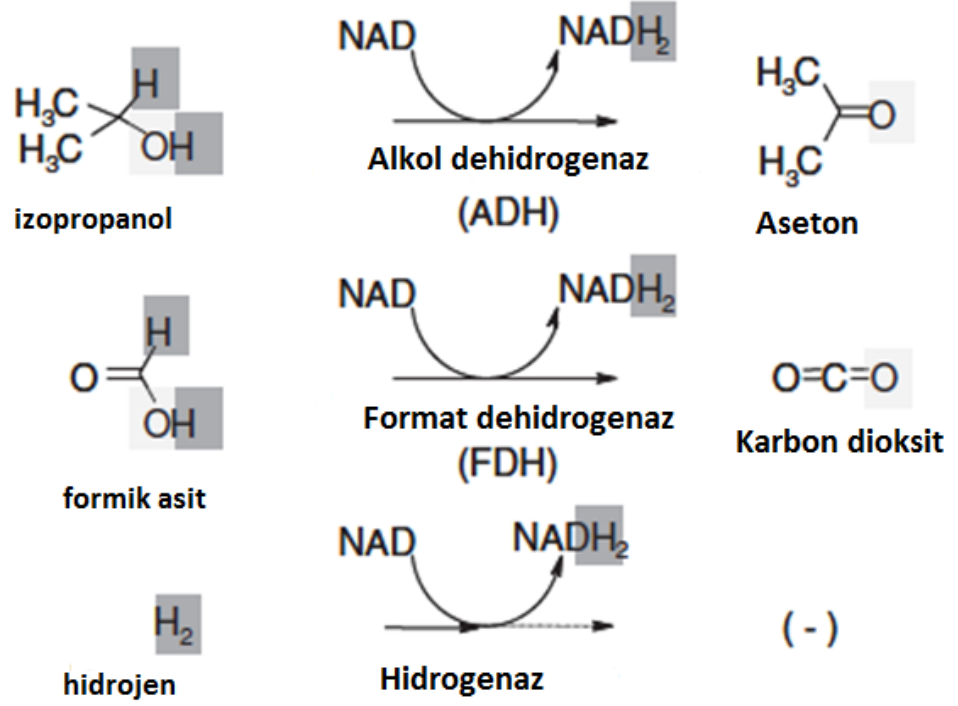
[Wilds, 1944)]. Formik asit ise klasik hidrojen transfer reaksiyonlarında kullanılır [Fujii et al., 1996], [Hashiguchi et al., 1995]. Hidrojen ise laboratuvar ölçeğinde klasik indirgeyici biyohidrojenasyon ajanı olarak hala kullanılmaktadır [Mertens et al., 2003].

Şekil 2.2 kofaktörlerin stokiyoikiyometrik olarak kullanımının ekonomik olmadığı açıkça göstermektedir. Sodyum borohidrid'in kullanımı da (genellikle klasik indirgemedi) ekonomik olarak oldukça talep görmektedir. Formik asit ve izopropanol oldukça ucuz indirgeyici ajanlardır. Glukozun oldukça ucuz hidrojen kaynağı olması da dikkati çeken bir durumdur (maya indirgemeleri). Hidrojen ve elektronlar da çok ekonomik indirgeyici ajanlardır.

Format/format dehidrogenaz sisteminin çok ekonomik olarak oldukça dikkati çeken bir sistem olduğu kanıtlanmıştır. Sürekli kofaktör rejenerasyon sistemi için format dehidrogenazın geliştirilmesi Dr. Maria-Regina Kula ve Dr. Martina Pohl'a 2002 Alman başkanlık ödülünü kazandırdı [Bundespräsidialamt, 2002]. Endüstriyel ölçekte kurulan kofaktör rejenerasyonuna örnek *L-tert* lösinin üretimidir (Şekil 2.3) [Bommarius and Riebel, 2005]. Bu proses (pinakolonun oksidasyonu ile elde edilebilen) prokiral substrat olan trimetil piruvat ile başlayarak Degussa tarafından ton bazında üretimi gerçekleştirilerek ticarileştirilmiştir. Bu reaksiyon membran reaksiyon içinde gerçekleştirilmiştir (Şekil 2.3). Bu teknik büyük ölçekte kofaktör rejenerasyonu için ikili enzim sisteminin kullanıldığı ilk çalışmadır.

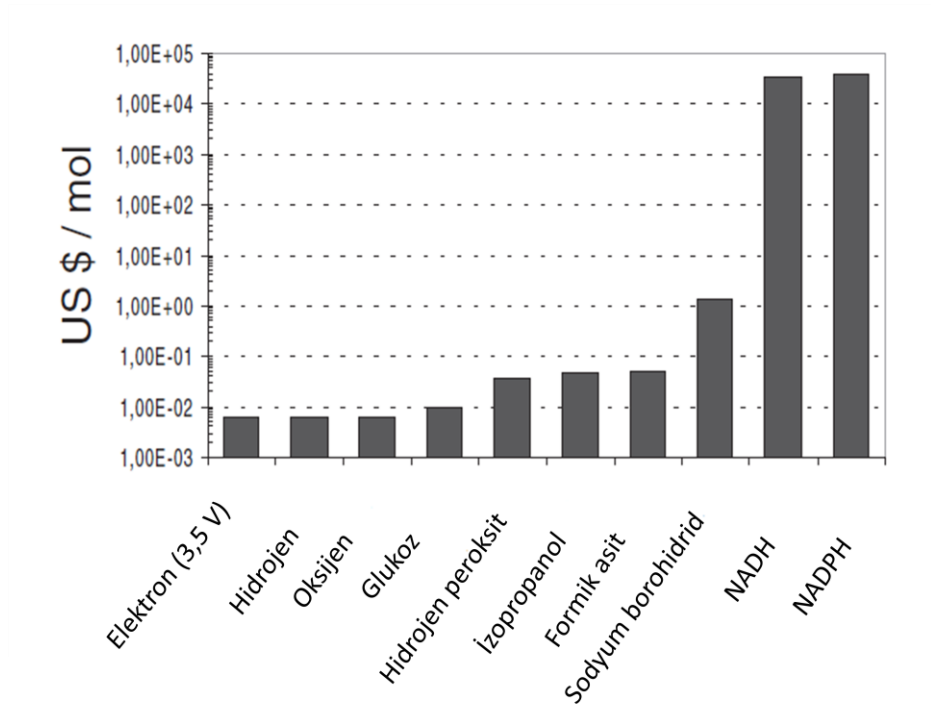
2.5. Kiral Bileşikler

Bugün kiral bileşikler kimyasal katalistler, sıvı kristaller, tatlandırıcılar, toprak kimyasalları ve ilaçlar gibi kimyasal ve farmosötik endüstri için önemli yapı maddeleri olan bileşiklerdir [Daußmann et al., 2006]. Endüstride genellikle çok iyi hazırlanmış kimyasal metodlar kullanılmaktadır [Blaser et al., 2003] fakat son on yılda uygulamalı biyokatalitik metodlar tarafından stereojenik merkezlerin oluşturulmasına olan ilgi artmaktadır [Breuer et al., 2004], [Liese, 2006].

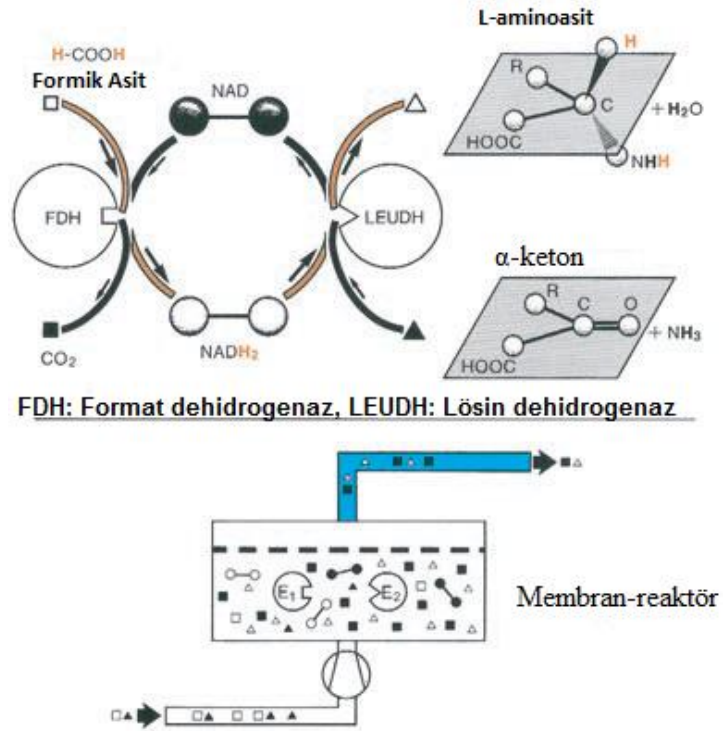


Şekil 2.1.: İzopropanol, formik asit ve hidrojen ile kofaktör rejenerasyonu.

Özellikle endüstriyel proseste alkol dehidrogenazların kullanımı artmaktadır. İzole enzim veya tüm hücre olarak kullanılan bu biyokatalistler dikkate değer oranlarda kemo-, regi- ve stereoselektiviteye sahip prokiral ketonların üretilmesini katalizlerler [Wandrey, 2004].



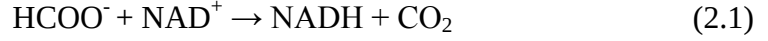
Şekil 2.2: Kofaktör rejenerasyonunda redoks eşitliğinde her bir mol için US\$ maliyetleri.



Şekil 2.3: L-tert'in üretimi için sürekli kofaktör rejenerasyonu.

2.6. Format Dehidrogenaz

Format dehidrogenaz (FDH; EC 1.2.1.2) NAD bağımlı olarak formatın oksidasyonunu kataliz eder ve böylece karbondioksit ve NADH üretir(2.1).



Format dehidrogenaz, ilk olarak bezelye tohumlarında (pea seed) bulunmuştur [Mathews and Vennesland, 1950]. 1970'lerde bu enzimle ilgili çalışmalar daha ciddi bir boyuta ulaşmış, metilotropik bakteriler ve mayalardan elde edilen FDH'lar çalışılmıştır [Tishkov et al., 1993]. FDH'ların pratikteki uygulamaları, NAD⁺ bağımlı dehidrogenazlarla, kiral bileşiklerin sentezi için kullanılan enzimatik proseslerdeki NADH rejenerasyonunu sağlamaları nedeniyle önem kazanmıştır [Wichmann et al., 1981], [Wichmann, 2005]. Yıllan yıla FDH'larla ilgili yayınlanan çalışmalarda bir artış olmakta ve bu çalışmaların büyük bölümü, FDH'ların kiral bileşiklerin sentez proseslerinde, kofaktör rejenerasyonu için kullanımlarını konu almaktadır [Tishkov and Popov 2006].

FDH'ın enzim teknolojisindeki en büyük kullanım alanı önemli kimyasalların enzimatik sentezinde NADH rejenerasyonudur [Aleksey et al., 1979]. NADH'ın reaksiyon ortamında tekrar kullanımı için kimyasal ve enzimatik olarak pek çok metot geliştirilmiştir. Enzimatik metotlar substrata yönelik seçicilikten dolayı tercih edilmektedir. Bu enzimatik metodlar içerisinde format/format dehidrogenaz (FDH) sistemi endüstriyel olarakta kullanılmaktadır. Degussa yüksek kalitede ilaç maddesi sentezinde (AIDS ve Kanseri ilaçları) kullanılan *L-tert* lösin üretiminde bu sistemi kullanmaktadır ve ton üretim kapasitesi ile çalışmaktadır. Bu sistemde kullanılan, NAD⁺ bağımlı format dehidrogenaz (FDH, EC 1.2.1.2), optikçe aktif bileşiklerin dehidrogenaz bazlı sentezinde, NADH rejenerasyonu için kullanılan en iyi enzimlerden biridir (Tishkov and Popov, 2006);[Wichmann, 2005].

Birçok çalışma indirgenmiş kofaktör rejenerasyonu için en iyi enzimlerden birinin FDH olduğunu göstermiştir [Burton, 2003], [Hummel and Kula, 1989], [Shaked and Whitesides, 1980], [Wichmann R, 2005]. FDH tarafından katalizlenen reaksiyon NADH rejenerasyonu için bütün kriterlere uymaktadır. Bunlar;

- Reaksiyon normal şartlar altında geri dönüşümsüzdür. Bu durum son ürünün % 99-100 verimle sonuçlanmasını ve temel reaksiyon dengelerini değiştirecek termodinamik basıncı sağlar.
- Format iyonu ucuz bir substrattır ve reaksiyon ürünü CO₂ reaksiyon karışımından kolaylıkla uzaklaştırılarak son ürünün saflaştırılması ile karışmaz.
- FDH optimum katalitik aktiviteyi geniş bir pH aralığında gerçekleştirir (6.0-9.0) [Mesentsev et al., 1997].
- Metanol kullanan maya ve bakteri düşük üretim maliyeti ile yüksek ölçekte enzim üretimi sağlarlar.
- Bakteriyel ve maya FDH'lar sürekli akışkan reaktör sistemlerinde belli bir süre kullanılabilirlikte kararlıdır.

Yukarıdaki bütün faktörler 'Degussa' tarafından fark edilen dehidrogenaz ile *L-tert* lösin'in kiral sentezinin ilk ticari prosesinde NADH rejenerasyonu için *Candida boidinii*'den elde edilen yeast FDH'in kullanımıyla belirlenmiştir (Bommarius and Riebel, 2005)]. Bu proses dehidrogenazlar yardımıyla optikçe aktif bileşiklerin üretiminde kullanılan diğer metodlar arasında üretim hacmi olarak en büyüklerinden birisidir. Profs. M.R. Kula ve C. Wandrey'in [Kula, 1987] liderliğinde *C. Boidinii*'nin üretim metodları ve milyonlarca aktif unit seviyesinde saflaştırma için geliştirildi [Botz et al., 1994].

Format dehidrogenazlar üzerindeki yönlendirilmiş bazı protein mühendisliği çalışmaları yapılarak, NAD(P)H rejenerasyonu için geliştirilmiş ve yeni kinetik özellikler sergileyen, artırılmış sıcaklık ve kimyasal stabilite ve düşük üretim maliyetine sahip yeni biyokatalizörlerin geliştirilmesine çalışılmıştır [Karaguler et al., 2001].

2.7. Alkol Dehidrogenaz

Alkol dehidrogenaz (ADH) primer alkollerin aldehidlere ve sekonder alkollerin ketonlara oksidasyonunu geri dönüşümlü olarak katalizleyen enzimlerdir. ADH elektron akseptörü olarak NAD⁺ veya NADP⁺'yi kullanarak karaciğerde etanol metabolizmasının ilk aşaması olarak etanolün oksidasyonu ile asetaldehidin oluşumunu katalizleyen fonksiyonuyla birlikte insan vücudunda pek çok rol oynarlar [Edenberg, 2007].

İlk ADH 1937 yılında Negelein ve Wuluff tarafından *Saccharomyces cerevisiae* veya bira mayasından izole edilmiştir [Negelein, 1937]. 1948 yılında Bonnichsen ve Wassen at karaciğerinden ADH'nin kristallendirilmesini başardılar [Bonnichsen, 1948]. Hayvan ve bakteri ADH'ların özelliklerinin çok farklı olduğu bulundu. Yeast ADH'ları hayvan ADH'larından 2 kat daha büyük ve 100 kat daha aktif olduğu ve maya enziminin daha fazla spesifik olduğu bulundu. Protein dizileme teknolojisi gelişiminde önemli bir özelliğe sahip aminoasit dizi ve 3D yapı belirlemede ilk kullanılan enzimlerden biri ADH'tır [Cannon, 1969].

Şu anda 150.000 nükleotid'den fazla dizi dehidrogenazlar olarak bilinmektedir [Stewart, 2007]. Alkol dehidrogenazlar (ADH) dehidrogenazlar familyası içinde en çok araştırılan enzim grubudur. Bu enzimler doğada hazır bulunurlar ve bakteri, mantar, bitkiler ve bazı memeli türlerinin dokularını içeren değişik kaynaklardan karakterize edilmişlerdir [Eklund and Ramaswamy, 2008]. ADH'lar tüm organizmalar içinde zorunlu prosesler arasında uygun kofaktörlerin karşılıklı redüksiyonu ile alkollerin keton ve aldehitlere karşılıklı dönüşümlerini katalizlerler. Nikotinamid kofaktör bağlı ADH'lar (NAD(P)-ADH) büyüklüklerine ve metal içeriklerine göre en az üç alt enzim süperfamilyasına ayrılabilen büyük bir enzim grubudur: (I) kısa zincirli dehidrogenazlar/redüktazlar (SDR), (II) orta zincirli (veya çinko içeren) dehidrogenazlar/redüktazlar (MDR) ve (III) demirle aktive olan alkol dehidrogenazlardır.

At karaciğerinden elde edilen ADH yapısı belirlenen ilk dehidrogenazlardan biridir [Branden et al., 1973], [Eklund et al., 1976a]. Bilgilerin çoğu 1970 ve 1980'li yıllar boyunca elde edilen genel yapı, koenzim bağlama, substrat bağlama ve konformasyonel değişimlerle ilgilidir [Eklund, 1983], [Eklund et al., 1984]. Yapısal özelliklerle ilgili bilgiler at karaciğeri ADH'nin (ADH1E) etanol aktif ile kristalloşekil çalışmalarından elde edilmiştir [Eklund et al., 1974], [Eklund et al., 1976a], [Eklund et al., 1982]. Bu enzim tetramerik fungal, yeast ve bakteriyel ADH'ların aksine sınıf 1 MDR-ADH ve dimerik yapıdadır. Şimdiye kadar birkaç tetramerik MDR-ADH'a karşın protein data bank'ta elde edilebilir dimerik MDR-ADH'tan 70 koordinat set vardır [Eklund and Ramaswamy, 2008].

ADH subunit'i genellikle iki domaine ayrılır; koenzim bağlanma domaini ve aktif merkezinde çinko iyonu bulunduran uzun derin bir yarık ile ayrılan katalitik domain [Eklund et al., 1976a]. Koenzim bağlanma bölgesi enzimin yarısında C

terminalinde yerleşmiş yaklaşık 150 rezidü ve C terminalden yaklaşık 50 rezidü ve enzimin yarısını içeren N terminalden toplam 170 rezidüden oluşmuştur (Şekil 2.4).

Koenzim bağlama domainin genel yapısı diğer dehidrogenazların ilgili domainine benzerdir. Bu özellik ilk keşfedildiğinde çok dikkat çeken etkileyici bir durumdu [Eklund, 1989]. Özellikle koenzim bağlama domaininin keşfi farklı dehidrogenazlarda farklı bir Şekilde yerleşmiştir ve şu anda çok iyi bilinen çoğu mozaik proteinler sebebiyle bu enzim familyalarının lego benzeri moleküler oluşumu olan diğer domainlerden tamamen farklı bir Şekilde kombine olmuştur [Rossmann et al., 1974].

Katalitik domain orijinal olarak üç β -yapısal motif ve birkaç heliks olarak açıklanan karmaşık bir düzenlemeye sahiptir [Eklund et al., 1976a]. Bu domain koenzim bağlama domaini ile ilgili rezidülerle ayrılan dizilerin olduğu daha küçük C-terminal kısmı ve daha büyük N-terminal kısmını içeren iki kısımdan meydana gelir.

Memeli MDR ADH'ları normalde herbir subunitteki katalitik domaine bağlanan iki çinko iyonu içerirler [Eklund et al., 1976a]. Bunlardan birisi 4 sistein rezidüsü tarafından bağlanan yapısal çinkodur [Drum et al., 1967]. Diğer çinko aktif bölgede bulunur. Bu kataliz için gereklidir ve iki sistein rezidüsü (Cys⁴⁶ ve Cys¹⁷⁴) ve histidin (His⁶⁷) ile koordine edilmiştir. Dördüncü pozisyon substrat veya bir su molekülü ile koordine olmuştur.

Substrat bağlama orijinal olarak aromatik alkol ve aldehidlerle ve trifloroetanol benzeri bileşikler olan substratlarla incelenmiştir [Eklund et al., 1982]. Alkol/aldehid işlevselliği Ser⁴⁸'e bir hidrojen bağlama mesafesinde çinko atomunu bağlar. Substratın geriye kalan kısımları nikotinamid halka ve katalitik ve koenzim bağlama domainlerinin her ikisindeki rezidülerle hidrofobik bir yarık içinde bağlanır. Bu substrat paketinin iç kısımları Ser⁴⁸, Phe⁹³, Phe¹⁴⁰ ve Leu⁴¹ tarafından oluşturulan aktif merkezdeki çinko iyonuna yakındır. Substrat yarığının dış yüzeyinde Phe¹¹⁰, Met³⁰⁶ ve Leu³⁰⁹ yerleşmiştir.

Katalizdeki genel olaylar ilk kez Theorell ve arkadaşları tarafından çalışılmıştır [Theorell, 1967]. Yapısal veriler moleküler anlamda bütün katalitik olayların açıklanması için elde edilebilir kinetik bilgiler ile birleştirilebilir. ADH'ların çoğu için mekanizma substrattan önce koenzimin bağlanması şeklinde sıralanmaktadır. Bu substrat bağlama bölgesinin nikotinamid kısmı sebebiyle yapısal özellikler tarafından açıklanmaktadır.

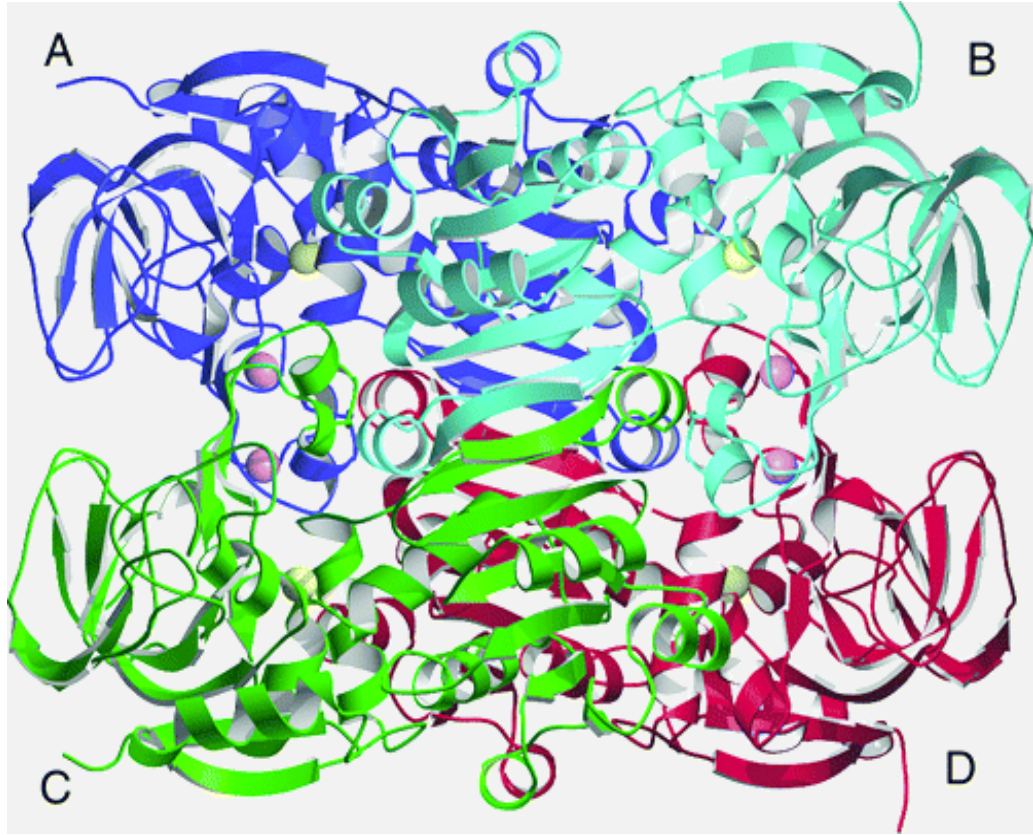
Alkol substratı için NAD^+ 'nin nikotinamid halkasının pozitif yükü alkol protonunun deprotonasyonuna etki eder ve aktif bölgedeki çinko iyonuna bağlanmasını sağlar. Substrat ve nikotinamid halka hidrid transferini kolaylaştırmak için birbirlerine yakın şekilde yerleşmişlerdir.

Memeli MDR-ADH'lar dimerik olmasına karşın bazı fungal ve bakteri enzimleri tetramerdir. Çoğu biyokimyasal çalışma farklı yeast enzimlerinde ama tetramerik MDR-ADH'ların yapısal çalışmaları termofilik organizmalardaki enzimlerde yapılmıştır. *E.coli*'den elde edilen tetramerik ADH'nin etanol ile indüklenen üç boyutlu yapısı NAD^+ 'nin varlığı ve yokluğunda belirlenmiştir [Karlsson et al., 2003]. Sınıf 1 ADH'larla ilgili olarak büyük fark *E.coli* ADH yapısı at karaciğer ADH'nin 118-139 rezidüleri ile ilgili 21 rezidüsünden yoksundur. Bir β -turn ve iki β -strand içeren bu uzun yapı substrat bağlanma bölgesinde bir tirozin rezidüsü ile karşılaşacak şekilde kısa bir dönüşle yer değiştirir. Bununla birlikte ikincil yapı elementleri arasında bir veya iki rezidü farklılığı zincir uzunluğundaki farklılıklardır.

Holoenzimin yapısı sürpriz bir şekilde NAD^+ ile bağ kuran hiçbir altbirim olmazken 4 altbirimin üçü ile koenzim bağlanmasına sahiptir. Kaba bir şekilde at karaciğeri ADH'ta olduğu gibi aynı bumerang yapılı konformasyonda koenzim bağlanır. NAD^+ enzime bağlandığında enzimin kapalı konformasyonu katalitik domainlerin dönmesi ile belirlenir. Katalitik domainin dönüşündeki büyüklük at ADH'ı gibi *E.coli* ADH'ında geniş olan koenzim domaini ile ilgilidir ama dönüş eksenini farklı bir şekilde yerleşmiştir. *E.coli* ADH ve at ADH'nin merkezi koenzim bağlama domainleri üst üste çakıştırılırsa, katalitik domainler molekülün uzun eksenini boyunca kaba bir şekilde dönerler. Bu *E.coli* ADH'nin 60 rezidü uzun delesyonu ile mümkün olabilir. Katalitik domainin bu dönüşü tetramer oluşumu için avantajlı ve düzgün olan molekülün arka yüzünü oluşturur [Sulzenbacher, 2004].

Clostridium beijerinckii'nin NADP(H) bağlı ADH apo ve holoenzim formu ve *Thermoanaerobacter brockii*'nin holo ADH'ı *E.coli* tetramerik ADH'ı ile benzer yapıdadır [Korkhin et al., 1998]. Tetramerler iki dimerden oluşmuştur ve her biri yapısal olarak omurgalı ADH'larının dimerine homologdur. İki bakteriyel ADH'nin NADP(H) 'a karşı özgülüğü koenzimin 2' fosfat oksijen atomu ile son üçünün hidrojen bağı yaptığı Gly¹⁹⁸, Ser¹⁹⁹, Arg²⁰⁰ ve Tyr²¹⁸ rezidüleridir. Termofilik enzim daha hidrofilik dış yüzey, daha hidrofobik iç yüzey, daha küçük yüzey alanı, daha fazla prolin ve alanin rezidüleri, mezofilik *C. beijerinckii* enziminden daha az serin

rezidüleri ve subunitler arası artan etkileşime sahiptir [Bogin et al., 2002], [Li et al., 1999a].



Şekil 2.4: *Bacillus stearothermophilus* LLD-R soyundan (HtADH) elde edilen NAD⁺ bağımlı alkol dehidrogenazın X ışını kristal yapısı. A, B, C ve D enzimin subunitlerini göstermektedir.

Subunitler A, B, C, D, dimerler A/D, B/C, katalitik çinko atomları sarı renkli, yapısal çinko atomları eflatun renkli, 150-285 rezidüleri kofaktör bağlanma domaini, 1-149, 286-339 rezidüleri katalitik domain [Eklund et al., 1976b].

Sıcaklık kararlılığı olarak güçlendirilmiş mezofilik enzim mutantları dörtlü yapıda daha güçlü etkileşimlere sahiptir [Bogin et al., 2002]. Orta zincirli tetramerik ADH'ların diğer yapıları hipertermofilik arkeonlar olan *Aeropyrum pernix* [Guy et al., 2003], [Littlechild et al., 2004], *Sulfolobus solfataricus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* yhfP proteini (pdb-kod:1tt7), *Thermotoga maritima* (pdb-kod:1vj0) ve yeast (pdb-kod:2hcy) ile belirlenmiştir. ADH'da klasik aktif merkez çinko iyonu 2 sistein, 1 histidin ve su molekülünün dört yüzölü koordinasyonuna sahiptir. Katalitik aktivite boyunca su molekülü substrat tarafından

değiştirilir. Diğerleri glutamik asit koordineli çinkoya sahip iken apoenzimde her bir tetramerdeki bir subunit klasik koordinasyona sahiptir [Karlsson et al., 2003].

2.7.1. *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* Kaynaklı ADH (BtADH)

BtADH'ın *Bacillus stearothermophilus* ile dizi eşleşmeleri yapıldığında % 50 dizi benzerliği olduğu bulunmuştur. BtADH'ın *Bacillus stearothermophilus* ADH (pdb kod: 1rjwA) yapısı ile Swiss-model programı kullanılarak modellendiğinde her bir subunitte iki çinko metali olduğu ve aktif merkezde Cys¹⁴⁷, His⁶⁰ ve Thr⁴¹ aminoasitlerinin substrat ve inhibitör etkileşimleri gösterilmiştir. *Bacillus stearothermophilus* MDR süperfamilyası içinde çinko içeren bakteri alt familyasından olduğundan *Bacillus thuringiensis* ile yapısal benzerlik olduğu düşünülmektedir [Auld and Bergman, 2008].

Bacillus stearothermophilus thermostabil bir enzim iken BtADH mezofilik bir karakterdedir. Termofilik özellikten yapısal motifler sorumludur. Bu yapısal motiflerle ilgili yapılan çalışmalarda [Bogin et al., 2002], [Ceccarelli et al., 2004], [Fiorentino et al., 1998], [Wallon et al., 1997] çeşitli faktörler belirlenmiştir. Bunların arasında Prolin aminoasitinin sayı ve lokasyonu, tuz köprüleri ve hidrojen bağları sayılabilir. HtADH'daki Pro²⁴² rezidüsünün thermostabiliteden sorumlu olduğu G. Fiorentino'nun mutasyon çalışmasında gösterilmiştir [Fiorentino et al., 1998]. HtADH'ın aminoasit dizisindeki 50-59 arasındaki 10 aminoasitten 4 tane prolin tespit edilmiştir [Ceccarelli et al., 2004]. BtADH'ta 50-59 arasında hiçbir prolin molekülü bulunmamaktadır ve 242. dizide de prolin yerine lizin aminoasiti bulunmaktadır. Yapısal benzerlik olmasına rağmen konformasyonel düzenlemede thermostabiliteden sorumlu prolin aminoasitlerinin olmaması BtADH'ın neden mesofilik karakterde olduğunu açıklamaktadır.

2.8. Enzim İmmobilizasyonu

Enzimler yıllardır besin endüstrisinde ve çok yakın zamanlarda da farmasötik ve kimya endüstrisinde kullanım alanı bulmaktadır. İmmobilize enzimlerin kullanımının artmasında Katchalski-Katzir'in 1971 yılında enzim mühendisliği kongresinde "enzim fiziksel olarak katalitik aktivitesini koruyarak boş bir alanda

lokalize olup tekrar tekrar ve sürekli bir Şekilde kullanılabilir” ifadesinin önemli bir katkısı olmuştur [Katchalski-Katzir and Kraemer, 2000]. İmmobilize enzim kullanmanın birçok avantajı bulunmaktadır. Bunlardan bazıları enzimlerin tekrar tekrar kullanılması (Üretimi zor ve pahalı enzimler için önemlidir), matriksin enzimi ortam şartlarından koruması, ürün saflaştırılmasında enzim kontaminasyonunun olmaması, aynı anda birçok enzim immobilize edilerek birden fazla reaksiyonun gerçekleştirilmesidir.

Temelde enzim immobilizasyonu bir matrikse bağlanma, hapsedme (tutuklama, entrapment) ve çapraz bağlama şeklinde üç geleneksel metoda ayrılır. Matrikse bağlanma fiziksel (hidrofobik ve Van Der Waals etkileşimleri), iyonik veya kovalent olabilir. Fiziksel bağlanma yüksek iyonik güç, yüksek ürün ve substrat konsantrasyonuna sahip endüstriyel koşullarda enzimi matrikse bağlamada yetersiz kalmaktadır. İyonik bağlanma daha güçlüdür ve kovalent bağlanma ise enzimin matrikse daha kuvvetli bağlanmasını sağlar ve enzimin yüzeyden uzaklaşmaması avantajına sahiptir. Matriks sentetik rezin, biyopolimer veya silika gibi inorganik polimerler olabilir. Tutuklama (entrapment) ise organik polimer ve silika sol jel gibi polimer bir ağ içinde enzimin hapsedilmesidir. Enzimin tamamen uzaklaşmasını engelleyecek fiziksel kuvvet genellikle çok zayıftır. Böylece ilave bir kovalent bağlanma gereklidir. Tutuklama ve matriks bağlama arasındaki fark çok açık değildir. Enzimin ya iç yüzeyine ya da dış yüzeyine yerleştiği önceden hazırlanan matrikse enzimin bağlanması matrikse bağlanan immobilizasyondur. Tutuklama ise enzim varlığında polimerik bir ağın varlığını gerektirir. Taşıyıcı olmayan makropartiküllerin hazırlanmasında biyofonksiyonel maddeler kullanılarak elde edilen çapraz bağlı enzim agregatları ve kristalleri kullanılır [Sheldon, 2007].Özetle enzimler gluteraldehit ile çapraz bağlanarak, katı bir matrikse adsorbe olma, çapraz bağlı katı bir matrikse adsorbe olma, katı matrikse kovalent bağlanma, fiberlere, mikrokapsüllere veya membranlara hapsolunma, membranlara veya membran reaktörlerdeki bir kompartımana adsorbe olma ve çapraz bağ olmaksızın enzim kristallenmesiyle immobilize olabilirler.

Kovalent immobilizasyon ile ilgili birçok protokol vardır. Bunlardan bir çoğu matriks aktivasyonu ve immobilizasyonu beraber kullandıkları için mililitre matriks başına çok az miktardaki proteinleri de immobilize edebilirler. Enzimler önce matriks yüzeyine adsorbe olurlar sonra proteinlerdeki nükleofilik gruplarla (amino, thio, hidroksil) ve matriks yüzeyindeki fonksiyonel gruplarla kovalent bağ oluştururlar. Bu

“intramoleküler” kovalent immobilizasyon “adsorbe olmamış proteinler ve tek fonksiyonlu epoksi matriksler arasındaki intermoleküler” kovalent immobilizasyondan daha hızlıdır. Bu iki aşamalı immobilizasyon mekanizması çok yüksek stabilitesi olan ve enzimle çok sağlam kovalent bağlar oluşturabilen epoksi gruplarının kullanılmasına olanak sağlar [Mateo et al., 2008].

Entrapment boşluk veya bir ağ içinde enzimin fiziksel sınırlandırılması olarak adlandırılan immobilizasyon tekniklerinden biridir. Enzim entrapment’da basit ve yaygın metot multi valent zıt iyonların ilavesiyle polianyonik veya polikanyonik jelleşmenin olmasıdır. Alginate’ler toksik olmayan normal jelleşme özelliklerine sahip olması sebebiyle sıklıkla kullanılan polimerlerden biridir. Alginate 1,4 – bağlı β -D-mannuronic acid ve α -L-guluronic acid’in apolar doğrusal kopolimerleşmesiyle oluşur. Biokatalist ve sodyum alginate çözeltisi Ca^{2+} çözeltisine damla damla ilave edilerek enzimlerin hapsolunması sağlanır. Katyonlar çapraz bağlayıcı bir ajan olarak alginate biopolimerlerine etki eder ve damlalar bir bead olarak bir ağ içerisinde biokatalistleri alarak çökerler [Won et al., 2005]. Enzimlerin immobilizasyonunda poliakrilamid jellerin kullanımı 1960’lı yıllarda başlamıştır. Bu jeller kendi yapılarında yüklenebilecek bazı özel karakteristiklere sahiptirler. Akrilamid zincirleri akrilik asit orijinli gruplarla reaksiyon verecek kapasitededir. Bu şartlar altında enzim çoğu sentetik taşıyıcı iyonize karboksil gruplarla yüksek negatif yüklü üç boyutlu oluşumu içine gömülürler. Enzim böylece hareketini etkileyecek güçlü elektrostatik bir alana maruz kalır [González-Sáiz and Pizarro, 2001].

Eupergit C gibi akrilik rezinler matriks olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Eupergit C *N,N*-metilen-bis-metakrilamid, glisidil metakrilat, allil glisidil eter ve metakrilamid’in kopolimerizasyonu ile oluşmuş, 100–250 μm çaplı çok delikli beadlerden oluşmuştur. Eupergit C pH 0-14 aralığında kimyasal ve mekanik olarak stabildir ve bu pH aralığında kesinlikle şişme ve büzülme gözlenmez. Eupergit C yüksek oranda reaktör uyumludur. Eupergit C sahip olduğu epoksi gruplarıyla protein moleküllerinin amino grupları alkali ve nötr pH da reaksiyona girerek proteinlere bağlanırlar. Eupergit C asidik nötr ve alkali pH’da enzim moleküllerine karboksil ve sülfidril gruplarıyla bağlanabilirler [Katchalski-Katzir and Kraemer, 2000].

Bu çalışmada Eupergit C matriksi üzerine kovalent immobilizasyon gerçekleştirildi. Yukarıda açıklanan avantajları ve yüksek verimlilikleri sebebiyle matriks olarak Eupergit C 250 L ve yöntem olarak kovalent immobilizasyon tercih

edildi. İmmobilizasyonda yeni konsept nanopor silika içinde tek bir enzim nanopartikül (SENs) uygulaması olarak görülmektedir [Kim et al., 2006]. Bununla birlikte oldukça farklı matrikslerin kullanımını içeren bu yeniliklerin çoğu immobilize edilecek enzimden daha pahalı olmaktadır. Sonuç olarak bu yenilikler endüstriyel biyotransformasyon uygulamaları için kullanılamaz ama biyosensör uygulamaları veya enzim maliyetlerinin ilgili konudan daha düşük maliyetli olduğu durumlarda tercih edilebilir. Ayrıca aktivite ve stabilite de enzim immobilizasyonunun etkileriyle ilgili önemli bilgiler sağlayabilir.

Endüstriyel biyotransformasyon uygulamaları için immobilize enzimin maliyeti çok önemlidir. Açıkçası immobilizasyon metodu aktif ve stabil biyokatalist sağlamaya ilaveten yüksek saflıkta enzim hazırlanmasını veya ticari olarak elde edilemeyen pahalı matriks gerektirmeyen oldukça basit bir uygulama olmalıdır. Çapraz bağlı enzim agregatları (CLEAs) matrikse ihtiyaç duymadan ve ham enzim örneklerinden kolayca hazırlanması gibi kolaylıklarıyla yüksek aktivite ve stabiliteye sahip olmaları dikkate değer bir şekilde gelecekte endüstriyel bir potansiyele sahip olacaklardır [Sheldon, 2007].Özetle, asimetrik sentez birden fazla kiral merkeze sahip ilaç öncü maddelerden ilaç sentezi gibi çeşitli alanlarda kullanılması sebebiyle önemi gittikçe artmaktadır [Carey et al., 2006]. Çevre dostu metodlarla bu maddeleri sentezlemek için katalist önemli rol oynamaktadır ve kimyasal ve biyokatalistlerin her ikisinde birbirlerini tamamlayıcı olmaları sebebiyle geliştirilmesi gerekmektedir. Total ilaç sentezinin yaklaşık % 10'u biyokatalistlerle olmaktadır. İlaç sektöründe kiral ara bileşiklerin sentezinde biyokatalitik uygulamalar kullanılmaktadır [Patel, 2011], [Wohlgemuth, 2011].Çoğu çalışmada kullanılan biyokatalitik reaksiyon çeşidi hidrolazların kolay elde edilebilir olması ve yüksek stabiliteleri sebebiyle hidroliz reaksiyonudur.. Biyokatalitik reaksiyonların ikinci büyük kısmını oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonları oluşturmaktadır. Son zamanlardaki ilerlemelerle oksidoredüktazlar ticari olarak kolay elde edilebilmektedir. Elde edilebilir enzimlerin artmasıyla yüksek enantioselektiviteye sahip çeşitli substratlar için uygun biyokatalist bulmak kolaylaşmaktadır.

Günümüzde veribankalarından elde edilebilir genlerin artması biyokatalistlerin artmasını sağlamıştır. Organik kimyacılar ve moleküler biyologlar arasındaki işbirliği *E.coli* ve ekmek mayası gibi kolay kullanılabilen organizmalarda enzimlerin yüksek oranda üretimi gerçekleştirilmektedir. Biyokatalistlerdeki bu ilerlemeler gelecekte endüstriyel uygulamalarda oksidoredüktazların kullanımını artıracaktır.

3. FORMAT DEHİDROGENAZ (FDH) EKSPRESYONU ve KİNETİK ÇALIŞMALARI

3.1. Materyal

3.1.1. Kimyasallar

Maya ekstraktı, pepton, sodyum klorür, agar, imidazol, kalsiyum asetat, etanol, kalsiyum klorür, NAD^+ , SDS, TEMED, kalsiyum klorür, akrilamid, amonyum sülfat, N,N, methylenebisakrilamid, potasyum hidrojen fosfat Merck'den, sodyum format, amonyum format Fiedel de Haen'den, fenilmetanosülfonilflorid (PMSF), sodyum alginate, APS (amonyumpersülfat) Sigma'dan, Bradford ayırıcı, lizozim Fluka'dan, sodyum fosfate monobazik, sodyum fosfat dibazik, Tris-Cl Sigma-Aldrich'den, Eupergit C 250 L Degussa'dan, ampicilin Applichem'den, IPTG (izopropil β -D-tioglikozilpiranozid) QIAGEN'den, trishidroksimetilaminometan (Tris) Fluka'dan alındı.

3.1.2. Cihazlar

Santrifüj (Beckman Allegra 64R), sonikatör (Banlin electronic), Uv-vis spektrofotometre (Shimadzu UV-3600), çalkalayıcı (Heidolph), inkübatör (Excella E-25), tartı (Sartorius Basic), manyetik karıştırıcı (Heidolph) ve mikropate okuyucu (SpectraMax Plus384TM, Molecular Devices), kullanıldı.

3.1.3. Plazmidler ve Bakteri Suşları

Taşıyıcı soy olarak *E.coli* Top10 (Invitrogen) ve *E.coli* (BL21 DE3) kullanıldı. Taşıyıcı vektör olarak pET14b (Invitrogen) kullanıldı.

3.2. Metod

3.2.1. *CmFDH*'ın Ekspresyonu

Taşıyıcı soy olarak *E.coli* (Top10) ve *E.coli* (Rosetta DE3) kullanıldı. *E.coli* Luria-Bertani (Bertani, 1951) ve Studier (Studier, 2005) besiyerinde büyütüldü. Bakteriler gliserol stoktan (-80 °C) alınarak ampisilin (100 µg/ml) ihtiva eden LB agar petrilere ekim yapıldı. Ekim yapılan petrilere 37 °C'de gecelik inkübasyona tabi tutuldu. İnkübatöre alınan petrilere üreme olduğu gözlemlendi. Daha önce otoklavlanmış 50 ml LB besiyeri içeren 250 ml lik flasklara 50 µl ampisilin (100 mg/ml) eklendi. Petrilere pipet ucuyla alınan tek koloniler 250 ml'lik flasklara aktarılıp 37 °C'de 210 rpm'de gece boyu inkübe edildi.

3.2.2. *E.coli* Kompetent Hücrelerin Hazırlanması

LB-agar besiyerinde büyütülen *E.coli* (Top 10) petrisinden alınan tek koloniler, 3 ml'lik LB besiyerine alınarak 30 °C de 16 saatlik gecelik inkübasyona bırakıldı. Gecelik kültürden 1 ml alınarak 100 ml'lik LB besiyerine eklendi ve 37 °C'de 170 rpm'de inkübe edildi. *E.coli* (Top 10) 600 nm'de OD değeri 0,3'e geldiğinde buz üzerine alındı. Hücreler 10000 rpm'de 10 dakika 4 °C'de santrifüj edildi. Santrifüjden sonra süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet 2 ml 100 mM MgCl₂ ile karıştırılıp tekrar 4000 rpm'de 4 °C'de 10 dakika santrifüj edildi. Sonra süpernatant uzaklaştırıldı. Steril 85 mM CaCl₂'den (%15 gliserol içeren) 1 ml hücre pelletine ilave edildi ve iyice süspanse edildi. Daha sonra mikrosantrifüj tüplerine 100 µl aktarılıp sıvı azot içerisinde donduruldu ve kullanılıncaya kadar -80 °C'de saklandı.

3.2.3. Transformasyon

E.coli Top 10 kompetent hücreler -80 °C'den alındı ve buz üzerinde çözünmeye bırakıldı. Daha önceden elde edilmiş *CmFDH* genini taşıyan plazmidten 3 µl hücre kültürlerine eklendi ve buz üzerinde 30 dakika bekletildi. Hücreler 42 °C'de 50 saniye ısı şokuna tabi tutuldu. Buz üzerinde 1 dakika bekletildi. 250 µl SOC besiyeri eklendi ve 37 °C'de 225 rpm'de 1 saat muamele edildi. Ampisilin (100µg/ml) içeren LB agar petrilere ekim yapıldı ve 37 °C'de 16 saatlik inkübasyona bırakıldı.

3.2.4. Plazmid DNA Saflaştırılması

Plazmid (*pCmFDH*) saflaştırılması için QIAGEN (Qiaprep spin miniprep kit) kit kullanıldı. LB besiyerinde büyütülmüş *E.coli* Top 10 (*pCmFDH*) gecelik kültürden 5 ml falkon tüpe alındı. Gecelik kültürler 13000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet kullanılıncaya kadar -80 °C’de saklandı. Pellet haldeki bakteri hücreleri 250 µl P1 tampon ile süspanse hale getirildi ve 1,5 ml’lik mikrotüpe alındı. 250 µl P2 tamponu eklendi ve tüp ters düz edilmek suretiyle 4-6 kez karıştırıldı. 350 µl N3 tamponu eklendi ve tüp ters düz edilmek suretiyle 4-6 kez karıştırıldı. 13000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant QIAprep spin kolona dekante etmek ya da pipetle çekmek suretiyle aktarıldı. 30-60 saniye santrifüj edilirdi. Spin kolonun altındaki sıvı atıldı. Spin kolon 0.5 ml PB buffer ile yıkandı ve 30-60 saniye santrifüj edildi. Spin kolonun altındaki sıvı atıldı. Spin kolon 0.75 ml PE tampon ile yıkandı ve 30-60 saniye santrifüj edildi. QIAprep spin kolon temiz bir mikrotüpe alındı. DNA’yı elüe etmek amacıyla 50 µl EB tamponu (10 mMTris-Cl, pH 8.5) ya da destile su, QIAprep spin kolonunun merkezine eklendi. Bir dakika beklendi sonra 1 dakika santrifüjlendi.

3.2.5. SDS PAGE (Sodyumdodesilsülfat-Poliakrilamidjel) Analizi

SDS-PAGE, SDS %10’luk poliakrilamid jel içinde ve 49 mM Tris, 384 mM glisin ve %0.1 (w/v) SDS (pH 8.5) içeren yürütücü tampon çözeltisi kullanılarak gerçekleştirildi. Coomassie blue, proteinlerin boyanması için kullanıldı. Örnek yükleme tamponundan 10 µl ve jelde yürütülecek protein örneğinden 10 µl bir mikrosantrifüj tüpüne kondu. Örnekler 5 dakika kaynatıldı ve yükleme yapılıncaya kadar oda sıcaklığında soğutuldu. Jel aparatları kuruldu. İçerisine yürütme tamponu dolduruldu. Jelin kuyularına örnekler hamilton şırıngası yardımıyla dikkatlice yüklendi. Jel önce 80 voltta 20 dakika sonra 120 voltta 1 saat yürütüldü. Jeldeki boya jelin sonuna kadar geldiğinde yürütme durdurularak jel temiz bir kaba alındı. İçerisine boya çözeltisi kondu ve çalkalayıcı da 1 saat boyanması için bekletildi. Daha sonra boya süzülerek tekrar bir şişeye alındı ve jel su ile yıkandı. Sonra boya giderici çözelti ilave edilerek fazla boyanın jelden uzaklaşması sağlandı.

3.2.6. *E.coli* (Rosetta BL21 DE3) Ekimi ve IPTG İndüksiyonu

LB besiyerinin 5 ml'sinin içersine 5 µl ampisilin (100 mg/ml) ilave edildi ve besiyeri hazırlandı. Buzdolabındaki petri kaplarındaki *pCmFDH* plazmidi içeren *E.coli* (Rosetta DE3) kültüründe üreyen kolonilerden tek bir koloni cam tüpe (5 ml) kürdan yardımıyla ekim yapıldı. 180 rpm'de 37 °C'de 16 saatlik gece inkübasyonuna bırakıldı. Ertesi sabah kültürden 1.5 ml alınıp 150 µl ampisilin (100mg/ml) içeren steril 150 ml LB besiyerine ekildi. Belli aralıklarla OD 600 nm'de 0,6'ya gelinceye kadar absorbans ölçümleri alındı. OD 0,6 ya gelince 1 ml numune mikrotüpe alındı sonra 150 ml'lik kültüre 375 µl IPTG (200 mM) eklendi. Kültürden 2, 4 ve 5. saatlerde 1 ml lik numuneler alındı. Numunelerin bulunduğu mikrotüpler 12000 rpm'de 7 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet mikrotüp içersinde buzdolabında (4 °C) saklandı.

Flaskın içinde bulunan hücre kültürünü falkonlara 35 ml olacak Şekilde eşitleyip 10000 rpm'de 4 °C'de 25 dakika süreyle 2 kez santrifüjlendi. Santrifüjleme sonundaki pelletler buzdolabında 4 °C'de saklandı. SDS jel elektroforezde protein ekspresyon bantlarının görüntülenmesi için mikrotüplere 100 µl hücre kültürü alıp 10000 rpm'de 1 dakika santrifüjlendi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklandı.

Elde edilen 16 saatlik gece kültürü (700 µl) ile %50 gliserol (300 µl) karıştırıldı ve -80 °C'de saklandı. Son gliserol oranı %15 olacak Şekilde ayarlandı. Böylece *pCmFDH* içeren *E.coli* kültürleri gliserol stok ile muhafaza edildi.

3.2.7. Studier Otoindüksiyonu Enzim Üretimi

Protein ekspresyonu Studier otoindüksiyon (Studier, 2005)] prosedüründe küçük değişiklikler yapılarak gerçekleştirildi. Özetle LB agardaki tek bir koloni 5 ml'lik küçük kültüre ekildi. Sonra bu kültür 2 litrelik girintili flaskda 100 µg/ml ampisilin içeren 750 ml'lik otoindüksiyon besiyerine indüklenmek üzere aktarıldı. Otoindüksiyon besiyerinin içeriğinde yeast ekstrakt (5 g/l), pepton (20 g/l), NaCl (5 g/l), glukoz (0.5 g/l), gliserol (6 g/l) and laktoz (2 g/l) bulunmaktadır. Besiyerinin pH'ı Na/K fosfat tamponu ile 7.0'a ayarlandı ve otoklavlandı. Büyütme besiyeri 30 °C'de 180 rpm'de 16 saat inkübasyona tabi tutuldu. Hücre pelleti 8000 x g'de 10 dakika santrifüj edilerek elde edildi ve -20 °C'de kullanılıncaya kadar saklandı.

3.2.8. *CmFDH*'in Saflaştırılması

Islak hücre pastası 10 ml 5mM imidazol içeren tampon A ile süspanse edildi. Bu süspansiyona, PMSF (fenilmetanosülfonilflorid) (1 mg) ve lizozim (1 mg) eklendi ve vorteksle iyice karıştırıldı. Buz üstünde 30 dk bekletildi ve sonikasyona tabi tutuldu (15 saniye sonikasyon, 45 saniye soğutma ile 6 kez tekrar edildi). Karışım 10000 rpm'de 4 °C'de 1 saat santrifüj edildi. Süpernatant 0.45 µm'lik Whatman filtreden geçirilerek 50 ml lik falkon tüplere aktarıldı. Süpernatant Tampon A ile dengelenmiş 2 ml nikel afinite kolona (Nickel Hitrap™ column, Amersham Biosciences) aktarıldı. En az 10 kolon hacim değişik imidazol konsantrasyonlarında (5, 10, 20, 50, 100, 400 mM) tampon kolondan geçirildi. Gerekli durumda daha fazla kontamine proteinlerin uzaklaştırılması için imidazol konsantrasyonu 10 mM'a çıkartıldı.

100-400 mM izmidazol içeren Tampon A histidin bağlı BtADH'ın elüsyonu için kullanıldı ve tampon PD-10 desalting kolon (Amersham Biosciences) kullanılarak tampon B (50 mM sodyum fosfat, pH 7,5) ile değiştirildi. Elde edilen elüsyon spin konsantre edici ile konsantre edildi ve -20 °C'de % 50 (v/v) gliserol içinde saklandı.

3.2.9. Bradford Yöntemi ile Protein Konsantrasyonu Tayini

Protein konsantrasyonlarını belirlemek için mikropiçin kuyucuklarına 200 µl ¼ oranında seyreltilmiş Bradford reaktifi ve 10 µl protein örneği konuldu. UV visible spektrofotometrede 595 nm'de absorbans değerleri ölçüldü. Farklı konsantrasyonlarda BSA protein standartları (0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.75 mg/ml), destile su ve konsantrasyonu belirlenecek olan *CmFDH* enzim örneklerinden 10 µl kuyucuklara yüklendi. Protein konsantrasyonları standart olarak BSA (Bovine Serum Albumin) kullanılarak çizilen kalibrasyon grafiği yardımıyla Bradford yöntemi ile belirlendi [Bradford, 1976].

3.2.10. PD-10 Kolon Yardımıyla İmidazolün Uzaklaştırılması

CmFDH enzim çözeltisi üzerine Tris-Cl tamponundan (pH 7.8, 50 mM) 2 ml ilave edilerek, toplam hacim 2,5 ml'ye tamamlandı. Bu çözelti 2,5 ml hacimli PD-10

kolonuna yüklendi. Tampon değiştirme işlemi, değiştirilecek tampondan (Tris-Cl, pH 7,82, 50 mM) 3,5 ml ilave edilmesiyle gerçekleştirildi. Devamında imidazolü uzaklaştırılmış enzim çözeltisi, uygun geçirgenlikli membran (10 kDa cut-off) yardımıyla spin-konsantre edildi (20 dakika, 4500 rpm). Tüm bu işlemler +4 °C’de gerçekleştirildi.

3.2.11. *CmFDH* Aktivite Tayini

Standart aktivite deneylerinde; 990 µl 25-200 mM sodyum format, 0,5 mM NAD, 0,1 M sodyum fosfat tampon çözeltisi karışımına 10 µl *CmFDH* (1,128 mg/ml) ilave edilmesiyle gerçekleştirildi. Aktivite ölçümleri spektrofotometrik olarak 340 nm’de 2 dakika NADH oluşumu gözlemlendi. Spesifik aktivite (U/mg) yukarıda verilen uygun deney şartlarında 1 mg enzimin bir dakikada oluşturduğu 1 µmol NADH miktarı olarak belirlendi. NADH oluşumu aktivite tayini absorption coefficient değeri $\epsilon_{340} = 6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ kullanılarak hesaplandı. *CmFDH*’ın sodyum format substratı kullanılarak NAD^+ koenziminin indirgenerek NADH oluşumu kararlı hal kinetikleri 340 nm’de 37 °C’de spektrofotometrik olarak gözlemlendi. Başlangıç hızlarının belirlenmesinde deneyler en az 3 kez tekrarlandı ve doğrusal olmayan regresyon programı (Origin, OriginLab, Northampton, MA) kullanılarak her bir substrat konsantrasyonu ortalama değerini Michaelis Menten eşitliğine ayarlanarak kararlı hal parametreleri olan k_{cat} ve K_M hesaplandı.

3.3. Sonuçlar ve Tartışma

3.3.1. *CmFDH*’ın Ekspresyonu ve Saflaştırılması

Ekspresyon vektörü (*pCmFDH*) *E.coli* (Rosetta DE3) hücrelerine transforme edildi. *E.coli*’ de rekombinant protein üretimi için küçük değişiklikler yapılarak otoindüksiyon prosedürü kullanıldı. Hücre ekstraktı SDS-PAGE ile analiz edildi. şekil 3.1’ de görüldüğü gibi yaklaşık 42 kDa boyutlu protein, *pCmFDH* plazmidi içeren *E.coli* (Rosetta DE3) ekstraktının coomassie boyası ile boyanarak kolaylıkla belirlendi. His₆-*CmFDH* metal iyon afinite kromatografisi ile saflaştırıldı. Bu

saflaştırmada SDS-PAGE analizi ile (Şekil 3.2'deki 6, 7 ve 8. hatlar) yaklaşık 1 litre kültürden %95 saflıkta 110 mg protein elde edildi.

3.3.2. *CmFDH*'ın Kinetik Değerleri

Şekil 3.3'de k_{obs} 'in S 'ye karşı grafiği, yani Michaelis Menten grafiği gösterilmiştir. *CmFDH* ile yapılan aktivite deneylerinde k_{cat} ve K_M değerleri, sırasıyla, $1.03 \pm 0.03 \text{ s}^{-1}$ ve $34.88 \pm 4.4 \text{ mM}$ olarak bulundu. Sodyum formatın pH 7.0 deki sekiz farklı konsantrasyonu (0-200 mM) ile en az üç ölçüm yapılarak standart sapmaları hesaplandı ve Şekilde RDS (relative standard deviation=bağıl standart sapma) değerleri olarak gösterildi. K_M ve k_{obs} değerleri Michaelis-Menten eşitliğine göre hesaplandı. Yapılan deneyler sonucunda elde edilen değerler *CmFDH* ile yapılan çalışmalara [Blanchard, 1980], [Schirwitz, 2007], [Shinoda, 2005], [Dijken, 1976] paralellik göstermektedir.

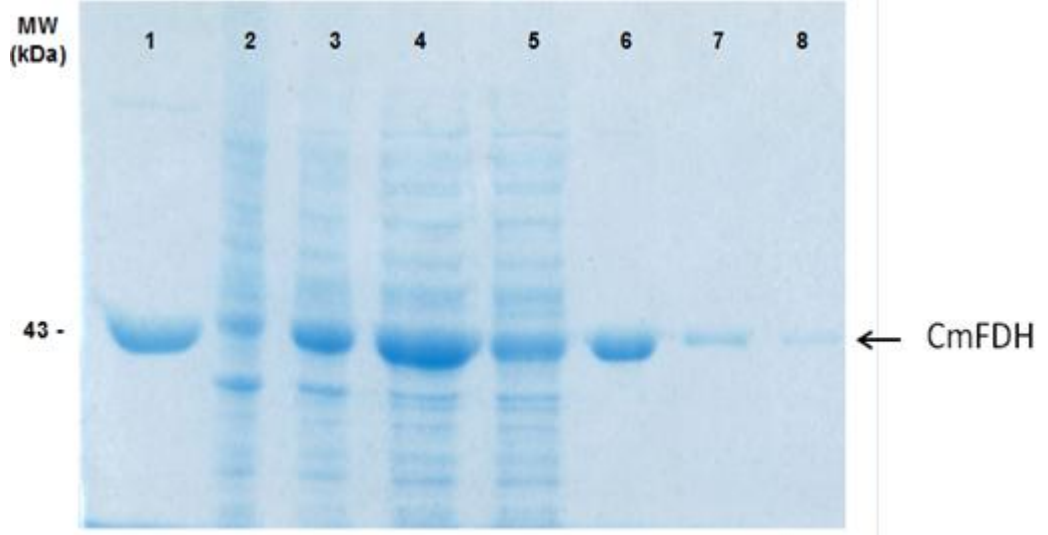
3.3.3. IPTG İndükleme ve Studier Otoindüksiyonu

Klonlanan genlerin taşıyıcı soylarda yüksek miktarlarda üretimi ve saflaştırılması klonlama stratejisini tamamlayan bir durumdur. Plazmide klonlanan protein gen dizisinin bir inducer (indükleyici) yardımı olmadan eksprese edilmesiyle çok az bir miktarda protein elde edilmektedir. Protein dizisi plazmid içinde T7 promotorunun kontrolü altında eksprese olmaktadır. *Ecoli*'ye transforme edilen plazmid indüklenebilir T7 polimeraza sahiptir. Geleneksel olarak istenen proteinin üretilmesinde IPTG indükleme metodu kullanılmaktadır. IPTG molekülü *LacI* geninden eksprese olan represör proteini ile etkileşime girerek onun yapısını değiştirmekte ve operatöre bağlanmasını engellemektedir. Dolayısıyla *lac* operatörüne bağlanma olmadığından T7 ve istenen protein eksprese olmaktadır [Hansen et al., 1998].

IPTG indüklemeye hücre inkübasyona bırakıldıktan sonra OD değerleri düzenli aralıklarda takip edilerek OD 0,6'ya geldiğinde ortama IPTG ilave edilerek indüksiyon başlatılmaktadır. IPTG molekülünün pahalı olması ve uygulamalarda düzenli OD takibi gerektirmesi sebebiyle uygulaması zor ve pahalı bir yöntemdir. F.W. Studier tarafından 2005 yılında yayınlanan bir makalede (Studier, 2005)] hücreler belli bir doygunluğa ulaştıklarında belli bir besiyeri içeriğinin etkisiyle

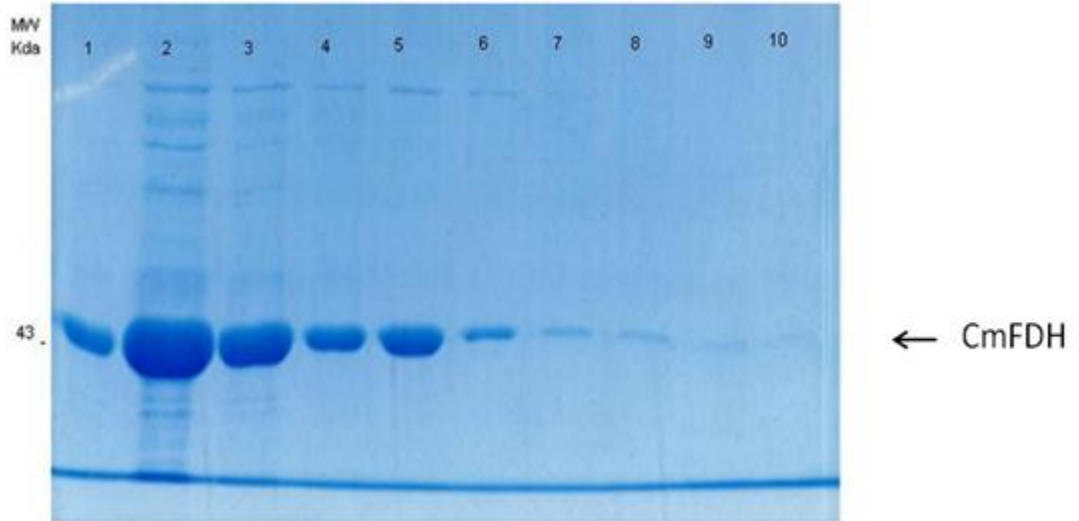
protein indüksiyonu gerçekleştirilebileceği ortaya konmuştur. Studier besiyerinin ortamını, içeriğindeki tuzlar ve pH'ı uygun seviyede dengeledikten sonra belirli bir glikoz, gliserol ve laktoz oranlarıyla proteinin otoindüksiyonunun gerçekleşebileceğini vurgulamaktadır. Besiyerindeki glikoz ilk enerji kaynağı ve lac operatörünün baskılayıcısı olarak görev yapmaktadır. Gliserol geç enerji kaynağı laktoz da indükleme için kullanılmaktadır. Studier'in otoindükleme genel prosedürü ilk olarak istenen plazmid *E.coli*'ye transforme edilir. Petride üretilmiş olan agardan tek bir koloninin ml'lik LB besiyerinde büyütüldükten sonra 1 litrelik kültüre inoküle edildikten sonra 20-24 saat çalkalayarak inkübe edilir. Ekspresyon vektörü olan *E.coli* BL21 (DE3) kromozomunda T7 polimeraz bulundurur ve istenen proteinin ekspresyonu için uygun bir taşıyıcı soydur. Studier otoindüksiyonun IPTG indüklemeye göre avantajları OD takibine gerek olmaması, aynı anda çoklu indüksiyonun gerçekleşmesi, OD 600 değerinin IPTG ye göre daha fazla olması (LB/IPTG~1.8, Otoindüksiyon~5), istenen protein ürününün daha fazla elde edilmesidir.

Yukarıda anlatılan protein indükleme metodlarının karşılaştırılması ve *CmFDH* ekspresyonlarındaki etkilerinin belirlenmesi için Studier ve IPTG indükleme ile protein ekspresyonları karşılaştırıldı. 100 ml LB besiyerinde 600 nm de OD değeri 0.6 ya geldiğinde son konsantrasyon 0.25 mM olacak şekilde IPTG ilave edildi ve inkübasyona bırakıldı. Aynı şartlarda Studier besiyeri 24 saat otoindüklenmeye bırakıldı. Tablo 3.1'de görüldüğü gibi hücre pelletleri ve toplam protein miktarları karşılaştırıldığında Studier besiyerinin %17.96 hücre pelleti ve %27.8 total protein miktarı olarak fazla olduğu gözlenmiştir. IPTG nin pahalı olmasından dolayı bundan sonraki çalışmalarda daha ekonomik olan Studier besiyeri tercih edildi.



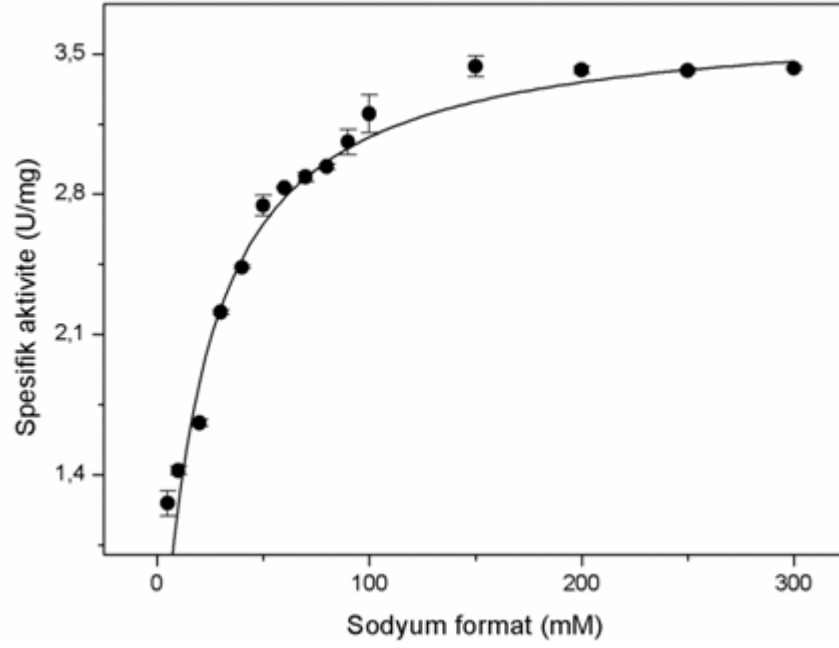
Şekil 3.1: Ni-afiniti kolon sonrası saflaştırılan *CmFDH* enziminin SDS-PAGE görüntüsü.

Şekil 3.1’de SDS-PAGE görüntüsü; coomasie blue ile boyanmış, *CmFDH* plazmidi içeren *E.coli* (Rosetta DE3) ve saflaştırılmış *CmFDH* enzimi. Marker (1), *E.coli* (Rosetta2 DE3) küçük kültür (2), Studier otoindüksiyon muamelesi 6. saat (3), otoindüksiyon muamelesi 18. saat (4), parçalanmış hücre ekstraktı (5) kolon sonrası saf enzim içeren tüpler (6,7,8).



Şekil 3.2: *CmFDH* enziminin nikel-afinite kolon saflaştırması SDS-PAGE görüntüsü.

Şekil 3.2’de SDS-PAGE görünüsü; coomasie blue ile boyanmış, *CmFDH* plazmidi içeren *E.coli* (Rosetta2 DE3) ve saflaştırılmış *CmFDH* enzimi Marker (1), kolon sonrası saf enzim içeren tüpler (2-10)



Şekil 3.3: *CmFDH*'ın Michaelis-Menten kinetiği.

Şekil 3.3'de aktiviteler 37 °C'de pH 7,0'de sodyum fosfat tampon çözeltisinde (25-300 mM) substrat konsantrasyonunda ölçüldü. Her bir ölçüm üç kez tekrarlandı ve ortalamaları alındı.

Tablo 3.1: IPTG indüksiyon ve Studier besiyerinin protein ekspresyonuna etkisi.

	Toplam Hücre Pelleti (g)	Total Protein (mg)	Total ptotein / pellet (mg/g)
IPTG	1.314	0.413	0.314
STUDIER	1.550	0.528	0.340

3.3.4. *CmFDH*'ın Spesifik Aktivitesinin Hesaplanması

CmFDH'ın kinetik dataları işlenerek Tablo 3.2'de görüldüğü gibi saflaştırma ve spesifik aktivite değerleri hesaplandı. *CmFDH*'ın spesifik aktivite değeri yani bir dakikada 1 mg proteinin oluşturduğu NADH ürün miktarı 3,62 U/mg olarak bulundu. Saflaştırma sonrası toplam ünit aktivite yaklaşık 2,5 kat artmıştır. Elde edilen veriler

Candida methylica'nın daha önce yapılan kinetik değerleriyle uyum göstermektedir [Ordu and Karaguler, 2007].

3.3.5. *CmFDH*'ın Amonyum Sülfat Çöktürmesi ile Saflaştırılması

Hücre ekstraktındaki proteinlerden istenilen proteinlerin saflaştırılmasında birçok metod kullanılmaktadır. Protein çöktürme işlemi protein saflaştırma işlemlerinin çoğunda kullanılmaktadır. Protein yüzeyinde bulunan hidrofobik ve hidrofilik gruplar proteinlerin çeşitli çözeltilerdeki çözünürlüklerinde etkilenebilirler. Bu özelliklerinden yararlanılarak proteinler amaca uygun olarak saflaştırılabilir. Protein çöktürme işlemlerinde en çok yüksek tuz derişimi ile çöktürme tercih edilmektedir.

Proteinlerin çözünürlükleri bulundukları çözeltinin iyonik direncine göre yani tuz konsantrasyonuna göre değişir. Düşük tuz konsantrasyonun da proteinlerin çözünürlüğü artar buna “salting in” denir. Tuz konsantrasyonu daha fazla artırılırsa proteinlerin çözünürlüğü azalmaya başlar. Yüksek tuz konsantrasyonu proteinin tamamen çökmesine sebep olabilir ki buna “salting out” denir. Hidrofobik alanları daha büyük olan proteinler hidrofobik alanları daha küçük olanlara göre daha çabuk birbirleriyle etkileşerek çökerler. Bunun için protein çözeltisine farklı oranlarda amonyum sülfat eklenir. Oluşan çökelti santrifüj ile çöktürülerek alınır ve uygun tamponda çözülür. Daha sonra her bir çöktürme örneği SDS-PAGE ile analiz edilerek istenen protein daha saf elde edilmeye çalışılır [Edelstein, 1996].

Tablo 3.2: *CmFDH*'ın saflaştırılma ve aktivite değerleri.

Fraksiyon	Toplam Hacim	Toplam Protein ^a	Aktivite	Toplam Aktivite ^b	Spesifik Aktivite	Saflaştırma	Ürün
	ml	mg	Unit	Unit	Unit/mg	Kat	(%)
Hücre Ekstraktı	60	400	0,02	1,45	3,01	1,0	100
Nikel Afinite Saflaştırma	50	108	0,07	3,62	3,62	1,2	250,0

Tablo 3.2’de ^a protein konsantrasyonları BSA standartları kullanılarak Bradford [Bradford, 1976] metodu ile hesaplandı. ^b Aktivite 50 mM sodyum fosfat tampon çözeltisi içinde (pH 7,0), substrat olarak 200 mM sodyum format ve koenzim olarak NAD⁺ kullanılarak ölçüldü.

4. ALKOL DEHİDROGENAZ (*BtADH*) ENZİMİNİN KLONLANMASI, EKSPRESYONU ve KARAKTERİZASYONU

4.1. Materyal

4.1.1. Kimyasallar ve Organizmalar

Alkol, keton ve aldehid substratları, Coomassie brilliant blue R-250, proteaz inhibitör karışımı PMSF (Fenilmetil-sülfonil florid), SDS (sodyum dodesil sülfat) Sigma-Aldrich'den alındı. Nikotinamid kofaktörleri (okside ve redükte formu) Roche Applied Science'dan alındı. IPTG (izopropil- β -D-tiogalaktopiranosid) Qiagen (ATQ biotechnology, TR). Restriksiyon endonükleazlar ve T4 DNA ligaz NEB (New England Biolabs), DreamTaq Green PCR Master Mix (2x) Fermentas'dan alındı. Diğer bütün biyokimyasallar çeşitli kaynaklardan mümkün olduğunca yüksek saflıkta ön saflaştırma yapılmadan temin edildi. *Bacillus thuringiensis serovar israelensis* (ATCC 35646) LGC Standarts GmbH (Germany)'dan temin edildi. pET14b vektör (Novagen) PCR ürünlerinin klonlanması için kullanıldı. E.coli TOP10 ve BL21 (DE3) (her ikisinde Invitrogen'den) *BtADH* geninin sırasıyla klonlama ve ekspresyon vektörü olarak kullanıldı. Bütün organizmalar LB-broth veya LB-agar'da 37 °C'de gerektiğinde ampicilin ilavesi yapılarak çoğaltıldı.

4.2. Metod

4.2.1. Dizi Analizi

BtADH'ın protein dizisi NCBI'daki (National Centre for Biotechnology Information) GeneBank'dan (Accession no: gi75761106) alındı. Çoklu dizi eşleşmesi varsayılan parametreler (default) kullanılarak CLUSTAL W programı ile gerçekleştirildi.

4.2.2. BtADH Geninin Klonlanması

Bacillus thuringiensis serovar *israelensis* Nutrient broth agarda 37 °C’de gecelik inkübasyona tabi tutularak büyütüldü. Agarda büyütülen kolonilerden tek koloni, LB besiyerinde 37 °C’de gecelik inkübasyon için kullanıldı. Genomik DNA fenol/kloroform/izoamil alkol (25/24/1) ekstraksiyon metodu kullanılarak elde edildi [Sambrook, 2006]. Saf genomik DNA TE tamponda (10 mM Tris–Cl, pH 8.0, 1 mM EDTA) konsantrasyonu 15 ng/μl olarak belirlendi. Genomik DNA’nın saflığı A260/A280 değerlerini oranlanması ile 1.93 olarak bulundu. BtADH geni polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltıldı. Klonlama için her bir primerin (4.1) 5’ ucunda bulunan *NdeI* ve *XhoI* (IDT Leuven, Belgium’den temin edildi.) restriksiyon bölgeleri belirlendi :

FP (İleri primer) 5’CGGTGTCCATATGAAAGCAGTAGTGGTTAATAAAAAC-3’)
RP (Geri primer) (5’CCCTGCTCGAGTTATTTGCAATCACAATTATG-3’). (4.1)

PCR reaksiyon karışımı (son konsantrasyonları her bir bileşik için parantez içinde verilmiştir.) DreamTaq Green PCR Master Mix (2x) (Fermentas) (25 μl), ileri ve geri primerler (2 μl, 0.8 pmol/μl), genomik DNA (5 μL, 1.5 ng/μl) ve distile su (16 μl) ile hazırlandı. PCR reaksiyonu Veriti®96 well Thermal Cycler™ (Applied Biosystems) kullanılarak gerçekleştirildi ve başlangıç denatürasyonu 95 °C’de 5 dakika ve sonra 2 aşamalı çoğaltma (95 °C, 1 dakika; 50 °C, 1 dakika; 68 °C, 1,5 dakika 5 döngü ve 95 °C, 1 dakika; 55 °C, 1 dakika; 68 °C, 1,5 dakika 24 döngü için) 29 döngü ve son uzama aşamasında 68 °C 10 dakika gerçekleştirildi. Ekspresyon vektörü pET14b plazmidi kullanılarak yapılandırıldı. PCR ürünü ve pET14b vektörü *NdeI/XhoI* restriksiyon enzimleri kullanarak kesildi ve agaroz jelde yürütüldükten sonra QIAprep Kit (Qiagen) kullanılarak jelden saflaştırıldı. PCR ürünü üretici firmanın talimatlarına göre (NEB GmbH, Germany) T4DNA ligaz kullanılarak vektöre aktarıldı. Oluşturulan plazmid pET14b-BtADH olarak isimlendirildi. Bu yapı N ucunda trombin kesim bölgesi içeren His₆-tag bağlı dehidrogenaz dizi bölgesi bulundurur. Plazmid DNA (pET14b-BtADH) *E. Coli* TOP10 hücre hattına transforme edildi ve sonra High 160 Pure™ plasmid isolation kit (Roche) kullanılarak transformantlardan saflaştırıldı ve DNA’nın her iki iplik dizisi (RefGen,

Ankara, TR) belirlendi. *pET14b-BtADH* plazmid *E. coli* BL21(DE3)'ye transforme edildi ve 100 µg/ml ampisilin içeren LB agar plate'e aktarıldı.

4.2.3. *BtADH*'ın Ekspresyonu ve Saflaştırılması

Protein ekspresyonu Studier besiyerinde küçük değişiklikler yapılarak otoindüksiyon [Studier, 2005] prosedürü ile yapıldı. Özetle LB agardaki tek bir koloni 5 ml'lik küçük kültüre ekildi. Sonra bu kültür 2 litrelik girintili flaskda 100 µg/ml ampisilin içeren 750 ml'lik otoindüksiyon besiyerine indüklenek üzere aktarıldı. Besiyerinin pH'ı 0,1 M Na/K fosfat tamponu ile 7.0'a ayarlandı ve otoklavlandı. Büyütme besiyeri 30 °C'de 180 rpm'de 16 saat inkübasyona tabi tutuldu. Hücre pelleti 8000 x g'de 10 dakika santrifüj edilerek elde edildi ve -20 °C'de kullanılıncaya kadar saklandı. Bir gram ıslak hücre pastası Tampon A (0.5 M NaCl ve 5 mM imidazol içeren 20 mM pH 8.0 Tris-CI tamponu) ile süspanse edildi.

Bu süspansiyona proteaz inhibitörü olan (Sigma-Aldrich) 0.1 mM fenilmetilsülfonil florid (PMSF)'den 100 µl ve 30-50 mg lizozim ilave edilerek 45 dakika buz üzerinde çalkalanarak inkübe edildi. Sonikasyon Soniprep 150 sonicator (Sanyo, Tokyo, Japan) cihazı ile 3-mm çaplı prob kullanılarak (45 saniye aralıklarla 15 saniye parçalama işlemi 6 kez tekrar edildi) gerçekleştirildi. Parçalanmış hücre kısımları 4 °C'de 10,000 x g ve 30 dakika santrifüj yapılarak uzaklaştırıldı ve ekstrakt tampon A ile dengelenmiş 2ml Nickel HiTrapTM (Amersham Biosciences) kolona yüklendi. En az 10 kolon hacim tampon bağlanmayan materyalin uzaklaştırılması için kullanıldı. Gerektiği durumlarda istenmeyen proteinleri uzaklaştırmak için imidazol konsantrasyonu 10 mM'a çıkarıldı.

100-400 mM izmidazol içeren Tampon A histidin bağlı *BtADH*'ın elüsyonu için kullanıldı ve tampon A PD-10 kolon (Amersham Biosciences) kullanılarak tampon B (50 mM sodym fosfat, pH 7,5) ile değiştirildi. Elde edilen elüsyon santrifüjde konsantre edici falkon ile konsantre edildi ve -20 °C'de %50 (v/v) gliserol içinde saklandı.

4.2.4. Protein Tayini

Elde edilen proteinin saflığını belirlemek için Mini-PROTEAN II elektroforez (Bio-Rad) cihazı ile %10 SDS-PAGE analizi yapıldı. Protein bandları Coomassie

brilliant blue R-250 ile boyanarak gözlemlendi. Protein konsantrasyonları sığır serum albumini standart olarak kullanılarak Bradford yöntemi [Bradford, 1976] ile belirlendi. Protein konsantrasyonu protein dizisi temelinde 280 nm’de [Gill and Hippel, 1989] extinction coefficient değeri $15,930 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ kullanılarak hesaplandı.

4.2.5. Protein Kütle Spektrometresi

Rekombinant His₆-BtADH’nin kütle spektrometresi MALDI-TOF MS (MicroFlex instruments, Bruker 211 Daltonics, Billerica, MA) cihazı ile gerçekleştirildi. 50 µl BtADH örneğini (10 mg/ml) çöktürmek için taze hazırlanmış 500 µl %20 trikloroasetikasit (TCA) kullanıldı. Elde edilen pellet 2 kez 250 µl soğuk asetonla yıkandı ve 10,000 x g’de santrifüjlendi. Pellet havada kurutuldu ve formik asit, destile su ve izopropanol (40 µl, hacimsel oran olarak sırasıyla 1:3:2) karışımı ile tekrar çözüldü. Karışım 2x denge hacminde olan % 50 izopropanol içerisinde doygun snapinik ile karıştırıldı. Ve örnek hedef yüzeye uygulandı. MS pozitif iyon moda (20 kV, 100 shots) ve sitokrom c (12,360 Da), miyoglobin (16,952 Da), ripsinojen (23,982 Da), protein A (44,613 Da) ve sığır serum albümini (BSA, 66,527 Da) proteinlerini içeren Bruker’in Protein standart II kiti ile cihaz kalibre edildi. Cihaza yüklenen karışımın kütlesi kalibre edilen protein standartlarına göre belirlendi.

4.2.6. Kofaktör Tercihi

Kofaktör tercihi (NAD^+ veya NADP^+) BtADH’nin model substratı olan 2-propanol kullanılarak gerçekleştirildi. Tris-CI tamponu (50 mM, pH 9.0) içinde 0,5 M 2-propanol 0,371 µM ile 25 °C’de 3 dakika muamele edildi ve çeşitli konsantrasyonlarda (0-1 mM) NAD^+ veya NADP^+ ilave edilerek reaksiyon başlatıldı. Reaksiyonlar spektrofotometrik olarak 340 nm’de 10 dakika takip edildi ve reaksiyon başlangıcındaki 2 dakika başlangıç hızları hesaplandı.

4.2.7. Metal İçeriği ve *BtADH*'ın Aktivitesine Metal İyonlarının Etkileri

Protein örneklerindeki metal iyonlarının analizi 182 kPa arka basınç ve akış hızı 0,55 L/dakika olacak şekilde İnductively Coupled Plasma Optical Emission 236 Spectrometry (ICP-OES) Optima 7000 instrument (Perkin Elmer) cihazı ile gerçekleştirildi. Standart çözeltiler yüksek saflıkta $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, $NiSO_4 \cdot 6H_2O$, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, $ZnCl_2$ ve $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ kullanılarak hazırlandı. ICP-OES örnekleri ıslak parçalama metodu kullanılarak hazırlandı. Özetle protein örnekleri bir cam tüp (Pyrex, 12x104mm) içinde (0,43 mg/ml, 2,5 ml) HNO_3 (%65, 5ml) ve H_2O_2 (%30, 2ml) ile karıştırıldı. Karışım ısıtma bloğunda 65 °C'de 1 saat ısıtıldı. Sonra parçalanmış örneğin hacmi destile su ile 10 ml'ye tamamlandı ve karışım ICP-OES analizi için kullanıldı.

BtADH enzim çözeltisi (1 ml, 0,38 mg/ml) metal iyonlarının uzaklaştırılması için 10 mM EDTA ile 30 °C'de 30 dakika muamele edildi. EDTA ile muamele edilen enzim çözeltisi EDTA'nın uzaklaştırılması için PD10 desalting kolondan (GE Healthcare) geçirildi. *BtADH* aktivitesine farklı katyonların etkileri reaksiyon karışımına 1, 5, 10, 25 ve 50 mM $ZnCl_2$, $MgCl_2$, $MnCl_2$, $CaCl_2$, $NiCl_2$, $FeCl_2$, $FeCl_3$, $CuCl_2$ ve $BaCl_2$ ilavesiyle incelendi. Substrat olarak izopropanol kullanıldı ve aktivite ölçümlerinde standart protokol uygulandı.

4.2.8. Katalitik Özelliklerin Belirlenmesi (pH, Sıcaklık, Kararlılık)

BtADH'ın pH-aktivite profilinin belirlenmesinde hem alkolün ketona (oksidasyon) ve ketonun alkole (redüksiyon) dönüşümünde substrat olarak sırasıyla izopropanol ve aseton kullanıldı. pH profili belirlenmesinde sitrik asit-sodyum sitrat (50 mM, pH 5.0-6.0), sodyum fosfat (50 mM, pH 6.0-9.0), Tris-CI (50 mM, pH 8.0-9.0), glisin-NaOH (50 mM pH 9.0-10.5) ve sodyum fosfat (pK_3 , 50 mM, pH 11.0-12.0) tamponları kullanıldı. Aktivite değerleri her bir tampon için 0,5 M 2-propanol veya aseton, 160 µg/ml *BtADH* ve 1 mM NAD^+ veya NADH kullanılarak 25 °C'de belirlendi. Enzim örneği (10 µl) karışıma ilave edildi ve 3 dakika daha inkübasyona tabi tutuldu. Reaksiyon NAD^+ veya NADH (20 µl) ilavesiyle başlatıldı ve mikropilok okuyucuda (SpectraMax Plus384™, Molecular Devices) 340 nm'de 2

dakikalık reaksiyon süresince absorbans takip edilerek spektrofotometrik olarak gözlemlendi. İzopropanol için NADH oluşumu veya aseton için NADH tüketimi başlangıç hızları, molar extinction coefficient of $6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ kullanılarak hesaplandı.

BtADH'ın sıcaklık profili 20-70 °C sıcaklıklarda aktivite ölçümü yapılarak belirlendi. Genel olarak deneyde 0,5 M 2-propanol içeren tampon çözeltisi (1ml) istenilen sıcaklığa gelinceye kadar UV-vis spektrometrede bekletildi (reaksiyon esnasındaki sıcaklık UV-vis spektrometrede ısı kontrollü su banyosu kullanarak 25 °C sabit tutuldu.). Karışıma 10 µl enzim eklendi ve 3 dakika daha inkübe edildi. Sonra reaksiyon NAD^+ ilavesiyle başlatıldı ve 340 nm'de 2 dakika spektrofotometrik olarak takip edildi. Başlangıç hızları önceden açıklandığı Şekilde NADH oluşumu takip edilerek hesaplandı.

Enzimin sıcaklık kararlılık deneylerinde, enzim (0,3 mg/ml, 200 µl) 20, 40, 50, 60 ve 70 °C'de 1, 5, 10, 20, 40 ve 60 dakika inkübe edildi ve buza alınarak soğutuldu. Bütün durumlarda enzim aktivitesi standart aktivite ölçüm metodu ile belirlendi.

4.2.9. Enzim Hız Ölçümü ve Kararlı Hal Kinetikleri

Alkollerin oksidasyon reaksiyonları için standart aktivite ölçümü 0,5 mM NAD^+ ve 0,1-10 mM substrat içeren 50 mM pH 9,0 Tris-CI tampon çözeltisine (800 µl) 0,371 µM enzim ilave edilerek gerçekleştirildi. Benzer Şekilde keton veya aldehidlerin redüksiyon reaksiyonları 0,1-10 mM substrat, 50 mM pH 7,5 sodyum fosfat içinde 0,5 mM NADH içeren 800 µl karışıma 0,371 µM enzim ilave edilerek gerçekleştirildi. Her iki ölçümde 25 °C'de 10 dakika 340 nm'de spektrofotometrik olarak kofaktörün oluşumu veya azalmasını takip edilmesiyle belirlendi.

Spesifik aktiviteler (U/mg) bir dakikada her bir miligram enzim tarafından ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$) verilen şartlarda bir μmol NADH'in oluşumu veya kullanımı olarak belirlendi. 340 nm'deki absorbsiyon coefficient değeri $\epsilon_{340} = 6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ve katalitik olarak aktif enzimin tüm alt birimlerinin protein kütlesi 38,9 kDa olarak hesaplamalarda kullanıldı. *BtADH*'ın 1-10 karbonlu primer alkollerin oksidasyonu ile ilgili aldehidlere dönüşümünün kararlı hal kinetikleri, 25 °C'de 340 nm'de spektrofotometrik takibi ile belirlendi. Her bir alkol substratının DMSO içeren 50 mM Tris-CI pH 9,0 tamponda 0,1-10 mM stok çözeltilerden 8 seri hazırlandı.

DMSO'nun maksimum konsantrasyonu %4 (v/v) olarak ayarlandı. Sonra absorpsiyon coefficient değeri $\epsilon_{340} = 6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ kullanılarak primer alkollerin oksidasyon hızı belirlenmesinde yukarıda bahsedilen aktivite ölçüm prosedürü uygulandı. *BtADH*'ın varlığındaki oksidasyon hızı kontrol olarak dikkate alınmadı. Başlangıç hızlarının tüm değerleri en az 3 kez tekrarlandı ve kararlı hal parametreleri k_{cat} ve K_M (Origin 7, 320 OriginLab, Northampton, 321 MA) nonlinear regression analiz programı kullanılarak Michaelis-Menten denkleminde her bir konsantrasyonda ortalama değerlerin uyarlanmasıyla belirlendi.

4.3. Deney Sonuçları ve Tartışma

Bakteriyel alkol dehidrogenazlar genellikle kofaktör kullanma özelliklerine göre 3 ana gruba ayrılırlar; (I) NAD(P)^+ , (II) PQQ ve (III) FAD bağımlı. *BtADH* alkollerin ilgili aldehid ve ketonlara karşılıklı dönüşümü için nikotinamid kofaktörü kullanmaktadır. Böylece bu enzime NAD(P)^+ bağımlı enzim denilebilir. Ayrıca NAD(P)^+ bağımlı ADH'lar büyüklüklerine ve metal içeriklerine göre sınıflandırılırlar. Bunlar 1) kısa zincirli ADH'lar (SDR, yaklaşık 250 aminoasit). 2) orta zincirli ADH'lar (MDR, yaklaşık 350 aminoasit), 3) demir le aktive olan ADH'lardır (392-891 aminoasit). Klonladığımız enzim 345 aminoasit büyüklüğünde olduğundan orta zincirli dehidrogenazlar/redüktazlar olarak karakterize edilebilir. Dizi uyumluluğu temelinde *BtADH*'ın filogenetik analizi çinko içeren orta zincirli ADH'lar ile yapıldı. Nisbeten iyi karakterize edilen *BtADH*'ın dizi uyumu ekte gösterildi.

Homoloji tabanlı veritabanı araştırmasında *Bacillus thurgiensis serovar israilensis* organizmasında muhtemel alkol dehidrogenaz geni tespit edildi. Bu gen ürünü PCR tabanında çoğaltıldı ve *pET14b* ekspresyon vektörüne başarıyla klonlandı. N ucunda polihistidin bağlı (His_6) bağlanma bölgesi içeren füzyon protein üretimi, *E. coli* BL21 (DE3) taşıyıcısı kullanılarak başarıyla gerçekleştirildi. İstenen dizideki proteinin biyokimyasal karakterizasyonu protein kütle spektrometresiyle beraber SDS-PAGE analiziyle de doğrulandı.

4.3.1. BtADH Geninin Klonlanması

Potansiyel alkol dehidrogenaz geni, bilinen alkol dehidrogenazların yardımıyla BLAST tarama [Altschul et al., 1997] yaparak *Bacillus thuringiensis serovar israelensis* (ATCC 35646)'nin genom dizisinden belirlendi. Oligonükleotid primerler ADH geninin translasyonel başlangıç bölgesini kapsayan diziden dizayn edildi. pET14b vektörüne direk klonlama için *NdeI* ve *XhoI* restriksiyon kesim bölgeleri ile uyum sağlamayacak şekilde ileri ve geri primerler dizayn edildi. *B. thuringiensis serovar israelensis*'ten elde edilen ADH N ucu modifiye olmaksızın 345 aminoasit rezidüsüne (36,758 Da) ve 5,37 pI değerine sahiptir. Klonlama ürünü proteini daha kolay saflaştırmak için 6 tane histidin ilavesiyle amino asit sayısı 365'e (38,921 Da) pI ise 6,27'e yükseldi.

BtADH genine ait PCR ürününün agaroz jel görüntüsü Şekil 4.1'de görülmektedir. *BtADH* genine ait PCR ürünü beklenildiği gibi 1,038 kbp'lik bir bant vermiştir. *BtADH* geni PCR'la çoğaltıldıktan sonra klonlama vektörü olarak kullanılacak olan pET14b plazmid DNA'sının hazırlanması gerçekleştirildi. pET14b plazmid DNA'sına ait agaroz jel görüntüsü Şekil 4.1'de verilmiştir. pET14b plazmid DNA'sı beklenildiği gibi 4.6 kbp'lik bir bant vermiştir. Klonlama sonrası elde edilen kolonilerden yapılan pET14b-*BtADH* plazmid izolasyonları ve sonrasında bu plazmidlerle birlikte kontrol plazmidi pET14b'nin farklı boyutlarda olduğu Şekil 4.1'de elde edilen agaroz jelde görülmektedir.

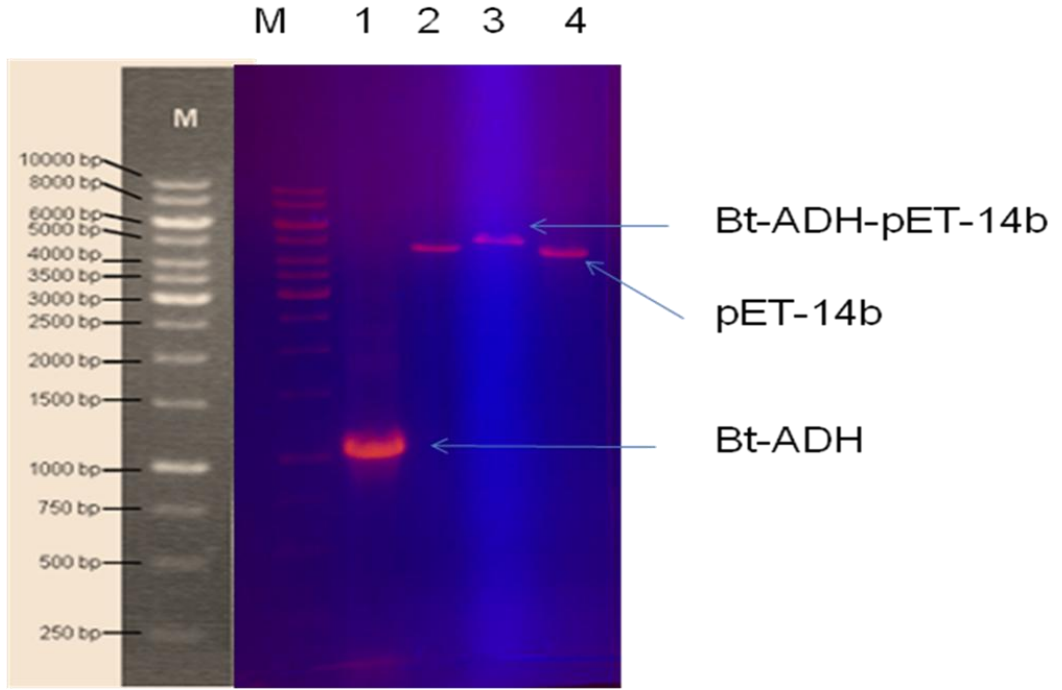
BtADH'ın 345 aminoasitlik protein dizisi aşağıda verilmiştir. Enzimin kaynağı, kodu ve gen ID no'su ise Alcohol dehydrogenase [*Bacillus thuringiensis serovar israelensis* ATCC 35646] 345 aa ZP_00741101.1 GI:75761106 şeklindedir.

4.3.2. BtADH Protein Dizisi

```
MKAVVVNKNKANİEVVEKELRPLRSGEALVDVEYCGVCHTDLHVAN
HDFGNTDGRİLGHEGVGİVTKİADDVNSLKİGDRVSIÄWMFQSCGRCEYCVT
GRETFCREVKNAGYSVDGGMAEQCİVTADYAVKVPEGLDPAQASSİTCAGV
TTYKAİKVSDİKPGQPİVİYGCGGLGNLÄİQYAKNVFGAKVİAVDİNDKDLAL
AKEVGADMTİNPİSQGPADKİVQEELGGAYAÄVVTAVSKVAFNSAVDAVRAC
GKVVAVGLPVETMDLNİPRLVLDGİEVVGS�VGTRKDLEEAFMFGAEGKVVP
VVQTCSLDKVQNVFEEMEQGRİQGRMVİDFKKHNCDCCK
```

(4.2)

BtADH'nın protein dizisi (4.2) de verilmektedir. Daha önce belirlenen DNA dizilerinin veritabanı taramasında çok iyi bilinen *E.coli*'den izole edilen ADH (*EcADH*) ile [Karlsson et al., 2003] %68 uyumluluk ve %81 benzerlik ve *Bacillus stearothermophilus strain LLD-R* (*HtADH*)'dan izole edilen ADH da ise %51 uyumluluk ve %70 benzerlik gözlemlendi.



Şekil 4.1: *BtADH* geni PCR ürünü, pET14b ve *BtADH*- pET14b plazmid DNA restriksiyon enzimleri kesimi agaroz jel (%0.8) görüntüsü.

Şekil 4.1'de (M) Marker, 1) *BtADH* geni PCR ürünü, 2) pET14b *XhoI* tekli restriksiyon kesimi, 3) pET14b-*BtADH* *EcoRV* restriksiyon kesimi, 4) pET14b *XhoI* tekli restriksiyon kesimi.

4.3.3. His₆-*BtADH*'ın Üretilmesi

Ekspresyon plazmidi (*pBtADH*) *E. Coli* BL21 (DE3) hücrelerine transforme edildi. Küçük değişiklikler yapılan otoindüksiyon prosedürü (Studier, 2005)] *E.coli*'nin rekombinant protein üretimi için kullanıldı. Hücre ekstraktı SDS-PAGE ile analiz edildi. Büyüklüğü 38,9 kDa olarak beklenen protein, *pBtADH* plazmidi içeren *E. Coli* BL21 (DE3) ekstraksiyonundan coomassie boyalı jel ile kolaylıkla belirlendi (Şekil 4.1). Sadece pET14b aktarılan aynı soyun negatif kontrolünde rekombinant

protein gözlenmedi. His₆-BtADH metal iyon afinite kromatografi ile saflaştırıldı. Tek aşama saflaştırma protokolünde 1 litre kültürde SDS-PAGE analizine göre %90 saflıkta 80-100 mg protein elde edildi (Şekil 4.2’de 4 ve 5.hatlar)

4.3.4. Protein Kütle Spektrometresi

BtADH monomerinin (tek yüklü) altbirim moleküler kütlesi MALDI-TOF spektrometre ile 39,221 Da olarak bulundu (Şekil 4.3). His₆-BtADH’ın aminoasit dizisinden kütlesi 38,921 Da hesaplandı. BtADH’ın ölçülen ve hesaplanan kütlesi cihazın çözünürlük kalitesi ve deneysel hatalardan kaynaklanan kütle farklılıkları dahilinde kendi aralarında uyumludur.

4.3.5. Kofaktör Tercih

BtADH’ın piridin nükleotid tercihini belirlemek için kararlı hal deneyi 2-propanolün doygun konsantrasyonuyla gerçekleştirildi. Piridin nükleotidin indirgenmesi gözlemlendi ve Şekil 4.4’te görüldüğü gibi nükleotid konsantrasyonuna karşı k_{obs} grafiği çizildi. 2- propanolün NAD bağlı oksidasyonu k_{cat} değeri 282.5 ± 3.4 dak.⁻¹ ve K_M 112 ± 4 µM bulunurken NADP⁺ k_{cat} 3.26 ± 0.58 dak.⁻¹ ve K_M 766 ± 24 µM olarak bulundu. NAD⁺’nin k_{cat}/K_M değeri NADP⁺’nin değerinden yaklaşık 600 kat fazla bulundu.

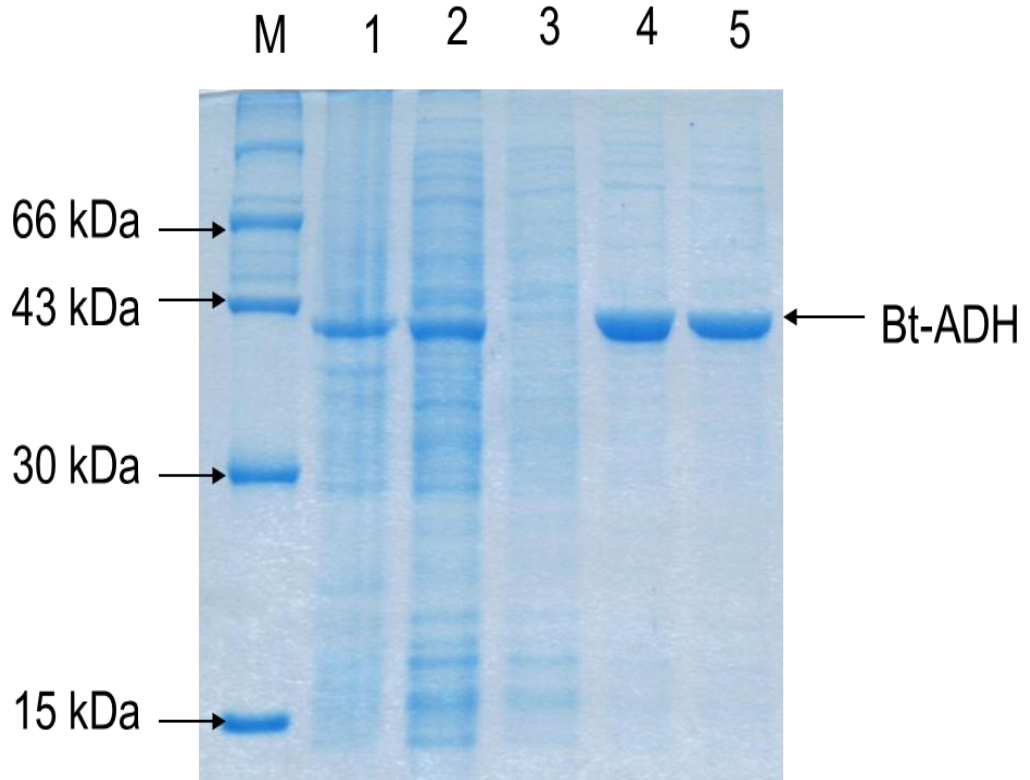
BtADH’ın kofaktör olarak NADP⁺ yerine NAD⁺’yi tercih ettiği görülmektedir. NAD⁺/NADP⁺ için katalitik verimlilik oranı (k_{cat}/K_M) yaklaşık 600 kattır. Bu sonuç *Bacillus stearothermophilus strain LLD-R* (HtADH) [Ceccarelli et al., 2004], *E. coli* K-12 (EcADH) [Karlsson et al., 2003], *Sulfolobus solfataricus* (SsADH) [Esposito et al., 2002], *Horse liver* (HlADH) [Eklund, 1983], *Bemisia argentifolii* (BaKR) [Banfield et al., 2001], *Thermoanaerobacter brockii* (TbADH) [Li et al., 1999b] ve *Clostridium beijerinckii* (CbADH) [Korkhin et al., 1999] organizmalarından izole edilen ADH’larla benzerlik gösteren nükleotid tercihinine sahiptir.

4.3.6. Metal İçeriği ve BtADH Aktivitesine Metal İyonlarının Etkisi

BtADH’ın metal içeriği ve aktiviteye çeşitli metal iyonlarının etkisi belirlendi. Enzimin orta zincirli olması sebebiyle ya demir ya da çinko içereceği

beklenmekteydi. Çünkü orta zincirli ADH'lar demir veya çinko içermektedir. ICP-OES analizi saf enzimin her bir alt birimde 1.78 ± 0.08 mol çinko içerdiğini gösterdi. Böylece enzimin her bir monomeri 2 mol çinko iyonu içermektedir. Ayrıca Şekil 4.5'de ICP-OES ekran görüntüsünde görüldüğü gibi enzim az miktarda (yaklaşık olarak çinkonun %10-15'i kadar) dış kaynaklardan gelen Mg^{+2} , Mn^{+2} ve Fe^{+2} iyonları içermektedir.

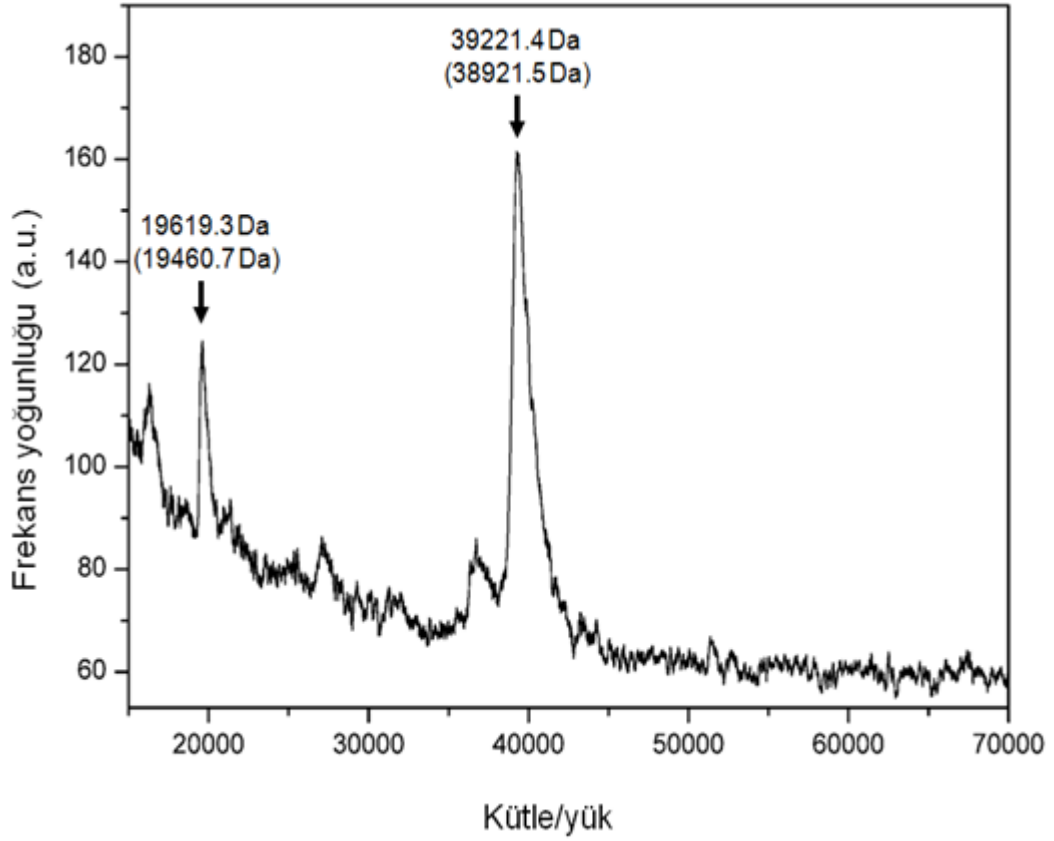
ICP-OES analizinde enzimin her bir monomerinde iki çinko iyonu (katalitik ve yapısal çinko atomları) bulunmasına rağmen küçük oranlarda bile çinko ilavesi (0,1 mM) aktiviteyi azaltmaktadır. Bu gibi bulgular oldukça şaşırtıcı ve tamamen beklenmeyen bir durumdur. Çinko ilavesinin aktiviteyi azalttığı *T. guaymasensis* ADH [Ying, 2011] ve *N. pharaonis* ADH'da [Cao et al., 2008] rapor edilmiştir. Her iki durumda da inaktivasyon için rasyonel bir açıklama bulunmamaktadır. *BtADH*'ın fazla çinko ile etkileşiminin aydınlatılması ileriki çalışmalar için dikkat çekicidir.



Şekil 4.2: *pBtADH* plazmidinin aktarıldığı *E.coli* BL21 (DE3) kültürünün tüm hücre ekstraktının SDS-PAGE analizi.

Şekil 4.2'nin sağındaki ok rekombinant proteinin (*BtADH*) pozisyonunu göstermektedir. M) Moleküler kütle standartları (solda moleküler kütle olarak

belirlenmiştir.); 1) *E.coli* BL21 (DE3)-*pBtADH*'ın çözünür olmayan fraksiyonu; 2) *E.coli* BL21 (DE3)-*pBtADH* hücre ekstraktı; 3) hücre ekstraktının 10 mM imidazol ile yıkama fraksiyonu; 4) ve 5) sırasıyla 100 ve 400 mM imidazol ile Ni-afinite kolondan ayrılan saf His₆-bağlı *BtADH*

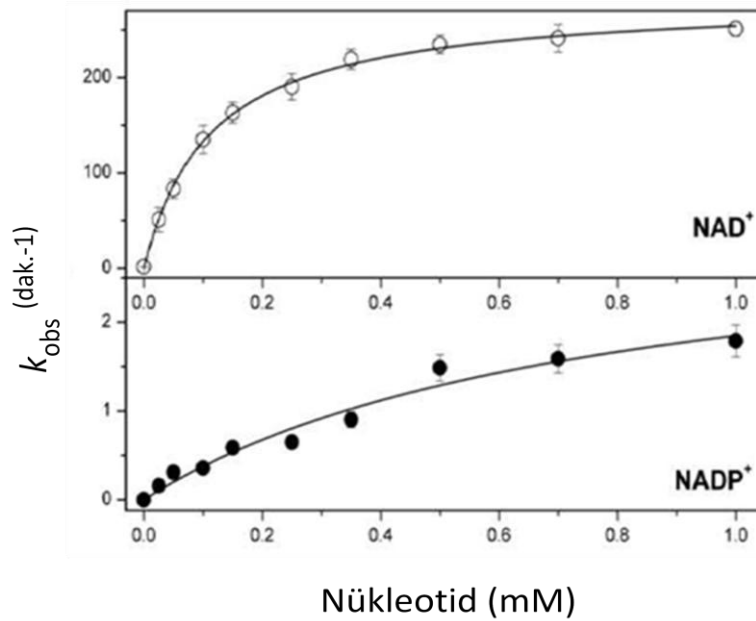


Şekil 4.3: His₆-bağlı *BtADH*'ın MALDI-TOF MS analizi.

Şekil 4.3'de tek (M^+) ve çift (M^{2+}) yüklü monomerler için oklarla belirginleştirmiş tahmini kütleler (parantez içindeki) ve deneysel olarak belirlenen kütleler gösterilmiştir. Tek yükü monomer için kütle 39,221 Da olarak bulundu.

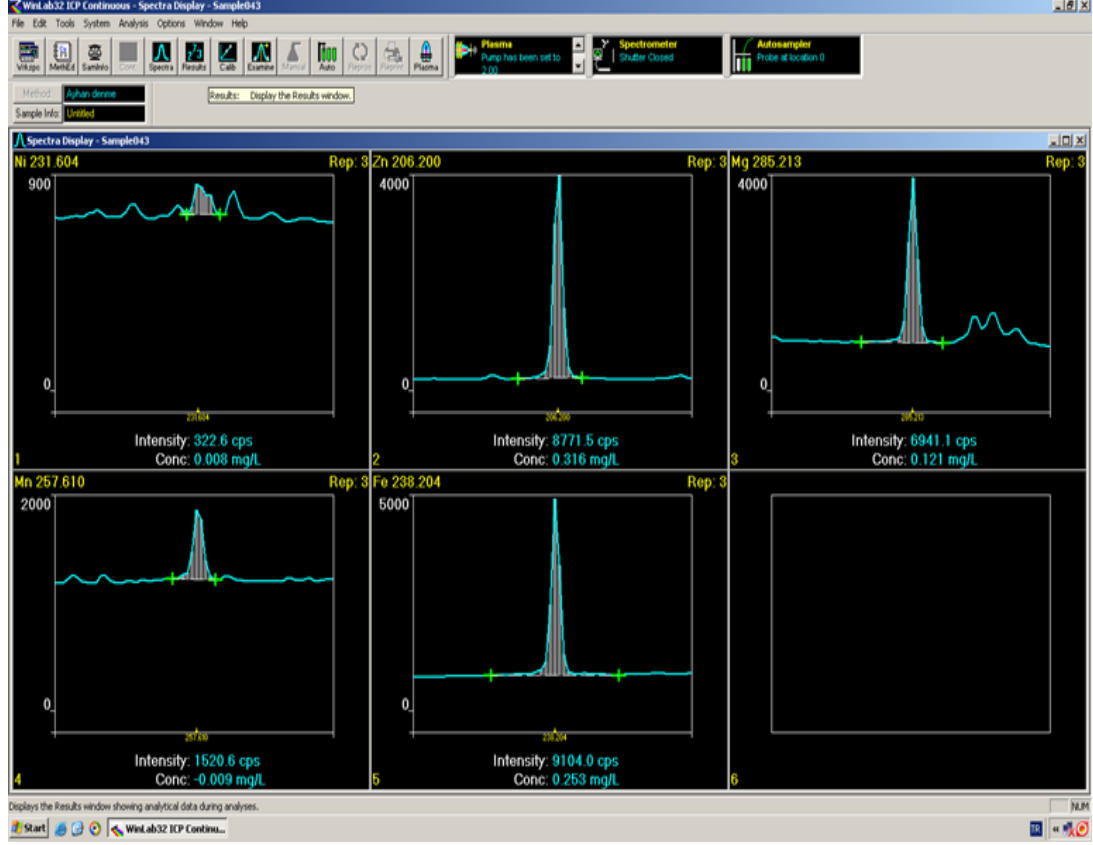
ICP-OES analizi *BtADH*'ın sınıflandırmasında belirleyici olmuştur. Enzimin her bir monomerinde yaklaşık iki çinko (II) iyonunun bulunması *BtADH*'ın kataliz için nikotinamid kofaktörü kullanan çinko içeren MDR alt familyasına ait olduğunu düşündürmektedir. Eğer iki çinko iyonu varsa MDR üyeleri her bir alt birimde 0, 1 veya 2 Zn^{+2} iyonuna sahip olduğu rapor edilmiştir [Hedlund et al., 2010]; bir Zn^{+2} iyonu katalitik bölgede bulunmaktadır (katalitik çinko olarak bilinir), diğeri ise yapıyı kararlı hale getiren loop bölgesine yerleşmiştir (yapısal çinko olarak bilinir). Çinko ve koenzim tercihi arasında bir uyum olduğu rapor edilmiştir [Hedlund et al.,

2010]. İki çinko içeren MDR familyasının çoğu kofaktör olarak NAD^{+} 'ı tercih etmektedir ve genellikle dehidrogenaz olarak aktivite gösterirler. *BtADH*'ın bu korelasyon dışında tutulamayacağı aşıkardır. İki çinko iyonuna sahip olması ve kofaktör olarak NAD^{+} 'ı tercih etmesi *BtADH*'ın diğer MDR familyası enzimleriyle uyumlu olduğunu göstermektedir [Eklund and Ramaswamy, 2008]. Ayrıca NADP bağımlı enzimler substrat olarak sekonder alkoller tercih ederken NAD^{+} spesifik enzimler primer alkoller tercih etmektedirler. Bu sebeple *BtADH*'de primer alkoller tercih etmektedir. Enzim aktivitesine değişik katyonların etkisi incelendi. Metal iyonlarının uzaklaştırılması için *BtADH* enzim çözeltisi 10 mM EDTA ile muamele edildi. Standart ölçüm prosedürü kullanılarak *BtADH* aktivitesine Zn^{+2} , Mn^{+2} , Mg^{+2} , Ni^{+2} ve Ca^{+2} içeren farklı metal katyonlarının etkisi belirlendi. Tablo 4.1'de görüldüğü gibi Mn^{+2} , Mg^{+2} , Ca^{+2} Co^{+2} ve Cu^{+2} gibi iki yüklü katyonlar aktiviteyi dikkate değer bir Şekilde (%80-90) ve Ni^{+2} az bir oranda (%20) azaltırken Ba^{+2} az bir oranda (%20) artırdı. 1 mM Zn^{+2} ilavesinde ciddi bir Şekilde enzim aktivitesinin azalması (%90 inhibisyon) beklenmedik bir durumdu. Zn^{+2} konsantrasyonu 0-1 mM arası 0,1 mM artırılarak incelendiğinde aktivitenin %11-100 oranında azaldığı gözlemlendi. En yüksek aktivite 0,1 mM Zn^{+2} konsantrasyonunda %86 olarak gözlemlendi (%14 inhibisyon). 10 mM Zn^{+2} ilavesiyle enzim tamamen inhibe edildi ve sadece %3'lük bir aktivite ölçüldü.



Şekil 4.4: *BtADH* tarafından katalizlenen 2-propanolün NAD^{+} ve NADP^{+} bağı reaksiyonları için Michaelis-Menten grafiği.

Şekil 4.4’de aktiviteler 25 °C’de pH 9,0’da Tris-Cl tamponunda (50 mM, pH 9.0) doygun substrat konsantrasyonunda (500 mM) ölçüldü. Her bir nokta üç ölçümün ortalamasıdır.



Şekil 4.5: *BtADH*’ın metal içeriğinin ICP-EOS ile belirlenmesi.

Şekil 4.5’de *BtADH*’ın ICP-OES cihazı ile metal içeriği belirlenmesi ekran görüntüsü verilmektedir. Başlangıçtaki kalibrasyon sonrası Ni^{+2} (0,008 mg/L), Zn^{+2} (0,316 mg/L), Mg^{+2} (mg/L), Mn^{+2} (0,009 mg/L) ve Fe^{+2} (0,253 mg/L) olarak tespit edildi.

Tablo 4.1: *BtADH* aktivitesine farklı metal iyonlarının etkisi (EDTA ilaveli)

Metal İyon	1mM	5mM	10mM
–	100	100	100
Zn ⁺²	9,1±2,7	9,4±1,1	0
Mg ⁺²	8,6±1,4	15,3±3,1	94,2±3,7
Ca ⁺²	14±3,7	4,1±0,2	0
Co ⁺²	5,5±2,3	34,2±1	34,9±18
Ni ⁺²	80,7±0,74	10,7±1,2	9,1±2
Ba ⁺²	121,5±8,5	81,7±0,5	91,6±5,30
Cu ⁺²	6,6±0,6	8,6±0,7	22,4±3,3
Mn ⁺²	12,9±4,7	54,7±9,9	216,6±40,5
K ⁺	4,4±2,6	4,8±0,3	13,1±6,6
EDTA	56,8±0,75	41,8±1,94	0

Tablo 4.1'deki aktivite deneyleri *BtADH* aktivitesini tamamen inhibe eden 10 mM EDTA ve metal iyonlarının 30 dakika 25 °C'de muamele edildikten sonra 2-propanol ve NAD⁺ ilavesiyle reaksiyon gerçekleştirildi.

4.3.7. Katalitik Özelliklerin Belirlenmesi

BtADH aktivitesine pH etkisi pH 5-12 aralıklarında aseton ve izopropanol kullanılarak sırasıyla keton indirgenmesi ve alkol yükseltgenmesi yönlerindeki enzimatik aktivitenin takip edilmesiyle incelendi. Oksidasyon reaksiyonları için Şekil 4.6'da görüldüğü gibi pH aktivite profilinde pH 6.0-8.5 arasında yüksek spesifik aktivite gözlenirken pH 7,5 da maksimum aktivite görüldü. Bu pH aralıklarının dışında aktivite ciddi oranda azaldı. İndirgenme reaksiyonları için Şekil 4.7'de görüldüğü gibi pH aktivite profilinde pH 9,0-11,0 arasında aktivite gözlenirken pH 7,0 nin altında ve pH 12,0'nin üstünde aktivite ciddi oranda azaldı. Enzimin pH

kararlılık çalışmasında *BtADH*'ın pH 5.5-11.5 arasında 25 °C'de 20 dakika muamele edildiğinde %80 oksidasyon aktivitesini koruyarak oldukça stabil olduğu gözlemlendi.

BtADH'ın optimum pH ve kararlılık deneylerinde maksimum aktivite için optimum pH 9.0 olarak bulundu. pH 8.5-10.5 arasında %78 oranında maksimum aktivitesini korudu. *BtADH* pH-7.0-11.5 arasında 20 °C'de yüksek pH kararlılığında olduğu gözlemlendi (Şekil 4.8).

BtADH aktivitesine sıcaklık etkisi 5-45 °C aralığında incelendi. Aktivite sıcaklık profili deneysel şartlar altında 2-propanolün oksidasyonu için maksimum aktivitenin 30 °C civarında olduğu gözlemlendi (Şekil 4.9). *BtADH*'ın maksimum aktiviteyi 25 °C'de gösterdi. *BtADH*'ın 15 °C'de bile %61 oranında aktivitesi olduğu görüldü. *BtADH* aktivitesinde sıcaklık optimizasyonu deneyinde optimum sıcaklık 25 °C olarak bulundu. Enzim 20-30 °C arasındaysa %90 ve üzeri aktivite gösterirken 40 °C'nin üzerinde aktivitesini tamamen kaybetmektedir.

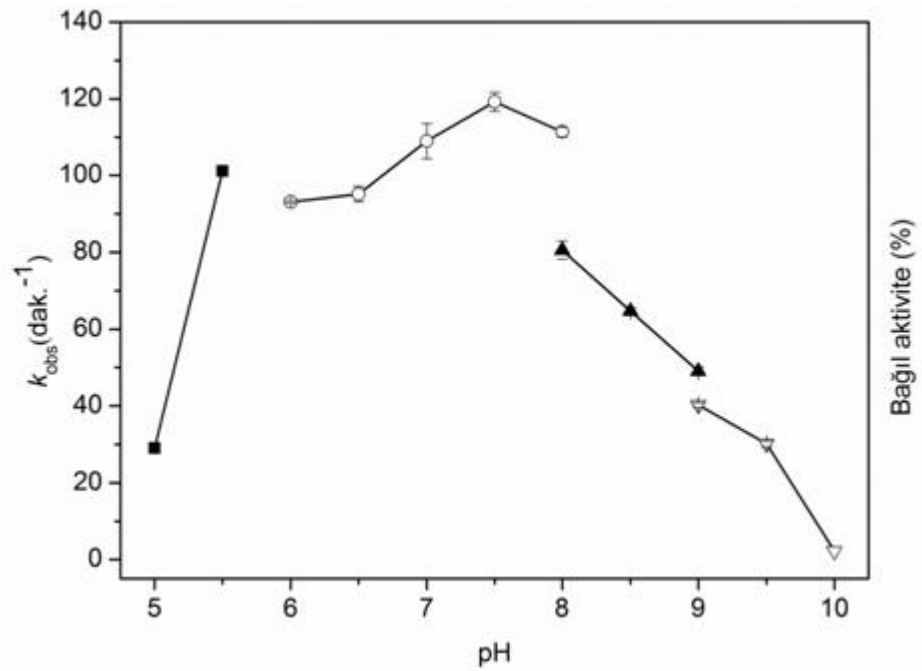
Ek olarak *BtADH*'ın kinetik stabilitesi 50, 60 ve 70 °C'deki yarı ömrü ölçülerek incelendi. Kalan aktivite 25 °C'de standart hız ölçümü ile gerçekleştirildi ve bu da hız sıcaklık muamelesi yapılmayan aktiviteyle oranlandı. *BtADH*'ın yarı ömrü 50 °C için 60 dakika civarında bulundu 60 °C için 10 dakika ve 70 °C için 3 dakika olarak bulundu (Şekil 4.10). Sonuçlar *BtADH*'ın 50 °C sıcaklıkta inkübasyonunda oldukça kararlı olduğunu gösterdi. Enzim çözeltisine 0,1 mM Zn^{2+} ilavesi 40 °C'de 20 dakika inkübasyon için yaklaşık % 8 stabiliteyi artırdığı gözlemlendi.

BtADH sıcaklık kararlılığı deneyinde enzim 20 °C'de 60 dakika inkübasyonda %97 oranında aktivitesini muhafaza etmektedir. 40 °C'de 60 dakika inkübasyonda ise kalan aktivite %62 ler seviyesinde olmaktadır.

Alkol, keton ve aldehidlerin içerisinde olduğu birkaç substratın ya oksidasyon veya redüksiyon enzim hız ölçümü ilginç bulgularla sonuçlanmıştır. *BtADH*'a en yakın ADH olarak bulunan *E.coli*'den elde edilen ADH (*EcADH*) ile ilgili uzun bir süre boyunca sadece dizi, yapı, kofaktör ve metal bağlama gibi birkaç özelliği rapor edilmiştir [Karlsson et al., 2003]. Ama etanol bağımlı furfuralın indirgenmesini içeren [Li et al., 2011] rapor hariç enzimin biyokimyasal karakterizasyonu ile ilgili neredeyse herhangi bir bilgi bulunmamaktadır. Böylece NAD^+ bağılı mezofilik enzimin sıcaklık, pH, metal iyon bağımlılığı ve substrat spesifitesi ile ilgili bilgi biyoteknolojik uygulamalar ve ADH araştırması yapanlar için önemli bir katkı sağlayacaktır.

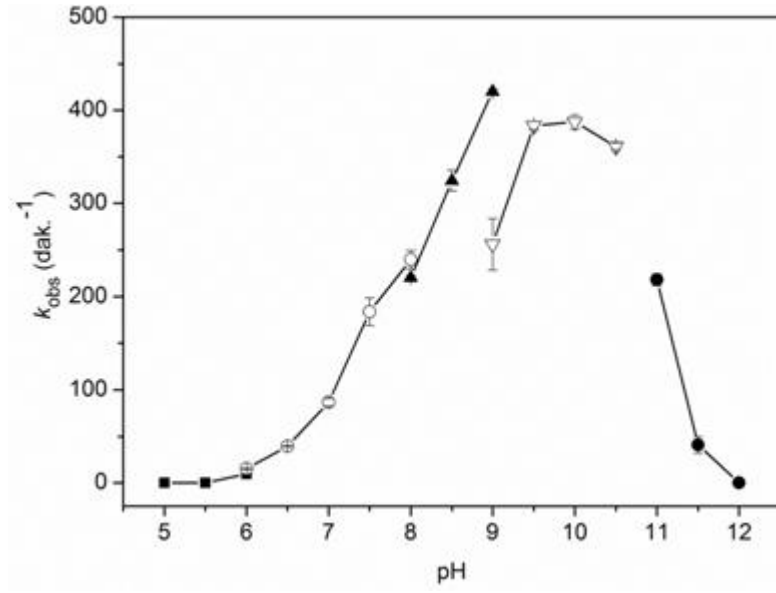
Bu çalışmadaki saf enzim primer alkollerin oksidasyonu için pH 9.0'da, keton redüksiyonu içinde pH 7.5'da maksimum aktiviteyi göstermektedir. Biz pH'ın *BtADH* aktivitesine dönüşümlü veya eğer oluyorsa geri dönüşümsüz etkilerini de inceledik. Enzim pH 6,0 ve 11,0 arasında oldukça kararlıdır. Bu özellikle enzimin ilgili biyoteknolojik uygulamalarda kullanılabileceğini göstermektedir.

BtADH'ın dikkate değer kinetik değerlerle aldehidleri, ketonları ve kısa zincirden orta zincirli primer alkolle kadar geniş substrat spesifitesi olduğu gösterildi. Bu oksidasyon redüksiyon reaksiyon tipleri organik kimya sentezinde sıklıkla kullanılmaktadır.

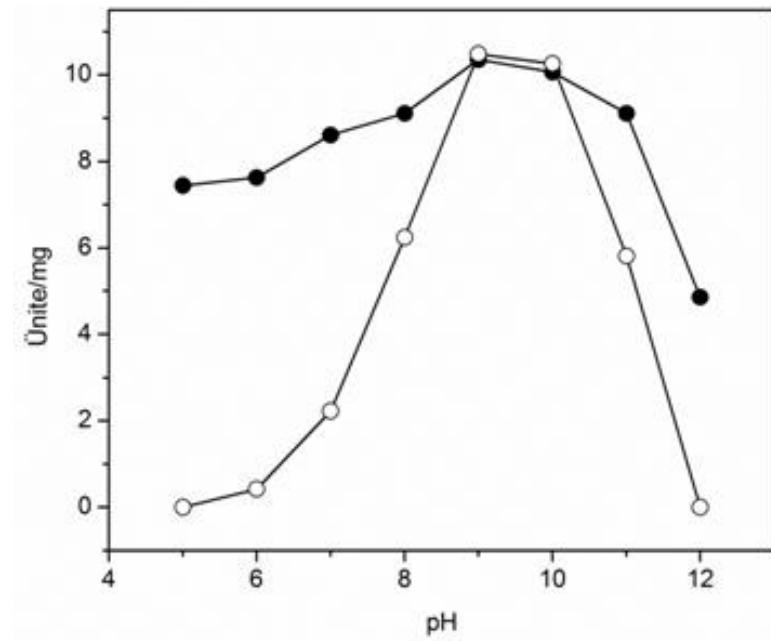


Şekil 4.6: *BtADH*'ın aseton kullanarak oksidasyon reaksiyonlarının Aktivite-pH profili.

Şekil 4.6'da ki profiller sitrik asit-sodyum sitrat (50 mM, pH 5,0-6,0), sodyum fosfat (50 mM, pH 6,0-8,0), Tris-CL (50 mM, pH 8,0-9,0), glisin-NaOH (pH 9,0-10,5) ve sodyum fosfat (pK3, 50 mM, pH 11,0-12,0) tampon çözeltileri kullanılarak belirlendi. Her bir nokta üç ölçümün ortalamasıdır.



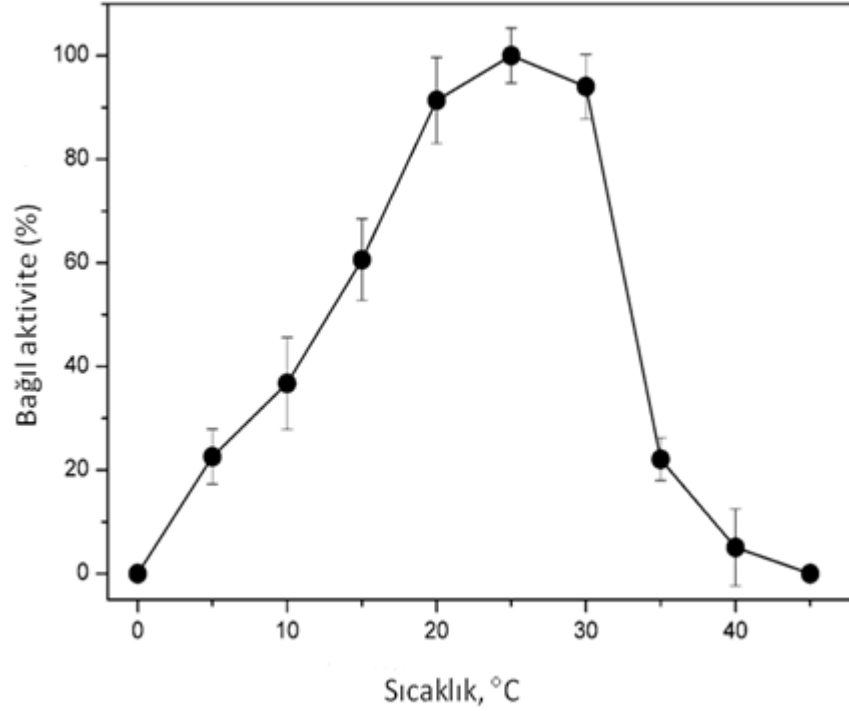
Şekil 4.7: *BtADH*'ın izopropanol kullanarak redüksiyon reaksiyonlarının Aktivite-pH profili.



Şekil 4.8: *BtADH*'ın izopropanol kullanarak redüksiyon reaksiyonlarının pH -kararlılık (●) ve pH -aktivite (○) profili.

Şekil 4.7'de ki profiller sitrik asit-sodyum sitrat (50 mM, pH 5,0-6,0), sodyum fosfat (50 mM, pH 6,0-8,0), Tris-CL (50 mM, pH 8,0-9,0), glisin-NaOH (pH 9,0-10,5) ve sodyum fosfat (pK3, 50 mM, pH 11,0-12,0) tampon çözeltileri kullanılarak belirlendi. Her bir nokta üç ölçümün ortalamasıdır.

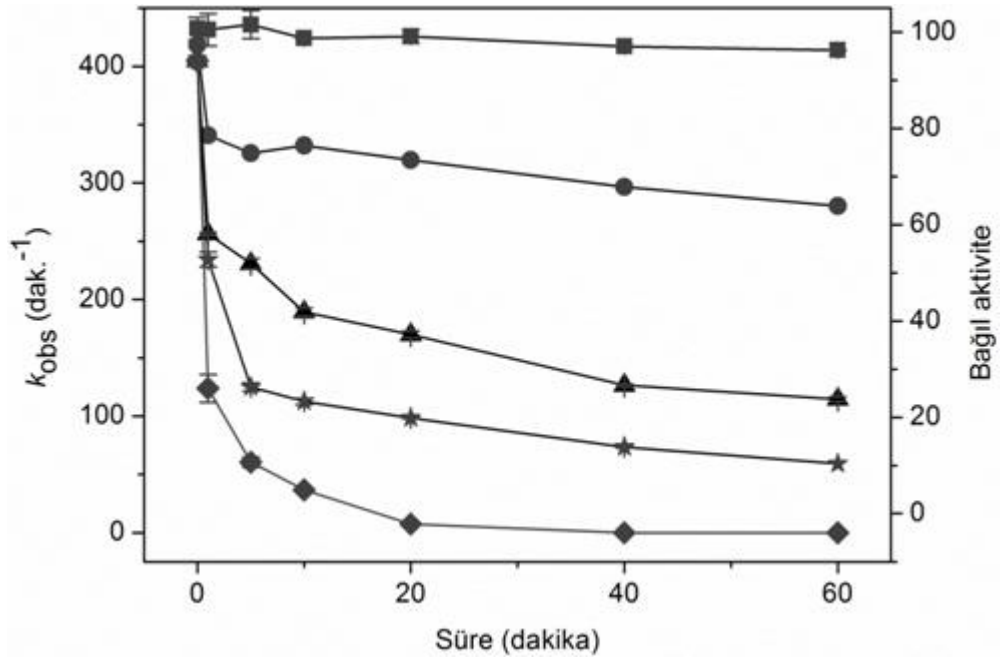
Şekil 4.8’de ki profiller sitrik asit-sodyum sitrat (50 mM, pH 5,0-6,0), sodyum fosfat (50 mM, pH 6,0-8,0), Tris-CL (50 mM, pH 8,0-9,0), glisin-NaOH (pH 9,0-10,5) ve sodyum fosfat (pK3, 50 mM, pH 11,0-12,0) tampon çözeltileri kullanılarak belirlendi. Her bir nokta üç ölçümün ortalamasıdır.



Şekil 4.9: *BtADH*’ın katalizlediği 2-propanol oksidasyonunun aktivite-sıcaklık profili. Her bir nokta üç ölçümün ortalamasıdır.

Şekil 4.9’daki aktiviteler 25 °C’de pH 9,0’da Tris-Cl tamponunda doymuş substrat konsantrasyonunda ölçüldü.

Şekil 4.10’da enzim 50 mM Tris-CL (pH 7,5) içinde 0,3 mg/ml konsantrasyonda olacak şekilde seyreltilti ve 1, 5, 10, 20, 40, ve 60 dakika 20 °C (▲), 40 °C (●), 50 °C (*), 60 °C (◆) ve 70 °C (■) sıcaklıklarda muamele edildi. Kalan aktivite 2-propanol kullanılarak 25 °C’de belirlendi. Kıyaslama yapmak için ön ısı muamelesiz aktivite yüzdesi de belirtildi. Her bir nokta üç ölçümün ortalamasıdır.



Şekil 4.10: *BtADH*'nin sıcaklık kararlılığı

4.3.8. Substrat Spesifitesi

Enzimin substrat spesifitesinin belirlenmesi için alkol, aldehid ve ketonlar kullanılarak *BtADH*'nin aktivite ölçümleri yapıldı. Aktivite görülen substratlar ile kararlı hal kinetiği yapılarak k_{cat} , K_M değerleri hesaplanarak bağıl aktiviteler (%) hesaplandı.

BtADH'nin değişik alkollerin oksidasyonuna ait kinetik değerlerin karşılaştırması Tablo 4.3'de verilmiştir. Tablo 4.3'de görüldüğü gibi *BtADH* 1-dekanole kadar primer alkoller, sekonder alkollerden 2-propanol ve 2-nonanol, diollerden 1,3 propandiol ve 1,6 heksandiol ve halkasal yapıdaki benzil alkol ile de aktivite göstermektedir. *BtADH* substrat olarak gliserol, tersiyer alkollerden tert amilalkol ve tert bütanol, farmosötik ve ticari önemi olan 1-fenil 2-propanol ile yapılan deneylerde aktivite göstermedi.

BtADH'nin değişik aldehid bileşikler redüksiyonu deneyleri yapıldı. Aldehidlerin kinetik değerleri Tablo 4.2'de verilmiştir. Substrat seçiciliği için aldehid bileşiklerinden formaldehid, 4-bromobenzaldehid ve salisil aldehid'de aktivite göstermezken, asetaldehid ve benzaldehid bileşiklerinde aktivite gösterdi.

BtADH'ın değişik ketonlarla redüksiyonu için 18 çeşit substrat denendi. Bunlardan 5 tanesinde aktivite gözlenirken diğer 13 tanesinde aktivite gözlenmedi. Aktivite gözlenen keton bileşikleri Tablo 4.4'de görüldüğü gibi aseton, etil metil keton, metil propil keton, siklopentanon ve 2,3 bütandion'dur. Benzen halkasına sahip değişik substratlar denenmesine rağmen hiçbirinde aktivite gözlenmedi. *BtADH*'ın laboratuvardaki alkol, aldehid ve keton bileşikleriyle toplam 43 substrat denendi ve bunlardan 21 tanesinde aktivite gözlenirken diğerlerinde aktivite gözlenmedi. Bu sonuçlarla klonlanan *BtADH* alkol, aldehid ve keton substratlarıyla aktivite göstermektedir. Aktivite gözlenen substratların kinetik çalışmaları için kararlı hal grafiği çizildi ve bunları kinetik sabitleri olan K_M , k_{cat} ve k_{cat}/K_M değerleri belirlendi. Alkol keton ve aldehid bileşikleri için kinetik değerleri belirlendi. Ayrıca aşığıda aktivite gözlenen tüm substratların kararlı hal Şekilleri tezin sonundaki ekler kısmında verildi.

Tablo 4.2: *BtADH*'ın değişik aldehid redüksiyonu kinetik değerleri.

	Substrat	K_M (mM)	k_{cat} (dak. ⁻¹)	k_{cat}/K_M (mM ⁻¹ dak. ⁻¹)
1	Asetaldehid	6,51 ±0,45	507,23 ±21,45	77,9
2	Benzaldehid	3,97 ±0,69	130,46 ±15,56	32,9
3	Formaldehid	0	0	0
4	4-Bromobenzaldehid	0	0	0
5	Salisilaldehid	0	0	0

Tablo 4.3: *BtADH*'ın değişik alkollerin oksidasyonu kinetik değerleri.

	Substrat	K_M (mM)	k_{cat} (dak. ⁻¹)	k_{cat}/K_M (mM ⁻¹ dak. ⁻¹)
1	Etanol	2,82 ±0,61	35,16 ±3,17	12,5
2	1-Propanol	0,98 ±0,03	29,07 ±2,54	29,4
3	1-Bütanol	1,53 ±0,47	32,44 ±2,32	21,1
4	1-Pentanol	3,55 ±0,8	24,29 ±2,31	6,8
5	1-Hekzanol	3,07 ±0,91	13,86 ±1,71	4,5
6	1-Heptanol	2,69 ±0,81	20,40 ±2,21	7,6
7	1-Oktanol	0,19 ±0,02	11,87 ±0,86	60,7
8	1-Nonanol	0,16 ±0,019	9,47 ±0,36	59,1875
9	1-Dekanol	0,38 ±0,012	10,36 ±0,28	26,97
10	2-Propanol	4,85 ±0,96	59,04 ±5,33	12,2
11	2-Nonanol	0,035 ±0,002	37,78 ±0,40	1065,1
12	1,3 Propandiol	5,47 ±1,4	12,81 ±0,57	2,34
13	1,6 Hekzandiol	3,33 ±0,09	12,18 ±0,67	3,65
14	Benzil alkol	19,41 ±4,36	3,23 ±0,6	0,16
15	Metanol	0	0	0
16	Gliserol	0	0	0
17	Tert-amil alkol	0	0	0
18	Tert- Bütanol	0	0	0
19	1-Fenil 2-propanol	0	0	0

4.3.9. Primer Alkollerin Oksidasyonunun Kinetik Çalışmaları

BtADH'ın primer alkol oksidasyonu standart aktivite ölçüm şartlarında gerçekleştirildi. *BtADH*'ın katalizlediği primer alkollerin (2-10 karbonlu) oksidasyonları Michaelis-Menten kinetiklerine uymaktadır. Ölçülen kinetik çalışmalardaki şartlar altında hiçbir substrat inhibisyonu gözlenmemiştir. Bütün kinetik datalar Tablo 4.2, Tablo 4.3 ve Tablo 4.4'de verilen k_{cat} ve K_M kararlı hal kinetik parametreleri Michaelis-Menten denkleminde lineer olmayan regresyonu ile hesaplandı.

Sınırlı substrat çözünürlüğü sebebiyle 1-dekanolün yüksek substrat konsantrasyonuna ulaşamadı. Rapor edilen aktivite değeri bu substratın 1 mM konsantrasyondaki hesaplanan değeridir. Etanol ve propanol test edilen primer alkoller arasında en yüksek aktiviteyi gösterdi. Substrat çözünürlüğünün sınırlaması sebebiyle 10 karbonlu substratta gözlenen aktivitede dikkate değer orandadır. 1-nonanolün k_{cat} değeri diğer substratlar arasında en düşük olmasına rağmen katalitik verimlilik bakımından 1-propanol ve 1-nonanol'ün en iyi substrat olduğu bulundu.

BtADH primer alkollerin 2-10 karbonu üyelerinde seçicilik yaptığı görülmektedir. *BtADH*'ın dörtlü kompleks yapısında kofaktör NAD^+ ile birlikte aktif merkezde primer alkollerin 2-10 karbonlu olanlarının yer alabildiği görülmektedir. Benzer yorum ters reaksiyonlarda enzimin aktif merkezinde kofaktörün indirgenmiş formu ile beraber 2-10 karbonlu aldehydlerin yer alabileceğini göstermektedir. *BtADH*'ın çok iyi bilinen ADH'lardan olan maya ADH'ı (YADH) [Ganzhorn et al., 1987] ve at karaciğeri ADH'ı (HlADH) [Dalziel, 1962] ile karşılaştırmalı kinetik parameterleri Tablo 4.5'de gösterilmiştir. *BtADH*'ın iyi bilinen ADH'lar ile kinetik değerlerinin karşılaştırılmaları reaksiyonların farklı şartlarda yapılmasından dolayı çok zor olduğunu da belirtmek gerekir. Bununla birlikte maya ADH ve *BtADH* küçük zincirli substratlarda benzer tercihler göstermektedir.

Tablo 4.4: *BtADH*'ın değişik ketonların redüksiyonu kinetik değerleri.

	Substrat	K_M (mM)	k_{cat} (dak. ⁻¹)	k_{cat}/K_M (mM ⁻¹ dak. ⁻¹)
1	Aseton	0,149 ±0,033	346,38 ±43,29	2329,6
2	Etil Metil keton	90,36 ±5,93	280,54 ±13,73	3,1
3	Metil Propil keton	15,06 ±0,88	314,92 ±7,07	20,7
4	Siklopentanon	9,77 ±2,07	11,14 ±0,26	1,1
5	2,3 bütandion	157,63 ±7,93	487,92 ±38,06	3,1
6	Sikloheksanon	0	0	0
7	İzobütil Metil keton	0	0	0
8	Asetofenon	0	0	0
9	2-Metilasetofenon	0	0	0
10	3-Metilasetofenon	0	0	0
11	2-Bromoasetofenon	0	0	0
12	Propiofenon	0	0	0
13	Benzoilaseton	0	0	0
14	4-Etoksiasetofenon	0	0	0

Çok kıymetli uzun zincirli alkol dehidrogenazlar elde edilmesi zor ve bunlarla ilgili çalışmalar çok az bulunmaktadır. Böylece uzun zincirli primer alkollerin oksidasyonun da *BtADH*'ın dikkate değer bir potansiyel olduğu görölmektedir. Örneğin yeni bir çalışmada [Cea et al., 2009] basit alkollere karşı substrat spesifitesi olduğu bilinen at karaciğeri alkol dehidrogenazı (*HLADH*) dokasonal (C22) ve tetraksonal (C24) içeren uzun zincirli alifatik alkollerin oksidasyonunda immobilize formunun kullanıldığı gösterilmektedir. *BtADH* dimetil keton (aseton), etil metil keton, metil propil ketonun ilgili sekonder alkollere dönüşümünü katalizlemektedir. Yüksek enantioselektivite ile ketonların sekonder alkollere dönüşerek önemli ince

kimyasalların ve ara bileşiklerin [Matsuda et al., 2009] elde edildiği asimetrik sentez reaksiyonlarında alkol dehidrogenazlar kullanıldığından bu çok önemli bir özelliktir.

4.3.10. *BtADH* Aktivitesine DMSO Etkisi

BtADH aktivitesine DMSO etkisini incelemek için reaksiyon ortamına %50 oranına kadar DMSO ilave edildi. Şekil 4.11’de görüldüğü gibi %5 konsantrasyon da bile enzim aktivitesi %50 oranında azalmaktadır. Buda bize organik çözücü olarak DMSO’nun kullanımının uygun olmadığını göstermektedir.

4.3.11. *BtADH*’ın Subunitlerinin (Altbirimleri) Belirlenmesi

BtADH’ın subunit içeriklerinin belirlenmesi için native jel deneyi yapıldı. Bu deney için ağırlıkları bilinen özel markerlar kullanıldı. Deney çok tekrarlanmasına rağmen Şekil 4.12’de görüldüğü gibi subunit içerikleri jelden belirlenemedi.

Dizi-yapı-fonksiyon ilişkisini anlamak için *mdr1*’den *mdr29*’a kadar gruplanmakta olan 42 protein bilgisi ile birlikte 2684 dizi içeren MDR lerin bilgi bankası (4) kullanıldı. Databank araştırması *BtADH*’ın *mdr2* alt familyasında olduğunu göstermektedir ‘2’ alt familya numarasını vermektedir. Kısa QSDL (kuarterner yapı belirleyici loop) ve katalitik çinko bu alt familyanın iki genel özelliğidir. Ayrıca henüz deneysel olarak doğrulanmamasına rağmen kısa QSDL’ye sahip olması *BtADH*’ın büyük bir olasılıkla tetramerik yapıda olduğunu belirler [Eklund and Ramaswamy, 2008]. Çoğu MDR’lerin dimer veya tetramer olarak aktif oldukları bilinmektedir. Bunun yanında mevcut kristal yapı [Karlsson et al., 2003] kullanılarak *E.coli* ADH (*EcADH*) ile elde edilen yüksek benzerlik oranı (%68 uyumluluk, %81 benzerlik) *BtADH*’ın büyük bir olasılıkla kuarterner yapı olarak Şekillendiği düşünülmektedir [Eklund and Ramaswamy, 2008].

4.3.12. *BtADH* Aktivitesine İyonik Direnç (Strenght) Etkisinin Belirlenmesi

Şekil 4.13’de ki *BtADH* aktivitesine tamponun iyonik direnç etkisi grafiğinde 50 mM’a kadar konsantrasyonda (~ %25) aktivite artışı sağladığı fakat 50 mM’dan 400 mM’a kadar aktivite değerlerinde bir değişiklik görülmedi. Bu deney sonucuyla

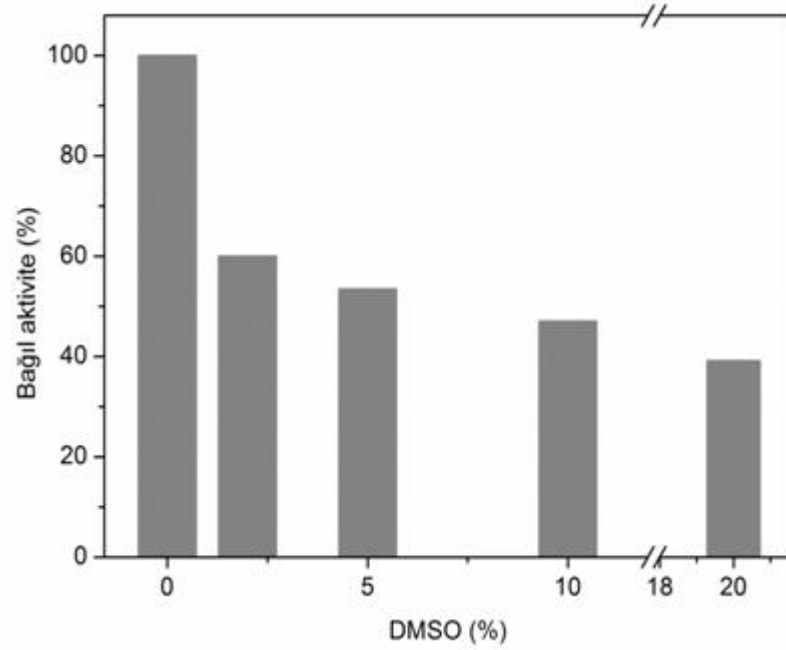
yüksek tuz konsantrasyonu *BtADH* aktivitesi üzerinde olumlu veya olumsuz bir etki göstermediğinden aktivite reaksiyonlarında tampon çözelti konsantrasyonu 50 mM olarak ayarlandı.

BtADH enzimi NADH kullanımı ile asetonun izopropanole dönüşümünü gerçekleştirmektedir. Ters reaksiyonda (izopropanolün asetona dönüşümü) *BtADH*'ın NADH üretimi ile katalizlenmektedir. Çoğu önemli reaksiyonlar için diğer NAD^+ bağlı oksidoredüktazların indirgenmiş kofaktör (NADH) kullanması sebebiyle bu özellik çok kullanışlı olmaktadır. Büyük ölçekli sentez reaksiyonlarında oksidoredüktazların kullanılması için ortamda kofaktör gereksinimi olduğundan *BtADH* izopropanol ile NADH rejenerasyonunu sağlayacak potansiyele sahiptir. Oksidoredüktazlar tarafından katalizlenen reaksiyonda aldehidlerin birincil alkollere ketonlarında ikincil alkollere indirgenmesinde gerekli olan NADH'in basit alkollerin (etanol, izopropanol) oksidasyonu ile elde edilerek rejenerasyon uygulamalarında önemli bir potansiyele sahiptir. Bu reaksiyonda bir mol basit alkol tüketilerek (oksidasyon) katalitik olarak fonksiyon gösteren NADH ve bir mol de yüksek değerlikli bir alkol sentezlenmektedir. Bunun gibi rejenerasyon sistemlerindeki hızlar döngüsel sistemlerde yer almasına gerek olmayan NADH'in ADH tarafından bozulması ve reaksiyonda hız sınırlayıcı aşama olması sebebiyle sıradan yöntemlere göre daha fazla olmaktadır.

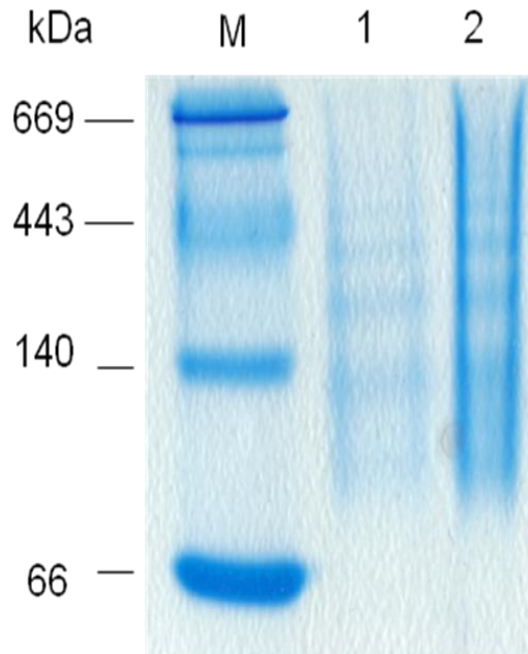
Tablo 4.5: *BtADH*'ın maya ADH (*YADH*) ve at karaciğer ADH (*HLADH*) kinetik değerleri.

	<i>YADH</i> ^a			<i>HLADH</i> ^b			<i>BtADH</i> ^c		
Substratlar	k_{cat} (s ⁻¹)	K_M (mM)	k_{cat}/K_M (s ⁻¹ mM ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_M (mM)	k_{cat}/K_M (s ⁻¹ mM ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_M (mM)	k_{cat}/K_M (s ⁻¹ mM ⁻¹)
Etanol	340	17	20.00	60	ng.		9.73	3.17	3.07
1-Propanol	120	27	4.44				8.89	1.19	7.45
1-Bütanol	51	55	0.93	46	ng		7.97	1.63	4.89
1-Pentanol	29	37	0.78				5.68	3.23	1.75
1-Hekzanol	16	9.5	1.68				3.20	2.15	1.45
2-propanol	nd	nd	nd	0.58	9.0	0.06	0.98	4.85	0.20

Tablo 4.5’de YADH^a [Ying and Ma, 2011]; HlADH^b [Cao et al., 2008]; [Ganzhorn et al., 1987]; BtADH^c (bu çalışma); nd belirlenmedi; ng verilmedi.

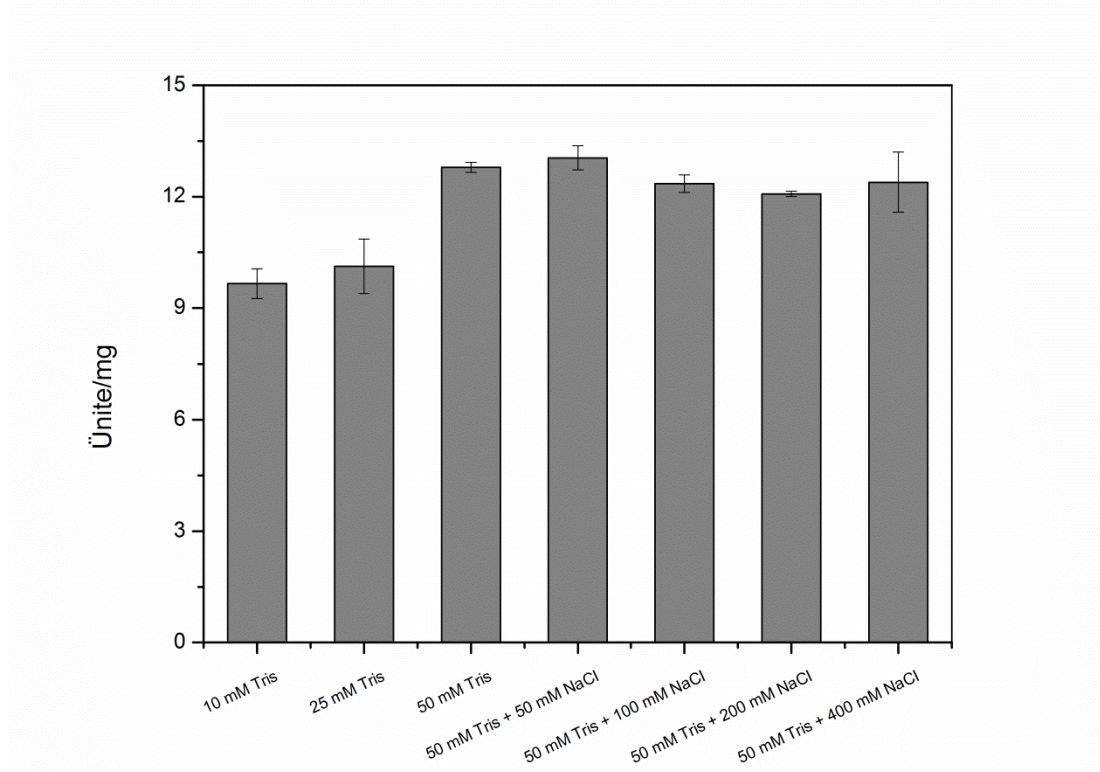


Şekil 4.11: *BtADH*’ın 2-propanol oksidasyonu aktivitesine DMSO’nun etkisi.



Şekil 4.12: *BtADH*’ın Native Gel görüntüsü.

Şekil 4.12’da M) Marker, 1) 10 µg ADH, 2) 20 µg ADH’ın jel görüntüsüdür.



Şekil 4.13: *BtADH*'ın aktivitesine tamponun iyonik direnç etkisi.

İlaveten yardımcı substrat (izopropanol) kullanılması hidrofobik doğada olan substratların çözünürlük problemlerinin aşılmasında yardımcı olabilecek solvent olarak görev yapabilir. Bu noktada bazı alkol dehidrogenazlar yüksek konsantrasyonlu yardımcı substratlarla daha fazla aktivite gösterdiği belirtilmiştir [Stampfer et al., 2002a], [Stampfer et al., 2002b]. Kinetik veriler *BtADH*'ın farklı substrat spesifitesine sahip NAD^+ bağımlı oksidoredüktaz olduğunu göstermektedir. Çeşitli substratlara karşı *BtADH*'ın katalitik aktivitesi incelendiğinde oksidasyon reaksiyonunda metanol haricindeki primer alkoller okside edebildiği görülmektedir. Ayrıca yukarıda bahsedildiği gibi sekonder alkollerle de aktivite göstermektedir. *BtADH*'ın birincil alkollerin kararlı hal kinetik değerleri Tablo 4.3' de gösterilmektedir. İndirgenmiş nikotinamid kofaktörünü oluşturmada aldehid veya ketonların *BtADH* tarafında muhtemel oksidasyonunun fizyolojik fonksiyonlarında olabileceği bu reaksiyonda, kofaktör ve substrat için yüksek ilgi ve oksidasyon reaksiyonları için yüksek katalitik verimliliğe sahip olduğunu kinetik veriler göstermektedir.

Sonuç olarak ADH'lar çeşitli alkol substratlarıyla redoks reaksiyonlarını katalizleyen, insanlarda ve çoğu organizmalarda bulunan değerli enzimlerdir.

Oksidasyon/redüksiyon reaksiyonlarını gerçekleştiren basit kimyasal dönüşümlerde kullanılırlar. Bu çalışmada *Bacillus thuringiensis serovar israelensis* organizmasından yeni bir alkol dehidrogenaz enzimini klonlanıp karakterize edildi. Bu enzim hem mezofilik hem de termofilik [Ceccarelli et al., 2004] ADH'larla yüksek dizi benzerliği göstermektedir. Biyokimyasal olarak karakterize edilen *BtADH* primer alkoller için dikkate değer kinetik değerlere sahiptir. *BtADH*, etkili kofaktör rejenerasyonu çalışmaları ve ince kimyasalların sentezinin olduğu biyoteknolojik uygulamalarda yeni bir enzim olarak sıcaklık stabilite kaynağı, substrat spesifitesi ve kofaktör tercihini içeren enzimlerin dizi-fonksiyon ilişkisi çalışması ile ilgili önemli bir konu sağlamaktadır.

Bacillus thuringiensis serovar israelensis organizmasından klonlanan alkol dehidrogenaz enziminin karakterizasyon çalışmaları tamamlandı. Karakterizasyon çalışmalarında enzimin optimum pH ve sıcaklık şartlarıyla beraber kararlılık deneyleride yapıldı. *BtADH* aktivitesine metal iyonlarının etkisi incelendi. *BtADH*'ın metal içeriği ICP-EOS cihazı ile çinko olarak belirlendi. MALDI-TOF ile kütle spektrometresi alındı. Enzim aktivitesine DMSO etkisi incelendi.

5. *CmFDH* ve *BtADH*'İN İMMOBİLİZASYONU

5.1. GİRİŞ

Enzimlerin endüstriyel uygulamalarda kullanımı son yıllarda giderek artmaktadır. Biyokatalist olarak enzimler kimyasal katalizörlere göre reaksiyonlara spesifik olmaları, daha ılımlı şartlarda çalışabilme ve çevre dostu olma gibi özellikleri sebebiyle tercih edilmektedir. Genellikle enzimler endüstriyel uygulamalarda protein mühendisliği yapılarak modifiye edilme ve reaktör uygulamalarında immobilize edilerek tekrar tekrar kullanılıp reaksiyondan saf ürün elde edilmesinde görev almaktadır. Endüstride reaktör uygulamalarında kofaktör regeneasyonu için format dehidrogenaz enzimi çok kullanılmaktadır [Wandrey, 2004].

NAD^+ spesifik format dehidrogenaz (EC 1.2.1.2, FDH) format anyonunun karbondioksit oksidasyonunu katalizler. FDH, substrat maliyetinin düşük olması, reaksiyon ürününün uçuculuğu sebebiyle kolaylıkla uzaklaştırılması ve biyolojik olarak aktif bileşiklerin sentezinde indirgenmiş koenzimlerin rejenerasyonu için [Hummel and Kula, 1989], [Hummel, 1999] katalist olarak dikkate değer ticari öneme sahiptir.

NAD^+ bağımlı format dehidrogenazlar doğada birçok organizmada bulunmaktadır. FDH enzimleri bakteri (*Pseudomonas sp. 101*, [Tishkov et al., 1993]), maya (*Candida methylica*, [Allen and Holbrook, 1995]), mantar (*Aspergillus nidulans*, [Saleeba et al., 1992]), bitki (*barley*, [Suzuki et al., 1998]), memeli (fare, (GeneBank Accession AA681620)) ve insanlardan (GeneBank Accession N75707) izole edilmiştir. Bütün format dehidrogenazlar benzer kinetik özelliklere sahiptirler. Fakat bakteriyel FDH'lar diğer enzimlere göre daha kararlıdır. Örneğin *Pseudomonas sp. 101* +4 °C'de 12 ay hiçbir aktivite kaybı olmaksızın depolanırken *C. Boidinii*'den elde edilen FDH aynı şartlarda 2 haftada % 50 aktivitesini kaybetmektedir. Bu tezde immobilize ettiğimiz *CmFDH* enzimi maya kökenli olduğundan dolayı bakteriyel kökenli olanlara göre kararlılığı daha az olmaktadır.

FDH'ın aktivite verimliliğinin artırılması, kararlılık ve depolama özelliklerinin artırılması için değişik yöntemler kullanılarak immobilize edilmiştir. FDH immobilizasyonunda kovalent, tutuklama, çapraz bağlama, adsorbsiyon gibi birçok

teknik kullanılmıştır. İmmobilizasyon matriksleri glioksil agaroz [Guisán, 1988], epoksi matriksler [Mateo et al., 2002], [Mateo, Torres et al., 2003] veya adsorbe enzimlerin ve aminlenmiş matrikslerin [López-Gallego et al. 2005], [Lopez-Gallego et al. 2005], [Betancor et al., 2006] çapraz bağlı immobilizasyonu ve çok nokta kovalent bağlama ile gerçekleştirilen yüksek kararlılığa sahip protokollerle yapılmıştır. Bu tezde çalıştığımız *CmFDH* daha önce hiçbir matrikse immobilize edilmemiştir.

Eupergit, endüstriyel biyotransformasyonlar için biyokatalistlerin tonlarca miktarda hazırlandığı popüler bir rezindir [Katchalski-Katzir and Kraemer, 2000]. Geniş oranda farklı enzimlerle uyumluluğu sebebiyle endüstriyel ve akademik araştırmada enzimlerin immobilizasyonu için sıklıkla kullanılmaktadır. Eupergit C birçok araştırmacı tarafından çeşitli enzimlerin immobilizasyonunda taşıyıcı matriks olarak kullanılmakta ve bu matriksin çok kararlı, iyi kimyasal ve mekanik özelliklere (basit immobilizasyon prosedürü, yüksek bağlanma kapasitesi, düşük su alımı, kolon prosedürlerinde yüksek akış hızı gibi) [Kourkoutas et al., 2004], [Tanriseven and Aslan, 2005], [Knežević-Jugović et al., 2011], [Liu et al., 2012] sahip olduğu rapor edilmektedir.

Guisan ve arkadaşları Eupergit C imobilizasyonu için iki aşamalı bir bağlama mekanizması önermişlerdir. Birinci aşamada enzim hidrofobik etkileşimlerle matriks üzerine fiziksel olarak adsorbe olur. Bu, enzimin yüzeyindeki amino ve tiol gruplarının matriksteki oksiran gruplarıyla karşılıklı olarak gelmesini sağlar. İkinci aşamada nükleofilik ataklarla oksiran gruplarıyla etkileşirler. Bu şekilde çok kararlı olan C-N ve C-S bağları oluşur [Guisán, 1988].

Epoksi matriksler (Eupergit C) enzim ve proteinlerin çok noktadan bağlanması için çok uygun olabilirler ve böylece enzimlerin üç boyutlu yapılarını kararlı hale getirebilirler. Çok noktalı kovalent bağlanmanın başarılabilmesi için deney şartlarının kontrolü kritik öneme sahiptir. İlk önce enzim ılımlı şartlarda (pH 7) kovalent olarak immobilize edildikten sonra matriks yüzeyindeki boşta kalan epoksi gruplarının ilave moleküllerle doyurulması gerekmektedir. İkinci aşamada matrikse bağlanan enzimin kovalent etkileşimi artarken boşta kalan gruplarda glisin, etilendiamin gibi moleküllerle doyurulmakta ve serbest epoksi grubu bırakılmamaktadır. İkinci aşama yapılamayan immobilizasyonlarda düşük kararlılık elde edilmiştir [Mateo et al., 2000]. Eupergit C üzerine kovalent immobilizasyonun diğer avantajları sıcaklık ve denatüre edici polar organik deterjanlara karşı kararlılığı artırmasıdır [Cabral, 1993].

Sentetik kimyada 4 enzim sınıfı çok önemlidir. Bunlar oksidoredüktazlar (E.C.1), transferazlar (E.C.2), hidrolazlar (E.C.3) ve liyazlardır (E.C.4). Bunların hepsi Eupergit'e başarılı bir şekilde immobilize edilmiştir [Boller et al., 2002].

İmmobilizasyon çalışmalarında oksiran gruplarının Eupergit C'ye göre 3 kat daha az olması sebebiyle Eupergit C 250 L tercih edildi.

Format dehidrogenaz (FDH) ve Alkol dehidrogenaz (ADH) endüstriyel uygulamalarda (kofaktör rejenerasyonu, ikili enzim sistemleri, üretimi zor kimyasal madde sentezi ve farmakolojik ilaç sanayi için önemli ilaç öncü madde sentezi gibi) kullanılan önemli enzimlerdendir. Enzimler endüstriyel kullanım ve depolama kararlılığının, daha geniş bir pH ve sıcaklık kullanımı ve kullanım ömrünün artırılması için değişik matrilkslere immobilize edilmektedirler. Alkol dehidrogenaz ve format dehidrogenaz bu güne kadar birçok matrikse immobilize edilmiş ve değişik uygulamalarda kullanılmıştır. Bu tez çalışmasında matrilks olarak operasyonel kararlılığı ve reaktör uygulamalarındaki avantajlarından dolayı Eupergit C 250 L matrilksi kullanıldı.

Keinan ve arkadaşlarının 1986'da yaptıkları bir çalışmada [Keinan, 1986], *Thermoanaerobium brockii*'den elde edilen TbADH'ın Eupergit C üzerine immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada TbADH'ın immobilizasyon aktivite verimi %15 olarak bulunmuştur ve ortamda birinci substrat olarak 2-pentanon ve kofaktör rejenerasyonu için ikinci substrat olarak 2-propanol kullanılmıştır. Kurulan reaktör sisteminde 3 hafta boyunca yapılan reaksiyon sonunda enzim karlılığını devam ettirmiştir. Kararlılık deneyinden başka ayrıntılı olarak immobilizasyon optimizasyonu yapılmamıştır.

Farklı organizmalardan elde edilen FDH ve ADH'ın Eupergit üzerine immobilizasyonu çalışmaları literatürde azda olsa bulunmaktadır [Zambianchi, 2002], [Hollmann, 2005]. Bu çalışmalar genellikle ikili enzim sistemi veya ikili substrat sistemi uygulamalarında ADH ve FDH'ın Eupergit C üzerine immobilizasyonu şeklindedir. Bu çalışmalarda immobilizasyon aktivite verimi ve kararlılık gibi özellikler çalışılmıştır. Bu tez çalışmasında kullanılan CmFDH ve BtADH'ın Eupergit C 250 L üzerine immobilizasyonu ve optimizasyonu literatürde bulunmamaktadır.

CmFDH'ın ve BtADH'ın Eupergit C 250 L üzerine immobilizasyonunun kapsamlı karakterizasyonu ilk kez bu çalışmada yapıldı. CmFDH'ın Eupergit C 250 L üzerine immobilizasyonunda %72 immobilizasyon verimi %37,5 aktivite verimi

ve *BtADH* içinde %54,2 immobilizasyon verimi %43,5 aktivite verimi elde edilmiştir. Bu çalışmada *CmFDH* ve *BtADH*'ın Eupergit C 250 L üzerine immobilizasyon parametreleri (sıcaklık, pH, iyonik güç, enzim miktarı ve immobilizasyon süresi ilk kez optimize edildi. Kinetik sabitler (K_M , k_{cat} , k_{cat}/K_M), sıcaklık ve depolama kararlılıkları belirlendi ve sonuçlar serbest enzim ile karşılaştırıldı. İmmobilize enzimin operasyonel kararlılığı tekrarlanan aktivite deneyi ile belirlendi.

5.2. Materyal

Lizozim Fluka'dan; sodyum fosfat monobazik, sodyum fosfat dibazik, Tris-HCl Sigma-Aldrich'den; sodyum format, Fiedel-de Haen'den; PMSF (Fenilmetansülfonil florid), APS Sigmadan, Eupergit C 250 L Degussa'dan, Ampisilin M.Nevzat'dan, NAD^+ , SDS, TEMED, $CaCl_2$, kalsiyum asetat, potasyum hidrojen fosfat ve glisin Merck'den alındı.

5.3. Metod

5.3.1. Enzimin Eupergit C 250 L Üzerine İmmobilizasyonu

5.3.1.1. Enzim İmmobilizasyonu

İmmobilizasyon 0,3 M süktroz içeren sodyum fosfat tampon çözeltisi içinde (1ml, 0,6 M, pH 8.0) 25 °C, 500 rpm'de 75 dakika enzim (*CmFDH* (0,1 mg, 739,64 mU) veya *BtADH* (769,23 mU)) ile Eupergit C 250 L (10 mg) matriksinin etkileşimi ile gerçekleştirildi. İmmobilize enzim sodyum fosfat tampon çözeltisi (10ml, 0,05 M, pH 7,0) ve destile su (10 ml) ile yıkandı ve cam filtre ile vakum altında süzöldü. İmmobilize enzim buzdolabında 4 °C'de kullanılıncaya kadar saklandı.

5.3.1.2. İmmobilizasyon Optimizasyonu

İmmobilizasyonun optimizasyonu, şartların (pH 6,0-9,0, tampon çözeltisi konsantrasyonu 0,05-0,80 M, immobilizasyon sıcaklığı 4-37 °C, immobilizasyon

süresi (0,25-24 saat ve sükröz konsantrasyonunun (0,1-1,0 M) tek tek değiştirilmesiyle belirlendi.

5.3.1.3. Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

- *CmFDH Aktivitesinin Belirlenmesi*

Isı kontrollü çalkalayıcı inkübatörde sodyum fosfat tampon çözeltisi (0,05 M, pH 7,0) içinde sodyum format (0,2 M), serbest (0,1 mg) veya immobilize *CmFDH* ile 37 °C’de, 500 rpm çalkalamada, 70 saniye muamele edildi. İmmobilize reaksiyon karışımı hemen mikro santrifüjde 13000 rpm’de 20 saniye santrifüj edildi ve süpernatandan 200 µl alınarak mikropate reader’da 340 nm’deki absorbansı belirlendi. Üretilen NADH konsantrasyonu 340 nm’deki doğrusal artış bölgesindeki absorbans farkı ile $C = \text{Abs} / \epsilon \cdot l$ formülü kullanılarak bulundu. Formülde C absorbe edici maddenin konsantrasyonu, l ışığın çözeltide izlediği mesafe (path lenght), ϵ verilen substratın belli bir dalga boyunda molar absorblama sabiti ve Abs absorbans olarak ifade edilmektedir.

- *BtADH Aktivitesinin Belirlenmesi*

Tris-Cl tampon çözeltisi (0,05 M, pH 9,0) içinde 2-propanol (0,5 M), serbest (0,1 mg) ve immobilize *BtADH* ile 25 °C’de, 500 rpm çalkalamada, 70 saniye sürede ısı kontrollü çalkalayıcı inkübatörde reaksiyonu ile gerçekleştirildi. İmmobilize reaksiyon karışımı hemen mikro santrifüjde 13000 rpm’de 20 saniye santrifüj edildi ve süpernatandan 200 µl alınarak mikropate reader’da 340 nm’deki absorbansı belirlendi. Üretilen NADH miktarı 340 nm’deki doğrusal artış bölgesindeki absorbans farkı ile $C = \text{Abs} / \epsilon \cdot L$ formülü kullanılarak bulundu.

5.3.1.4. Protein Miktarının Belirlenmesi

Protein miktarı Bradford [Bradford, 1976] yöntemiyle belirlendi. Ölçümlerde 200 µl bradford çözeltisi ve 10 µl numune kullanıldı ve 595 nm de absorbansına bakıldı. Standart grafiği için BSA (Bovine serum albumin) (0,05-0,75 mg/ml) kullanıldı.

5.3.1.5. Optimum Sıcaklık, pH ve Kinetik Sabitlerinin Belirlenmesi

- *CmFDH*

Optimum sıcaklık, pH, K_M ve V_{max} aktivite ölçüm şartlarının tek tek değiştirilmesiyle bulundu (pH 6,0-10,0; sıcaklık 20–70 °C; ve sodyum format konsantrasyonu 25 – 200 mM). Tampon çözeltileri (pH 6,0-8,0) sodyum fosfat, (pH 8,0-9,0) Tris-Cl, (pH 9,5-10,0) Glisin kullanıldı. Kinetik parametreler için reaksiyon 70 saniye süreyle gerçekleştirildi. K_M ve V_{max} değerleri Michaelis-Menten eşitliği ile hesaplandı.

- *BtADH*

Optimum sıcaklık, pH, K_M ve V_{max} aktivite ölçüm şartlarını tek tek değiştirilmesiyle bulundu (pH 5,5-12,0; sıcaklık 5–45 °C; ve 2-propanol konsantrasyonu 25 – 200 mM). Tampon çözeltileri (pH 5,5) sodyum asetat, (pH 6,0-8,0) sodyum fosfat, (pH 8,0-9,0) Tris-Cl, (pH 9,5-10,0) Glisin, (pH 10,5-12,0) disodyum fosfat kullanıldı. Kinetik parametreler için reaksiyon 70 saniye süreyle gerçekleştirildi. K_M ve V_{max} değerleri Michaelis-Menten eşitliği ile hesaplandı.

5.3.1.6. pH Kararlılığının Belirlenmesi

Serbest (*CmFDH* (0,1 mg, 739,64 mU) veya *BtADH* (769,23 mU) veya immobilize enzim çeşitli tampon çözeltilerinde (pH 5,5-12,0), 25 °C’de 20 dakika muamele edildi ve kalan aktivite yukarıda açıklanan standart aktivite ölçüm metodu kullanılarak belirlendi.

5.3.1.7. Sıcaklık Kararlılığının Belirlenmesi

Serbest (*CmFDH* (0,1 mg, 739,64 mU) veya *BtADH* (769,23 mU) veya immobilize enzim *CmFDH* için sodyum fosfat (pH 7,0) ve *BtADH* için tris-Cl (pH 9,0) tampon çözeltilerinde, *CmFDH* için 20-70 °C’de ve *BtADH* için 5-45 °C’de 20 dakika muamele edildi ve kalan aktivite yukarıda açıklanan standart aktivite ölçüm metodu kullanılarak belirlendi.

5.3.1.8. Tekrar Kullanım Sayısı ve Saklama Kararlılığı

Tekrar kullanım sayısı aktivite belirleme metodu kullanılarak 13 tekrarlı deney gerçekleştirilerek belirlendi. Saklama kararlılığı her üç günde bir, 30 gün boyunca aktivitenin standart metot ile ölçümü ile gerçekleştirildi. İmmobilize enzim kullanılmadığı sürede +4 °C’de saklandı.

5.3.1.9. İmmobilize Enzimin Glisin ile Muamelesi

İmmobilizasyon 5.3.1.1 deki metodla gerçekleştirildikten sonra glisin (0,038 g) ilave edilerek değişik sürelerde (15, 30, 45, 60, 75 dakika) muamele edildi. İmmobilizasyon sonrası yıkama ve süzme işlemlerine tabi tutulduktan sonra aktivite tayin edildi.

5.4. Sonuçlar ve Tartışma

5.4.1. *Cm*FDH in Eupergit C 250 L Üzerine İmmobilizasyonu

5.4.1.1. İmmobilizasyon Optimizasyonu

- *Tampon Çözeltisi pH’sı*

Eupergit C 250 L matriksi çok geniş pH (2- 12) aralığında üzerindeki epoksi gruplarının enzim üzerindeki amino, karboksil veya sülfidril gruplarıyla etkileşime girmektedir. Epoksi grupları asidik ortamlarda karboksil, alkali ortamlarda ise amino ve sülfidril gruplarıyla reaksiyon vermektedir [Novic, 2005]. Yine enzimler kendi optimum pH’larında en iyi immobilize olmaktadır. *Cm*FDH’in Eupergit C 250 L üzerine immobilizasyonunda uygun tampon çözelti pH’sını tespit etmek için pH 6-9 arasında farklı tamponlar kullanılarak immobilizasyon gerçekleştirildi. Tablo 5.1’de görüldüğü gibi enzimin kendi optimum pH’sında (pH 8,0) en iyi immobilize olduğu görülmektedir. *Cm*FDH Eupergit C 250 L matriksine pH 8,0’de %72 immobilizasyon ve %35,1 aktivite verimi ile immobilize edildi.

İmmobilizasyon optimizasyonu deneylerinde immobilize enzim aktivitesi ile süzüntüdeki aktivite değerlerinin toplamı başlangıçtaki kullanılan *Cm*FDH’in (739,64 mU) aktivite değerlerinden daha az görülmektedir. Bunun immobilizasyon süresince

tampon çözeltisi tuz konsantrasyonu, çözelti pH'sı ve immobilizasyon süresinin enzim üzerindeki olumsuz etkisi sebebiyle aktivite kaybından kaynaklandığı düşünülmektedir. pH 8,0'de süzüntüdeki toplam aktivite 107,1 mU olarak beklenenden daha yüksek bulundu. Bu değerin yüksek olması deneysel ölçüm hatalarından kaynaklanmaktadır.

- *Tampon Çözeltisi Konsantrasyonu*

Oksiran grupları bulunan matrikslere immobilizasyon, immobilizasyon tamponunun iyonik gücünden kuvvetli bir şekilde etkilenmektedir. Immobilizasyon tamponunun yüksek iyonik gücü Eupergit ve enzim arasında hidrofobik etkileşimleri artırır ve bu da immobilizasyon sürecini hızlandırır [López et al., 2010]. Knezevic ve arkadaşlarının yaptığı [Knezevic et al., 2006] çalışmada geleneksel metodlarla [Martı'n, 2003] Eupergit matrikslerine kovalent immobilizasyonu artırmak için yüksek iyonik güce sahip tampon çözeltisi kullanılmasına rağmen bazı enzimler bu şartlarda aktif olamamıştır.

500 mM pH 8,5 tamponunda gerçekleştirilen immobilizasyon aynı tamponun 100 mM'ına kıyasla immobilizasyon verimi %12,1 azalmıştır. 1000 mM tampondaki immobilizasyonda yüksek immobilizasyon verimine ulaşılmasına rağmen muhtemelen enzimin yapı ve konformasyonunun bozulması sebebiyle immobilize enzimin katalitik özellikleri azalmıştır. *CmFDH*'ın Eupergit C 250 L üzerine immobilizasyonunda en iyi bağlanma ve aktivite gösteren sodyum fosfat tampon çözeltisi konsantrasyonunu tespit etmek için 0,05-0,8 M arasında farklı konsantrasyonlar kullanılarak immobilizasyon gerçekleştirildi.

Tablo 5.1: Immobilizasyon verimliliğine tampon çözeltisi pH'sının etkisi.

pH	İmmobilizasyon verimi (%)	Aktivite verimi (%)	İmmobilize enzim aktivitesi (mU)	Süzüntüdeki toplam aktivite (mU)
6,0	71,0	4,3	22,3	114,5
6,5	70,0	12,3	63,6	121,9
7,0	73,0	19,7	106,5	99,7
7,5	75,0	24,3	134,6	84,9
8,0	72,0	35,1	199,7	107,1
8,5	78,0	27,9	161,2	62,7
9,0	79,0	21,3	124,3	55,3

Tablo 5.1'deki immobilizasyon şartları: *CmFDH* (739,64 mU) ve Eupergit C 250 L (10 mg) sodyum fosfat tampon çözeltisinde (1 ml, 0,6 M), değişik pH'larda

(6,0-9,0) 25 °C' de, 500 rpm'de, 75 dakika muamele edildi. Daha sonra reaksiyon karışımına glisin (0,038 g) eklenerek 37 °C'de, 500 rpm'de, 75 dakika muamele edildi.

Tablo 5.2'de görüldüğü gibi süzüntüdeki aktivitenin en düşük olduğu tampon çözeltisi konsantrasyonu 0,6 M'dır. 0,05 M konsantrasyondaki immobilizasyon ile aynı şartlardaki 0,6 M'da ki immobilizasyon aktivite verimi %9,4'den %36,7'ye yükseldi.

Bu da yaklaşık 5 kat immobilizasyon aktivite veriminin artması anlamına gelmektedir. *CmFDH*'ın Eupergit C 250 L üzerine immobilizasyonunda en uygun tampon konsantrasyonu 0,6 M bulundu.

Süzüntüde kalan enzim aktivitesi tüm tampon çözelti konsantrasyonlarında beklenenin altında bir değerde çıkmıştır. Bunun immobilizasyon süresince çözeltide kalan enzimlerin immobilizasyon ortamından kaynaklanan sebeplerle aktivite verimleri azalmıştır.

- *Sıcaklık*

CmFDH'ın Eupergit C 250 L üzerine immobilizasyonunda en iyi bağlanma ve aktivite gösteren sodyum fosfat tampon çözeltisi (0,6 M, pH 8.0) şartlarında uygun sıcaklığı tespit etmek için 4 farklı sıcaklıkta (4, 15, 25, 37 °C) immobilizasyon gerçekleştirildi. Tablo 5.3'de görüldüğü gibi *CmFDH*'ın Eupergit C 250 L üzerine immobilizasyonunda en uygun immobilizasyon sıcaklığı 25 °C olarak bulundu. *CmFDH*'ın immobilizasyon aktivite verimi 4 °C'de %25,4 iken 25 °C'de %34,5'a yükseldi.

Süzüntüde kalan enzim aktivitesi tüm sıcaklık değerlerinde daha düşük değerlerdedir. Enzimlerin yapısındaki hidrojen bağlarının sıcaklık etkisiyle denatüre olması ile üç boyutlu yapının değişerek aktif merkezin konumu değişmekte ve aktivite verimi düşmektedir. Süzüntüde serbest kalan enzimin kararlılığının immobilize enzime göre azalmasıyla süzüntüdeki toplam aktivite değerleri azalmaktadır.

Tablo 5.2: İmmobilizasyon verimliliğine tampon çözeltisi konsantrasyonunun etkisi.

Konsantrasyon (M)	İmmobilizasyon verimi (%)	Aktivite verimi (%)	İmmobilize enzim aktivitesi (mU)	Süzüntüdeki toplam aktivite (mU)
0,05	54,0	9,4	37,4	240,2
0,10	62,0	10,2	46,6	181,1
0,20	64,0	22,2	105,0	166,3
0,30	65,0	27,7	133,1	158,9
0,40	67,0	31,9	158,3	144,1
0,60	72,0	36,7	195,3	107,1
0,80	75,0	21,9	121,3	84,9

Tablo 5.2’de ki immobilizasyon şartları: *CmFDH* (739,64 mU) ve Eupergit C 250 L (10 mg) ile farklı konsantrasyonlarda (50-800 mM) sodyum fosfat tampon çözeltisinde (1 ml, pH 8.0), 25 °C’ de, 500 rpm’de, 75 dakika muamele edildi. Daha sonra reaksiyon karışımına glisin (0,038 g) eklenerek 37 °C’de, 500 rpm’de, 75 dakika muamele edildi.

Tablo 5.3: Sıcaklığın immobilizasyon verimliliğine etkisi.

Sıcaklık (°C)	İmmobilizasyon verimi (%)	Aktivite verimi (%)	İmmobilize enzim aktivitesi (mU)	Süzüntüdeki toplam aktivite (mU)
4	48,0	25,4	90,2	284,6
15	62,0	22,6	103,6	181,1
25	72,0	37,5	199,7	107,1
37	65,0	12,9	62,1	88,9

Tablo 5.3’de ki immobilizasyon şartları: *CmFDH* (739,64 mU) ve Eupergit C 250 L (10 mg) 0,6 M sodyum fosfat tampon çözeltisinde (1 ml, pH 8.0), ile farklı sıcaklıklarda (4, 15, 25, 37, 25 °C’ de), 500 rpm’de, 75 dakika muamele edildi. Daha sonra reaksiyon karışımına glisin (0,038 g) eklenerek 37 °C’de, 500 rpm’de, 75 dakika muamele edildi.

- *İmmobilizasyon Süresi*

CmFDH immobilizasyon şartlarının optimizasyonunda daha önceden optimize edilen şartlarda uygun immobilizasyon süresini belirlemek için 0,25-24 saat aralıklarında 7 farklı inkübasyon süresi denendi. Tablo 5.4’te görüldüğü gibi süre arttıkça enzimin matrikse bağlanma oranı artmakta fakat bağlanan enzimin aktivite veriminin azaldığı görülmektedir. Bağlanma oranı ve bağlanan enzimin en kararlı

olduğu süre 75 dakika olarak belirlendi. Süre arttıkça enzimin aktivite veriminin düşmesi enzimin matriks üzerinde bulunan epoksi gruplarıyla etkileşiminin aktif merkezdeki bazı grupları etkilemesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. 15 dakika immobilizasyonda İmmobilizasyon verimi %55 aktivite verimi %15 iken 75 dakikada immobilizasyon verimi %72 'ye aktivite verimi de %37,6'ya yükseldi.Tablo 5.4'de görüldüğü gibi 17 saat ve üzerindeki immobilizasyon sürelerinde tüm enzimin matriks üzerine immobilize olduğu ve süzüntüde aktivite olmadığı görülmektedir. İmmobilizasyon süresi olarak 75 dakikaya kadar olan sürelerdeki immobilizasyonlarda süzüntü aktivitelerinin beklenenin üzerinde olduğu görülmektedir. Bunun yukarıda açıklanan sebeplerden kaynaklandığı düşünülmektedir.

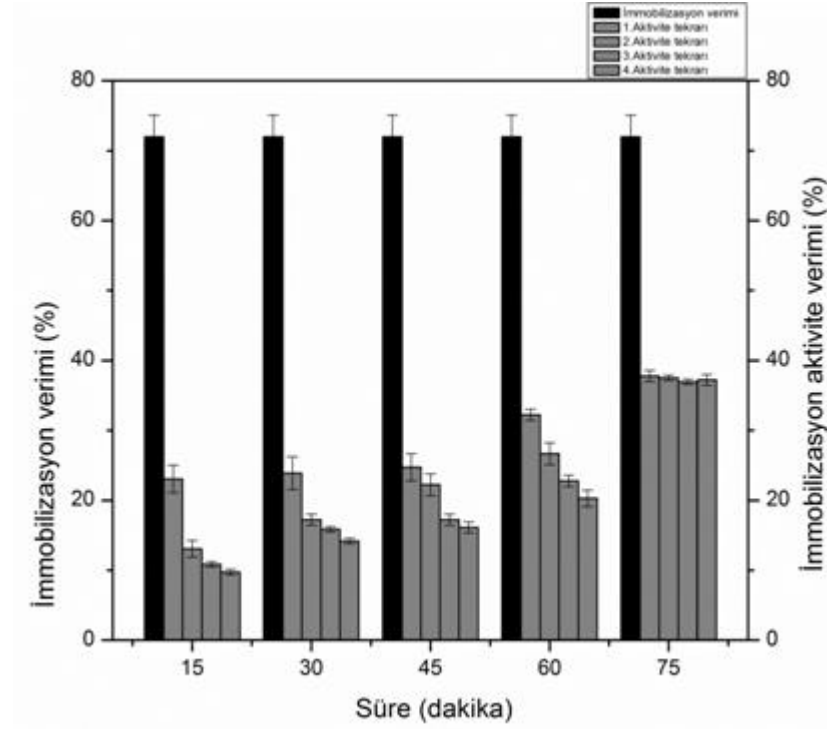
- *Glisin Muamele Süresi*

İmmobilizasyon sonrası serbest epoksi gruplarının enzimlerle çoklu çapraz bağ oluşturarak aktiviteyi azalttığı bilinmektedir. Bu etkinin ortadan kaldırılması için ortama serbest epoksi gruplarını bağlayabilen maddeler (BSA, glisin, etilendiamin gibi) kullanılır. Biz bu çalışmada glisin ilavesiyle ortamdaki serbest epoksilerin doyurulması işlemin gerçekleştirdik.0,5 M glisin (0,038 g) 6 farklı sürede (15-75 dakika) immobilizasyon sonrası inkübasyona tabii tutuldu. İmmobilizasyon sonrası glisin muamele süresinin bağlanan enzimin bağıl aktivitesine etkisi Şekil 5,1'de gösterilmektedir. En uygun glisin muamele süresi olarak 75 dakika tespit edildi. 75 dakika glisin muamelesi ile enzimin 4 tekrarlı reaksiyonunda aktivitesini koruduğu görülmektedir. Bunun glisin aminoasitinin boşta kalan epoksi gruplarını doyurması ile enzim aktivitesini koruduğu düşünülmektedir.

Tablo 5.4: İmmobilizasyonun verimliliğine immobilizasyon süresi etkisi.

Süre (Saat)	İmmobilizasyon verimi (%)	Aktivite verimi (%)	İmmobilize enzim aktivitesi (mU)	Süzüntüdeki toplam aktivite (mU)
0,25	55,0	15,0	60,9	232,8
0,50	62,0	22,2	101,6	181,0
1,00	68,0	26,5	133,1	136,6
1,15	72,0	37,6	200,2	107,0
17,00	100,0	17,2	127,2	0,0
20,00	100,0	8,0	59,2	0,0
24,00	100,0	7,9	58,6	0,0

Tablo 5.4’de ki immobilizasyon şartları: *CmFDH* (739,64 mU) ve Eupergit C 250 L (10 mg) 0,6 M sodyum fosfat tampon çözeltisinde (1 ml, pH 8.0), ile 25 °C’ de, 500 rpm’de, değişik sürelerde (0,25-24 saat) muamele edildi. Daha sonra reaksiyon karışımına glisin (0,038 g) eklenerek 37 °C’de, 500 rpm’de, 75 dakika muamele edildi.



Şekil 5.1: İmmobilize enzim aktivitesine glisin muamele süresi etkisi.

Şekil 5.1’de ki immobilizasyon şartları: *CmFDH* (739,64 mU) ve Eupergit C 250 L (10 mg) 0,6 M sodyum fosfat tampon çözeltisinde (1 ml, pH 8.0), ile 25 °C’ de, 500 rpm’de, 75 dakika muamele edildi. Daha sonra reaksiyon karışımına glisin (0,038 g) eklenerek 37 °C’de, 500 rpm’de değişik sürelerde (15- 75 dakika) muamele edildi.

- *Sükroz Etkisi*

İmmobilizasyon esnasında enzimin kararlılığının artırılması için ortama sükroz ilavesi gerçekleştirildi. Uygun sükroz konsantrasyonunun tespiti için 5 farklı konsantrasyonda (0,1-1 M) ve sükroz ilavesiz inkübasyon gerçekleştirildi. Tablo 5.5’de görüldüğü gibi en uygun sükroz konsantrasyonu 0,3 M olarak tespit edildi. 0,3 M sükroz konsantrasyonuna kadar immobilize enzimin aktivite verimi artarken süzüntüdeki aktivite değerleri aynı kalmaktadır. Artan sükroz konsantrasyonu

immobilizasyon verimini etkilememektedir ve 1 M süktroz konsantrasyonunda immobilizasyon verimi yine %72 olarak bulundu. Bu sonuçlar bize süktroz konsantrasyonunun enzimin matrikse bağlanmasını etkilemediğini fakat 0,3 M süktroz konsantrasyonuna kadar bağlanan enzimin aktivite veriminin artmasından da enzim üzerinde koruyucu etkisi olduğunu düşündürmektedir. Tablo 5.5’de 0,3 M süktroz konsantrasyonundan sonra süzüntü aktivite veriminin daha da azaldığı görülmektedir. Bunun yukarıda sonuçlarında açıklanan sebeplerden kaynaklandığı düşünülmektedir.

İmmobilize Enzim Karakterizasyonu

Enzim immobilizasyonu sodyum fosfat tampon çözeltisi (0,6 M, pH 8,0) içinde 0,1 mg *CmFDH* ve 10 mg Eupergit C 250 L ile 500 rpm’de, 25 °C’ de, 75 dakika reaksiyonu ile elde edildi. En yüksek immobilizasyon verimi % 72 ve aktivite verimi %37,6 olarak bulundu.

- *Optimum Sıcaklık*

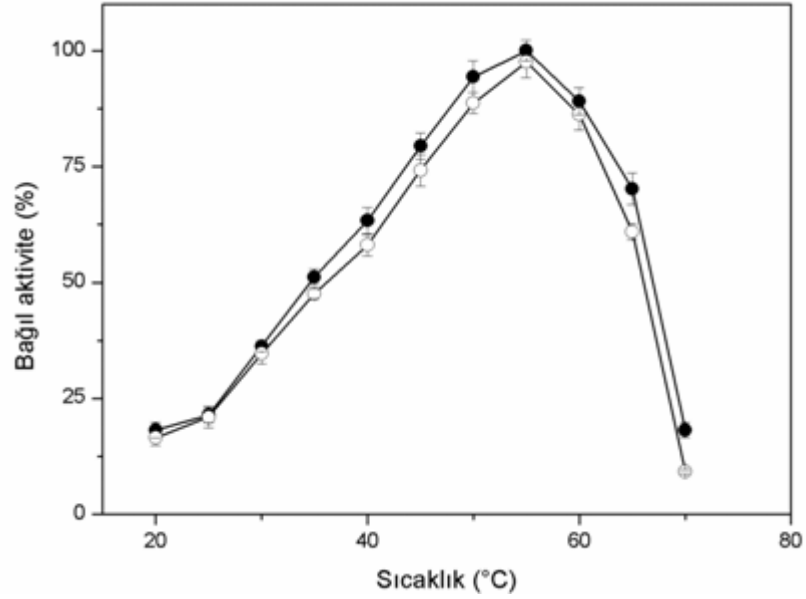
İmmobilize veya serbest *CmFDH*’ın optimize reaksiyon şartlarında optimum sıcaklığı belirlemek için 20-70 °C aralıklarında aktivite gerçekleştirilerek Şekil 5.2’deki Şekil çizildi. Şekil 5.2.’de görüldüğü gibi optimum *CmFDH* aktivite sıcaklığının 55 °C olduğu belirlendi. İmmobilize ve serbest enzimin her ikisinde de optimum aktivite sıcaklıkları aynı bulundu. İmmobilizasyonun enzimin reaksiyon şartlarında sıcaklık olarak bir değişiklik oluşturmadığı gözlemlendi.

Tablo 5.5: İmmobilizasyon verimliliğine süktroz etkisi.

Süktroz konsantrasyonu (M)	İmmobilizasyon verimi (%)	Aktivite verimi (%)	İmmobilize enzim aktivitesi (mU)	Süzüntüdeki toplam aktivite (mU)
0,0	72,0	23,3	124,3	107,1
0,1	72,0	25,0	133,1	107,1
0,2	72,0	30,3	161,2	107,1
0,3	72,0	37,5	199,7	107,1
0,5	72,0	20,0	106,5	87,2
1,0	72,0	8,3	44,4	83,1

Tablo 5.5’de ki immobilizasyon şartları: *CmFDH* (739,64 mU) ve Eupergit C 250 L (10 mg) 0,6 M sodyum fosfat tampon çözeltisinde (1 ml, pH 8.0), değişik konsantrasyonlarda süktroz (0,-1 M) ile 25 °C’ de, 500 rpm’de, 75 dakika muamele

edildi. Daha sonra reaksiyon karışımına glisin (0,038 g) eklenerek 37 °C’de, 500 rpm’de, 75 dakika muamele edildi.



Şekil 5.2: Sıcaklığın serbest (○) ve immobilize (●) CmFDH aktivitesine etkisi.

- *Optimum pH*

İmmobilize ve serbest CmFDH’ın reaksiyon şartlarında optimum pH’ı belirlemek için pH 6.0-10.0 aralıklarında aktivite gerçekleştirilerek Şekil 5.3’deki Şekil çizildi. Şekil 5.3’de görüldüğü gibi optimum CmFDH pH’sının 8.0 olduğu belirlendi. İmmobilize ve serbest enzimin her ikisinde de optimum pH’sı 8,0 bulundu. İmmobilizasyonun enzimin reaksiyon şartlarında pH olarak bir değişiklik oluşturmadığı bulunmuştur.

- *Kinetik Değerlerin Belirlenmesi*

İmmobilize CmFDH’ın kinetik değerlerinin belirlenmesi reaksiyonlarında birinci substrat olarak 2-propanol ve ikinci substrat olarak NAD⁺ koenzimi kullanıldı. Reaksiyon şartları daha önce optimize edilen şartlarda (37 °C, 50 mM NaP tampon çözeltisi, pH 7.0, 340 nm) gerçekleştirildi. İmmobilize CmFDH’ın kararlı hal grafiği Şekil 5.4’de gösterilmiştir. Tablo 5.7’de görüldüğü gibi immobilize CmFDH’ın serbest olana göre V_{max} ve k_{cat} değeri düşerken K_M değeri artmıştır. Buda bize immobilize CmFDH’ın substrata ilgisinin azaldığını göstermektedir. Bu azalma enzimin bağlanış biçimine göre sterik kısıtlamadan kaynaklanmaktadır.

- *Sıcaklık Kararlılığı*

Enzimlerin sıcaklık kararlılıkları onların uzun ömürlü olmaları ve ticari kullanımları açısından önemli kriterlerden biridir. Genellikle immobilize enzimlerin serbest enzimlere göre sıcaklığa karşı daha dirençli oldukları bilinmektedir. Immobilize ve serbest *CmFDH*'ın sıcaklık kararlılıklarını karşılaştırmak için daha önce belirlenen optimize reaksiyon şartlarında 20 - 70 °C sıcaklıklarda 20 dakika inkübasyon yapılarak 37 °C'de aktivitelerine bakıldı ve Şekil 5.5'de ki Şekil çizildi. Şekil 5.5'de görüldüğü gibi immobilize *CmFDH*'ın özellikle 55 °C'den sonra serbest enzime göre kararlılığının yaklaşık olarak %15-35 oranında arttığı görülmektedir. Kovalent bağlı immobilize enzimlerde sıcaklık kararlılığının aktif merkezin sıcaklık etkisinden korunarak arttığı bilinmektedir. Yüksek sıcaklıklarda serbest enzimin denatürasyonu ile enzim aktivitesinin azalmasına karşın immobilize enzimlerde denatürasyon matriks ile enzimin kovalent etkileşimi sebebiyle daha az olmaktadır. *CmFDH*'ın Eupergit C 250 L matriksine bağlanması enzimin üç boyutlu yapısını daha kararlı hale getirmektedir.

- *pH Kararlılığı*

İmmobilize ve serbest *CmFDH*'ın pH kararlılıklarını karşılaştırmak için daha önce belirlenen optimize reaksiyon şartlarında pH 6-10 arasında 20 dakika inkübasyona tabi tutuldu ve pH 8.0'de aktivitelerine bakılarak Şekil 5.6'da ki Şekil çizildi. Şekil 5.6'da görüldüğü gibi immobilize *CmFDH*'ın her pH'da serbest enzime göre kararlılığın arttığı görülmektedir. Bu sonuç bize *CmFDH*'ın matrikse bağlandıktan sonra alkali ve asit ortamda kararlılığı artırıcı şekilde enzimin mikroçevresinin değiştiğini göstermektedir.

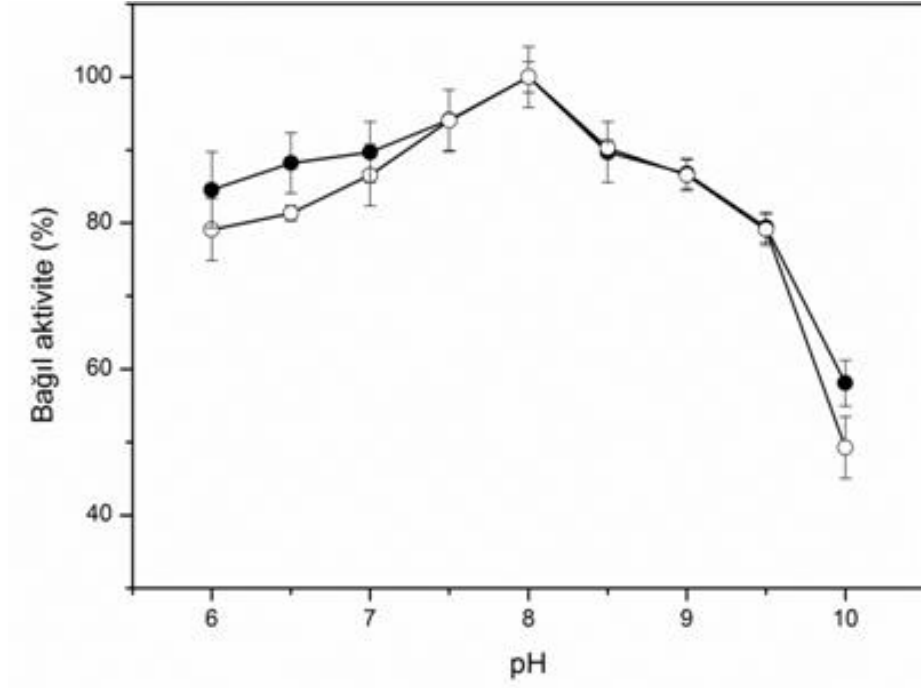
- *Saklama Kararlılığı*

İmmobilize *CmFDH*'ın saklama kararlılığın belirlenmesi için tampon içerisinde +4 °C'de 30 gün süre ile belli aralıklarda aktivite bakıldı. Şekil 5.7'de görüldüğü gibi 10 gün sonunda immobilize *CmFDH* aktivitesinin yaklaşık %90'ını, 30 gün sonunda da %50'sini koruduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar *CmFDH*'ın saklama kararlılığının yüksek olduğunu göstermektedir. Eupergit C 250 L yüzeyindeki yüksek yoğunluktaki oksiran grupları çok noktalı kovalent bağlanma gerçekleştirmektedir. Bu bağlanma enzimin konformasyonel kararlılığını artırmakta ve böylece immobilize enzimlerin uzun süreli operasyonel ve saklama kararlılığının artmasını sağlamaktadır [Mateo, 2000 #46]. *Candida boidini* FDH normal saklama koşullarında +4 °C'de 2 haftada

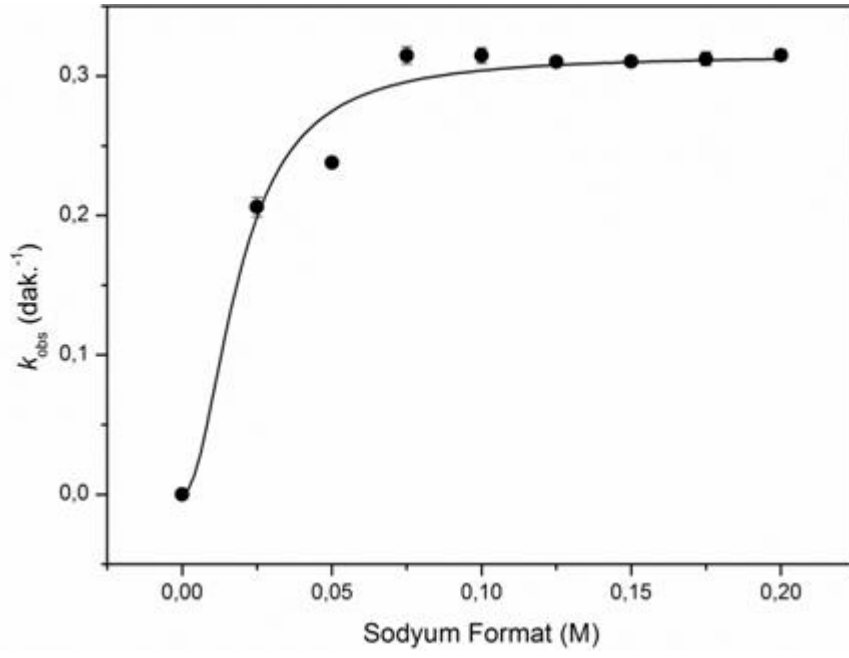
aktivitesinin %50 sini kaybettiği rapor edilmiştir [Rojkova, 1999 #92]. İmmobilize *CmFDH*'ın yaklaşık olarak 2 kat saklama kararlılığını artırdığı görülmektedir.

- *Tekrar Kullanım Sayısı*

İmmobilize *CmFDH*'ın tekrar kullanım sayısı daha önce belirlenen optimum reaksiyon şartlarında üst üste gerçekleştirilen reaksiyon sonuçlarıyla belirlendi. Şekil 5.8'de görüldüğü gibi 13 tekrarlı aktivite sonucunda immobilize enzimin yaklaşık %60 seviyelerinde aktivitesinin kaldığı görülmektedir.



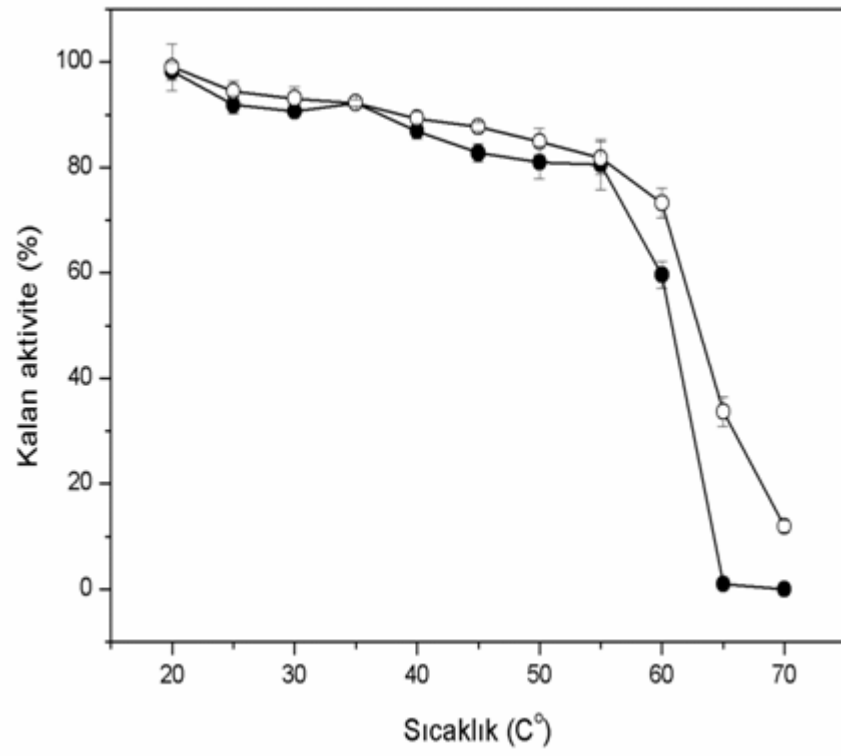
Şekil 5.3: pH'ın Serbest (○) ve immobilize (●) *CmFDH* aktivitesine etkisi.



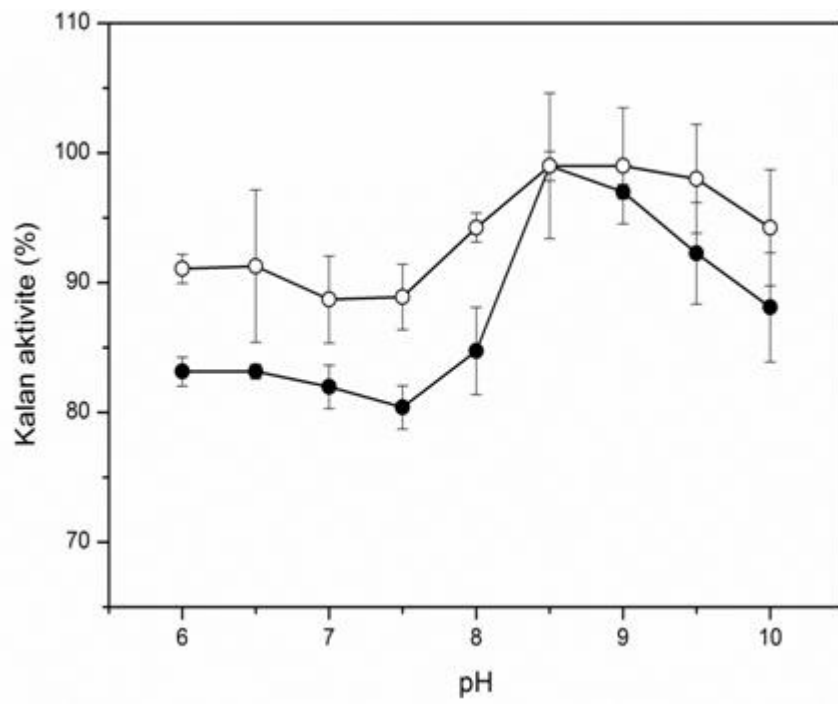
Şekil 5.4: İmmobilize *CmFDH*'ın Michaelis Menten kinetiği.

Tablo 5.6: Serbest ve immobilize *CmFDH*'ın kinetik değerleri.

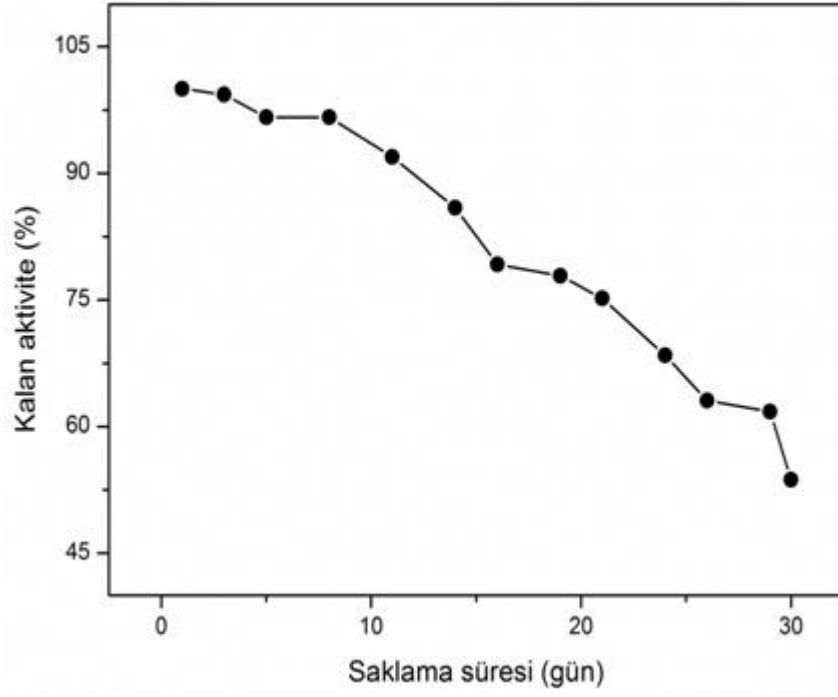
Enzim	Spesifik Aktivite (U/mg)	K_M (mM)	k_{cat} (dak. ⁻¹)	k_{cat}/K_M (M ⁻¹ .dak. ⁻¹)
Serbest <i>CmFDH</i>	3,55±0,34	13,06±2,61	0,86±0,07	65,84
İmmobilize <i>CmFDH</i>	0,91±0,03	19,1±3,8	0,31±0,04	16,23



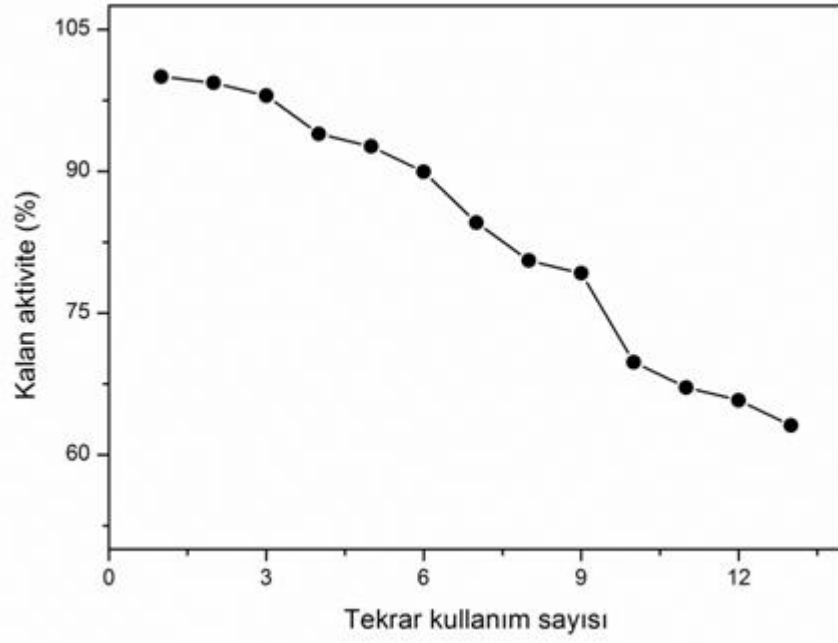
Şekil 5.5: Serbest (●) ve immobilize (○) *CmFDH*'ın sıcaklık kararlılığı.



Şekil 5.6: Serbest (●) ve immobilize (○) *CmFDH*'ın pH kararlılığı.



Şekil 5.7: İmmobilize *CmFDH*'ın saklama kararlılığı.



Şekil 5.8: İmmobilize *CmFDH*'ın tekrar kullanımı.

5.4.2. *BtADH*'ın Eupergit C 250 L Üzerine İmmobilizasyonu

İmmobilizasyon Optimizasyonu

Eupergit C üzerindeki epoksi grupları enzim üzerindeki amino, karboksil ve sülfüdril grupları ile kovalent etkileşime girerek enzimin immobilize olmasını sağlayan önemli bir matrikstir. *BtADH*'ın Eupergit C 250 L üzerine immobilizasyonunda immobilizasyon sonrası epoksi grupları glisinle muamele edilerek serbest epoksiler doyuruldu ve bağlanan enzimlerin aktivite kaybı engellenerek kararlılık artırıldı. İmmobilizasyon esnasında enzimin kararlılığının artırılması için süktroz kullanıldı ve konsantrasyonu optimize edildi.

- *Tampon Çözeltisi pH'sı*

Eupergit C deki epoksi grupları geniş pH aralığında (pH 1–12) enzimlerin çeşitli reaktif gruplarıyla reaksiyona girmesine rağmen çoğu enzimin immobilizasyonu kendi optimum pH'sında en yüksek verimle gerçekleşmektedir [Katchalski-Katzir and Kraemer, 2000]. *BtADH*'ın Eupergit C 250 L üzerine immobilizasyonunda uygun tampon çözelti pH'sını tespit etmek için pH 6-9 arasında farklı tamponlar kullanılarak immobilizasyon gerçekleştirildi. Tablo 5.7.'de görüldüğü gibi *BtADH*'ın kendi optimum pH'sı 9.0 iken Eupergit C 250 L üzerine immobilizasyonunda en uygun tampon çözeltisi pH'sı 8.0 olarak bulundu. Tampon çözelti pH'sı 6,0'da immobilizasyon aktivite verimi 12,3 iken pH 8,0'da 43,2'ye yükseldi. Tablo 5.7'de süzüntü aktivite verimlerinin beklenen değerlerin altında olduğu görülmektedir. Bunun Bölüm 5.4.1'de *CmFDH* immobilizasyonu tampon çözeltisi pH'sı optimizasyonunda açıklanan benzer sebeplerden kaynaklanmaktadır. Süzüntüdeki enzim ortamın yüksek tuz konsantrasyonu, alkali ve bazik tamponla muamele, sıcaklık gibi enzimin kararlılığını bozacak etmenler sebebiyle süzüntü toplam aktivitesi beklenen az bulundu.

Tablo 5.7: İmmobilizasyon verimliliğine tampon çözelti pH'sı etkisi.

pH	İmmobilizasyon verimi (%)	Aktivite verimi (%)	İmmobilize enzim aktivitesi (mU)	Süzüntüdeki toplam aktivite (mU)
6,0	42,3	12,3	39,9	326,8
6,5	47,5	27,5	100,6	288,3
7,0	48,6	34,4	128,7	280,2
7,5	50,3	40,5	156,8	267,6
8,0	54,3	43,2	180,5	238,0
8,5	54,2	36,5	152,4	238,8
9,0	53,2	29,6	121,3	246,2

Tablo 5.7’de ki immobilizasyon şartları: *BtADH* (769,23 mU) ve Eupergit C 250 L (10 mg) sodyum fosfat tampon çözeltisinde (1 ml, 0,6 M), değişik pH’larda (6,0-9,0) 25 °C’ de, 500 rpm’de, 75 dakika muamele edildi. Daha sonra reaksiyon karışımına glisin (0,038 g) eklenerek 25 °C’de, 500 rpm’de, 75 dakika muamele edildi.

- *Tampon Çözeltisi Konsantrasyonu*

BtADH’ın Eupergit C 250 L üzerine immobilizasyonunda en iyi bağlanma ve aktivite gösteren sodyum fosfat tampon çözeltisi konsantrasyonunu tespit etmek için farklı konsantrasyonlarda (0,05-0,8 M) tampon kullanılarak immobilizasyon gerçekleştirildi. Tablo 5.8’de görüldüğü gibi *BtADH*’ın Eupergit C 250 L üzerine immobilizasyonunda en uygun tampon konsantrasyonu 0,6 M olarak bulunmuştur. Tampon çözeltisi konsantrasyonu arttıkça immobilizasyon aktivite verimi artarken 0,6 M’den sonra düşmektedir. Tampon çözeltisi konsantrasyonu 0,05 M’da immobilizasyon aktivite verimi %19,2 iken 0,6 M’da %43,5’a yükselmektedir. Tablo 5.8’de süzüntü aktivite değerlerinin beklenenin altında olduğu görülmektedir. Belli bir süre yüksek tuz konsantrasyonu ve alkali pH ortamında enzimin muamelesi ile bazı enzimlerin üç boyutlu yapılarının bozulması, çökme ve kararlılığının bozulması sebebiyle süzüntüdeki toplam aktivite beklenenden az bulundu.

- *Sıcaklık*

BtADH’ın Eupergit C 250 L matriksine immobilizasyonunda en iyi bağlanma ve aktivite gösteren 0,6 M, pH 8.0 sodyum fosfat tamponu şartlarında uygun sıcaklığı tespit etmek için 4 farklı sıcaklık derecesinde (4, 15, 25, 37 °C) immobilizasyon gerçekleştirildi. Tablo 5.9’da görüldüğü gibi *BtADH*’ın Eupergit C 250 L üzerine immobilizasyonunda en uygun immobilizasyon sıcaklığı 25 °C olarak

bulundu. Tablo 5.9’da süzüntü aktivitelerinin beklenen değerlerin altında olduğu görülmektedir. Sıcaklık artışına paralel olarak yüksek alkali ve tuz ortamında enzimin kararlılığının azalması süzüntüdeki immobilize olmayan enzimin toplam aktivitesinin azalmasına sebep olmaktadır.

Tablo 5.8: İmmobilizasyon verimliliğine tampon çözeltisi konsantrasyonu etkisi.

Konsantrasyon (M)	İmmobilizasyon verimi (%)	Aktivite verimi (%)	İmmobilize enzim aktivitesi (mU)	Süzüntüdeki toplam aktivite (mU)
0,05	42,3	19,2	63,6	326,8
0,10	47,5	23,1	79,9	288,3
0,20	48,6	34,7	122,8	280,2
0,30	50,3	38,0	134,6	267,6
0,40	54,3	40,3	158,3	238,0
0,60	54,2	43,5	177,5	238,8
0,80	53,2	27,2	121,3	246,2

Tablo 5.8’de ki immobilizasyon şartları: *BtADH* (769,23 mU) ve Eupergit C 250 L (10 mg) değişik konsantrasyonlarda (0,05-0,6 M) sodyum fosfat tampon çözeltisinde (1 ml, pH 8,0), 25 °C’ de, 500 rpm’de, 75 dakika muamele edildi. Daha sonra reaksiyon karışımına glisin (0,038 g) eklenerek 25 °C’de, 500 rpm’de, 75 dakika muamele edildi.

Tablo 5.9: İmmobilizasyon verimliliğine sıcaklık etkisi.

Sıcaklık (°C)	İmmobilizasyon verimi (%)	Aktivite verimi (%)	İmmobilize enzim aktivitesi (mU)	Süzüntüdeki toplam aktivite (mU)
4	38,0	29,4	85,8	358,6
15	42,0	32,1	103,6	329,0
25	52,0	42,9	171,6	255,0
37	48,0	17,6	65,1	284,6

Tablo 5.9’da ki immobilizasyon şartları: *BtADH* (769,23 mU) ve Eupergit C 250 L (10 mg) sodyum fosfat tampon çözeltisinde (1 ml, pH 8,0, 0,6 M) değişik sıcaklıklarda (4-37 °C), 500 rpm’de, 75 dakika muamele edildi. Daha sonra reaksiyon karışımına glisin (0,038 g) eklenerek 25 °C’de, 500 rpm’de, 75 dakika muamele edildi.

- *İmmobilizasyon süresi*

Süre arttıkça enzimin aktivite veriminin düşmesi enzimin matriks üzerinde bulunan epoksi gruplarıyla etkileşiminin aktif merkezdeki bazı grupları etkilemesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Tablo 5.10'da görüldüğü gibi 75 dakika immobilizasyon sonunda %52 immobilizasyon verimi ve %43 aktivite verimi tespit edildi.

İmmobilizasyon süresi arttıkça 75 dakikaya kadar süzüntü aktivite değerleri enzimin matrikse bağlanması sebebiyle azalmaktadır. 17 saat ve sonrasında ise süzüntüde aktivite olmaması sebebiyle enzim bulunmadığını göstermektedir. Enzim immobilizasyonunda uzun süre immobilizasyon tamponunda yüksek tuz ve alkali ortama maruz kalmasıyla enzimin protein yapısı denatüre olmaktadır. Bununla birlikte süzüntüdeki immobilize olmayan enzimin toplam aktivitesi beklenenin altında olmaktadır.

- *Glisin etkisi*

İmmobilizasyon sonrası bağlanan enzimin karalılığın artırılması için matriks üzerindeki boşta kalan epoksi gruplarının doyurulması gerekmektedir. Bu çalışma için glisin aminoasiti kullanıldı. Glisin (0,038 g) 6 farklı sürede (15-75 dakika) immobilizasyon sonrası Eupergit C 250 L ile muamele edildi. İmmobilizasyon sonrası glisin muamele süresinin bağlanan enzimin bağıl aktivitesine etkisi Şekil 5.9.'da gösterilmiştir. En uygun glisin muamele süresi 75 dakika olarak tespit edildi. 75 dakika glisin muamelesi ile enzimin 4 tekrarlı reaksiyonunda aktivitesini koruduğu görüldü.

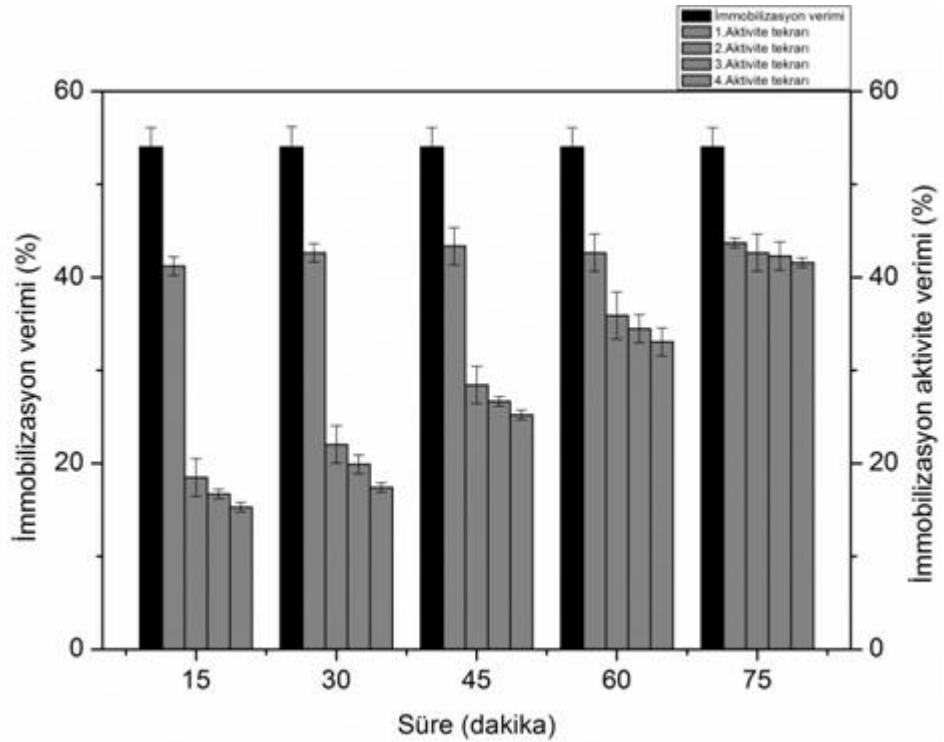
Tablo 5.10: İmmobilizasyon verimliliğine immobilizasyon süresi etkisi.

Süre (Saat)	İmmobilizasyon verimi (%)	Aktivite verimi (%)	İmmobilize enzim aktivitesi (mU)	Süzüntüdeki toplam aktivite (mU)
0,25	19,0	31,6	44,4	499,1
0,50	22,0	32,1	52,3	476,9
1,00	39,0	34,9	100,6	351,1
1,15	52,0	43,8	168,6	255,0
17,00	100,0	13,6	100,6	0,0
20,00	100,0	8,1	59,8	0,0
24,00	100,0	1,2	8,6	0,0

Tablo 5.10’da ki immobilizasyon şartları: *BtADH* (769,32 mU) ve Eupergit C 250 L (10 mg) sodyum fosfat tampon çözeltisinde (1 ml, pH 8,0, 0,6 M), 25 °C, 500 rpm’de, değişik sürelerde (0,25-24 saat) muamele edildi. Daha sonra reaksiyon karışımına glisin (0,038 g) eklenerek 25 °C’de, 500 rpm’de, 75 dakika muamele edildi.

- *Sükroz etkisi*

İmmobilizasyon esnasında enzimin karlılığın sağlanması için ortama sükroz ilavesi gerçekleştirildi. Uygun sükroz konsantrasyonunun tespiti için 5 farklı konsantrasyonda (0,1-1 M) ve sükroz ilavesiz inkübasyon gerçekleştirildi. Tablo 5.11’de görüldüğü gibi en uygun sükroz konsantrasyonu 0,3 M olarak tespit edildi. 0,3 M sükroz konsantrasyonuna kadar immobilize enzimin aktivite verimi artarken süzüntüdeki aktivite değerleri aynı kalmaktadır. Artan sükroz konsantrasyonu immobilizasyon verimini etkilememektedir ve 1 M sükroz konsantrasyonunda immobilizasyon verimi yine %52 olarak bulundu. Bu sonuçlar bize sükroz konsantrasyonunun enzimin matrikse bağlanmasını etkilemediğini fakat 0,3 M sükroz konsantrasyonuna kadar bağlanan enzimin aktivite veriminin artmasından da enzim üzerinde koruyucu etkisi olduğunu göstermektedir.



Şekil 5.9: İmmobilize *BtADH* aktivitesine glisin etkisi.

İmmobilize Enzim Karakterizasyonu

- *Optimum sıcaklık*

İmmobilize ve serbest *BtADH*'ın optimize reaksiyon şartlarında optimum sıcaklığı belirlemek için 20- 70 °C aralıklarında aktivite gerçekleştirildi ve Şekil 5.10'daki Şekil çizildi. Şekil 5.10'da görüldüğü gibi optimum sıcaklık 25 °C olarak belirlendi. İmmobilize ve serbest enzimin her ikisinde de optimum sıcaklık aynı bulundu. İmmobilizasyonun enzimin reaksiyon şartlarında sıcaklık olarak bir değişiklik oluşturmadığı belirlendi.

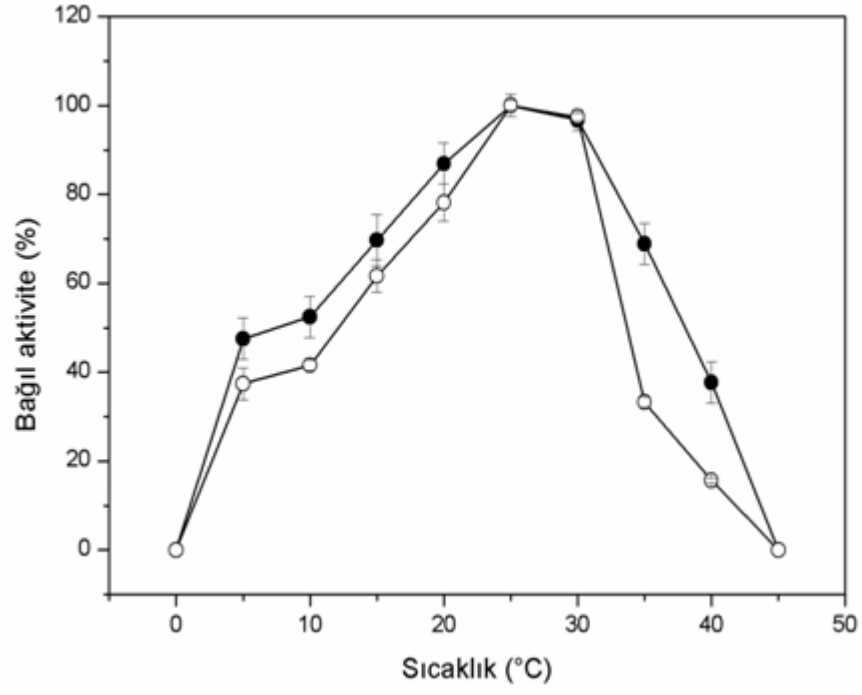
- *Optimum pH*

İmmobilize ve serbest *BtADH*'ın optimize reaksiyon şartlarında optimum pH'ını belirlemek için pH 6.0-10.0 aralıklarında aktivite gerçekleştirildi Şekil 5.11'deki Şekil çizildi. Şekil 5.11'de görüldüğü gibi optimum pH 9.0 olarak belirlendi. İmmobilize ve serbest enzimin her ikisinde de optimum pH aynı bulundu. İmmobilizasyonun enzimin reaksiyon şartlarında pH olarak bir değişiklik oluşturmadığı belirlendi.

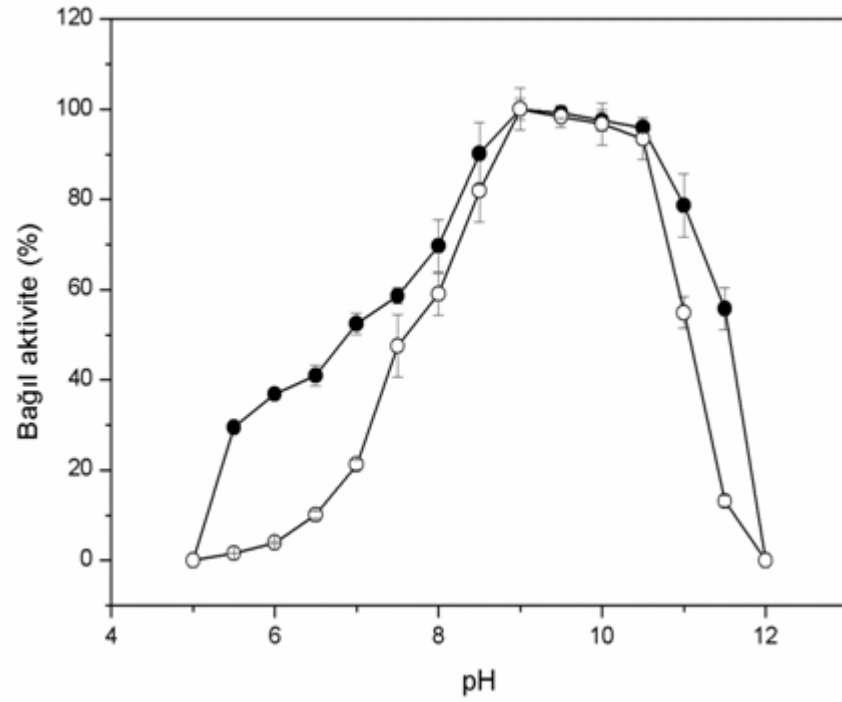
Tablo 5.11: İmmobilizasyon verimliliğine sükröz etkisi.

Sükröz konsantrasyonu (M)	İmmobilizasyon verimi (%)	Aktivite verimi (%)	İmmobilize enzim aktivitesi (mU)	Süzüntüdeki toplam aktivite (mU)
0,0	52,0	25,6	106,5	269,3
0,1	52,0	30,6	127,2	269,3
0,2	52,0	35,5	147,9	269,3
0,3	52,0	42,6	177,5	269,3
0,5	52,0	34,8	145,0	152,6
1,0	52,0	10,7	44,4	125,3

Tablo 5.11'de ki immobilizasyon şartları: *BtADH* (769,32 mU) ve Eupergit C 250 L (10 mg) sodyum fosfat tampon çözeltisinde (1 ml, pH 8,0, 0,6 M), 25 °C, 500 rpm'de, değişik konsantrasyonlarda sükröz (0,1-1 M), 75 dakika muamele edildi. Daha sonra reaksiyon karışımına glisin (0,3 g) eklenerek 25 °C'de, 500 rpm'de, 75 dakika muamele edildi.



Şekil 5.10: Serbest (○) ve immobilize (●) *BtADH*'ın 2-propanol oksidasyonunun optimum sıcaklığı.



Şekil 5.11: Serbest (○) ve immobilize (●) *BtADH*'ın 2-propanol oksidasyonunun optimum pH'sı.

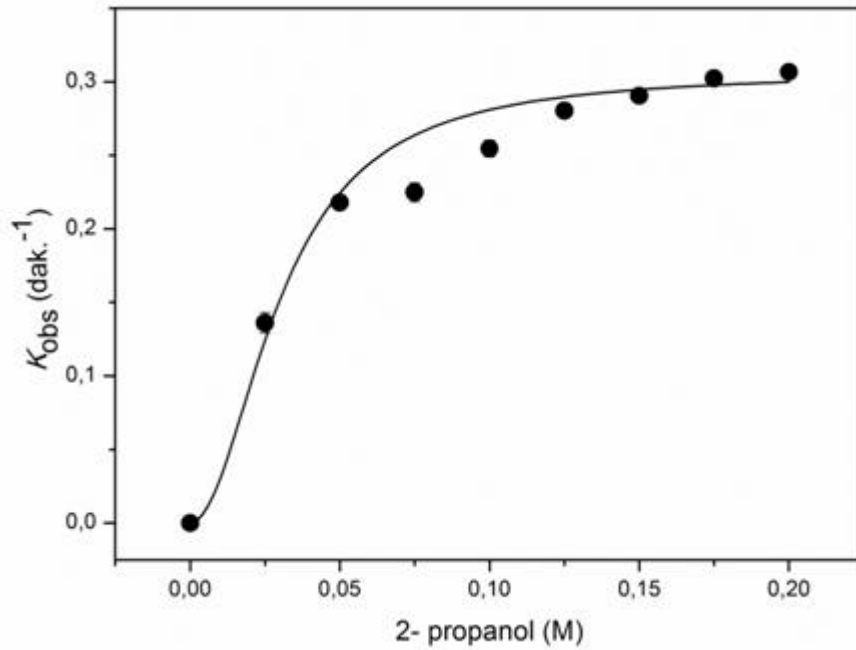
- *Kinetik değerlerin belirlenmesi*

İmmobilize *BtADH*'ın serbest enzime göre kinetik karakterinin belirlenmesinde birinci substrat olarak 2-propanol ve ikinci substrat olarak NAD^+ koenzimi kullanıldı. Reaksiyon şartları daha önce optimize edilen şartlarda (25 °C, 50 mM NaP tampon, pH 9.0, 340 nm) gerçekleştirildi.

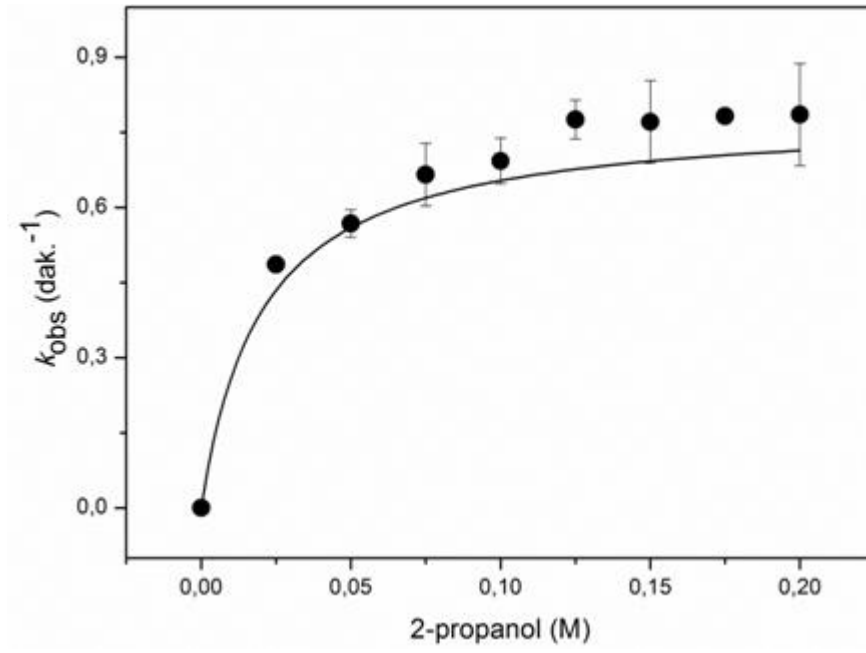
İmmobilize ve serbest *BtADH*'ın steady state Şekilleri Şekil 5.12 ve 5.13'de gösterilmiştir. Tablo 5.12'de görüldüğü gibi immobilize *BtADH*'ın serbest olana göre $V_{\max}$ ve k_{cat} değeri düşerken K_M değeri artmıştır. Buda bize immobilize *BtADH*'ın substrata ilgisinin azaldığını göstermektedir. İmmobilize enzimlerin matrikse bağlanması ile substrat ile etkileşimlerinde bağlanma konumlarına göre sterik kısıtlama olmaktadır. Bu da enzimin substratla etkileşimini azaltmaktadır.

- *Sıcaklık kararlılığı*

İmmobilize ve serbest *BtADH*'ın sıcaklık kararlılıklarını belirlemek için daha önce belirlenen optimize reaksiyon şartlarında 20 - 70 °C sıcaklıklarda 20 dakika muamele edilerek 25 °C'de aktivitelerine bakıldı ve Şekil 5.14'de ki Şekil çizildi.



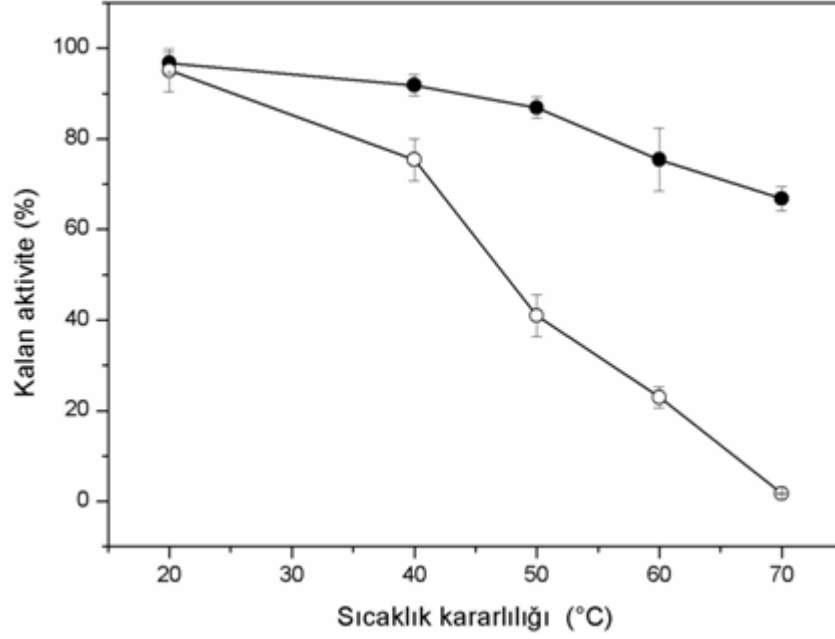
Şekil 5.12: İmmobilize *BtADH*'ın 2-propanol oksidasyonunun Michaelis-Menten kinetiği.



Şekil 5.13: Serbest *BtADH*’ın 2-propanol oksidasyonunun Michaelis-Menten kinetiği.

Tablo 5.12: Serbest ve immobilize *BtADH*’ın 2-propanol oksidasyonunun kinetik değerleri.

Enzim	Spesifik aktivite (U/mg)	K_M (mM)	k_{cat} (dak. ⁻¹)	k_{cat}/K_M (M ⁻¹ .dak. ⁻¹)
Serbest <i>BtADH</i>	0,80±0,09	20,2±3,50	0,78±0,77	38,61
İmmobilize <i>BtADH</i>	0,31±0,03	30,2±1,82	0,30±3,26	9,93



Şekil 5.14: Serbest (○) ve immobilize (●) *BtADH*'ın 2-propanol oksidasyonunun sıcaklık kararlılığı.

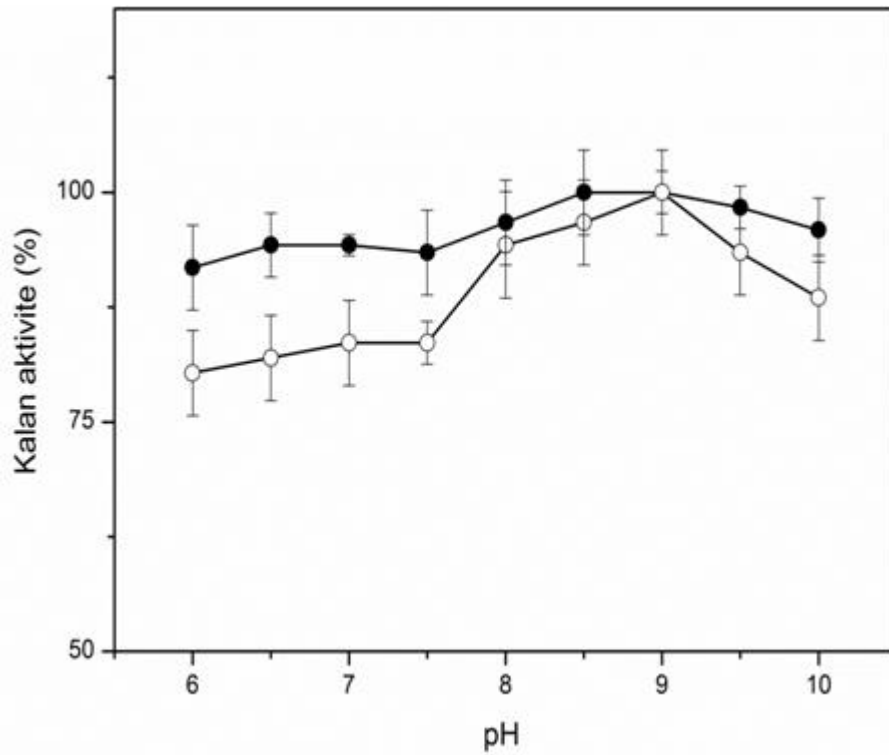
Şekil 5.14'de görüldüğü gibi immobilize *BtADH*'ın özellikle 40 °C'den sonra serbest enzime göre kararlılığının yaklaşık olarak %20-70 oranında arttığı görülmektedir. Matrikse kovalent bağlanan enzim immobilizasyonunda aktif merkezinin mikroçevresi serbest enzime göre değişmektedir. Bu değişim enzimin yüksek sıcaklıklardaki kararlılığını artırmakta ve protein denatürasyonunu engellemektedir. Artan kararlılık enzimin yüksek sıcaklıklardaki reaksiyonlarında büyük avantaj oluşturmaktadır.

- *pH kararlılığı*

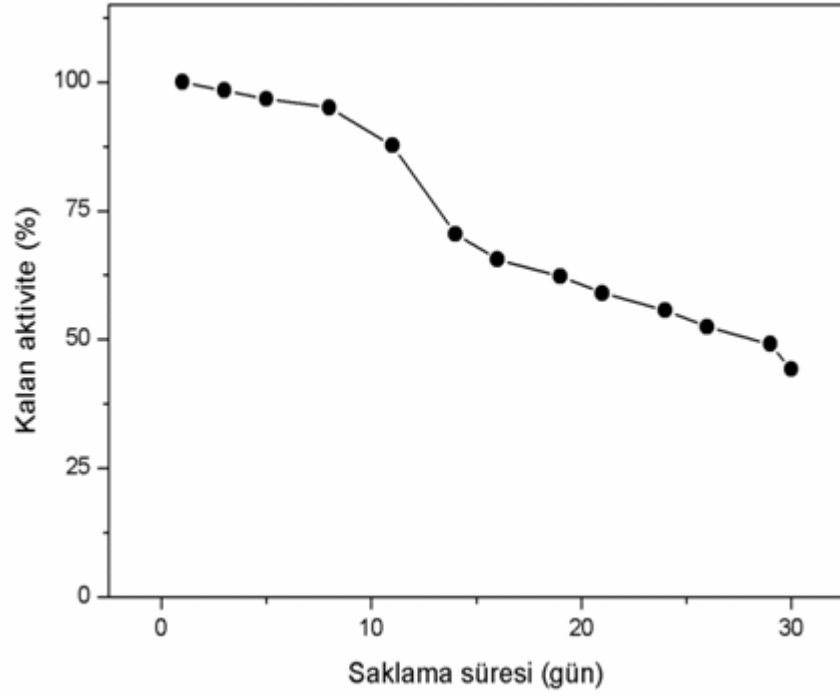
İmmobilize ve serbest *BtADH*'ın pH kararlılıklarını karşılaştırmak için daha önce belirlenen optimize reaksiyon şartlarında pH 6-10 arasında 20 dakika inkübasyona tabi tutuldu ve pH 8,0'de aktivitelerine bakılarak Şekil 5.15'de ki Şekil çizildi. Şekil 5.15'de görüldüğü gibi immobilize *BtADH*'ın her pH'da serbest enzime göre kararlılığının arttığı görülmektedir. İmmobilize enzimlerin matrikse bağlanmasıyla enzimin aktif merkezinin tampon ile etkileşim içerisinde olduğu mikroçevre özellikleri değişmektedir. Bu değişimle birlikte immobilize enzim alkali ve asit ortamda serbest enzime göre daha kararlı olmaktadır. Alkali ve asit ortamdaki kararlılığın artması immobilize enzimin reaksiyonlardaki kullanılabilirliğini artırmaktadır.

- *Saklama kararlılığı*

İmmobilize *BtADH*'ın saklama kararlılığının belirlenmesi için tampon çözeltisi içerisinde +4 °C'de 30 gün süre ile belli aralıklarda aktivite bakıldı. Şekil 5.16.'da görüldüğü gibi 10 gün sonunda immobilize *BtADH* aktivitesinin yaklaşık % 90'ını, 30 gün sonunda da yaklaşık % 40'ını koruduğu gözlemlendi. Enzimlerin katalitik özellikleri ile birlikte operasyonel kararlılıkları ve kullanım ömürleride reaksiyonlarda büyük önem arz etmektedir. Enzimler +4 °C'de kullanılıncaya kadar saklanırlar. Bu süre içinde enzimin kararlılığını muhafaza etmesi gereklidir. İmmobilize enzimlerde enzimin serbest enzime göre kararlılığını muhafaza etmesi beklenen durumdur. Eupergit C 250 L matriksine kovalent olarak bağlanan *BtADH* 10 gün süre sonunda aktivitesinin tamamına yakını korumaktadır. 30 gün sonunda ise hala % 40 oranında aktivitesini devam ettirmektedir.



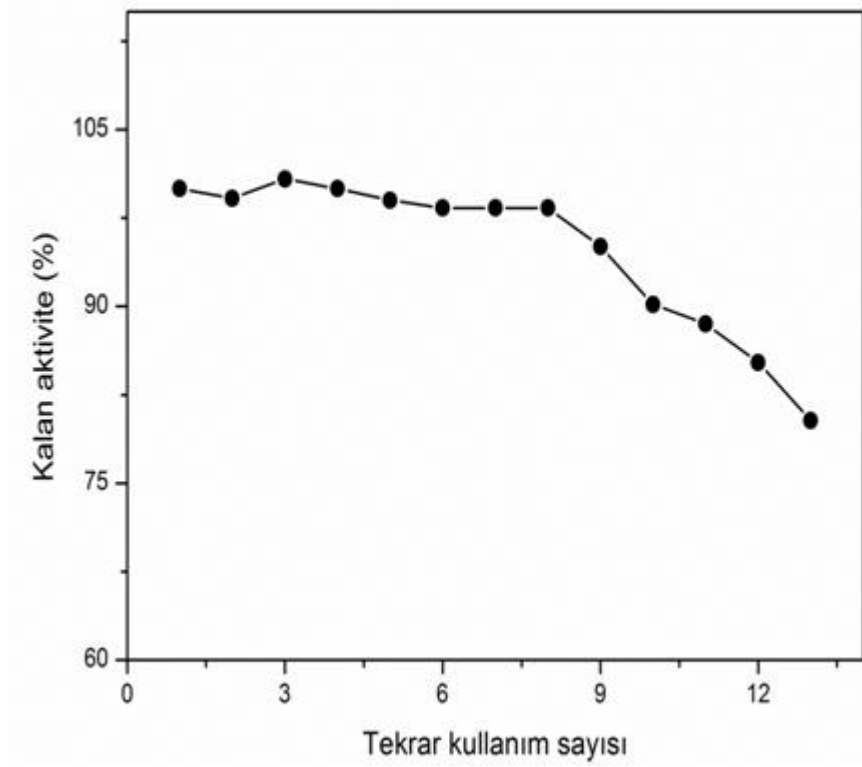
Şekil 5.15: Serbest (○) ve immobilize (●) *BtADH*'ın 2-propanol oksidasyonunun pH kararlılığı.



Şekil 5.16: İmmobilize *BtADH*'ın 2-propanol oksidasyonunun saklama kararlılığı.

- *Tekrar kullanım sayısı*

İmmobilize *BtADH*'ın tekrar kullanım sayısı daha önce belirlenen optimum reaksiyon şartlarında üst üste gerçekleştirilen reaksiyon sonuçlarıyla belirlendi. Şekil 5.17'de görüldüğü gibi 13 tekrar kullanım sonucunda immobilize enzimin yaklaşık %80 seviyelerinde aktivitesinin kaldığı görülmektedir. Enzimler reaksiyonlarda tekrar tekrar kullanılırlar. Enzimlerin reaksiyonlarda tekrar tekrar kullanımları yapısal kararlılıkları ile ilgilidir. Yapısal olarak kararlılığı artırılan enzimlerin reaksiyonlarda tekrarlı kullanım sayısı artmaktadır. Enzimlerin immobilizasyonu kararlılığı artıran önemli etmenlerdendir. Bir matrikse kovalent olarak bağlanan enzimin çevresel faktörlerden daha az etkilenecek reaksiyonlardaki tekrar kullanımı artmaktadır.



Şekil 5.17: İmmobilize *BtADH*'ın 2-propanol oksidasyonunun tekrar kullanım sayısı.

5.5. İmmobilizasyon Genel Değerlendirme

İkili enzim sistemi reaksiyonlarında kullanılan *CmFDH* ve *BtADH*'ın Eupergit C 250 L üzerine immobilizasyonu başarıyla gerçekleştirildi. İmmobilizasyon optimizasyonu ve immobilize enzimin karakterizasyonu yapıldı. Serbest enzim ile immobilize enzimin katalitik değerlerinin ve reaksiyon şartlarının karşılaştırmalı değerlendirmeleri yapıldı. Bu çalışmada kullanılan iki enzim daha önce hiçbir çalışmada herhangi bir matrikse immobilize edilmedi. Bu çalışmada endüstriyel uygulamalarda kullanılan, reaktör uygulamalarına elverişli ve enzimlerle kovalent etkileşime girecek gruplara sahip Eupergit C 250 L matriksi kullanıldı.

Yapılan immobilizasyonlarda *CmFDH*'ın %72 immobilizasyon verimi ve %37,5 aktivite verimi bulundu. İmmobilize enzimin reaksiyon şartları optimizasyonun da optimum sıcaklık 55 °C ve pH 8,0 olarak serbest enzim şartlarıyla aynı bulundu. Katalitik olarak K_M değeri serbest *CmFDH* için 13,06 mM iken immobilize *CmFDH* için 19,1 mM olarak belirlendi. İmmobilize sistemde K_M değerinin artması substrata olan ilginin azaldığını göstermektedir. K_M değeri bize

enzimin substrata olan ilgisi hakkında bilgi verir. Düşük K_M 'e sahip bir enzimin substrata olan ilgisi fazladır. Çünkü enzim düşük substrat konsantrasyonunda maksimum hıza ulaşmıştır. Serbest *CmFDH*'ın k_{cat} değeri 0,86 dak.⁻¹ iken immobilize *CmFDH*'ın 0,31 dak.⁻¹ olarak tespit edildi. Katalitik verimlilik değeri olan k_{cat}/K_M değeri serbest *CmFDH* için 65,84 iken immobilize *CmFDH* için 16,23 olarak belirlendi. *BtADH*'ın Eupergit C 250 L üzerine immobilizasyonunda %52 immobilizasyon %43,8 aktivite veriminin olduğu bulundu. Reaksiyonlarda optimum sıcaklık 25-30 °C, optimum pH'da 9,0 olarak belirlendi. Bu değerler serbest enzimle aynı olduğunda *BtADH*'ın immobilize olmasıyla enzimin reaksiyon şartlarında bir değişim olmadığı görülmektedir. Katalitik değerlerin kıyaslamasında immobilize *BtADH*'ın K_M değeri 30,2 mM iken serbest enzimin 20,2 mM olarak bulunması immobilize enzimin K_M değerinin yükseldiği böylece substrata ilgisinin azaldığı görülmektedir. Immobilize *BtADH*'ın k_{cat} değeri 0,30 dak.⁻¹ iken serbest enzimin 0,78 dak.⁻¹ olarak bulunması immobilize enzimin k_{cat} değerinin azaldığını göstermektedir. Katalitik verimlilik değeri olarak k_{cat}/K_M değeri immobilize *BtADH* için 9,93 iken serbest enzim için 38,61 olarak bulundu. Bu değerler bize serbest enzime göre immobilize *BtADH* ve *CmFDH*'ın katalitik veriminin daha az olduğunu ve aynı miktar ürün için daha fazla süre gerektiğini göstermektedir. Kovalent immobilizasyonda enzimin matrikse bağlanma şekline bağlı olarak enzim substrat etkileşimi için aktif merkezde bazı değişiklikler olabilmekte ve sterik kısıtlama ile substrat transferi zorlaşmaktadır. Bu sebeple immobilize sistemlerde enzimin substrata ilgisi olan ve aktif merkezin yarısının dolması anlamına gelen K_M değerinin düşük çıkması beklenmektedir. K_M değerinin düşük çıkması ile birlikte aynı şekilde k_{cat} değeride immobilize enzimde daha düşük bulundu. k_{cat} bir saniyede veya bir dakikada bir enzim molekülünün substrattan oluşturduğu ürün sayısını vermektedir. Enzimin substrata bağlandıktan sonraki enzim aktivitesini göstermektedir. Enzimin immobilize olduktan sonra substrat ile etkileşimi ve kütle transferi açısından bazı kısıtlamalar bu değerinin düşük bulunmasına sebep olmaktadır. k_{cat}/K_M değeri ise enzimin total aktivitesini gösteren bir değerdir. Enzimin substrata bağlanmadan önce ve substrata bağlandıktan sonraki dönemleri kapsadığından enzim aktivite değerlerinin karşılaştırılmasında en önemli kriterdir. Immobilize edilen enzimlerin her ikisinin aktivite veriminde yaklaşık 4 kat azalma oldu. Buda bize serbest enzimle gerçekleştirilen bir reaksiyonun aynı verimle sonuçlanması için yaklaşık 4 kat fazla süre gerekmesi demektir. Genellikle immobilize sistemlerde enzim ve tekrar

kullanım sayısı kararlılığı artırıldığından uzun süreli reaksiyonlarla iyi sonuçlar alınabilmektedir.

İmmobilize *CmFDH*'ın saklama koşulları incelenmesinde 10 gün sonunda aktivitesinin %90'ını korurken 30 gün sonunda %50 aktivitesini muhafaza etmektedir. *CmFDH*'ın reaksiyonlarda tekrar kullanım sayısı tespiti deneyinde 13 tekrarlı aktivite sonunda %60 seviyelerinde aktivitesini koruduğu gözlemlendi. İmmobilize *BtADH*'ın saklama kararlılığı deneyinde 10 gün sonunda aktivitenin %90 ve 30 gün sonunda %40 oranında koruduğu görülmektedir. Tekrarlı aktivite deneyinde immobilize *BtADH*'ın 13 tekrar sonunda aktivitesinin %80'ini koruduğu görülmektedir. Genellikle tüm FDH'lar benzer kinetik özelliklere sahiptirler fakat bakteriyel FDH'lar diğer enzimlere göre daha kararlıdır. Örneğin *Pseudomonas sp.* fosfat tamponunda, pH 7,0'de, +4 °C'de en az 12 ay hiçbir aktivite kaybı olmaksızın saklanabilirken *C. Boidini* aynı şartlarda 2 haftada aktivitesinin %50'sini kaybetmektedir [Rojkova, 1999]. Bu sonuçlar bize maya kökenli FDH'ların kısa sürede aktivitelerini kaybettiklerini ve depolama kararlılıklarının düşük olduğunu göstermektedir. Serbest halde kararlı olamayan enzimler immobilize sistemlerle kararlı hale getirilmektedir. Bu çalışmada immobilize *CmFDH*'ın 10 gün sonunda hala %90'lar seviyesinde aktivitesini koruması yapılan immobilizasyonun depolama kararlılığını artırdığını göstermektedir. Yine enzimlerin operasyonel kararlılıkları verimlilik açısından önemlidir. İmmobilize edilen her iki enzimde de serbest forma göre tekrar kullanım kararlılıkları 13 kullanım sonunda yaklaşık %60-80 seviyelerinde korunmaktadır. Zamanla bu değerlerin azalması reaksiyon şartları etkisiyle zamanla proteinlerin bir kısmının denatürasyonu olması ve enzim inaktivasyonu gerçekleşmesidir.

İmmobilize *CmFDH*'ın sıcaklık kararlılığının serbest enzime göre 55 °C'den sonra yaklaşık olarak %15-35 oranında arttığı görülmektedir. Enzimin reaksiyonlardaki pH kararlılığı ise her pH'da immobilize *CmFDH*'ın serbeste göre arttığı görülmektedir. İmmobilize *BtADH*'ın sıcaklık kararlılığının 40 °C'den sonra serbest enzime göre %20-70 oranında arttığı ve pH kararlılığının ise tüm pH değerlerinde serbest enzime göre daha yüksek olduğu görülmektedir. İmmobilize *CmFDH* ve *BtADH*'ın serbest enzim formlarına göre sıcaklık kararlılıklarının daha yüksek olduğu bulundu. Bu sonuçlar bize serbest enzime kıyasla immobilize enzimlerin daha düşük inaktivasyon oranına sahip olduğunu ve sıcaklık değişimlerine daha az duyarlı olduğunu göstermektedir. İmmobilize enzimlerin daha

az hareketli olmaları sebebiyle sıcaklık etkisiyle enzimin denaturasyuna karşı daha dirençlidirler.

CmFDH ve *BtADH*'ın immobilizasyonunda immobilizasyon esnasında kararlılığının artırılması için 0,3 M süktroz ve bağlanan enzimlerin matriks üzerindeki boşta kalan epoksilerle reaksiyonunun engellenerek aktivite kayıplarının azalması için 0,5 M glisin ortama ilave edilerek inkübasyon gerçekleştirildi. Bu işlemler sonunda bağlanan enzim kararlılığının artırıldığı görüldü.

Sonuç olarak *CmFDH* ve *BtADH* Eupergit C 250 L üzerine başarılı bir Şekilde immobilize edilerek karakterize edildi. Karakterizasyon ve optimizasyon sonrasında her iki enzimin Eupergit C 250 L üzerine immobilize edilerek kofaktör rejenerasyonu için ikili enzim sistemi reaksiyonlarında kullanılabilir kararlılıkta ve kinetik değerlerde olduğu bulundu.

6. İKİLİ ENZİM SİSTEMİ REAKSİYONLARI

6.1. Materyal

(Etil metil keton (%99), metil propil keton (%90), 1- oktanol 8.20931.100, 1- hekzanol (%98), 1- propanol, 2- nonanol 107.04.11, 1,6 hekzandiol (%97), benzil alkol) Merck, (2,3 bütanedion (%89), siklopentanol (%99), 2- pentanol (%98), 1- nonanol (%98)) Aldrich, (2- bütanol (%99,5), 2-propanol (%99,5), 1-pentanol (%98) Sigma Aldrich, etanol (%99,8) Riedel-de haen, (1-dekanol (%97), 1,3 propandiol (%97)) Fluka Chemica'dan, 1-bütanol (%99+) Sigma, siklopentanon (%99) Alfa Aesar, etil asetat (%99,8) VWR, aseton (%99,5) Embay, diklormetan (%99,8) VWR firmalarından alındı.

6.2. Metod

6.2.1. İkili Enzim Sistemi ile Keton ve Aldehitlerin İndirgenmesi

0,2 M Sodyum format içeren 900 µl sodyum fosfat tampon çözeltisi (pH 7,5 50 mM) içerisine 50µl BSA (20 mg/ml), 20 µl *CmFDH* (1,128 mg/ml), 150 µl *BtADH* (0,65 mg/ml) , 2,5 µl (9-13 M) aldehit veya keton bileşiği, 80 µl NAD⁺ (100 mM) ve 20 µl NADH (100 mM) sırasıyla 1,5 ml'lik mikrotüplere ilave edilerek 25 °C'de, 150 rpm'de ısıtıcılı çalkalayıcıda 3 saat ve 20 saat reaksiyona tabi tutuldu. Reaksiyon sonrası 500 µl reaksiyon karışımı ve 500 µl etil asetat veya diklorometan ile iyice vortekste karıştırıldıktan sonra mikrosantrifüjde 13000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Aseton, metil propil keton, siklopentanon, asetaldehit, benzaldehit, 2,3 bütandion reaksiyon sonrası etil asetat ile etil metil keton da diklormetan ile ekstarkte edildi. Etilasetat ekstraksiyonda üst fazı diklormetan ekstraksiyonda da alt fazı olarak +4 °C'de GC'de analiz edilinceye kadar saklandı. Solventler kullanılırken +4 °C'de ve buz üzerinde bekletildi. Numuneler mikrotüplere alınarak ağızları parafin film ile iyice sarıldı.

6.2.2. Alkollerden Keton ve Aldehit Eldesi veya Alkollerin Yükseltgenmesi

Sodyum fosfat tampon çözeltisi içerisine 50 µl BSA (20 mg/ml), 150 µl *BtADH* (0,65 mg/ml), 2,5 µl (9-13 M) değişik alkol bileşikleri ve 80 µl NAD^+ (100 mM) sırasıyla 1,5 ml'lik mikrotüplere ilave edilerek 25 °C'de, 150 rpm'de ısıtıcılı çalkalayıcıda 4,5 saat ve 20 saat reaksiyona tabi tutuldu. Reaksiyon sonrası 500 µl reaksiyon karışımı ve 500 µl etil asetat veya diklormetan ile iyice vortekste karıştırıldıktan sonra mikrosantrifüjde 13000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilip etilasetat ekstraksiyonda üst fazı diklormetan ekstraksiyonda da alt fazı olarak +4 °C'de GC'de analiz edilinceye kadar saklandı. Etanol, 1- propanol, 1-bütanol, 1-pentanol, 1-hekzanol, 1-heptanol, 1-oktanol, 1-nonanol, 1-dekanol, 2-propanol, 2-pentanol, 2-nonanol, 1,3 propandiol, 1,6 heksandiol, benzil alkol ve siklopentanol reaksiyon sonrası etil asetat ile 2-bütanol ise diklorometan ile ekstrakte edildi. Solventler kullanılırken +4 °C'de ve buz üzerinde bekletildi. Numuneler mikrotüplere alınarak ağızları parafin film ile iyice sarıldı.

6.2.3. *CmFDH* ve *BtADH*'ın Eupergit C 250 L Üzerine İkili İmmobilizasyonu

Bir mikrotüpte (2 ml) sodyum fosfat (1000 µl, 0,6 M, pH 8,0) tampon çözeltisinde *CmFDH* (0,022 mg), değişik miktarlarda *BtADH* (0,21, 0,28, 0,35, 0,45 mg) ve süktroz (0,3 M) 25 °C'de, 500 rpm'de ve 75 dakika ısı kontrollü çalkalayıcıda inkübe edildi. 75 dakika sonra immobilizasyon ortamına 0,038 g glisin ilave edilerek aynı şartlarda 75 dakika daha inkübe edildi. İmmobilizasyon sonrasında 4 numaralı sinter cam filtre ile vakum altında 10 ml destile su ve 10 ml 0,05 M pH 7,0 sodyum fosfat tampon çözeltisi ile yıkanarak filtre edildi. Yıkanan ve filtre edilen matriks mikrotüpe alınarak reaksiyon gerçekleştirilinceye kadar +4 °C'de saklandı.

6.2.4.1. Eupergit C 250 L (10 mg) üzerine ikili immobilizasyon şartları

- *1 nolu immobilizasyon*

CmFDH (0,022 mg), *BtADH* (0,21 mg), sodyum fosfat tampon çözeltisi (1000 µl, 0,6 M pH 8,0), 0,3 M süktroz, 0,5 M glisin kullanılarak yukarıdaki şartlarda immobilizasyon gerçekleştirildi.

- *2 nolu immobilizasyon*

CmFDH (0,022 mg), *BtADH* (0,28 mg), sodyum fosfat tampon çözeltisi (1000 µl, 0,6 M pH 8,0), 0,3 M süktroz, 0,5 M glisin kullanılarak yukarıdaki şartlarda immobilizasyon gerçekleştirildi.

- *3 nolu immobilizasyon*

CmFDH (0,022 mg), *BtADH* (0,35 mg), sodyum fosfat tampon çözeltisi (1000 µl, 0,6 M pH 8,0), 0,3 M süktroz, 0,5 M glisin kullanılarak yukarıdaki şartlarda immobilizasyon gerçekleştirildi.

- *4 nolu immobilizasyon*

CmFDH (0,022 mg), *BtADH* (0,45 mg), B sodyum fosfat tampon çözeltisi (1000 µl, 0,6 M pH 8,0), 0,3 M süktroz, 0,5 M glisin kullanılarak yukarıdaki şartlarda immobilizasyon gerçekleştirildi.

6.2.4.2. Eupergit C 250 L (20 mg) üzerine ikili immobilizasyon şartları

- *5 nolu immobilizasyon*

CmFDH (0,022 mg), *BtADH* (0,21 mg), sodyum fosfat tampon çözeltisi (1000 µl, 0,6 M pH 8,0), 0,3 M süktroz, 0,5 M glisin kullanılarak yukarıdaki şartlarda immobilizasyon gerçekleştirildi.

- *6 nolu immobilizasyon*

CmFDH (0,022 mg), *BtADH* (0,28 mg), sodyum fosfat tampon çözeltisi (1000 µl, 0,6 M pH 8,0), 0,3 M süktroz, 0,5 M glisin kullanılarak yukarıdaki şartlarda immobilizasyon gerçekleştirildi.

- *7 nolu immobilizasyon*

CmFDH (0,022 mg), *BtADH* (0,35 mg), sodyum fosfat tampon çözeltisi (1000 µl, 0,6 M pH 8,0), 0,3 M süktroz, 0,5 M glisin kullanılarak yukarıdaki şartlarda immobilizasyon gerçekleştirildi.

- *8 nolu immobilizasyon*

CmFDH (0,022 mg), *BtADH* (0,45 mg), sodyum fosfat tampon çözeltisi (1000 µl, 0,6 M pH 8,0), 0,3 M süktroz, 0,5 M glisin kullanılarak yukarıdaki şartlarda immobilizasyon gerçekleştirildi.

6.2.4. İmmobilize Enzimlerle Kofaktör Rejenerasyonu Reaksiyonu ve Aktivite Ölçümü

0,2 M sodyum format içeren sodyum fosfat tampon çözeltisine (900 µl, pH 7,5 0,05 M) BSA (50 µl, 20mg/ml), immobilize enzim içeren Eupergit C 250 L, metil propil keton (2,5 µl, 10,64 M), NAD⁺ (100 mM, 80 µl), NADH (100 mM, 20µl) ilave edilerek reaksiyon başlatıldı. Reaksiyon 25 °C’de, 500 rpm’de ve 60 dakika ısı kontrollü çalkalayıcıda gerçekleştirildi. Her 10 dakikada bir numune alınarak mikropilaka okuyucuda 340 nm’de absorbansı ölçüldü. Aynı şartlarda immobilize sistemle kıyaslama yapmak için serbest enzim reaksiyonunda hazırlandı. Son hacim 200 µl olacak şekilde ve immobilizasyon ve aktivite verimlerine göre reaksiyona giren enzim ve substrat oranları ayarlandı ve yukarıdaki şartlarda 60 dakika reaksiyon gerçekleştirildi. NADH oluşumu reaksiyonu UV spektrofotometrede 340 nm’deki absorbansı ölçülerek takip edildi.

6.2.5. Serbest Enzimlerle Kofaktör Rejenerasyonu Reaksiyonu ve Aktivite Ölçümü

0,2 M sodyum format içeren sodyum fosfat tampon çözeltisine (150 µl, pH 7,5 0,05 M), *CmFDH* (4 µl, 1,128 mg/ml), *BtADH* (30-45 µl, 1,4 mg/ml), metil propil keton (0,5 µl, 10,64 M), NAD⁺ (100 mM, 16 µl), NADH (100 mM, 4µl) ilave edilerek reaksiyon başlatıldı. Reaksiyon 1 saat süre ile mikropilaka okuyucuda 340 nm’de NADH oluşumu ve kullanımı takibi ile gerçekleştirildi.

- *1 nolu reaksiyon*

CmFDH (4µl, 1,128 mg/ml) ve *BtADH* (30µl, 1,4 mg/ml mg), 0,2 M sodyum format içeren sodyum fosfat tampon çözeltisi (144 µl, pH 7,5 0,05 M), metil propil

keton (0,5 µl, 10,64 M), NAD⁺ (100 mM, 16 µl), NADH (100 mM, 4µl) ilave edilerek reaksiyon başlatıldı.

- *2 nolu reaksiyon*

CmFDH (4µl, 1,128 mg/ml), BtADH (35µl, 1,4 mg/ml mg), 0,2 M sodyum format içeren sodyum fosfat tampon çözeltisi (139 µl, pH 7,5 0,05 M) metil propil keton (0,5 µl, 10,64 M), NAD⁺ (100 mM, 16 µl), NADH (100 mM, 4µl) ilave edilerek reaksiyon başlatıldı.

- *3 nolu reaksiyon*

CmFDH (4µl, 1,128 mg/ml), BtADH (40µl, 1,4 mg/ml mg), 0,2 M sodyum format içeren sodyum fosfat tampon çözeltisi (134 µl, pH 7,5 0,05 M) metil propil keton (0,5 µl, 10,64 M), NAD⁺ (100 mM, 16 µl), NADH (100 mM, 4µl) ilave edilerek reaksiyon başlatıldı.

- *4 nolu reaksiyon*

CmFDH (4µl, 1,128 mg/ml), BtADH (45µl, 1,4 mg/ml mg), 0,2 M sodyum format içeren sodyum fosfat tampon çözeltisi (129 µl, pH 7,5 0,05 M) metil propil keton (0,5 µl, 10,64 M), NAD⁺ (100 mM, 16 µl), NADH (100 mM, 4µl) ilave edilerek reaksiyon başlatıldı.

6.2.6. BtADH oksidasyon ve Redüksiyon Reaksiyonları Gaz Kromatografisi (GC) Analizi

GC analizleri 30 m uzunluğunda 0,25 mm iç çapında, taşıyıcı gaz olarak azot gazı (1 ml/dakika) bulunduran ve flame iyonizasyon dedektör sıcaklığı 275 °C, split 500:1, akış hızı (1 ml/ dakika), Optima1 kolonu (Macherey-Nagel) takılı olan Agilent 6890 N gaz kromatografi cihazı ile yapıldı. Sıcaklık programı 40 °C/5 dakika, 1 °C/dakika yükselerek 50 °C 0,1 dakika bekletildi ve 25 °C/dakika yükselerek 130 °C olarak ayarlandı. Standart karışımı 2 µl keton aldehid bileşikleri 250 µl saf etil asetat içerisinde hazırlandı. 500 µl keton aldehid reaksiyonu 500 µl etil asetat ile karıştırılarak ekstrakte edildi. Üst kısımdaki etil asetat fazı alınarak GC de ürün analizi yapıldı. Etil metil keton ve 2-bütanol ekstraksiyonunda etil asetat ile etil metil ketonun üst üste çakışması sebebiyle ekstraksiyon solventi olarak diklormetan tercih edilmiştir.

- *Metil propil keton GC ayarları (Serbest)*

Split 500:1, 2 µl, inlet 275 °C, oven temp: 40 °C 5min, 1 °C / min 60 °C 0,1 min, 25 °C / min 130 °C

- *Metil propil keton GC ayarları (İmmobilize)*

Split 500:1, 1 µl, inlet 275 °C, oven temp: 40 °C 5min, 1 °C / min 50 °C 0,1 min, 35 °C / min 200 °C

- *2,3 bütandion GC ayarları*

Split 500:1, 2 µl, inlet 275 °C, oven temp: 40 °C 5min, 1 °C /min 50 °C 0,1 min, 25 °C / min 130 °C

- *1-hekzanol GC ayarları*

Split 500:1, 1 µl, inlet 275 °C, oven temp: 40 °C 1min, 5 °C /min 70 °C 0,01 min, 25 °C/min 200 °C

- *1-heptanol, 1-oktanol, 1-nonanol, 1-dekanol, siklopentanol, benzil alkol GC ayarları*

Split 500:1, 1ul, inlet 275 °C, oven temp: 40 °C 1min, 5 °C /min 70 °C 0,01 min, 25 °C /min 250 °C

- *2-pentanol, 1,3 propandiol, 1,6 hekzandiol, 2 nonanol, 2-bütanol GC ayarları*

Split 500:1, 1ul, inlet 275 °C oven temp: 40 °C 1min, 5 °C /min 70 °C 0,01 min, 25 °C/min 200 °C

6.3. Deney Sonuçları ve Tartışma

Son yıllarda genetik mühendisliği ve teknolojik ilerlemeler sebebiyle daha seçici, güvenli ve temiz reaksiyonlar için enzimlerin endüstriyel uygulamalarda kullanımlarına ilgi artmaktadır. Bu enzimlerin çoğunun kofaktör bağımlı ve maliyetlerinin yüksek olmaları sebebiyle endüstriyel uygulamalardaki kullanımları sınırlı olmaktadır. NAD bağımlı oksidoredüktazlar karbonil gruplarının asimetric indirgenmesiyle alkol ve aminlere dönüşümünü katalizlemektedirler. Ama bu enzimlerin kofaktör kullanmaları sebebiyle büyük ölçekli uygulamalarda daha az kullanılmaktadırlar. Ortamdaki kofaktörün değişik sistemlerle regene edilmesiyle bu problem çözülmektedir. Kofaktör rejenerasyon yöntemlerinden en çok kullanılan format/format dehidrogenaz (FDH) sistemidir. Bu çalışmada *BtADH*'ın keton indirgenmesi reaksiyonlarında NADH ihtiyacı ortama *CmFDH* enzimi ve sodyum

format substratı ilavesiyle kofaktör rejenerasyonu gerçekleştirilerek sağlandı. Öncelikle kofaktör rejenerasyonunun UV spektrofotometrede anlık takibi deneyleri yapıldı. İkili enzim sistemi ile kofaktör rejenerasyonu ve kiral alkol sentezi reaksiyonları serbest enzim ile ve uygun reaksiyon şartlarında UV spektrofotometrede 340 nm’de reaksiyon takibi ile gerçekleştirildi.

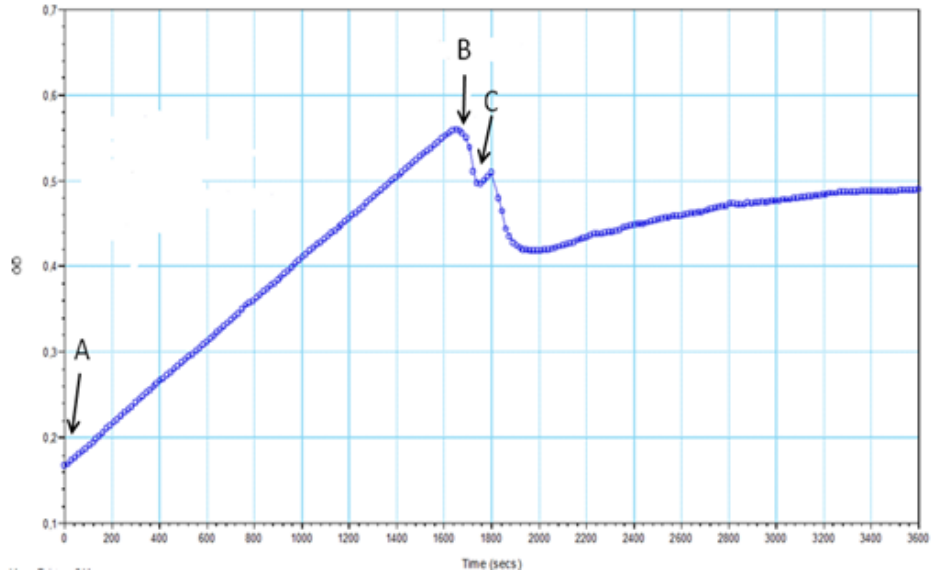
Şekil 6.1’de görüldüğü gibi reaksiyon öncelikle ortamda *CmFDH* olduğundan dolayı NAD^+ ’nın NADH ’a dönüşümü yönünde devam ettiğinden 340 nm’de absorbans artışı gerçekleşti.

Belli bir değerde ortama *CmFDH* miktarının 3 katı yani 30 μg *BtADH* ilave edildiğinde bu sefer ortamda oluşan NADH molekülleriyle *BtADH* 2-bütanolü tekrar etil metil ketona dönüştürmeye başladı. Reaksiyonun bu yönde olduğunun takibi UV spektrofotometrede 340 nm’de absorbans azalmasıyla gözlemlendi. Bu deney ile uygun şartlarda kofaktör rejenerasyonunun gerçekleştirildiği UV spektrofotometredeki absorbans takibi ile gösterildi. Şekil 6.1’de görüldüğü gibi etil metil ketonun bir sekonder alkol olan 2-bütanole dönüşümü ortama *BtADH* ilavesiyle gerçekleştirilmiştir. Bir süre sonra eğrinin düzleşmesi *CmFDH* ve *BtADH* enzimlerinin aynı hızda çalışmalarından dolayı oluşan NADH ile dönüştürülen NAD^+ ’nin aynı miktar olmasından kaynaklanmaktadır.

Şekil 6.2’de ortamda *CmFDH* varken NADH oluşumunun gerçekleştiği ve 340 nm’de absorbansın arttığı görülmektedir. Belli bir süreden sonra ortama *BtADH* ilavesiyle metil propil ketonun 2-pentanole dönüşümü için gerekli NADH ortamda bulunduğundan *BtADH* NADH ’ı kullandığından absorbans ani bir şekilde düşmektedir. Daha sonra iki enzim aynı anda çalıştıklarından NADH bir taraftan oluşturulurken bir taraftan da tüketilmektedir. *CmFDH*’ın spesifik aktivitesi *BtADH*’tan daha fazla olduğundan tekrar NADH yönünde bir artma görülmektedir.

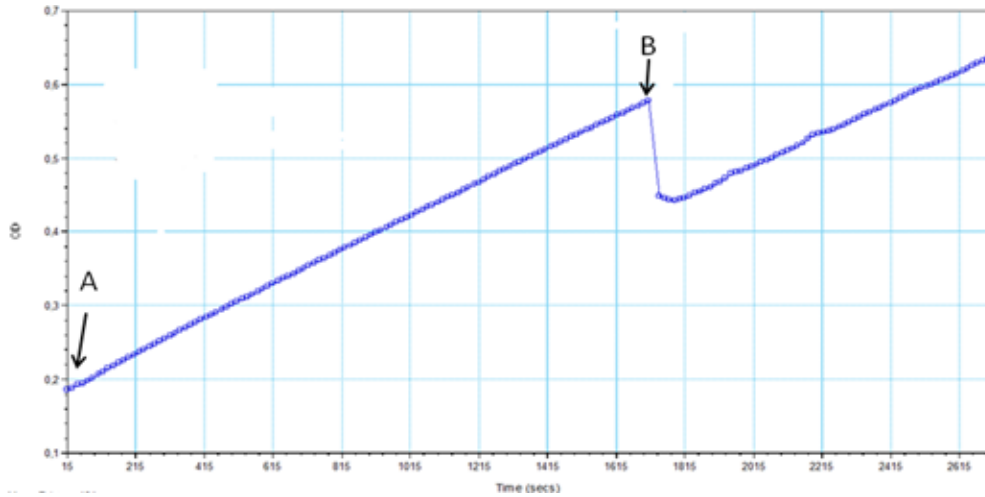
Şekil 6.3’de ise kofaktör rejenerasyonu aynı enzimlerle fakat farklı bir substrat olan 2,3 bütandionla gerçekleştirildi. Ortamda *CmFDH* olduğunda absorbans artışı devam ederken ortama *BtADH* ilavesiyle NADH kullanıldığında absorbans düşmektedir. Burada ikili enzim sistemi ile kofaktör rejenerasyonu gerçekleştirilerek 2,3 bütandionun 2,3 bütandiol’e dönüşümü UV spektrofotometrede kofaktör takibi ile gösterildi. Şekil 6.4’de ise benzaldehidin ikili enzim sistemi ile kofaktör rejenerasyonu gösterilmektedir. *CmFDH* ile başlayan reaksiyon NADH oluşumu sebebiyle absorbans artışı gösterirken ortama *BtADH* ilavesiyle NADH kullanıldığından 340 nm’de absorbans azalması görülmektedir. Bu sonuç

benzaldehyd substrarı ile yapılan ikili sistemde kofaktör rejenerasyonunda iki enzimin aktif olarak çalıştığını göstermektedir.



Şekil 6.1: İkili enzim sistemi ile kofaktör rejenerasyonu gerçekleştirilerek etil metil ketonun redüksiyonu.

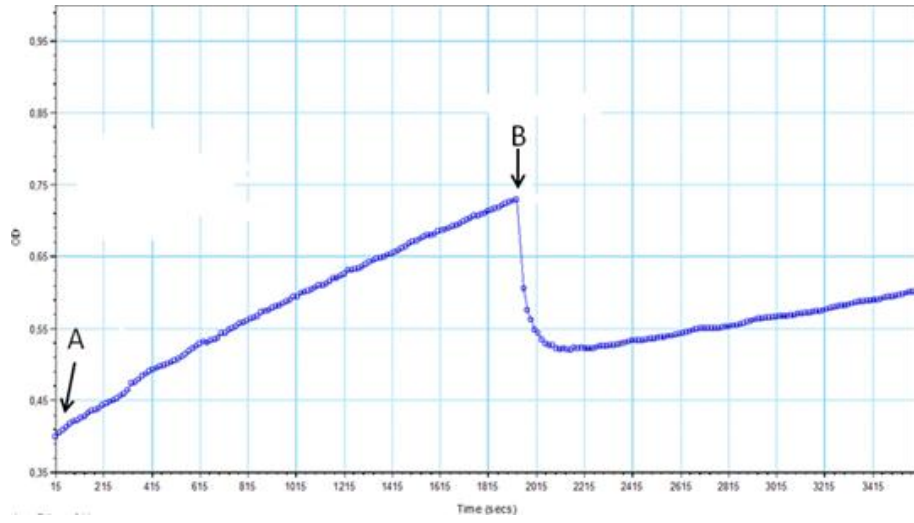
Şekil 6.1’de A) Reaksiyon öncelikle 50 mM pH 7,5 sodyum fosfat tampon çözeltisi içinde 200 mM sodyum format, 10 mM etil metil keton, 1mM NAD^+ ve 5 μg *CmFDH* ilavesiyle reaksiyon başlatıldı. B) bu noktadan itibaren 30 μg *BtADH*, C) tekrar 30 μg *BtADH* ilave edilerek reaksiyon gerçekleştirildi.



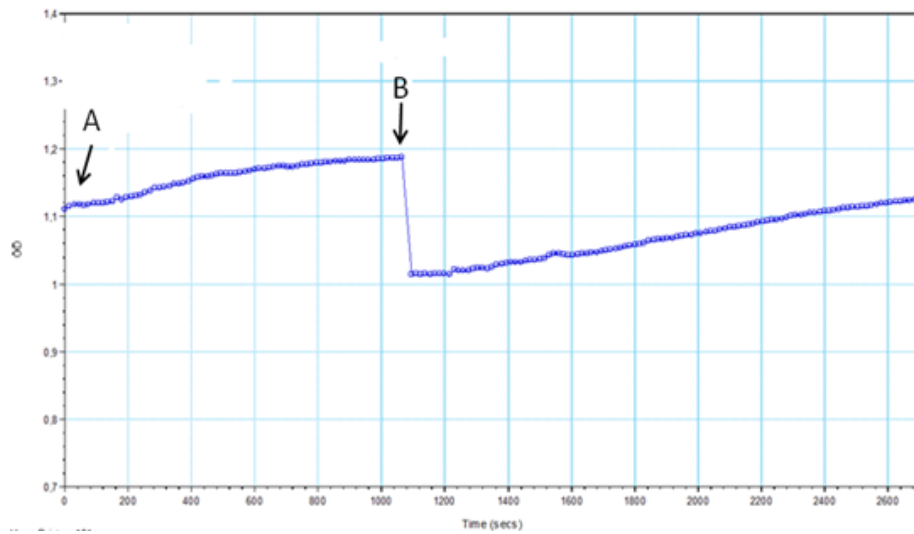
Şekil 6.2: İkili enzim sistemi ile kofaktör rejenerasyonu gerçekleştirilerek metil propil ketonun redüksiyonu.

Şekil 6.2’de A) Reaksiyon öncelikle 50 mM pH 7,5 sodyum fosfat tampon çözeltisi içinde 200 mM sodyum format, 10 mM metil propil keton, 1mM NAD⁺ ve 5 µg CmFDH ilavesiyle reaksiyon başlatıldı. B) bu noktadan itibaren 30 µg BtADH ilave edilerek reaksiyon gerçekleştirildi.

Şekil 6.3’de A) Reaksiyon öncelikle 50 mM pH 7,5 sodyum fosfat tampon çözeltisi içinde 200 mM sodyum format, 10 mM 2,3 bütandion, 1mM NAD⁺ ve 5 µg CmFDH ilavesiyle reaksiyon başlatıldı. B) bu noktadan itibaren 30 µg BtADH ilave edilerek reaksiyon gerçekleştirildi.



Şekil 6.3: İkili enzim sistemi ile kofaktör rejenerasyonu gerçekleştirilerek 2,3 bütandion redüksiyonu.



Şekil 6.4: İkili enzim sistemi ile kofaktör rejenerasyonu gerçekleştirilerek benzaldehid redüksiyonu.

Şekil 6.4’de A) Reaksiyon öncelikle 50 mM pH 7,5 sodyum fosfat tampon çözeltisi içinde 200 mM sodyum format, 10 mM benzaldehid, 1mM NAD⁺ ve 5 µg *CmFDH* ilavesiyle reaksiyon başlatıldı. B) bu noktadan itibaren 30 µg *BtADH* ilave edilerek reaksiyon gerçekleştirildi.

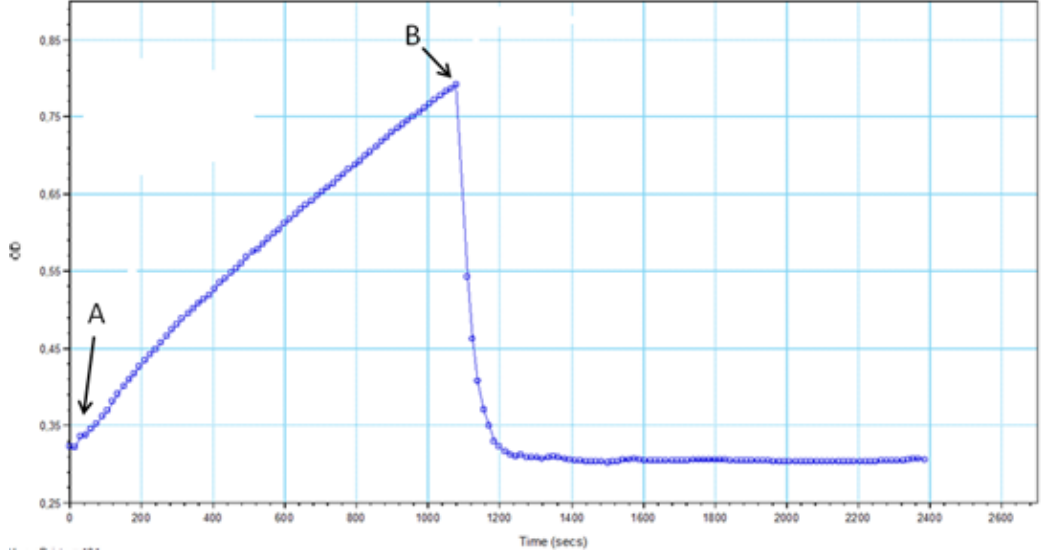
Şekil 6.5’de ise farklı bir aldehit olan asetaldehit kullanımı ile kofaktör rejenerasyonu UV spektrofotometrik takip ile gösterilmektedir. *CmFDH* varlığında artan absorbans ortama *BtADH* ilavesiyle hızlı bir şekilde azalmakta ve sonra ikili sistem aynı anda çalıştığından belli bir hızda kofaktör oluşumu ve kullanılması gerçekleşmektedir.

Yukarıda verilen keton ve aldehit örneklerinin kullanılarak ikili enzim sistemi ile kofaktör rejenerasyonu UV spektrofotometrede 340 nm’de absorbans takibi ile gösterilmektedir. Bu sonuçlar iki enzimin aynı ortamda çalışabildiğini ve ürün oluşturabileceğini göstermektedir.

Serbest enzimlerle kofaktör rejenerasyonu gerçekleştirildiği UV spektrofotometre ile gösterildikten sonra bu iki enzimin Eupergit C 250 L matriksine immobilize edilerek reaktörlerde kullanılabilir olup olmadığı denendi. Beşinci bölümde ayrıntılı olarak gösterildiği gibi *CmFDH* ve *BtADH*’ın Eupergit C 250 L üzerine ayrı ayrı immobilizasyonu ve karakterizasyonu başarıyla gerçekleştirildi. Bu bölümde ise aynı matriks üzerine iki enzim aynı anda immobilize edilerek ikili immobilizasyon gerçekleştirildi. İmmobilizyon farklı miktarlarda enzim ve matriks kullanımı ile gerçekleştirildi. 10 mg ve 20 mg Eupergit C 250 L üzerine yapılan immobilizasyonlarda ayrı ayrı kofaktör oluşumu ve harcanması UV spektrofotometrede takip edildi.

İkili immobilizasyon gerçekleştirilen oranlarda immobilize ve serbest ikili sistemi kıyaslamak için aynı şartlarda serbest enzim ile metil propil keton substratı kullanılarak 340 nm’de reaksiyon takibi gerçekleştirildi. Şekil 6.6’da farklı oranlarda serbest *CmFDH* (0,004 mg), *BtADH* (0,04 mg) kullanılarak ikili enzim sistemi ile kofaktör oluşumu takibi mikropilaka okuyucu ekran görüntüsü görülmektedir. Şekil 6.6’da görüldüğü gibi reaksiyon NAD⁺ oluşumu yönünde ilerlemektedir. *BtADH*’ın spesifik aktivitesi *CmFDH*’tan daha az olması sebebiyle *BtADH* reaksiyon ortamında on kat fazla kullanıldı. Bu sebeple NAD⁺ oluşum hızı NADH oluşumundan daha fazla olduğundan 340 nm’de absorbans azalması görülmektedir. Azalmanın çok hızlı olmaması iki enzimin çalıştığını fakat *BtADH*’ın aktivitesinin daha fazla olduğunu göstermektedir. Reaksiyonun bu şekilde 1 saat süre ile takibi bize metil propil

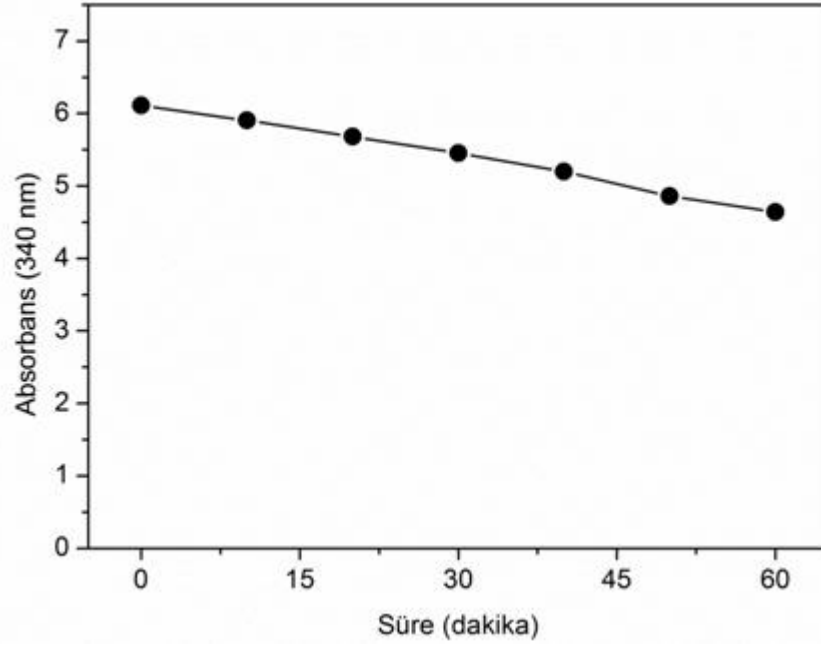
ketonun 2-pentanolle dönüşümünün verimli bir Şekilde gerçekleştiğini ve *CmFDH* ve *BtADH* miktarının kofaktör rejenerasyonu için ideal seviyeye yakın olduğunu göstermektedir.



Şekil 6.5: İkili enzim sistemi ile kofaktör rejenerasyonu gerçekleştirilerek asetaldehid redüksiyonu.

Şekil 6.5’de A) Reaksiyon öncelikle 50 mM pH 7,5 sodyum fosfat tampon çözeltisi içinde 200 mM sodyum format, 10 mM asetaldehid, 1mM NAD^+ ve 5 μg *CmFDH* ilavesiyle reaksiyon başlatıldı. B) bu noktadan itibaren 30 μg *BtADH* ilave edilerek reaksiyon gerçekleştirildi.

Şekil 6.7’de farklı oranlarda serbest *CmFDH* (0,004 mg), *BtADH* (0,06 mg) kullanılarak ikili enzim sistemi ile kofaktör oluşumu takibi ekran görüntüsü verilmiştir. *BtADH* miktarının artırılması *BtADH*’ın NAD^+ oluşum hızını bir miktar artırdığı görülmektedir. 340 nm’deki absorbans azalmasına artan *BtADH* miktarının NADH kullanımını artırması neden olmaktadır. İkili enzim sistemindeki reaksiyon *BtADH* aktivitesi yönünde devam etmesine rağmen azalışın biraz artması bize iki enzim oranının sekonder alkol oluşumunu dahada artıracak Şekilde ilerlerken ideal seviye olan denge konumundan uzaklaştığını göstermektedir.



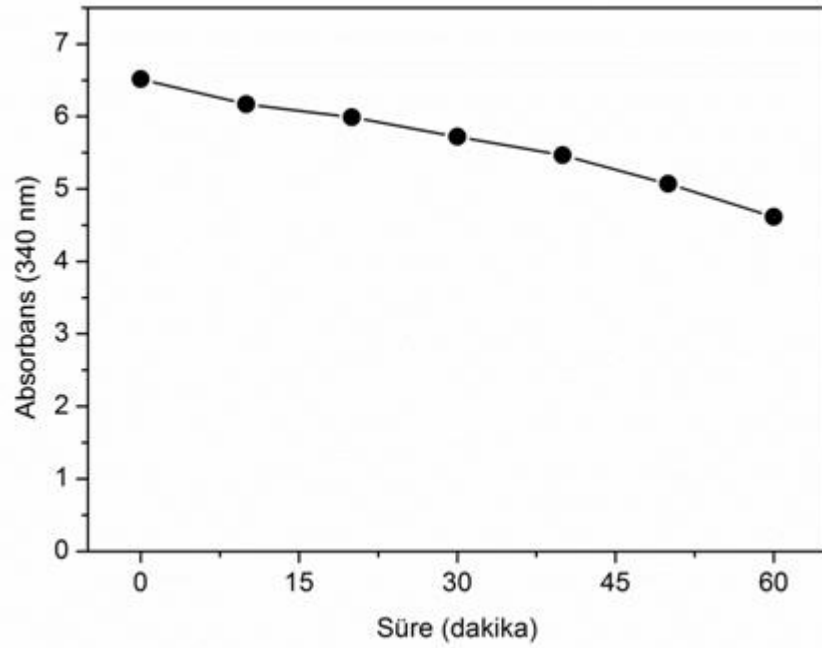
Şekil 6.6: Farklı oranlarda serbest *CmFDH* (0,004 mg), *BtADH* (0,04 mg) kullanılarak ikili enzim sistemi ile kofaktör oluşumu takibi.

Şekil 6.6'ki şekil çiziminde kofaktör dönüşümleri belirlenmesi için kullanılan absorbans değerleri 5 kat seyreltme faktörü ile hesaplanmıştır.

Şekil 6.8'de ise ikili immobilize sistemin kofaktör oluşumu ve harcanması takibi gösterilmektedir. Burada ise NADH harcanma hızı *BtADH* artışı sebebiyle bir miktar daha artmaktadır. *BtADH* enziminin bir miktar daha artırıldığı 4 nolu reaksiyonda Şekil 6.9'da gösterilmektedir. Burada da artan *BtADH*'ın 340 nm'deki absorbansı daha da azalttığı görülmektedir. Serbest ikili enzim sistemi ile yapılan deneylerde ikili enzim sisteminin çalıştığı ve kofaktör rejenerasyonunu gerçekleştirdiği görülmektedir. En ideale yakın immobilizasyon enzim oranının 1 nolu ikili enzim reaksiyonu olduğu görülmektedir. *BtADH* toplam unit aktivitesinin *CmFDH*'dan daha fazla olduğu ve 340 nm'deki absorbansın belli bir hızda azaldığı Şekil 6.6'da görülmektedir. Bu da bize reaksiyonun NAD^+ oluşumu yönünde ilerlediğini ve sekonder alkol oluştuğunu göstermektedir. Diğer ikili enzim sistemi reaksiyonu şartlarında (2, 3 ve 4 nolu) ise artan *BtADH* miktarının NADH miktarını azaltıcı yönde etkide bulunduğu görülmektedir.

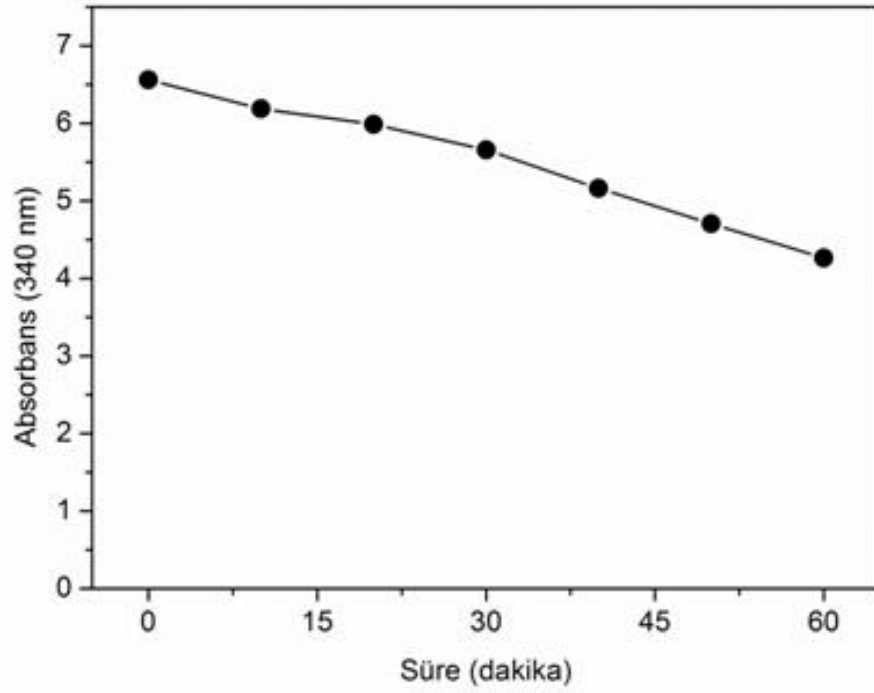
Aynı şartlarda immobilize sistemin kofaktör oluşumu takibi UV spektrofotometrede gerçekleştirildi. Beşinci bölümde ayrıntılı olarak açıklandığı gibi *CmFDH* ve *BtADH*'ın immobilizasyonunda optimum Eupergit C 250 L matriksi 10 mg olarak belirlendi. Bu sebeple ikili immobilizasyonda 10 mg ve 20 mg matriks

kullanılarak etkileri belirlendi. Şekil 6.10'da 10 mg matriks üzerine yapılan 1, 2, 3 ve 4 nolu immobilizasyonlarının ikili sistem reaksiyonlarının kofaktör oluşumu takip edilmektedir. Şekil 6.10'da görüldüğü gibi 4 farklı immobilizasyonda da 60 dakikalık reaksiyon takibinde NADH miktarı zamanla azalmaktadır. Buda bize immobilize *BtADH*'ın toplam unit aktivitesinin *CmFDH*'tan daha yüksek olduğunu göstermektedir. Bu sonuç *CmFDH*'ın serbest formunun spesifik aktivitesinin *BtADH*'ın spesifik aktivitesinden yaklaşık 4 kat fazla olması ile paralellik göstermektedir.



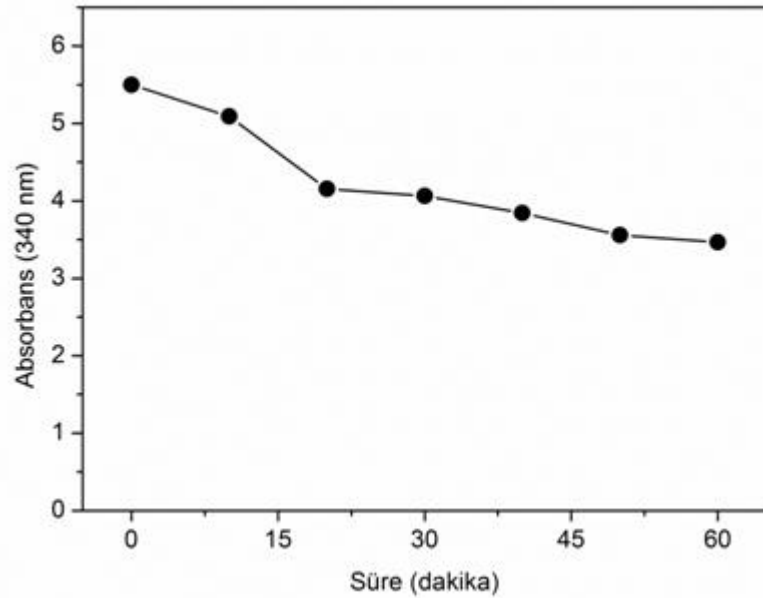
Şekil 6.7: Farklı oranlarda serbest *CmFDH* (0,004 mg), *BtADH* (0,06 mg) kullanılarak ikili enzim sistemi ile kofaktör oluşumu takibi.

Şekil 6.7'de şekil çiziminde kofaktör dönüşümleri belirlenmesi için kullanılan absorbans değerleri 5 kat seyreltme faktörü ile hesaplanmıştır.



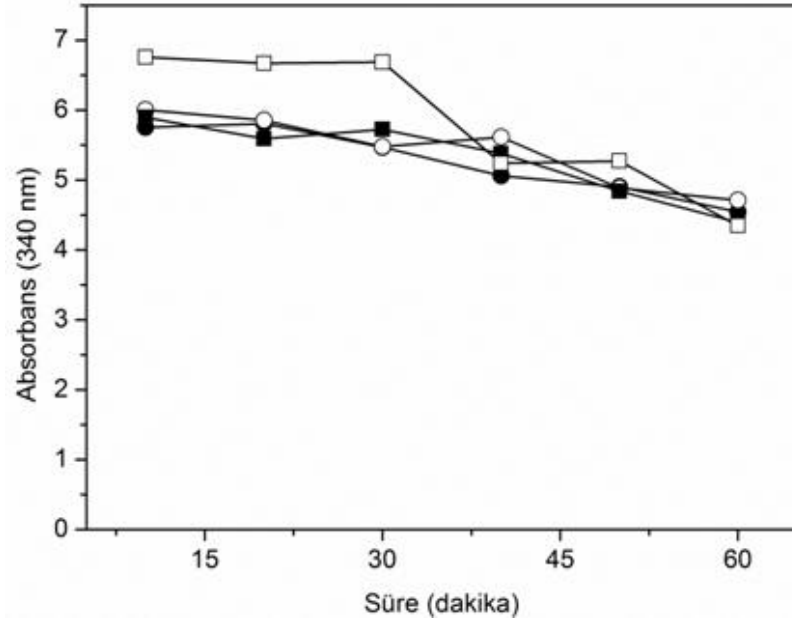
Şekil 6.8: Farklı oranlarda serbest *CmFDH* (0,004 mg), *BtADH* (0,07 mg) kullanılarak ikili enzim sistemi ile kofaktör oluşumu takibi.

Şekil 6.8’de ki şekil çiziminde kofaktör dönüşümleri belirlenmesi için kullanılan absorbans değerleri 5 kat seyreltme faktörü ile hesaplanmıştır.



Şekil 6.9: Farklı oranlarda serbest *CmFDH* (0,004 mg), *BtADH* (0,09 mg) kullanılarak ikili enzim sistemi ile kofaktör oluşumu takibi.

Şekil 6.9’da kofaktör dönüşümleri belirlenmesi için kullanılan absorbans değerleri 5 kat seyreltme faktörü ile hesaplanmıştır.



Şekil 6.10: 1 (■), 2 (□), 3 (●) ve 4 (○) nolu ikili immobilizasyonu 60 dakikalık reaksiyonu kofaktör dönüşümü takibi.

Şekil 6.10’da ki immobilizasyon ve reaksiyon şartları materyal metod kısmında açıklanmıştır. Şekil çiziminde kofaktör dönüşümleri belirlenmesi için kullanılan absorbans değerleri 5 kat seyreltme faktörü ile hesaplanmıştır.

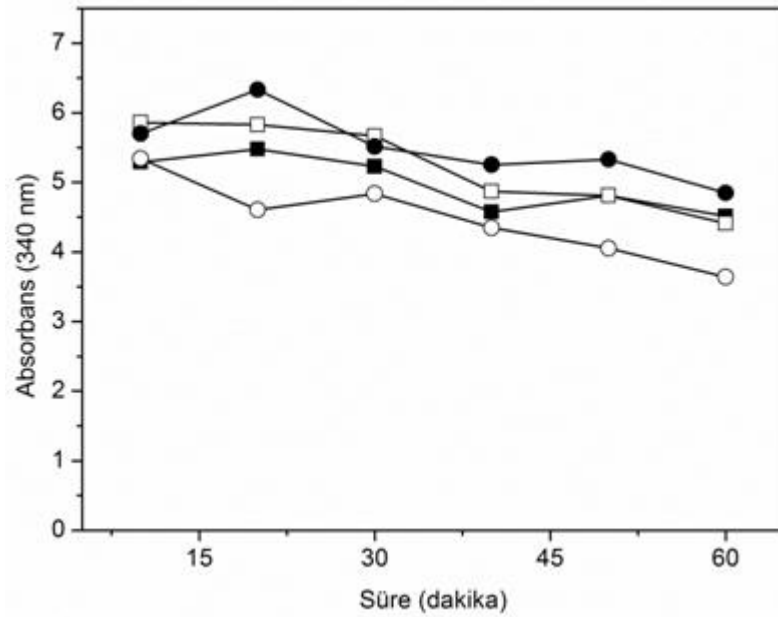
Bu aktivite farkı sebebiyle immobilize sistemde *BtADH* miktarını 10 kat fazla aldığımız için aktivite *BtADH* yönünde devam etmektedir. Aynı zamanda serbest forma göre kıyasladığımızda bağlanan *CmFDH*’ın serbest enzime göre aktivitesinin daha az olduğu görülmektedir.

Eupergit C 250 L matriksinin 20 mg kullanılarak gerçekleştirildiği reaksiyonlar (5, 6, 7 ve 8 nolu) Şekil 6.11’de gösterilmektedir. Burada da iki enzimin toplam unit aktivitesinin 10 mg matriks deki sonuçlarla paralel olduğu görülmektedir. Matriks miktarının iki katına çıkarılması bağlanan enzimlerin aktivitelerinin 1, 2, 3 ve 4 nolu immobilizasyon reaksiyonlarındakine benzer olduğu görülmektedir. Bağlanan *CmFDH*’ın serbest forma göre aktivite kaybının olması sebebiyle NADH azalması yönünde reaksiyon ilerlemektedir.

Bu sonuçlar bize serbest ve immobilize ikili enzim sisteminin verimli bir şekilde çalışarak kofaktör rejenerasyonunu gerçekleştirdiğini UV spektrofotometredeki reaksiyon takibi ile göstermektedir.

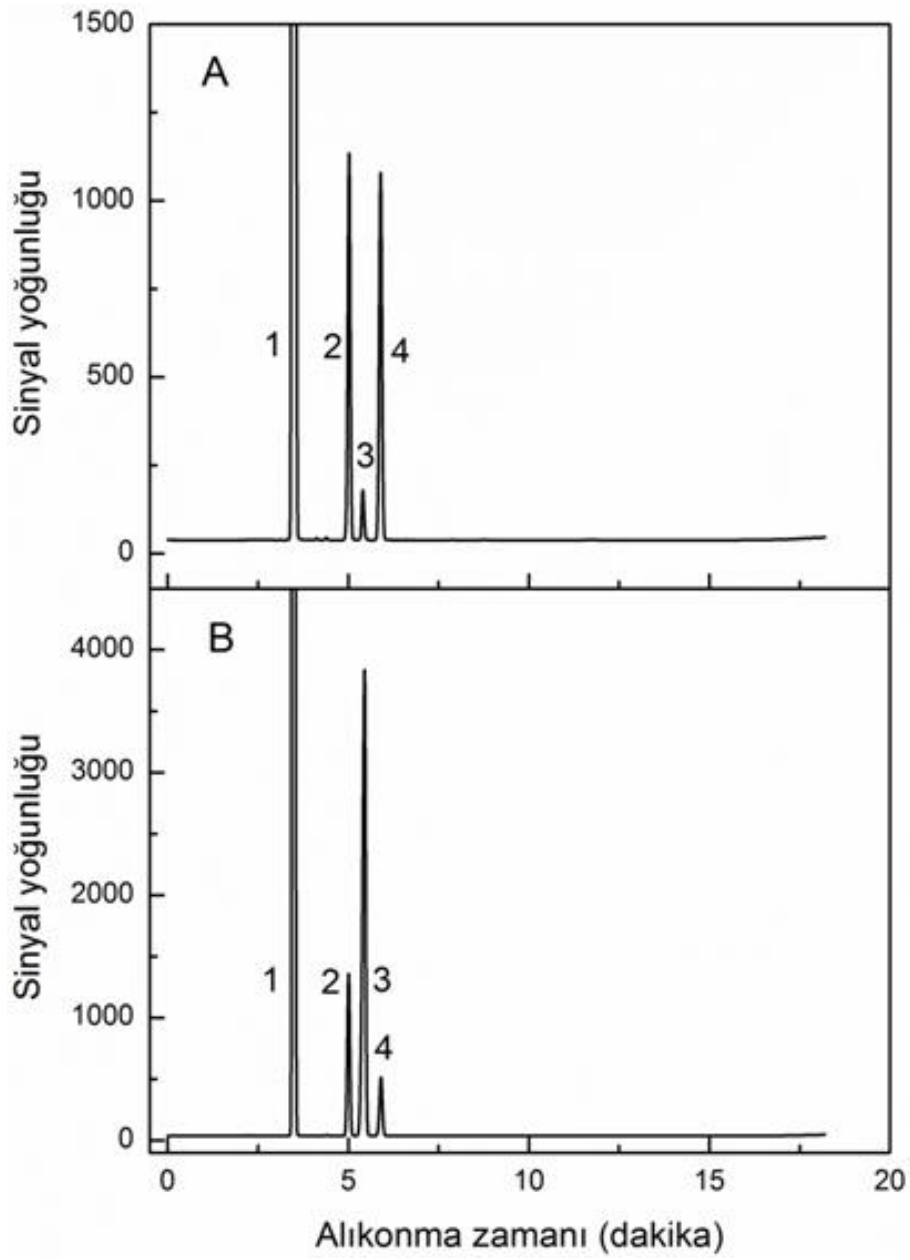
Serbest ve immobilize enzimlerle kofaktör rejenerasyonu gösterildikten sonra *BtADH*'ın aktivite gösterdiği substratlarla reaksiyon hazırlayıp Gaz kromatografisinde (GC) ürün analizleri yapıldı. Bu bölümde aktivite gösteren substratlardan bazılarının GC analizleri verilerek sonuçlar değerlendirilmektedir. Aktivite görülen diğer substratların GC analiz sonuçları ekte verilmiştir.

Etil metil keton substratının standart olarak alıkonma zamanlarının belirlenmesi için GC-FID kolona yüklendi. Kolonda yürütülme sonunda standart olarak etil metil ketonun (EMK) alıkonma zamanı 5,02, 2- bütanolün ise 5,40 dakika olarak tespit edildi (Şekil 6.12). Ekstraksiyon için kullanılan diklormetanın alıkonma zamanı ise 3,43 dakika olarak belirlendi. Daha sonra Şekil 6.12'de görüldüğü gibi ikili enzim sistemi ile gerçekleştirilen 3 saatlik reaksiyon sonucunda etil metil keton azalarak 2-bütanol artmaktadır. Bu sonuç bize *BtADH*'ın *CmFDH* yardımıyla kofaktör rejenerasyonu gerçekleştirilerek etil metil ketonu 2-bütanole dönüştürdüğünü göstermektedir. Şekil 6.13'de ise 2- bütanolün *BtADH* ile 4,5 saatlik reaksiyonu GC analizi gösterilmiştir.



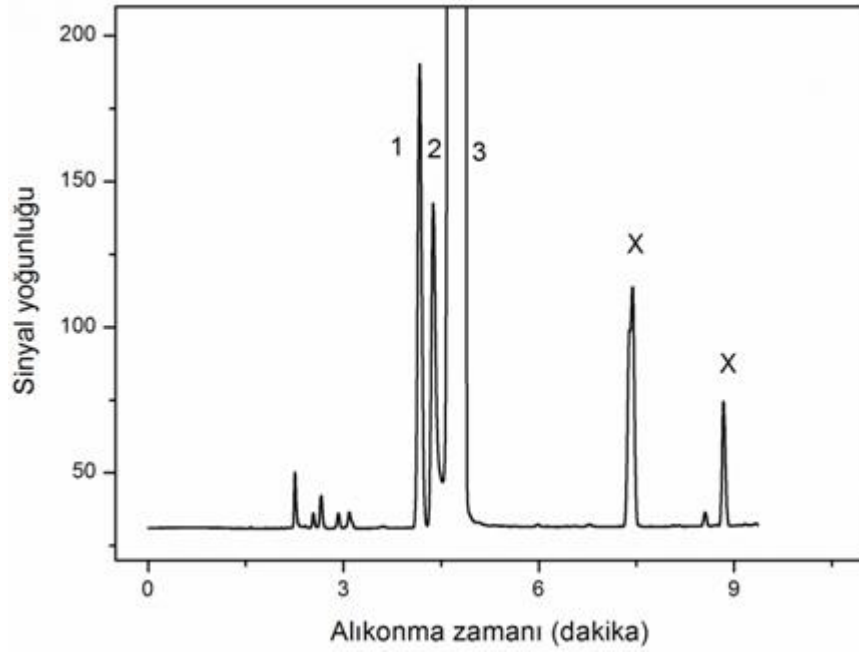
Şekil 6.11: 5 (■), 6 (□), 7 (●) ve 8 (○) nolu ikili immobilizasyonu 60 dakikalık reaksiyonu kofaktör dönüşümü takibi.

Şekil 6.11'de ki immobilizasyon ve reaksiyon şartları materyal metod kısmında açıklanmıştır. Şekil çiziminde kofaktör dönüşümleri belirlenmesi için kullanılan absorbans değerleri 5 kat seyreltme faktörü ile hesaplanmıştır.



Şekil 6.12: A) Etil metil ketonun ikili enzim sistemi ile 3 saatlik reaksiyonunun ve B) standartının GC analizi.

Şekil 6.12’de ki gaz kromatografisi analizi sonuçlarına göre bileşiklerin alıkonma zamanları 1) diklorometan 3,43 dakika, 2) etil metil keton 5,02 dakika, 3) bilinmeyen pik ve 4) 2-bütanol 5,4 dakikadır.



Şekil 6.13: 2-bütanol'ün 4,5 saatlik reaksiyonunun GC analizi.

Şekil 6.13'de ki gaz kromatografisi analizi sonuçlarına göre bileşiklerin alıkonma zamanları 1) 2-bütanon 4,17 dakika, 2) 2-bütanol 4,38 dakika, 3) etil asetat 4,83 dakika ve X) pikleri ise safsızlıktır.

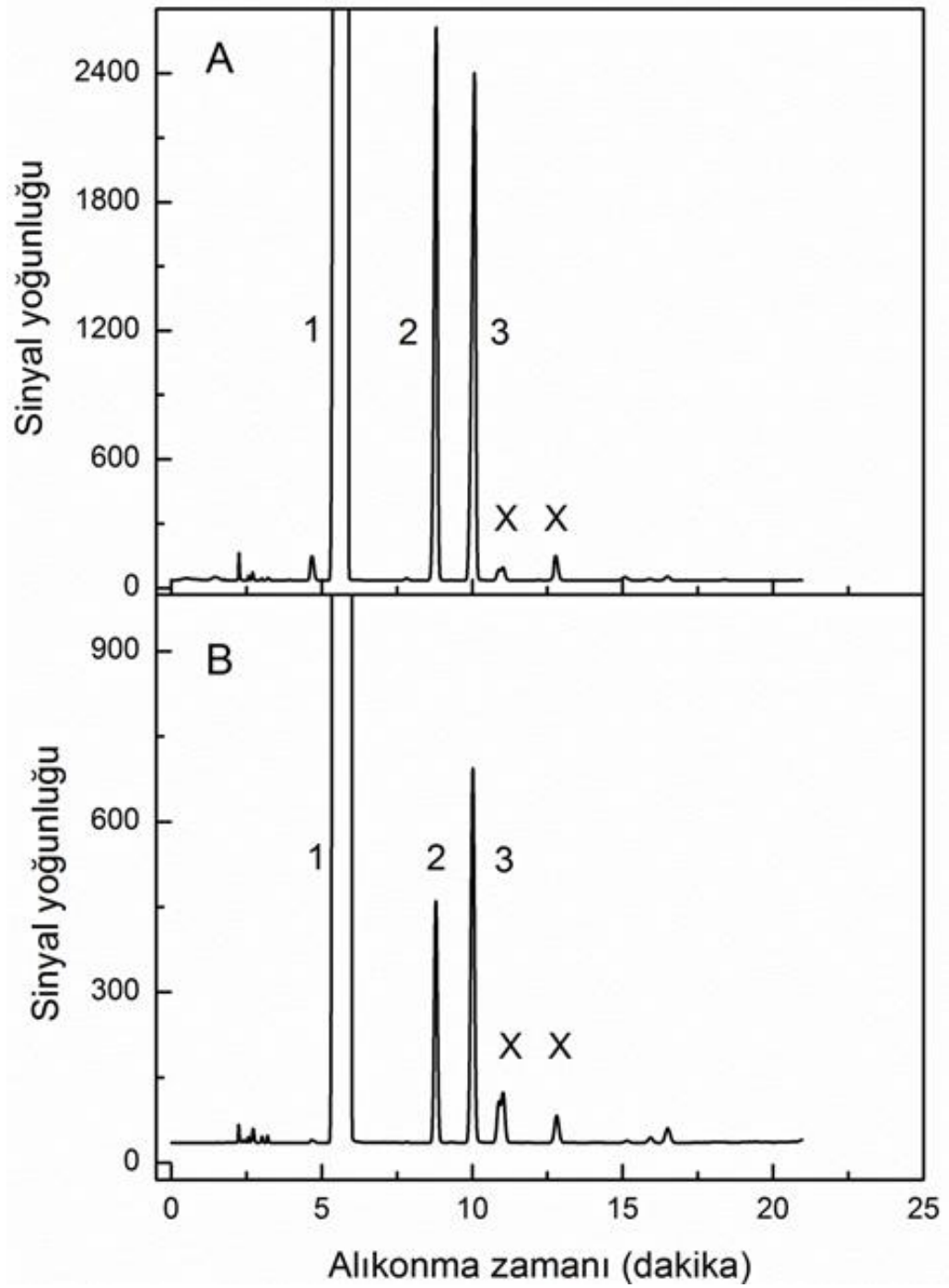
Şekil 6.14.'de metil propil keton ve 2-pentanol standardı ile 20 saatlik reaksiyon Şekilleri ikili Şekil şeklinde çizilerek ürün oluşumu daha net olarak gösterildi. Şekil 6.14. (A)'da metil propil keton (MPK) standardının pikleri görülmektedir. Metil propil ketonun alıkonma zamanı 8,79, 2- pentanolün ise 10,07 dakika olarak belirlendi. Şekil 6.14. (B)'de ise 20 saatlik reaksiyonun sonucundaki pikler görülmektedir. 20 saatlik reaksiyonda metil propil keton pikinin azaldığı ve 2-pentanol pikinin ise arttığı gözlenmektedir. Bu sonuçlar bize serbest ikili enzim sisteminin verimli bir Şekilde çalışarak metil propil keton substratını 2-pentanole dönüştürdüğünü göstermektedir.

Şekil 6.15'de 2-propanolün serbest ikili enzim sistemi ile 20 saatlik reaksiyonunun GC analizi grafiği verilmiştir. Bu Şekilde aseton substratının alıkonma zamanı 2,6 dakika ve 2-propanol'ün ise 2,75 dakika olduğu görülmektedir. Şekil 6.15'de 2- propanol standardı ile 2- propanolün 20 saatlik reaksiyonunun GC analizi grafiği ikili Şekil şeklinde çizilerek zamanla aseton oluşumu gösterilmiştir. Bu sonuçlar bize bir sekonder alkol olan 2-propanolün *BtADH* ile 20 satlık reaksiyon sonucunda aseton oluşumunu gerçekleştirdiğini göstermektedir.

Şekil 6.17 (A)'da siklopentanon ketonunun standart olarak GC analizi görülmektedir. Siklopentanonun alıkonma zamanı olarak 16,33 dakika olarak tespit edildi. Şekil 6.16'da siklopatnonun ikili enzim sistemi ile 3 saatlik reaksiyonu sonucunda siklopentanolün 16,61 dakikada reaksiyonda üretildiği görülmektedir. Şekil 6.17 (B)'de 20 saatlik reaksiyon sonucu siklopentanol pikinin daha da arttığı gözlenmektedir. Şekil 6.17'de standart ve 20 saatlik reaksiyon grafiği ikili Şekil şeklinde çizilerek siklopentanolün zamanla arttığı bariz olarak gösterildi.

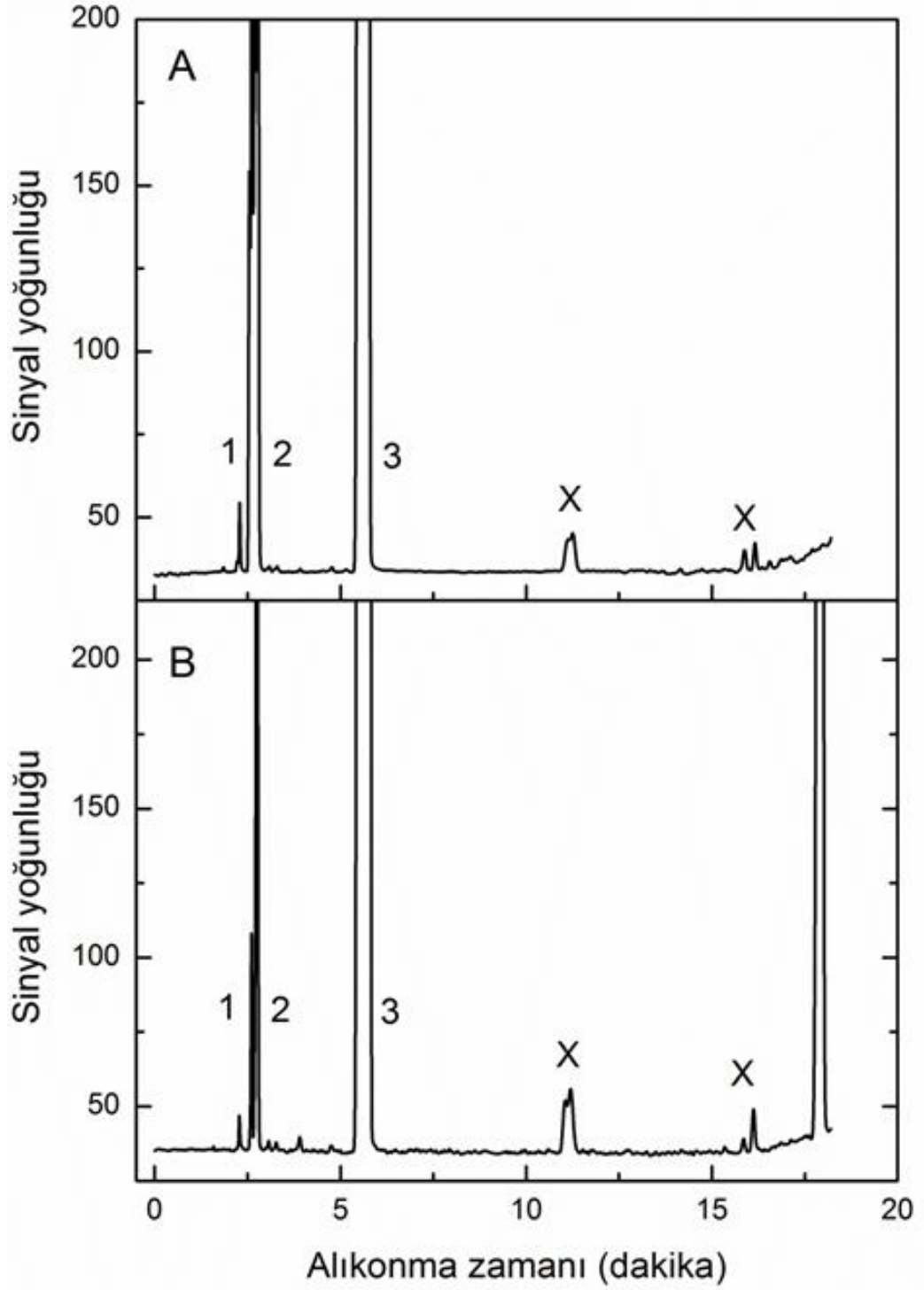
Bu GC analizleri bize *BtADH*'ın keton substratlarını ikili enzim sistemi ile indirgeyerek alkole dönüştürdüğünü ürün analiziyle göstermektedir. Oluşan ketonun kiral özelliklerinin belirlenmesi için kiral kolona ihtiyaç bulunmaktadır. Kiral kolonun laboratuvarımızda olmaması, çevre araştırma merkezleri ve üniversitelerde bu özellikte kiral kolonun bulunmaması sebebiyle kiralite ve enantiyomerik miktar analizleri yapılamadı.

Bu GC analizleriyle birlikte spektrofotometrik olarak gösterilen *BtADH* aktivitesinin ürün analizi ile tamamen kanıtlandığı ortaya konmuştur. Spektrofotometrik olarak reaksiyon verdiği gösterilen diğer substratların (alkol, aldehid ve keton) GC analizleri ve Michaelis-Menten kinetik Şekilleri ekte verilmiştir.



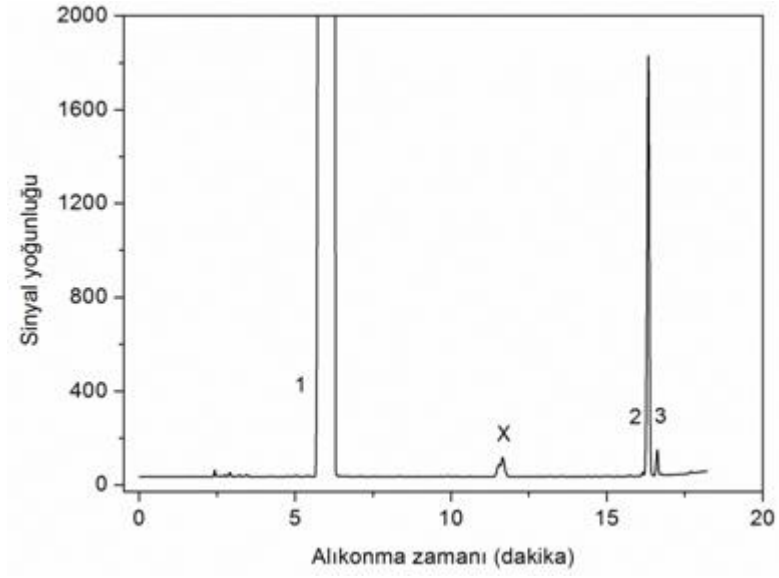
Şekil 6.14: A) Metil propil keton standartının ve B) ikili enzim sistemi ile 20 saatlik reaksiyonunun GC analizi.

Şekil 6.14’de ki gaz kromatografisi analizi sonuçlarına göre bileşiklerin alıkonma zamanları 1) etil asetat 5,85 dakika, 2) metil propil keton 8,79 dakika ve 3) 2- pentanol 10,07 dakika ve X) pikleri safsızlıktır.

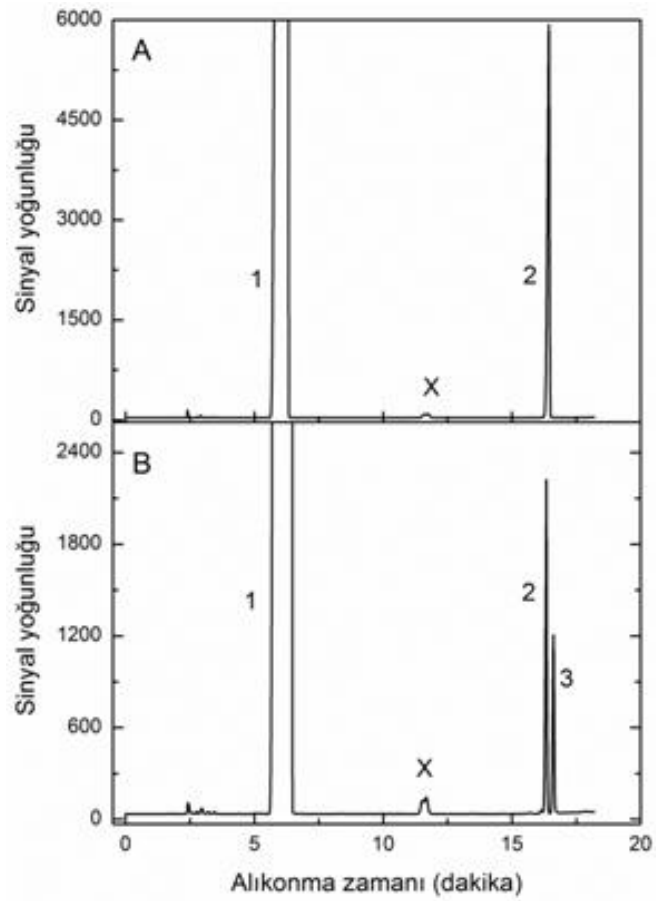


Şekil 6.15: A) 2-propanol standartının ve B) 20 saatlik reaksiyonunun GC analizi.

Şekil 6.15’de ki gaz kromatografisi analizi sonuçlarına göre bileşiklerin alıkonma zamanları 1) aseton 2,6 dakika, 2) 2-propanol 2,75 dakika, 3) etil asetat 5,77 dakika ve X) pikleri ise safsızlıktır.



Şekil 6.16: Siklopentanonun ikili enzim sistemi ile 3 saatlik reaksiyonunun GC analizi.

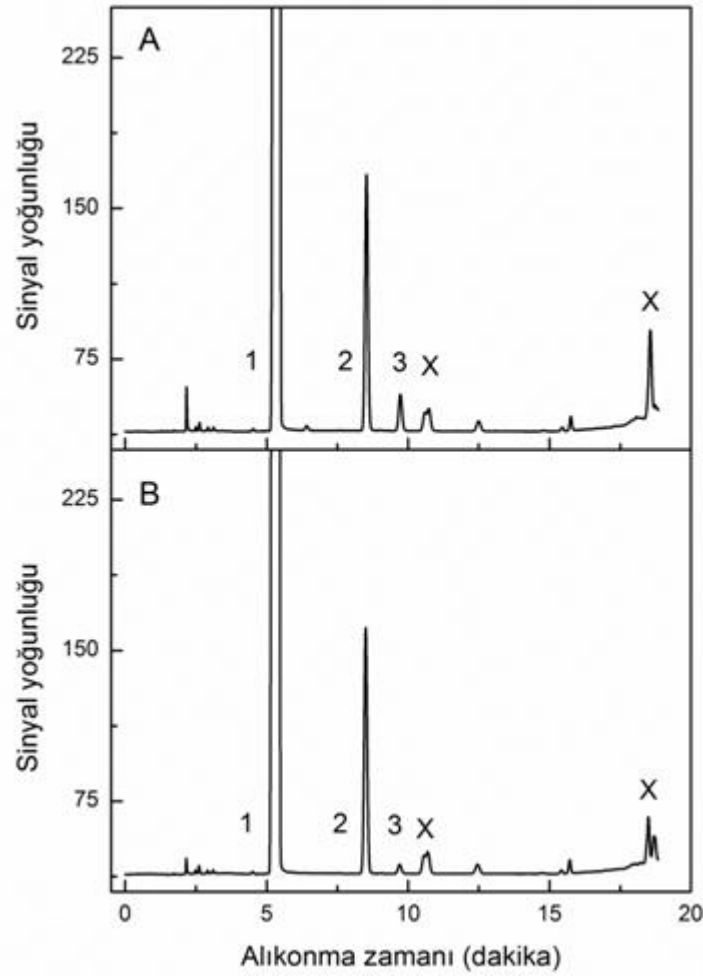


Şekil 6.17: A) Siklopentanon standartının ve B) 20 saatlik ikili enzim sistemi reaksiyonunun GC analizi.

Şekil 6.16'da ki gaz kromatografisi analizi sonuçlarına göre bileşiklerin alıkonma zamanları etil asetat 6,25 dakika, siklopentanon 16,33 ve siklopentanol 16,61 dakikadır. Şekil 6.17'de ki gaz kromatografisi analizi sonuçlarına göre bileşiklerin alıkonma zamanları etil asetat 6,35 dakika, siklopentanon 16,33 ve siklopentanol 16,61 dakikadır. İmmobilize ikili enzim sistemi ile metil propil keton substratının bir sekonder alkol olan 2-pentanol'e dönüşümü reaksiyonları etil asetat ile ekstrakte edilerek GC-FID ile analiz edildi. İki farklı matriks miktarında 4 farklı enzim oranlarında gerçekleştirilen immobilizasyonlarda her bir immobilizasyon reaksiyonu için ayrı ayrı GC ürün analizleri gerçekleştirildi. Bu bölümde bunlardan bazı örnekler verilerek sonuçlar değerlendirilecektir. Diğer tüm immobilize sistemle gerçekleştirilen GC analiz sonuçları ekte verilmiştir.

Metil propil ketonun alıkonma zamanı 8,79 ve 2-pentanolün'de 10,07 olarak belirlendi. Daha sonra metil propil ketonun 1) nolu immobilize ikili enzim sistemi ile 1 ve 20 saatlik reaksiyonunun GC analizleri Şekil 6.18'de görülmektedir. Metil propil keton substratının 1) nolu immobilize ikili enzim sistemi ile 1 ve 20 saatlik reaksiyon ekstraksiyonunun GC-FID analizlerinde 1 saatlik reaksiyonda az miktarda oluşan 2-pentanol pikinin (10,07 dakika) alıkonma zamanında geldiği görülmektedir. Reaksiyon ilerlediğinde 20 saatlik analizde ise 2- pentanol pikinin arttığı metil propil keton pikinin ise (8,79 dakika alıkonma zamanında) fazla azalmadığı görülmektedir. Metil propil keton pikinin beklendiği gibi azalmaması deneysel hatalardan kaynaklanmaktadır. Reaksiyonun 1 ve 20 saatlik ürünlerinin aynı Şekilde analizi için Şekil 6.18'de görüldüğü gibi ikili Şekil çizme işlemi yapıldı. Bu sonuç bize immobilize ikili enzim sisteminin çalıştığını göstermektedir. Serbest enzime göre karşılaştırıldığında immobilize enzimin aynı sürede ürün oluşturma hızının daha yavaş olduğu görülmektedir. Bunun immobilize sistemde kütle transferi ve sterik kısıtlama gibi aktiviteyi azaltıcı etkenlerin rol oynadığı düşünülmektedir.

2), 3) ve 4) nolu immobilize ikili enzim sistemi ile yapılan reaksiyonların GC analizleri 1 nolu immobilizasyon analizleri ile benzerlik göstermektedir. İlk 1 saatlik reaksiyonda 2- pentanol oluşumu piki az iken 20 saatlik reaksiyonda 2- pentanol piki artmaktadır. Burada *BtADH* miktarı artırılarak immobilizasyon yapılmasına rağmen 1 nolu immobilizasyona göre bir değişiklik gözlenmemektedir. İkili immobilizasyonda *BtADH* miktarının artırılması immobilize sistemin verimini olumlu veya olumsuz yönde etkilememiştir. Bağlanan enzim aynı aktivitesini koruduğundan bağlanmayan enzimler ise süzüntüde kalmaktadır.



Şekil 6.18: 1) nolu ikili immobilize enzim sistemi ile metil propil keton substratının 1 ve 20 saatlik reaksiyonlarının GC analizi.

Şekil 6.18’de ki gaz kromatografisi analizi sonuçlarına göre bileşiklerin alıkonma zamanları etil asetat 5,85 dakika, metil propil keton 8,79 dakika ve 2-pentanol 10,07 dakikadır.

Eupergit C 250 L miktarı iki katına çıkarılan 5), 6), 7) ve 8) nolu ikili immobilize sistem ile yapılan 1 ve 20 saatlik reaksiyonların analizlerinde 2-pentanol miktarının 1), 2), 3) ve 4) nolu immobilize sistemlerdeki gibi 20 saatlik reaksiyonda 1. saate göre ürün artışı görülmektedir. 2-pentanol artışı 10 mg matriks kullanılan sisteme göre biraz azalmaktadır. Matriks artışı ile birlikte immobilizasyon esnasında ortamda daha fazla bulunan serbest epoksi grupları ile enzimlerin etkileşimi sonucu aktivite azalmaktadır. 1) nolu ikili immobilizasyonu dışındaki diğer ikili immobilizasyon GC analizleri ekte verilmiştir.

7. SONUÇLAR ve YORUMLAR

Enzimlerin biyokatalist olarak endüstride kullanımları ve önemi gün geçtikçe artmaktadır. Oksidoredüktazlar grubunda bulunan alkol dehidrogenazlar alkol, aldehid ve keton bileşiklerinin dönüşümlerini gerçekleştirerek ekonomik değeri yüksek kimyasal bileşiklerin sentezinde kullanılmaktadırlar. Alkol dehidrogenazların çoğunluğu kofaktör bağımlı olduklarından ortamda sürekli kofaktör bulundurulması gerekmektedir. Kofaktör maliyetlerinin yüksek olması ve endüstriyel kullanılabilirlik için kofaktör rejenerasyonu yapılmaktadır. Kofaktör rejenerasyonunda ise en yaygın kullanılan format/format dehidrogenaz sistemidir.

Bu çalışmada ikili enzim sistemlerinde kofaktör rejenerasyonunda en çok tercih edilen format dehidrogenaz enzimi için *Candida methylica* kaynaklı format dehidrogenaz (CmFDH) kullanıldı. Yaklaşık 42 kDa büyüklüğünde olan CmFDH'nin Studier otoindüksiyonu ile yüksek miktarda üretilmesi sağlandı. Bir litre kültürden yaklaşık olarak %95 saflıkta 110 mg protein elde edildi. Otoindüksiyon yöntemi kullanımı sebebiyle IPTG'ye göre daha pratik ve verimli bir ekspresyon gerçekleştirildi. Hücre pelletleri ve toplam protein miktarları karşılaştırıldığında Studier besiyerinin %17.96 hücre pelleti ve %27.8 total protein miktarı olarak fazla olduğu gözlenmiştir. CmFDH'nin kinetik çalışmalarında k_{cat} ve K_M değerleri, sırasıyla, $1.03 \pm 0.03 \text{ s}^{-1}$ ve $34.88 \pm 4.4 \text{ mM}$ olarak bulundu. Yapılan deneyler sonucunda elde edilen değerler CmFDH ile yapılan çalışmalara [Blanchard, 1980], [Schirwitz, 2007], [Shinoda, 2005], [Dijken, 1976] paralellik göstermektedir. CmFDH'nin spesifik aktivite değeri yani bir dakikada 1 mg proteinin oluşturduğu NADH ürün miktarı 3,62 U/mg olarak bulundu. Saflaştırma sonrası toplam Unit aktivite yaklaşık 2,5 kat artmıştır. Elde edilen veriler *Candida methylica*'nın daha önce yapılan kinetik değerleriyle uyum göstermektedir ([Ordu and Karaguler, 2007]).

İkili enzim sisteminde kullanılmak üzere protein dizisi NCBI'daki (National Centre for Biotechnology Information) GeneBank'dan (Accession no: gi75761106) alınan bir alkol dehidrogenaz *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* organizmasından klonlandı. Klonladığımız enzim 345 aminoasit büyüklüğünde olduğundan orta zincirli dehidrogenazlar/redüktazlar olarak karakterize edilebilir. Dizi uyumluluğuna daha derin olarak baktığımızda filogenetik analizinin çinko içeren orta zincirli ADH'lar ile yapılması tercih edildi. Homoloji tabanlı database

araştırmasında *Bacillus thurgiensis* serovar *israilensis* organizmasında muhtemel alkol dehidrogenaz geni tespit edildi. Bu gen ürünü PCR yardımıyla çoğaltıldı ve pET14b ekspresyon vektörüne başarıyla klonlandı. N ucunda polihistidin bağlı (His₆) bağlanma bölgesi içeren füzyon protein üretimi, *E. coli* BL21 (DE3) taşıyıcısı kullanılarak başarıyla gerçekleştirildi. İstenen dizideki proteinin biyokimyasal karakterizasyonu protein kütle spektrometresiyle beraber SDS-PAGE analiziyle de doğrulandı.

Daha önce belirlenen DNA dizilerinin veri taramasında BtADH'nin çok iyi bilinen *E.coli*'den izole edilen ADH (*EcADH*) ile (Karlsson et al., 2003)] %68 uyumluluk ve %81 benzerlik ve *Bacillus stearothermophilus* strain *LLD-R* (*HtADH*)'dan izole edilen ADH da ise %51 uyumluluk ve %70 benzerlik gözlemlendi. Ekspresyon plazmidi (*pBtADH*) *E. Coli* BL21 (DE3) hücrelerine transforme edildi. Küçük değişiklikler yapılan otoindüksiyon prosedürü (Studier, 2005)] *E.coli*'nin rekombinant protein üretimi için kullanıldı. Hücre ekstraktı SDS-PAGE ile analiz edildi. Büyüklüğü 38,9 kDa olarak beklenen protein, *pBtADH* plazmidi içeren *E. Coli* BL21 (DE3) ekstraksiyonundan coomassie boyalı jel ile kolaylıkla belirlendi. His₆-BtADH metal iyon afinite kromatografi ile saflaştırıldı. Tek aşama saflaştırma protokolünde 1 litre kültürde SDS-PAGE analizine göre %90 saflıkta 80-100 mg protein elde edildi.

BtADH'nin piridin nükleotid tercihini belirlemek için yapılan kinetik çakışmalarda 2- propanolün NAD⁺ bağlı oksidasyonu k_{cat} değeri 282.5±3.4 dak.⁻¹ ve K_M 112±4 µM bulunurken NADP⁺ k_{cat} 3.26±0.58 dak.⁻¹ ve K_M of 766±24 µM olarak bulundu. NAD⁺'nin kinetik sabit değeri NADP⁺'nin değerinden yaklaşık 600 kat fazla bulundu. Bu sonuç *Bacillus stearothermophilus* strain *LLD-R* (*HtADH*) [Ceccarelli et al., 2004], *E. coli* K-12 (*EcADH*) [Karlsson et al., 2003], *Sulfolobus solfataricus* (*SsADH*) [Esposito et al., 2002], *Horse liver* (*HlADH*) [Eklund, 1983], *Bemisia argentifolii* (*BaKR*) [Banfield et al., 2001], *Thermoanaerobacter brockii* (*TbADH*) [Li et al., 1999b] ve *Clostridium beijerinckii* (*CbADH*) [Korkhin et al., 1999] organizmalarından izole iyi bilinen benzer nükleotid tercihi paylaştığını göstermektedir.

BtADH'nin metal içeriği ve aktiviteye çeşitli metal iyonlarının etkisi belirlendi. Enzimin orta zincirli olması sebebiyle ya demir ya da çinko içereceği beklenmekteydi. Çünkü orta zincirli ADH'lar demir veya çinko içermektedir. ICP-OES analizi saf enzimin her bir alt birimde 1.78 ±0.08 mol çinko içerdiğini gösterdi.

Böylece enzimin her bir monomeri 2 mol çinko iyonu içermektedir. ICP-OES analizi *BtADH*'ın sınıflandırmasında belirleyici olmuştur. Enzimin her bir monomerinde yaklaşık iki çinko (II) iyonunun bulunması *BtADH*'ın kataliz için nikotinamid kofaktörü kullanan çinko içeren MDR alt familyasına ait olduğunu düşündürmektedir.

Enzim aktivitesine değişik katyonların etkisi incelendi. Yapılan deneyler sonucunda Mn^{+2} , Mg^{+2} , Ca^{+2} , Co^{+2} ve Cu^{+2} gibi iki yüklü katyonlar aktiviteyi dikkate değer bir Şekilde (%80-90) ve Ni^{+2} az bir oranda (%20) azaltırken Ba^{+2} az bir oranda (%20) artırdı. 1 mM Zn^{+2} ilavesinde ciddi bir Şekilde enzim aktivitesinin azalması (%90 inhibisyon) beklenmedik bir durumdu.

BtADH'ın katalitik özellikleri belirlenmesi çalışmalarında oksidasyon reaksiyonları için pH 6.0-8.5 arasında yüksek spesifik aktivite gözlenirken pH 7,5 da maksimum aktivite görüldü. Bu pH aralıklarının dışında aktivite ciddi oranda azaldı. İndirgenme reaksiyonları için pH aktivite profilinde pH 9,0-11,0 arasında aktivite gözlenirken pH 7,0 nin altında ve pH 12,0'nin üstünde aktivite ciddi oranda azaldı. Enzimin pH stabilizasyon çalışmasında *BtADH*'ın pH 5.5-11.5 arasında 25 °C'de 20 dakika muamele edildiğinde %80 oksidasyon aktivitesini koruyarak oldukça stabil olduğu gözlemlendi. *BtADH*'ın optimum pH ve kararlılık deneylerinde maksimum aktivite için optimum pH 9.0 olarak bulundu. pH 8.5-10.5 arasında %78 oranında maksimum aktivitesini korudu. *BtADH* pH-7.0-11.5 arasında 20 °C'de yüksek pH stabilitesinde olduğu gözlemlendi.

BtADH aktivitesine sıcaklık etkisi 5-45 °C aralığında incelendi. Aktivite sıcaklık profili deneysel şartlar altında 2-propanolün oksidasyonu için maksimum aktivitenin 30 °C civarında olduğu gözlemlendi. *BtADH*'ın maksimum aktiviteyi 25 °C'de gösterdi. *BtADH*'ın 15 °C'de bile %61 oranında aktivitesi olduğu görüldü. *BtADH* aktivitesinde sıcaklık optimizasyonu deneyinde optimum sıcaklık 25 °C olarak bulundu. Enzim 20-30 °C arasında %90 ve üzeri aktivite gösterirken 40 °C'nin üzerinde aktivitesini tamamen kaybetmektedir.

BtADH'ın kinetik kararlılığı 50, 60 ve 70 °C'deki yarı ömrü ölçülerek incelendi. Kalan aktivite 25 °C'de standart hız ölçümü ile gerçekleştirildi ve bu da hız sıcaklık muamelesi yapılmayana aktiviteyle oranlandı. *BtADH*'ın yarı ömrü 50 °C için 60 dakika civarında, 60 °C için 10 dakika ve 70 °C için 3 dakika olarak bulundu. Sonuçlar *BtADH*'ın 50 °C sıcaklıkta inkübasyonunda oldukça kararlı olduğunu gösterdi. Enzim çözeltisine 0,1 mM Zn^{+2} ilavesi 40 °C'de 20 dakika inkübasyon için

yaklaşık %8 stabiliteyi artırdığı gözlemlendi. *BtADH* sıcaklık kararlılığı deneyinde enzim 20 °C’de 60 dakika inkübasyonda %97 oranında aktivitesini muhafaza etmektedir. 40 °C’de 60 dakika inkübasyonda ise kalan aktivite %62 ler seviyesinde olmaktadır.

Bu çalışmadaki saf enzim primer alkollerin oksidasyonu için pH 9.0’da, keton redüksiyonu içinde pH 7.5’da maksimum aktiviteyi göstermektedir. Bu çalışmada pH’ın *BtADH* aktivitesine dönüşümlü veya eğer oluyorsa geri dönüşümsüz etkilerini de incelendi. Enzim pH 6 ve 11 arasında oldukça kararlıdır. Bu özellikle enzimin ilgili biyoteknolojik uygulamalarda kullanılabileceğini göstermektedir. *BtADH*’ın dikkate değer kinetik değerlerle aldehydleri, ketonları ve kısa zincirden orta zincirli primer alkolle kadar geniş substrat spesifitesi olduğu gösterildi. Bu oksidasyon redüksiyon reaksiyon tipleri organik kimya sentezinde sıklıkla kullanılmaktadır.

Enzimin substrat spesifitesinin belirlenmesi çalışmalarında *BtADH* primer alkollerden 1-dekanole kadar, sekonder alkollerden 2-propanol ve 2-nonanol ile ve diollerden 1,3 propandiol ve 1,6 heksandiol ile halkasal yapıdaki benzil alkol ile de aktivite göstermektedir. *BtADH* substrat olarak gliserol, tersiyer alkollerden tert amilalkol ve tert bütanol, farmosötik ve ticari önemi olan 1-fenil 2-propanol ile yapılan deneylerde aktivite göstermedi. *BtADH*’ın değişik aldehyd bileşikleri redüksiyonu deneyleri yapıldı. Substrat seçiciliği için aldehyd bileşiklerinden formaldehyd, 4-brombenzaldehyd ve salisil aldehyd’de aktivite göstermezken, asetaldehyd ve benzaldehyd bileşiklerinde aktivite göstermektedir. *BtADH*’ın değişik ketonlarla redüksiyonu için 18 çeşit substrat denendi. Bunlardan 5 tanesinde aktivite gözlenirken diğer 13 tanesinde aktivite gözlenmedi. Aktivite gözlenen keton bileşikleri aseton, etil metil keton, metil propil keton, siklopentanon ve 2,3 bütandion’dur. Benzen halkasına sahip değişik substratlar denenmesine rağmen hiçbirinde aktivite gözlenmedi. *BtADH*’ın laboratuvarındaki alkol, aldehyd ve keton bileşikleriyle toplam 43 substrat denendi ve bunlardan 20 tanesinde aktivite gözlenirken diğerlerinde aktivite gözlenmedi.

BtADH aktivitesine DMSO etkisin incelendiğinde %5 DMSO konsantrasyonunda bile enzim aktivitesi %50 oranında azalmaktadır. Buda bize organik çözücü olarak DMSO’nun kullanımının uygun olmadığını göstermektedir. *BtADH* aktivitesine tamponun iyonik direnç etkisi incelendiğinde 50 mM’a kadar konsantrasyonda (~ %25) aktivite artışı sağladığı fakat 50mM’dan 400 mM’a kadar aktivite değerlerinde bir değişiklik olmadığı görülmektedir. Bu deney sonucuyla

yüksek tuz konsantrasyonu *BtADH* aktivitesi üzerinde olumlu veya olumsuz bir etki göstermediğinden aktivite reaksiyonlarında tampon çözelti konsantrasyonu 50 mM olarak ayarlandı.

Bu çalışmada İkili enzim sistemi reaksiyonlarında kullanılan *CmFDH* ve *BtADH*'ın Eupergit C 250 L üzerine immobilizasyonu başarıyla gerçekleştirildi. Immobilizasyon şartları optimize edildi ve immobilize enzimin karakterizasyonu yapıldı. Immobilizasyon çalışmalarında *CmFDH*'ın %72 immobilizasyon verimi ve %37,5 aktivite verimi bulundu. Optimum immobilize enzim reaksiyon şartları çalışmasında optimum sıcaklık 55 °C ve pH 8,0 olarak serbest enzim şartlarıyla aynı değerlerde bulundu. İmmobilize enzimin K_M değeri serbest *CmFDH* için 13,06 mM iken immobilize *CmFDH* için 21,06 mM olarak belirlendi. İmmobilize enzimin K_M değerinin artması substrata olan ilginin azaldığını göstermektedir. Serbest *CmFDH*'ın k_{cat} değeri 0,86 dak.⁻¹ iken immobilize *CmFDH*'ın 0,31 dak.⁻¹ olarak belirlendi. Katalitik verimlilik değeri olan k_{cat}/K_M değeri serbest *CmFDH* için 65,84 iken immobilize *CmFDH* için 14,71 olarak belirlendi. İmmobilize *CmFDH*'ın saklama kararlılığı deneylerinde 10 gün sonunda enzim aktivitesinin %90'ını korurken 30 gün sonunda %50 aktivitesini devam ettirmektedir. *CmFDH*'ın reaksiyonlarda tekrar kullanım sayısı tespiti deneyinde 13 tekrarlı aktivite sonunda %60 seviyelerinde aktivitesini koruduğu gözlemlendi. İmmobilize *CmFDH*'ın sıcaklık kararlılığının serbest enzime göre 55 °C'den sonra yaklaşık olarak %15-35 oranında arttığı görülmektedir. Enzimin reaksiyonlardaki pH kararlılığı ise her pH'da immobilize *CmFDH*'ın serbeste göre arttığı görülmektedir.

BtADH'ın Eupergit C 250 L üzerine immobilizasyonunda %52 immobilizasyon %43,8 aktivite veriminin olduğu bulundu. Reaksiyonlarda optimum sıcaklık 25-30 °C, optimum pH'da 9,0 olarak belirlendi. Bu değerlerin serbest enzimle aynı olması immobilize *BtADH*'ın reaksiyon şartlarında bir değişiklik olmadığını göstermektedir. İmmobilize *BtADH*'ın K_M değeri 19,01 iken serbest enzimin 13,06 olarak bulunması immobilize enzimin K_M değerinin yükseldiğini böylece substrata ilgisinin azaldığını göstermektedir. İmmobilize *BtADH*'ın k_{cat} değeri 0,34 iken serbest enzimin 0,78 olarak bulunması immobilize enzimin k_{cat} değerinin azaldığını göstermektedir. k_{cat} / K_M değeri katalitik verimlilik olarak immobilize *BtADH* için 17,8 iken serbest enzim için 59,02 olarak bulundu. Bu değerler bize serbest enzime göre immobilize *BtADH*'ın katalitik veriminin daha az olduğu ve aynı miktar ürün için daha fazla süre gerektiğini göstermektedir.

İmmobilize *BtADH*'ın sıcaklık kararlılığının 40 °C'den sonra serbest enzime göre %20-70 oranında arttığı ve pH kararlılığının ise tüm pH değerlerinde serbest enzime göre daha yüksek olduğu görülmektedir. İmmobilize enzimin saklama kararlılığı deneyinde 10 gün sonunda aktivitenin %90 ve 30 gün sonunda %40 oranında koruduğu görülmektedir. Tekrarlı aktivite deneyinde immobilize *BtADH*'ın 13 tekrar sonunda aktivitesinin %80'ini koruduğu görülmektedir.

İkili enzim sistemi reaksiyonları için *CmFDH* ve *BtADH*'ın serbest ve ikili immobilize formlarının kullanılarak kofaktör rejenerasyonu ve önemli alkol bileşikler sentezi gerçekleştirildi. Bu çalışmada *BtADH*'ın keton indirgenmesi reaksiyonlarında NADH ihtiyacı ortama *CmFDH* enzimi ve sodyum format substratı ilavesiyle kofaktör rejenerasyonu gerçekleştirilerek sağlandı. Öncelikle kofaktör rejenerasyonunun UV spektrofotometrede anlık takibi deneyleri yapıldı. İkili enzim sistemi ile kofaktör rejenerasyonu ve önemli alkol bileşikler sentezi reaksiyonları serbest ve ikili immobilize enzim ile uygun reaksiyon şartlarında UV spektrofotometrede 340 nm'de reaksiyon takibi ile gerçekleştirildi. Yapılan deneylerde kofaktör rejenerasyonunu gerçekleştirdiği gösterildi. İkili enzim sistemlerinde *BtADH*'ın spesifik aktivitesinin *CmFDH*'dan daha düşük olması sebebiyle ortama yaklaşık 5 kat daha fazla *BtADH* ilave edildi. Serbest ve ikili immobilize enzim sistemi ile gerçekleştirilen reaksiyonların ürün analizleri GC-FID ile belirlendi. Reaksiyonda kullanılan substrat ve ürünlerin alıkonma zamanları belirlendi. İkili immobilize sistemde ürün veriminin daha az olması sebebiyle aynı miktar ürün eldesi için reaksiyon süresinin daha uzun tutulması gerektiği belirlendi.

Bu çalışmada ikili enzim sistemi ile önemli alkol bileşikler sentezi çalışmaları başarıyla gerçekleştirildi. İkili sistemde kullanılan *CmFDH* ve *BtADH* karakterize edilip optimum reaksiyon şartları belirlendi. Daha sonra reaktör kullanımları için ayrı ayrı ve ikili immobilizasyonları gerçekleştirilip serbest enzime göre katalitik özellikleri belirlendi. İkili enzim sistemi ile reaksiyon veren tüm substratların ürün analizleri GC-FID ile gerçekleştirildi. Klonlanan *BtADH*'ın ayrıntılı karakterizasyonları yapılarak tüm aktivite gösteren tüm substratların Michaelis-Menten kinetikleri çalışıldı.

Şu anda 150.000 nükleotid'den fazla dizi dehidrogenazlar olarak bilinmektedir [J.D. Stewart, 2007]. Alkol dehidrogenazlar (ADH) dehidrogenazlar familyası içinde en çok araştırılan enzim grubudur. ADH'lar tüm organizmalar içinde zorunlu prosesler arasında uygun kofaktörlerin karşılıklı redüksiyonu ile alkollerin keton ve

aldehitlere karşılıklı dönüşümlerini katalizlerler. Primer alkollerin ilgili aldehitlere oksidasyonu ilaç ara maddeleri ve değerli kimyasal eldesi için birçok önemli reaksiyonlardan biridir. Aldehidler hem kozmetik endüstrisi için yüksek değerde bileşikler ve hemde ara maddeler olarak değerlidir.

Genom dizileme olası tahmini açık okuma bölgeleri (ORF: Open Reading Frame) içerisinde kullanılabilir yeni alkol dehidrogenazların büyük bir potansiyel olarak bulunduğunu göstermektedir. Diğer bir taraftan başarı ilgili endüstriler için istenen ve/veya uygun özelliklere sahip enzimleri bulmaktır. Böylece tarama çalışmaları yüksek seçicilikte, iyi verimlilikte ve belli substrat seçiciliğindeki enzimlerin bulunduğu düşünülen çeşitli mikroorganizma türlerinde yönlendirilmektedir. Diğer bir deyişle geniş orandaki alifatik ve aromatik alkollerin ADH'lar tarafından ilgili önemli aldehid ve ketonlara katalizlenmesi deneysel olarak rapor edilmiştir [Musa and Phillips, 2011]. Özellikle kiral sintonların eldesi saf farmosötik ajanların kiral olarak sentezinde çok kıymetlidir. Ama biyoteknolojik uygulamalar için moleküler mühendislik ile modifikasyona uygun, kararlı ve potansiyel olarak önemli substratlarla aktif olması gibi istenen özelliklere sahip ADH'lar hala yeterli değildir.

Hem tahmini hemde karakterize edilmiş ADH'lar hakkındaki bilgiler yapı fonksiyon mekanizmasını ve biyolojik fonksiyonlarını daha iyi anlayabilmek gibi çalışmalar için çok önemlidir. Dizi, yapı ve fonksiyon hakkında daha fazla bilgi elde etmek için; ADH'lar üzerinde tüm genom dizi analizi yanında deneysel çalışmaların da uyumlu olması gereklidir. Bu doğrultuda bir adım olarak, bu çalışmada başlangıçta bir böcek patojeni olarak karakterize edilen ve spor yapıda, gram pozitif bakteri olan *Bacillus thuringiensis serovar israelensis*'den genom dizi çalışmaları ile elde edilen bilgiler temelinde yeni bir alkol dehidrogenazın tiplendirilmesi ve karakterizasyonunu gerçekleştirildi. Bu çalışma polimer ve deterjan sürfaktanlarının üretimi için önemli endüstriyel substratlar olan orta zincir uzunluğundaki primer alkoller kullanabilen mezofilik orjinden olan yeni ADH olması sebebiyle önemlidir. Yine *B. stearothermophilus*'dan [Ceccarelli et al., 2004] izole edilen *HtADH* gibi termofilik ADH'lar ile yüksek dizi benzerliği bulunmaktadır. *BtADH* ve *HtADH* özellikle substrat ve kofaktör tercihi, sıcaklık kararlılık kaynağı ve dizi fonksiyon çalışması için mükemmel bir çift olabilir.

BtADH'a en yakın ADH olarak bulunan *E.coli*'den elde edilen ADH (*EcADH*) ile ilgili uzun bir süre boyunca sadece dizi, yapı, kofaktör ve metal bağlama gibi

birkaç özelliği rapor edilmiştir [Karlsson et al., 2003]. Ama etanol bağımlı furfuralın indirgenmesini içeren [Li et al., 2011] rapor hariç enzimin biyokimyasal karakterizasyonu ile ilgili neredeyse herhangi bir bilgi bulunmamaktadır. Böylece NAD^+ bağılı mezofilik enzimin sıcaklık, pH, metal iyon bağımlılığı ve substrat spesifitesi ile ilgili bilgi biyoteknolojik uygulamalar ve ADH araştırması yapanlar için önemli bir katkı sağlayacaktır.

Çok kıymetli uzun zincirli alkol dehidrogenazlar kolaylıkla elde edilebilir değildir ve bunlarla ilgili çalışmalar çok az bulunmaktadır. Böylece uzun zincirli primer alkollerin oksidasyonun da *BtADH*'ın dikkate değer bir potansiyel olduğu görülmektedir. *BtADH* dimetil keton (aseton), etil metil keton, metil propil keton gibi ketonların ilgili sekonder alkollere dönüşümünü katalizlemektedir. Yüksek enantioselektivite ile ketonların sekonder alkollere dönüşerek önemli ince kimyasalların ve ara bileşiklerin [Matsuda et al., 2009] elde edildiği asimetrik sentez reaksiyonlarında alkol dehidrogenazlar kullanıldığından bu çok önemli bir özelliktir.

BtADH enzimi NADH kullanımı ile asetonun izopropanole dönüşümünü yeterli kinetik değerlerle gerçekleştirmektedir. Ters reaksiyonda (izopropanolün asetona dönüşümü) *BtADH*'ın NADH üretimi ile katalizlenmektedir. Çoğu önemli reaksiyonlar için diğer NAD^+ bağılı oksidoredüktazların indirgenmiş kofaktör (NADH) kullanması sebebiyle bu özellik çok kullanışlı olmaktadır. Büyük ölçekli sentez reaksiyonlarında oksidoredüktazların kullanılması için ortamda kofaktör gereksinimi olduğundan *BtADH* izopropanol ile NADH rejenerasyonunu sağlayacak iyi bir potansiyele sahiptir.

Bu çalışmada *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* organizmasından yeni bir alkol dehidrogenaz enzimi klonlanıp saflaştırılıp karakterize edildi. Bu enzim hem mezofilik hem de termofilik [Ceccarelli et al., 2004] ADH'larla yüksek dizi benzerliği göstermektedir. Primer alkoller için dikkate değer kinetik değerlere sahip biyokimyasal olarak karakterize edilen *BtADH* etkili kofaktör rejenerasyonu çalışmaları ve ince kimyasalların sentezinin olduğu biyoteknolojik uygulamalarda yeni bir enzim olarak termal stabilite kaynağı, substrat spesifitesi ve kofaktör tercihini içeren enzimlerin dizi-fonksiyon ilişkisi çalışması ile ilgili önemli bir konu sağlamaktadır.

BtADH'ın *Bacillus stearothermophilus* ile dizi eşleşmeleri yapıldığında %50 dizi benzerliği olduğu bulunmuştur. *Bacillus stearothermophilus* MDR süperfamilyası içinde çinko içeren bakteri alt familyasından olduğundan *Bacillus*

thuringiensis ile yapısal benzerlik olduğu düşünülmektedir. *Bacillus stearethermophilus* thermostabil bir enzim iken *BtADH* mezofilik bir karakterdedir. Termofilik özellikten yapısal motifler sorumludur. Bu yapısal motiflerle ilgili yapılan çalışmalarda çeşitli faktörler belirlenmiştir. Bunların arasında Prolin aminoasitinin sayı ve lokasyonu, tuz köprüleri ve hidrojen bağları sayılabilir. *HtADH*'daki Pro²⁴² rezidüsünün thermostabiliteden sorumlu olduğu Fiorentino'nun mutasyon çalışmasında gösterilmiştir. *HtADH*'ın aminoasit dizisindeki 50-59 arasındaki 10 aminoasitten 4 tane prolin tespit edilmiştir. *BtADH*'ta 50-59 arasında hiçbir prolin molekülü bulunmamaktadır ve 242. rezidüde de prolin yerine lizin aminoasiti bulunmaktadır. Yapısal benzerlik olmasında rağmen konformasyonel düzenlemede thermostabiliteden sorumlu prolin aminoasitlerinin olmaması *BtADH*'ın neden mezofilik karakterde olduğunu açıklamaktadır.

Çeşitli aminoasitlerin diğer aminoasitlerle değiştirilerek yapıdaki rollerinin anlaşılmasında yönlendirilmiş dizi mutasyonları önemli araçlardır. Böylece yukarıda açıklanan termofilik özellik sağlayan prolin ve kofaktör tercihi belirleyen aminoasitinin mutasyon tekniğiyle değiştirilerek mezofilik karakterde olan *BtADH*'ın termofilik olması ve NADP kullanımının sağlanması gerçekleştirilebilir. Ayrıca substrat spesifitesinin değiştirilmesi için yapılacak mutasyonlarla da önemli kimyasal bileşiklerin sentezi gerçekleştirilebilir. Geniş substrat spesifitesine sahip olan mezofilik *BtADH*'ın kinetik özelliklerinin ve operasyonel kararlılıklarının artırılması ileriki çalışmalarda planlanmaktadır.

BtADH enziminin klonlama ve karakterizasyonu çalışması bu sahada önemli dergilerden olan *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* dergisinde "A new NADH-dependent, zinc containing alcohol dehydrogenase from *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* involved in oxidations of short to medium chain primary alcohols" başlığı ile yayınlandı. Bundan sonra *BtADH* enzimi üzerinde yukarıda açıklanan mutasyon çalışmaları ile protein mühendisliği uygulamaları ve ikili immobilize sistemin farklı matrislerde farklı substratlarla uygulama çalışmaları yapılarak yayınlanması planlanmaktadır.

KAYNAKLAR

- Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W. Lipman D. J., (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res*, 25, 3389-3402.
- Auld D.S., Bergman T., (2008), "Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families : The role of zinc for alcohol dehydrogenase structure and function", *Cell Mol Life Sci*, 65, 3961-3970.
- Banfield M.J., Salvucci M.E., Baker E.N., Smith C.A., (2001), "Crystal structure of the NAD(H)-dependent ketose reductase from *Bemisia argentifolii* at 2.3 Å resolution", *Journal of Molecular Biology*, 306, 239-250.
- Berg J.M., John L., Tymoczko L., (2007), "Biochemistry", 6th ed., New York, Freeman W. H. and company.
- Bertani G., Studies on lysogenesis I., (1951), "The mode of phage liberation by Lysogenic *Escherichia coli*", *Journal of Bacteriology*, 62, 293-300.
- Bogin O., Levin I., Hacham Y., Tel-or S., Peretz M., Frolov F., Burstein Y., (2002), "Structural basis for the enhanced thermal stability of alcohol dehydrogenase mutants from the mesophilic bacterium *Clostridium beijerinckii*: Contribution of salt bridging", *Protein Sci*, 11(11), 2561-74.
- Bommarius A. S., Riebel B. R., (2005), "Introduction to biocatalysis" *Biocatalysis*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 1-18.
- Bradford M.M., (1976), "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Anal Biochem*, 72, 248-254.
- Branden C.I., Eklund H., Nordstrom B., Boiwe T., Soderlund G., Zeppezauer E., Ohlsson I., Akeson A. (1973), "Structure of liver alcohol dehydrogenase at 2.9- angstrom resolution bridging", *Proc Natl Acad Sci USA*, 70, 2439-2442.
- Bundespräsidialamt, (December, 2002), "Press report bridging", Berlin/Germany.
- Burton S.G., (2003), "Oxidizing enzymes as biocatalysts. bridging", *Trends in biotechnology*, 21, 543-549.
- Cao Y, Liao L., Xu X. W., Oren A., Wang C., Zhu X. F, Wu M., (2008), "Characterization of alcohol dehydrogenase from the haloalkaliphilic archaeon *Natronomonas pharaonis* bridging", *Extremophiles*, 12, 471-476.
- Carey J.S., Laffan D., Thomson C., Williams M.T., (2006), "Analysis of the reactions used for the preparation of drug candidate molecules", *Organic & Biomolecular Chemistry*, 4, 2337-2347.

Cea G., Wilson L., Bolívar J.M., Markovits A., Illanes A., (2009), "Effect of chain length on the activity of free and immobilized alcohol dehydrogenase towards aliphatic alcohols", *Enzyme and Microbial Technology*, 44, 135-138.

Ceccarelli C., Liang Z. X., Strickler M., Prehna G., Goldstein B. M., Klinman J. P., Bahnson B. J., (2004), "Crystal structure and amide H/D exchange of binary complexes of alcohol dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus*: insight into thermostability and cofactor binding", *Biochemistry*, 43, 5266-5277.

Chenault H.K., Whitesides G.M., "Regeneration of nicotinamide cofactors for use in organic synthesis", *Appl Biochem Biotechnol*, (1987), 14, 147-197.

Dalziel K., (1962), "Kinetic studies of liver alcohol dehydrogenase", *Biochem. J.*, 84, 244-254.

Drum D.E., Harrison J.H., Li T.K., Bethune J.L., Vallee B.L., (1967), "Structural and functional zinc in horse liver alcohol dehydrogenase", *Proc Natl Acad Sci USA*, 57, 1434-1440.

Edelstein D., (1996), *J. Protein Methods*, New York, Wiley-Liss .

Eklund H., (1983), "Structural studies of horse liver alcohol dehydrogenase: coenzyme, substrate and inhibitor binding", *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 18, 1, 73-81.

Eklund H., Nordström B., Zeppezauer E., Söderlund G., Ohlsson I., Boiwe T., Brändén C.I., (1974), "The structure of horse liver alcohol dehydrogenase", *FEBS Letters*, 44, 200-204.

Eklund H., Nordström B., Zeppezauer E., Söderlund G., Ohlsson I., Boiwe T., Söderberg B. O., Tapia O., Brändén C. I., Akeson A., (1976a), "Three - dimensional structure of horse liver alcohol dehydrogenase at 2.4 Å resolution", *Journal of Molecular Biology*, 102, 27-59.

Eklund H., Nordström B., Zeppezauer E., Söderlund G., Ohlsson I., Boiwe T., Söderberg B. O., Tapia O., Brändén C. I., Akeson A., (1976b), "Three - dimensional structure of horse liver alcohol dehydrogenase at 2.4 Å resolution", *Journal of Molecular Biology*, 102, 27-59.

Eklund H., Plapp B.V., Samama J.P., Brändén C.I., (1982), "Binding of substrate in a ternary complex of horse liver alcohol dehydrogenase", *Journal of Biological Chemistry*, 257, 14349-14358.

Eklund H., Ramaswamy S., (2008), "Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families", *Cell. Mol. Life Sci.*, 65:3907-3917.

Eklund H., Samama J.P., Jones T.A., (1984), "Crystallographic investigations of nicotinamide adenine dinucleotide binding to horse liver alcohol dehydrogenase", *Biochemistry*, 23, 5982-5996.

El-Zahab B., Donnelly D., Wang P., (2008), "Particle-tethered NADH for production of methanol from CO₂ catalyzed by coimmobilized enzymes", *Biotechnology and Bioengineering*, 99, 508-514.

Esposito L., Sica F., Raia C. A., Giordano A., Rossi M., Mazzarella L., Zagari A., (2002), "Crystal Structure of the Alcohol Dehydrogenase from the Hyperthermophilic Archaeon *Sulfolobus solfataricus* at 1.85 Å Resolution", *Journal of Molecular Biology*, 318, 463-477.

Faber K., (1997), "Biotransformations" In *Organic Chemistry, A Textbook*, Springer-Verlag, Berlin, Germany.

Findrik Z., Vasic'-Rački Đ., Lütz S., Daußmann T., Wandrey C., (2005), "Kinetic Modeling of Acetophenone Reduction Catalyzed by Alcohol Dehydrogenase from *Thermoanaerobacter* sp", *Biotechnol Lett*, 27, 1087-1095.

Fiorentino G., Cannio R., Rossi M., Bartolucci S., (1998), "Decreasing the stability and changing the substrate specificity of the *Bacillus stearothermophilus* alcohol dehydrogenase by single amino acid replacements", *Protein Eng*, 11, 925-930.

Fujii A., Hashiguchi S., Uematsu N., Ikariya T., Noyori R., (1996), "Ruthenium(II)-Catalyzed Asymmetric Transfer Hydrogenation of Ketones Using a Formic Acid-Triethylamine Mixture", *Journal of the American Chemical Society*, 118, 2521-2522.

Ganzhorn A.J., Green D.W., Hershey A.D., Gould R.M., Plapp B.V., (1987), "Kinetic characterization of yeast alcohol dehydrogenases".

Gill S.C., Von P.H., (1989), "Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data", *Analytical Biochemistry*, 182, 319-326.

Goldberg K., Schroer K., Lütz S., Liese A., (2007), "Biocatalytic ketone reduction-a powerful tool for the production of chiral alcohols-part II: whole-cell reductions", *Appl Microbiol Biotechnol*, 76, 249-255.

González J.M., Pizarro C., (2001), "Polyacrylamide gels as support for enzyme immobilization by entrapment. Effect of polyelectrolyte carrier, pH and temperature on enzyme action and kinetics parameters", *European Polymer Journal*, 37, 435-444.

Gröger H., Hummel W., Rollmann C., Chamouleau F., Hüskens H., Werner H., Wundt C., Abokitse K., Drauz K., Buchholz S., (2004), "Preparative asymmetric reduction of ketones in a biphasic medium with an (S)-alcohol dehydrogenase under in situ-cofactor-recycling with a formate dehydrogenase", *Tetrahedron*, 60, 633-640.

Gul-Karaguler N., Sessions R., Clarke A., Holbrook J.J., (2001), "A single mutation in the NAD-specific formate dehydrogenase from *Candida methylica* allows the enzyme to use NADP", *Biotechnol Lett*, 23:283-287.

- Guy J.E., Isupov M.N., Littlechild J.A., (2003), "The structure of an alcohol dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum pernix*", *J Mol Biol*, 331, 1041-1051.
- Hansen L.H., Knudsen S., Sorensen S.J., (1998), "The effect of the *lacY* gene on the induction of IPTG inducible promoters, studied in *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens*", *Curr Microbiol*, 36, 341-347.
- Hashiguchi S., Fujii A., Takehara J., Ikariya T., Noyori R., (1995), "Asymmetric transfer hydrogenation of aromatic ketones catalyzed by chiral ruthenium(II) complexes", *Journal of the American Chemical Society*, 117, 7562-7563.
- Hedlund J., Jorvall H., Persson B., (2010), "Subdivision of the MDR superfamily of medium-chain dehydrogenases/reductases through iterative hidden Markov model refinement", *BMC Bioinformatics*, 11, 534.
- Hollmann F., Schmid A., (2004), "Electrochemical regeneration of oxidoreductases for cell-free biocatalytic redox reactions", *Biocatalysis and Biotransformation*, 22, 63-88.
- Hummel W., Kula M.R., (1989), "Dehydrogenases for the synthesis of chiral compounds", *European Journal of Biochemistry*, 184, 1-13.
- Stewart J.D., (2007), "Future directions in biocatalysis", *Amsterdam*, 650 Elsevier., 345.
- Johannes T., Simurdiak M.R., Zhao H., (2006), "Encyclopedia of Chemical Processing", 101-110.
- Johannes T.W., Woodyer R.D., Zhao H., (2007), "Efficient regeneration of NADPH using an engineered phosphite dehydrogenase", *Biotechnology and Bioengineering*, 96, 18-26.
- Johannes T.W., Zhao H., (2006), "Directed evolution of enzymes and biosynthetic pathways", *Current Opinion in Microbiology*, 9, 261-267.
- Karlsson A., El-Ahmad M., Johansson K., Shafqat J., Jorvall H., Eklund H., Aswamy S. (2003), "Tetrameric NAD-dependent alcohol dehydrogenase", *Chemico-Biological Interactions*, 143-144, 239-245.
- Katchalski-Katzir E., Kraemer D.M., (2000), "Eupergit® C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 10, 157-176.
- Kim J., Jia H., Lee, C.W., Chung S.-W., Kwak J. H., Shin Y., Dohnalkova A., Kim B. G., Wang P., Grate, J.W., (2006), "Single enzyme nanoparticles in nanoporous silica: A hierarchical approach to enzyme stabilization and immobilization", *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 474-480.

Koeller K.M., Wong C.H., (2001), “Enzymes for chemical synthesis”, *Nature*, 409, 232-240.

Korkhin Y., Kalb A.J., Peretz M., Bogin O., Burstein Y., Frolow F., (1998), “NADP-dependent bacterial alcohol dehydrogenases: crystal structure, cofactor-binding and cofactor specificity of the ADHs of *Clostridium beijerinckii* and *Thermoanaerobacter brockii*”, *Journal of Molecular Biology*, 278, 967-981.

Korkhin Y., Kalb A.J., Peretz M., Bogin O., Burstein Y., Frolow F., (1999), “Oligomeric integrity--the structural key to thermal stability in bacterial alcohol dehydrogenases”, *Protein Sci.*, 8, 1241-1249.

Kosjek B., Nti-Gyabaah J., Telari K., Dunne L., Moore J.C., (2008), “Preparative Asymmetric Synthesis of 4,4-Dimethoxytetrahydro-2H-pyran-3-ol with a Ketone Reductase and in Situ Cofactor Recycling using Glucose Dehydrogenase”, *Organic Process Research & Development*, 12, 584-588.

Li C., Heatwole J., Soelaiman S., Shoham M., (1999a), “Crystal structure of a thermophilic alcohol dehydrogenase substrate complex suggests determinants of substrate specificity and thermostability”, *Proteins*, 37, 619-627.

Li C., Heatwole J., Soelaiman S., Shoham M., (1999b), “Crystal structure of a thermophilic alcohol dehydrogenase substrate complex suggests determinants of substrate specificity and thermostability”, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 37, 619-627.

Li Q., Mettew L.K., Xun L., (2011), “Biochemical characterization of ethanol-dependent reduction of furfural by alcohol dehydrogenases”, *Biodegradation*, 22, 1227-1237.

Li Z., Van J. B., Duetz W. A., Schmid A., De Raadt A., Griengl H. Witholt B. (2002), “Oxidative biotransformations using oxygenases”, *Current Opinion in Chemical Biology*, 6, 136-144.

Littlechild J.A., Guy J.E., Isupov M.N., (2004), “Hyperthermophilic dehydrogenase enzymes”, *Biochem Soc Trans*, 32, 255-258.

Mateo C. B., Valeria G., Fernando R.T., Manuel F., Aurelio J.M.P., Lorena B., Gloria F., Claudia O.A., Jose M. G., Roberto F. L., (2008), “Immobilization and Stabilization of Proteins by Multipoint Covalent Attachment on Novel Amino-Epoxy-Sepabeads®”, *Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells*, Second Edition, 22, 153-162.

Matsuda T., Yamanaka R., Nakamura K., (2009), “Recent progress in biocatalysis for asymmetric oxidation and reduction”, *Tetrahedron: Asymmetry*, 20, 513-557.

Mertens R., Greiner L., Van E.C.D., Haaker H.B., Liese A., (2003), “Practical applications of hydrogenase I from *Pyrococcus furiosus* for NADPH generation and regeneration”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 24-25:39-52.

Mesentsev A.V., Lamzin V.S., Tishkov V.I., Ustinnikova T.B., Popov V.O., (1997), "Effect of pH on kinetic parameters of NAD⁺-dependent formate dehydrogenase", *Biochem. J.*, 321, 475-480.

Musa M.M., Phillips R.S., (2011), "Recent advances in alcohol dehydrogenase-catalyzed asymmetric production of hydrophobic alcohols", *Catalysis Science and Technology*, 1, 1311-1323.

Ordu E.B., Karaguler N.G., (2007), "Improving the purification of NAD⁺-dependent formate dehydrogenase from *Candida methylca*", *Prep Biochem Biotechnol*, 37,333-341.

Patel R.N., (2011), "Biocatalytic Routes to Chiral Intermediates for Development of Drugs", In: *Biocatalysis for Green Chemistry and Chemical Process Development*, John Wiley & Sons Inc., 89-149

Riebel B.R., Gibbs P.R., Wellborn W.B., Bommarius A.S., (2002), "Cofactor Regeneration of NAD⁺ from NADH: Novel Water-Forming NADH Oxidases", *Advanced Synthesis & Catalysis*, 344, 1156-1168.

Rissom S., Beliczey J., Giffels G., Kragl U., Wandrey C., (1999), "Asymmetric reduction of acetophenone in membrane reactors: comparison of oxazaborolidine and alcohol dehydrogenase catalysed processes", *Tetrahedron: Asymmetry*, 10, 923-928.

Rossmann M.G., Moras D., Olsen K.W., (1974), "Chemical and biological evolution of nucleotide-binding protein", *Nature*, 250, 194-199.

Rozzell J.D., (1999), "Commercial scale biocatalysis :myths and realities", *Bioorg. Med. Chem.*, 7, 2253–2261.

Schmid A., Dordick J.S., Hauer B., Kiener A., Wubbolts M., Witholt B., (2001), "Industrial biocatalysis today and tomorrow", *Nature*, 409, 258-268.

Shaked Z., Whitesides G.M., (1980), "Enzyme-catalyzed organic synthesis: NADH regeneration by using formate dehydrogenase", *Journal of the American Chemical Society*, 102, 7104-7105.

Sheldon R.A., (2007), "Enzyme immobilization: The quest for optimum performance", *Advanced Synthesis & Catalysis*, 349, 1289-1307.

Slade A., Kennedy J.F., (1985), "Handbook of enzyme biotechnology", 2nd edition. Edited by A. Wiseman, Ellis Horwood, Chichester,. pp. 457, ISBN 0-85312-420-5, *British Polymer Journal*, (1986), 18, 274.

Stampfer W., Kosjek B., Faber K., Kroutil W., (2002a), "Biocatalytic asymmetric hydrogen transfer employing *rhodococcus ruber* DSM 44541", *The Journal of Organic Chemistry*, 68, 402-406.

Stampfer W., Kosjek B., Moitzi C., Kroutil W., Faber K., (2002b), "Biocatalytic asymmetric hydrogen transfer", *Angew Chem Int Ed Engl*, 41, 1014-1017.

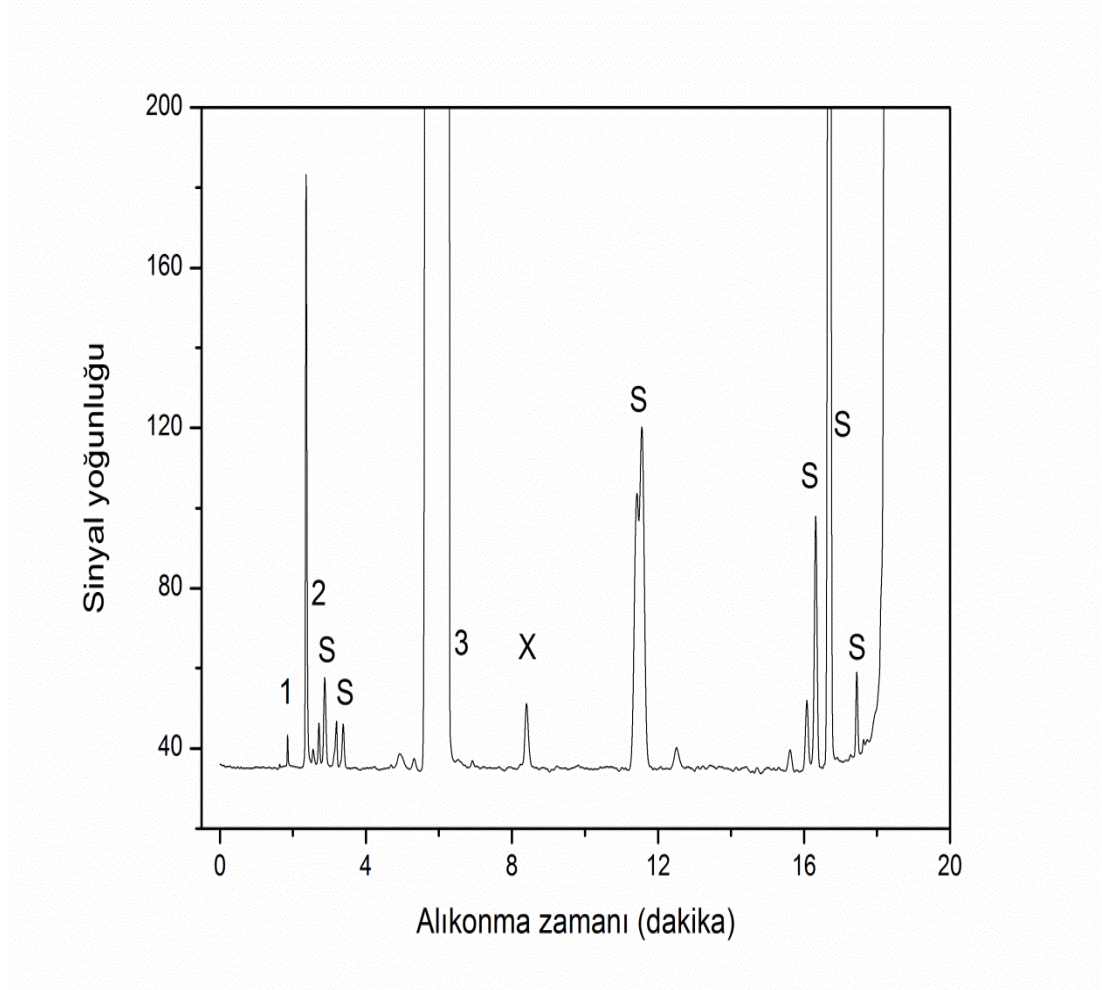
- Stephanie G.B., Don A.C., John M.W., (2002), "The search for the ideal biocatalyst", *Nature Biotechnology*, 20, 37-45.
- Stewart J.D., (2001), "Dehydrogenases and transaminases in asymmetric synthesis", *Curr Opin Chem Biol*, 5, 120-129.
- Studier F.W., (2005), "Protein production by auto-induction in high density shaking cultures", *Protein Expr Purif*, 41, 207-234.
- Theorell H., (1967), "Function and structure of liver alcohol dehydrogenase", *Harvey Lect*, 61, 17 –41.
- Tishkov V.I., Popov V.O., (2006), "Protein engineering of formate dehydrogenase", *Biomolecular Engineering*, 23, 89-110.
- Wallon G., Kryger G., Lovett S.T., Oshima T., Ringe D., Petsko G.A., (1997), "Crystal structures of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* 3- isopropylmalate dehydrogenase and comparison with their thermophilic counterpart from *Thermus thermophilus*", *J Mol Biol*. 266, 1016-1031.
- Wandrey C., (2004), "Biochemical reaction engineering for redox reactions", *Chem Rec*, 4, 254-265.
- Weuster-Botz D., Paschold H., Striegel B., Gieren H., Kula M.R., Wandrey C., (1994), "Continuous computer controlled production of formate dehydrogenase (FDH) and isolation on a pilot scale", *Chemical Engineering & Technology* 17, 131-137.
- Wichmann R., (2005), "Cofactor regeneration at the lab scale", *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 92, 225–260.
- Wichmann R., Vasic-Racki D., (2005), "Cofactor Regeneration at the Lab Scale", In: *Technology Transfer in Biotechnology*, Springer, Berlin, Heidelberg, 225-260.
- Wilds A.L., (1944), "Reduction with aluminum alkoxides (The meerwein- ponndorf-verley reduction)", *Organic Reactions*, 2, 178.
- Wohlgemuth R., (2011), "Green production of fine chemicals by isolated enzymes", In: *Biocatalysis for Green Chemistry and Chemical Process Development*, John Wiley & Sons, Inc., 277-298.
- Won K., Kim S., Kim K.J., Park H.W., Moon S.J., (2005), "Optimization of lipase entrapment in Ca-alginate gel beads", *Process Biochemistry*, 40, 2149-2154.
- Ying X., Ma K., (2011), "Characterization of a zinc-containing alcohol dehydrogenase with stereoselectivity from the hyperthermophilic archaeon *thermococcus guaymasensis*", *Journal of Bacteriology*, 193, 3009-3019.
- Zaks A., (2001), "Industrial biocatalysis", *Current Opinion in Chemical Biology*, 5, 130-136.

ÖZGEÇMİŞ

Fatih AKTAŞ 26.06.1976 yılında İzmit'te doğdu. İlk, orta ve Lise eğitimini İzmit'te tamamladı. 1994 yılında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği bölümünü kazandı. 1998 yılında lisans eğitimini tamamladıktan sonra Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen bilimleri Enstitüsünde Biyoloji bölümünde yüksek lisansa başladı. 2002 yılında yüksek lisansını tamamladıktan sonra 2006 yılında GYTE Mühendislik ve Fen bilimleri Enstitüsünde kimya bölümünde doktora programına başladı.

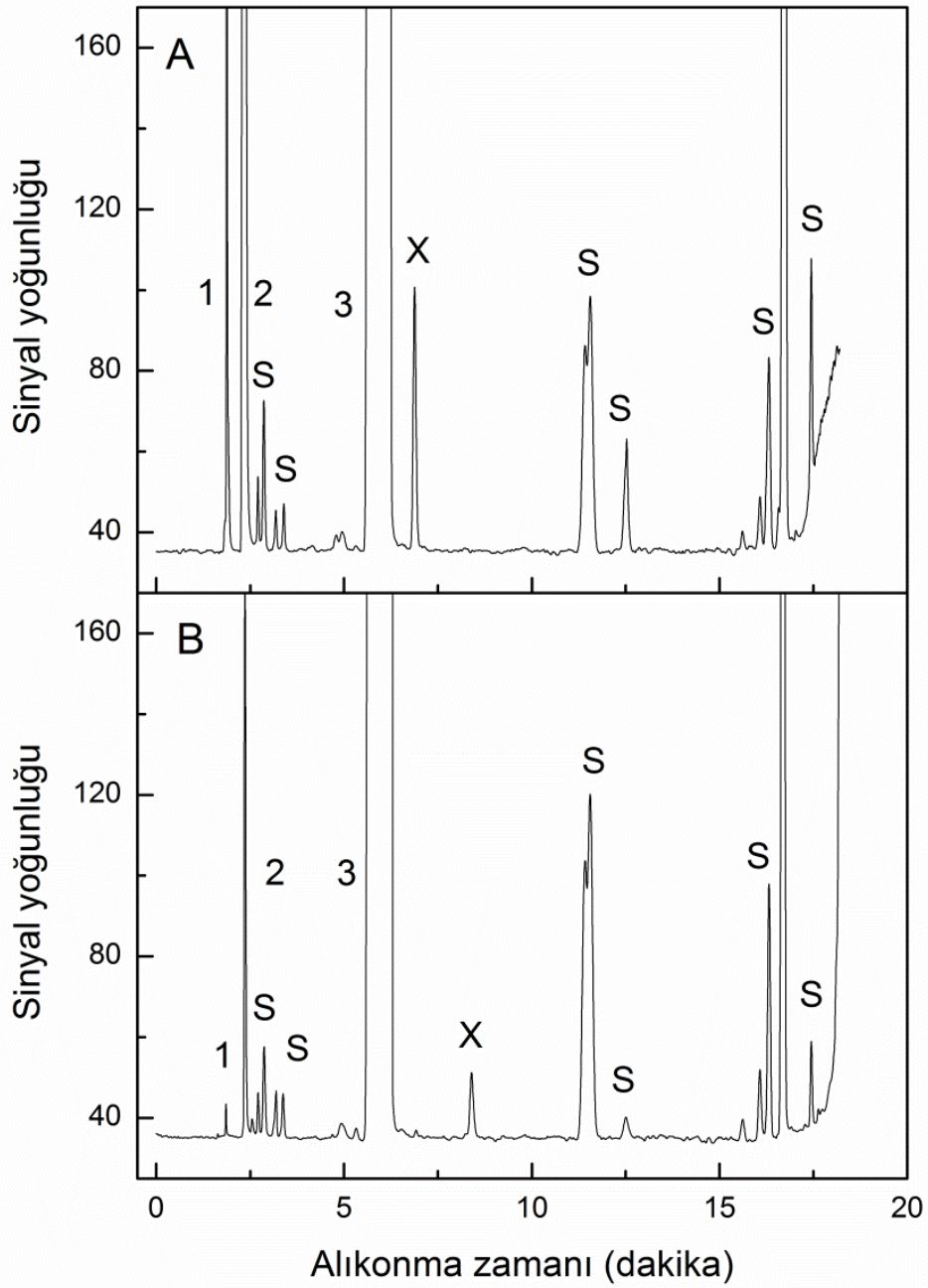
EKLER

• *BtADH*'ın alkol, keton ve aldehid reaksiyonlarının GC analizleri



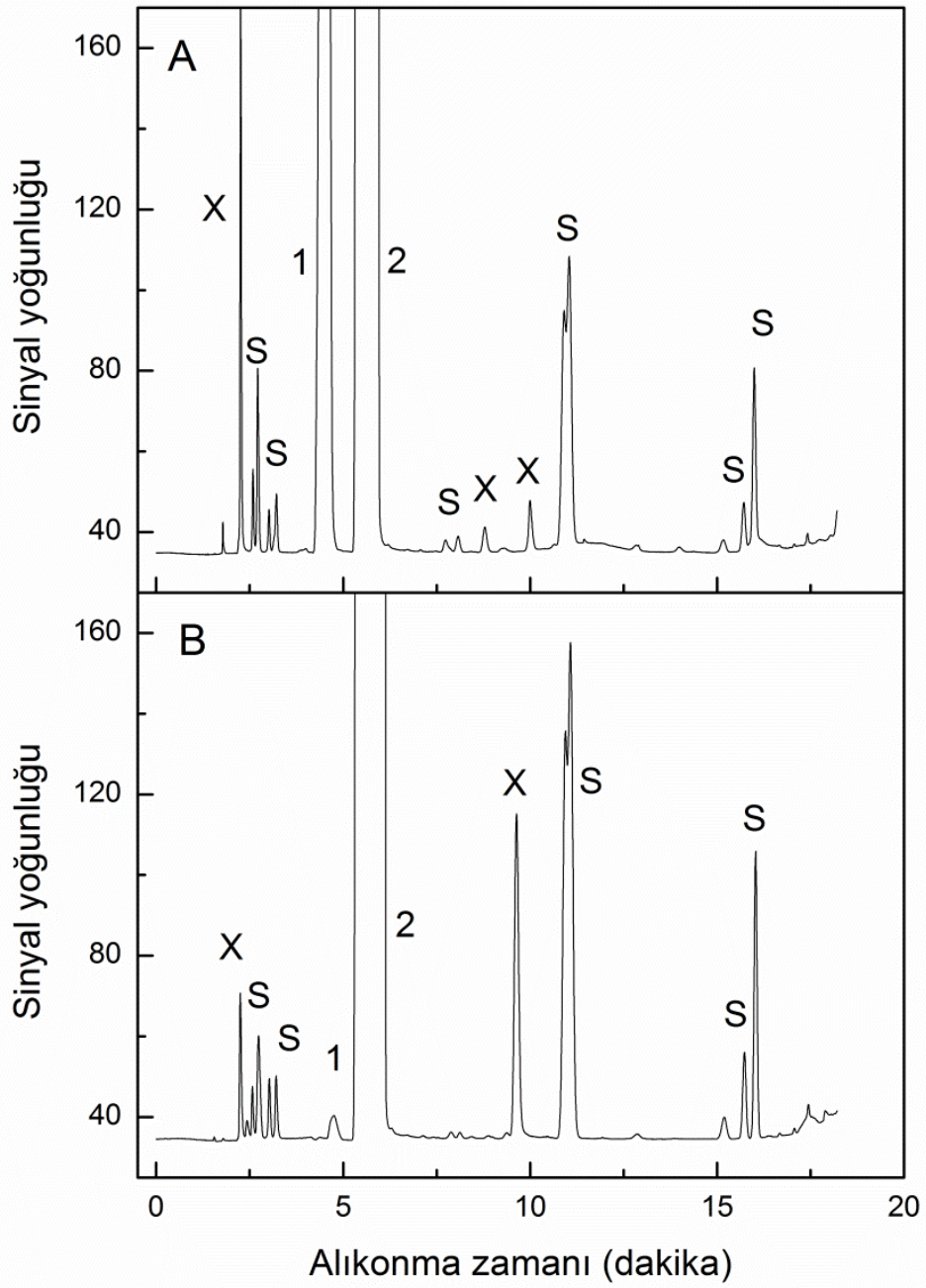
Şekil 9.1: Asetaldehid'in ikili enzim sistemi ile 3 saatlik reaksiyonunun GC analizi.

Şekil 9.1'de ki gaz kromatografisi analizi sonuçlarına göre bileşiklerin alıkonma zamanları 1) asetaldehid, 2) etanol 2,36 dakika, 3) etil asetat 6,17 dakika, X) bilinmeyen pik ve S) safsızlıktır.



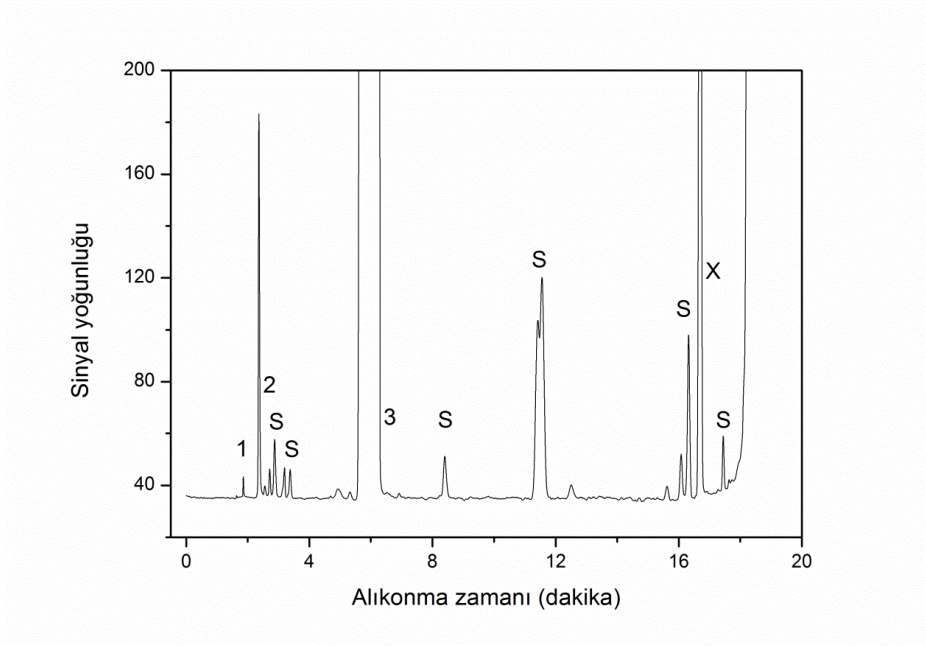
Şekil 9.2: A) Asetaldehid'in ikili enzim ile 20 saatlik reaksiyonunun ve B) standartının GC analizi.

Şekil 9.2'de ki gaz kromatografisi analizi sonuçlarına göre bileşiklerin alıkonma zamanları 1) asetaldehid, 2) etanol 2,36 dakika, 3) etil asetat 6,17 dakika, X) bilinmeyen pik ve S) safsızlıktır.



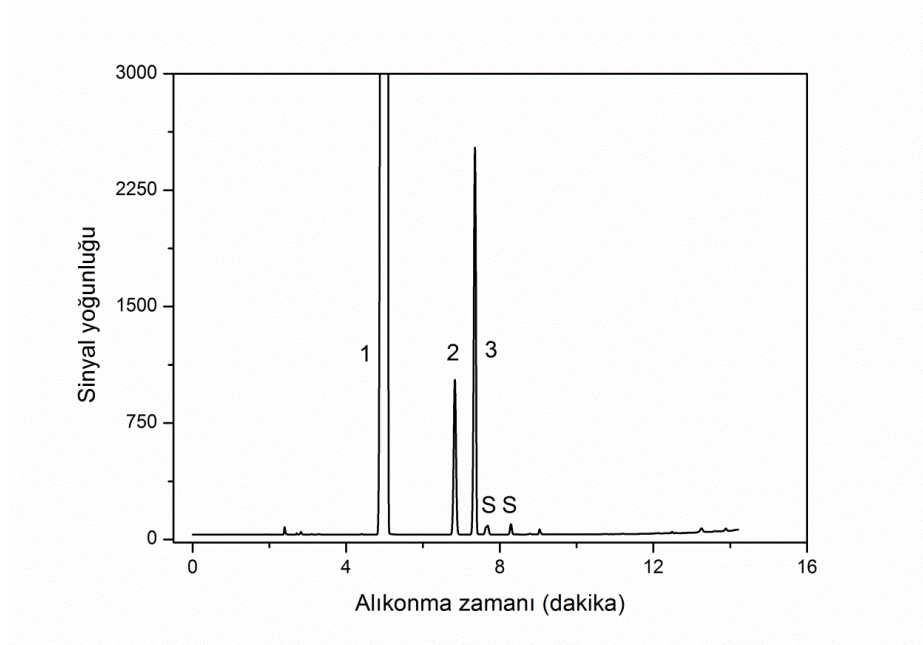
Şekil 9.3: A) 2,3 bütandion standartının ve ikili enzim ile B) 20 saatlik reaksiyonunun GC analizi.

Şekil 9.3’de ki gaz kromatografisi analizi sonuçlarına göre bileşiklerin alıkonma zamanları 1) 2,3 bütandion 4,59 dakika, 2) etil asetat 5,91 dakika, X) bilinmeyen pik ve S) safsızlıktır.



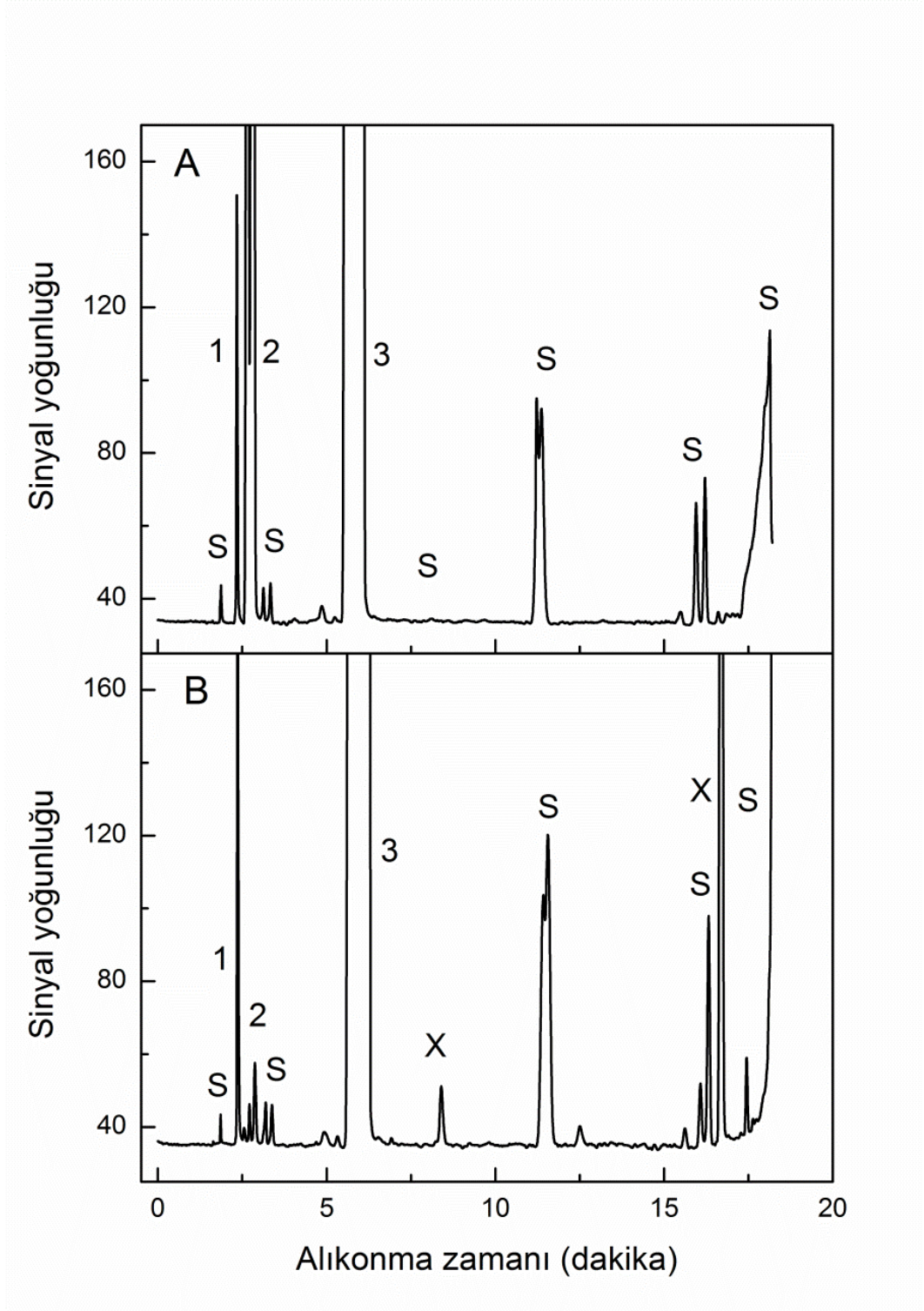
Şekil 9.4: Asetonun ikili enzim sistemi ile 4,5 saatlik reaksiyonunun GC analizi.

Şekil 9.4’de ki gaz kromatografisi analizi sonuçlarına göre bileşiklerin alıkonma zamanları 1) aseton 2,71dakika, 2) 2-propanol 2,87 dakika 3) etil asetat 6,09 dakika, X) bilinmeyen pik ve S) safsızlıktır.



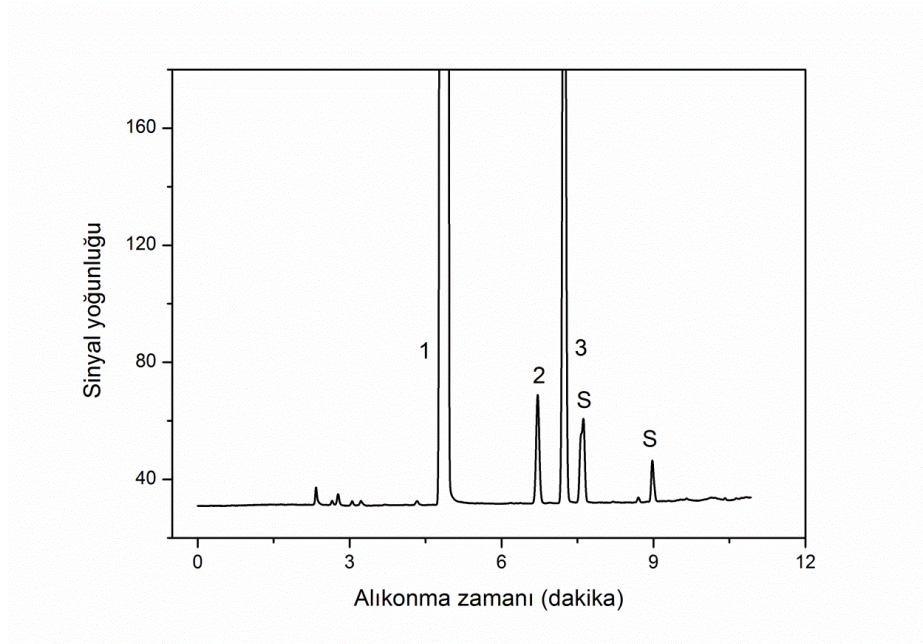
Şekil 9.5: 2-pentanol standardının GC analizi.

Şekil 9.5’de ki gaz kromatografisi analizi sonuçlarına göre bileşiklerin alıkonma zamanları (1) etil asetat 4,85 dakika, (2) metil propil keton 6,82 dakika, (3) 2-pentanol 7,35 dakika ve (S) safsızlıktır.



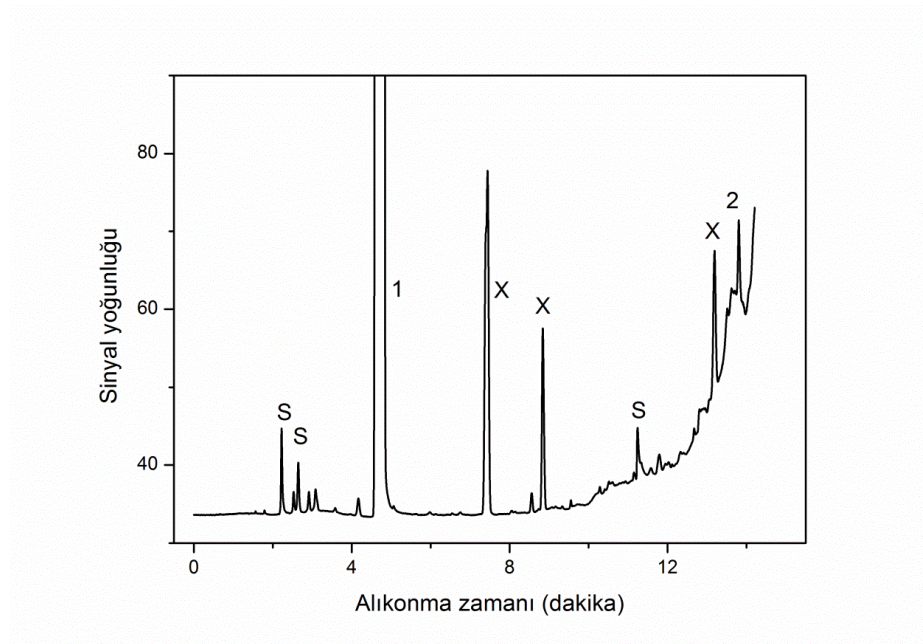
Şekil 9.6: A) Aseton standartının ve B) ikili enzim sistemi ile 20 saatlik reaksiyonunun GC analizi.

Gaz kromatografisi analizi sonuçlarına göre bileşiklerin alıkonma zamanları 1) aseton 2,71dakika, 2) 2-propanol 2,88 dakika, 3) etil asetat 6,22 dakika ve X) bilinmeyen pik ve S) safsızlıktır.



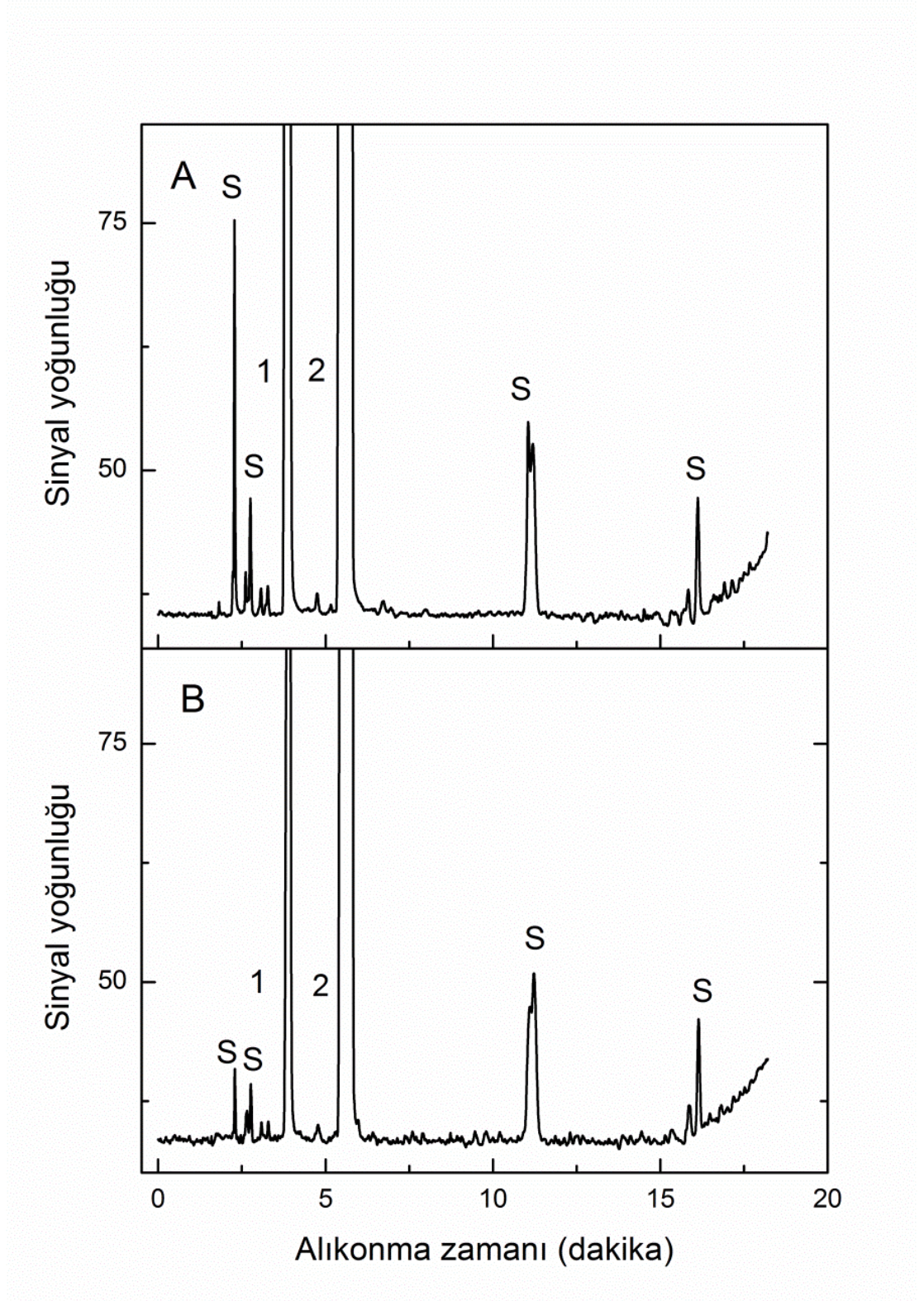
Şekil 9.7: 2-pentanol'ün 4,5 saatlik reaksiyonunun GC analizi.

Şekil 9.7'de ki gaz kromatografisi analizi sonuçlarına göre bileşiklerin alıkonma zamanları 1) etil asetat 4,9 dakika, 2) metil propil keton 6,71 dakika, 3) 2-pentanol 7,32 dakika ve S) safsızlıktır.



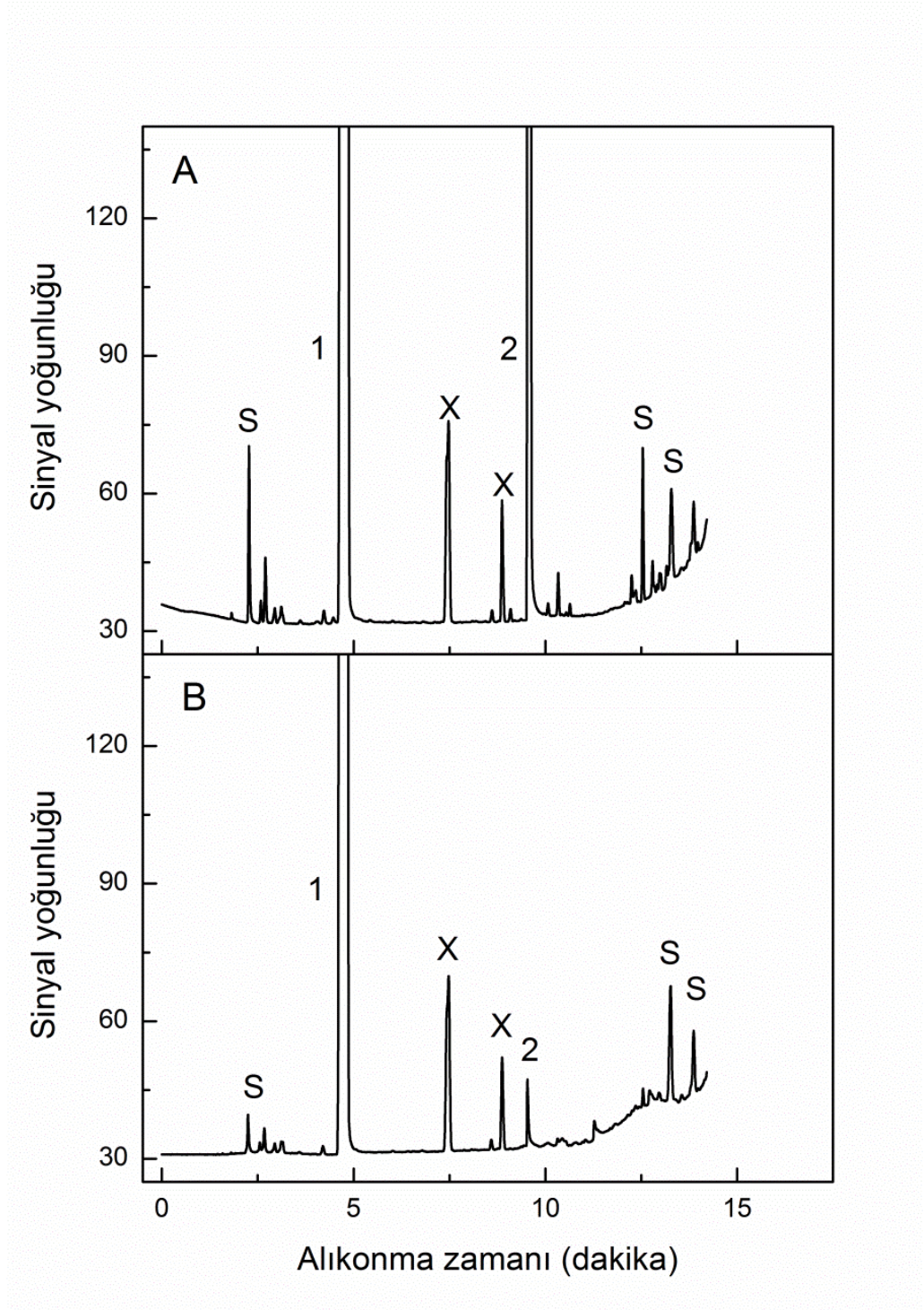
Şekil 9.8: 1-dekanol'ün 20 saatlik reaksiyonunun GC analizi.

Şekil 9.8’de ki gaz kromatografisi analizi sonuçlarına göre bileşiklerin alıkonma zamanları 1) etil asetat 4,81 dakika, 2) 1-dekanol 13,68 dakika, X) bilinmeyen pik ve S) safsızlıktır.



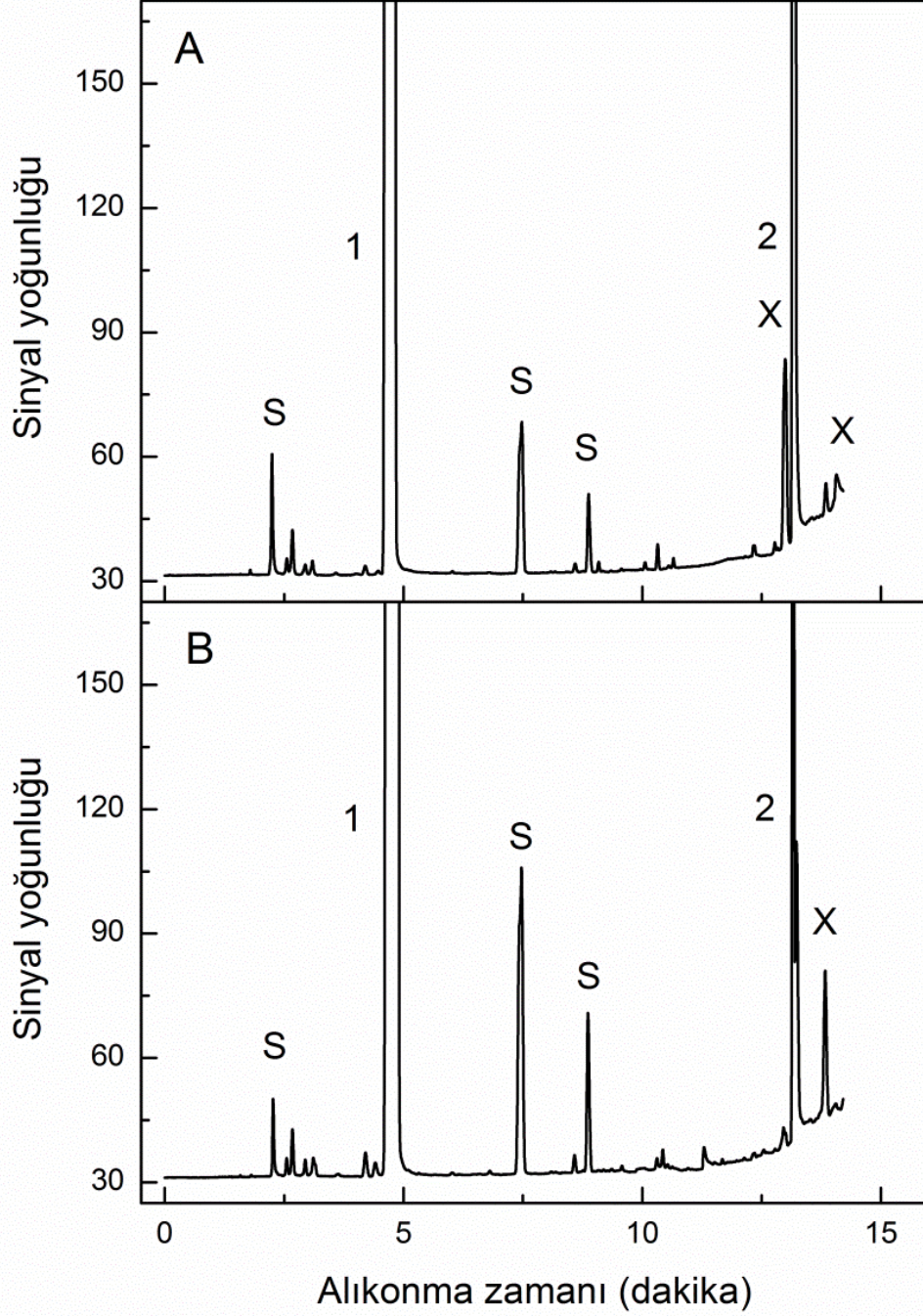
Şekil 9.9: A) 1-propanol standartının ve B) 20 saatlik reaksiyonunun GC analizi.

Şekil 9.9'da ki gaz kromatografisi analizi sonuçlarına göre bileşiklerin alıkonma zamanları 1) 1-propanol 3,94 dakika, 2) etil asetat 5,81 dakika ve S) safsızlıktır.



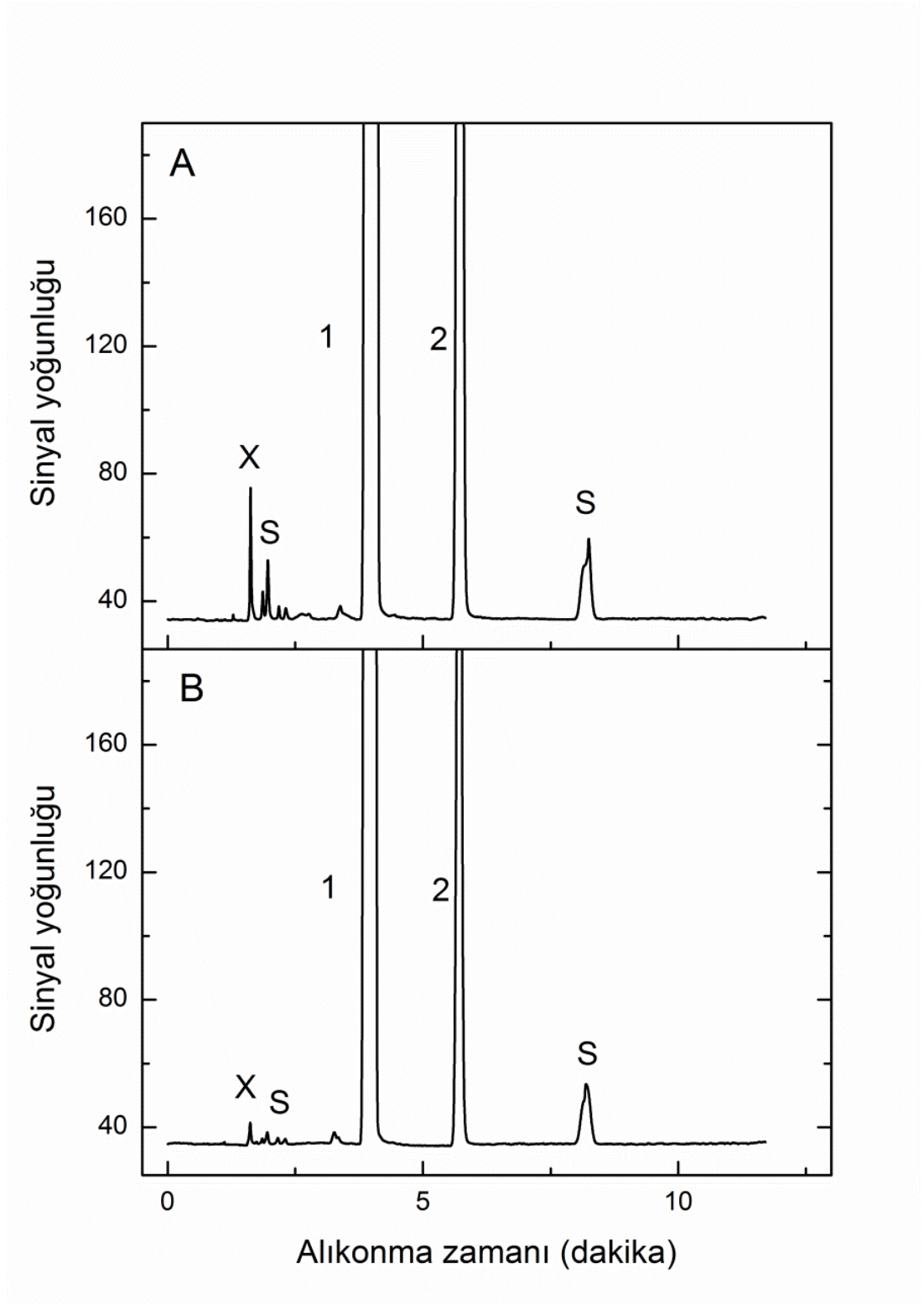
Şekil 9.10: A) 1,3 propandiol standartının ve B) 4,5 saatlik reaksiyonunun GC analizi.

Şekil 9.10'da ki gaz kromatografisi analizi sonuçlarına göre bileşiklerin alıkonma zamanları 1) etil asetat 4,8 dakika, 2) 1,3 propandiol 9,53 dakika, X) bilinmeyen pik ve S) safsızlıktır.



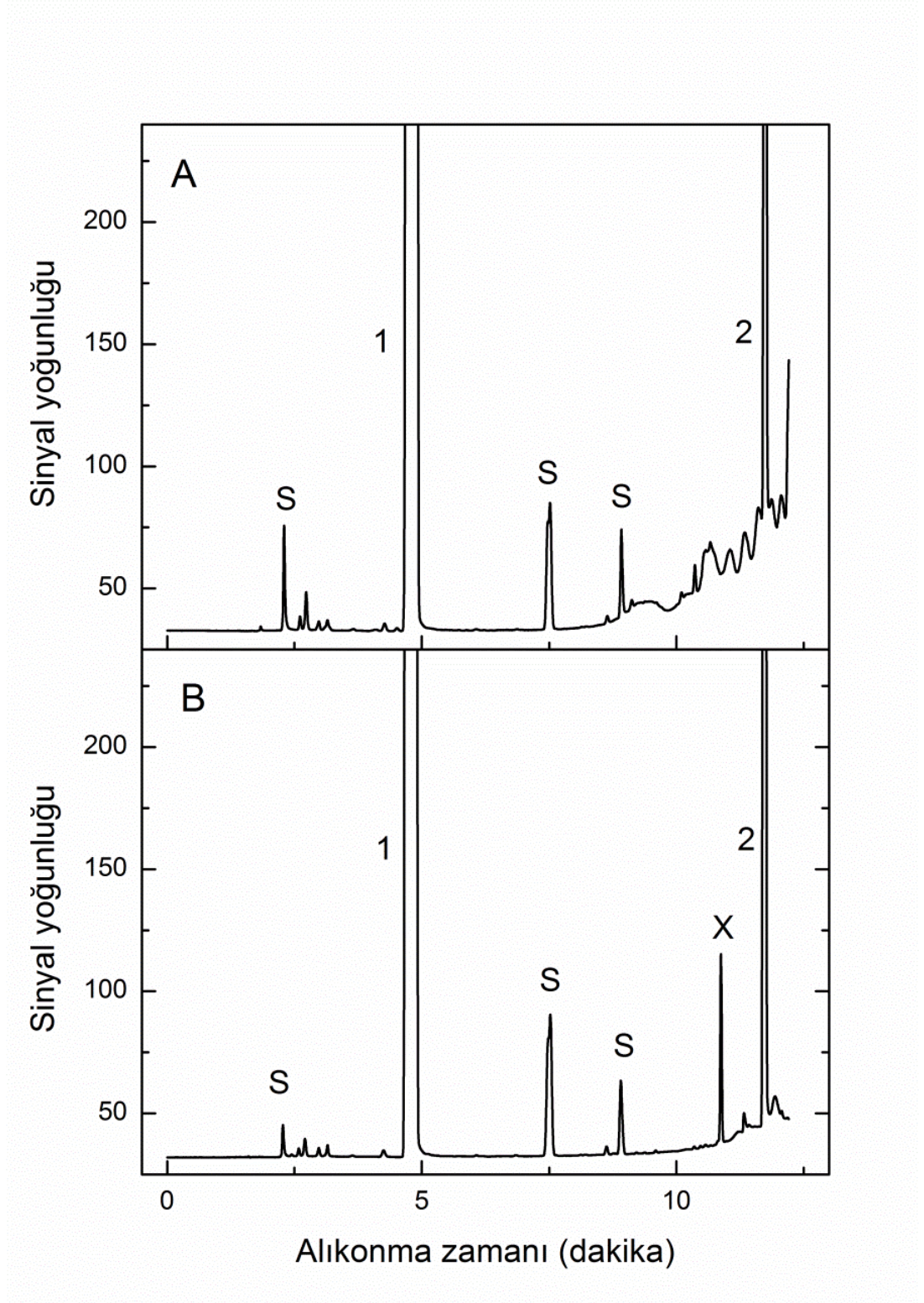
Şekil 9.11: A) 1,6 hekzandiol standartının ve B) 4,5 saatlik reaksiyonun GC analizi.

Şekil 9.11'de ki gaz kromatografisi analizi sonuçlarına göre bileşiklerin alıkonma zamanları 1) etil asetat 4,85 dakika, 2) 1,3 hekzandiol 13,16 dakika, X) bilinmeyen pik ve S) safsızlıktır.



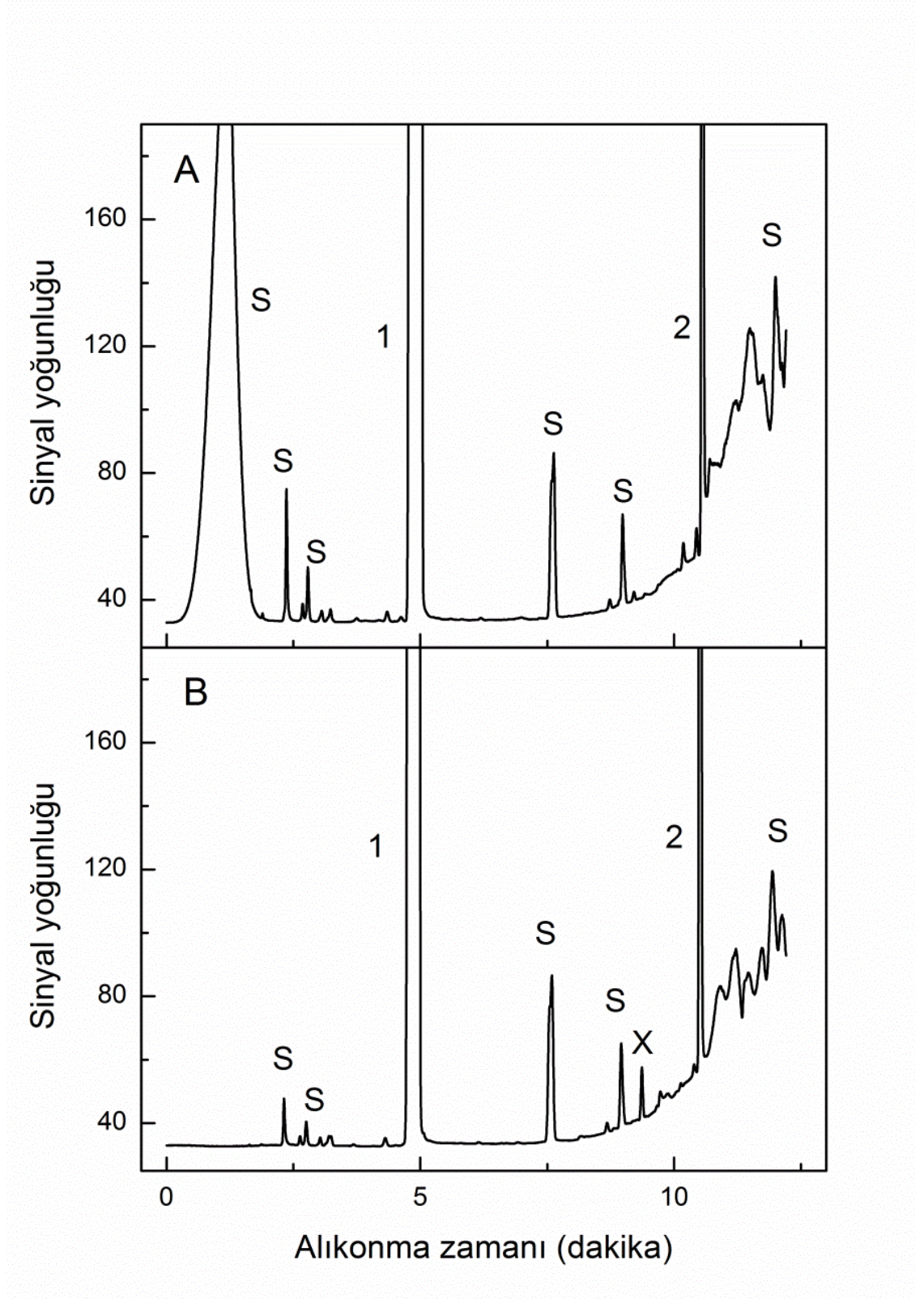
Şekil 9.12: A) 1-bütanol 20 saatlik reaksiyonunun ve B) standartının GC analizi.

Şekil 9.12’de ki gaz kromatografisi analizi sonuçlarına göre bileşiklerin alıkonma zamanları 1) etil asetat 4,05 dakika, 2) 1-bütanol 5,69 dakika, X) bilinmeyen pik ve S) safsızlıktır.



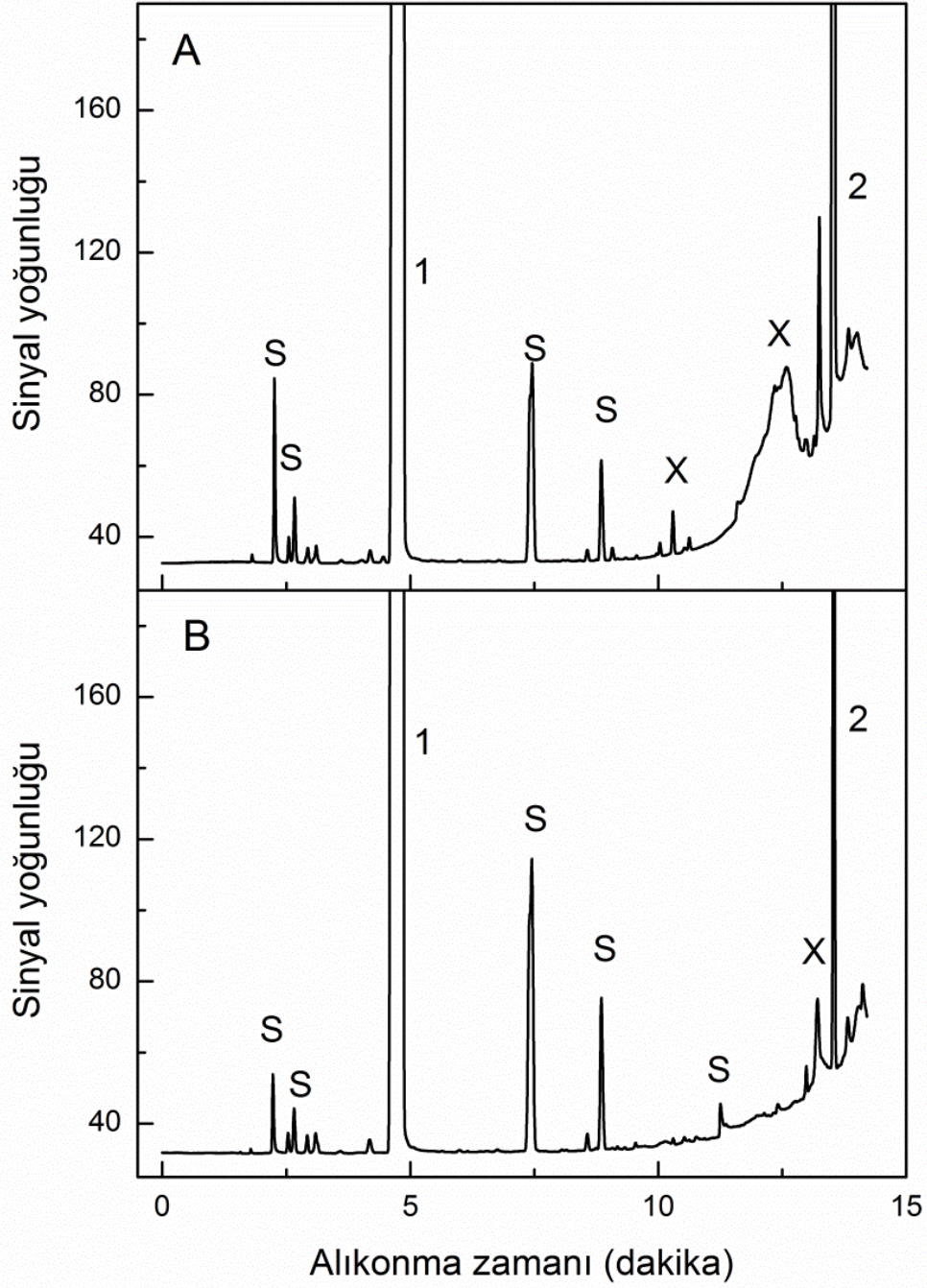
Şekil 9.13: A) 1-heptanol standartının ve B) 20 saatlik reaksiyonunun GC analizi.

Şekil 9.13'de ki gaz kromatografisi analizi sonuçlarına göre bileşiklerin alıkonma zamanları 1) etil asetat 4,86 dakika, 2) 1-heptanol 11,73 dakika, X) bilinmeyen pik ve S) safsızlıktır.



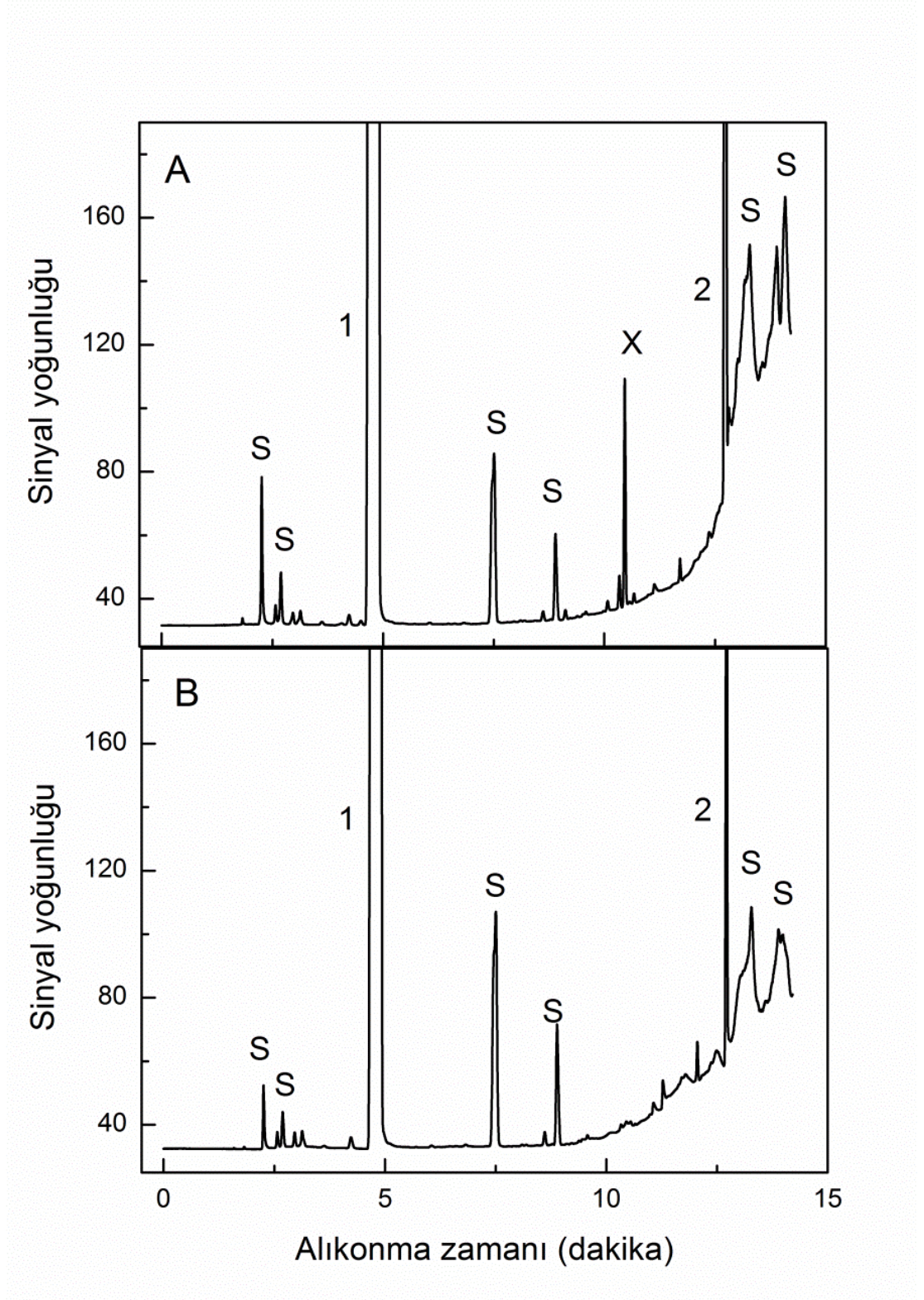
Şekil 9.14: A) 1-hekzanol standartının ve B) 20 saatlik reaksiyonunun GC analizi.

Şekil 9.14’de ki gaz kromatografisi analizi sonuçlarına göre bileşiklerin alıkonma zamanları 1) etil asetat 4,94 dakika, 2) 1-hekzanol 10,51 dakika, X) bilinmeyen pik ve S) safsızlıktır.



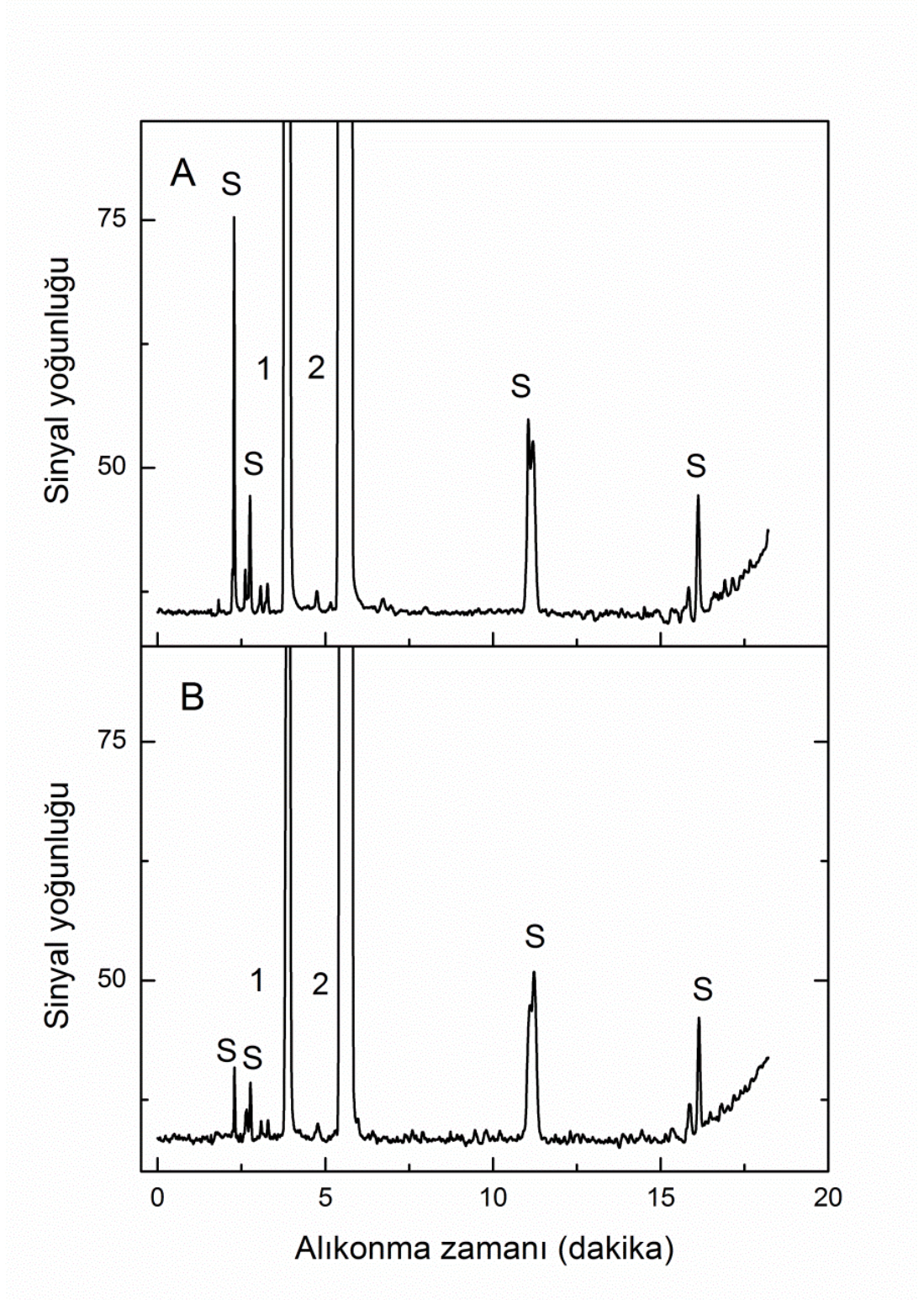
Şekil 9.15: A) 1-nonanol 20 saatlik reaksiyonunun ve B) standartının GC analizi.

Şekil 9.15'de ki gaz kromatografisi analizi sonuçlarına göre bileşiklerin alıkonma zamanları 1) etil asetat 4,81 dakika, 2) 1-nonanol 13,52 dakika, X) bilinmeyen pik ve S) safsızlıktır.



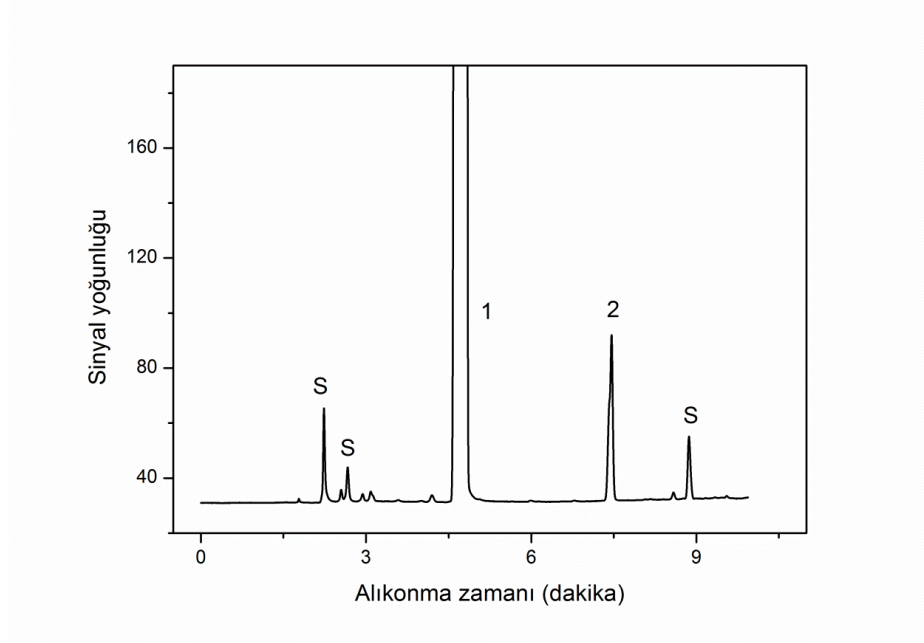
Şekil 9.16: (A) 1-oktanol 20 saatlik reaksiyonunun ve (B) standartının GC analizi.

Şekil 9.16'da ki gaz kromatografisi analizi sonuçlarına göre bileşiklerin alıkonma zamanları (1) etil asetat 4,89 dakika, (2) 1-oktanol 12,71 dakika, (X) bilinmeyen pik ve (S) safsızlıktır.



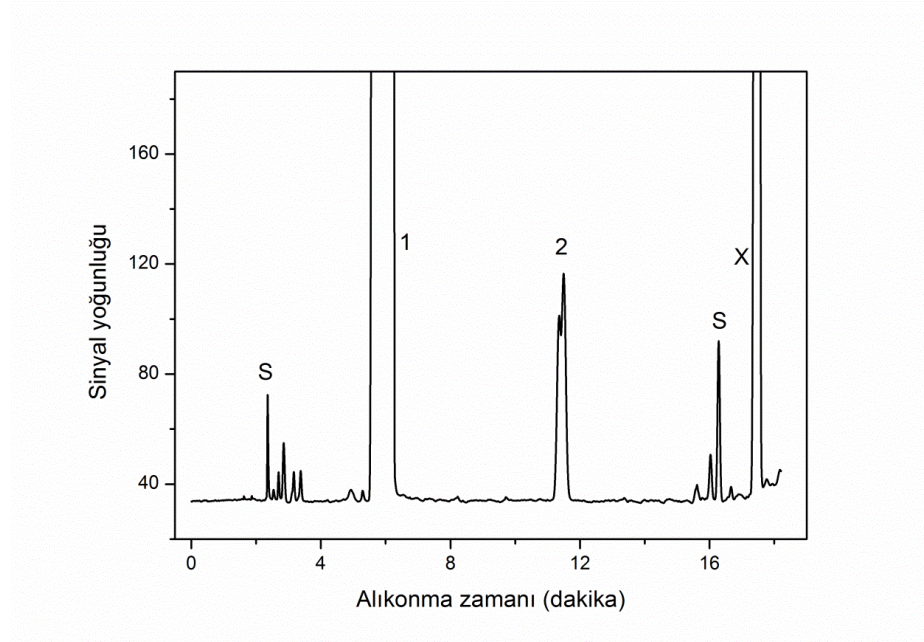
Şekil 9.17: A) 1-pentanol standartının ve B) 20 saatlik reaksiyonunun GC analizi.

Şekil 9.17’de ki gaz kromatografisi analizi sonuçlarına göre bileşiklerin alıkonma zamanları 1) etil asetat 5,68 dakika, 2) 1-pentanol 8,89 dakika ve S) safsızlıktır.



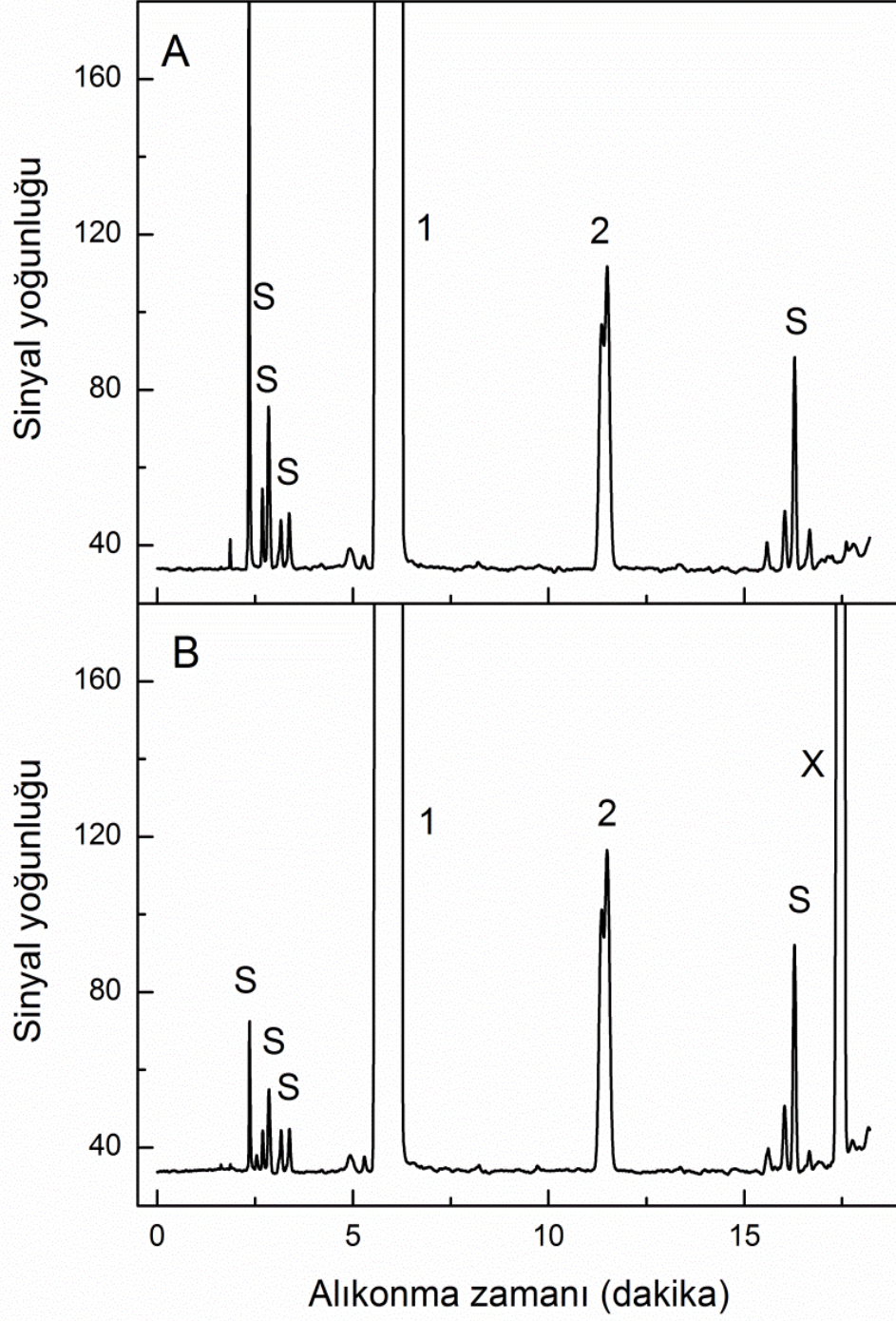
Şekil 9.18: 2-nonanol’ün 4,5 saatlik reaksiyonunun GC analizi.

Şekil 9.18’de ki gaz kromatografisi analizi sonuçlarına göre bileşiklerin alıkonma zamanları 1) etil asetat 4,83 dakika, 2) 2-nonanol 12,95 dakika ve S) safsızlıktır.



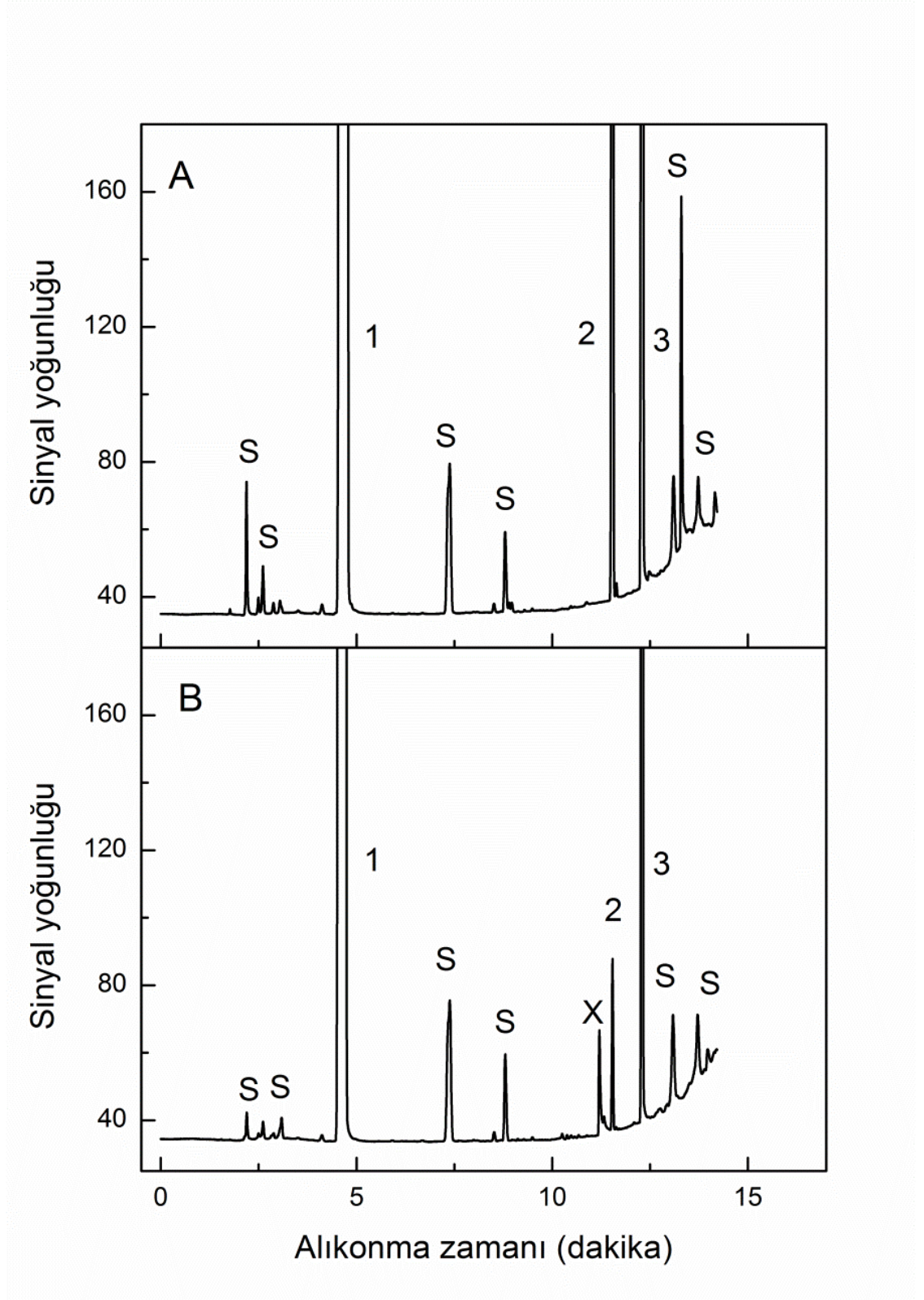
Şekil 9.19: Benzaldehid’in ikili enzim sistemi ile 3 saatlik reaksiyonunun GC analizi.

Şekil 9.19'da ki gaz kromatografisi analizi sonuçlarına göre bileşiklerin alıkonma zamanları 1) etil asetat 6,23 dakika, 2) benzaldehid 11,49 dakika, X) bilinmeyen pik ve S) safsızlıktır.



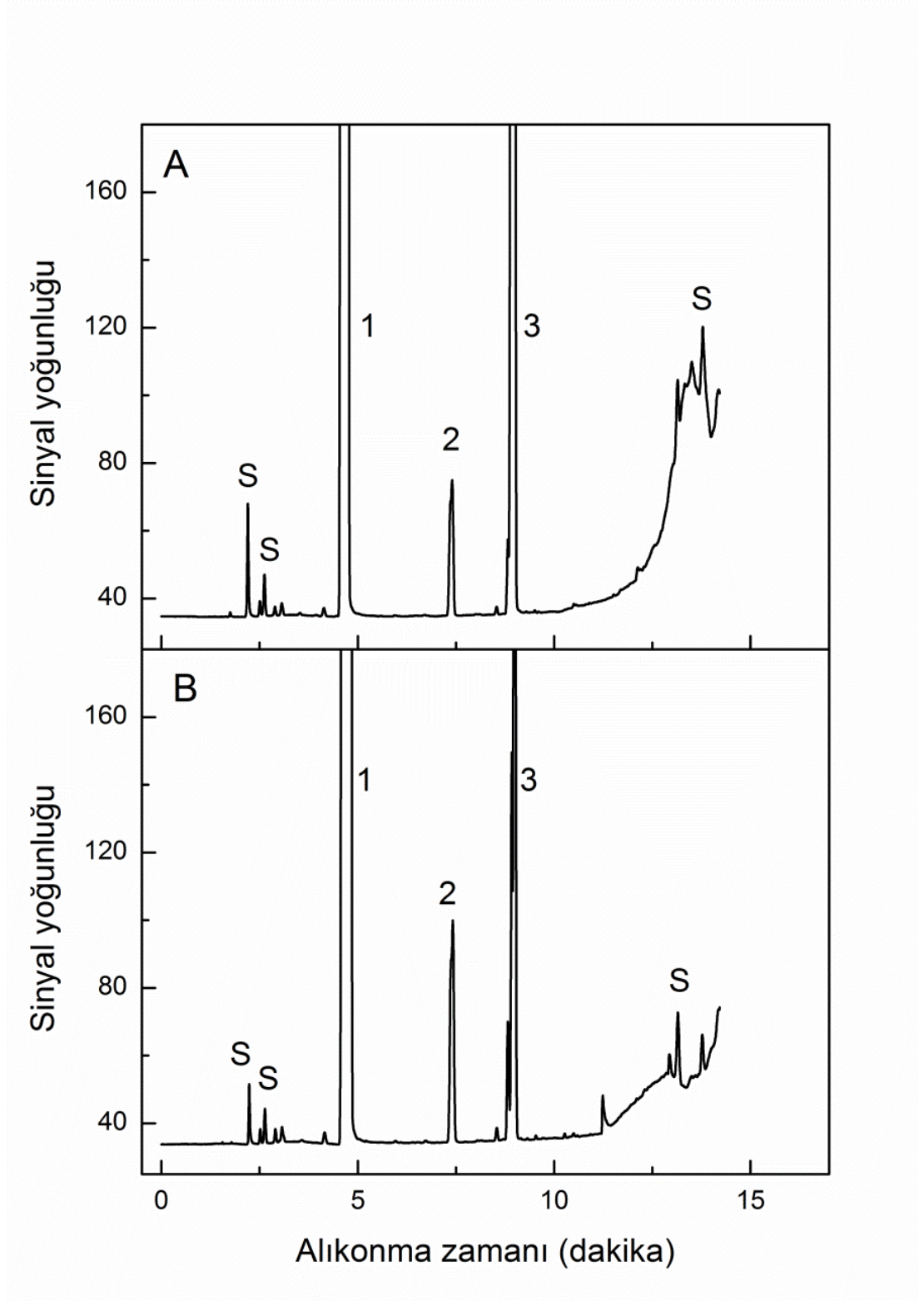
Şekil 9.20: A) Benzaldehid standartının ve B) ikili enzim ile 20 saatlik reaksiyonunun GC analizi.

Şekil 9.20’de ki gaz kromatografisi analizi sonuçlarına göre bileşiklerin alıkonma zamanları 1) etil asetat 6,23 dakika, 2) benzaldehid 11,49 dakika, X) bilinmeyen pik ve S) safsızlıktır.



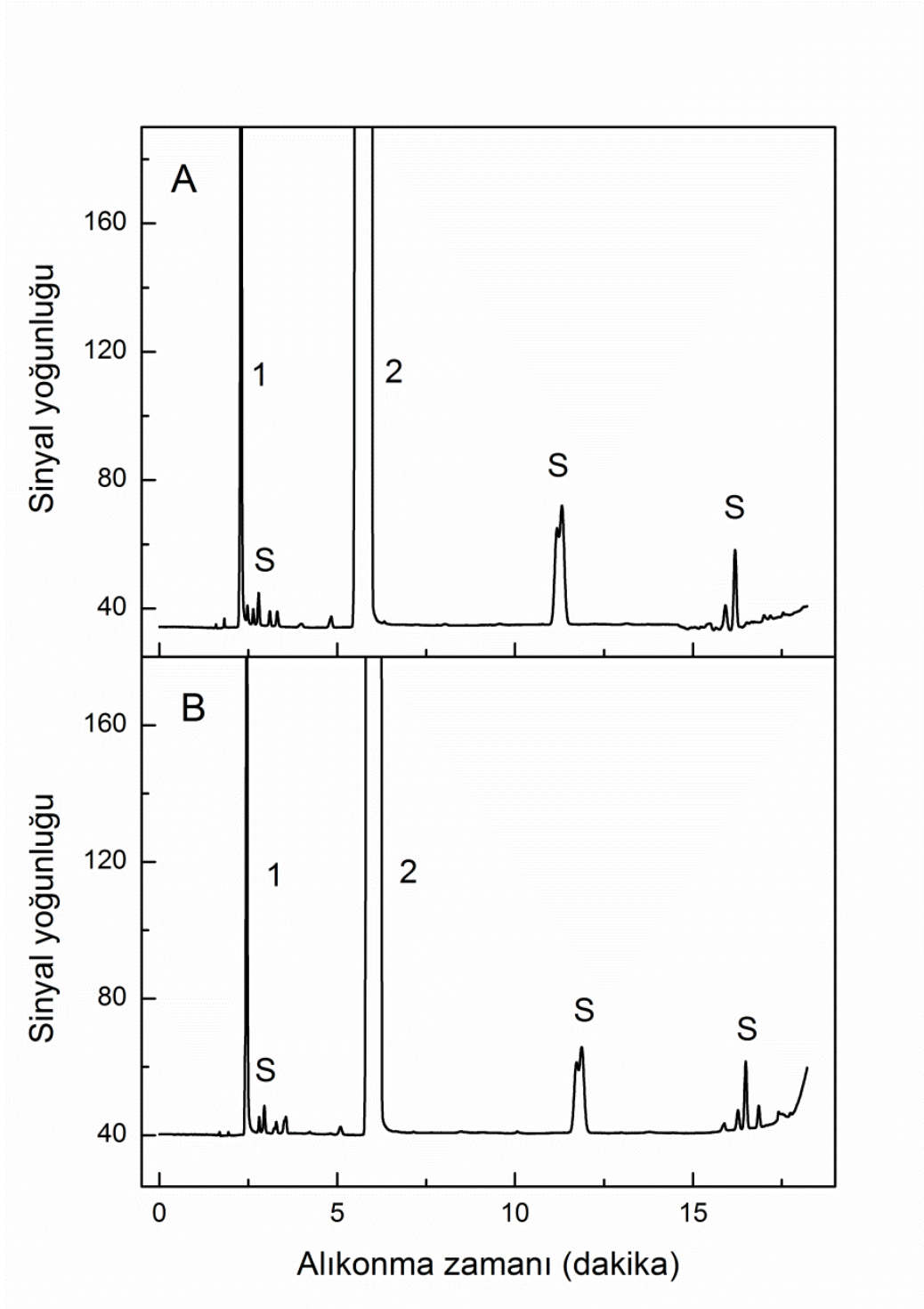
Şekil 9.21: A) Benzil alkol standartının ve B) 4,5 saatlik reaksiyonunun GC analizi.

Şekil 9.21’de ki gaz kromatografisi analizi sonuçlarına göre bileşiklerin alıkonma zamanları 1) etil asetat 4,69 dakika, 2) benzaldehid 11,54 dakika, 3) benzil alkol 12,29 dakika, X) bilinmeyen pik ve S) safsızlıktır.



Şekil 9.22: A) Siklopentanol standartının ve B) 4,5 saatlik reaksiyonunun GC analizi.

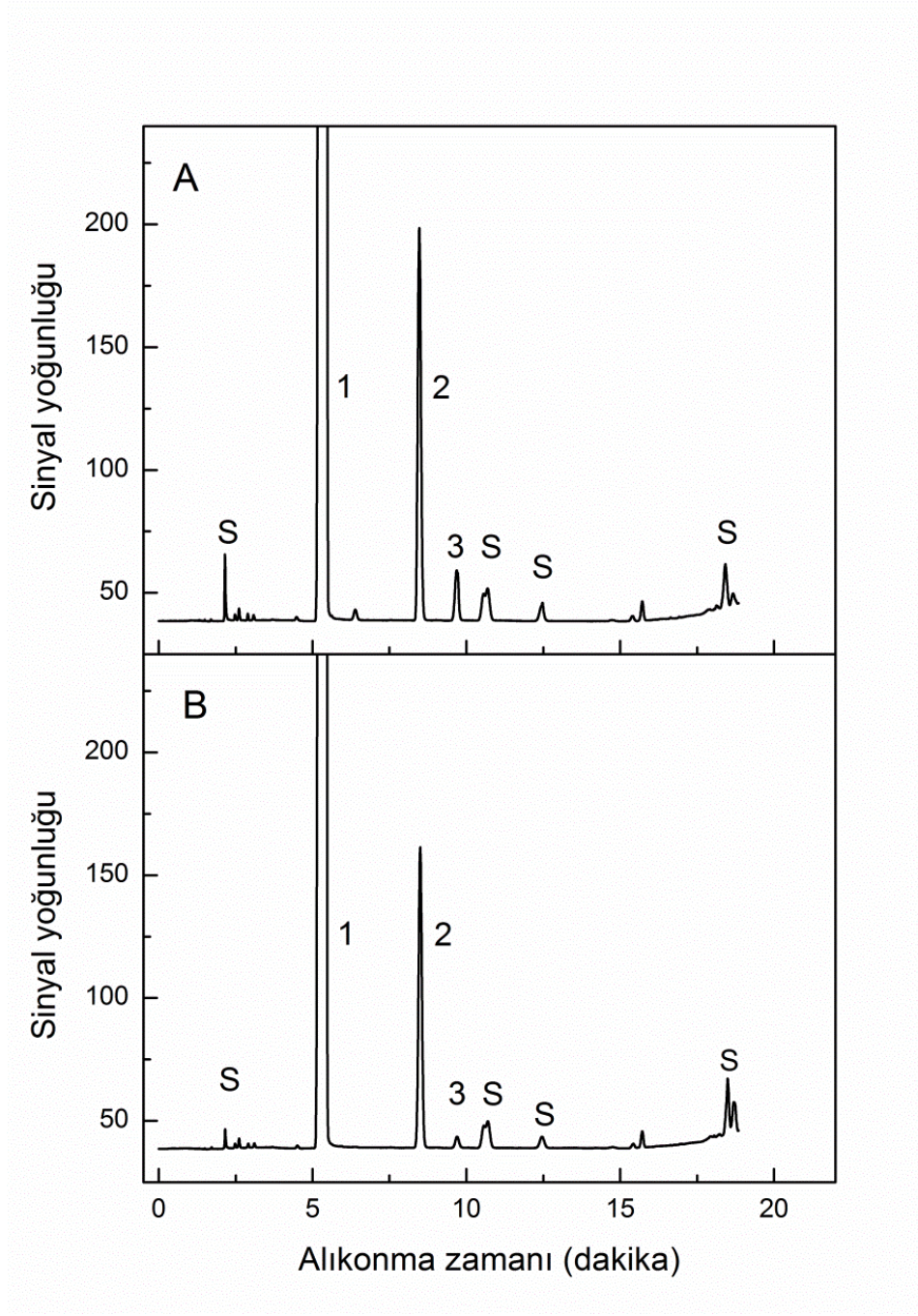
Şekil 9.22’de ki gaz kromatografisi analizi sonuçlarına göre bileşiklerin alıkonma zamanları 1) etil asetat 4,79 dakika, 2) siklopentanon 8,92 dakika, 3) siklopentanol 8,99 dakika ve S) safsızlıktır.



Şekil 9.23: 1) Etanol standartının ve 2) 4,5 saatlik reaksiyonunun GC analizi.

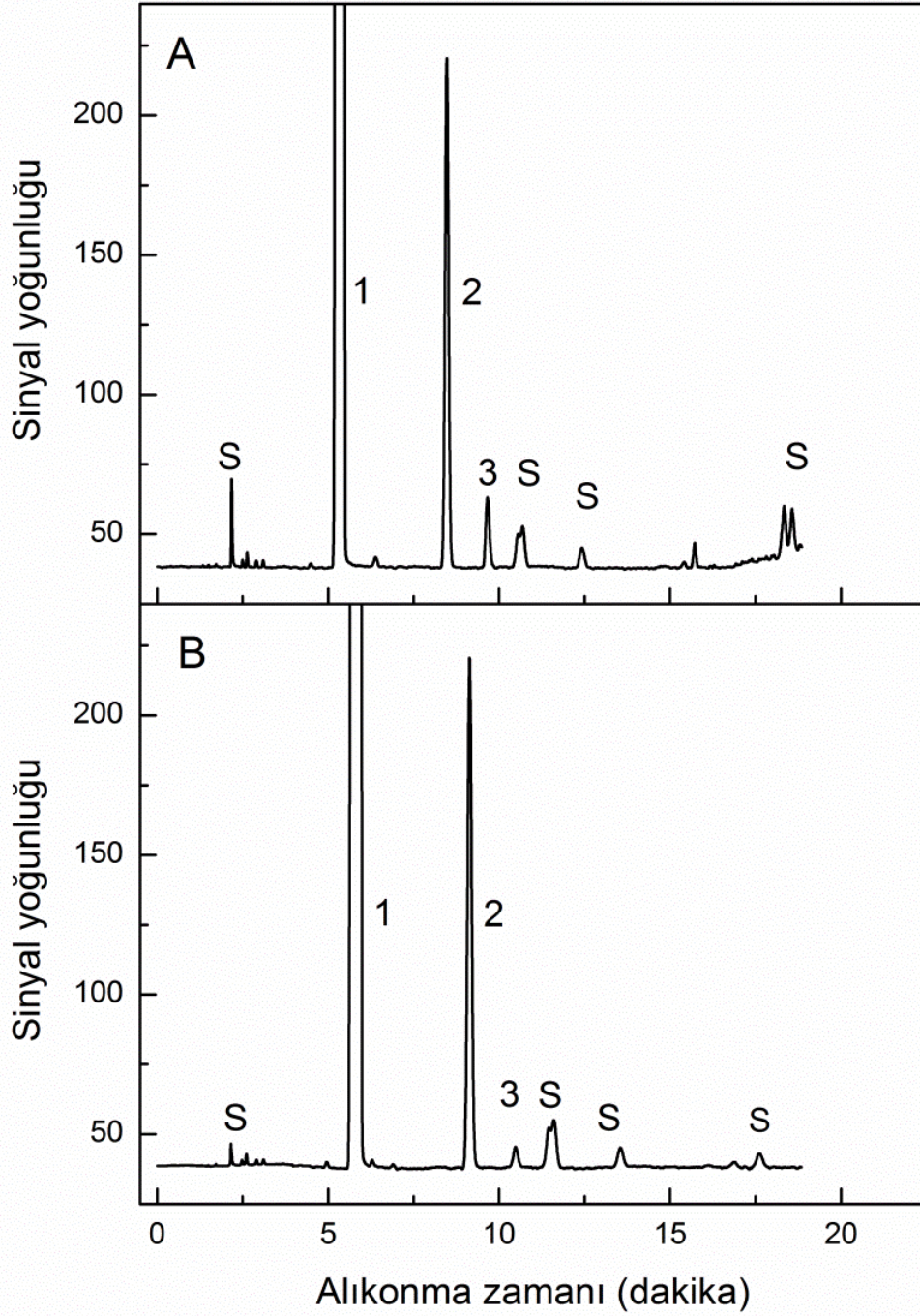
Şekil 9.23’de ki gaz kromatografisi analizi sonuçlarına göre bileşiklerin alıkonma zamanları 1) etanol 2,29 dakika, 2) etil asetat 5,98 dakika ve S) safsızlıktır.

- İkili İmmobilize Enzim Sistemi Reaksiyonları GC Analizleri



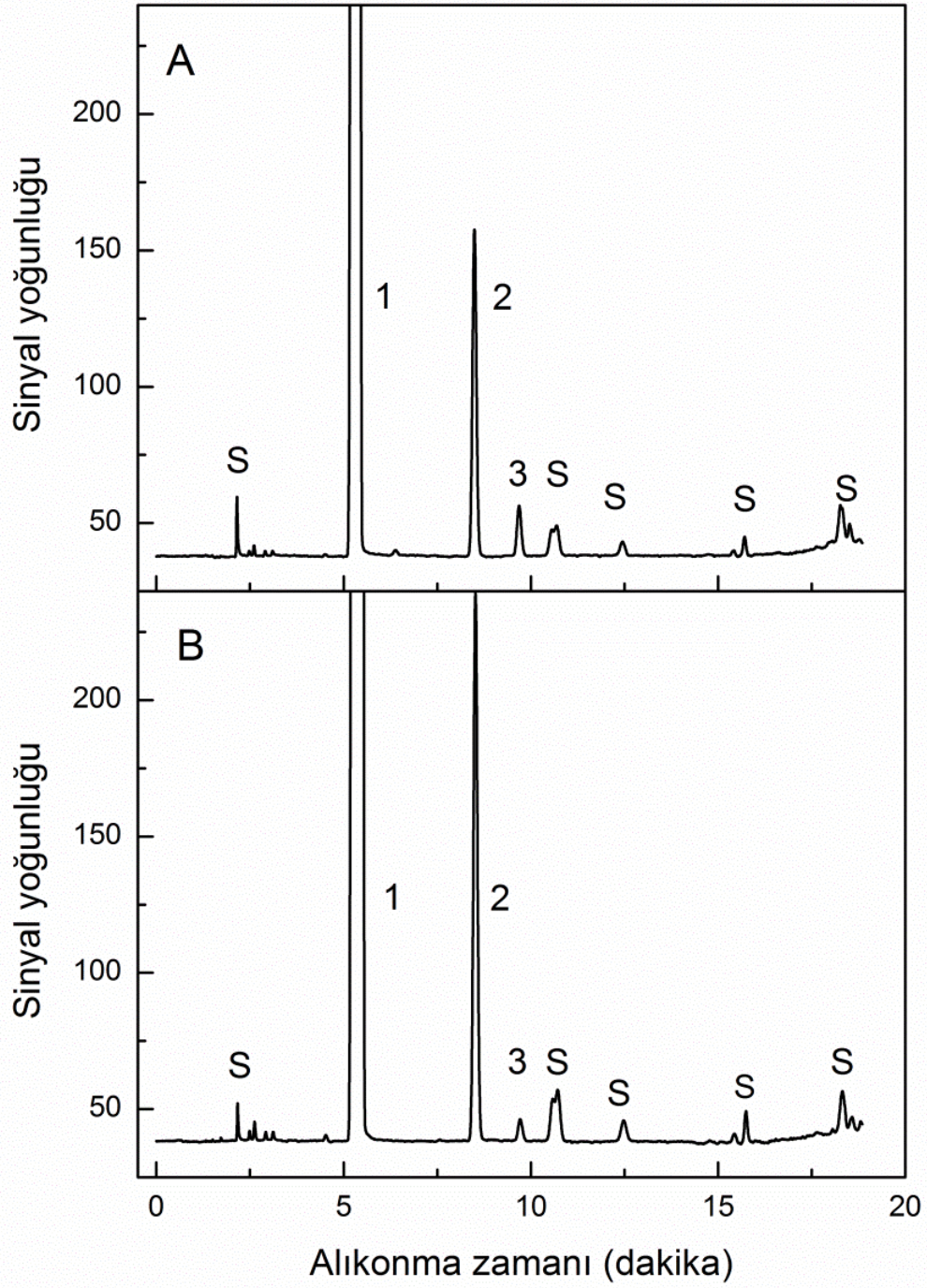
Şekil 9.24: 2) nolu ikili immobilize enzim sistemi ile metil propil keton substratının 1 A) ve 20 saatlik B) reaksiyonlarının GC analizi.

Şekil 9.24’de ki gaz kromatografisi analizi sonuçlarına göre bileşiklerin alıkonma zamanları 1) etil asetat 5,85 dakika, 2) metil propil keton 8,79 dakika, 3) 2-pentanol 10,07 dakika ve S) safsızlıktır.



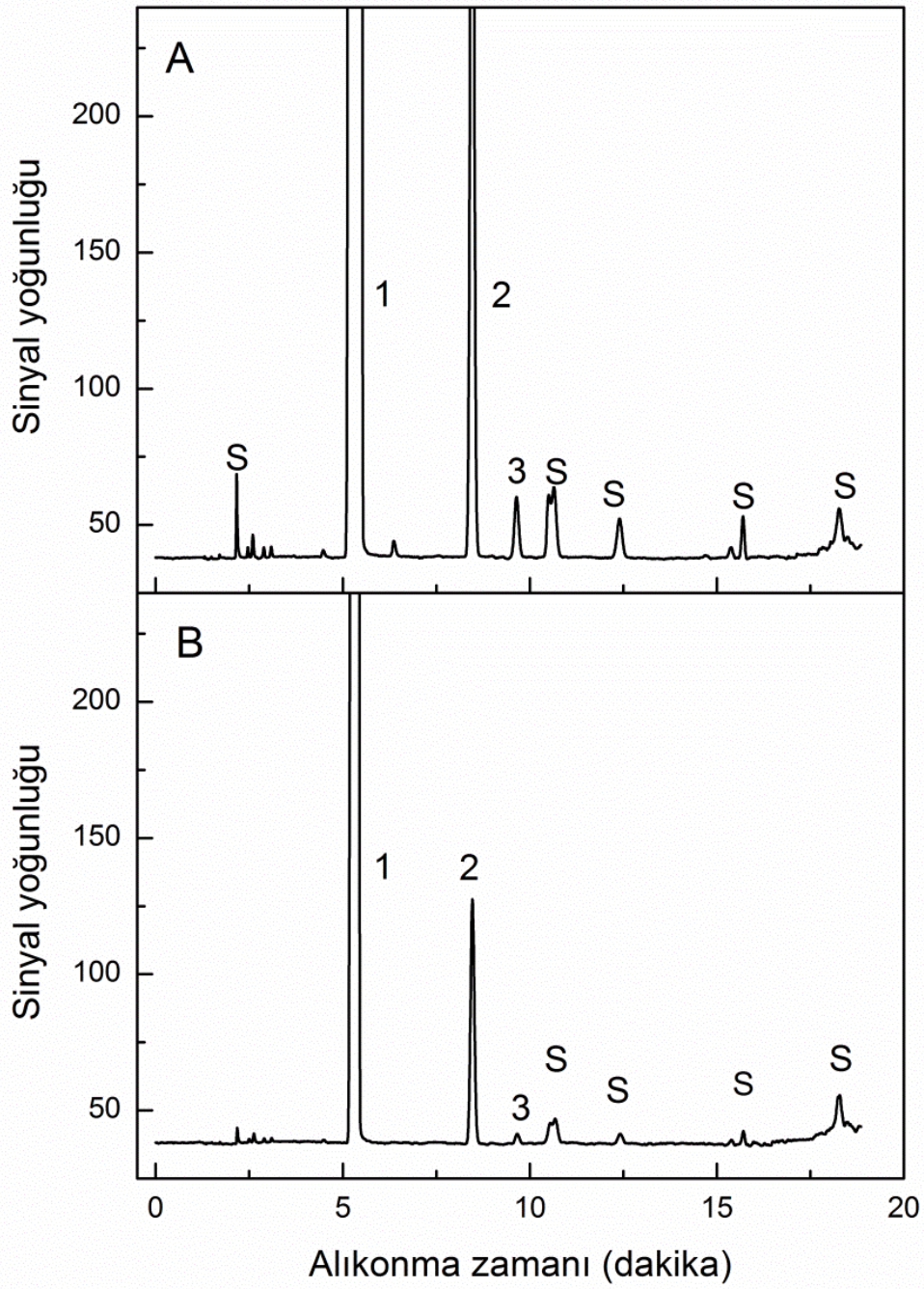
Şekil 9.25: 3) nolu ikili immobilize enzim sistemi ile metil propil keton substratının 1 B) ve 20 saatlik A) reaksiyonlarının GC analizi.

Şekil 9.25’de ki gaz kromatografisi analizi sonuçlarına göre bileşiklerin alıkonma zamanları 1) etil asetat 5,85 dakika, 2) metil propil keton 8,79 dakika, 3) 2-pentanol 10,07 dakika ve S) safsızlıktır.



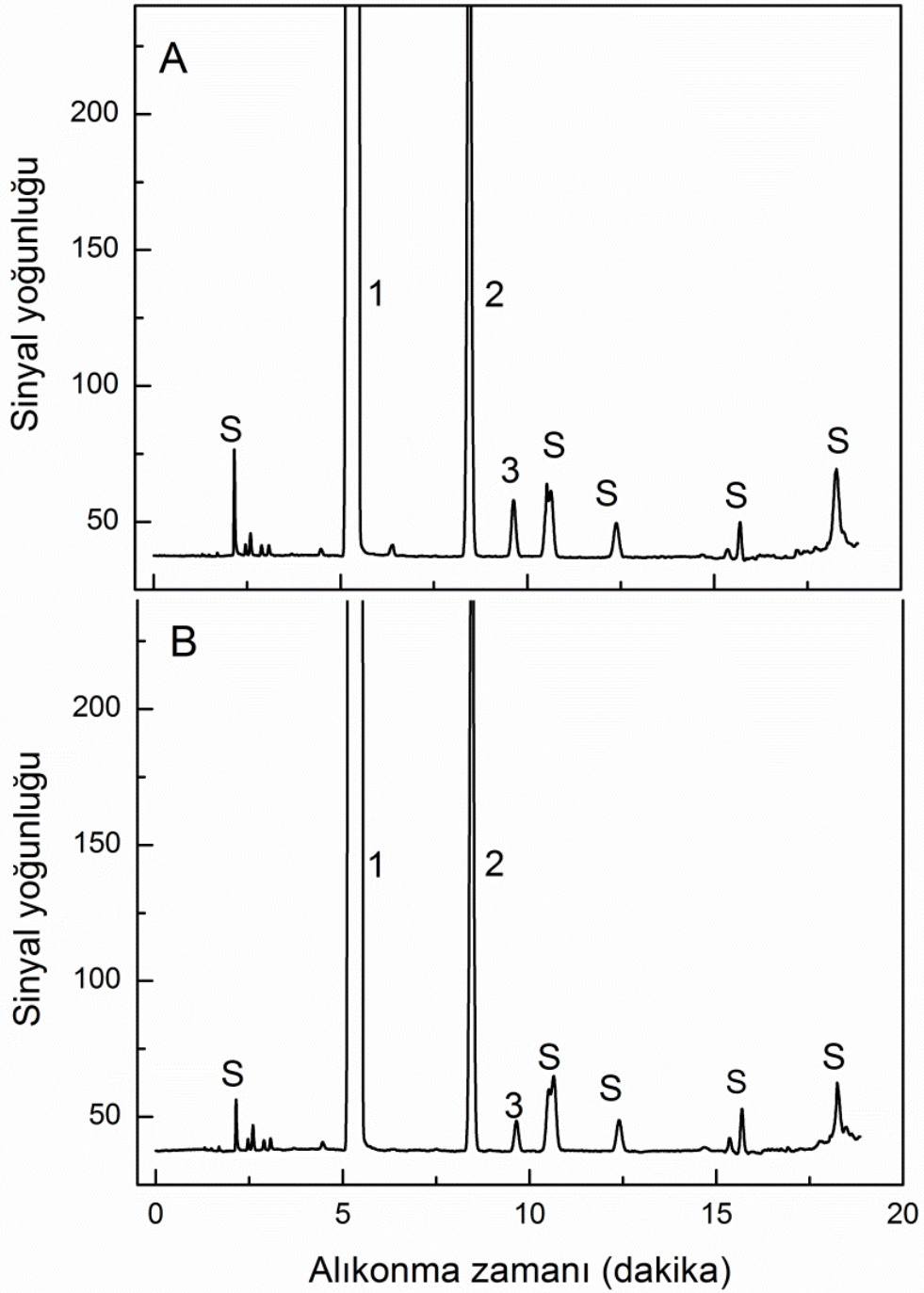
Şekil 9.26: 4) nolu ikili immobilize enzim sistemi ile metil propil keton substratının 1 B) ve 20 saatlik A) reaksiyonlarının GC analizi.

Şekil 9.26'da ki gaz kromatografisi analizi sonuçlarına göre bileşiklerin alıkonma zamanları 1) etil asetat 5,85 dakika, 2) metil propil keton 8,79 dakika, 3) 2-pentanol 10,07 dakika ve S) safsızlıktır.



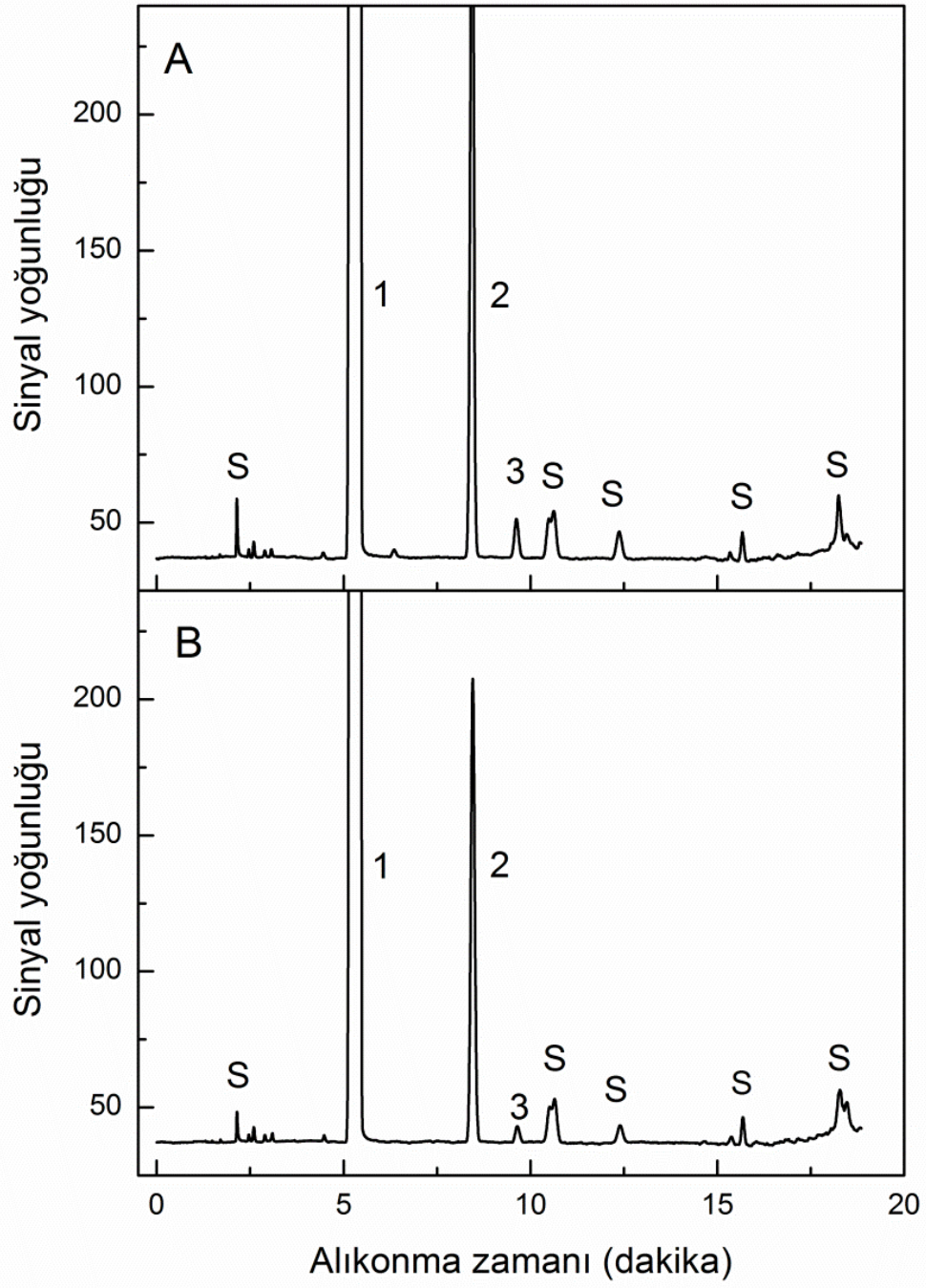
Şekil 9.27: 4) nolu ikili immobilize enzim sistemi ile metil propil keton substratının 1 B) ve 20 saatlik A) reaksiyonlarının GC analizi.

Şekil 9.27’de ki gaz kromatografisi analizi sonuçlarına göre bileşiklerin alıkonma zamanları 1) etil asetat 5,85 dakika, 2) metil propil keton 8,79 dakika, 3) 2-pentanol 10,07 dakika ve S) safsızlıktır.



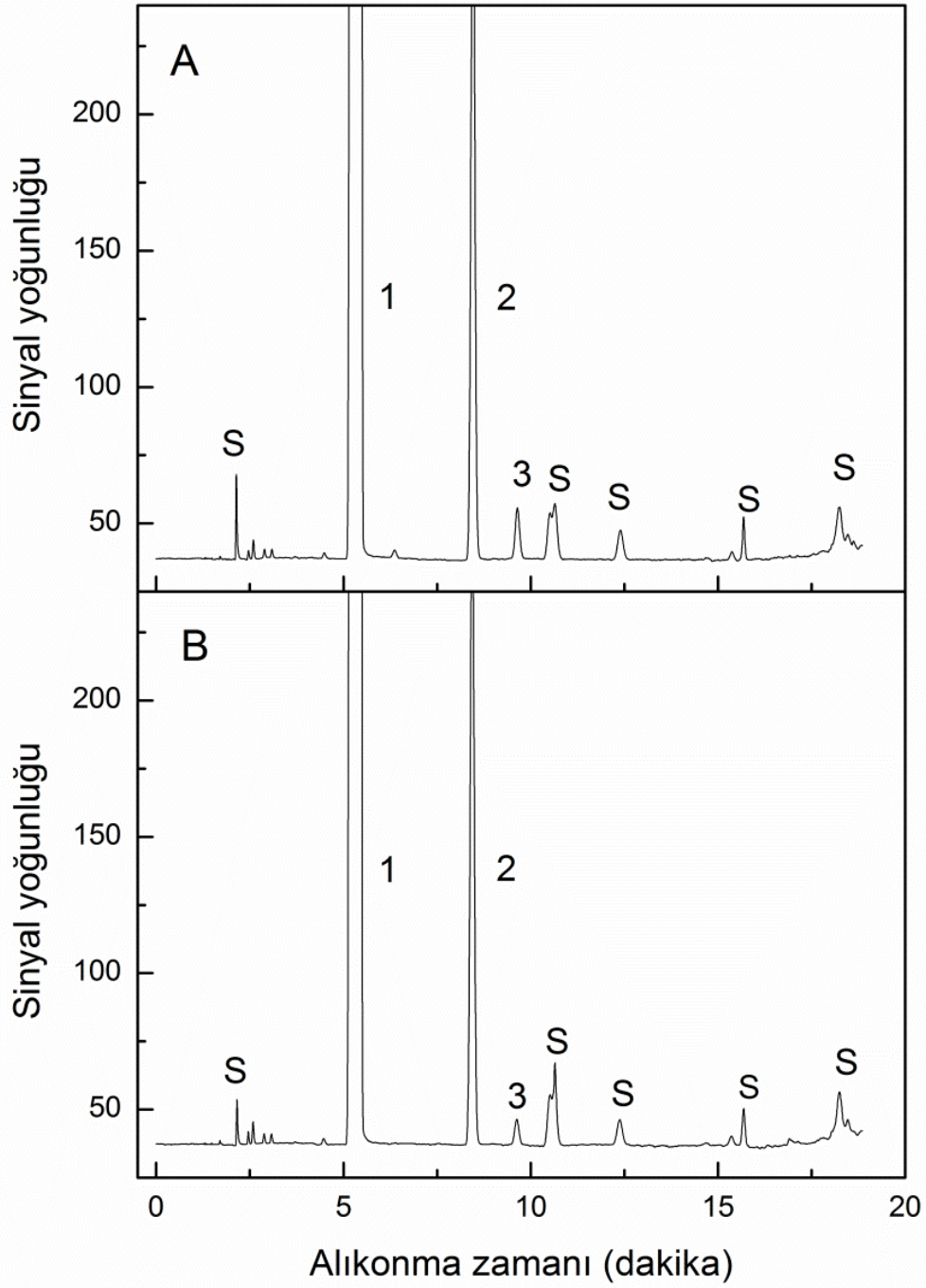
Şekil 9.29: 6) nolu ikili immobilize enzim sistemi ile metil propil keton substratının 1 B) ve 20 saatlik A) reaksiyonlarının GC analizi.

Şekil 9.28’de ki gaz kromatografisi analizi sonuçlarına göre bileşiklerin alıkonma zamanları 1) etil asetat 5,85 dakika, 2) metil propil keton 8,79 dakika, 3) 2-pentanol 10,07 dakika ve S) safsızlıktır.



Şekil 9.29: 7) nolu ikili immobilize enzim sistemi ile metil propil keton substratının 1 B) ve 20 saatlik A) reaksiyonlarının GC analizi.

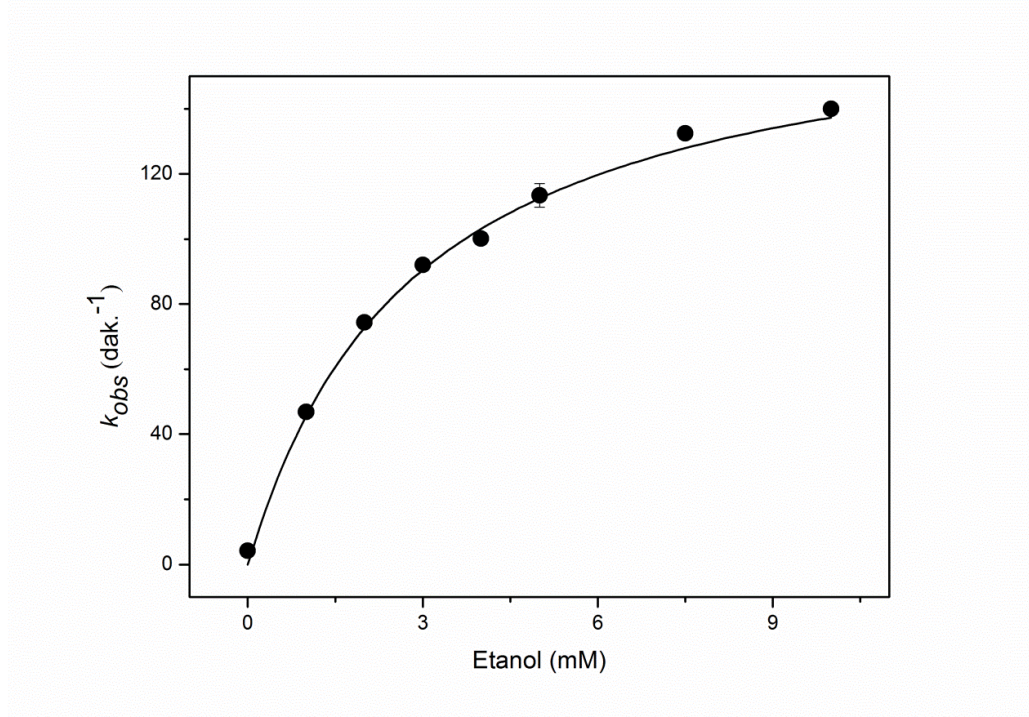
Şekil 9.29’da ki gaz kromatografisi analizi sonuçlarına göre bileşiklerin alıkonma zamanları 1) etil asetat 5,85 dakika, 2) metil propil keton 8,79 dakika, 3) 2-pentanol 10,07 dakika ve S) safsızlıktır.



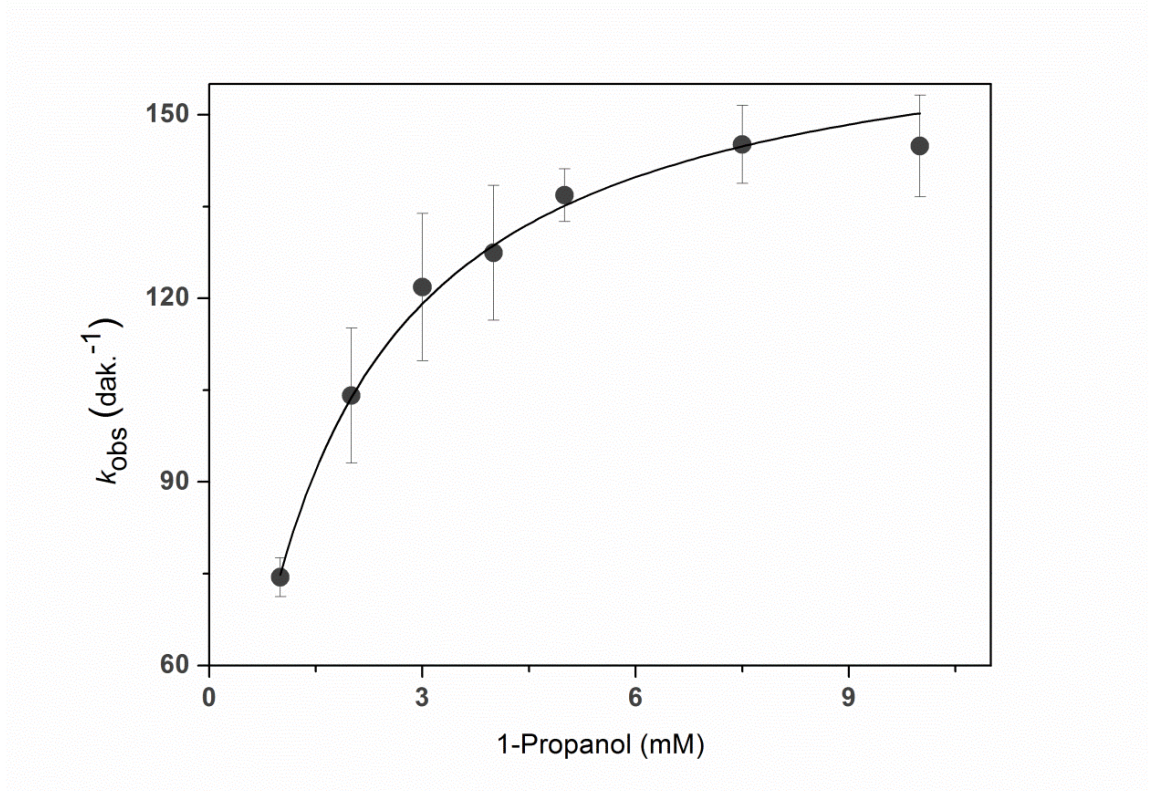
Şekil 9.30: 8) nolu ikili immobilize enzim sistemi ile metil propil keton substratının 1 B) ve 20 saatlik A) reaksiyonlarının GC analizi.

Şekil 9.30'da ki gaz kromatografisi analizi sonuçlarına göre bileşiklerin alıkonma zamanları 1) etil asetat 5,85 dakika, 2) metil propil keton 8,79 dakika, 3) 2-pentanol 10,07 dakika ve S) safsızlıktır.

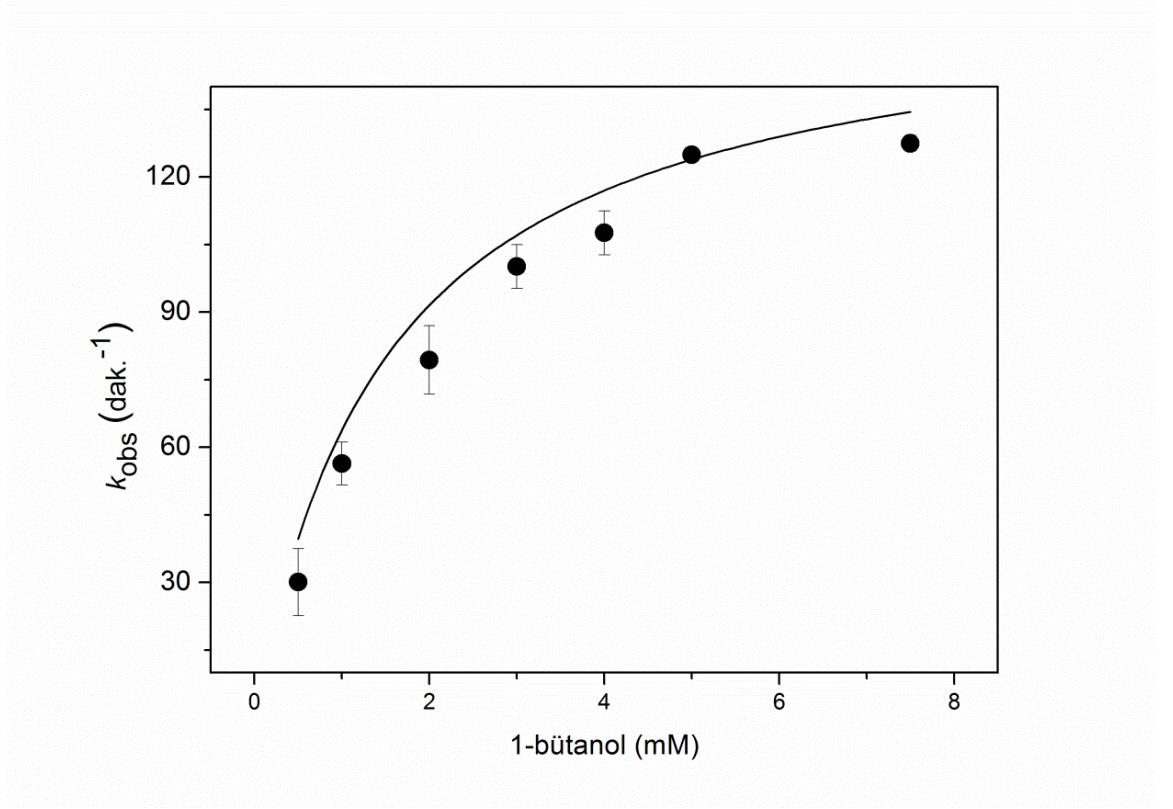
- **BtADH’ın Değişik Substratlar İçin Michaelis-Menten Grafikleri**



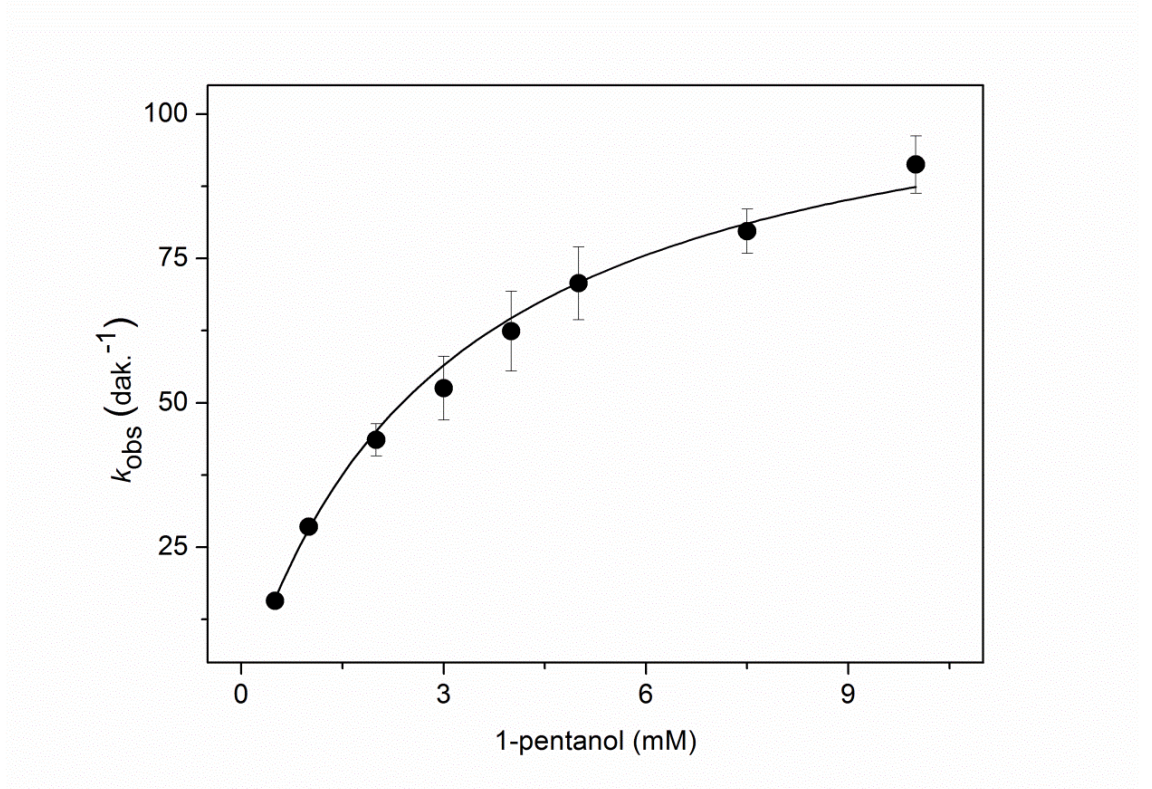
Şekil 9.31: *BtADH*’ın etanol oksidasyonu Michaelis-Menten grafiği.



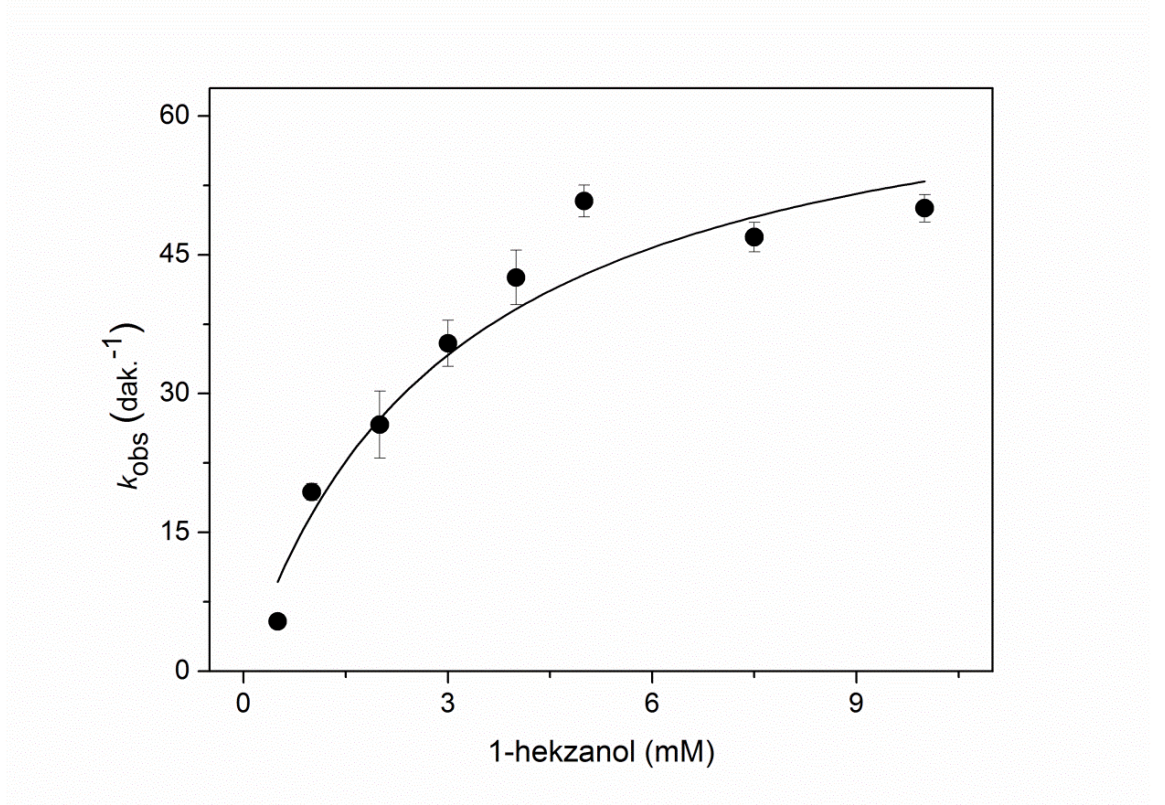
Şekil 9.32: *BtADH*'ın 1-propanol oksidasyonu Michaelis-Menten grafiği.



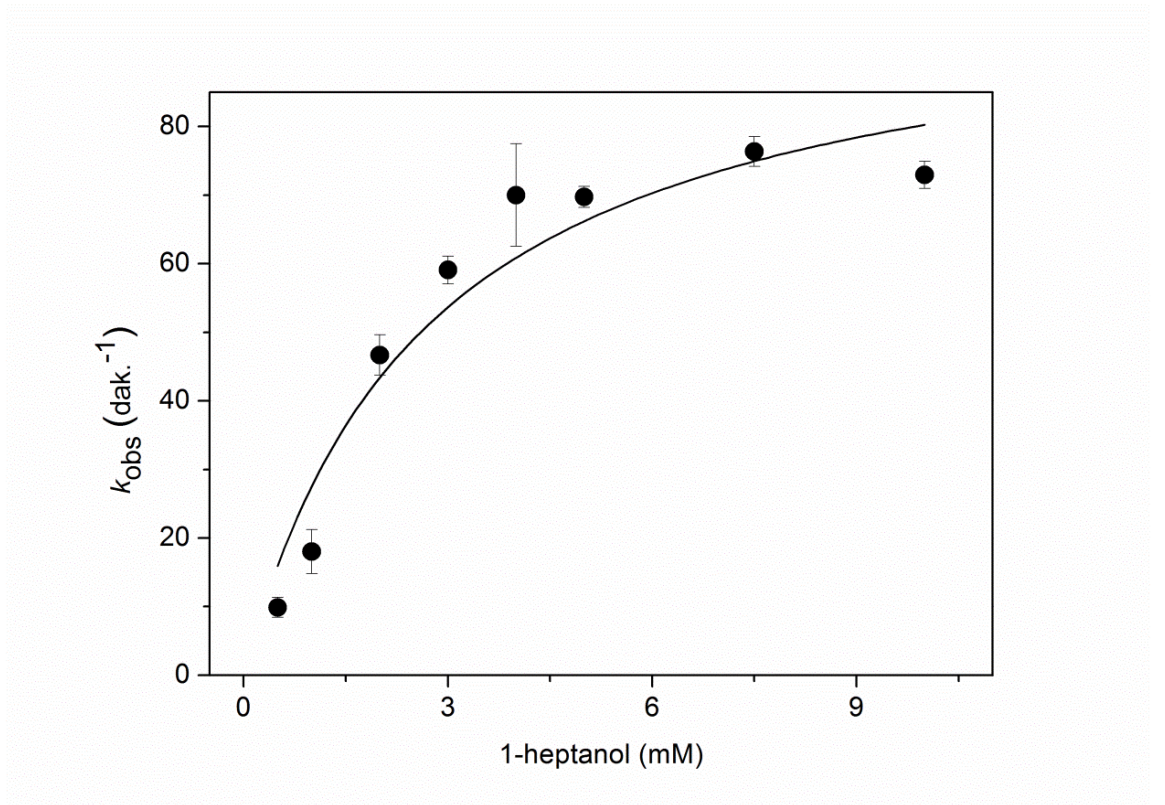
Şekil 9.33: *BtADH*'ın 1-bütanol oksidasyonu Michaelis-Menten grafiği.



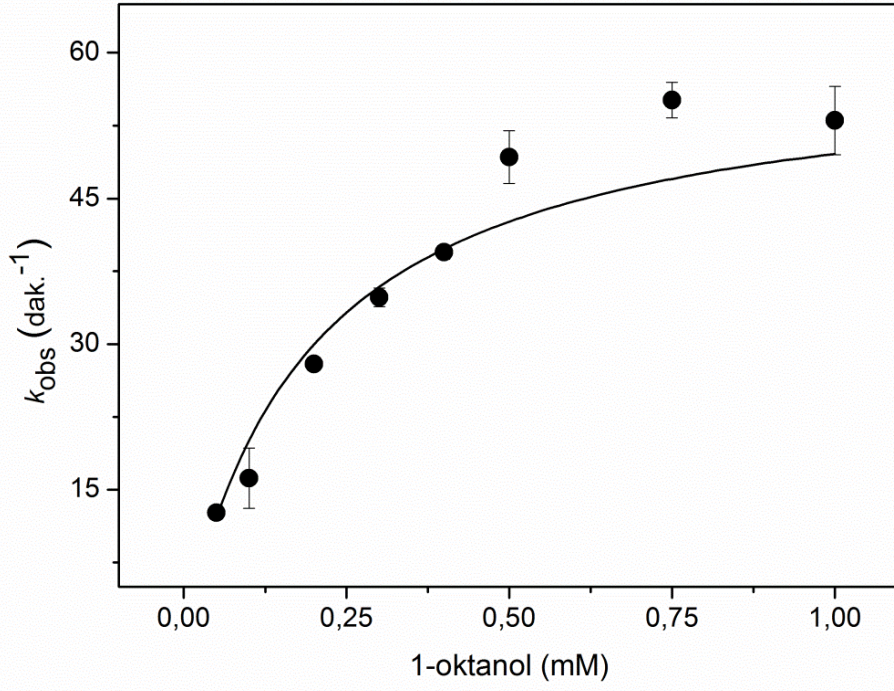
Şekil 9.34: *BtADH*'ın 1-pentanol oksidasyonu Michaelis-Menten grafiği.



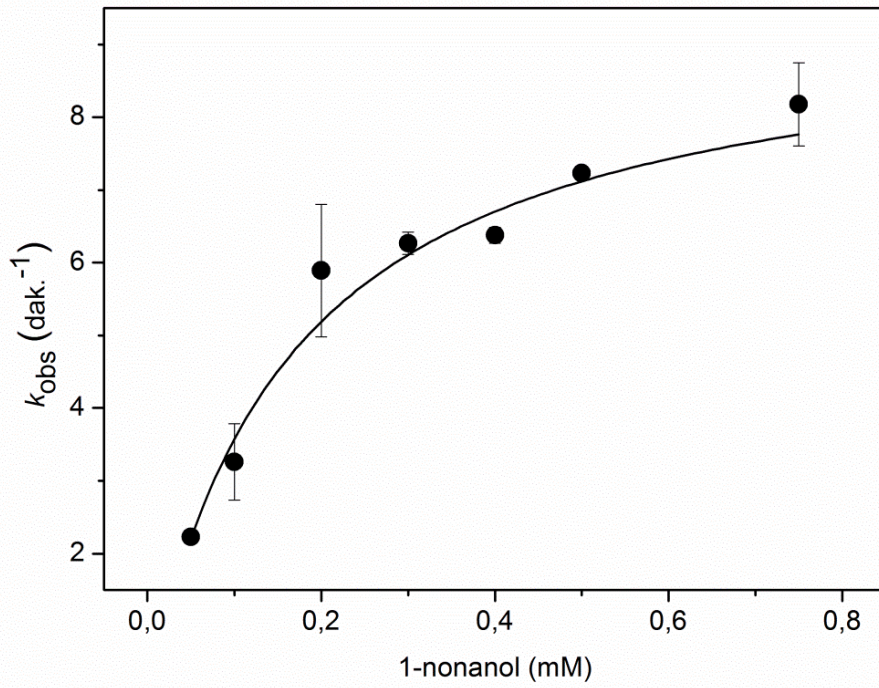
Şekil 9.35: *BtADH*'ın 1-hekzanol oksidasyonu Michaelis-Menten grafiği.



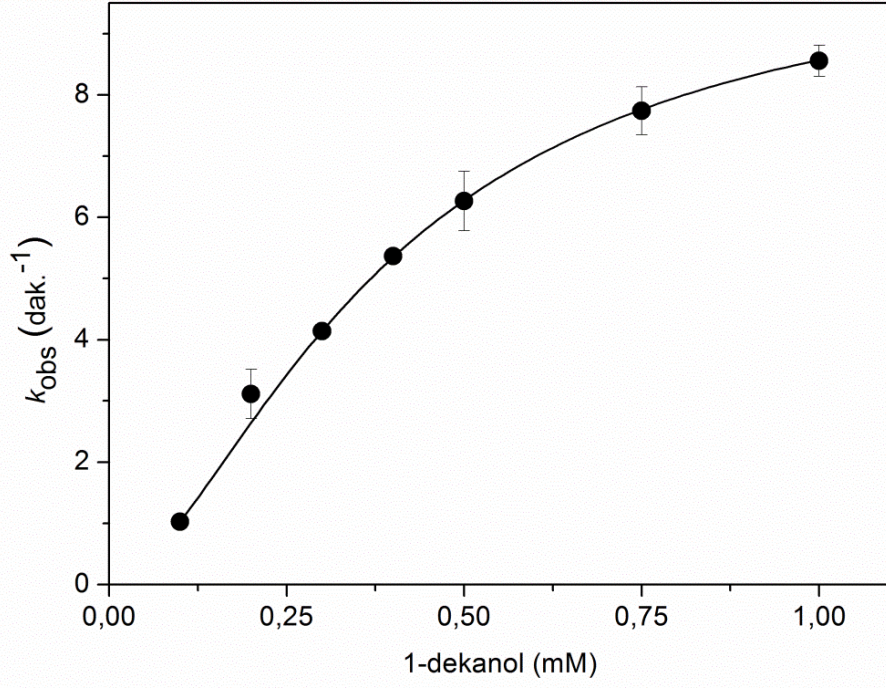
Şekil 9.36: *BtADH*'ın 1-heptanol oksidasyonu Michaelis-Menten grafiği.



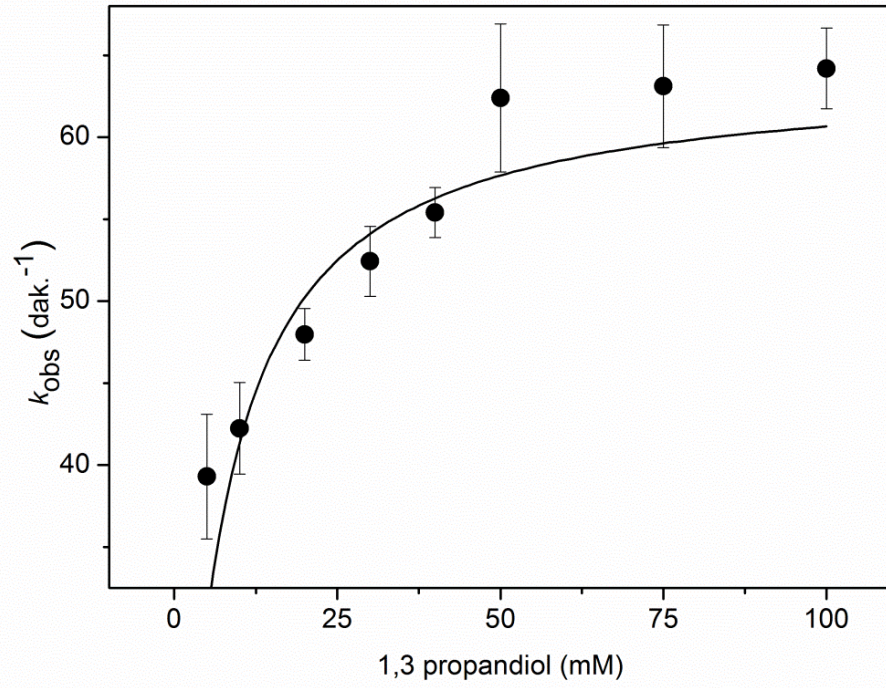
Şekil 9.37: *BtADH*'ın 1-oktanol oksidasyonu Michaelis-Menten grafiği.



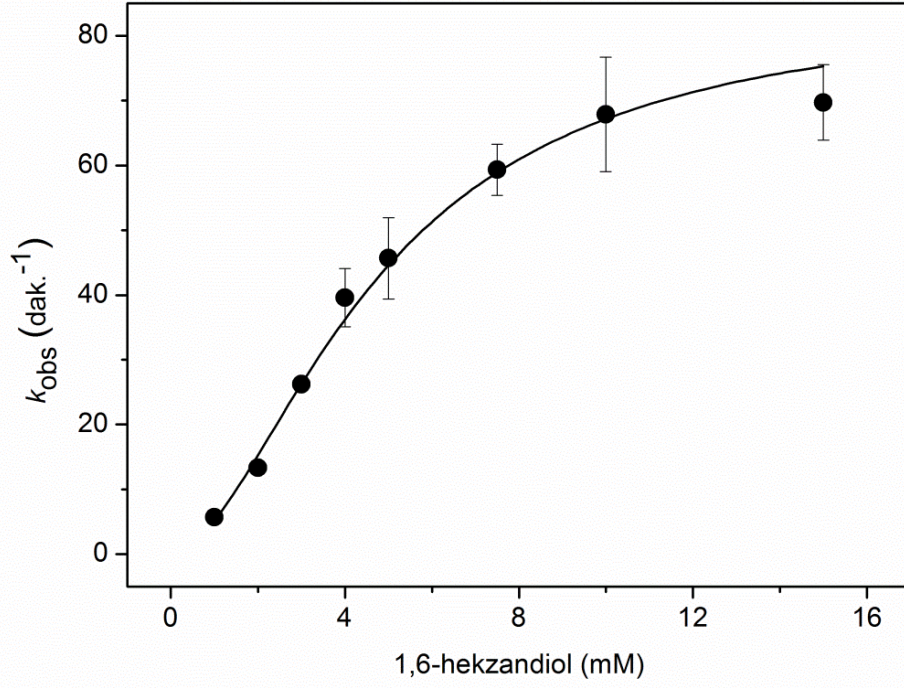
Şekil 9.38: *BtADH*'ın 1-nonanol oksidasyonu Michaelis-Menten grafiği.



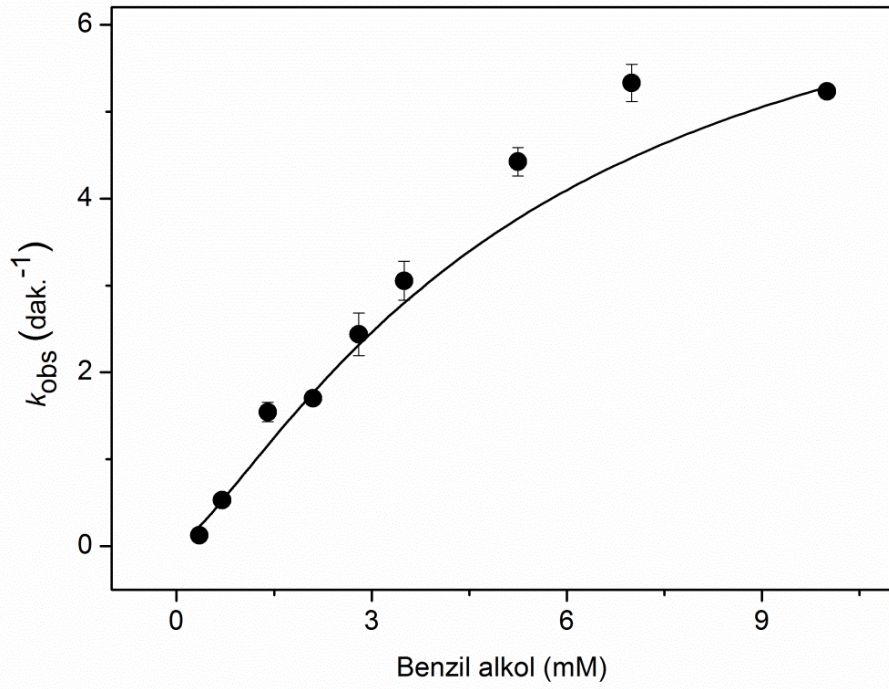
Şekil 9.39: *BtADH*'ın 1-dekanol oksidasyonu Michaelis-Menten grafiği.



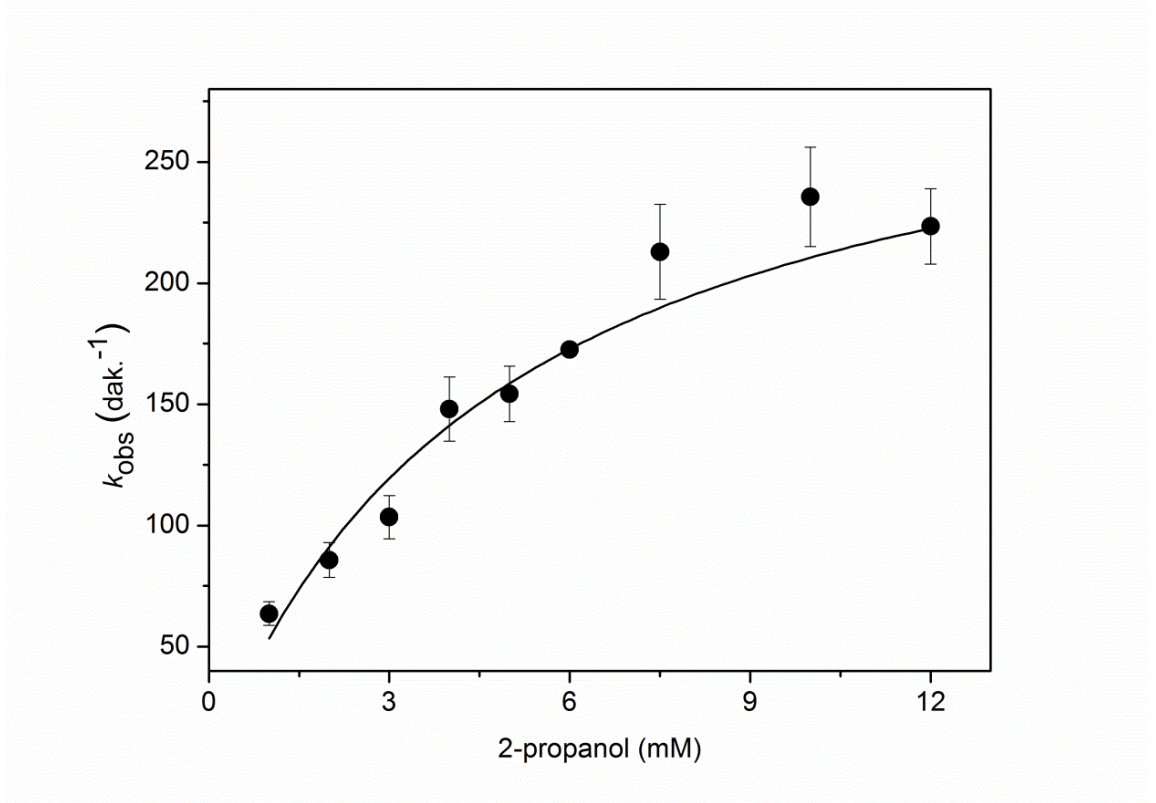
Şekil 9.40: *BtADH*'ın 1,3 propandiol oksidasyonu Michaelis-Menten grafiği.



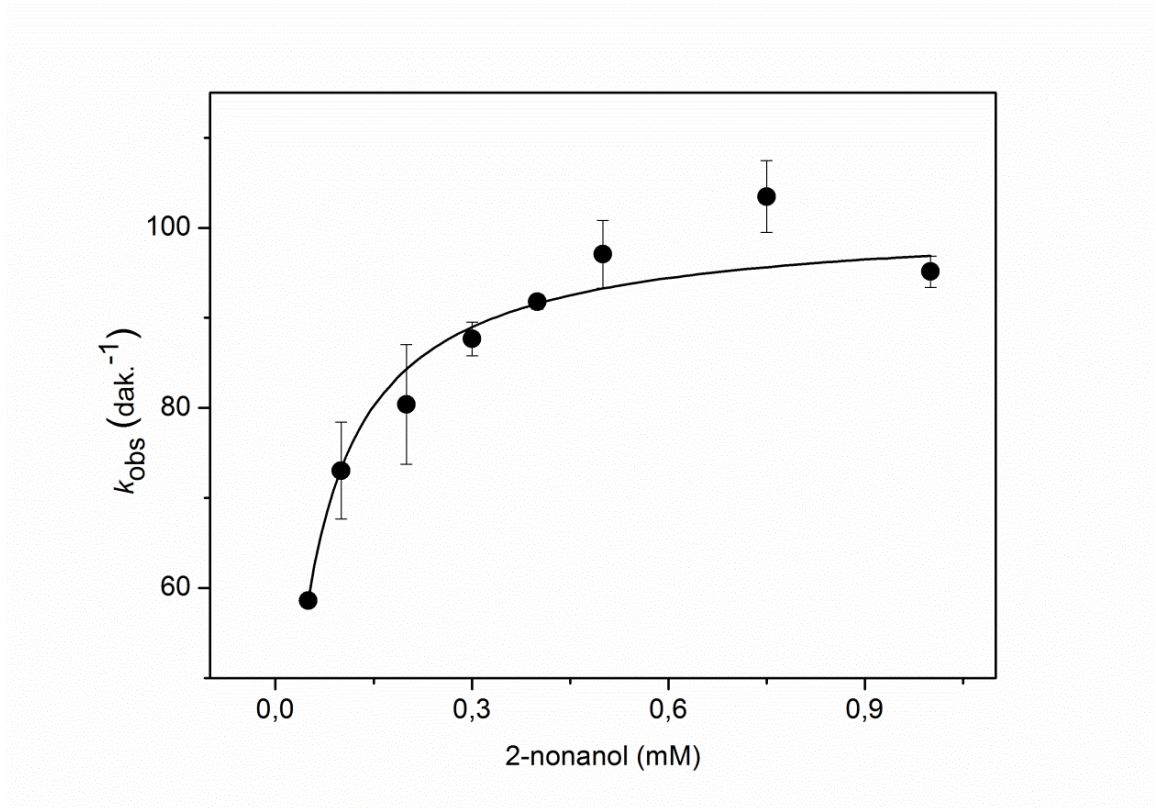
Şekil 9.41: *BtADH*'ın 1,6 hekzandiol oksidasyonu Michaelis-Menten grafiği.



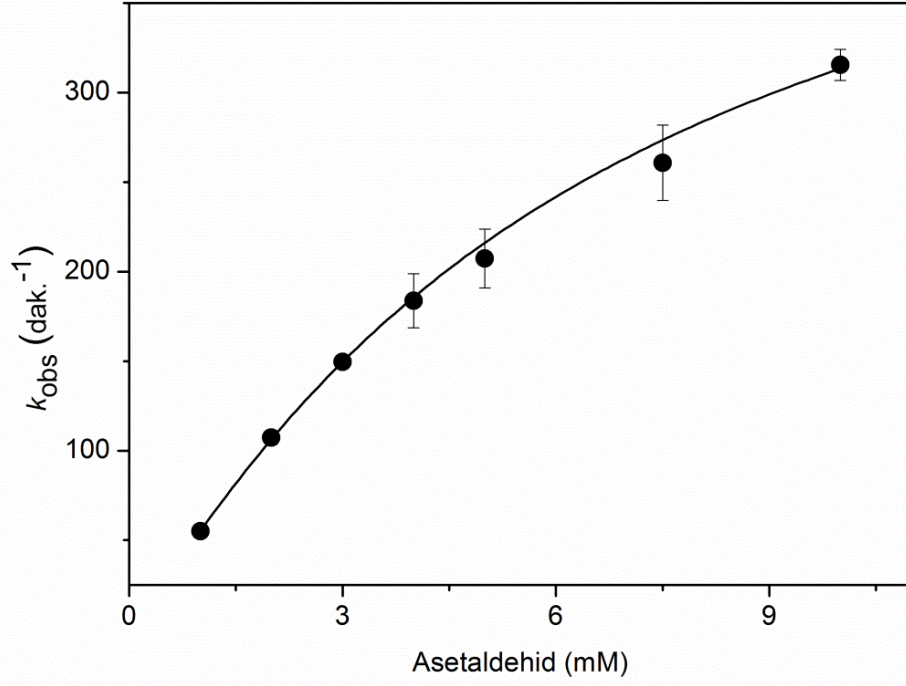
Şekil 9.42: *BtADH*'ın benzil alkol oksidasyonu Michaelis-Menten grafiği.



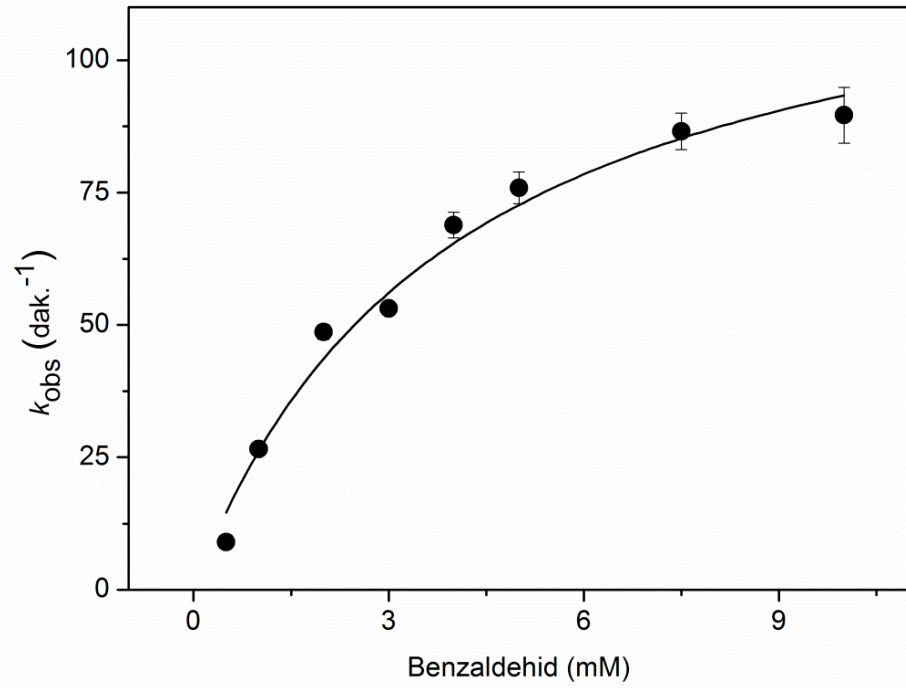
Şekil 9.43: *BtADH*'ın 2-propanol oksidasyonu Michaelis-Menten grafiği.



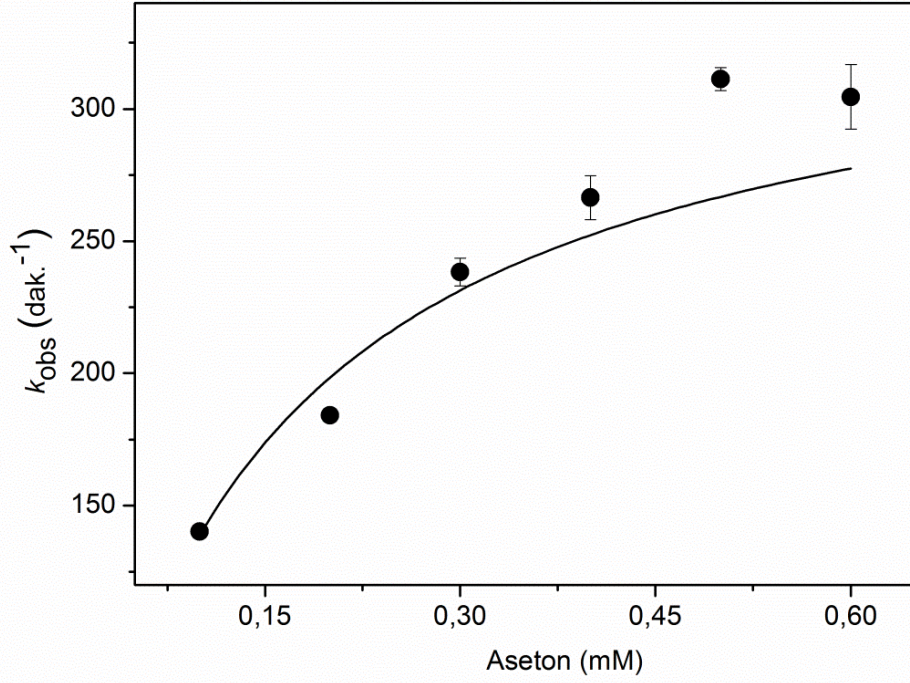
Şekil 9.44: *BtADH*'ın 2-nonanol oksidasyonu Michaelis-Menten grafiği.



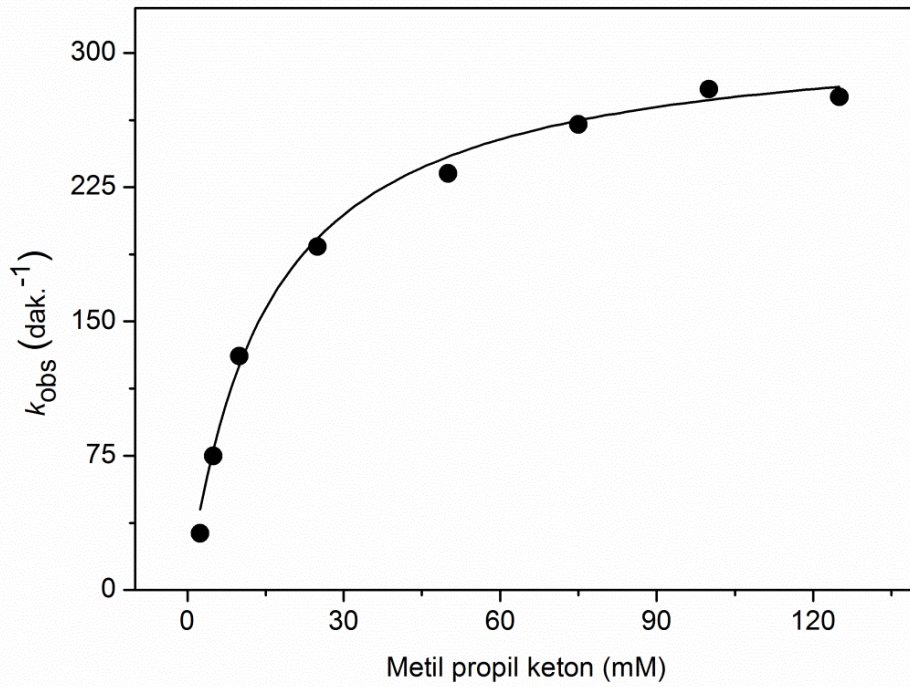
Şekil 9.45: *BtADH*'ın asetaldehid redüksiyonu Michaelis-Menten grafiği.



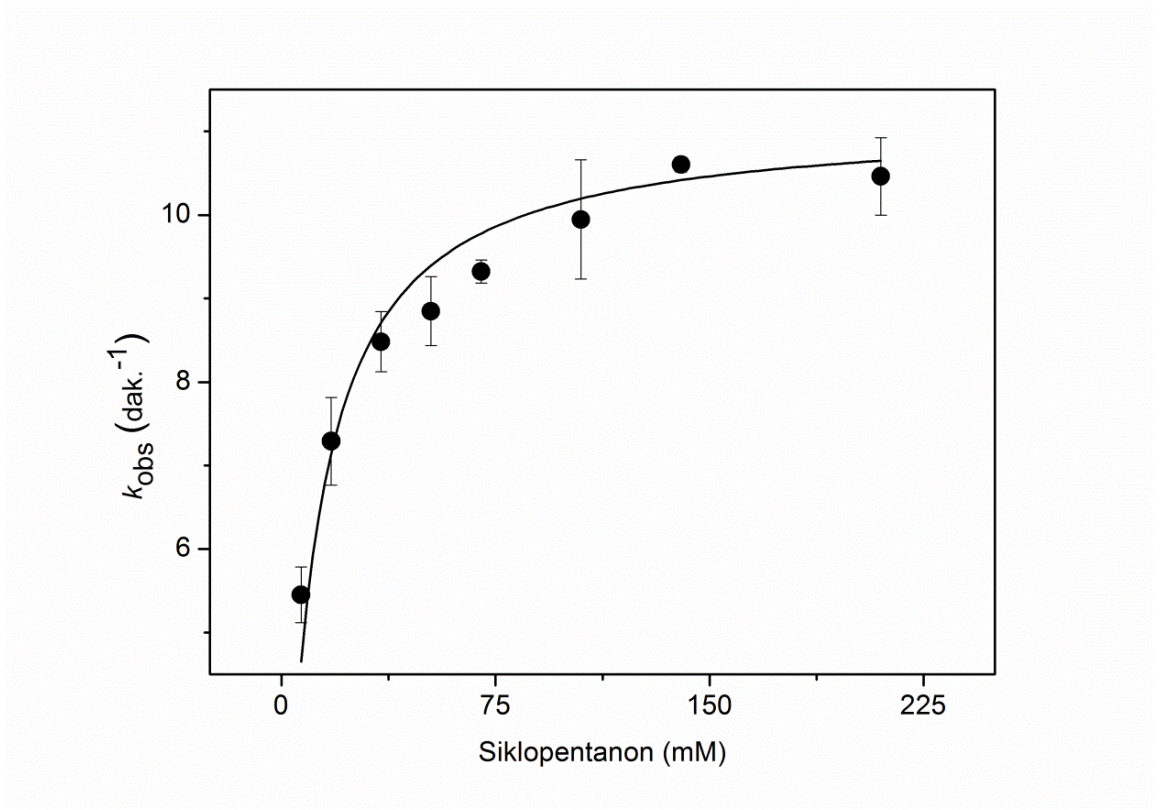
Şekil 9.46: *BtADH*'ın benzaldehyd redüksiyonu Michaelis-Menten grafiği.



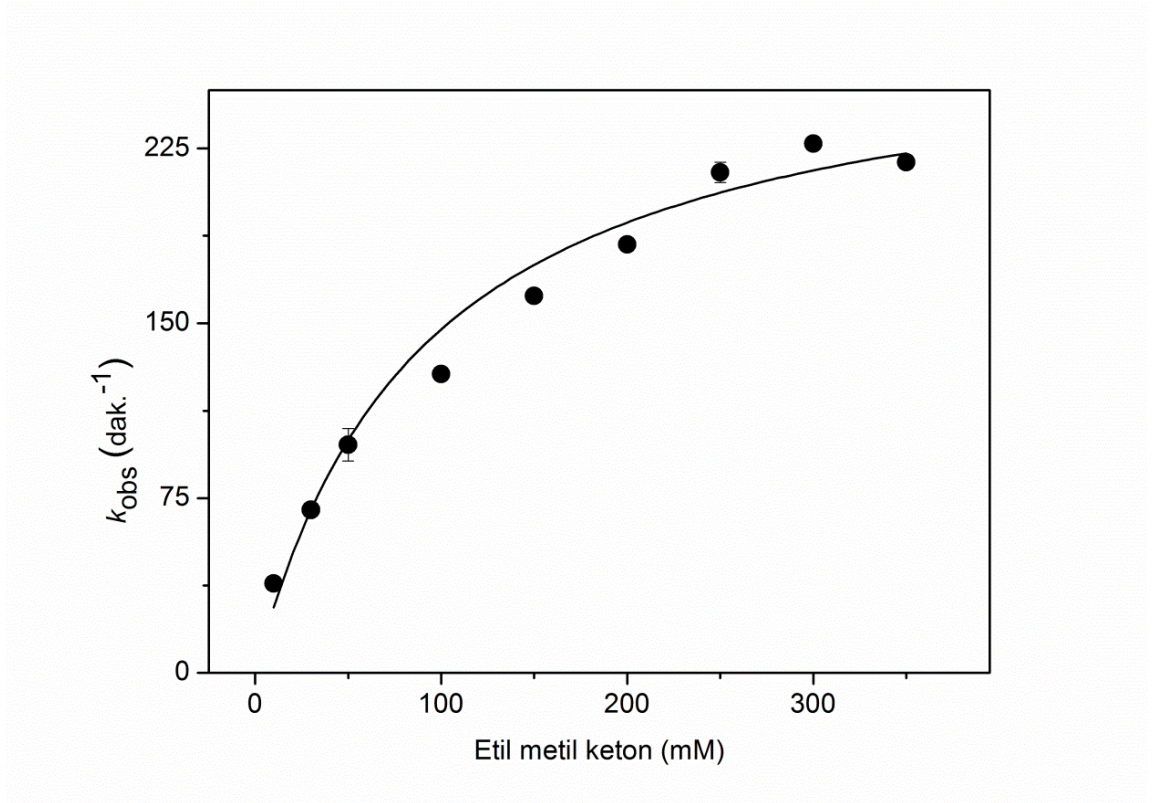
Şekil 9.47: *BtADH*'ın aseton redüksiyonu Michaelis-Menten grafiği.



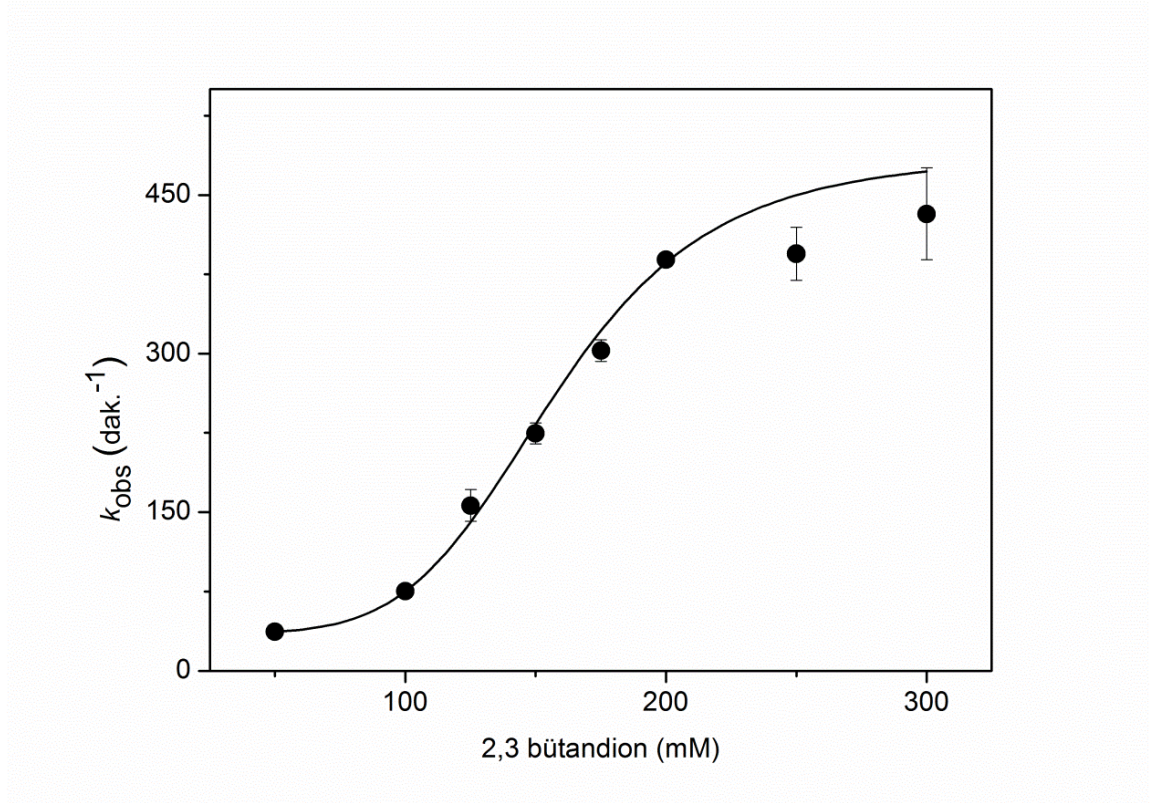
Şekil 9.48: *BtADH*'ın metil propil keton redüksiyonu Michaelis-Menten grafiği



Şekil 9.49: *BtADH*'ın siklopentanon redüksiyonu Michaelis-Menten grafiği.



Şekil 9.50: *BtADH*'ın etil metil keton redüksiyonu Michaelis-Menten grafiği.



Şekil 9.51: *BtADH*'ın 2,3 bütandion redüksiyonu Michaelis-Menten grafiği.

• *BtADH* Gen Dizisi

TTATTTGCAATCACAATTATGTTTTTTAAAATCAATTACCATACGCCCTTGAATTCTACCT
 TGTTCATTTCTTCGAATACATTTTGTACTTTATCTAGCGAACAAGTTTGAACAACCGGCA
 CTACTTTTCCTTCTGCCCCAAACATAAACGCCTCTTCCAAATCTTTACGAGTACCAACTAG
 AGAACCAACTACTTCAATTCCATCCAGTACAAGTCGCGGGATGTTTAAGTCCATTGTTTC
 TACTGGTAGCCCTACTGCAACTACTTTACCGCAAGCACGTACTGCATCAACTGCTGAGTT
 AAAGGCTACTTTAGAGACTGCTGTTACTACCGCAGCATAAGCGCCACCAAGCTCCTCTTG
 AACAAATTTTATCAGCAGGACCTTGAGAAATTGGATTGATAGTCATATCAGCACCAACTTC
 TTTTCGCTAAGGCTAATTTGTCGTCATTAATGTCTACTGCGATTACCTTTGCACCAAATACA
 TTTTATAGCATATTGGATAGCTAAGTTACCTAATCCACCGCAGCCATAGATTACAATAGGT
 TGACCAGGTTTAATATCTGATACTTTAATAGCTTTATATGTAGTTACACCAGCACATGTAA
 TTGATGATGCTTGAGCAGGATCTAATCCTTCTGGTACTTTTACCGCATAATCAGCTGTAAC
 GATACATTGTTTCAGCCATACCACCATCTACTGAATAACCTGCGTTTTTAACTTCACGGCA
 AAATGTTTCTCTACCAGTTACGCAATATTCACAACGTCCACAAGATTGGAACATCCATGC
 AATACTTACACGGTCACCTATCTTTAGCGAATTAACATCATCAGCTATTTTCGTAACAATA
 CCTACACCCTCATGACCAAGAATACGGCCATCAGTGTTACCAAAATCATGATTGCGAACG
 TGTAATCAGTGTTGGCAAACCTCCACAATACTCTACATCTACTAACGCTTCACCTGAGCGT
 AACGGACGTAATTCTTTTTCAACCACTTCGATGTTTGCTTTGCTGTTTTTATTAACCACTA
 CTGCTTTCAT

• BtADH'ın Dizi Uyumu

	10	20	30	40	50	60	70	80	90
BtADH	-----	MKAVVVKNSKANIEVVEKELRPLRS	GEALVDVEYCGVCHTDLH-VANHDPG	-----	NTDGR	--	ILGHEGVGIVTKIADD		
HtADH	-----	MKAADVVEQFK-EPLKIKEVEKPTISYGEVLVRIKACGVCHTDLH-AAHGDWP	-----	VKPKLPLIPGHEGVGIVEVGP					
EcADH	-----	MKAADVTKDH--HVDVYKTLRSLKHGEALLKMECCGVCHTDLH-VKNGDPG	-----	DKTGV	--	ILGHEGIGVVAEVP			
SsADH	-----	MRVRLVEIG-KPLSLQETGVPEKGPVLIKVEAACVCHSDVH-MRQGRFGNLRIVEDLGVL		PVTLGHEIAGKIEE					
HLADH	STAGKVIKCKAAVLWEK-KPFSIEEVEVAPPKAHEVRIKMVATGICRSDDHVVS		GTLVT	-----	PLPVIAGHEAAGIVESIG				
BaKR	-----	DNLSAVLYKQN--DLRLQRPIPEPKEDVLLQMAVVGICGSDVHYEHGRIAD	-----	FIVKDPMYIGHEASGTVVKGKN					
TbADH	-----	MKGFAMLSIG--KVGWIEKEKPAEPGPDIVRPLAVAPCTSDIHTVFBGAIG	-----	ERHNMILGHEAVGEVVEVGSE					
CbADH	-----	MKGFAMLGIN--KLGWIEKERPVAGSYDAIVRPLAVSPCTSDIHTVFBGALG	-----	DRKNMILGHEAVGEVVEVGSE					
	100	110	120	130	140	150	160	170	180
BtADH	VNSLTKGDRVSTAMMFQSCGRCEYCVTGRETFCREVKNAGYS--VDGMAEQCTV	-----	TADYAVKVPEGLDPAQ						
HtADH	VTHLKVGDVVGIPWLYSACGCHDYCLSGQETLCEHOKNAGYS--VDGGAETCRA	-----	AADVVKIPDNLSE						
EcADH	VTSLKPGDRASVAMFYECCGCHCEYCNNGETLCRSVKNAGYS--VDGMAEBCIV	-----	VADYAVKVPDGLD						
SsADH	VVGYSKGLVAVN--PWQSGNCYCRIGEEHLCDSPRWLGIN--FDGAYAEYVIV	-----	PHYKMYKLRINAVE						
HLADH	VTVVRPGD-KVIPLETPQCCKCRVCKHPEGNFCLKNDLSMFRGTMDGTSRPTCRGKPIHHFLGTSTESQYTVVDEISVAKIDAASPLEK								
BaKR	VKHLKKGDRVAVEPGVP-CRRQFCKEGKYNLCPLTFCATPP-DDGNLARYVH	-----	AADFCHKLPDNLSE						
TbADH	VKDFKPGDRVVPALT PDWRTSEVQRYHQHSGGMLAGWKFSNVKDGVEGFPHVND	-----	ADMNLALHLEKIPLEA						
CbADH	VKDFKPGDRVIVPCTT PDWRSLEVQAGFQQHSGNMLAGWKFSNFKDGVEGFPHVND	-----	ADMNLALHLEKIMPLEN						
	190	200	210	220	230	240	250	260	270
BtADH	ASSITCAGVTTY-KAIKVS		DIKPGQPIVIYGGG-LGNLAIQYAKNVFGAKVIAVDINDDKLALAKEVGADMTINPI-SQGPADKIVQ						
HtADH	AAPIFCAGVTTY-KALKVTGAKPGEWVAIYIGIG-LGHVAVQYAK-AMGLNVAVDIGDEKLELAKELGADLVVNPL-KED-AARFKM								
EcADH	ASSITCAGVTTY-KAVKLSKIRPGQWIAIYGLGG-LGNLAIQYAKNVFNKAVIAIDVNDQLKATEMGADLAINSH-TED-AARKIVQ								
SsADH	AAPLTCSGITTY-RAVRKASLDPTKTLVVGAGGGLGTMAVQIAKAVSGATIIGVDVREEAVEAAKRAGADYVINAS-MQDPLAIBIR								
HLADH	VCLIGCGFSTGYGSAVKVAKVTQGSTCAVFLGG-VGLSVIMGCKAAGAARIIGVDINKDKFAKAKEVGATECWNPDQYKKPIQEVLT								
BaKR	GALLEPLESVGVH--ACRRRAGVQLGTTVLVIGAGP-IGLVSVLAAR-AYGAFVVTARSRRLEVAKNOCADVTLVVDPAKEBESSIIERI								
TbADH	AVMIDPDMMTGF-HGABELADIELGATVAVLGIGP-VGLMAVAGAKLRGAGRIIAGVSRPVCVDAAKYYGATDINVK-DGPIESQIMN								
CbADH	AVMIDPDMMTGF-HGABELADIQMGSSVVVIGIGA-VGLMGIAGAKLRGAGRIIGVSGRPICVBAKFYGATDIINVK-NGHIVDQVMK								
	280	290	300	310	320	330	340	350	360
BtADH	-EELG-GAYA		AVVTAVSKVAFNSAVDAVRAC-GKVVAVGLPVETMDLNI-PRVL						
HtADH	-EKVG-GVHA		AVVTAVSKPAFQSAVNSIRRC-GACVLVGLPPEEMPIPI-FDVLNGIKIIGSIVC	-----	TRKDLQALQFAAE				
EcADH	-EKTG-GAHA		AVVTAVAKAFNSAVDAVRAC-GRVAVGLPPESSMLDI-PRVL						
SsADH	-ITESKGVDAVIDLNNSEKTL		SVYPKALAKQ-GKYVMVGLFGADLHYHA-PLITLSEIQFVGS						
HLADH	-EMSNGGVDP		SPEVIGRLDTMTALSCCQAYGVSVIVGVPPDSQNLNMPMLLLSGRTWKGAIPGG	---	PKSKDSVPEKLVADFM				
BaKR	RSAGIDLENVTIDCSGNEK		CITIGINITRTG-GTLMVGMGSQMTVPL--VNACAREIDIKSYFR	----	YCNDYPIALEMVASGR				
TbADH	-LPEKGVDAAL		IAGGNADIMATAVKIVKPG-GTIANVNYFGGEVLPV-PRLEWGCMAHKT						
CbADH	-LTKGKVDRVIMAGGSETLSQAVSMVKPG-GIISNINYHSGDALLI-PRVEWGCMAHKT								

• Reaksiyonlarda Kullanılan Besiyerleri ve Çözeltiler

Çözeltiler

100mM PMSF Çözeltisi : 0.17g PMSF 10ml izopropil alkol içinde hazırlandı ve -20 °C’de saklandı.

100 mM IPTG Çözeltisi : 0.12 g IPTG steril su ile 5 ml’ye tamamlandı ve -20 °Cde saklandı.

100 mM CaCl₂ Çözeltisi : 1.5 g CaCl₂.2H₂O deiyonize suyla 100 ml’ye tamamlandı ve 121 °C’de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

Lizozim Çözeltisi : 10mg lizozim 1ml 50mM Tris-HCl (pH 8) tamponunda hazırlandı.

100 mM MgCl₂ Çözeltisi : 2g MgCl₂ deiyonize suyla 100 ml’ye tamamlandı ve 121 °C’de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

85mM CaCl₂ %15 Gliserol Çözeltisi : 1.2 g CaCl₂.2H₂O ve 15ml gliserol deiyonize suyla 100 ml’ye tamamlandı ve 121 °C’de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

Agaroz jel elektroforezde kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

Agaroz jel (% 0.8) : Agaroz (0.4 g) tartılıp ve 1XTAE (50 ml) tampon çözeltisi ile karıştırıldı ve mikrodalga fırında ısıtılarak çözüldü. 2 µl etidyum bromür (10 mg/ml) ortalama 55 °C’ye soğumuş agaroz çözeltisine ilave edildi. Hazırlanan çözelti kasete döküldü ve taraklar yerleştirilerek jelin donması beklendi. Donduktan sonra tarak çıkarıldı. İçerisinde 1XTAE (300 ml) ve etidyum bromür (12.5 µl, 10 mg/ml) bulunan elektroforez tankına yerleştirildi.

Etidyum bromür (10 mg/ml) : 100 mg Etidyum bromür distile su içerisinde çözülerek 10 ml’ye tamamlandı. Filtre edilerek koyu renkli bir şişe içerisinde oda sıcaklığında saklandı.

50XTAE : 100 ml 0.5 M EDTA, 242 gr Tris Baz, 57.1 ml Asetik asit destile su içerisinde çözüldü ve 1 litreye tamamlandı.

6XDNA yükleme tamponu : %0.15 bromofenol mavisi, %30 süktroz, destile su içerisinde çözülerek 10 ml’ye tamamlandı. Koyu renkli bir şişe içerisinde oda ısısında saklandı.

Besiyerleri ve Hazırlanması

LB (Luria-Bertani) broth besiyeri : NaCl (5 g/l), Pepton (10 g/l) ve maya ekstraktı (5 g/l) distile su içerisinde çözülerek pH 7'ye ayarlanarak 1 litreye tamamlandı. Otoklavda 121 °C'ta 15 dakika sterilize edildi.

LB (Luria-Bertani) agar besiyeri : NaCl (5 g/l), Pepton (10 g/l), maya ekstraktı (5 g/l) ve agar (15 g/l) destile su içerisinde çözülerek pH 7'ye ayarlanarak ve 1 litreye tamamlandı. Otoklavda 121 °C'ta 15 dakika sterilize edildi. Besiyeri otoklavlandıktan sonra 55-60 °C'ye soğutuldu. Gerekli antibiyotik ilavesi yapıldıktan sonra temiz petrilere dökülerek katılaşmaya bırakıldı. Katılaşan petrilere besiyerinin adı ve hazırlanış tarihi yazılarak 4 °C'de muhafaza edildi.

SOC besiyeri : 20 mM MgSO₄ (24.6 g), 20 mM glukoz (9.0 g), %2 Pepton, %0.5 maya ekstrakt, 10 mM NaCl (2.92 g), 2.5 mM KCl (3.73 g), 20 mM MgCl₂ (20.2 g), destile su içerisinde çözülerek 100 ml'ye tamamlandı. 0.45'lik steril filtreden geçirilerek -20 °C'de 200 µl'lik stoklar halinde saklandı.

Oto-indüksiyon besiyeri :

20 g pepton , 5 g maya ekstraktı, 6 g sodyum fosfat dibazik, 5 g sodyum klorür, 3 g potasyum fosfat monobazik bir miktar suda karıştırıldı. Sonra üzerine % 60'lık gliserol çözeltisinden 10 ml, % 10'luk glukoz çözeltisinden 5 ml, ve % 8'lik laktoz çözeltisinden 25 ml eklendi. pH 7'ye ayarlandı ve hacim 1 litreye tamamlandı. Hazırlanan besiyeri, 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

SDS-PAGE'de Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

% 10'luk APS Çözeltisi : Amonyum persülfat (0.1 g) tartılarak 1 ml saf suda çözüldü. APS çözeltisi taze olarak hazırlandı.

% 10'luk SDS Çözeltisi : Sodyum dodesil sülfat (5 g) tartılarak bir miktar saf suda çözüldü ve hacim 50 ml'ye tamamlandı.

% 30'luk Akrilamid Çözeltisi : Akrilamid (30 g) ve bis-akrilamid (0.8 g) tartılarak hacim 100 ml'ye tamamlandı.

1.5 M Tris Tampon (pH 8.9) : Tris (36.34 g) tartılarak bir miktar saf suda çözüldü ve pH'sı 8.9'a ayarlandı. Destile suyla hacim 200 ml'ye tamamlandı.

1 M Tris Tampon (pH 6.8) : Tris (12.11 g) tartılarak bir miktar saf suda çözüldü ve pH'sı 6.8'e ayarlandı. Destile suyla hacim 100 ml'ye tamamlandı.

SDS Yürütme Tamponu : Tris (3.03 g), glisin (14.04 g) ve SDS (1 g) tartılarak bir miktar saf suda çözüldü, hacim saf su ile 1 litreye tamamlandı.

6X Örnek Yükleme Tamponu : Tris tampon (0.9 ml, 1 M, pH 6.8), Bromofenol mavi (6 mg), SDS (4.5 ml, % 10 (wt/vol)), gliserol (3.75 ml) , destile su (2.1 ml) karıştırılarak hazırlandı. Hazırlanan çözeltiden 375 µl tüplere aktarıldı. Kullanılacağı zaman mikrotüpe, 125 µl β-merkaptoetanol ilave edildi.

Jel Boyama Çözeltisi : 50ml asetik asit, 250ml metanol, ve 0.5g Coomassie brilliant blue destile su ile 500ml'ye tamamlandı.