



T.C.

BARTIN ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**BİYOTEKNOLOJİK UYGULAMALARA YÖNELİK REKOMBİNANT
GDH ENZİMİNİN BİYOREAKTÖR SİSTEMİNDE ÜRETİMİ,
OPTİMİZASYONU VE GRAFEN OKSİT (GO) NANOYAPILARININ
ENZİM AKTİVİTESİNE ETKİLERİ**

Ahmet ÇELİK

DANIŞMAN

DOÇ. DR. DURSUN KISA

BARTIN-2024



T.C.

BARTIN ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**BİYOTEKNOLOJİK UYGULAMALARA YÖNELİK REKOMBİNANT GDH
ENZİMİNİN BİYOREAKTÖR SİSTEMİNDE ÜRETİMİ, OPTİMİZASYONU VE
GRAFEN OKSİT (GO) NANOYAPILARININ ENZİM AKTİVİTESİNE ETKİLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ahmet ÇELİK

JÜRİ ÜYELERİ

Danışman : Doç. Dr. Dursun KISA
Üye : Prof. Dr. Mahfuz ELMASTAŞ
Üye : Dr. Öğr. Üyesi Ahmet BULUT

BARTIN-2024

BEYANNAME

Bartın Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre Doç. Dr. Dursun KISA danışmanlığında hazırlamış olduğum “BİYOTEKNOLOJİK UYGULAMALARA YÖNELİK REKOMBİNANT GDH ENZİMİNİN BİYOREAKTÖR SİSTEMİNDE ÜRETİMİ, OPTİMİZASYONU VE GRAFEN OKSİT (GO) NANOYAPILARININ ENZİM AKTİVİTESİNE ETKİLERİ” başlıklı yüksek lisans tezimin bilimsel etik değerlere ve kurallara uygun, özgün bir çalışma olduğunu, aksinin tespit edilmesi halinde her türlü yasal yaptırımını kabul edeceğimi beyan ederim.

28.06.2024

Ahmet ÇELİK

ÖN SÖZ

Akademiye girişimden itibaren bilgi ve tecrübesiyle beni destekleyen, araştırma ve geliştirme anlamında büyük katkılar sunan, laboratuvar çalışmalarım boyunca her türlü laboratuvar alt yapısını sağlayan, danışmanlık anlamında maddi ve manevi desteğini esirgemeyen ve öğrencisi olmaktan gurur duyduğum kıymetli hocam Doç. Dr. Dursun KISA'ya,

Çalışmalarına katkı sağlayan sayın hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Ahmet BULUT' a , Dr. Öğr. Üyesi Rizvan İMAMOĞLU'na ve akademik süreçte beni destekleyen diğer tüm hocalarıma,

Tez sürecim boyunca desteklerini esirgemeyen ve çalışmalarına katkıda bulunan değerli arkadaşlarım Buket YIDIRIM, Vildan SAĞ ve Ayşenur OĞUZYER'e,

Bugünlere gelmemi sağlayan, eğitim hayatım boyunca daima beni destekleyen, her türlü konuda bana güvenen, sevgi ve hoşgörülerini her daima hissettiren sevgili aileme,

Sevgi ve saygılarımı sunar, teşekkür ederim.

Bu tez çalışması kapsamında yer alan GDH enzimin üretimi TÜSEB “Hastabaşı glukoz ölçüm cihazlarında kullanılmak üzere GDH Enziminin Rekombinant Olarak Biyoreaktör Sisteminde Üretimi” başlıklı ve 2022 ACİL-22442 nolu proje ile, nanoyapıların sentezi ve karakterizasyonu ve enzim aktivitelere etkilerinin incelenmesine yönelik “Grafen oksit (GO) nanoyapılarının sentezi ve biyoteknolojik uygulamalara yönelik rekombinant GDH enzim aktivitesine etkileri” başlıklı ve 2023-FEN-İHP-006 nolu proje Bartın Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon birimi tarafından desteklenmiştir. Ayrıca, TÜBİTAK 2210-D Yurt İçi Sanayiye Yönelik Yüksek Lisans Burs Programı kapsamında bursiyer desteği alınmıştır.

Ahmet ÇELİK

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BİYOTEKNOLOJİK UYGULAMALARA YÖNELİK REKOMBİNANT GDH ENZİMİNİN BİYOREAKTÖR SİSTEMİNDE ÜRETİMİ, OPTİMİZASYONU VE GRAFEN OKSİT (GO) NANOYAPILARININ ENZİM AKTİVİTESİNE ETKİLERİ

Ahmet ÇELİK

Bartın Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Dursun KISA

Bartın-2024 sayfa: 64

Enzimler canlı organizmalarda hedef spesifik biyokimyasal reaksiyonları gerçekleştiren biyokatalizörlerdir. Enzimlerin çeşitli biyotransformasyonları icra etmeleri onların endüstriyel proseslerde kullanımını artırmaktadır. Enzim endüstrisi açısından değer taşıyan enzimlerden biri olan glukoz dehidrojenaz (GDH), glukozu indirgeme kabiliyetinden dolayı kan şekeri seviyesinin tespitine yönelik çeşitli testlerde ticari olarak kullanılmaya aday bir enzimdir. Bu doğrultuda tez çalışmasında GDH enziminin rekombinant üretimi ve aktivite çalışmaları yürütülmüştür. GDH geni klonlanan ekspresyon vektörü (pET-28a(+)-GDH)'nü *E. coli* BL21(DE3) ekspresyon suşuna transfer edilerek rekombinant üretimi gerçekleştirilmiştir. Yapılan SDS-PAGE ve aktivite çalışmalarında GDH enzimin yüksek ekspresyona, saflığa, aktiviteye ve spesifiteye sahip olduğu görülmüştür. Tez çalışmasının ikinci aşamasında sentez ve karakterizasyonu (XRD ve FTIR) yapılan çeşitli nanoyapıların (GO, rGO, GO-Fe, GO-Pt, GO-Ni ve GO-Fe-Histidin) enzim aktivitesine etkileri incelenmiştir. Çalışılan konsantrasyon aralığında nanoyapıların enzim aktivitesini azalttığı görülmüştür. Sonuç olarak rekombinant üretimi yapılan GDH enzimi incelenen parametreler

açısından referans enzimle karşılaştırıldığında glukoz test çalışmalarında kullanılabileceği ifade edilebilir.

Anahtar Kelimeler: Glukoz dehidrogenaz, grafen oksit, rekombinant üretim.

Bilim Alanı Kodu: 20605, 20610, 92311



ABSTRACT

M. Sc. Thesis

PRODUCTION AND OPTIMIZATION OF RECOMBINANT GDH ENZYME IN BIOREACTOR SYSTEM FOR BIOTECHNOLOGICAL APPLICATIONS AND THE EFFECTS OF GRAPHENE OXIDE (GO) NANOSTRUCTURES ON ENZYME ACTIVITY

Ahmet ÇELİK

Bartın University

Graduate School

Department of Molecular Biology and Genetic

Thesis Advisor: Assoc. Prof. Dr. Dursun KISA

Bartın-2024, pp: 64

Enzymes are biocatalysts that carry out target-specific biochemical reactions in living organisms. The fact that enzymes perform various biotransformations increases their use in industrial processes. Glucose dehydrogenase (GDH), one of the enzymes of value for the enzyme industry, is a candidate enzyme to be used commercially in various tests for the detection of blood sugar levels due to its ability to reduce glucose. In this direction, recombinant production, activity studies of the GDH enzyme were carried out in the thesis study. Recombinant production was carried out by transferring the expression vector (pET-28a(+)-GDH) cloned from the GDH gene to the *E. coli* BL21(DE3) expression strain. SDS-PAGE and activity studies showed that GDH enzyme had high expression, purity, activity and specificity. Enzyme synthesis and characterization (XRD and FTIR) of various nanostructures (GO, rGO, GO-Fe, GO-Pt, GO-Ni and GO-Fe-Histidine) were carried out in the second stage of the thesis study. The effects on its activity were examined. It was observed that nanostructures reduced enzyme activity in the concentration range studied. As a result, it can be stated that the recombinantly produced GDH enzyme can be used in

glucose test studies when compared with the reference enzyme in terms of the parameters examined.

Keywords: Glucose dehydrogenase, graphene oxide, recombinant production.

Scientific Field Code: 20605, 20610, 92311



İÇİNDEKİLER

BEYANNAME	ii
ÖNSÖZ	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
TABLOLAR DİZİNİ.....	xii
EKLER DİZİNİ	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xv
KISALTMALAR.....	xv
1.GİRİŞ.....	1
1.1 Enzimler	1
1.1.1 Glukoz Dehidrojenaz (GDH).....	4
1.1.2 Enzim Kaynakları.....	5
1.1.2.1 Mantarlar.....	5
1.1.2.2 Mayalar.....	6
1.1.2.3 Bakteriler.....	7
1.1.2.4 Bitkiler.....	8
1.1.2.5 Hayvanlar.....	8
1.1.3 Rekombinant DNA Teknolojisi.....	9
1.1.4 Enzim Aktivitesine Etki Eden Faktörler.....	10
1.1.4.1 Substrat Konsantrasyonu.....	11
1.1.4.2 Enzim Miktarı.....	11
1.1.4.3 pH.....	11
1.1.4.4 Sıcaklık.....	12
1.1.4.5 Kofaktör ve İnhibitör Etkisi.....	12
1.1.4.6 Zaman.....	12
1.1.5 Endüstriyel Amaçlı Enzim Üretimi	13
1.2. Nanomateryaller	14

1.2.1 Grafen Nanomateryaller.....	15
1.2.1.1 Grafen Oksit ve İndirgenmiş Grafen Oksit.....	15
1.2.2 Nanomateryaller ve Enzimler.....	17
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	19
3.MATERYAL VE METOT	22
3.1 Materyal	22
3.1.1 Deney Esnasında Kullanılan Cihazlar.....	22
3.1.2 Deney Esnasında Kullanılan Kimyasallar.....	23
3.1.3 Kullanılan Çözeltiler.....	25
3.2. Yöntem.....	28
3.2.1 Rekombinant Enzim Üretimi.....	28
3.2.1.1 Hedef Genin ve Uygun Vektörlerin Belirlenmesi.....	28
3.2.1.2 GDH Geni Taşıyan Vektörün <i>E. coli</i> DH5a Hücrelerine Transformasyonu.....	29
3.2.1.3 GDH Enziminin Ekspresyonu.....	30
3.2.1.4. GDH Enziminin Biyoreaktörde Üretimi.....	30
3.2.1.5 Enzimin His-tag Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması.....	31
3.2.1.6 UV-Spektrofotometre ve SDS-PAGE Analizi	31
3.2.1.7 Saflaştırılan GDH Enziminin Aktivite Ölçümü.....	32
3.2.1.8 GDH Enziminin Liyofilize Hale Getirilmesi.....	32
3.2.2 Grafen Oksit ve Türevlerinin Sentezi ve Karakterizasyonu.....	33
3.2.2.1 Grafen Oksit Sentezi (GO).....	33
3.2.2.1 İndirgenmiş Grafen Oksit Sentezi (rGO).....	33
3.2.2.3 GO-Pt Sentezi.....	33
3.2.2.4 GO- FeCl ₃ 'ün Sentezi.....	34
3.2.2.5. GO- FeCl ₃ /L-His Sentezi.....	34

3.2.2.6 GO-Ni Sentezi.....	35
3.2.2.7 Sentezlenen Nanoyapıların Karakterizasyonu.....	35
3.2.3 Glukoz Dehidrogenazın GO, rGO, GO- Fe, GO-Pt, GO-Ni, GO- Fe. Histidin ile Etkileşimi.....	35
3.2.4 Farklı Nanoyapıların GDH Enziminin Aktivitesine Etkilerinin İncelenmesi.....	36
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	37
4.1 pET-28a(+)-GDH Plazmid Eldesi.....	37
4.2 GDH Enziminin Üretimi.....	37
4.3 GDH Enzim Aktivite Tayini.....	41
4.4 Grafen Oksit Nanoyapıların Sentezi, Karakterizasyonu ve GDH Enzimi ile Etkileşimi.....	46
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	54
KAYNAKLAR.....	56
EKLER	63

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa No
1.1: <i>Bacillus megaterium</i> (<i>Priestia megaterium</i>) bakterisine ait GDH enziminin yapısı.....	5
1.2: Glukoz dehidrojenazın glukozu D-glukono-1,5-laktone katalizleme reaksiyonu.....	5
3.2: pET-28a(+)-GDH vektörünün dairesel haritası ve nükleotid dizisi.....	28
4.1: GDH plazmidi içeren <i>E. coli</i> kolonileri.....	37
4.2: Farklı ekspresyon koşullarında GDH proteinin ekspresyonuna ilişkin SDS-PAGE görüntüsü.....	38
4.3: Liyofilize edilen proteinlere ilişkin SDS-PAGE görüntüleri.....	40
4.4: Biyoreaktörde üretimi yapılan GDH proteinin SDS-PAGE görüntüsü.....	41
4.5: Biyoreaktör üretimi sonrası liyofilize edilen GDH SDS-PAGE analizi.....	41
4.6: Enzim ünitesi belirlenmesinde kullanılan NADPH+H kalibrasyon grafiği.....	42
4.7: GDH enzim aktivite ölçümüne ilişkin spektrofotometrik ölçüm sonucu.....	42
4.8: Farklı glukoz konsantrasyonlarında yüzde enzim aktivitesi.....	43
4.9: Farklı substratlara karşı GDH aktivitesi.....	43
4.10: Farklı çözelti tampon pH'larında GDH aktivitesi.....	44
4.11: Farklı sıcaklıklara karşı GDH aktivitesi.....	44
4.12: (a) GO ve GO+GDH'in FTIR spektrumları. (b) GO, GDH ve GO+GDH'in XRD görüntüleri.....	45
4.13: (a) rGO ve rGO+GDH'in FTIR spektrumları. (b) rGO, GDH ve rGO+GDH'in XRD görüntüleri.	45
4.14: (a) GO-Fe ve GO-Fe+GDH'in FTIR spektrumları. (b) GO-FeCl ₃ , GDH ve GO-FeCl ₃ +GDH'in XRD görüntüleri.....	47
4.15: (a) GO-Pt ve GO GO-Pt+GDH'in FTIR spektrumları. (b) GO-Pt, GDH ve GO-Pt+GDH'in XRD görüntüleri	48
4.16: (a) GO-Ni ve GO GO-Ni+GDH'in FTIR spektrumları. (b) GO-Ni, GDH ve GO-Ni+GDH'in XRD görüntüleri.....	49
4.17: (a) GO-Fe-Histidin ve GO-Fe-Histidin+GDH'in FTIR spektrumları. (b) GO-FeCl ₃ -Histidin, GDH ve GO-FeCl ₃ -Histidin+GDH'in XRD görüntüleri.....	49

4.18: GDH enziminin nanoyapılara immobilizasyonu SDS-PAGE görüntüsü GO + GDH, GO, rGO + GDH, rGO, marker, GO-Fe + GDH, GO-Fe.....	50
4.19: GDH enziminin nanoyapılara immobilizasyonu SDS-PAGE görüntüsü GO-Pt + GDH, GO-Pt, marker, GO-Ni+GDH, GO-Ni, GO-Fe-Histidin+GDH, GO-Fe-Histidin.....	50
4.20: Farklı nanoyapıların enzim aktivitesine etkisi.....	51



TABLolar DİZİNİ

Tablo	Sayfa
No	No
1.2.1.1 Grafen Oksit (GO) ve indirgenmiş Grafen Oksit (rGO) 2D yapısı (NCBI).....	16
3.1.1 Deney Esnasında Kullanılan Cihazlar.....	22
3.1.1 Deney Esnasında Kullanılan Kimyasallar.....	23
4.1 Farklı kültür koşullarında küçük ölçekli üretim sonuçları.....	39



EKLER DİZİNİ

Ek	Sayfa
No	No
1. GO, GO + GDH, rGO, rGO + GDH, GO-Fe, GO-Fe + GDH, GO-Pt, GO-Pt + GDH, GO-Ni, GO-Ni+GDH, GO-Fe-Histidin, GO-Fe-Histidin+GDH'in FTIR spektrumları.....	63
2. GO, GO + GDH, rGO, rGO + GDH, GO-Fe, GO-Fe + GDH, GO-Pt, GO-Pt + GDH, GO-Ni, GO-Ni+GDH, GO-Fe-Histidin, GO-Fe-Histidin+GDH'in XRD görüntüleri.....	64



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
nm	Nanometre
mL	Mililitre
μ L	Mikrolitre
μ g	Mikrogram
RPM	Dakikadaki devir sayısı
mM	Milimolar

KISALTMALAR

Kısaltmalar	Açıklama
AMP	Ampisilin
APS	Amonyum persülfat
BSA	Sığır Serum Albumin
CHL	Kloromfenikol
DMSO	Dimetil Sülfoksit
EC	Enzyme Comission
EDTA	Etilendiamintetra Asetik Asit
FSB	Frozen Storage Buffer
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
GDH	Glukoz dehidrojenaz
GO	Grafen Oksit
GOx	Glukoz Oksidaz
HRP	Horseradish peroksidaz
IPTG	İzopropil β -D-1-tiolgalaktopiranosid
IU	International Unit
IUBMB	Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği
LB	Luria-Bertani
NAD(H)	Nikotinamid adenin dinükleotit

NAD(P)	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
OD	Optik Dansite
PCR	Polimeraz zincir (chain) reaksiyonu
SMF	Batık fermantasyon
SSF	Katı hal fermantasyon
TB	Terrific Broth
TEMED	Tetrametiletildiamin
XRD	X Işını Kristalografisi



1.GİRİŞ

Biyoteknoloji, İnsanoğlunun binlerce yıl önce gıda alanında şarap ve ekmek yapımında mayaları kullanmaya başladığı döneme kadar izlenebilmekle birlikte, doğa ve yaşam bilimlerinin gelişmesine katkıda bulunarak günümüzde daha çeşitli uygulamaların gerçekleşmesine olanak sağlamaktadır. Modern dünyada, biyoteknoloji genel olarak canlı sistemler, organizmalar veya hücre dışı sistemleri kullanarak biyolojik ürün üretimi veya modifiye edilmesi sürecini ifade eder. Geleneksel fermentasyonun yanı sıra, biyoteknolojik araçlar, genetik mühendisliği, uygulamalı immünoloji ve tıbbi tedaviler ve tanı/teşhis gibi daha ileri bilimleri kullanarak genişlemektedir. Bu araçlar arasında, çeşitli enzimler biyoteknoloji ve moleküler biyoloji çalışmalarının gerçekleştirilmesine yönelik olarak vazgeçilmez olup gelişmiş uygulamalar için farklı amaçlara yönelik olarak farklı endüstriyel üretimlerde yer almaktadır. Enzim teknolojisinin gelişmesiyle ürünlerin kullanım alanları açısından ve ekonomik açıdan önemi artmıştır. Bu nedenle enzimler farklı çalışma alanlarında dikkat çekmekte ve önemli biyotransformasyonları icra etmesi sebebiyle enzim üzerine daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. (Buchholz ve Bornscheuer, 2017; Hennigan ve Lynch, 2022; Tamanoi, 2023).

1.1 Enzimler

Enzimler, amino asit monomerlerinden oluşan birçok önemli kimyasal ve biyokimyasal süreci katalize eden biyomakromoleküllerdir. Kimyasal katalizörler gibi enzimler de aktivasyon enerjisini düşürerek reaksiyon hızını arttırmaları, dolayısıyla reaksiyonlar denge durumuna daha hızlı ulaşır ve ürünler daha hızlı oluşur. Uzun yıllar sürebilecek belirli bir dönüşüm enzimler sayesinde saniyeler içinde gerçekleştirebilmektedir. Hücredeki işlevlerinin yanı sıra hücre dışında da aktivite gösterebilen enzimler bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal (bakteri, maya) kaynaklardan ticari amaçlı üretilmektedir. Teknoloji geliştikçe kullanımı yaygınlaşan ve giderek önemi artan enzimler; sağlık, eczacılık, gıda, tekstil, tarım, çevre, kağıt ve deterjan vb. birçok alanda kullanılmaktadır (Certel ve Erem, 2018; Patel vd., 2023; Amatto vd., 2022).

İnsanlar binlerce yıl öncesinden günümüze kadar mayaları çeşitli uygulamalarda kullanarak birçok ürün elde etmişlerdir. Günümüz dünyasında biyoteknoloji, çeşitli organizmalar,

canlı sistemler veya hücre dışı sistemlerin kullanımıyla biyolojik ürün elde etme veya düzenleme sürecini ifade eder. Konvansiyonel fermantasyon sistemlerinin yanı sıra genetik mühendisliği, biyoteknolojik araçlar, uygulamalı immünoloji ve tıbbi tedaviler ve tanı/teşhis gibi daha modern teknolojileri kullanarak genişlemeye devam etmektedir. Bu teknolojiler arasında, enzimler biyoteknoloji ve moleküler biyoloji alanındaki çalışmalarda önemli olup birçok ileri uygulamalar için çeşitli amaçlar doğrultusunda farklı endüstriyel üretimlerde yer almaktadır. En eski enzim uygulama örneği mayaların kullanımınıdır. Mayaların hücre dışı ekprese ettiği enzimler sayesinde ekmek, şarap ve bira endüstrisinde birçok uygulamada kullanılmışlardır. Fakat ilk başlarda enzim adı verilmemiştir. Enzimlerle ilgili en eski yazılı kaynaklardan biri, Homeros'un yaklaşık M.Ö. 800'de kaleme aldığı Yunan destansı şiirlerinde bulunur; bu şiirde enzimlerin peynir üretiminde kullanıldığından bahsedilir. Ayrıca Japonlar bin yıla aşkın süredir pirinçten yapılan Japon likörü Sake gibi fermente ürünlerin yapımında da doğal olarak oluşan enzimleri kullanmaktadırlar (Patel vd., 2023b).

Günümüzde kullanılan enzimlerden yaklaşık 158'i gıda endüstrisinde, 64'ü teknik uygulamalarda, 57'si hayvan yemlemede, 24'ü her üç sektörde kullanılmaktadır. Yaklaşık 8000'i aşkın enzim bilinmekte ve bunların yaklaşık 200'ü ticari olarak kullanılmaktadır. Yeşil çağ olarak adlandırılan günümüz zaman diliminde kimyasal ürünlerin sadece %5'i biyolojik bir yolla üretilmektedir. Küresel enzim pazarında enzim talebi 2021'de 11.47 milyar dolar olduğu bildirilerek 2022'den 2030'a kadar da yaklaşık yıllık %6,5 büyüme oranıyla artacağı tahmin edilmektedir. Novozymes, DSM, DuPont ve BASF şirketleri genel endüstriyel enzimlerin yaklaşık %75'ini üretebilen en büyük enzim üreticileri olarak bilinmektedir. Enzim sektöründe Avrupa ve Kuzey Amerika %65 oranında büyük bir kâr elde ederken, Asya-Pasifik ise %30 kâr ile pazarda yer alır. Enzimlerin geniş uygulama alanları ve sürekli yeni enzim teknolojileri arayışla birlikte pazar gelirinin daha da artması öngörülmektedir (Maghraby vd., 2023; Amatto vd., 2022; URL-1 (2024)).

Endüstriyel ölçekte enzimler, yüksek reaksiyon hızı, özgüllük, ürün verimi, ürün kalitesi ve operasyonlarda güvenlik ile reaksiyonları katalize etme yeteneklerinden dolayı önem kazanmıştır. Enzimler bitki, hayvan ve mantar dokuları tarafından doğal olarak üretilmektedir. Bu bilgi, endüstri tarafından 50 yılı aşkın bir süredir kullanılmaktadır. Bakteriler ve mantarlar, enzimlerin endüstriyel üretimi için en uygun mikroorganizmalardır.

Kullanımı kolaydır, ışısız büyük tanklarda yetiştirilebilirler ve çok yüksek bir büyüme hızına sahiptirler (Liu ve Kokare, 2023; Patel vd., 2023a).

Enzimler ilk keşfedildikleri zamanlarda substratının veya katalizediği bileşimin adının sonuna '-az' getirilerek ya da reaksiyonun tipine göre adlandırma yapılmıştır. Enzim alanındaki gelişmeler sayesinde birçok yeni enzimin keşfedilmesiyle IUBMB (Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği) enzim sınıflandırma sistemine göre sınıflara ayrılmıştır. Sınıflandırmada katalizlenen reaksiyona göre bir enzimi tanımlayan dört bileşenli bir sayı (EC (Enzyme Commission)numarası) kullanılır. Günümüze kadar enzimler; Oksidoredüktazlar (EC 1), Transferazlar (EC 2), Hidrolazlar (EC 3), Liyazlar (EC 4), İzomerazlar (EC 5) ve Ligazlar (EC 6) olmak üzere altı gruba ayrılmaktaydı. Son çalışmalarda, yeni bir sınıf olan Translokazlar (EC 7)'inde eklenmesiyle yedi gruba ayrılmıştır (McDonald ve Tipton 2023; Uyar, 2019).

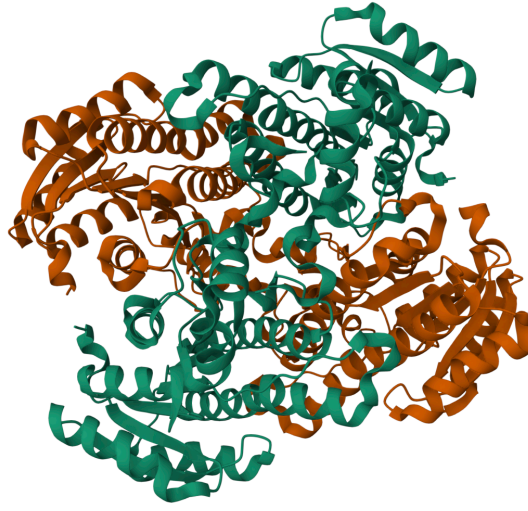
- **Oksidoredüktazlar (E.C.1):** Oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarını katalizleyen enzim grubudur. Katalaz (1.11.1.6), alkol dehidrojenaz (1.1.1.1), glukoz oksidaz (1.1.3.4), L-laktat dehidrojenaz (1.1.1.27), glutatyon redüktaz ve glukoz dehidrojenaz (1.1.1.47) bu gruba giren enzimler arasındadır.
- **Transferazlar (E.C.2):** Hidrojen hariç bir atomun ya da atom grubunun bir molekülden diğerine iletilmesini sağlar. Fosforilaz kinaz (2.7.11.19), transketolaz (2.2.1.1), gama-glutamilttransferaz (2.3.2.2) ve aspartat transaminaz (2.6.1.1) bu gruba giren enzimlerdir.
- **Hidrolazlar (E.C.3):** Büyük moleküllerin yıkılması için kimyasal bağa su ekleyen veya başka bir grubu suya çevirerek kolay kullanılabilir hale getiren enzim grubudur. Asetilkolinesteraz (3.1.1.7), beta-glukosidaz (3.2.1.21), laktaz (3.2.1.108) ve üreaz (3.5.1.5) bu gruba giren enzimlerdir.
- **Liyazlar (E.C.4):** Reaksiyon esnasında ortama su molekülü çıkarmadan molekülleri yıkan enzim grubudur. Adenilat siklaz (4.6.1.1), pirüvat dekarboksilaz (4.1.1.1), arjininosüksinat liyaz (4.3.2.1) ve aldolaz (4.1.2.55) bu gruba giren enzimlerdir.
- **İzomerazlar (E.C.5):** Molekülü yapısal olarak değiştirerek uzaydaki dizilişini değiştiren enzim grubudur. DNA topoizomeraz (5.6.2.2), triozfosfat izomeraz

(5.3.1.1), fosfoglukomutaz (5.4.2.2) ve glukoz-6-fosfat izomeraz (5.3.1.9) bu gruba giren enzimler içerisinde yer almaktadır.

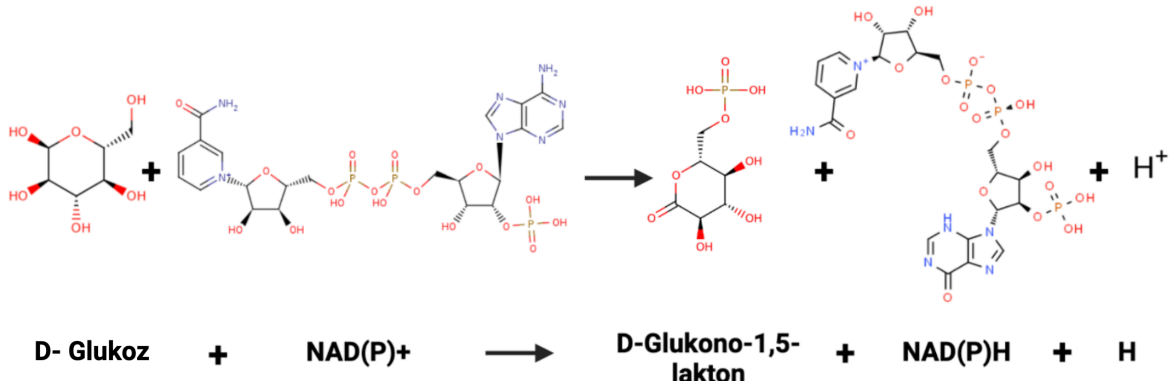
- **Ligazlar (E.C.6):** Substrat moleküllerinin enerji kullanılarak birbirine bağlanmasını sağlayan enzim grubudur. Glutamin sentetaz (6.3.1.2), DNA ligaz (6.5.1.1) ve pirüvat karboksilaz (6.4.1.1) bu gruba giren enzimlerdir.
- **Translokazlar (E.C.7):** Molekül ve iyonların zarlar boyunca hareketini veya zarlar içinde ayrılmasını katalize eden enzim grubudur. Sitokrom- c oksidaz (7.1.1.9) ve süksinat dehidrojenaz (7.1.1.12) bu gruba giren enzimlerdir.

1.1.1 Glukoz Dehidrojenaz (GDH)

Oksidoredüktaz grubunda yer alan glukoz dehidrojenaz (1.1.1.47) yaklaşık 126 kD moleküler ağırlığa sahip tetramer bir yapıdadır. *Bacillus megaterium* yeni ismiyle *Priestia megaterium* ve *Bacillus subtilis* gibi çeşitli organizmalarda meydana gelir. GDH yiyecek, içecek, tanı-teşhis ve biyoyakıt gibi çeşitli endüstrilerde yaygın olarak kullanılmaktadır. GDH kandaki glukoz seviyesinin tespiti ve kan şekerinin kendi kendine izlenmesi için test şeritlerinde ticari olarak kullanılma potansiyeli olan alternatif bir enzimdir. Bu enzim NAD(P) varlığında glukozu glukonik asit ve NAD(P) H⁺H'a dönüştürmektedir. Bunun sonucunda kandaki glukoz miktarı ile doğru orantılı olarak indirgenmiş formdaki koenzimlerin konsantrasyonu da amperometrik ya da fotometrik yöntem aracılığıyla ölçülür. Yiyecek ve içecek endüstrisinde meyve suları, şarap ve bira gibi ürünlerde glukoz ölçümü için GDH'den yararlanılmaktadır. Kalite kontrolüne ve fermantasyon sürecinin izlenmesine yardımcı olur (Aslan vd., 2016; Rao vd., 2017; Luis, 2015).



Şekil 1.1: *Bacillus megaterium* (*Priestia megaterium*) bakterisinde bulunan GDH enziminin yapısı (Protein Data Bank, <https://www.rcsb.org/3d-view/1RWB/1>)



Şekil 1.2: Glukoz dehidrojenazın glukozu D-glukono-1,5-laktone katalizleme reaksiyonu

1.1.2 Enzim Kaynakları

Canlı organizmalar enzimlerin biyolojik kaynaklarıdır. Endüstride kullanılan enzimlerin yarısından çoğu maya ve mantarlardan, üçte birinden fazlası bakterilerden, geri kalan kısmı ise bitki ve hayvanlardan elde edilmektedir. Çoğu enzim klinik tanı ve biyokimyasal analizde yaygın olarak kullanıldığı için önem arz etmektedir (Sharma vd., 2021).

1.1.2.1 Mantarlar

Endüstriyel enzim kaynakları arasında mantarlar, endüstriyel enzimler için önemli bir kaynaktır. Küresel enzim pazarında birçok mantar kaynaklı enzim bulunmaktadır.

Mantardan elde edilen enzimler, üretim potansiyelleri yüksektir, kolay saflaştırılabilirler ve ekstrem koşullara karşı stabilite gösterirler. Ayrıca, mantarlar antik çağlarda bira yapımı ve fırınlama gibi birçok alanda kullanıldığı için günümüzdeki uygulamalarla güvenli ve sağlam bir bağ oluşturmaktadır. Ticari ölçekli enzim üretimine yönelik *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* ve *Rhizopus* cinsleri başta olmak üzere birçok mantar türü kullanılmaktadır. Günümüzde mantar yetiştiriciliğinin yüksek üretkenliği ve yatırım maliyetinin düşük olması enzim üretiminde umut vaat etmektedir. Mantarlar çoğunlukla çevredeki selülozik malzemeden beslenirler; dolayısıyla bu malzemeleri sindirmek için selülazlar, lakkazlar, β -glukosidazlar, lignin peroksidazlar ve lignoselüloolitik enzimler dahil olmak üzere çoğu enzimi yapılarında bulundurlar. *Aspergillus* cinsi mantarlar gıda endüstrisinde yiyeceklerde akrilamid oluşumunu azaltan L-asparaginaz (3.5.1.1)'ı, tekstil alanında liflerden nişastanın uzaklaştırılmasında kullanılan amilazı üretirler. *Penicillium* cinsi mantarlar tekstil sektöründe haşıl sökme işleminde kullanılan α -amilaz (3.2.1.1)'ı üretmektedir. *Trichoderma* cinsi mantarlar kağıt ve kağıt hamuru sektöründe kağıt ağartmada kullanılan ksilanaz (3.2.1.8)'ı, tekstil sektöründe biyo-parlatma işleminde kullanılan selülazı üretir. *Rhizopus* cinsi mantarlar yakıt endüstrisinde alkolsüz yolla biyodizel sentezlenmesinde kullanılan triaçilgliserol lipaz (3.1.1.3) enzimini üretmektedir (El-Gendi vd., 2022).

1.1.2.2 Mayalar

Ökaryotik organizmalardan olan mayalar, geçmişten günümüze kadar endüstriyel, biyoteknoloji ve çevresel alanda birçok uygulamada önemli etkilere sahip olmuştur. Mayalar yüksek salgılama kapasitesine, yüksek termal stabiliteye, çok çeşitli karbon kaynaklarında yüksek büyüme hızına, birçok translyon sonrası modifikasyonu gerçekleştirme yeteneğine, kolay yetiştirilebilme gibi birçok avantajlı fenotipe sahiptirler. Hızlı büyüme oranları ve termo toleransları gibi çeşitli özelliklerinden dolayı endüstriyel gıda ve biyoteknolojik uygulamalar için vazgeçilmez kaynaklardır. Biyoteknoloji alanında hücre dışı enzimatik aktivitelerde büyük bir potansiyel taşırlar. Ayrıca genetik manipülasyon yoluyla büyük konsantrasyonlarda elde edilebilirler, ideal bir biyokatalizör olarak kabul edilirler. Günümüzde biyokatalizörlerin, düşük maliyeti, enantiyoseçiciliği ve bölgesel seçicilik kapasiteleri, gelişmiş biyobozunurluğu ve daha ılıman koşullarda uygulanabilirliği, dönüşüm kullanımı için geri kazanılma kapasitesi gibi çeşitli özelliklerinden dolayı

endüstride önemi artmıştır. Biyokatalizörler, amilaz, selülaz ve proteaz gibi hidrolitik enzimlere ağırlık vererek kimyasal katalizörlerle karşılaştırıldığında daha verimlidir. Mikrobiyal enzimlerin uygulanabilirliğindeki büyük artışla birlikte glukon 1,4-alfa-glukosidaz (3.2.1.3)'ü üreten *Tetracladium* sp., β -glukosidaz (3.2.1.21)'ü *Trichosporon laibachii* ve proteinaz K (3.4.21.64) *Tritirachium album* gibi mayalar enzimleri sentezleme yeteneğinden dolayı odak haline gelmiştir (Carvalho vd., 2021; Giese vd., 2017; Karim vd., 2020).

1.1.2.3 Bakteriler

Bakteriler endüstriyel enzimlerin çoğunu doğal olarak üretir. Doğal olarak üretilen enzimler 50 yılı aşkındır endüstride kullanılmaktadır. Bakteriler endüstriyel enzim üretimine en uygun mikroorganizmalardır. Çünkü bakterilerin kullanımı kolaydır, kültür koşullarında büyük ölçekte üretim yapabilirler ve yüksek üreme oranına sahiptirler (Patel vd., 2023b). Bakteriye enzimlerin üretim maliyeti düşüktür ve çeşitli hammaddelerin kullanımına bağlı hızlı büyürler. Enzim içerikleri tahmin edilebilir ve kontrol edilebilir. Bakteriden elde edilen enzimlerin stabilitesi diğer kaynaklardan elde edilen enzimlere göre daha fazladır (Kaur vd., 2014). Mikrobiyal enzimler, doğal kaynakların tükenmesi, çevreye zararının az olması, veriminin yüksek olması, ekonomik uygulanabilirlik gibi çok sayıda faktör nedeniyle fırıncılık, içecek, deterjan, gıda, yem, deri, ilaç ve tekstil gibi çeşitli endüstrilerde çok sayıda uygulamaya sahiptir. Mikrobiyal enzimlerin üretimi, farklı endüstriyel sektörlerde üstün aktiviteler ve yüksek performans gösterdikleri için sürekli enzime olan talep günden güne artmaktadır (Sharma vd., 2021). Deterjan, gıda, kozmetik, farmasötik, deri ve kağıt endüstrisinde kullanılmak üzere *Bacillus* sp.'den alkalın lipaz (3.1.1.3), *Aeromonas hydrophila*'dan α -amilaz (3.2.1.1), *Pseudomonas aeruginosa*'dan proteaz-IV (3.4.21.112) elde edilmiştir. Ayrıca PCR teknolojisinde kullanılmak üzere *Thermus aquaticus*'tan Taq polimeraz enzimi elde edilmiştir (Solunke, 2018).

Günümüzde çoğu endüstriyel uygulamalar için mikrobiyal enzim kaynakları, mikrobiyal olmayan kaynaklara göre tercih edilir. Çünkü mikrobiyal enzimler hayvan ve bitki kaynaklı enzimlerinden daha stabil ve aktif özellik gösterir. Fermantasyon prosesi tasarlanarak esas olarak seçilmiş suşlar yardımıyla, yüksek saflıkta, iyi karakterize edilmiş enzimler üretebilir. Ayrıca, mikroorganizmalar tarafından üretilen enzimlerin biyokimyasal çeşitliliği ve gen

manipülasyonuna yatkınlığı nedeniyle ürün modifikasyonu ve optimizasyonu daha kolaydır (Liu ve Kokare, 2023).

1.1.2.4 Bitkiler

Bitkiler, büyümelerinin mevsimsel ve coğrafi yapısından dolayı genellikle enzim üretimi için sık tercih edilen kaynak değildir. Bitkilerden elde edilen enzimler genellikle hücre içi olduğundan enzim saflaştırma sürecini daha zahmetli hale getirir. Buna rağmen bitkiler çok çeşitli enzimlerin üretimi için geleneksel bir kaynak olarak kullanılmaktadır. Askorbat oksidaz, peroksidaz, fitaz, bromelain, lipaz, sükröz, üreaz, nitrat redüktaz, hidrosinitril liyaz, papain, proteaz ve ksantin dehidrojenaz gibi çeşitli enzimlerin saflaştırılmasında çeşitli bitki dokuları kaynak olarak kullanılmıştır. Bu enzimler şuruplar, unlu mamuller, alkollü içecekler, süt ürünleri dahil olmak üzere gıda üretiminde önemli bir rol oynamıştır (Kaur vd., 2014; Meshram vd., 2019). Örnek olarak; üreaz (3.5.1.5) enzimi kandaki üre miktarının tespitinde kullanılmak üzere jack bean fasulyesinden, α -amilaz (3.2.1.1) enzimi bira endüstrisinde kullanılmak üzere arpadan, HRP (Yabanturpu peroksidaz, 1.11.1.7) enzimi biyosensörlerde kullanılmak üzere yaban turpundan, sistein proteaz (3.4.22.2) antiinflamatuvar ajan olarak kullanılmak üzere papaya lateksinden, fisin (3.4.22.3) enzimi gıda endüstrisinde kullanılmak üzere incirden elde edilmiştir (Kaur vd., 2014).

1.1.2.5 Hayvanlar

Hayvanlar tıbbi ve endüstriyel alanda kullanılan birçok enzimin ana kaynağıdır. Hayvansal enzimlerin izolasyonu, saflaştırılmasındaki zorlukların maliyeti artırması nedeniyle cazip bir enzim kaynağı değildirler. Buna rağmen hayvan dokuları lipaz, esteraz ve proteaz gibi enzimlerin çok iyi kaynaklarıdır. Belirli bir enzimin bir dokudaki ekspresyon derecesi, enzim saflaştırması için kaynak olarak doku seçimine karar verir (Kaur vd., 2014). Tamamlayıcı pankreas enzimleri, kimotripsin ve tripsin ile birlikte en çok bilinen hayvansal enzimlerdir. Bu enzimler et endüstrisinin bir yan ürünü oldukları düşünüldüğünde, hayvan bazlı enzimlerin elde edilmesi zor olabilir ve kalitesi açısından sorgulanabilir. Hayvan bazlı enzimler düşük pH seviyelerine karşı çok hassastır, düşük pH aralığında fonksiyonları ve faydaları önemli derecede düşer. Ayrıca hayvansal enzimler, mantar türevli enzimler gibi diğer enzim kaynaklarına göre daha düşük etki gücüne sahiptir (Janiro vd., 2016). Bu

enzimlerden katalaz (1.11.1.6) gıda endüstrisinde kullanılmak üzere karaciğerden, tripsin (3.4.21.4) deri endüstrisinde kullanılmak üzere pankreastan, kimozi (3.4.23.4) peynir üretiminde kullanılmak üzere sığır midesinde, aldolaz früktoz (4.1.2.13) sindiriminde kullanılmak üzere karaciğer ve kaslardan elde edilmiştir (Solunke, 2018).

1.1.3 Rekombinant DNA Teknolojisi

Rekombinant DNA teknolojisi, farklı canlı biyolojik türlerden DNA moleküllerinin genetik mühendisliği teknolojisiyle kesilmesi ve ardından ifade için bir vektöre bağlanmasıdır. Organizmanın genomundaki değişiklik, bir veya daha fazla yeni gen ve düzenleyici elementin eklenmesi yoluyla ya da genlerin ve elementlerin yeniden birleştirilmesi yoluyla endojen genlerin ekspresyonunun artırılması, azaltılması veya bloke edilmesi yoluyla gerçekleştirilir. Farklı DNA fragmanları elde etmek için DNA bölgeleri kısıtlama endonükleazları kullanılarak enzimatik bölünme uygulanır, sonra istenen geni vektörde sabitlemek üzere DNA fragmanları DNA ligaz enzimi kullanılarak birleştirilir. Ardından vektör, kültürde birleştirilmiş DNA fragmanının birden fazla kopyasını üretecek şekilde büyütülen bir konakçı organizmaya transforme edilir ve son olarak ilgili bir DNA fragmanı içeren klonlar seleksiyon yoluyla ayrılır ve toplanır. Bu teknoloji, istenilen proteinin bitki ve hayvanlardan uzun ekstraksiyon yöntemlerini kullanarak elde etmek yerine genetik mühendisliği sayesinde büyük miktarlarda eksprese edilmesini sağlar (Coskun vd., 2022; Khan vd., 2016).

Son yıllarda rekombinant DNA teknolojisinde kullanılmasıyla moleküller üzerinde istenilen değişikliklerin yapılması sonucunda bu yapıların daha etkili hale gelebildiği anlaşılmıştır (Khan vd., 2016). Mikrobiyal biyoteknoloji sayesinde istenilen enzimler ticari nitelikte çoğaltılabilir ve üretilebilir. Bu yöntem bilim, tıp, tarım ve çeşitli endüstrileri alanlarında sıklıkla kullanılmaktadır. Ayrıca rekombinant DNA teknolojisi ile bu enzimlerin heterolog ekspresyonuna imkan sağlar ve ilaç geliştirme amaçlı ya da tedavi amaçlı kullanılır (Güven, 2011; Kıyan ve Yaylım, 2020). İlâveten bu enzimlerin düşük maliyetle ve yüksek verimle fazla miktarda elde edilmesi ticari açıdan da oldukça büyük bir avantaj sunar. *E. coli* birçok proteinin üretimi için tercih edilen organizmalardan biridir. Ticari olarak ilk üretilen insan insülini *E. coli*'de eksprese edilmiştir. 1970'lerin sonunda. *E. coli* dışında ökaryotlarda

biyofarmasötik proteinlerin üretiminde mayalar kullanılmıştır. Son yıllarda bitkilerin, biyofarmasötik proteinlerin ve insan ilaçlarının büyük ölçekli üretimi için potansiyel model sistemler olduğu bulunmuştur. Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi (FDA), genetiği değiştirilmiş havuç hücrelerinde üretilen ilk bitki bazlı ilaçları onaylamıştır (Watts vd., 2021).

Türkiyede yeterli düzeyde enzim üretimi yapılamadığı için çoğu enzim yurtdışından ithal olarak temin edilmektedir. Bu durum ihtiyaç duyulan enzimlerin yurt dışından temin edilmesini gerektirmekte ve ülkeyi bu ürünlere karşı dışa bağımlı kılmaktadır. Günümüzdeki enzimlerin çeşitliliği göz önüne alındığında enzim üretiminde ülke olarak henüz alınması gereken önemli mesafelerin olduğu açıktır. Gerek endüstriyel bir katalizör olarak kullanımı, gerekse sağlık alanındaki öneminden dolayı enzimlerin yerli olarak üretimi önem arz etmektedir.

1.1.4 Enzim Aktivitesine Etki Eden Faktörler

Enzim aktivitesi, belirli pH ve sıcaklık koşulları altında birim zaman başına dönüştürülen substratın mol sayısı veya gramıdır. Enzimin spesifik bir reaksiyonu katalizleme kapasitesinin bir ölçümünü vermektedir ve enzim aktivite birimi ünitedir. En yaygın kullanılan enzim aktivite birimi, International Unit (IU) olarak tanımlanmaktadır. 1 IU enzim aktivitesi, reaksiyon koşullarında, 1 dakikada 1mol (veya g) substratı dönüştüren enzim aktifliğini ifade etmektedir (Işık Biçen, 2022).

Enzimin aktivitesini etkileyen faktörler; “Substrat konsantrasyonu, enzim miktarı, ortam pH’ı, sıcaklık, zaman, kofaktör ve inhibitör etkileri”dir. Bu faktörler enzimlerin reaksiyon ortamındaki işlevini düzenler. Enzim konsantrasyonunun fazla olması reaksiyon hızını artırır. Örneğin, ortamda yüksek konsantrasyonda katalaz enzimi bulunduğunda hidrojen peroksit gibi birçok substratı hızlı şekilde katalize eder. Ancak ortamda substrat miktarı az olduğunda aktivite olumsuz etki gösterebilir. Ortam pH’ı enzim aktivitesinde önemlidir. Enzimlerin belirli bir pH aralığı bulunur ve bu aralığın dışında bulunan ortamlarda enzimlerin yapısı olumsuz etkilenerek aktivite düşer. Örneğin, mide asitinde bulunun pepsin enziminin optimum pH’ı 1.5-2.0 aralığındadır. Ortamdaki substrat miktarında enzim aktivitesini önemli

ölçüde etkiler. Örneğin, fosfodiesteraz gibi bazı enzimlerin ortamdaki substrat miktarına göre aktivitesi değişir. Yani enzimler daha fazla substrat bulunan ortamda daha hızlı reaksiyon gösterirler; ancak bir süre sonra enzimlerin aktif bölgesi doymuş hale geldiğinden reaksiyon hızı sabitlenir. Sıcaklık enzim etkinliğinde önemlidir. Her enzimin optimum sıcaklık aralığı vardır. Örneğin, pankreasta üretilen tripsin enzimi 30-40 °C’ de optimum aktivite gösterir. Fakat yüksek sıcaklıklarda aktivitesi hızlı bir şekilde düşer. Enzim aktivitesi zamana bağlı olarak değişir. Örneğin, substrat tükendiğinde enzim aktivitesi zamanla azalır, ortamda inhibitör madde bulunduğunda enzim aktivitesi zamanla azalır, enzimlerin inaktif hale geçmesiyle proteinlerin yapısı bozulur dolayısıyla aktivite azalır (Solunke, 2018).

1.1.4.1 Substrat Konsantrasyonu

Substrat konsantrasyonu enzimatik reaksiyonun hızını ve verimini etkiler. Substrat konsantrasyonunun artmasıyla enzimin aktivitesi artar. Enzim aktivitesi maksimum sınıra ulaşana kadar artış devam eder. Yani enzim molekülleri substrata tamamen doyurulur. Bu tüm enzimlerin aktif bölgelerinin dolu olduğu anlamına gelir. Ortamda bulunan fazla substrat molekülleri, enzimler ile bağlanana kadar herhangi bir reaksiyon göstermeyecektir. Ancak yüksek substrat konsantrasyonları, hidroliz oranını büyük miktarda azaltan substrat inhibisyonuna yol açabilmektedir (Aslanzadeh vd., 2014; Geldimyradow vd., 2023).

1.1.4.2 Enzim Miktarı

Enzimatik reaksiyon hızı, ortamdaki enzim miktarı ile doğru orantılıdır. Substrat miktarının sabit olduğu ortamda enzim miktarı ne kadar fazla ise reaksiyon hızı da o orantıda artar. Enzimatik reaksiyonda enzim miktarı olabildiği kadar düşük olmalıdır, yalnızca katalitik miktarlar yeterlidir, bu da enzimlerin nadir ve değerli maddeler olduğunu gösterir. Reaksiyon hızının substratlara ve kofaktörlere bağlı olmasının yanı sıra enzim konsantrasyonuyla doğrudan orantılıdır (Bisswanger, 2014).

1.1.4.3 pH

Enzimlerin aktivitesi ortam pH’ı ile doğrudan ilişkilidir. pH etkili enzimler, asidik karboksilik gruplar (COOH-) ve temel amino grupları (NH₂) içeren biyomoleküllerdir. Böylece, enzimler pH değerinin değiştirilmesinden etkilenir. Her enzimin en aktif çalıştığı

pH değeri bulunur. Bu değere enzimin optimum pH aralığı olarak adlandırılır. Enzimatik reaksiyon sırasında pH optimal pH'dan daha düşük veya daha yüksek olduğunda kataliz hızı azalmaktadır (Çelik, 2014; Shrief, 2020).

1.1.4.4 Sıcaklık

Enzim aktivitesi sıcak ortamda artar, sıcaklık optimum sıcaklıktan daha fazla yükseldikçe doğal bileşiminin değişmesi nedeniyle enzim aktivitesinin tamamen durduğu belirli bir sıcaklığa ulaşana kadar kademeli olarak düşer. Öte yandan, sıcaklık optimum sıcaklığın altına düşerse, enzim aktivitesi, enzim aktivitesinin en az olduğu minimum bir sıcaklığa ulaşana kadar düşer. Genelde enzim aktivitesi 0 C°de tamamen durma noktasına gelir, ancak sıcaklık tekrar yükselirse ve ardından enzim bir kez daha yeniden aktive olur (Bisswanger, 2014; Shrief, 2020).

1.1.4.5 Kofaktör ve İnhibitör Etkisi

Çoğu enzim aktifleşebilmek için kofaktörlere ihtiyaç duymaktadır. Kofaktörler, bazı vitaminlerden türetilen kimyasal bileşikler veya katyon ve anyonlardır. Örneğin; Zn^{++} insanlarda 150'den fazla enzim için gerekli bir kofaktördür, Cl^{-} ise tükürük α -amilaz için gerekli kofaktördür. Enzimatik reaksiyon sırasında gerekli bir kofaktörün yokluğunda enzim aktivite olmamaktadır (Scanlon vd., 2018).

Enzim inhibitörleri, enzimlere bağlanan ve aktivitelerini azaltan moleküllerdir. Bu maddeler enzimlerin substratlarla uyumluluğunu azaltırlar. Reaksiyonun katalizini düşürerek ürünlerin üretimine engel olurlar. Örneğin, kolesterol seviyesini düşürmede statinler kullanılır. Bu maddeler hidroksimetilglutaril-CoA (HMG-CoA) redüktaz inhibitörleridir. Rosuvastatin (Crestor), simvastatin (Zocor) ve atorvastatin (Lipitor) FDA onaylı statinlerdir (Katlowitz vd., 2023).

1.1.4.6 Zaman

Enzimlerin katalizlediği reaksiyon hızı reaksiyon sonuna doğru azalır. Azalmanın sebebi; ürünlerin inhibe edici etkisi, reaksiyonu engelleyici kimyasallar veya sustrat yetersizliğidir (Çelik, 2014). Yani enzim aktivitesi zamana bağlı olarak değişim gösterir.

1.1.5 Endüstriyel Amaçlı Enzim Üretimi

Enzimler, substrat ve ürün spesiflikleri, ürün oluşumu ve reaksiyon koşulları nedeniyle biyoproses endüstrisi için önemli biyomoleküllerdir. Bu sebeple, gelişmiş ve sürdürülebilir enzim üretimi için biyoreaktör tasarımlarının, mühendislik aracılığıyla optimum proses koşullarında çalışmasını sağlamak önem taşımaktadır. Endüstriyel ölçekte başarılı bir enzim üretimi için uygun suşun seçimi kadar biyoreaktör prosesinin optimizasyonunda önemlidir. Ayrıca biyoreaktör prosesi yeterince optimize edilmedikçe maksimum seviyede enzim üretimini sağlanmayabilir. Bir fermantasyon sisteminin verimliliği, kullanılan fermantasyon yönteminin tipine (SSF (Katı hal fermantasyon) veya SMF (Batık fermantasyon)), işlem sıcaklığına, ortamın pH'ına, verilen besin kaynağına ve fermantasyon süresine bağlıdır. Bu parametrelerin ve optimizasyonu ve uygun şekilde denenmesi, yüksek verimde enzim üretimi seviyesine ulaşmak için önemlidir. Enzimlerin yiyecek ve içecek, kimya ve ilaç endüstrilerindeki çeşitli uygulamaları nedeniyle biyoteknolojik açıdan optimum koşullarda üretilmesi endüstriyel açıdan önem taşır. Enzim üretiminde uygun biyoreaktörün seçimi ekonomik açıdan değerlidir. Biyoreaktörlerin tasarımı, substratın enzim ile etkileşimi, hava, düşük köpüklenme, düşük kayma gerilimi, yeterli kütle transferi, minimum enerji ve su tüketimi ile verimli bir şekilde karıştırılmasını sağlanmasında kritik bir husustur (Tarafdar vd., 2021).

Biyoreaktörde yüksek protein üretimi için büyüme ortamı formülasyonunun belirlenmesi önemlidir. Besiyerinin türü (Luria-Bertani (LB) besiyeri, Terrific besiyeri (TB), Süper besiyeri ve M9 minimal besiyeri) ve bir besiyerindeki bileşenler (maya ekstraktı, pepton, glukoz, gliserol, sodyum ve magnezyum klorür) üretim verimliliğini etkilemektedir. Genellikle besiyerinde maya ekstraktı ve hidrolize protein içerenlerin tercih edilmektedir. Besiyeri formülasyonlar için bir nitrojen kaynağına ve karbon-enerji kaynağına (glukoz, gliserol veya diğer şekerler) ihtiyaç duyulur. Bu sebeple TB ve LB, rekombinant protein üretimi için en verimli besi ortamı kabul edilmiştir (Packiam vd., 2020). Üretimi verimliliğini etkileyen etmenlerden biri de indükleyicinin tanımlanmasıdır. İzopropil β -D-1-tiogalaktopiranosid (IPTG) indüklemeye en yaygın kullanılan indükleyicidir. Plazmit tasarımı sırasında indükleyicinin tasarlanan vektörle birlikte seçilmesi verimlilik açısından önem taşır. Üretim ortamındaki indükleyici konsantrasyonu da proteinlerin ekspresyonunda

hayati öneme sahiptir. Aşırı indükleyici konsantrasyonu, toksik etkileri nedeniyle hücre büyümesinin azalmasına neden olabilir, düşük indükleyici konsantrasyonu ise verimsiz indüksiyona sebep olarak rekombinant protein verimini önemli derecede düşürebilmektedir (Akmayan, 2023; Jayakrishnan vd., 2024). Diğer önemli bir etmende indüksiyon süresidir. İndüksiyon süresi, üretim ortamında bulunan ve rekombinant proteinlerin çözünür ekspresyonunu kolaylaştırabilen hücrelerin yoğunluğunu belirler. İndüksiyon süresi ve indüksiyon sonrası inkübasyon sıcaklığı da verimli rekombinant protein üretiminde önemli bir rol oynar. İndükleme sonrasında sıcaklık oranı, protein sentez hızının stabil tutulmasında ve inklüzyon cisimciklerinin oluşumunun engellenmesinde önemlidir (Jayakrishnan vd., 2024).

1.2 Nanomateryaller

Nanoteknoloji, iyi geliştirilmiş ve yüksek performanslara sahip ürünler üretme konusunda büyük potansiyele sahip tasarlanmış nanomateryaller sunan, güncel teknolojinin en iyi örneklerinden biridir. Nanoteknoloji alanında önemli yeri olan nanomalzemeler en az bir boyutu 1 ila 100 nm aralığında olan çok fazla örneğe sahip olan malzeme grubudur. Nanomalzemelerin akılcı tasarımıyla yüksek yüzey alanları elde edilebilir. Nanomalzemeler, benzer yapıdaki diğer malzemelerden önemli seviyede farklı olan olağanüstü optik, manyetik, mekanik, elektriksel ve katalitik özelliklere sahip olarak elde edilebilir. Nanomalzemelerin özellikleri, şekil, boyut, sentez koşulları ve uygun işlevselleştirmenin dikkatli biçimde kontrol edilmesi yoluyla istenilen şekilse ayarlanabilir. Nanomalzemeler yüzey kaplamalarında, çizilmez boyalarda, elektronikte, çevre iyileştirmede, kozmetikte, spor ekipmanlarında, enerji depolama cihazlarında ve sensörlerde önemli ticari rolleri üstlenmektedirler. Nanomalzeme ailesi; ultra ince 2D yapıları nanomalzemeleri, karbon bazlı nanomalzemeleri, çekirdek-kabuk malzemeleri, nanogözenekli malzemeleri ve metal bazlı nanomalzemelerinden oluşur. Bu yapılar arasında karbon bazlı nanomalzemeler, fullerenler, karbon bazlı kuantum noktaları, karbon nanotüpler, karbon nanohornlar ve grafenden oluşan önemli bir nanomateryal sınıfıdır. Bu malzemelerin yüzeyleri, çeşitli uygulamalara yönelik yapısal özelliklerini düzenlemek için işlevselleştirilebilir. Grafen ve karbon nanotüpler, karbon bazlı nanomalzemeler ailesinin en değerli üyeleridir ve yüksek yüzey alanları, hızlı

yük transfer özellikleri ve yüksek mekanik mukavemetleri nedeniyle çeşitli uygulamalarda kullanımı için önemli çalışmalar yürütülmektedir (Baig vd., 2021).

1.2.1 Grafen Nanomateryaller

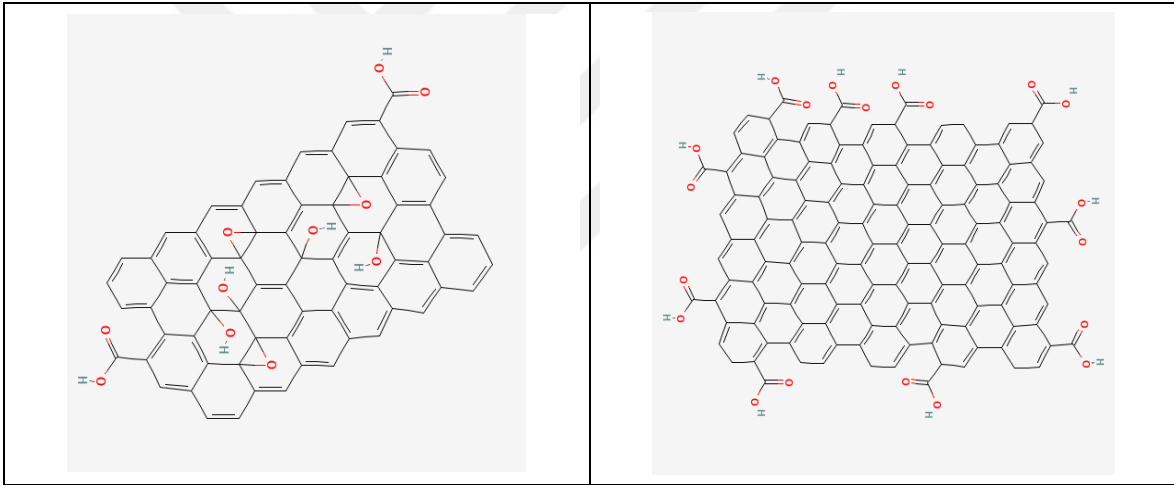
Grafen nanomateryaller (GFN'ler) temel olarak katman sayısı, kimyasal özellikler, yanal boyut, bileşim, kusur yoğunluğu, sertlik, saflık ve kaliteye göre sınıflandırılır. GFN'ler, grafen nano tabakalar, tek katmanlı grafen, birkaç katmanlı grafen, ultra ince grafit, grafen oksit (GO) ve indirgenmiş grafen oksit (rGO) içerir. Biyolojik tepkileri etkileyebilen farklı fizikokimyasal özellikler taşırlar. GFN'ler arasında özellikle GO ve rGO, biyolojik uygulamalar için detaylı bir şekilde geliştirilmiştir (Heidari vd., 2022; Zhou vd., 2021). Günümüzde, GFN aracılı elektrotlar üzerindeki immobilize enzimler, yakıt, klinik, çevresel ve gıda numunelerindeki çeşitli bileşikler tespit etmek için çeşitli biyosensör türlerinde başarıyla uygulanmıştır (Adeel vd., 2018). Ayrıca atık sularda boya giderimine yönelik L-histidin bağlanmış GO-Fe₃O₄ nanokompozitlere enzim immobilizasyonu çalışması yapılmış ve boya giderimde olumlu etkileri gözlemlenmiştir (Akkoyun, 2019). Balık etindeki ksantin belirlenmesi için amperometrik bir biyosensör cihazı oluşturmak amacıyla grafen bazlı hibrit nanomateryale (rGO-CMC) ksantin oksidaz enziminin kovalent immobilizasyonu yapılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Borisova vd., 2016).

1.2.1.1 Grafen Oksit ve İndirgenmiş Grafen Oksit

Grafen oksit (GO) polimerler, küçük moleküller, inorganik nanopartiküller (NP'ler) ve biyolojik makromoleküller gibi harici fonksiyonel grupların kullanımı olmadan bağlanması için birçok reaktif bölge sağlayan, yüzeyinde oksijen içeren gruplar bulunan oksitlenmiş grafen katmanlarından oluşan katmanlı yapılardır. Grafen oksit (GO), yüksek biyoyumluluğa ve güçlü mekanik sertliğe sahip bileşiklerdir. Yapısal olarak GO, pi bağları ile birbirine bağlanan grafen tabakasının oksijenle süslenmiş petek kafesi olarak tanımlanır. GO biyosensörler, biyoyakıt hücreleri, hücre sel görüntüleme ve ilaç dağıtımı gibi farklı biyoteknolojik uygulamalarda enzim immobilizasyonu için bir matris olarak kullanılmıştır. Ayrıca GO'nun protein adsorpsiyon kapasitesi, diğer geniş yüzey alanlı karbonlu materyallere göre çok daha yüksektir (Adeel vd., 2018; Bolibok vd., 2017; Soozanipour ve Taheri-Kafrani, 2018; Wang vd., 2021).

Grafen oksit, kimyasal olarak değiştirilmiş grafenin öncüsü olarak daha çok bildirilen ve araştırılan grafenle ilgili bir malzemedir. Grafen oksit kolayca bulunabilen ucuz grafit tozundan sentezlenir. Grafen oksit karboksil, hidroksil, epoksi ve karbonil grupları gibi birçok oksijen bulunduran fonksiyonel gruba sahiptir. Grafen oksidin taban düzlemi genellikle epoksit ve hidroksil gruplarını, kenarları ise karboksil ve karbonil bazlı fonksiyonel gruplarını bulundurur. Grafen oksitte aktif fonksiyonel grupların bulunması, birçok endüstriyel uygulamaların gerçekleştirilmesi için küçük organik bileşikler, farklı polimerler ya da diğer nanomateryaller ile daha fazla işlevselleştirilmesini sağlar. Grafen oksit, yapısında bulundurduğu oksijen işlevselliğinden dolayı yalıtkandır ve zayıf elektrokimyasal performans gösterir (Baig vd., 2021).

Tablo 1.2.1.1: Grafen Oksit (GO) ve indirgenmiş Grafen Oksit (rGO) 2D yapısı (NCBI).



rGO (indirgenmiş grafen oksit) genellikle GO tabakalarının indirgenmesiyle meydana gelir. Bu yöntem, karbon ağındaki hataları ortaya çıkarır, su dağılabilirliğini ve yüzey yükünü düşürür. Ancak yapıyı ve elektrik iletkenliğini yüksek ölçüde korur. GO, rGO'dan daha düşük elektrik iletkenliğine sahiptir. Bu nedenle elektrokimyasal uygulamalar ve biyosensörler için kimyasal indirgeme ile iletkenliğini geri kazanmak daha iyidir. rGO ve enzimler arasındaki çoğu etkileşim, hidrofobik etkileşimler yoluyla meydana gelir. rGO, yüksek biyoyumluluk, aşırı mekanik esneklik, yüksek yüzey alanı, düşük üretim maliyeti ve elektrik iletkenliği gibi farklı özellikleri sebebiyle elektrokimyasal algılarda önemli yere sahiptir. Geçmişte rGO biyosensör olarak dopamin, kortizol hormonu, kanser biyobelirteçleri, insan T-lenfotropik virüs-1 (HTLV-1), glukoz ve DNA biyobelirteçleri olarak kullanılmışlardır. İndirgenmiş grafen oksit, çeşitli elektrokimyasal cihazların

performansını yükseltmede yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bu yapının elektrokimyasal aktivitesi, geliştirilmiş performansa sahip elektrokimyasal cihazların üretilmesini sağlayacak seviyede yüksektir (Baig vd., 2021; Mohd Razib vd., 2021; Soozanipour ve Taheri-Kafrani, 2018).

1.2.2 Nanomateryaller ve Enzimler

Nanoteknoloji malzeme bilimi, fizik, kimya, biyoloji, biyokimya ve diğer mühendislik alanlarından gelen oldukça disiplinlerarası bir bilimdir. Günümüzde bilim özellikle tamamı nano ölçekli yeni fonksiyonel malzemelerin, cihazların ve sistemlerin araştırılmasına ve geliştirilmesine yönelmektedir. Nanomateryaller en az bir kritik boyutu 100 nm'den küçük olan malzemelerdir. Genellikle yapısal olarak kendilerinden büyük olan maddelerden daha fazla aktiftirler ve artan elektriksel iletkenlik, yüksek yüzey-hacim oranı, yüksek katalitik aktivite ve üstün manyetik özellikler gibi önemli özellikler sağlayabilirler. Geniş yüzey alanına sahip olması ve farklı fonksiyonel gruplar tarafından kolay modifiye olması, etkili biyomolekül immobilizasyonu sağlayacağı anlamına gelir. Ayrıca bu malzemeler biyoalgılama uygulamalarında yüksek talep görmektedir. Son yıllarda, nanoyapılı malzemeler biyoanalitik ve analitik bilimleri önemli seviyede değiştirmiştir. Nanomalzemeler, bu bilim alanlarının yanı sıra nanokataliz, entegre kataliz, enerji, yakıt, depolama, endüstriyel atık arıtma, enerji dönüşümü, gıda, biyomühendislik ve biyotıp gibi çok çeşitli endüstriyel alanlara yayılmıştır (Batool vd., 2019; Cavalcante vd., 2021).

Nanomateryallerin potansiyel çok yönlülüğü ve sayısız uygulamalarının etkisiyle bu alanda yeni çalışma alanları ortaya çıkmıştır. Bu yapılar halihazırda cerrahi nanomalzemeler, biyolojik cihazlar ve nanoelektronik biyosensörlerin geliştirilmesinde ve ayrıca biyolojik olarak çalıştırılan makineler gibi moleküler nanoteknolojideki diğer olası uygulamaların geliştirilmesinde kullanılmaktadır. Kullanım amacı hastalıkların teşhisi, izlenmesi, kontrolü, önlenmesi ve tedavisi için nano ölçekli materyallerin kullanılmasıdır. Bu amaç doğrultusunda nanomateryaller destekleyici yapılar olarak enzim tabanlı biyosensörlerde kullanılmaktadır. Enzimlerin biyosensör üzerine immobilizasyonunda destek materyali olarak etkilidir ve birçok durumda enzimlerin çeşitli özelliklerini geliştirerek onlara artan aktivite, pH direnci ve termal stabilite kazandırabilirler. Enzimleri immobilize etmek için bir destek olarak nanomateryallerin kullanılması bu işlemlerde yer alan enzimlerin çeşitli

özelliklerini iyileştirdiği birçok çalışmada belirtilmiştir. Bunlardan Xing ve diğerlerinin yaptığı çalışmaya göre, APTES (3-aminopropiltrioksilan) ile modifiye edilerek glutaraldehit ile aktive edilmiş manyetik nanopartiküller üzerinde *Candida antarctica*'dan elde edilen lipaz B enziminin immobilizasyonu denenmiştir. Bu biyokatalizörler kinetik çözünme reaksiyonlarında kullanıldığında %99 oranından daha yüksek enantiyomerik fazlalığa sahip bir ürün elde edilmiştir. Yalnızca enzim kullanıldığında elde edilen sonuçla karşılaştırıldığında, çok büyük farkın olduğu görülmüştür. Bu durum, enzimin desteğe immobilize edilip daha sonra yeniden kullanılmasının enzim açısından önemli sonuçlar ortaya çıkardığını göstermektedir (Cavalcante vd., 2021; Xing vd., 2019; Zhu vd., 2015).



2. LİTERATÜR ÖZETİ

Grafen oksit (GO) yüksek biyoyumluluğa ve güçlü mekanik sertliğe sahip bileşiklerdir. Zengin karboksil fonksiyonel grupları, geniş yüzey alanı ve yüksek suda çözünürlüğünden dolayı proteinlerin veya enzimlerin immobilizasyonu için ideal bir taşıyıcıdır. Ayrıca GO'nun protein adsorpsiyon kapasitesi, diğer geniş yüzey alanlı karbonlu materyallere göre çok daha yüksektir (Bolibok vd., 2017; Wang vd., 2021).

Son yıllarda enzim aktivitesini ve stabilitesini artırmaya yönelik GO destekli çalışmalar literatür önemli yer edinmiştir.

- Patila vd. tarafından yılında yayınlanan makalede GO, protein molekülleri ile elektrostatik etkileşimler yoluyla güçlü bir şekilde etkileşime girerek çok kararlı konjugatları oluşturabileceğini bildirmişlerdir (Patila vd., 2016).
- Zhang vd. tarafından yayınlanan araştırmada GO'ın indirgeme derecelerinin glukoz tespiti üzerindeki etkisini araştırmışlardır ve kısmen indirgenmiş GO'nun yüzey fonksiyonel gruplarının GOx (Glukoz oksidaz) absorpsiyonu için faydalı olduğunu, yüksek oranda azaltılmış GO'nun ise hızlı elektron transferine yardımcı olduğunu ortaya çıkarmışlardır (Zhang vd., 2014).
- 2012 yılında American Chemical Society Nano dergisinde yayınlan çalışmada, GO ve enzimler arasındaki etkileşimlerle ilgili olarak, birkaç çalışmada, çoğunlukla biyoalgılama için glukoz oksidaz, hemoglobin ve yaban turpu peroksidaz dahil olmak üzere çeşitli enzimlerin immobilizasyonu için kullanılmış etkili bir matris olarak rapor edilmiştir (Jin vd., 2012).
- Lin ve arkadaşları 2020 yılında enzim immobilizasyonu üzerine makale yayınlamışlardır. Çalışmada, lakkaz, kararlı ve güçlü nanobiyokatalizörler olarak indirgenmiş grafen oksit (rGO)/polimer veya fGO (terminal amin grupları ile işlevselleştirilmiş grafen oksit) üzerinde immobilize etmişlerdir ve immobilizasyonun umut verici biyokatalitik davranış sergilediği görülmüştür (Lin vd., 2020).
- Başka bir çalışmada ise GO'nun belirli bölgelerde GOx'u etkili bir şekilde immobilize edebildiğini ve glukozun katalitik reaksiyonunu büyük ölçüde hızlandırabildiğini bildirilmiştir (Sumaryada vd., 2019).
- 2021 yılında Brazilian Journal of Chemical Engineering dergisinde yayınlanan çalışmada GDH'ın Fe₃O₄-SiO₂-GO kompozitleri ile immobilizasyonu sonrası

%92'lik bir hareketsizleştirme verimi ve %91'lik aktivite geri kazanımı elde edilmiştir. 25 döngüden sonra immobilize GDH başlangıç aktivitesinin %50'si olarak kalmıştır (Wang vd., 2021).

- GDH'ı immobilizasyonu üzerine yapılan bir diğer çalışmada ise GDH'yi hareketsiz hale getirmek için hiyerarşik olarak gözenekli silika desteği (MM-SBA-15) kullanılmıştır, ancak 10 döngüden sonra yalnızca ~%10 aktivitesinin kaldığı görülmüştür (Solé vd., 2019).
- 2011 yılında yapılan bir çalışmada grafen oksit α -kimotripsin üzerinde inhibitör etkisinin olduğu görülmüştür (De vd., 2011).
- Liu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada grafen oksit, in vitro inkübasyon deneylerine uygun olarak esas olarak hidrojen bağı yoluyla α -amilazın amino asit kalıntılarına (yani His305, His299 ve Asp300) bağlanmıştır. α -amilazın nişastayı glukozu katalize etme yeteneği GO tarafından baskılandığı görülmüştür (Liu vd., 2023).
- Colloids and Surfaces B: Biointerfaces dergisinde yayınlanan çalışmada, grafen oksit ve indirgenmiş grafen oksit lizozim etkileşimi incelenmiştir. İnkübasyon sonrası hem GO hem de rGO'nun, büyük miktarlarda lizozim adsorbe ettiği görülmüştür. Grafen oksit, lizozim aktivitesini ciddi şekilde inhibe ettiği görülürken, indirgenmiş grafen oksit enzim aktivitesi üzerinde etkisinin olmadığı görülmüştür (Bai vd., 2017).

Yapılan literatür taramasından da görüleceği üzere grafen oksit destekleyici ajanının yüksek bağlanma kapasiteli, bağlandığı enzimin aktivitesini koruyan veya inhibe eden, enzimlerin tekrarlı olarak kullanımını artıran ve enzimlerin uzun ömürlü olmasını sağlayan önemli bileşiklerdir. Fakat günümüzde biyoteknoloji ve malzeme bilimi alanlarında kaydedilen ilerlemeye rağmen, grafen oksit gibi nanomalzemelerin biyofiziksel protein özellikleri üzerindeki etkisine ilişkin temel bilgiler hala yeterli düzeyde değildir. Ayrıca, çeşitli nano ve biyoteknolojik alanlarda enzimlerin potansiyel uygulamaları stabilite sorunları nedeniyle engellenmiştir ve üstesinden gelinmesi gereken kritik bir faktör olmaya devam etmektedir (Hernández-Cancel vd., 2015).

Dünya'da ve ülkemiz genelinde diyabet hastalığının insidansı günden güne artış göstermektedir. Bu hastalığın kontrolü ve takibi ilaç, biyosensörler veya glukometre

cihazları aracılığıyla yapılmaktadır. Günümüzde kandaki glukoz miktarının belirlenmesinde kullanılan glukometrelerde glukoz oksidaz enzimi, glukozun glukonik asit ve hidrojen peroksida oksidasyonunu sağlar. Oluşan hidrojen peroksit miktarı, kan örneğindeki glukoz konsantrasyonu ile doğru orantılı olduğundan HRP enzimi de kullanılarak kandaki glukoz oranı belirlenir. Fakat bu enzimlerin reaksiyon vermesi sırasında oksitlenme olduğu için enzimin aktivite oranı düşmektedir. Bu soruna yönelik glukoz dehidrojenaz enzimi glukometrelerde kullanılmaya aday enzimdir. Çünkü GDH enziminin aktivitesi yüksek ve birden fazla kofaktörle reaksiyon gösterebilmektedir. Bu enzim glukometrelerin ana bileşenlerini oluşturacak kapasiteye sahip bir türdür. Diyabet hastaları günlük olarak kan şekeri seviyesini ölçmede glukometre cihazına ihtiyaç duymaktadır. Tez çalışmasında bu ihtiyaca yönelik glukometrelerde kullanılmak üzere GDH enziminin rekombinant üretimi amaçlanmıştır. Ayrıca son yıllarda bazı nanoyapıların çeşitli enzim aktiviteleri üzerine etkileri rapor edildiğinden, bu çalışmada GDH enziminin aktivitesine yönelik etkilerini araştırmak için çeşitli nanoyapıların (GO, rGO, GO-Fe, GO-Pt, GO-Ni ve GO-Fe-Histidin) sentezi hedeflenmiştir.

3. MATERYAL VE METOT

Tez çalışmasının rekombinant enzim üretimi ve farklı nanoyapıların sentezi aşamalarında kullanılan materyal ve metotlar başlıklar altında verilmiştir.

3.1 Materyal

3.1.1. Deney Esnasında Kullanılan Cihazlar

Bu tez çalışmasında kullanılan cihazlar ve markaları Çizelge 3.1.1’de verilmiştir.

Tablo 3.1.1. Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar

Mevcut Altyapı/Ekipman	Marka
Biyoreaktör	Infrost
Fplc	Knauer
Yüksek Hızlı Santrifüj	Vs-30000i Vision
Liyofilizatör	Biobase
Çalkalamalı İnkübatör	Medfuture Mfi-S211c
Buz Makinesi	Scotsman AF 103
Spektrofotometre	Thermo Scientific
Santrifüj	Hettich Mikro 220R
Etüv	Memmert
Ph Metre	Hanna
Dikey Soğutucu +4°C	Uğur
Vorteks	Miulab Mix-25p
Elektroporator	Bio-Rad
Terazi	Weightlab Instruments
Saf Su Cihazı	Termoscientific Smart2pure
Manyetik Karıştırıcı	Velp Scientific
PCR Cihazı	Bio-Rad
İnkübatör	Memmert

SDS-PAGE Sistemi	Bio-Rad
Jel Görüntüleme Cihazı	Bio-Rad
-20°C Dondurucu	Arçelik
-80 °C Dondurucu	Thermo Scientific
Vakumlu Etüv	Clis Scientific

3.1.2. Deney Esnasında Kullanılan Kimyasallar

Bu tez çalışmasında kullanılan kimyasallar ve markaları Çizelge 3.2.'de verilmiştir.

Tablo 3.2.1. Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar

Kimyasal Adı	Cas. No	Marka
Agar	9002-18-0	Sigma
Agaroz	9012-36-6	Conda
Akrilamid-Bis 40%	79-06-1	Biobasic
Amonyum Persülfat	7727-54-0	Sigma
Ampisilin Sodyum Tuzu	7177-48-2	Biobasic
Asetik Asit	64-19-7	Isolab
Benzamidin Hidroklorit	1670-14-0	Biobasic
Bovine Serum Albumin	9048-46-8	Goldbio
Bromofenolblue	115-39-9	Sigma
Coomassie Brilliant Blue R-250 Dye	6104-59-2	Serva
Coomassie Brilliant Blue G-250	6104-58-1	Thermo Scientific
Disodyum Hidrojen Fosfat Dihidrat	7558-79-4	Sigma
Dimetil Sülfoksit (DMSO)	67-68-5	Tekkim
Etilendiamintetraasetik Asit (EDTA)	6381-92-6	Sigma
Etanol	64-17-5	Carlo Erba
Etidyum Bromür	1239-45-8	Sigma
Fenilmetilsülfonil Florür (PMSF)	329-98-6	Goldbio

Glasiyel Asetik Asit	64-19-7	Merck
Gliserol	56-81-5	Carlo Erba
Glisin	56-40-6	Isolab
Hidroklorik Asit	7647-01-0	Isolab
Hispur Ni-Nta Resin	64-17-5	Serva
İzopropil β -D-1-Tiyogalaktopiranosid (IPTG)	367-93-1	Goldbio
Kalsiyum Klorit Dihidrat	10035-04-8	Isolab
Kanamisin Sülfat	70560-51-9	Biobasic
Kloromfenikol	56-75-7	Biobasic
LB Broth	(91079-40-2; 8013-01-2; 7647-14-5)	Neogen
LB Agar	(91079-40-2; 8013-01-2; 7647-14-5; 9002-18-0)	Neogen
L-Histidin	71-00-1	Tci
Magnezyum Klorid Hekzahidrat	7791-18-6	Isolab
Maya Ekstraktı	8013-01-2	Sigma
Pepton	91079-40-2	Merck
Potasyum Dihidrojen Fosfat	7778-77-0	Isolab
Sodyum Dodesil Sülfat	151-21-3	Biobasic
Sodyum Hidroksit	1310-73-2	Merck
Sodyum Klorür	7647-14-5	Tekkim
Sükroz	57-50-1	Merck
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	110-18-9	Serva
Tris	77-86-1	Serva
Tris-HCl	1185-53-1	Serva
β - Merkaptotanol	60-24-2	Sigma
Sodyum Borhidrid	16940-66-2	Sigma
Demir (III) Klorit Hekzahidrat	10025-77-1	Sigma
Potasyum tetrakloro platinat (II)	123-54-6	Stream Chemicals
Nikel (II) Klorit	7718-54-9	Sigma

3.1.3. Kullanılan Çözeltiler

LB çözeltisi:

40.0 g Luria-Bertani Broth (LB Broth) 1000 ml suda çözdürülmüştür. Hazırlanan besiyeri çözeltisi her şişede 250'şer ml olacak şekilde üç tane stok şişesine alınmıştır. Ardından üzerine 3.75 g agar eklenerek karıştırılıp 121°C sıcaklıkta 15 dakika otoklavlanmıştır. Kalan LB çözeltisi her tüpe 4 ml ve her erlene 50 ml olacak şekilde konularak erlenlerin üst kısımları alüminyum folyo ile kapatılarak 121°C sıcaklıkta 15 dakika otoklavlanmıştır.

Kloromfenikol Çözeltisi:

64.0 mg kloromfenikol 2.0 ml etanolde çözülmüştür. Ardından 0.20 µm'lik filtreden geçirilerek sterilizasyonu yapılmıştır.

Kanamisin:

0.25 g kanamisin antibiyotiği alınarak 5.0 ml saf suda çözdürüldü ve 0.20 µm'lik filtreden geçirilerek sterilize edildi. Ardından steril ependorf tüplerine bölünerek -20°C'de saklandı.

IPTG:

1.3 g IPTG tartılarak 13.0 ml steril suda çözüldü ve steril 0.20 µm'lik filtreden geçirilerek mikrotüplere paylaştırıldı ve -20°C'ye kaldırılmıştır.

PMSF:

1500 µg PMSF 10 ml etanol ile çözdürülmüştür.

FSB çözeltisi:

50.0 g gliserol, 3.25 g Kalsiyum klorot dihidrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 3.7 g Potasyum klorür (KCl) alınarak 250 ml saf suda çözülmüştür. Çözelti pH'ı 10.0 ml (1M, pH:7.5) KCH_3COO (Potasyum asetat) alınarak pH:6.5'e ayarlanarak hacim 500 ml'ye tamamlanmıştır ve otoklavlanmıştır.

SDS -PAGE Elektroferez Jeli:

Üst Tampon: 4.0 g SDS (%0.4), 60.5 g Tris (1.5 M), 1000 ml saf suda çözdürülerek tampon pH'6.6 olarak ayarlandı.

Alt Tampon: 182.0 g Tris (1.5 M), 4.0 g SDS (%0.4) 1000 ml saf suda çözülerek pH:8.8 olarak ayarlanmıştır.

Yükleme jeli: 1.0 ml üst tampon, 0.35 ml %40 akrilamid, 2.55 ml su, 50.0 µl %10 APS ve 10.0 µl TEMED. Tüm maddeler katılmıştır ve en son TEMED ve APS eklenerek jel hazırlık sistemine döküldü. Yürütme jeli polimerleştikten sonra üzerine yükleme jeli döküldü ve polimerleşmesi beklenmiştir.

Yürütme jeli: 2.7 ml %40 akrilamid, 2.25 ml alt tampon, 4.0 ml su, 50.0 µl %10 APS ve 20.0 µl TEMED.

Elektroferez Tamponu (1X): 14.4 g Glisin, 3.0 g Tris, 1.0 g SDS bileşikleri son hacim 1000 ml olacak şekilde saf su eklenerek hazırlanmıştır.

SDS Örnek Yükleme Tamponu (5X): 0.6 ml 1M Tris-HCl (pH 6.8), 5 ml gliserol (%50), 2 ml %10'luk SDS, 0.5 ml β-ME (β- Merkaptoetanol), 1 000 µl %1' lik bromfenol mavisi ve 0.9 ml saf su karışımından hazırlanmıştır.

Destaining Çözeltisi: 250 ml metanol, 50.0 ml asetik asit ve kalan hacim saf su karışımıyla 500 ml'ye tamamlanmıştır

Staining Çözeltisi: Coommasie Brilliant Blue R-250'de 0.5 g alınarak 250 ml metanol içerisinde çözülüp filtre kâğıdından süzümüştür. Ardından karışımın üzerine 50.0 ml asetik asit eklendi ve 200 ml saf su ile hacim 500 ml' ye tamamlandı.

Amonyum Persülfat (APS-%10): APS'den 0.2 g alınarak 2.0 ml saf su içerisinde çözülerek hazırlandı.

Afinite Kromatografiyle Saflaştırmada Kullanılan Cözeltiler:

Lizis tamponu: (20 mM TRIS, 100 mM NaCl): 2.42 TRIS, 5.84 NaCl 1000 ml distile suda çözdürüldü.

Elüsyon tamponu (Elution Buffer): 10.2 g imidazol (300 mM), 2.92 g NaCl (100 mM), 1.22 g TRIS (20 mM TRIS) 500 ml distile suda çözdürüldü.

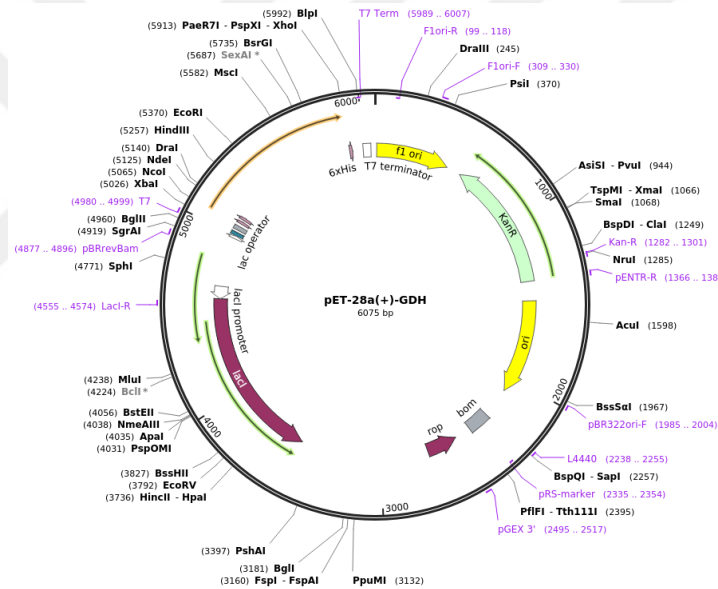


3.2. Yöntem

3.2.1. Rekombinant Enzim Üretimi

3.2.1.1. Hedef Genin ve Uygun Vektörlerin Belirlenmesi

GDH enzimini kodlayan farklı organizmalara ait gen dizisi literatür taramaları yapılarak yüksek aktivite gösteren enzimler incelenmiştir. Bu doğrultuda seskiterpenlerin in vitro sentezine yönelik biyosentez yaklaşık on enzim içerisinde bulunan GDH enziminin ilgili yolakta NADPH+H üretimine yönelik yüksek aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Ticari olarak elde edilen gen dizisini içeren pET-28a(+)-GDH plazmidini (Şekil 3.2) transformasyon çalışmalarında kullanılmıştır.



Şekil 3.2: pET-28a(+)-GDH vektörünün dairesel haritası

```
ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGTATAC
AGATTTAAAAGATAAAGTAGTTGTAATTACAGGTGGATCAACAGGTTTAGGACGTGCAATGGCTGTTTC
GTTTCGGTCAAGAAGAAGCAAAAAGTTGTTATTAACATATTACAACAATGAAGAAGAAGCTTTAGATGCG
AAAAAAGAAGTAGAAGAAGCAGGCGGACAAGCAATCATCGTTCAAGGCGACGTAACAAAAGAAGAAGA
CGTTGTAAACCTTGTTCAAACAGCTATTAAGAATTCGGAACATTAGACGTTATGATTAATAACGCTG
GTGTTGAAAACCCAGTTCCTTCTCATGAGCTATCTTTAGACAACCTGGAACAAAAGTTATTGATACAAAC
TTAACAGGTGCATTCTTAGGAAGCCGTGAAGCAATTAATATTTTCGTTGAAAATGACATTAAGGAAA
CGTTATTAACATGTCCAGCGTTCACGAAATGATTCCCTTGCCATTATTTGTTTCACTACGCAGCAAGTA
AAGGCGGTATGAAACTAATGACGGAAACATTGGCTCTTGAATATGCGCCAAAAGGTATCCGAGTAAAT
AACATTGGACCAGGTGCGATGAACACACCAATTAACGCTGAAAAATTCGCTGATCCTGTACAACGTGC
AGACGTAGAAAGCATGATTCCAATGGGTACATCGGTAAGCCAGAAGAAGTAGCAGCAGTTGCAGCAT
TCTTAGCATCATCACAAGCAAGCTATGTAACAGGTATTACATTTATTTGCTGATGGTGGTATGACGAAA
TACCCTTCTTTCCAAGCAGGAAGAGGCTAA
```

Şekil 3.2: pET-28a(+)-GDH enzim genin nükleotid dizisi

3.2.1.2. GDH Geni Taşıyan Vektörün *E. coli* DH5α Hücrelerine Transformasyonu

Yapısında GDH enzimi genini bulunduran plazmiti çoğaltmak için plazmit *E. coli* DH5α bakteri suşuna aktarılmıştır. *E. coli* DH5α bakterilerine transforme edilen plazmit kanamisin antibiyotik içeren besiyerlerine yayma ekim yapılarak 37°C’de bir gece inkübe edilmiştir. Üreme sonucu elde edilen kolonilerden bir tane alınarak içeriğinde kanamisin antibiyotiği bulunduran 4.0 mL’lik sıvı besiyerine konularak 37°C’de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Üreme gözlemlenen kültürlerden 2-5 ml alınarak plazmit DNA saflaştırma kiti yardımıyla plazmid DNA saflaştırılmıştır.

GDH enzimi gen dizisini yapısında bulunduran plazmidin *E. coli* bakterisine aktarımı için öncelikle bakteriler kompetent hale getirildi. Petri besi ortamındaki *E. coli* (BL21(DE) pLysE ve DH5α ve) kültüründen tek koloni alınarak 4.0 ml LB besi yeri içeren cam tüplere ekim yapıldı. Cam tüpler ve 37°C’de, 12-16 saat 240 rpm inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında kültürden 100.0 µL alınarak içerisinde 50.0 mL LB bulunan 250 mL’lik steril erlenlere ekim yapılarak 240 rpm’de ve 37°C inkübasyona bırakıldı. Her 30 dakikada bir 600 nm’de optik dansite (OD) kontrol edildi. Ardından yaklaşık 3 saat sonra absorbans yaklaşık olarak 0.7 olduğunda erlen inkübatörden alındı ve 5000 rpm’de, +4°C’de, 10 dakika santrifüjlendi. Süpernatant uzaklaştırıldı, pellet üzerine FSB (dondurulmuş saklama tamponu) çözeltisinden 50.0 mL eklenerek pellet tamamen çözününceye kadar vortekslenmiştir. Sonra 1 saat buz banyosunda inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra 4000 rpm’de, +4°C’de 10 dakika santrifüjlendi. Süpernatant uzaklaştırılarak oluşan pellet üzerine 8.0 mL soğuk FSB çözeltisi eklenerek vortekslemeden nazikçe çözdürülmüştür. Pelletin tamamı çözüldükten sonra üzerine 560.0 µL DMSO eklenerek yaklaşık 2-3 saat buza gömülü şekilde inkübe edilmiştir. İşlemler sonucunda transformasyon için hazır olan bakteriler küçük ependorf tüplere alınarak -80°C’de stoklanmıştır.

Transformasyona hazır hale getirilmiş buz banyosu içindeki kompetent bakteri kültüründen 200 µL alınarak ependorf tüplerine pipetleme yapılmıştır. Üzerine 2-3 µL plasmid DNA eklenerek hassas bir şekilde karıştırılıp 1 saat buz banyosunda inkübe edilmiştir. Ardından 42°C’de 2 dakika ısıya maruz bırakılıp, tekrar buza gömülerek 5 dakika inkübasyon yapılmıştır. Daha sonra hücreler antibiyotikli LB agarlı petriye yayma yöntemi ile ekildi ve 37°C’de 16 saat inkübasyona bırakıldı ve plazmit DNA’lar saflaştırılmıştır (Hao vd. 2020). GDH enzim gen dizisini taşıyan plazmidin çok sayıda kopyası elde edildikten sonra aynı

işlem ekspresyon/üretim aşaması için *E. coli* BL21(DE3) pLysE bakteri suşuna transforme edilmiştir.

3.2.1.3. GDH Enziminin Ekspresyonu

Transformasyon işlemi tamamlandıktan sonra koloni oluşumu görülen BL21(DE3) pLysE kültüründen bir koloni alındı; içerisinde antibiyotik bulunan 4.0 mL lik steril LB bulunan tüplerine ekim yapıldı. Sonra 37°C'de , 250 rpm'de de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Ardından 600 mL besi yeri içeren 2L'lik antibiyotikli erlenlerde inoküle edilen kültürler, 37°C, 240 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır. Sonrasında belirli aralıklarla kültürden örnekler alınarak 600 nm'de spektrofotometrik ölçümler yapıldı, OD değeri yaklaşık 0.5-0.7 ye geldiğinde erlenlerdeki kültür ortamına 1M IPTG ilavesi ile BL21(DE) pLysE *E. coli* hücreleri indüklenmiştir. Kültürler aynı koşullarda 3-4 saat tekrar inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra 250.0 mL'lik tüplerinde +4 °C'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonucu elde edilen peleteki *E. coli* BL21(DE3) pLysE hücreleri saflaştırma işlemlerinde kullanılmak üzere -20 °C'de saklanmıştır (İbrahim vd., 2018). Daha sonra farklı kültür koşullarının (sıcaklık, IPTG konsantrasyonu, indüksiyon zamanı ve O.D değerleri) hedef proteinin ekspresyonu üzerine etkileri incelenmiştir. Bu kültür koşullarında elde edilen sonuçlara göre biyoreaktörde üretime geçilmiştir.

3.2.1.4. GDH Enziminin Biyoreaktörde Üretimi

Daha önce transformasyonu yapılan bakteri kültürleri, içerisinde kanamisin (50 µg/mL) bulunan LB agar petrilere yayma ekim yapılarak 37°C'de gece boyunca inkübasyona bırakılmış ve inkübasyonun ardından petriden tek koloni alınarak 4 mL LB Broth besiyerine ekimi yapılarak 37°C'de ve 240 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır. Sıvı besi ortamında büyütülen kültürden 3 mL alınarak, iz elementlerin yanında temel besi yeri olarak 30 g yeast ekstrakt, 30 g pepton ve 30 gr NaCl içeren biyoreaktör tankında (3 L) yaklaşık 3 saat inoküle edilmiştir. Biyoreaktörde üretime yönelik sıcaklık 32°C, karıştırma hızı: 300 rpm min⁻¹, pH:7.0, pO₂: % 40, ve oksijen akışı: 1.00 L min⁻¹ çalışma koşulları sabit tutularak çalışma gerçekleştirilmiştir. Hücre konsantrasyonunun optik dansitesi spektrofotometrik olarak 600 nm'de ölçülerek takip edilmiştir. Ölüm fazına geçiş öncesi, O.D: 3.26 değerindeyken hücreler hasat edilmiştir. Ardından hücreler saflaştırma işlemlerinde kullanılmak üzere santrifüj edilerek toplanarak -20°C'de saklanmıştır.

3.2.1.5. Enzimin His-tag Afinitite Kromotografisi ile Saflaştırılması

Üretim sonucu elde edilen, -20 °C’de bulunan indüklenmiş haldeki *E. coli* bakteri pelleti buza gömülü halde bekletilmiştir. Pelleti süspansiyon haline getirmek üzere 10.0 mL 100 mM Tris/HCl (pH = 7.5) tamponundan eklenerek süspansiyon haline getirilmiştir. Süspansiyona 100.0 µL 100 mM benzamidinden eklenip vortekslendikten sonra tekrar üzerine 100.0 µL 100 mM PMSF’den eklenerek buz üzerinde bekletilmiştir *E. coli* BL21(DE3) pLysE süspansiyonu buza gömülü halde 6 mm ucu olan sonikatör yardımıyla 1 saat parçalama işlemi gerçekleştirilmiştir. Parçalanmayan bakterileri ayırmak amacıyla ve 6000 rpm’de ve +4 °C’de 10 dakika santrifüj yapılmıştır. Süpernatant temiz bir tüpe alınmıştır. Pellet üzerine 10.0 mL Tris/HCl (pH = 7.5) tamponundan eklenerek önceki işlemler tekrar edilmiştir. Bu şekilde devam eden işlemlerin ardından parçalanmış bakterileri içeren süpernatantlar birleştirilmiştir. Bu işlemleri takiben süpernatant +4°C’de, 30 000 rpm’de 1 saat santrifüj yapıldı ve istenmeyen materyaller çöktürülerek kromotografi uygulanacak kısımdan ayrıştırılmıştır.

Saflaştırmanın gerçekleştirileceği polikarbonat kolona “Qiagen Ni-NTA agaroz Protein Purification Resin” reçineden üretim hacmine göre konulduktan sonra, kolon 50 mL Tris/HCl (100 mM, pH = 7.5) tamponuyla yıkanmıştır. Santrifüj sonrasında elde edilen süpernatant kolona tatbik edildi ve kolondan gelen bütün fraksiyonlar toplanmıştır. Protein yüklenmiş kolon 50 mL Tris/HCl (100 mM, pH = 7.5) tamponuyla yıkanmıştır. Ardından kolon 50 mL 25 mM imidazol içeren Tris/HCl (100 mM, pH = 7.5) tamponuyla yıkanarak kolonda tutunmuş histidince zengin diğer proteinlerden yırtılmıştır. Daha sonra 300 mM imidazol içeren, Tris/HCl (100 mM Tris/HCl pH = 7.5) tamponuyla kolona tutunmuş olan protein 1’er mL’lik fraksiyonlar halinde 5.0 mL ile elüe edildi ve bütün fraksiyonlar toplanarak +4°C’de saklanmıştır. Kolondan elüe edilen her fraksiyondan alınan numuneler SDS-PAGE’de analiz edilmiştir (Hao vd., 2020; Ibrahim vd., 2018).

3.2.1.6. UV-Spektrofotometre, SDS-PAGE Analizi

Saflaştırılan proteinler ilk olarak UV spektrofotometrede A₂₈₀’de konsantrasyonu belirlenmiştir. SDS-PAGE %15’lik poliakrilamitte Laemmli metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Laemmli 1970). Toplanan her fraksiyondan ve yıkama sonrası elde edilen çözeltilerden alınan 100 µl’lik numuneler 100 µl Commasie Brilliant Blue-R250

mavisi içeren jel yükleme tamponuyla karıştırılıp, 100°C'de 2 dakika denatüre edilerek önceden hazırlanan SDS-PAGE jelinin kuyucuklarına 10'ar µl yüklenir. Proteinler yüklendikten sonra boya ayırma jelinden uzaklaşmaya kadar 100 mA'de yürütülür. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra üst jel atılır ve ayırma jeli Coomassie brilliant blue R-250 içeren jel boyama solüsyonu (staining) eklenir. Yavaş şekilde çalkalanarak 10- 15 dk bekletilir. Boyanan jelden boya uzaklaştırma çözeltisi (destaining) ile uzaklaştırıldıktan sonra oluşan bantlar görüntülenir.

3.2.1.7. Saflaştırılan GDH Enziminin Aktivite Ölçümü

GDH enziminin aktivitesi, Glucose Dehydrogenase Assay Kit (Colorimetric) (ab102532) isimli abcam markalı kit kullanılarak belirlenmiştir. Reaksiyon karışımı 82 µl GDH assay buffer, 10 µl glukoz, 8 µl developer ve 2 µl GDH enzim ilavesi ile oluşturulmuştur. 37°C'de 30 saniye aralıklarla yaklaşık 20 dk boyunca substratın enzimatik katalizi ile NAD (P)'nin indirgenmesi sonucu meydana gelen NAD(P)H'ın 450 nm'de verdiği absorbanstaki artış mikro plaka okuyucuda ölçülerek belirlenmiştir. Ardından enzimin farklı sıcaklıklarda (4, 15, 25, 40, 60 ve 80°C), farklı substrat konsantrasyonlarında (50, 100, 200, 400, 800, 1600, 2000 mM), farklı pH (4.0, 6.0, 7.0, 8.8, 11.0) aralığında ve farklı substratlara karşı aktivitesi test edilmiştir.

3.2.1.8. GDH Enziminin Liyofilize Hale Getirilmesi

Rekombinant üretim sonucu sıvı olarak elde edilen protein örneği ilk olarak 1 gece -20 °C'de ardından 12 saat -80 °C'de dondurulmuştur. Ardından donmuş enzim örneği liyofilizatör cihazına yerleştirilerek 2 gün boyunca dondurarak kurutma işlemi uygulanmıştır.

3.2.2. Grafen Oksit ve Türevlerinin Sentezi ve Karakterizasyonu

3.2.2.1. Grafen Oksit Sentezi (GO)

Grafen oksit Hummers methoduna göre hazırlanmıştır (Hummers ve Offeman 1958). Bu yöntemde 1.0 g doğal grafit, 50.0 mL sülfirik asit (H_2SO_4) ve 1.0 g sodyum nitrat ($NaNO_3$) 500 mL'lik bir şişeye alınarak yarım saat karıştırılmıştır. Daha sonra bu karışım sıcaklığı $3.0^\circ C$ 'de tutulan su banyosuna alınarak sabit karıştırma hızında (600 devir/dakika) 6.0 g potasyum permanganat ($KMnO_4$) yavaş yavaş ilave edilerek yarım saat daha karıştırılmıştır. Bu çözelti $35.0^\circ C$ 'de 3 saat karıştırıldı, bu sürenin sonunda $3.0^\circ C$ 'de tutulan su banyosuna alınan çözeltiliye damla damla 50.0 mL su ilave edildi. İlave edildikten sonra oda sıcaklığına alınacak çözelti oda sıcaklığında yarım saat karıştırılarak sırasıyla 100 mL su ve 8.0 mL Hidrojen peroksit (H_2O_2) damla damla ilave edilmiştir. Bulamaç şeklini alacak karışımda renk koyu kahverengiden sarıya doğru değişmiştir, renk değişimi grafitin azaldığını göstermiştir. Nihai çözelti süzülerek katı kısım uzaklaştırıldı ve bol su ile yıkanmıştır. Daha sonra katı kısım 10^{-1} Torr vakum altında $80^\circ C$ 'deki vakumlu fırında kurutulmuştur. Ortaya çıkan GO tozu, x-ışını kırınımı (XRD), Fourier dönüşümü kızılötesi spektrometrisi (FTIR) ile karakterize edilmiştir (Bulut vd., 2023).

3.2.2.2. İndirgenmiş GO Sentezi (rGO)

GO kolloidleri, 133 ml etilen glikol (EG) içinde dağıtılarak hazırlanır. rGO karıştırılırken hidrat heksahidrat (N_2H_4) damlatılmıştır. İndirgeme işlemi, numuneyi 20 dakika mikrodalgaya sokarak tamamlanmıştır. Ardından numune süzülerek ve deiyonize su ve alkol ile yıkanıp ardından 12 saat boyunca kurumaya sağlanmıştır. Ortaya çıkan rGO tozu, X-ışını kırınımı (XRD) ve Fourier dönüşümü kızılötesi spektrometrisi (FTIR) ile karakterize edilmiştir (Husnah vd., 2017).

3.2.2.3. GO-Pt Sentezi

Klasik emdirme-indirgeme yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde 22.38 mg potasyum tetrakloro platinat (II) (K_2PtCl_4), 200 mg grafen oksit ve 10.0 ml distile su 25.0 ml'lik behere alınarak sabit karıştırma hızında (600 devir/dakika) 2 saat karıştırılmıştır. Ardından 33.96 mg sodyum borhidrür ($NaBH_4$) üzerine yaklaşık 1ml distile su ile çözülürülerek karışmakta olan karışıma damla damla eklendi. Ekleme sonrası oda sıcaklığında sabit karıştırma hızında

yarım saat karıştırılarak 30 dk indirgeme reaksiyonu gerçekleşti. Ortaya çıkan karışım çift katlı Whatman (No.4) kağıdı kullanılarak 3 defa H₂O/EtOH karışımı ile iyice yıkandı ve son olarak katı kısım 10⁻¹ Torr vakum altında 80°C'deki vakumlu fırında kurutulmuştur. Sentezlenen GO-Pt nanomateryalinin, FTIR ve XRD kullanılarak yapısı karakterize edilmiştir.

3.2.2.4. GO- FeCl₃'ün Sentezi

Klasik emdirme-indirgeme yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde 101.82 mg demir (III) hekzahidrat (FeCl₃ 6H₂O), 400.0 mg grafen oksit ve 20 ml distile su 50.0 ml'lik behere alınarak sabit karıştırma hızında (600 devir/dakika) 2 saat karıştırılmıştır. Ardından 237.32 mg NaBH₄ üzerine yaklaşık 2.0 ml distile su ile çözdürülerek karışmakta olan karışıma damla damla eklendi. Ekleme sonrası oda sıcaklığında sabit karıştırma hızında yarım saat karıştırılarak 30 dk indirgeme reaksiyonu gerçekleşti. Ortaya çıkan karışım çift katlı Whatman (No.4) kağıdı kullanılarak 3 defa H₂O/EtOH karışımı ile iyice yıkandı ve son olarak katı kısım 10⁻¹ Torr vakum altında 80°C'deki vakumlu fırında kurutulmuştur. Sentezlenen GO-FeCl₃ nanomateryalinin FTIR ve XRD kullanılarak yapısı karakterize edilmiştir.

3.2.2.5. GO- FeCl₃/L-His Sentezi

GO-FeCl₃ sentezi sonucu ortaya çıkan ürüne, aynı oranda disikloheksilkarbodiimid (DCC) ilave edilip 10.0 ml distile suda çözdürüldü, karışım oda sıcaklığında 30 dakika karıştırılmıştır. Bir beherde bulunan 80.0 mL distile suya 80.0 mg L-Histidin ilave edildi ve çözeltinin pH'sı 8.0'e ayarlanarak hazırlanan çözeltiliye ilave edilmiştir. Elde edilen karışıma oda sıcaklığında 1 saat sonikasyon uygulanmıştır. Ortaya çıkan nanokompozit santrifüjlenmiştir, H₂O/EtOH karışımı ile iyice yıkandı ve son olarak 60°C'de vakumlu fırında kurutulmuştur. Sentez yapıldıktan sonra elde edilen nanokompozitin gerekli karakterizasyonu için GO- FeCl₃ ve L-Histidin arasındaki etkileşim FT-IR spektrumları ile doğrulanmıştır (Akkoyun, 2019). Ayrıca GO-FeCl₃/L-His'nin yapısı, FTIR ve XRD kullanılarak karakterize edilmiştir.

3.2.2.6. GO-Ni Sentezi

Klasik emdirme-indirgeme yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde 42.59 mg nikel(II)klorit (NiCl_2), 200.0 mg grafen oksit ve 10.0 ml distile su 25.0 ml'lik behere alınarak sabit karıştırma hızında (600 devir/dakika) 2 saat karıştırılmıştır. Ardından 112.74 mg NaBH_4 üzerine yaklaşık 1.0 ml distile su ile çözdürülerek karışmakta olan karışıma damla damla eklendi. Ekleme sonrası oda sıcaklığında sabit karıştırma hızında yarım saat karıştırılarak 30 dk indirgeme reaksiyonu gerçekleşti. Ortaya çıkan karışım çift katlı Whatman (No.4) kağıdı kullanılarak 3 defa $\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$ karışımı ile iyice yıkandı ve son olarak katı kısım 10^{-1} Torr vakum altında 80°C 'deki vakumlu fırında kurutulmuştur. Sentezlenen GO-Ni nanomateryalinin, FTIR ve XRD kullanılarak yapısı karakterize edilmiştir.

3.2.2.7. Sentezlenen Nanoyapıların Karakterizasyonu

Elde edilen grafen oksit bileşikleri, GO, rGO, GO- FeCl_3 , GO-Pt, GO-Ni, GO- FeCl_3 -Histidin, yapılarının yapısal karakterizasyonları çeşitli spektroskopik yöntemlerle XRD ve FTIR yapılmıştır. Hizmet alımı yöntemiyle yapılar analizlerde, kısaca XRD analizlerinde bileşiklerin yapılarının belirlenmesi; FTIR'da fonksiyonel grupların belirlenmiştir.

3.2.3. Glukoz Dehidrogenazın GO, rGO, GO-Fe, GO-Pt, GO-Ni, GO- Fe-Histidin ile Etkileşimi

10.0 mg manyetik nanokompozit (GO, rGO,GO-Fe, GO-Pt, GO-Ni, GO-Fe-Histidin), 1.0 mL PBS (0.1 M, pH 7.0) içinde dağıtıldı, ardından 20.0 μL %25 (v/v) gluteraldehit çözeltisi ilave edilerek oda sıcaklığında 10 saat boyunca yüzey fonksiyonel grupları aktive edilmiştir. Elde edilen nanokompozitler 0.1 M NaCl içeren PBS (0.1 M, pH 7.0) ile 3 kez yıkanır. Daha sonra immobilizasyon için 10.0 mg manyetik nanokompozitler 4 mg/mL GDH çözeltisine ilave edildi ve oda sıcaklığında 12 saat karıştırılmıştır. Hareketsizleştirilmiş GDH, santrifüjleme yoluyla toplanır ve 0.1 M fosfat tamponu (pH 7.0) ile yıkanmıştır. Hareketsizleştirme verimi, SDS-PAGE yöntemiyle yapılmıştır. Örnekler SDS-Sample Buffer ile boyanarak jelde yürütüldü. Örneklerin jelde oluşturduğu bantlara göre enzimin maddelere tutunma oranı ölçülmüştür (Wang vd., 2021).

3.2.4. Farklı Nanoyapıların GDH Enziminin Aktivitesine Etkilerinin İncelenmesi

Rekombinant olarak üretimi yapılan enzimin farklı nanoyapılarla etkileşimi sonucu aktiviteler test edilmiştir. GDH aktivitesi, Glucose Dehydrogenase Assay Kit (Colorimetric) (ab102532) isimli abcam markalı kit kullanılarak belirlenmiştir. Reaksiyon karışımı 82 µl GDH assay buffer, 10 µl Glukoz , 8 µl developer , 2 µl GDH enzimi ve 2.5 µl nanoyapı (1 mg/ml) ilavesi ile oluşturularak 37°C’de 10 dakika inkübe edildi. Ardından 37°C’de 30 saniye aralıklarla yaklaşık 20 dk boyunca substratın enzimatik katalizi ile NAD(P)’nin indirgenmesi sonucu meydana gelen NAD(P)H’ın 450 nm’de verdiği absorbanstaki artış mikropłaka okuyucuda ölçülerek belirlenmiştir.

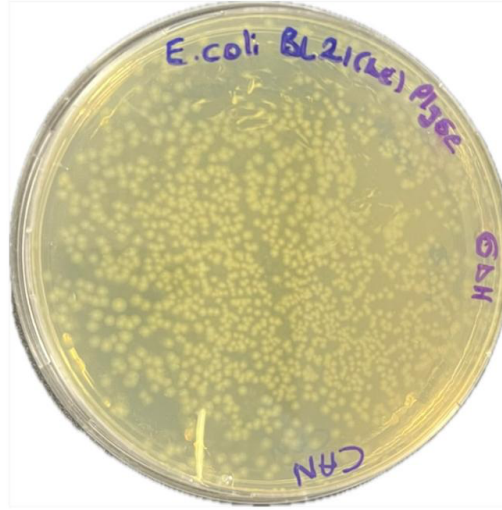


4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Tez çalışmasında GDH enzimi rekombinant DNA teknolojisi ile üretilerek farklı sıcaklıklarda, farklı substrat konsantrasyonlarında, farklı pH aralığında ve farklı substratlara karşı aktivitesi test edilmiştir. Çalışmanın diğer bir bölümünde ise GDH enziminin aktivitesini arttırmaya yönelik farklı nano yapıların etkisi incelenmiştir. Yapılan çalışmalardan elde edilen tüm bulgular başlıklar halinde verilmiştir.

4.1. pET-28a(+)-GDH Plazmid Üretimi

Hedef GDH genini taşıyan plazmitin (pET-28a(+)-GDH) çoğaltılması için kompetent hale getirilen *E. coli* DH5 α hücrelerine ısı şoku ile transfer edilmiştir. Transformasyon işleminin ardından Şekil 4.1'de görüldüğü gibi antibiyotik içeren petri kaplarında koloniler oluşmuştur. Başarılı aktarım işleminin ardından tek koloni seçilerek sıvı besi ortamında büyütülen bakteri hücrelerinden plazmit saflaştırılarak *E. coli* BL21(DE3) pLysE vektörüne protein ekspresyon çalışmaları için transfer edilmiştir.

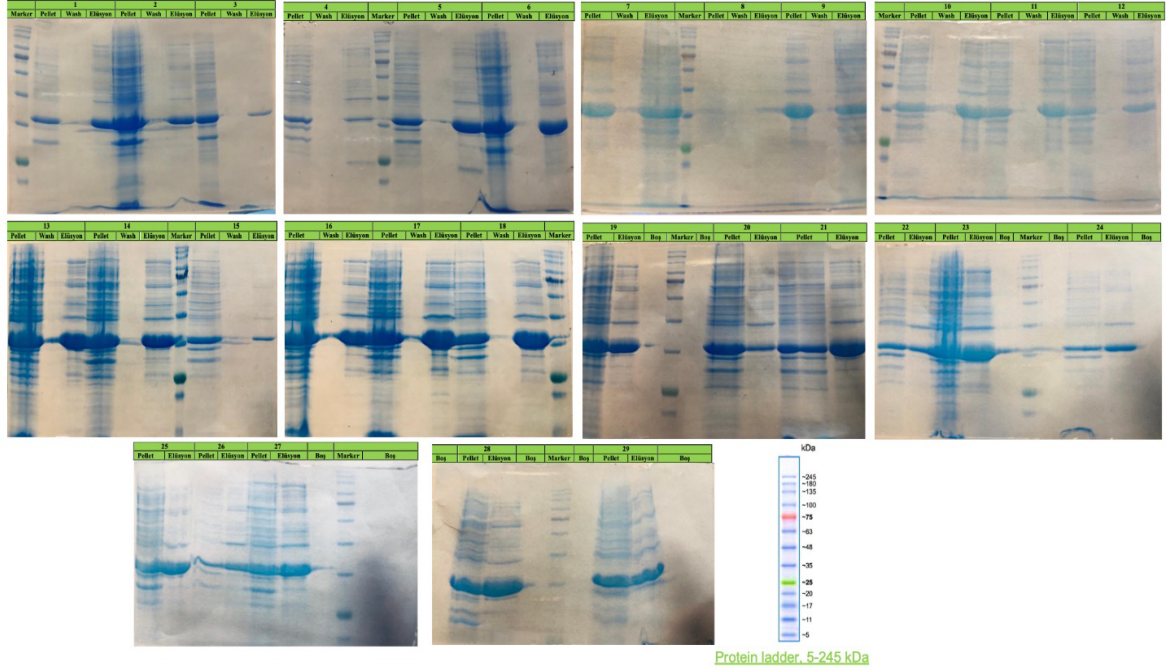


Şekil 4.1: GDH plazmidi içeren *E. coli* kolonileri

4.2. GDH Enziminin Üretimi

Hedef geni taşıyan plazmid *E. coli* BL21(DE3) pLysE suşuna transfer edilerek farklı kültür koşullarında (sıcaklık, IPTG konsantrasyonu, induksiyon zamanı ve O.D değerleri) hedef

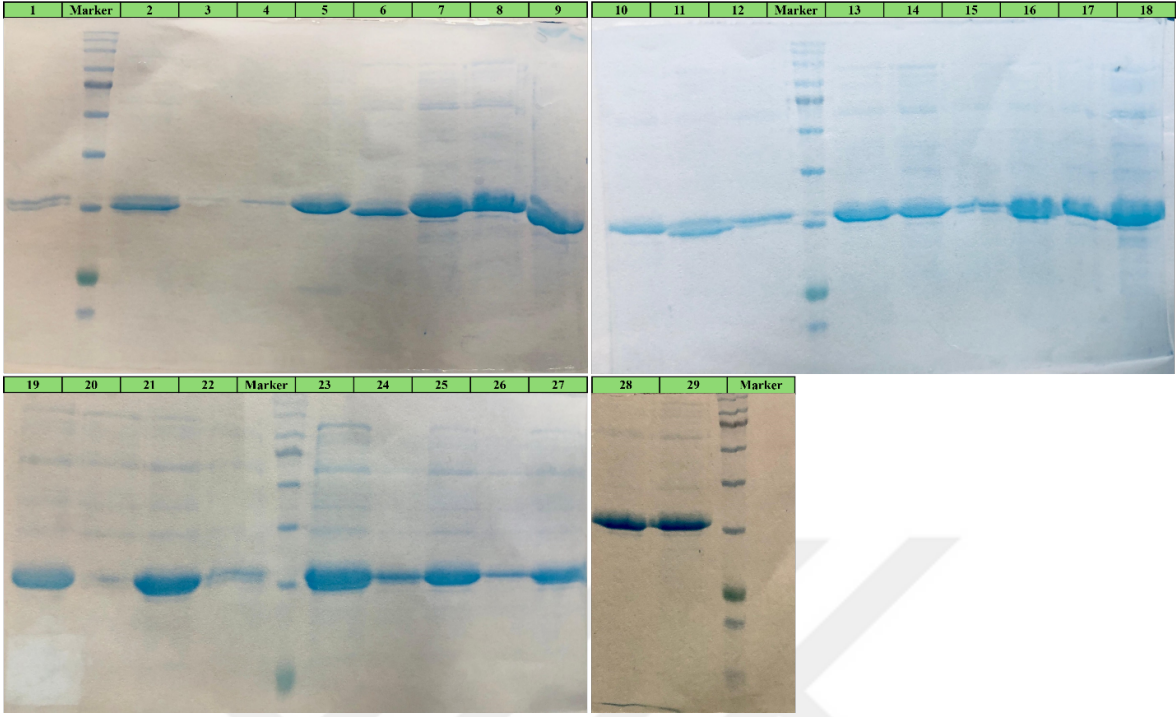
proteinin ekspresyon düzeyi incelenmiştir. Farklı kültür koşullarında büyütülen *E. coli*'de GDH protein ekspresyon sonuçları Şekil 4.2 verilmiştir. Tablo 4.1'de farklı kültür koşullarında elde edilen bakteriyel verim ve protein miktarları özetlenmiştir. Farklı kültür koşullarının protein ekspresyonu etkilediği görülmüştür. Daha sonra farklı kültür koşullarında üretilen örneklerden elde edilen proteinler His-tag afinite kromatografisi ile saflaştırılıp liyofilize edildikten sonra tekrar SDS-PAGE analizi yapılmıştır (Şekil 4.3). SDS-PAGE sonuçları ile Tablo 4.1 birlikte değerlendirildiğinde 32°C üretim sıcaklığının daha uygun olduğu anlaşılmıştır. Yapılan analizlerde enzimin yüksek ekspresyona sahip olduğu görülmektedir.



Şekil 4.2: Farklı ekspresyon koşullarında GDH proteinin ekspresyonuna ilişkin SDS-PAGE görüntüsü

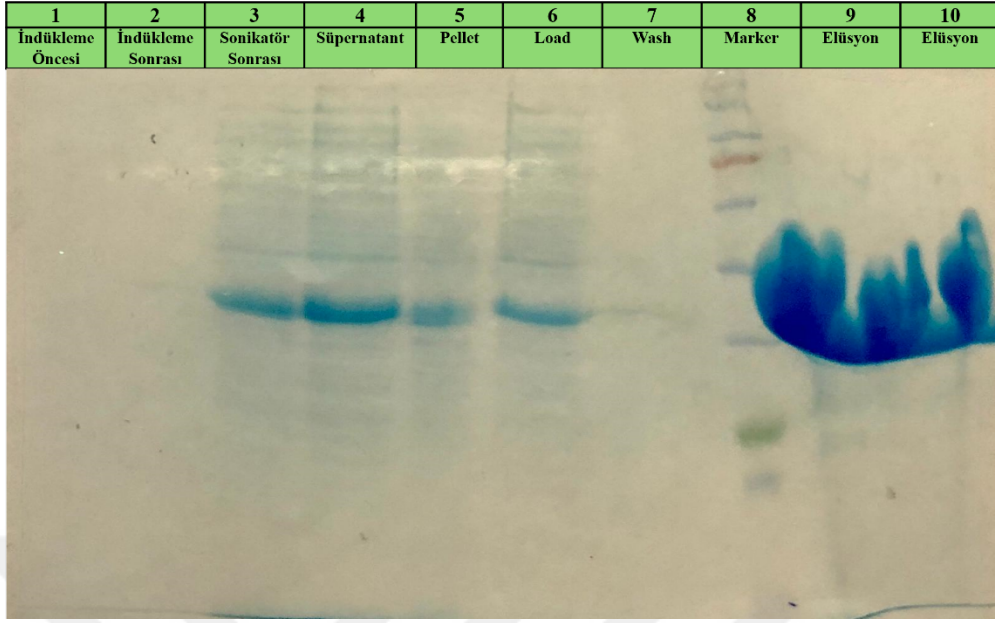
Tablo 4.1. DOE yaklaşımı ile farklı kültür koşullarında küçük ölçekli üretim sonuçları

Sıra No	Factor 1: Sıcaklık	Factor 2: OD600 nm	Factor 3: IPTG mM	Factor 4: İndüksiyon süresi-saat	Response 1: Bakteriyel verim-mg	Protein Konsantrasyonu- μ g (Bradford)	Protein Konsantrasyonu- μ g (NanoDrop)
1	37 °C	0.2	0.6	3	459	11.838	71.06
2	37 °C	0.5	1	3	601	13.660	72.67
3	37 °C	0.5	0.6	5	405	1.156	16.67
4	37 °C	0.5	0.6	1	341	2.217	36.72
5	37 °C	0.5	0.2	3	336	32.825	132.78
6	37 °C	0.8	0.6	3	600	24.323	114.11
7	32 °C	0.2	1	3	462	33.198	120.33
8	32 °C	0.2	0.6	1	341	3.717	11.33
9	32 °C	0.2	0.6	5	789	41.44	172.78
10	32 °C	0.2	0.2	3	487	28.969	123.17
11	32 °C	0.8	1	3	464	44.192	179.00
12	32 °C	0.8	0.6	1	444	13.825	105.67
13	32 °C	0.8	0.6	5	341	45.002	197.89
14	32 °C	0.8	0.2	3	643	38.415	149.28
15	32 °C	0.5	1	1	535	10.388	73.61
16	32 °C	0.5	1	5	615	43.894	188.61
17	32 °C	0.5	0.6	3	786	31.519	137.83
18	32 °C	0.5	0.6	3	622	46.3	198.17
19	32 °C	0.5	0.6	3	505	20.256	115.94
20	32 °C	0.5	0.6	3	647	22.694	94.17
21	32 °C	0.5	0.6	3	627	50.094	151.22
22	32 °C	0.5	0.2	1	468	58.74	51.83
23	32 °C	0.5	0.2	5	774	59.525	220.72
24	27 °C	0.2	0.6	3	319	63.677	52.39
25	27 °C	0.5	1	3	600	25.754	146.00
26	27 °C	0.5	0.6	1	436	54.944	85.61
27	27 °C	0.5	0.6	5	548	46.369	213.83
28	27 °C	0.5	0.2	3	580	37.348	136.83
29	27 °C	0.8	0.6	3	587	40.098	145.56

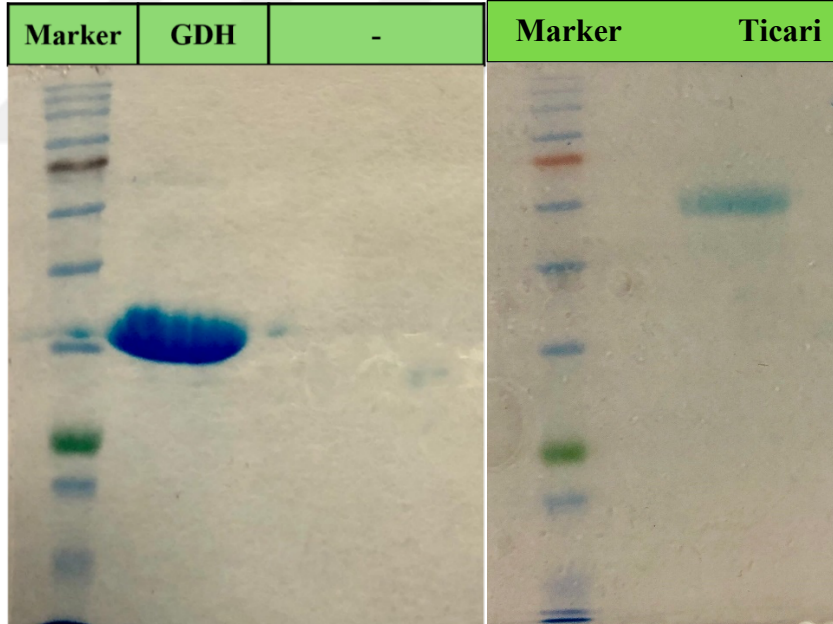


Şekil 4.3: Liyofilize edilen proteinlere ilişkin SDS-PAGE görüntüleri

Hedef proteinin farklı koşullarda üretiminin ardından biyoreaktörde üretimine geçilmiştir. Sıfırlama sonrası elde edilen elüsyonlarda (E9 ve E10) GDH enziminin oldukça yüksek miktarda ekspres olduğu görülmüştür (Şekil 4.4). Liyofilizasyon sonrası SDS-PAGE analizi Şekil 4.3’de verilmiştir. Rekombinant üretim sonrası tek bir bant elde edilmesi GDH yüksek saflıkta olduğunu ve bant kalınlığı ise proteinin veriminin iyi olduğunu ortaya çıkarmıştır. Liyofilize GDH ve ticari GDH enzimleri SDS-PAGE analizi ile karşılaştırıldığında liyofilize GDH enziminin bant kalınlığının ticariye göre daha kalın olduğu görülmüştür (Şekil 4.5).



Şekil 4.4: Biyoreaktörde üretimi yapılan GDH proteinin SDS-PAGE görüntüsü



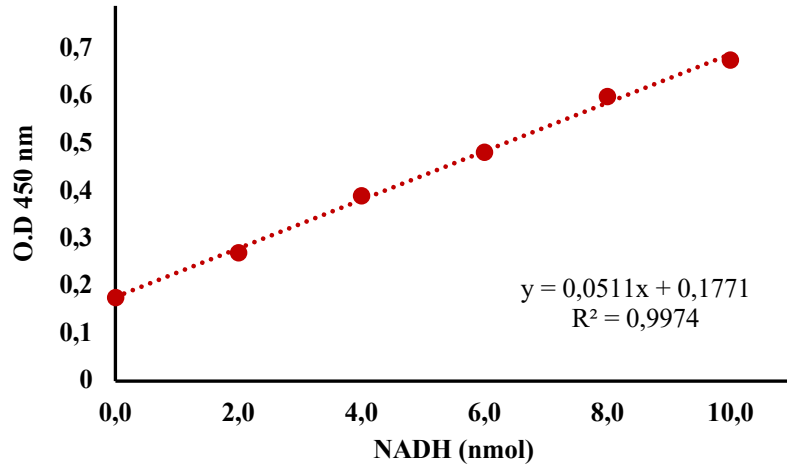
Şekil 4.5: Biyoreaktör üretimi sonrası liyofilize edilen GDH ve ticari enzim SDS-PAGE analiz

4.3. GDH Enzim Aktivite Tayini

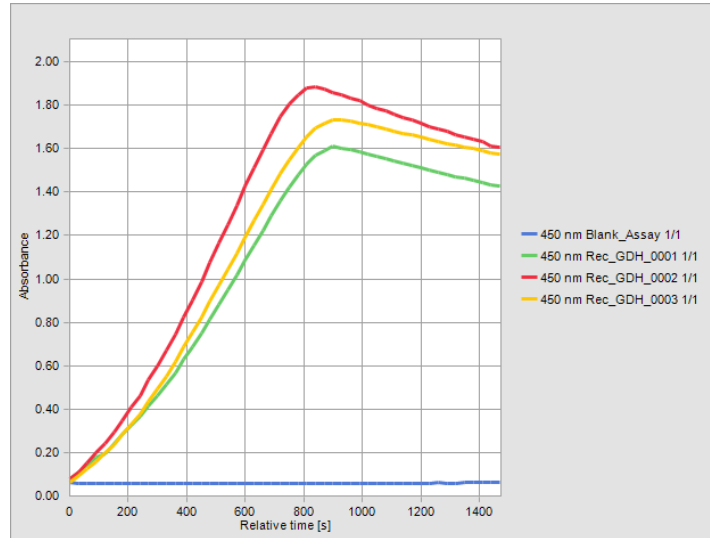
GDH enzim aktivitesi kit (BioVision) prosedüründe belirtildiği şekilde farklı NADH konsantrasyonlarındaki kalibrasyon grafiğinden (Şekil 4.6) elde edilen denklem üzerinden

GDH aktivitesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır (Şekil 4.7). Bir enzim ünitesi 1 dk boyunca 37°C ve pH=8.8'de 1.0 µmol NADH üreten enzim miktarı olarak ifade edilmektedir (C: Standart eğriden gelen NADH miktarı, T: İnkübasyon zamanı, V: kuyucuklara eklenen enzim miktarı, mL). Rekombinant üretimi yapılan GDH enzimin aktivitesi **2917.17 U/mL**, spesifik aktivitesi ise **1.46 kU/mg** protein olarak hesaplanmıştır.

$$\text{GDH aktivitesi} = \frac{C}{\Delta T \times V} \times \text{Seyreltme faktörü} = \text{nmol/min/mL} = \text{mU/mL}$$

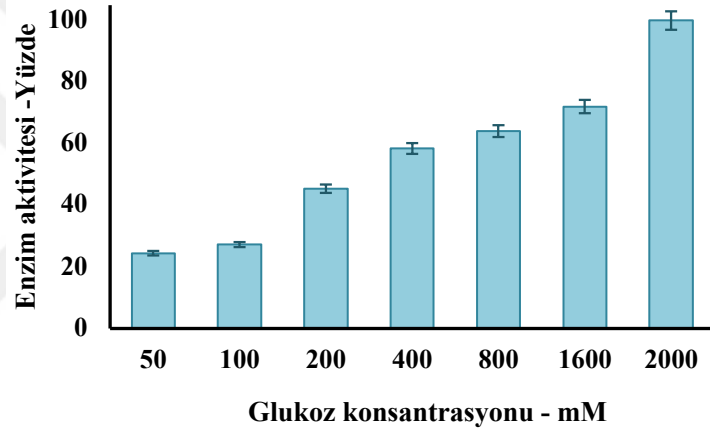


Şekil 4.6: Enzim ünitesi belirlenmesinde kullanılan NADH kalibrasyon grafiği

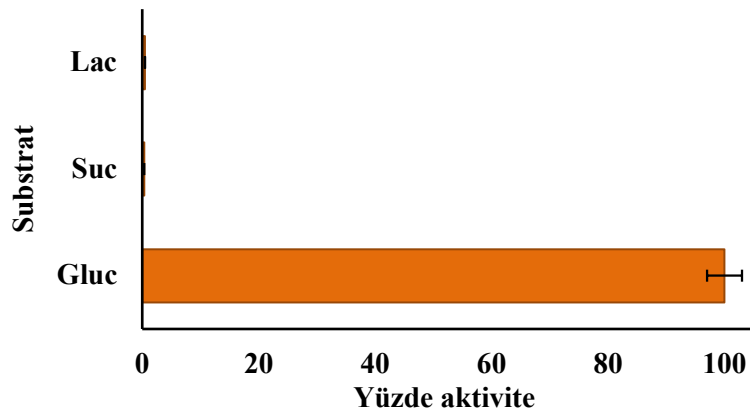


Şekil 4.7: GDH enzim aktivite ölçümüne ilişkin spektrofotometrik ölçüm sonucu

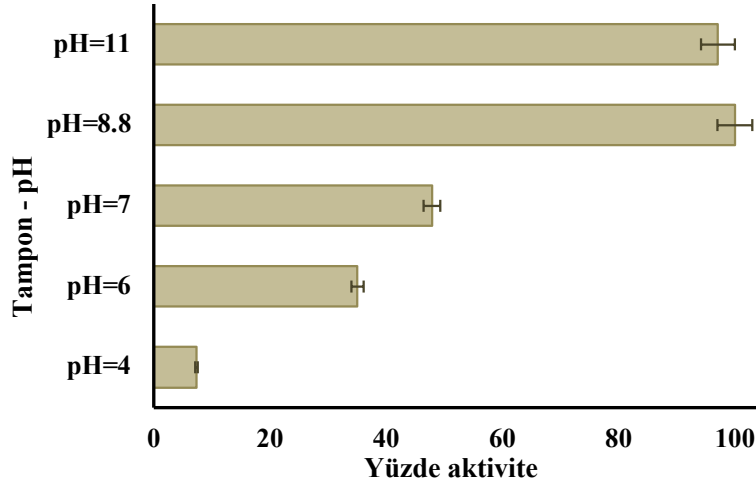
GDH kolorimetrik aktivite test kitinde (BioVision) 2 M olarak önerilen glukoz (substrat) konsantrasyonundaki aktivite %100 kabul edilerek seyreltmeler sonucu elde edilen farklı glukoz dozlarındaki aktivite sonuçları Şekil 4.8’de gösterilmiştir. Üretimi yapılan GDH enzimin farklı şekerlere (glukoz, laktoz ve sükroz) karşı aktiviteleri test edilmiştir. GDH enziminin glukoz dışı şekerlere karşı (laktoz ve sükroz) aktivite sergilemediği görülmektedir (Şekil 4.9). Bu durum enzimin söz konusu disakkarit şekerlere göre glukozla spesifikliğinin oldukça yüksek olduğunu göstermektedir. Rekombinant üretimi yapılan GDH enzimin farklı tampon pH’larında aktiviteleri de incelenmiştir. Enzimin bazik ortamda daha yüksek aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.8: Farklı glukoz konsantrasyonlarında yüzde enzim aktivitesi

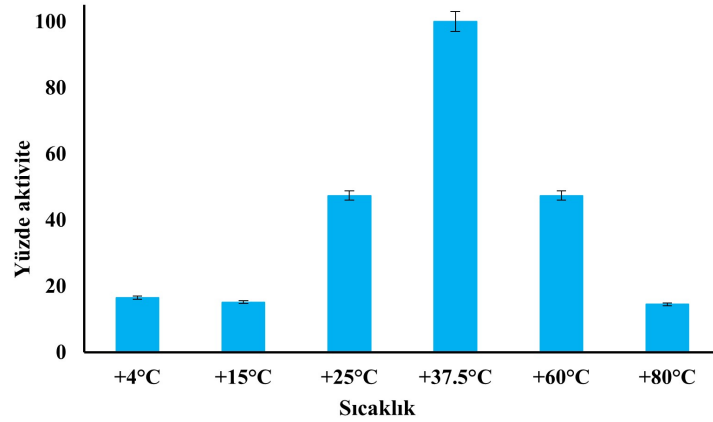


Şekil 4.9: Farklı substratlara karşı GDH aktivitesi



Şekil 4.10: Farklı çözelti tampon pH'larında GDH aktivitesi

GDH enziminin farklı sıcaklıklardaki aktiviteleri incelenmiştir. Enzimin 37.5°C'de daha yüksek aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Diğer düşük ve yüksek sıcaklıklarda enzim aktivitesinde azalma olduğu görülmüştür (Şekil 4.11).

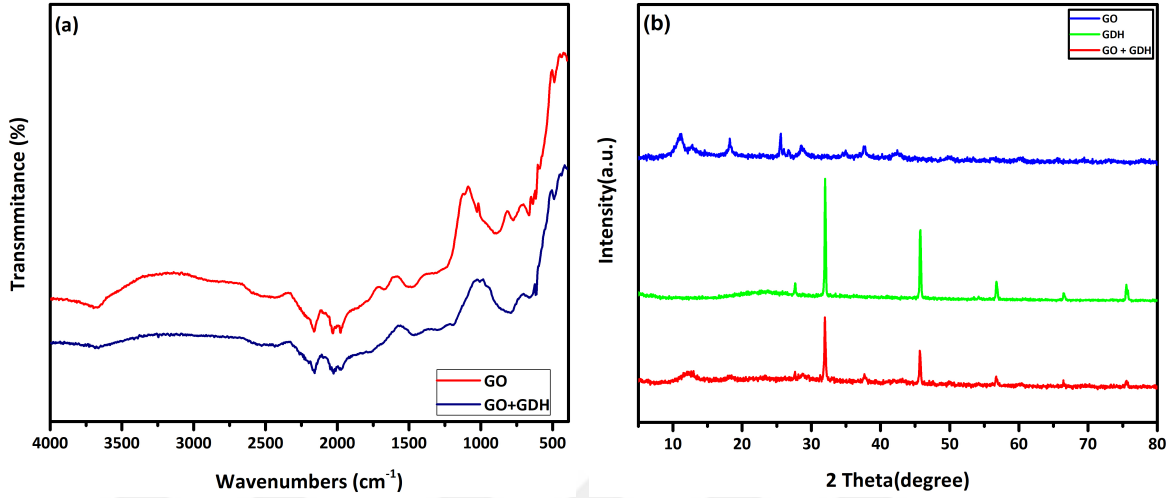


Şekil 4.11: Farklı sıcaklıklara karşı GDH aktivitesi

Tekstil sektöründe yoğun olarak kullanılan indigo boyasının giderilmesine yönelik P450 BM3 ve glukoz dehidrojenazın rekombinant üretimine yönelik pET28a vektörü ve *E. coli* BL21(DE3) straini kullanılarak yapılan çalışmada NADPH bağımlı GDH enzim aktivitesinin 0.045 U/mg protein olduğu belirtilmiştir. Söz konusu çalışmanın SDS-PAGE görüntüsü incelendiğinde kendi çalışmamızda elde edilen enzimin saflık durumunun çok daha yüksek olduğu anlaşılmaktadır (Lu ve Mei, 2007). Asetik asitten başlayarak seskiterpenlerin in vitro biyosentezi yönelik çalışmada NADPH+H üretici olarak GDH enzimin ekspre edildiği çalışmada enzim saflığının oldukça yüksek olduğu görülmekle

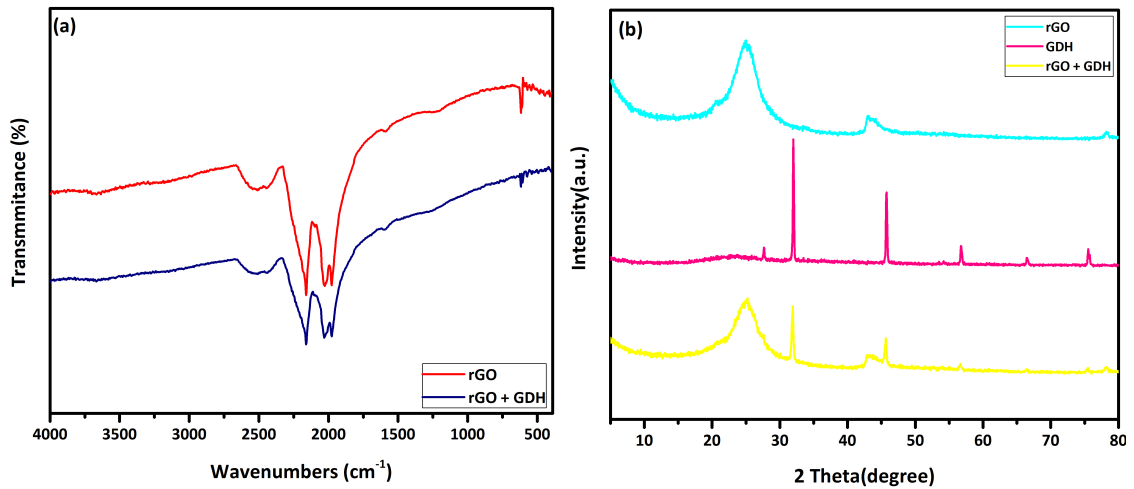
birlikte enzimin aktivitesine yönelik bir sonuç belirtilmemiştir (Dirkmann, vd., 2018). *Glomerella cingulata*'dan elde edilen FAD bağımlı GDH geninin *E. coli*'de ekspresyonu sonucu en yüksek GDH aktivitesini 10 U L^{-1} olduğu ve inklüzyon cisimlerinin oluştuğu belirtilmiştir (Sygmund vd., 2011). *Bacillus megaterium*'dan elde edilen GDH geninin pQE30 ekspresyon vektörüne aktarılarak farklı *E. coli* suşlarına transformasyonu sonucu en yüksek *E. coli* M15 suşunda 4.55 U/mg protein olarak açıklanmıştır (Xu vd., 2007). 1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl) acetophenone'nu indirgenmesine yönelik alkol dehidrogenaz ve glukoz dehidrogenaz enzimlerinin birlikte ekspresyonuna yönelik yapılan çalışmanın SDS-PAGE sonuçları karşılaştırıldığında bu proje çalışmasında elde edilen saflık değerinin çok daha yüksek olduğu görülmüştür (Hu vd., 2017). Kofaktör geri dönüşümüyle alisiklik hidroksilasyonu için P450pyrTM monooksijenaz ve glukoz dehidrogenazı eksprese eden rekombinant *E. coli* (BL21(DE3)) hücrelerinde en yüksek GDH aktivitesi 106 U g^{-1} protein olarak ifade edilmiştir. Söz konusu çalışmanın SDS-PAGE görüntüsü incelendiğinde ise saflık derecesinin oldukça düşük olduğu görülmüştür (Pham vd., 2013). GDH'ın ekspresyon seviyesini artırmaya yönelik *Escherichia coli*'ye *Bacillus subtilis* glukoz dehidrojenaz genini içeren plazmid (prL7) aktarılmıştır. Ardından hücre ekstraktına çöktürme, iyon değişim kromatografisi ve triazin boya kromatografisi işlemleri uygulanarak 375 U/mg spesifik aktiviteye kadar saflaştırılmıştır. Enzim, SDS-PAGE aralizi sonucu jelde homojen olarak görülmüştür. Bu çalışmanın aktivite sonucu incelendiğinde çalışmamızda elde edilen enzimin aktivite açısından üstün olduğu görülmüştür (Hilt vd., 1991). Daha önce yapılan çalışmalar irdelendiğinde farklı amaçlara yönelik GDH enzimi farklı ekspresyon vektörü, farklı gen kaynakları ve farklı bakteri suşlarında üretildiği görülmektedir. Bu çalışmada rekombinant üretimi gerçekleştirilen GDH enziminin belirtilen çalışmalardan daha yüksek aktivite ve saflığa sahip olduğu anlaşılmıştır. Bu durum kullanılan ekspresyon vektörü (pET-28a(+)-GDH), bakteri suşu (*E. coli* BL21(DE3)), kültür koşullarının optimizasyonu, saflaştırma ve aktivite test koşulları ile bağlantılı olabilir.

4.4. Grafen Oksit Nanoyapıların Sentezi, Karakterizasyonu ve GDH Enzimi ile Etkileşimi



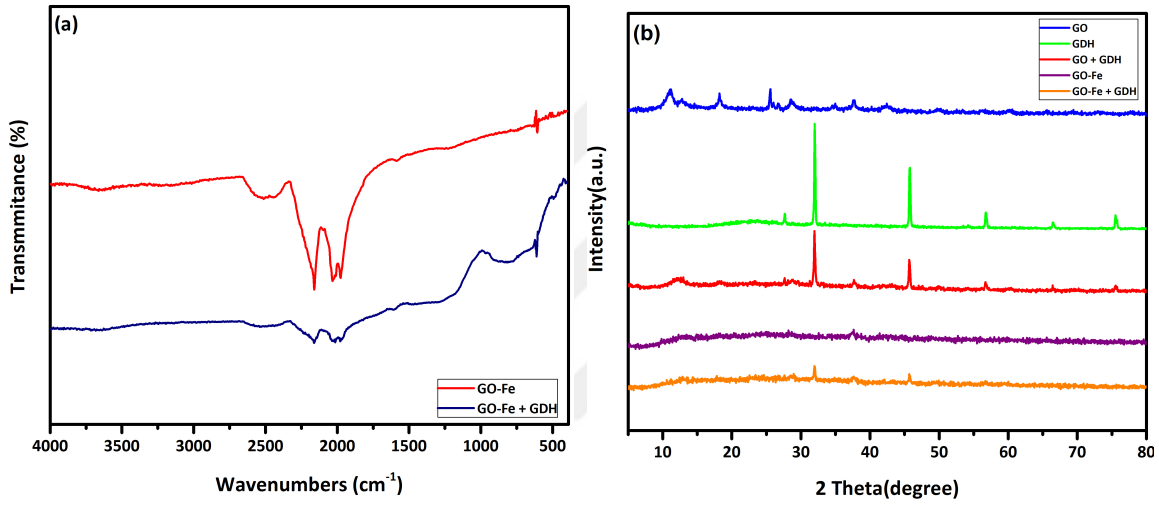
Şekil 4.12: (a) GO ve GO+GDH'in FTIR spektrumları. (b) GO, GDH ve GO+GDH'in XRD görüntüleri

Grafen oksit ve glukoz dehidrogenaz ile immobilize edilmiş grafen oksit nanoyapıların FTIR spektrumları şekil 4.12 (a)'da verilmiştir. 2000 cm⁻¹ civarındaki tepe grafen oksitin karbon oksijen titreşimine karşılık gelir. 1200 cm⁻¹ civarındaki piklerde grafen oksite enzimin immobilize olduğu görülmektedir (Wang vd., 2015). Şekil 4.12 (b)'de GO, GDH ve GO+GDH'in XRD görüntüsü bulunmaktadır. Grafikte grafen oksitin 12 derecede pik verdiği görülmektedir. GO üzerine GDH enzimi immobilizasyonu yapıldıktan sonra GO'ya ait pik şiddetinde düşüş gözlemlenmektedir. Bunun nedeni GDH enziminin yüksek kristal yapıya sahip olmasından kaynaklanmaktadır (Yasin vd., 2018).



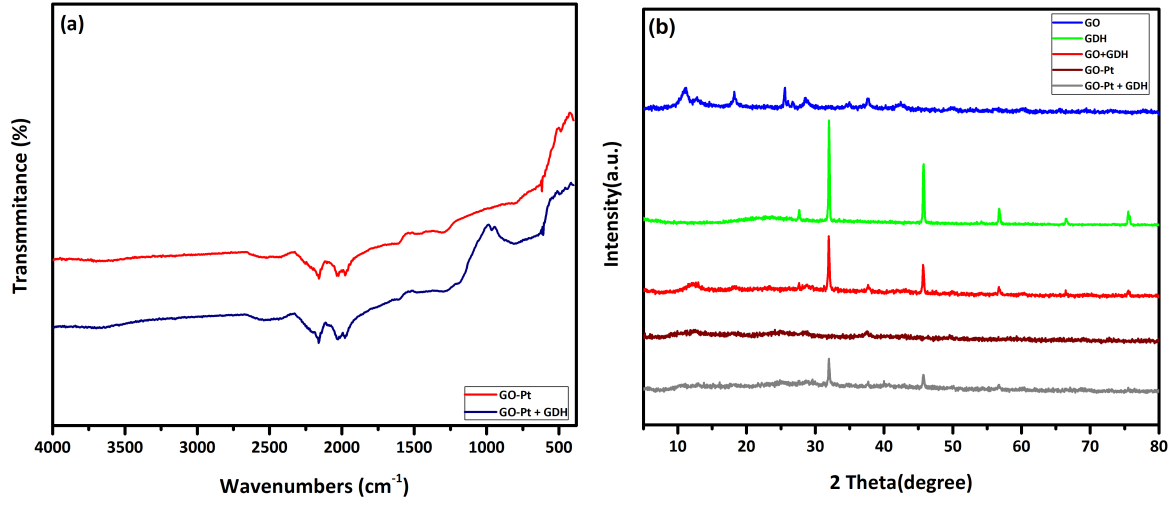
Şekil 4.13: (a) rGO ve rGO+GDH'in FTIR spektrumları. (b) rGO, GDH ve rGO+GDH'in XRD görüntüleri.

İndirgenmiş grafen oksit ve glukoz dehidrogenaz ile immobilize edilmiş grafen oksit nanoyapıların FTIR spektrumları şekil 4.13 (a)'da verilmiştir. 600 cm^{-1} yakınında grafen oksitin keskin pik verdiği görülmektedir. Yapıya enzim immobilize edildikten sonra pik şiddetinde baskılanma meydana gelmiştir. Bu durum enzimin yapıya immobilize olduğunu göstermektedir. Şekil 4.13 (b)'de rGO, GDH ve rGO+GDH'nin XRD grafiği verilmiştir. 25 derecede rGO'nun piki görülmektedir (Popov vd., 2021).Grafik incelendiğinde rGO'ya enzim bağlandıktan sonra 25 derecede bulunan pikte düşüş gözlemlenmektedir. Bunun sebebi GDH enziminin kristal yapısından kaynaklı baskı oluşturduğu düşünülmektedir.



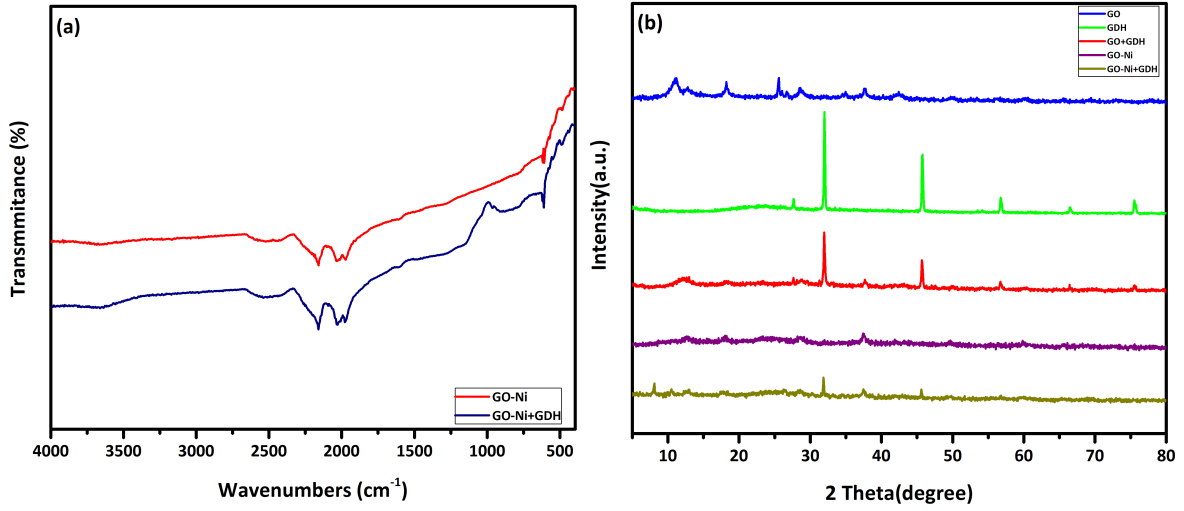
Şekil 4.14: (a) GO-Fe ve GO-Fe+GDH'nin FTIR spektrumları. (b) GO-Fe, GDH ve GO-Fe+GDH'nin XRD görüntüleri.

Grafen oksit'in FeCl_3 demir tuzu ile indirgenmesiyle ortaya çıkan GO-Fe ve glukoz dehidrogenaz ile immobilize edilmiş grafen oksit tabanlı nanoyapıların FTIR spektrumları şekil 4.14 (a)'da verilmiştir. 1000 cm^{-1} civarındaki tepe grafen oksitin karbon oksijen titreşimine karşılık gelir (Wang vd., 2015). Bu durum grafen nanaoyapıya enzimin immobilize olduğu görülmektedir. Şekil 4.14 (b)'de GO-Fe, GDH ve GO-Fe+GDH'nin XRD görüntüsü bulunmaktadır. Grafikte grafen oksitin 12, 20 ve 25 derecede pik verdiği görülmektedir. GO-Fe üzerine GDH enzimi immobilizasyonu yapıldıktan sonra GO'ya ait pik şiddetinde düşüş gözlemlenmektedir. Bunun nedeni GDH enziminin yüksek kristal yapıya sahip olmasından kaynaklanmaktadır (Yasin vd., 2018).



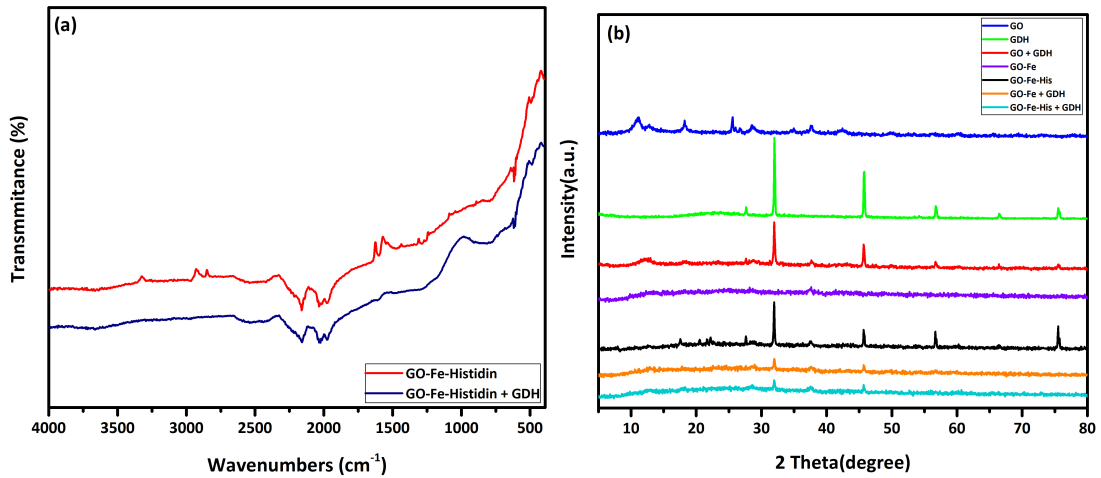
Şekil 4.15: (a) GO-Pt ve GO-Pt+GDH'in FTIR spektrumları. (b) GO-Pt, GDH ve GO-Pt+GDH'in XRD görüntüleri.

Grafen oksit'in potasyum tetrakloro platinat (II) tuzu ile indirgenmesiyle oluşan GO-Pt ve glukoz dehidrogenaz ile immobilize edilmiş grafen oksit nanoyapıların FTIR spektrumları şekil 4.15 (a)'da verilmiştir. 1200 cm^{-1} civarındaki tepe grafen oksitin karbon oksijen titreşimine karşılık gelir (Wang vd., 2015). Bu pikten hareketle grafen oksite enzimin immobilize olduğu görülmektedir. Şekil 4.15 (b)'de GO, GDH, GO-GDH, GO-Pt+GDH ve GO-Pt+GDH'in XRD görüntüsü bulunmaktadır. Grafikte grafen oksitin 12 derecede pik verdiği görülmektedir. GO-Pt ve GO-Pt+GDH karşılaştırıldığında GO-Pt'de pik gözlemlenemezken GO-Pt+GDH yapısında 32 ve 46 derecede pik görülmektedir. Pikler GDH grafiği ile karşılaştırıldığında piklerin GDH enzimine bağlı olduğu görülmektedir. Bunun nedeni GDH enziminin yüksek kristal yapıya sahip olmasından kaynaklanmaktadır.



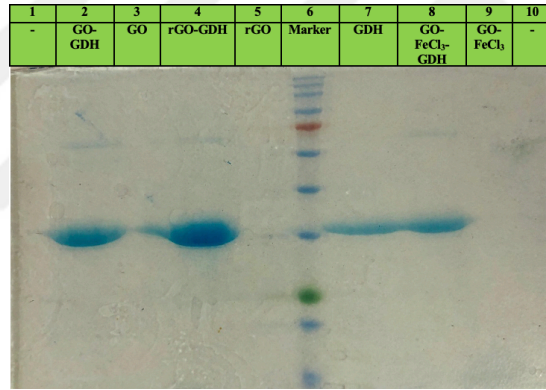
Şekil 4.16: (a) GO-Ni ve GO-Ni+GDH'nin FTIR spektrumları. (b) GO-Ni, GDH ve GO-Ni+GDH'nin XRD görüntüleri.

GO-Ni ve GO-Ni+GDH'nin FTIR spektrumları 4.16 (a)'da verilmiştir. 1200 cm^{-1} civarındaki tepe grafen oksitin karbon oksijen titreşimine karşılık gelir. Bu durum grafen nanaoyapıya enzimin immobilize olduğu görülmektedir. Şekil 4.16 (b)'de GO, GO-Ni, GDH, GO-GDH ve GO-Ni+GDH'nin XRD görüntüsü bulunmaktadır. Grafikte grafen oksitin 12 ve 20 derecede pik verdiği görülmektedir (Wang vd., 2015). GO-Ni ve GO-Ni+GDH karşılaştırıldığında GO-Ni' de pik gözlemlenemezken GO-Ni+GDH yapısında 32, 46 derecede pik görülmektedir. Pikler GDH Grafiği ile karşılaştırıldığında piklerin GDH enzimine bağlı olduğu görülmektedir. Bunun nedeni GDH enziminin yüksek kristal yapıya sahip olmasından kaynaklanmaktadır (Yasin vd., 2018).

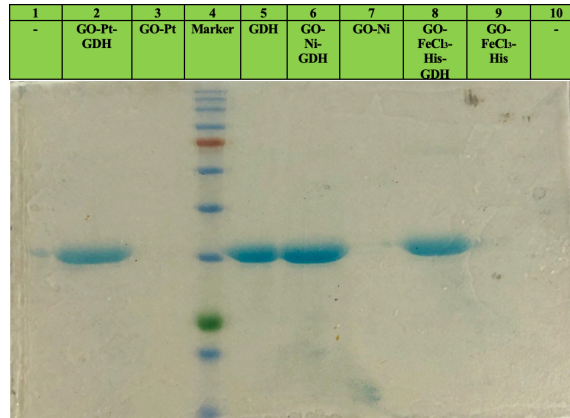


Şekil 4.17: (a) GO-Fe-Histidin ve GO-Fe-Histidin+GDH'nin FTIR spektrumları. (b) GO-Fe-Histidin, GDH ve GO-Fe-Histidin+GDH'nin XRD görüntüleri.

Grafen oksit'in GO-FeCl₃ tuzu ile indirgenmesiyle ortaya çıkan GO-Fe yapısına histidin eklenerek GO-Fe-His yapısı oluşturulmuştur. Ortaya çıkan nanopyapı glukoz dehidrogenaz ile immobilize edilmiş grafen oksit tabanlı nanopyapıların FTIR spektrumları şekil 4.17 (a)'da verilmiştir. 1200 cm⁻¹ civarındaki tepe grafen oksit'in karbon oksijen titreşimine karşılık gelir. Bu durum grafen nanopyapıya enzimin immobilize olduğu görülmektedir. Şekil 4.17 (b)'de GO, GDH, GO+GDH, GO-Fe, GO-Fe-GDH, GO-Fe-Histidin, GO-Fe+GDH, GO-Fe-Histidin+GDH'nin XRD görüntüleri bulunmaktadır. GO-Fe-Histidin ve GO-Fe-Histidin+GDH karşılaştırıldığında, GO-Fe-Histidin histidinden kaynaklı 75 ve 57 derecede pik verdiği görülmektedir. Yapıya enzim immobilizasyonu uygulandıktan sonra histidin pikinin baskılandığı görülmektedir. Bu baskılamanın enzimin kristal yapısından kaynaklandığı öngörülmektedir.



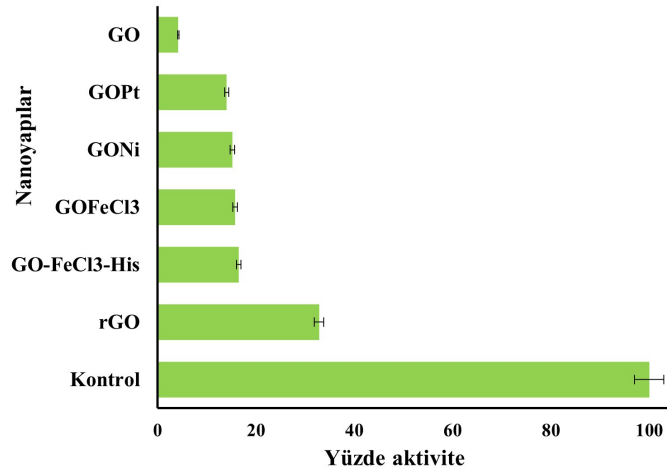
Şekil 4.18: GDH enziminin nanopyapılara immobilizasyonu SDS-PAGE görüntüsü GO + GDH, GO, rGO + GDH, rGO, marker, GO-Fe + GDH, GO-Fe.



Şekil 4.19: GDH enziminin nanopyapılara immobilizasyonu SDS-PAGE görüntüsü GO-Pt + GDH, GO-Pt, marker, GO-Ni+GDH, GO-Ni, GO-Fe-Histidin+GDH, GO-Fe-Histidin.

Yukarıda sentezi ve karakterizasyonu yapılan nanoyapıların GDH enzimi ile immobilizasyonunun tespitine yönelik sadece nanoyapılar ve nanoyapı+enzim şeklinde SDS-PAGE analizi ile yapılmıştır (Şekil 4.18-19). Analiz sonucu sadece nanoyapıların yüklendiği jel alanında bant görülmezken nanoyapı ve enzimlerin yüklendiği alanlarda bant görülmüştür. Bantların görülmesi enzimin nanoyapıya bağlandığını gösterir.

Nanoyapıların rekombinant üretimi gerçekleştirilen GDH enziminin aktivitesine etkileri incelenmiştir (Şekil 4.20). Çalışılan konsantrasyon oranlarında (4:1 v/v) enzim aktiviteleri incelendiğinde tüm nanoyapıların enzim aktivitesini azalttığı görülmektedir. Ayrıca GO'nun GO türevli nanoyapılara göre daha güçlü inhibisyon kabiliyeti olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.20: Farklı nanoyapıların enzim aktivitesine etkisi

GDH'nin endüstri ve klinikteki uygulamalarında kullanımına yönelik GDH'ı immobilizasyonu üzerine yapılan bir çalışmada GDH'yi hareketsiz hale getirmek için hiyerarşik olarak gözenekli silika desteği (MM-SBA-15) kullanılmıştır, ancak 10 döngüden sonra yalnızca ~%10 aktivitesinin kaldığı belirtilmiştir (Solé vd., 2019). Bir başka çalışmada ise GDH'nin immobilizasyonu $Fe_3O_4-SiO_2-GO$ kompozitleri ile yapıldıktan sonra, %92'lik bir hareketsizleştirme verimi ve %91'lik aktivite geri kazanımı elde edilmiştir. 25 döngüden sonra immobilize GDH başlangıç aktivitesinin %50'si olarak kalmıştır (Wang vd., 2021). Diğer bir çalışmada çalışmada ise, sırasıyla glukoz dehidrojenaz (GDH, EC 1.1.1.47) ve ksiloz dehidrojenaz (XDH, EC 1.1.1.175) ile işlem görmüş huş ağacı liköründe bulunan ksiloz ve glukozdan ksilonik asit ve glukonik asidin enzimatik üretimi yapılmıştır. Enzim immobilizasyonu için altıgen gözenekli gözenekli silika parçacıkları (SBA 15 silika) ve

silika nanopartikülleri (nanoSiO_2) ve kullanılarak karşılaştırma yapılmıştır. Her iki enziminde immobilizasyon sonrası termal stabilitelerinde ve sağlamlıklarında önemli bir iyileşme görülmüştür. İki malzemede de alkali pH'ta ve pH 10.0 ve 60 °C'de bile immobilizasyon matrisinde %50'nin üzerinde aktivite sergilemiştir. 45°C' de nanoSiO_2 ve SBA silika üzerinde immobilize edilen GDH serbest enzimlerle karşılaştırıldığında, enzimin yarılanma oranında 4.5 ve 7.25 kat artış görülmüştür (Zdarta vd., 2018). Fe_3O_4 -kitosan manyetik partiküller üzerine lipazın immobilizasyonunun yapıldığı bir çalışmada enzim/destek oranı 4 mg'dan 24 mg/g'a yükseldiğinde immobilizasyon verimi %98'den %75'e düştüğü görülmüştür. Ortamdaki enzim konsantrasyonunun artışıyla birlikte destek yüzeyindeki enzim moleküllerinin rekabetini artırdığı ve bunun sonucunda destek üzerinde istifleme etkisine yol açtığı görülmüştür (Wang vd., 2015). Enzim stabilitesini artırmaya yönelik GDH enziminin Fe_3O_4 - SiO_2 -GO destekleyici malzemesiyle immobilizasyonu denenmiştir. Enzim/destek oranı 12 mg/g olduğunda, %93'lük en yüksek aktivite geri kazanımı, elde edilmiştir. Enzim oranı artmaya devam ettiğinde aktivite geri kazanımı 24 mg/g olduğunda %70'e düştüğü görülmüştür (Wang vd., 2021). Enzim immobilizasyonu üzerine yapılan bu iki çalışmada enzim/destek oranının artmasıyla immobilizasyon veriminin azaldığı görülmüştür. Başka bir çalışmada grafen oksit, in vitro inkübasyon deneylerine uygun olarak esas olarak hidrojen bağı yoluyla α -amilazın amino asit kalıntılarına (yani His305, His299 ve Asp300) bağlanmıştır. α -amilazın nişastayı glukozaya katalize etme yeteneği GO tarafından baskılandığı görülmüştür (Liu ve Kokare 2023). Grafen oksit ve indirgenmiş grafen oksitin lizozim etkileşimi incelendiği bir çalışmada immobilizasyon işlemi sonrası hem GO hem de rGO'nun, büyük miktarlarda lizozim adsorbe ettiği görülmüştür. Grafen oksitin, lizozim aktivitesini ciddi şekilde inhibe ettiği görülürken, indirgenmiş grafen oksitin enzim aktivitesi üzerinde etkisinin olmadığı görülmüştür (Bai vd., 2017). Geçmiş dönemde yapılan çalışmalar incelendiğinde çeşitli amaçlar doğrultusunda farklı malzemeler üzerine enzim immobilizasyonu çalışmaları yapılmıştır. Destek materyallerinin bazılarının enzim aktivitesini koruduğu bazılarında aktiviteyi düşürdüğü veya inhibe ettiği görülmüştür. Bu çalışmada ise GDH enziminin farklı nanoyapılar (GO, rGO, GO-Fe, GO-Pt, GO-Ni, GO-Fe-Histidin) ile etkileşimi incelenmiştir. Sonuç olarak nanoyapılar ve enzimin SDS-PAGE, XRD ve FTIR analizleri sonucuna göre birbirileriyle etkileşime girdiği görülmüştür. Fakat etkileşim sonrası aktivite ölçüldüğünde nanoyapıların çalışılan konsantrasyon değerlerinde enzimi inhibe ettiği görülmüştür. Bu

durum yukarıda bahsedilen çalışmalardan da anlaşıldığı üzere enzim/destek oranının yüksek olmasından kaynaklanmış olabilir. Ayrıca yukarıda da belirtildiği üzere grafen oksit nanoyapıların enzimleri inhibe etme potansiyeli taşıdığı görülmektedir.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada rekombinant olarak üretimi yapılan GDH enzimi sağlık birimlerinin yoğun bakım, yataklı tedavi ve yenidoğan servisleri ile diyabetli kişilerin kan glukoz düzeylerini takip etmelerine imkan sağlayan glukometre gibi cihazların test striptlerinde kullanılmaktadır. Proje önerisinde belirtilen hedeflere uygun olarak GDH enzimin üretimi başarılı şekilde gerçekleştirilmiştir. Rekombinant olarak üretimi yapılan GDH enzimi liyofilize hale getirilmiş ve yapılan SDS-PAGE analiz sonuçlarına göre hem yüksek düzeyde ekspre olmuş hem de yüksek saflıkta elde edilmiştir. Üretimi yapılan enzim çeşitli aktivite testlerine tabii tutularak farklı substrat, pH ve glukoz konsantrasyonlarında GDH aktivitesi test edilmiştir. Enzim aktivitesinin en önemli parametresi olan enzim ünitesi (EU) değerlendirildiğinde GDH enziminin yüksek aktiviteye ve spesifik aktiviteye sahip olduğu anlaşılmıştır. Tek seferlik, 3 litrelik biyoreaktör koşullarında üretim, saflaştırma ve liyofilizasyon sonrası elde edilen GDH enzimi ile laboratuvar koşullarında in vitro olarak yaklaşık 50 bin reaksiyonluk çalışma yapılabilecek ürün elde edilmiştir. GDH enziminin aktivitesine yönelik farklı nanoyapıların (GO, rGO, GO-Fe, GO-Pt, GO-Ni, GO-Fe-Histidin) etkisi incelenmiştir. Nanoyapılar enzim aktivitesine inhibitör etki ettiği görülmüştür (Şekil 4.18).

Proje çalışmaları sonucu üretimi yapılan GDH enzimi moleküler biyoloji açısından yüksek ekspresyona oranında sahip olmasının yanında, biyokimyasal yönden önemli olan aktivite değerleri açısından in vitro koşullarda yüksek saflık, aktivite ve spesifik aktiviteye (1.46 kU/mg protein) sahiptir. Rekombinant üretimi yapılan enzimin in vitro aktivite çalışmalarında 2 µL enzim ilave edilerek reaksiyon başlatıldığında absorbansın 1.600 nm'in üzerine çıkması (Şekil 4.7) enzimin glukometre cihazlarında kullanılabilir aktiviteye sahip olduğu fikrini desteklemektedir. Hastane merkez laboratuvarlarında çift enzim (GOX - HRP veya heksokinaz - glukoz 6 fosfat dehidrogenaz) yöntemiyle tayin edilen glukoz ölçümü yerine tek enzim tabanlı (GDH) farklı bir tekniğin kullanılabilirliğini akla getirmektedir. Fakat bunun için hastane koşullarında farklı serum ve plazma örneklerinde test edilerek mevcut kan şeker ölçüm tekniği ile karşılaştırılarak konfirmasyon ve validasyon çalışmalarına ihtiyaç duyulmaktadır. Enzimin glukometre cihazlarına sabitlenmesine ve aktivitesinin artırılmasına yönelik farklı nanoyapılarla veya daha geniş konsantrasyon

aralığında etkileşimi araştırılabilir. Fakat grafen oksit gibi nanomalzemelerin biyofiziksel enzimatik özellikleri üzerindeki etkisine ilişkin temel bilgiler hala yeterli düzeyde değildir. Bu anlamda enzim ve nanoyapıların etkileşimi ile ilgili yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.



KAYNAKLAR

- Adeel, M., Bilal, M., Rasheed, T., Sharma, A. ve Iqbal, H. M. (2018). Graphene and graphene oxide: Functionalization and nano-bio-catalytic system for enzyme immobilization and biotechnological perspective. *International journal of biological macromolecules*, 120, 1430-1440.
- Akkoyun, F. (2019). Fonksiyonlaştırılmış Manyetik Grafen Oksit Üzerine Enzim İmmobilizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Kayseri, 69s.
- Akmayan, İ. (2023). Investigation of the effect of different culture conditions on recombinant protein production. *Bulletin of Biotechnology* 4(2):42-48. Doi: 10.51539/biotech.1226205.
- Aslanzadeh, S., Ishola, M. M., Richards, T. ve Taherzadeh, M. J. (2014). An overview of existing individual unit operations. *Biorefineries*, 3-3
- Bai, Y., Ming, Z., Cao, Y., Feng, S., Yang, H., Chen, L. ve Yang, S. T. (2017). Influence of graphene oxide and reduced graphene oxide on the activity and conformation of lysozyme. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 154, 96-103. Doi: 10.1016/J.COLSURFB.2017.03.011.
- Baig, N., Kammakakam, I. ve Falath, W. (2021). Nanomaterials: A review of synthesis methods, properties, recent progress, and challenges. *Materials Advances*, 2(6), 1821-1871.
- Batool, R., Rhouati, A., Nawaz, M. H., Hayat, A. ve Marty, J. L. (2019). A review of the construction of nano-hybrids for electrochemical biosensing of glucose. *Biosensors*, 9(1), 46.
- Bisswanger, H. (2014). Enzyme assays. *Perspectives in Science* 1(1-6):41-55. Doi: 10.1016/j.pisc.2014.02.005.
- Bolibok, P., Wiśniewski, M., Roszek, K. ve Terzyk, A. P. (2017). Controlling enzymatic activity by immobilization on graphene oxide. *The Science of Nature*, 104, 1-10. Doi: 10.1007/s00114-017-1459-3.
- Borisova, B., Sánchez, A., Jiménez-Falcao, S., Martín, M., Salazar, P., Parrado, C., ... ve Villalonga, R. (2016). Reduced graphene oxide-carboxymethylcellulose layered with platinum nanoparticles/PAMAM dendrimer/magnetic nanoparticles hybrids. Application to the preparation of enzyme electrochemical biosensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 232, 84-90. Doi: 10.1016/j.snb.2016.02.106.
- Buchholz K, Bornscheuer UT (2017) Enzyme Technology: History and Current Trends. *Appl Bioeng Innov Futur Dir* 11–46 . Doi: 10.1002/9783527800599.CH2

- Bulut, A., Karakaş, K., Kanberoğlu, G. S. ve Zahmakıran, M. Synthesis and identification of graphene oxide supported ruthenium nanoparticles with sulfonic acid functional and investigation of the catalytic performance of aromatic hydrocarbons in reduction reactions. *Science and mathematics in A globalizing world*, 5.
- Carvalho, J. K., Panatta, A. A. S., Silveira, M. A. D., Tav, C., Johann, S., Rodrigues, M. L. F. ve Martins, C. V. B. (2021). Yeasts isolated from a lotic continental environment in Brazil show potential to produce amylase, cellulase and protease. *Biotechnology Reports*, 30, e00630. Doi: 10.1016/j.btre.2021.e00630.
- Cavalcante, F. T., de A. Falcão, I. R., da S. Souza, J. E., Rocha, T. G., de Sousa, I. G., Cavalcante, A. L., ... ve dos Santos, J. C. (2021). Designing of nanomaterials-based enzymatic biosensors: Synthesis, properties, and applications. *Electrochem*, 2(1), 149-184.
- Coskun, K. A., Yurekli, N., Abay, E. C., Tutar, M., Al, M. ve Tutar, Y. (2022). Structure- and Design-Based Difficulties in Recombinant Protein Purification in Bacterial Expression. *Protein Detection*, 3. Doi: 10.5772/intechopen.103958.
- Çelik, M. (2014). The Effects Of Microwave Irradiation on Urease Enzyme Activity. Master Thesis, Fatih University The Graduate School of Sciences and Engineering, Genetics and Bioengineering, Istanbul, 51.
- De, M., Chou, S. S. ve Dravid, V. P. (2011). Graphene oxide as an enzyme inhibitor: modulation of activity of α -chymotrypsin. *Journal of the American Chemical Society*, 133(44), 17524-17527. Doi: 10.1021/ja208427j.
- Dirkmann, M., Nowack, J. ve Schulz, F. (2018). An in vitro biosynthesis of sesquiterpenes starting from acetic acid. *ChemBioChem*, 19(20), 2146-2151.
- Erem, F. ve Certel, M. (2018). Sünmüş ekmekten izole edilen Bacillus suşlarının peptidaz üretme potansiyellerinin belirlenmesi ve peptidaz üretimi için bazı kültür şartlarının optimizasyonu. *Anadolu University Journal of Science and Technology C-Life Sciences and Biotechnology*, 7(2), 160-179. Doi: 10.18036/aubtdc.348383.
- El-Gendi, H., Saleh, A. K., Badierah, R., Redwan, E. M., El-Maradny, Y. A. ve El-Fakharany, E. M. (2021). A comprehensive insight into fungal enzymes: Structure, classification, and their role in mankind's challenges. *Journal of Fungi*, 8(1), 23.
- Geldimyradow, A. B., Japarov, M. P. ve Gylyjova, M. J. (2023). Factors affecting enzyme activity. *Инновационная Наука*, (10-1), 104-105.
- Giese, E. C., Dussán, K. J., Pierozzi, M., Chandel, A. K., Pagnocca, F. C. ve da Silva, S. S. (2017). Cellulase production by *Trichosporon laibachii*. *Orbital: The Electronic Journal of Chemistry*, 271-278.
- Güven, R. G. (2011). Termofilik bakteriler ve biyoteknolojik açıdan önemli bazı enzimleri. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR*, 9(1), 1-10.

- Hao, S., Liu, Y., Qin, Y., Zhao, L., Zhang, J., Wu, T., ... ve Wang, C. (2020). Expression of a highly active β -glucosidase from *Aspergillus niger* AS3. 4523 in *Escherichia coli* and its application in gardenia blue preparation. *Annals of microbiology*, 70, 1-9. Doi: 10.1186/s13213-020-01576-7.
- Heidari, M., Farsad-Akhtar, N., Toorchi, M., Kazemi, E. M. ve Mahna, N. (2022). Proteomic, biochemical, and anatomical influences of nanographene oxide on soybean (*Glycine max*). *Journal of Plant Physiology*, 272, 153667. Doi: 10.1016/j.jplph.2022.153667.
- Hennigan JN, Lynch MD (2022) The past, present, and future of enzyme-based therapies. *Drug Discov Today*, 27:117 . Doi: 10.1016/J.DRUDIS.2021.09.004
- Hernández-Cancel, G., Suazo-Dávila, D., Ojeda-Cruzado, A. J., García-Torres, D., Cabrera, C. R. ve Griebenow, K. (2015). Graphene oxide as a protein matrix: influence on protein biophysical properties. *Journal of nanobiotechnology*, 13, 1-12.
- Hilt, W., Pfliegerer, G. ve Fortnagel, P. (1991). Glucose dehydrogenase from *Bacillus subtilis* expressed in *Escherichia coli* I: purification, characterization and comparison with glucose dehydrogenase from *Bacillus megaterium*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1076(2), 298-304.
- Hu, X., Liu, L., Chen, D., Wang, Y., Zhang, J. ve Shao, L. (2017). Co-expression of the recombined alcohol dehydrogenase and glucose dehydrogenase and cross-linked enzyme aggregates stabilization. *Bioresource technology*, 224, 531-535.
- Hummers, William S. ve Richard E. Offeman. (1958). *Preparation of Graphitic Oxide*.
- Husnah, M., Fakhri, H. A., Rohman, F., Aimon, A. H. ve Iskandar, F. (2017). A modified Marcano method for improving electrical properties of reduced graphene oxide (rGO). *Materials Research Express*, 4(6), 064001. Doi: 10.1088/2053-1591/aa707f.
- Ianiro, G., Pecere, S., Giorgio, V., Gasbarrini, A. ve Cammarota, G. (2016). Digestive enzyme supplementation in gastrointestinal diseases. *Current drug metabolism*, 17(2), 187-193.
- Ibrahim, E., Jones, K. D., Taylor, K. E., Hosseney, E. N., Mills, P. L. ve Escudero, J. M. (2018). Recombinant *E. coli* cellulases, β -glucosidase, and polygalacturonase convert a citrus processing waste into biofuel precursors. *ACS sustainable chemistry ve engineering*, 6(6), 7304-7312. Doi: 10.1021/acssuschemeng.7b04518.
- Işık Biçen, H.E. (2022). Selülotik Atıklardan İzole Edilen *Bacillus cereus* Bakterisi Tarafından Üretilen Selülaz Enziminin Biyokimyasal Karakterizasyonu . Yüksek Lisans, Düzce Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Emstitüsü, Kimya Anabim Dalı, Düzce, 63s.

- Jayakrishnan, A., Wan Rosli, W. R., Tahir, A. R. M., Razak, F. S. A., Kee, P. E., Ng, H. S., ... ve Liew, K. B. (2024). Evolving Paradigms of Recombinant Protein Production in Pharmaceutical Industry: A Rigorous Review. *Sci*, 6(1), 9.
- Jin, L., Yang, K., Yao, K., Zhang, S., Tao, H., Lee, S. T., ... ve Peng, R. (2012). Functionalized graphene oxide in enzyme engineering: a selective modulator for enzyme activity and thermostability. *ACS nano*, 6(6), 4864-4875. Doi: 10.1021/nn300217z.
- Karim, A., Gerliani, N. ve Aïder, M. (2020). *Kluyveromyces marxianus*: An emerging yeast cell factory for applications in food and biotechnology. *International Journal of Food Microbiology*, 333, 108818.
- Katlowitz, K., Gopinath, S., Navarro, J. C. ve Robertson, C. (2023). HMG-CoA reductase inhibitors for traumatic brain injury. *Neurotherapeutics*, 20(6), 1538-1545. Doi: 10.1007/S13311-023-01399-9.
- Kaur, J., Kataria, M., Punia, S., Aggarwal, D. ve Kumar, K. (88). Immobilized enzymes and its implications. *Industrial Enzymes*, 73.
- Khan, S., Ullah, M. W., Siddique, R., Nabi, G., Manan, S., Yousaf, M. ve Hou, H. (2016). Role of recombinant DNA technology to improve life. *International journal of genomics*, 2016(1), 2405954.
- Kıyan, H. F. ve Yaylım, İ. Rekombinant DNA teknolojisinin tıpta kullanımı; Moleküler Cerrahi. *ÜCD Güncelleme Serileri*, 67.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, 227(5259), 680-685.
- Lin, P., Zhang, Y., Yao, G., Huo, H., Ren, H., Wang, Y., ... ve Fang, B. (2020). Immobilization of formate dehydrogenase on polyethylenimine-grafted graphene oxide with kinetics and stability study. *Engineering in life sciences*, 20(3-4), 104-111. Doi: 10.1002/elsc.201900134.
- Liu, X. ve Kokare, C. (2023). Microbial enzymes of use in industry. *In Biotechnology of microbial enzymes* (pp. 405-444). Academic Press. Doi: 10.1016/B978-0-443-19059-9.00021-9.
- Liu, X., Sun, B., Xu, C., Zhang, T., Zhang, Y. ve Zhu, L. (2023). Intrinsic mechanisms for the inhibition effect of graphene oxide on the catalysis activity of alpha amylase. *Journal of Hazardous Materials*, 453, 131389. Doi: 10.1016/J.JHAZMAT.2023.131389.
- Lu, Y. ve Mei, L. (2007). Co-expression of P450 BM3 and glucose dehydrogenase by recombinant *Escherichia coli* and its application in an NADPH-dependent indigo production system. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 34(3), 247-253.

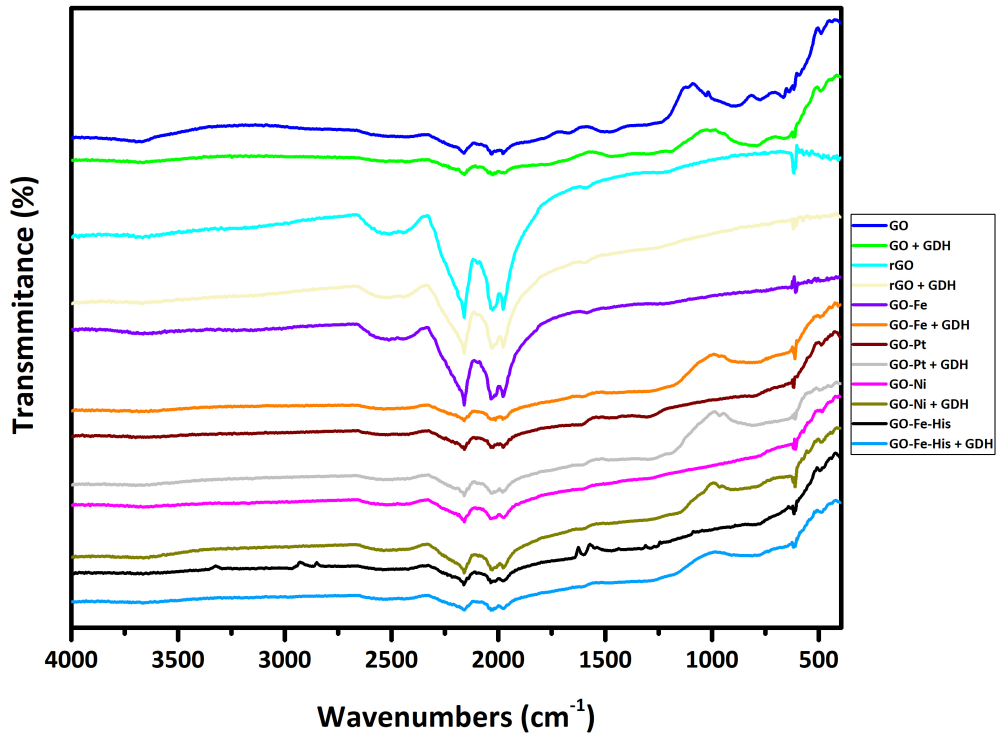
- Luis B. J. (2015). *Microbial Enzymes and Biotransformation*. C. 17. Humana.
- Maghraby, Y. R., El-Shabasy, R. M., Ibrahim, A. H. ve Azzazy, H. M. E. S. (2023). Enzyme immobilization technologies and industrial applications. *ACS omega*, 8(6), 5184-5196.
- McDonald, A. G. ve Tipton, K. F. (2023). Enzyme nomenclature and classification: The state of the art. *The FEBS journal*, 290(9), 2214-2231.
- Meshram, A., Singhal, G., Bhagyawant, S. S. ve Srivastava, N. (2019). Plant-derived enzymes: a treasure for food biotechnology. *In Enzymes in food biotechnology* (pp. 483-502). Academic Press.
- Mohd Razib, M. S., Latip, W., Abdul Rashid, J. I., Knight, V. F., Wan Yunus, W. M. Z., Ong, K. K., ... ve Mohd Noor, S. A. (2021). An Enzyme-Based Biosensor for the Detection of Organophosphate Compounds Using Mutant Phosphotriesterase Immobilized onto Reduced Graphene Oxide. *Journal of Chemistry*, 2021(1), 2231089. Doi: 10.1155/2021/2231089.
- Packiam, K. A. R., Ramanan, R. N., Ooi, C. W., Krishnaswamy, L. ve Tey, B. T. (2020). Stepwise optimization of recombinant protein production in *Escherichia coli* utilizing computational and experimental approaches. *Applied microbiology and biotechnology*, 104(8), 3253-3266. Doi: 10.1007/s00253-020-10454-w.
- Patel, A. K., Dong, C. D., Chen, C. W., Pandey, A. ve Singhania, R. R. (2023). Production, purification, and application of microbial enzymes. *In Biotechnology of microbial enzymes* (pp. 25-57). Academic Press. Doi: 10.1016/B978-0-443-19059-9.00019-0.
- Patila, M., Pavlidis, I. V., Kouloumpis, A., Dimos, K., Spyrou, K., Katapodis, P., ... ve Stamatis, H. (2016). Graphene oxide derivatives with variable alkyl chain length and terminal functional groups as supports for stabilization of cytochrome c. *International Journal of Biological Macromolecules*, 84, 227-235. Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.12.023.
- Pham, S. Q., Gao, P. ve Li, Z. (2013). Engineering of recombinant *E. coli* cells co-expressing P450_{pyr}TM monooxygenase and glucose dehydrogenase for highly regio- and stereoselective hydroxylation of alicycles with cofactor recycling. *Biotechnology and bioengineering*, 110(2), 363-373.
- Popov, A., Aukstakojyte, R., Gaidukevic, J., Lisyte, V., Kausaite-Minkstimiene, A., Barkauskas, J. ve Ramanaviciene, A. (2021). Reduced graphene oxide and polyaniline nanofibers nanocomposite for the development of an amperometric glucose biosensor. *Sensors*, 21(3), 948. Doi: 10.3390/s21030948.
- Scanlon, M. G., A. W. Henrich, ve J. R. Whitaker. (2018). Factors affecting enzyme activity in food processing . Ss. 337-65. *Proteins in Food Processing, Second Edition*. Elsevier.

- Sharma, A., Gupta, G., Ahmad, T., Mansoor, S. ve Kaur, B. (2021). Enzyme engineering: current trends and future perspectives. *Food Reviews International*, 37(2), 121-154.
- Shrief, E. (2020). Factors Affecting Enzyme Activity. *Department of Biochemistry and Nutrition, Ain Shams University*. Doi: 10.13140/RG.2.2.27359.48800.
- Sygmund, C., Staudigl, P., Klausberger, M., Pinotsis, N., Djinović-Carugo, K., Gorton, L., ... ve Ludwig, R. (2011). Heterologous overexpression of *Glomerella cingulata* FAD-dependent glucose dehydrogenase in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. *Microbial cell factories*, 10, 1-9.
- Solé, J., Caminal, G., Schürmann, M., Álvaro, G. ve Guillén, M. (2019). Co-immobilization of P450 BM3 and glucose dehydrogenase on different supports for application as a self-sufficient oxidative biocatalyst. *Journal of Chemical Technology ve Biotechnology*, 94(1), 244-255. Doi: 10.1002/jctb.5770.
- Solunke, A. B. (2018). Fermentation production of α -Ketglutaric Acid. *Recent Advances in Biotechnology*, 10.
- Soozanipour, A. ve Taheri-Kafrani, A. (2018). Enzyme immobilization on functionalized graphene oxide nanosheets: efficient and robust biocatalysts. *In Methods in enzymology* (Vol. 609, pp. 371-403). Academic Press.
- Sumaryada, T., Sandy Gunawan, M., Perdana, S., Arjo, S. ve Maddu, A. (2019). A molecular interaction analysis reveals the possible roles of graphene oxide in a glucose biosensor. *Biosensors*, 9(1), 18. Doi: 10.3390/bios9010018.
- Tamanoi F (2023) History of The Enzymes: 1950–2023. *Enzymes* 54:3–11. Doi: 10.1016/BS.ENZ.2023.09.001
- Tarafdar, A., Sirohi, R., Gaur, V. K., Kumar, S., Sharma, P., Varjani, S., ... ve Sim, S. J. (2021). Engineering interventions in enzyme production: Lab to industrial scale. *Bioresource technology*, 326, 124771.
- Uyar, Ç. (2017). *Bacillus sp.*'den alkali pektinolitik enzim üretimi ve karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Adana, 106s.
- Victorino da Silva Amatto, I., Gonsales da Rosa-Garzon, N., Antonio de Oliveira Simoes, F., Santiago, F., Pereira da Silva Leite, N., Raspante Martins, J. ve Cabral, H. (2022). Enzyme engineering and its industrial applications. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 69(2), 389-409.
- Yasin, G., Arif, M., Shakeel, M., Dun, Y., Zuo, Y., Khan, W. Q., ... ve Nadeem, M. (2018). Exploring the nickel–graphene nanocomposite coatings for superior corrosion resistance: manipulating the effect of deposition current density on its morphology, mechanical properties, and erosion-corrosion performance. *Advanced Engineering Materials*, 20(7), 1701166.

- Wang, J., Zhao, M., Lu, X., Gu, H. ve Liu, B. (2021). Covalent immobilization of glucose dehydrogenase onto graphene oxide magnetic nanoparticles to improve the stability. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 38(2), 265-272. Doi: 10.1007/s43153-021-00102-9.
- Wang, X. Y., Jiang, X. P., Li, Y., Zeng, S. ve Zhang, Y. W. (2015). Preparation Fe₃O₄@chitosan magnetic particles for covalent immobilization of lipase from *Thermomyces lanuginosus*. *International journal of biological macromolecules*, 75, 44-50. Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.01.020.
- Watts, A., Sankaranarayanan, S., Watts, A. ve Raipuria, R. K. (2021). Optimizing protein expression in heterologous system: Strategies and tools. *Meta Gene*, 29, 100899.
- Xing, X., Jia, J. Q., Zhang, J. F., Zhou, Z. W., Li, J., Wang, N. ve Yu, X. Q. (2019). CALB immobilized onto magnetic nanoparticles for efficient kinetic resolution of racemic secondary alcohols: long-term stability and reusability. *Molecules*, 24(3), 490. Doi: 10.3390/molecules24030490.
- Xu, Z., Jing, K., Liu, Y. ve Cen, P. (2007). High-level expression of recombinant glucose dehydrogenase and its application in NADPH regeneration. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 34(1), 83-90.
- Zdarta, J., Pinelo, M., Jesionowski, T. ve Meyer, A. S. (2018). Upgrading of biomass monosaccharides by immobilized glucose dehydrogenase and xylose dehydrogenase. *ChemCatChem*, 10(22), 5164-5173. Doi: 10.1002/cctc.201801335.
- Zhang, X., Liao, Q., Chu, M., Liu, S. ve Zhang, Y. (2014). Structure effect on graphene-modified enzyme electrode glucose sensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 52, 281-287. Doi: 10.1016/j.bios.2013.07.022.
- Zhou, W., Rao, Y., Zhuang, W., Ge, L., Lin, R., Tang, T., ... ve Ying, H. (2021). Improved enzymatic activity by oriented immobilization on graphene oxide with tunable surface heterogeneity. *Composites Part B: Engineering*, 216, 108788. Doi: 10.1016/j.compositesb.2021.108788.
- Zhu, C., Yang, G., Li, H., Du, D. ve Lin, Y. (2015). Electrochemical sensors and biosensors based on nanomaterials and nanostructures. *Analytical chemistry*, 87(1), 230-249.
- URL-1 (2024). https://www.brenda-enzymes.org/all_enzymes.php, *All enzymes in BRENDA*, (24.06.2024).

EKLER

EK 1: GO, GO + GDH, rGO, rGO + GDH, GO-Fe, GO-Fe + GDH, GO-Pt, GO-Pt + GDH, GO-Ni, GO-Ni+GDH, GO-Fe-Histidin, GO-Fe-Histidin+GDH'in FTIR spektrumları.



EK 2: GO, GDH, GO + GDH, rGO, rGO + GDH, GO-Fe, GO-Fe + GDH, GO-Pt, GO-Pt + GDH, GO-Ni, GO-Ni+GDH, GO-Fe-Histidin, GO-Fe-Histidin+GDH'in XRD görüntüleri.

