

T.C  
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

*vgb*<sup>+</sup> Rekombinant *E. coli* Suşu ile Mikrobiyal Kondroitin Sülfat Üretimi

ESRA NEZAFED ÜLKE

DOKTORA TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ARALIK 2019

Tezin Başlığı : *vgb<sup>+</sup>* Rekombinant *E. coli* Suşu ile Mikrobiyal Kondroitin Sülfat Üretimi

Tezi Hazırlayan : Esra Nezafed ÜLKE

Sınav Tarihi : 27.12.2019

Yukarıda adı geçen tez jürimizce değerlendirilerek Biyoloji Ana Bilim Dalında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

### Sınav Jüri Üyeleri

**Tez Danışmanı :** **Dr. Öğrt. Üyesi Ayşe Şebnem ERENLER** .....  
İnönü Üniversitesi

**Jüri Başkanı :** **Prof. Dr. Dilek ASMA** .....  
İnönü Üniversitesi

**Prof. Dr. Süleyman KÖYTEPE** .....  
İnönü Üniversitesi

**Dr. Öğrt. Üyesi Aysel UÇKUN** .....  
Adıyaman Üniversitesi

**Dr. Öğrt. Üyesi Miraç UÇKUN** .....  
Adıyaman Üniversitesi

**Prof. Dr. Kazım TÜRK**  
Enstitü Müdürü

## ONUR SÖZÜ

Doktora tezi olarak sunduğum "**vgb<sup>+</sup> Rekombinant *E. coli* Suğu ile Mikrobiyal Kondroitin Sülfat Üretimi**" başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığını ve yararlandığım bütün kaynakların, hem metin içinde hem de kaynakçada yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

Esra Nezafed ÜLKE

*Her daim beni güçlendiren ve motive eden Canım Eşim Ahmet'e ve Bal kızım Ada'ya...*





# ÖZET

Doktora Tezi

*vgb*<sup>+</sup> REKOMBİNANT *E. coli* SUŞU İLE MİKROBİYAL KONDROİTİN SÜLFAT ÜRETİMİ

Esra Nezafed ÜLKE

İnönü Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

116 + x sayfa

2019

Danışman: Dr. Öğrt. Üyesi Ayşe Şebnem ERENLER

Bu tezde; kendine özgü özellikleri nedeniyle tıpta, veterinerlikte, farmasötik ve kozmetik alanında çeşitli uygulamalara sahip, glikozaminoglikan türevli bir ürün olan kondroitin sülfatın (KS) bilinen hayvan kaynaklarının yerine güvenilir biyoteknolojik yöntemler kullanılarak yeni ve rekombinant bir mikrobiyal kaynaktan üretimi amaçlanmıştır.

Çalışma kapsamında; öncelikle *vgb* genini taşıyan pUC8:15 plazmidinin, *E. aerogenes* [pUC8:15] suşundan izole edilip çoğaltılması sağlanmıştır. Daha sonra, uygun işlemler ile *vgb* gen bölgesi pETM6-PACF plazmidine aktarılmış ve oluşturulan bu yeni plazmidin (pETM6-PACF-pUC8:15) patojenik olmayan *E. coli* (C2987) suşuna transferi gerçekleştirilmiştir.

Oluşturulan *E. coli* *kfo*<sup>+</sup>-*vgb*<sup>+</sup> rekombinant suşundan elde edilen kondroitinin HPLC ve NMR analizleri ile moleküler yapı tayini gerçekleştirilmiştir. Daha sonra ise seçici sülfasyon yöntemi ile sülfatlama işlemi uygulanarak kondroitin sülfat üretilmiştir. Bu ürünün moleküler yapısı yine HPLC ve NMR analizleri ile kanıtlanmıştır. Analiz sonuçlarına göre; elde edilen kondroitin ve kondroitin sülfat sırasıyla **203.0** ve **269 Da** molekül ağırlığına (MA) sahiptir.

Kondroitin ve kondroitin sülfat içeren preparatların düşük MA değerinde, oral alım sonrası daha yüksek düzeyde absorbe edilerek tıp uygulamalarında daha etkin olduğu bilinmektedir. Sonuçlarımız; ülkemizde bu konuda mevcut araştırma eksikliğine katkı sağlayacak niteliktedir. Özgün ve yeni bir suştan elde edilen KS, güvenilir, yüksek saflıkta KS üretimi için yaygınlaştırılabilir ve tercih edilebilir bir değere sahiptir.

Ürettiğimiz mikrobiyal KS, nütrosötik ve farmasötik özellik ve etkisinin araştırılmasına yönelik yapılacak daha sonraki deneysel çalışmalar için önemli bir kaynak olma potansiyeli taşımaktadır.

ANAHTAR KELİMELER: *Vitreoscilla*, *vgb*, pUC8:15, pETM6-PACF, biyoteknolojik kondroitin, kondroitin sülfat.

# ABSTRACT

Ph. D. Thesis

PRODUCTION OF MICROBIAL CHONDROITIN SULPHATE WITH *vgb*<sup>+</sup>  
RECOMBINANT *E. coli* STRAIN

Esra Nezafed ÜLKE

İnönü University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Biology

116 + x pages

2019

Supervisor: Assist. Prof. Ayşe Şebnem ERENLER

In this thesis; it is aimed to produce chondroitin sulfate (CS) which is a product derived from glycosaminoglycan has various applications in medicine, veterinary, pharmaceutical and cosmetics fields due to its unique features, from a new and recombinant microbial source by using reliable biotechnological methods instead of known animal sources.

Within the scope of the work; first, the plasmid pUC8:15, carrying the gene *vgb*, was isolated from *E. aerogenes* [pUC8:15] strain and replicated. Then, by appropriate procedures, the *vgb* gene region was transferred to pETM6-PACF plasmid and this new plasmid (pETM6-PACF- pUC8:15) was transferred to the non-pathogenic *E. coli* (C2987) strain.

Molecular structure determination of chondroitin obtained from the recombinant strain of *E. coli kfo*<sup>+</sup>-*vgb*<sup>+</sup> was performed by HPLC and NMR analysis. Then, chondroitin sulfate was produced by sulfation process via selective sulfation method. The molecular structure of this product was also confirmed by HPLC and NMR analysis. According to the analysis results the chondroitin and chondroitin sulfate obtained have a molecular weight of **203.0** and **269 Da**, respectively.

It is known that preparations containing chondroitin and chondroitin sulphate with low MA are absorbed at higher levels after oral intake and are more effective in medical applications. Our results will contribute to overcome the lack of research on this subject in our country. KS obtained from a unique and new strain has a generalizable and preferable value for reliable, high purity KS production.

The microbial KS we produce has the potential to be an important source for further experimental studies to investigate the nutritional and pharmaceutical properties and effects.

**KEYWORDS:** *Vitreoscilla*, *vgb*, pUC8:15, pETM6-PACF, biotechnological chondroitin, chondroitin sulfate.

## TEŞEKKÜR

Doktora tezimin sonlandırılmasına yaklaştığım bu günlerde sevinç ve hüznü bir arada yaşamaktayım. Çalışmalarımı yaptığım dönemde ciddi sağlık sorunları yaşarken bu zamanlara evliliğim ve kızım gibi çok güzel olayları da sığdırdım. Tez sürecimin yanında, hayatımdaki zorluklarla da mücadele ettim. Ve şimdi emeklerimizin karşılığını alma vakti... Bu dönemde hem tezimde karşılaştığım zorluklarda kıymetli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösterici olan hem de sağlık sorunlarımda ve hayatımdaki güzel gelişmelerde yanımda olup bana destek olan değerli Danışman Hocam Dr. Öğrt. Üyesi Ayşe Şebnem ERENLER'e teşekkürü bir borç bilirim. Değerli danışman hocam bana hep inandı ve güvendi. Tüm zorlukları beraber atlattık biz. Ben kendimden vazgeçtiğim anlarda bile o benden vazgeçmedi. Bu yüzden ona sonsuz minnettarım.

Çalışmalarım boyunca bilgi ve tecrübeleri ile bana yardımcı olan Değerli Hocalarım Prof. Dr. Süleyman KÖYTEPE'ye ve Prof. Dr. Dilek ASMA'ya,

Tez savunma sınavımda değerli bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan Kıymetli Hocalarım Dr. Öğrt. Üyesi Aysel UÇKUN'a ve Dr. Öğrt. Üyesi Miraç UÇKUN'a,

Tez çalışmalarım boyunca bana destek olan değerli arkadaşlarım, Samet UÇAR'a ve Aygün ALİYEVA'ya,

Her daim maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen canım aileme ve tüm sıkıntılarında ve başarılarımda beni yalnız bırakmayan eşimin ailesine,

Her sıkıntıda bana destek olup her zorluğu beraber atlattığım, dünyanın en düşünceli en vicdan sahibi insanı; Canım eşime ve hayatıma bambaşka güzellikler katıp yaşam kaynağım olan, hayatımın en güzel en özel detayı; Biricik kızım "Yağmur Ada"ya,

Bu tez çalışmasını 215S861 nolu projeye destekleyen TUBİTAK'a,

teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT .....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	x
1. GİRİŞ .....	1
1.1. Glikozaminoglikan (GAG).....	3
1.2. Kondroitin Sülfat (KS).....	5
1.3. Mikrobiyal Kondroitin.....	8
1.3.1. Bakteriyel kapsüler polisakkaritler (KPS) .....	8
1.3.2. <i>E. coli</i> bakteriyel kapsüler polisakkariti.....	11
1.4. Kondroitin Sülfatın Mikrobiyal Üretimi .....	19
1.4.1. Kondroitin üreten mikroorganizmalar.....	19
1.5. Çalışmamızda Kullanılan Vektörler ve Özellikleri.....	21
1.5.1. pETM6-PACF plazmidi .....	21
1.5.2. pUC8:15 plazmidi .....	22
1.6. <i>Vitreoscilla</i> Hemoglobin .....	23
1.7. Kondroitin Sülfat Ekstraksiyonu ve Saflaştırma İşlemleri.....	25
1.7.1. Seyreltik alkali-enzimatik hidroliz.....	26
1.7.2. Seyreltik alkali-iki aşamalı enzimatik hidroliz .....	27
1.7.3. Mekanokimyasal destekli ekstraksiyon yöntemi .....	27
1.7.4. Ultrason destekli ekstraksiyon yöntemi .....	27
1.7.5. Organik çözücü ile çöktürme.....	28
1.7.6. Kuaterner amonyum tuzlarıyla çöktürme yoluyla fraksiyonlama .....	28
1.7.7. Kolon kromatografisi .....	28
1.7.8. Membran ayırma işlemleri .....	29
1.8. Kondroitin Sülfatın Mikrobiyal Üretim Yöntemleri.....	29
1.9. Üretilen Mikrobiyal KS'ın Analiz Edilmesi .....	30
1.10. Kondroitin Sülfat Uygulamaları.....	31
1.10.1. Antiviral ve antienfektif olarak potansiyel kullanım .....	31
1.10.2. Doku rejenerasyonunda ve mühendislikte KS .....	31
1.10.3. Kanser tanısındaki ve tedavisindeki ilişkisi .....	32
2. KAYNAK ÖZETLERİ .....	33

3.	MATERYAL VE YÖNTEM .....	45
3.1.	Çalışmada Kullanılan Kimyasallar .....	45
3.2.	Çalışmada Kullanılan Bakteriler ve Saklama Koşulları.....	45
3.3.	Çalışmada Kullanılan Besiyerleri .....	46
3.4.	Çalışmada Kullanılan Çözeltiler .....	46
3.5.	Kullanılan Plazmidler .....	47
3.5.1.	pETM6-PACF plazmidi .....	47
3.5.2.	pUC8:15 plazmidi .....	49
3.6.	pETM6-PACF- pUC8:15 Plazmidinin Oluşturularak <i>E. coli</i> Suşuna Aktarılması ve Klonlamayı Doğrulayan Agaroz Jel Elektroforezi .....	50
3.7.	<i>E. coli kfo<sup>+</sup>-vgb<sup>+</sup></i> Rekombinant Bakterinin Üreme Eğrisi .....	53
3.8.	Mikrobiyal Kondroitin Üretimi.....	53
3.9.	Kondroitin Numunelerinin HPLC-MS Analizleri.....	54
3.10.	Kondroitin Numunelerinin NMR ile Karakterizasyonu ve Disakkarit Analizi .....	56
3.11.	Mikrobiyal Kondroitin Üretim Düzeyi Araştırması.....	57
3.12.	Mikrobiyal Kondroitin Sülfat Üretimi .....	57
4.	ARAŞTIRMA BULGULARI .....	59
4.1.	Araştırmada Kullanılan Plazmidlerin Karakterizasyonları .....	59
4.1.1.	pETM6-PACF plazmidi .....	59
4.1.2.	pUC8:15 plazmidi .....	66
4.2.	<i>E. coli</i> 'nin Transformasyon Öncesi Doğrulama Jel Görüntüleri: .....	71
4.2.1.	pETM6-PACF plazmidi jel görüntüsü .....	71
4.2.2.	pUC8:15 plazmidi jel görüntüsü .....	72
4.3.	pETM6-PACF- pUC8:15 Plazmidinin Transformasyonunu Doğrulayan Agaroz Jel Elektroforezi.....	72
4.4.	<i>E. coli kfo<sup>+</sup>-vgb<sup>+</sup></i> Rekombinant Bakterinin Üreme Eğrisi .....	74
4.5.	Mikrobiyal Kondroitin Üretimi.....	75
4.6.	Kondroitin Numunelerinin HPLC-MS Analizleri.....	78
4.7.	Kondroitin Numunelerinin NMR ile Karakterizasyonu ve Disakkarit Analizi .....	81
4.8.	Mikrobiyal Kondroitin Üretim Düzeyi Araştırması.....	83
4.9.	Mikrobiyal Kondroitin Sülfat Üretimi .....	84
4.10.	Kondroitin Sülfat Numunelerinin HPLC-MS Analizleri .....	86
4.11.	Kondroitin Sülfat Numunesinin NMR ile Karakterizasyonu ve Disakkarit Analizi .....	91
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ .....	94
6.	KAYNAKLAR .....	102



## SİMGELER VE KISALTMALAR

g L <sup>-1</sup>	Litre başına gram
Ω	Ohm
kV	Kilovolt
mF	Milifarad
rpm	Dakikada dönme sayısı
GAG	Glikozaminoglikan
HA	Hiyalüronik asit
KS	Kondroitin sülfat
DS	Dermatan sülfat
GlcA	Glukuronik asit
GalNAc	N-asetilgalaktozamin
<i>vgb</i>	<i>Vitreoscilla</i> hemoglobin geni
VHb	<i>Vitreoscilla</i> hemoglobin
<i>E. aerogenes</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>
<i>Ea</i> [pUC8:15]	<i>E. aerogenes</i> bakterisinin <i>vgb</i> genini içeren rekombinanti
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>kfA, kfoC, kfoF</i>	<i>E. coli</i> K4 suşunun kapsüler kondroitin sentezinden sorumlu genleri
LPS	Lipopolisakkarit
EPS	Ekzopolisakkarit
nm	Nanometre
MurNAc	N-Asetilmuramik asit
GlcNAc	N-Asetilglukozamin
UDP	Üridin difosfat
GlcN	Glukozamin
kb	Kilobaz
bp	Baz çifti
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
MS	Kütle Spektrometresi
ELISA	Enzim-bağlı immünosorbent

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	KS'ın temel yapısı .....	6
Şekil 1.2.	Tipik bir gram negatif bakterinin bakteriyel hücre duvarını oluşturan tabakaların şematik gösterimi .....	10
Şekil 1.3.	ABC taşıyıcıya bağlı yol vasıtasıyla KPS aktarım modeli .....	13
Şekil 1.4.	UDP-GlcNAc'lı <i>E. coli</i> K4 kondroitin sentazın kristal yapısı .....	14
Şekil 1.5.	N- ve C-terminal hegzapeptitleri arasındaki etkileşimi gösteren <i>E. coli</i> K4 kondroitin sentazın kristal yapısı .....	15
Şekil 1.6.	<i>E. coli</i> K4'ün transmisyon elektron mikroskopisi .....	16
Şekil 1.7.	ABC-taşıyıcıya bağlı KPS'yi eksprese eden gram-negatif bakterilerdeki <i>kps</i> geni lokusu birleşme yolları .....	18
Şekil 1.8.	<i>E. coli</i> K4'de kapsüler polisakarit sentezi .....	19
Şekil 1.9.	pETM6-PACF plazmidi .....	22
Şekil 1.10.	pUC8:15 plazmidi .....	23
Şekil 1.11.	VHb ve promotorunun potansiyel uygulamaları .....	25
Şekil 3.1.	pETM6-PACF plazmidi .....	49
Şekil 3.2.	pUC8 ve pUC8:15 plazmidlerinin fiziki haritası .....	50
Şekil 3.3.	2-aminoakridon (AMAC) ve sodyum siyanoborohidrit ile indirgeyici aminleme yoluyla sakkarit floro-etiketlemesinin şematik gösterimi .	56
Şekil 4.1.	pETM6-PACF operatör ve promotor bölgeleri .....	65
Şekil 4.2.	pETM6-PACF plazmidi restriksiyon enzimi kesim bölgeleri haritası	66
Şekil 4.3.	pUC8:15 <i>vgb</i> gen bölgesi.....	70
Şekil 4.4.	pUC8:15 plazmidi restriksiyon enzimi kesim bölgeleri haritası .....	70
Şekil 4.5.	pETM6-PACF plazmidi jel görüntüsü .....	71
Şekil 4.6.	pUC8:15 plazmidinin jel görüntüsü .....	72
Şekil 4.7.	<i>vgb</i> geni jel görüntüsü.....	73
Şekil 4.8.	pETM6-PACF-pUC8:15 plazmidi genetik haritası .....	73
Şekil 4.9.	pETM6-PACF-pUC8:15 plazmidi jel görüntüsü.....	74
Şekil 4.10.	<i>E. coli kfo<sup>+</sup>-vgb<sup>+</sup></i> rekombinant bakterinin zamana bağlı üreme grafiği	75
Şekil 4.11.	Kondroitin üretimi prosesinde örneklere uygulanan alkolle çökeltme işlemi .....	76
Şekil 4.12.	Vakumla liyofilize edilmesi için hazırlanan örnekler.....	77
Şekil 4.13.	<i>E. coli kfo<sup>+</sup>-vgb<sup>+</sup></i> rekombinant bakterisi ile elde edilen mikrobiyal kondroitin .....	78
Şekil 4.14.	<i>E. coli kfo<sup>+</sup>-vgb<sup>+</sup></i> suşundan elde edilen kondroitinin HPLC-MS spektrum analizi.....	79
Şekil 4.15.	<i>E. coli kfo<sup>+</sup>-vgb<sup>+</sup></i> suşundan elde edilen kondroitinin HPLC-MS kromatogram analizi .....	79



<b>Şekil 4.16.</b>	Rekombinant <i>E. coli</i> O5:K4:H4 suşu ile üretilen biyoteknolojik kondroitinin HPLC kromatogramı .....	80
<b>Şekil 4.17.</b>	Kondroitinin disakkarit analizi kromatogramı .....	80
<b>Şekil 4.18.</b>	Mühendisliği yapılan <i>E. coli</i> BL21 suşu ile üretilen kondroitinin disakkarit HPLC-MS spektrumu .....	81
<b>Şekil 4.19.</b>	Konak organizma olarak <i>E. coli</i> JM109 suşunun kullanıldığı rekombinant DNA teknolojisi ile oluşturulan suşta üretilen kondroitine ait HPLC-MS spektrum. ....	81
<b>Şekil 4.20.</b>	<i>E. coli kfo<sup>+</sup>-vgb<sup>+</sup></i> suşundan elde edilen kondroitinin NMR spektral analizi .....	82
<b>Şekil 4.21.</b>	Metabolik olarak mühendisliği yapılmış <i>B. subtilis</i> suşundan üretilen kondroitinin NMR analizi .....	82
<b>Şekil 4.22.</b>	Metabolik olarak mühendisliği yapılmış <i>E. coli</i> suşundan üretilen kondroitinin NMR analizi .....	83
<b>Şekil 4.23.</b>	<i>E. coli kfo<sup>+</sup>-vgb<sup>+</sup></i> suşunun kondroitin (supernatan), kondroitin (toplam) üretim seviyesi ve OD <sub>600</sub> verileri .....	84
<b>Şekil 4.24.</b>	<i>E. coli kfo<sup>+</sup>-vgb<sup>+</sup></i> suşundan üretilen kondroitin sülfat.....	85
<b>Şekil 4.25.</b>	<i>E. coli kfo<sup>+</sup>-vgb<sup>+</sup></i> suşundan üretilen kondroitin ve kondroitin sülfat ..	85
<b>Şekil 4.26.</b>	<i>E. coli kfo<sup>+</sup>-vgb<sup>+</sup></i> suşundan üretilen KS'ın HPLC-MS analiz sonuçları .....	86
<b>Şekil 4.27.</b>	Sığır trakesi kaynaklı kondroitin sülfatın HPLC analizi sonucu .....	87
<b>Şekil 4.28.</b>	Rekombinant <i>E. coli</i> O5:K4:H4 suşu ile üretilen biyoteknolojik kondroitin sülfatın HPLC analiz sonucu. ....	88
<b>Şekil 4.29.</b>	KS disakkarit fraksiyon analizi .....	88
<b>Şekil 4.30.</b>	<i>E. coli</i> K4 suşundan elde edilen KS'a ait HPLC analiz sonucu .....	89
<b>Şekil 4.31.</b>	(a) KS-A disakkaritlerin HPLC-MS spektrumu (b) KS-C disakkaritlerin HPLC-MS spektrumu .....	89
<b>Şekil 4.32.</b>	(c) sığır KS (d) köpek balığı KS .....	90
<b>Şekil 4.33.</b>	Sığır trakesi kaynaklı KS'a ait HPLC analiz sonucu .....	90
<b>Şekil 4.34.</b>	Domuz kıkırdağından ekstre edilen KS disakkaritinin HPLC-MS analiz sonucu .....	90
<b>Şekil 4.35.</b>	Sığır trakesinden, köpek balığı kıkırdağından, domuz trakesinden ve <i>Bacillus natto</i> suşundan elde edilen KS'a ait HPLC-MS analiz sonuçları .....	91
<b>Şekil 4.36.</b>	<i>E. coli kfo<sup>+</sup>-vgb<sup>+</sup></i> suşundan elde edilen KS'a ait NMR sonuçları.....	91
<b>Şekil 4.37.</b>	Sığır trakesi kaynaklı KS'a ait NMR sonucu .....	92
<b>Şekil 4.38.</b>	<i>Andrias davidianus</i> kıkırdağından çıkarılan KS'a ait NMR analiz sonucu.....	92
<b>Şekil 4.39.</b>	KS'a ait NMR spektral analiz .....	93
<b>Şekil 4.40.</b>	Domuz kıkırdağından ekstre edilen KS disakkaritinin NMR analiz sonucu.....	93

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1.	GAG'ların yapıları.....	4
Çizelge 1.2.	Kondroitin sülfatta bulunan tipik disakkarit alt üniteleri.....	6
Çizelge 1.3.	Kondroitin üreten bakteriler .....	20
Çizelge 3.1.	LB besiyeri içeriği (g L <sup>-1</sup> ).....	46
Çizelge 3.2.	Kondroitin üretiminde kullanılan parçalama tamponu.....	46
Çizelge 3.3.	HPLC-MS analizinde kullanılan parçalama tamponu .....	47
Çizelge 3.4.	Tris-NaCl-İmidazol çözeltisi .....	47
Çizelge 3.5.	Enzim kesimi için hazırlanan miktarlar .....	51
Çizelge 3.6.	Ligasyon için kullanılan maddeler ve miktarları.....	52



## 1. GİRİŞ

Mikrobiyal polisakkaritlerin üretimi, önemli bir biyoteknolojik ürün olarak oldukça önem kazanmış ve yakın dönemde bu konu ile ilgili önemli çalışmalar yapılmıştır. Çeşitli patojenik bakterilerin, zor çevre koşullarına karşı bariyer olarak görev yapan ve invazif enfeksiyonlar sırasında savunmaya yönelik olan kapsüller polisakkaritler ürettikleri bilinmektedir. Bu kapsüller genellikle glikozaminoglikan (GAG) benzeri polimerler içermektedir [1,2]. Ökaryotlarda ise GAG'lar, hücre dışı matriksin önemli yapısal elemanlarından. Hücre dışı matriks; hücreleri bir arada tutan ve her bir hücreye besin ve oksijen difüzyonu için gözenekli bir kanal sağlayan, hayvan dokularında hücre dışı boşluğu dolduran jel benzeri bir yapıdır. Bu yapı; lifli proteinler (kollajen, elastin, fibronektin ve laminin) ve heteropolisakkaritler yani GAG'lerden oluşmaktadır [1,3]. Bu heteropolisakkaritler, tekrarlayan disakkarit birimlerinden oluşan dallanmamış polisakkarit zincirleridir. Tekrarlayan disakkaritteki iki şeker kalıntısından biri, çoğu durumda sülfatlanmış bir amino şekeri (N-asetilglukozamin veya N-asetilgalaktozamin) olduğu için GAG'lar olarak adlandırılmaktadır [4]. Genellikle galaktoz içeren dermatan sülfat hariç diğerlerinde ikinci şeker bir üronik asittir (glukuronik veya iduronik). GAG'lar, şeker artıklarının çoğunda, sülfat veya karboksil gruplarının varlığı nedeniyle yüksek oranda negatif yüklüdürler. Disakkarit bileşimine, bağlantı tipine ve sülfat gruplarının varlığına bağlı olarak, GAG'lar, dört ana gruba ayrılmışlardır: 1. Hiyalüronik asit (HA) 2. Kondroitin sülfat (KS) ve dermatan sülfat (DS) 3. Heparan sülfat ve heparin 4. Keratan sülfat [5,6]. HA, heparin ve KS gibi GAG'lar, olağanüstü özellikleri nedeniyle, tıp, veterinerlik ve kozmetik alanında çeşitli uygulamalara sahiptirler [1].

KS; tekrarlayan disakkarit birimi (4GlcA $\beta$ 1-3GalNAc $\beta$ 1-; GlcA, glukuronik asit; GalNAc, N-asetilgalaktozamin) içeren, homopolimerik bir GAG'dır [1]. KS; anti enflamatuar, antitrombotik, antikoagülan, antioksidan etkisi ile bilinmektedir. Ayrıca, kemik oluşumunu desteklemede, kemik iyileşme sürecini hızlandırmada, anjiyogenez ve tümör büyümesini bloke etmede, kan lipidlerini düzenlemede, ateroskleroza iyileştirmede, santral sinir sisteminin onarımında ve rejenerasyonunda ve eklem ile ilişkili patolojilerde yararlı olduğuna dair çalışmalar rapor edilmiştir [7-10]. KS, yapısal olarak çeşitlilik gösterir ve bu çeşitliliğin, KS'nin biyoaktivitesi ve fonksiyonu üzerindeki etkileri önemlidir. KS ile ilgili mevcut araştırmalar, temel

olarak fonksiyonel gıda (veya gıda takviyesi), tıp, eczacılık, biyomalzeme, kozmetik vb. alanlarına yöneliktir [11-14].

Besin takviyeleri dahil olmak üzere birçok uygulamada kullanılan mevcut kondroitin sülfat preparatları sığır, domuz, kuş ve balık gibi çeşitli hayvansal dokulardan ekstraksiyon yolu ile elde edilmektedir [6,15-17]. Fakat sığırlarda deli dana hastalığı ve şap hastalığı riski, kuşlarda influenza riski, balıklarda muhtemel alerjik reaksiyonlar ve diğer hastalık kaynağı olabilecek ajanların (bakteri kalıntıları, virüsler ve prionlar) olası varlığı sebebi ile bu kaynaklardan üretilen KS'li ürünler, tüketiciler için güvenlik endişesi yaratmaktadır [12,18]. Ayrıca bu tür ürünlerde, nükleik asitler, proteinler ve diğer (makro) moleküllerin yanı sıra başka polisakkaritlerin neden olabileceği kontaminasyon riski de vardır. Kondroitin sülfat üretimine dair bu potansiyel sorunlar, araştırmacıları, alternatif kaynak arayışına yönlendirmiştir [19,20]. Bu alternatif üretim yöntemlerinden son zamanlarda en dikkat çeken, KS'ın mikrobiyal kaynaklardan üretimidir [15,18,21].

Metabolik mühendisliğin, endüstriyel açıdan önemli çeşitli farmasötik ve nutrasötik üreten mikrobiyal türler geliştirmek için kullanıldığı bilinmektedir. Çalışmamızda; metabolik mühendislik yoluyla, rekombinant bir mikroorganizma suşu tasarlanarak, biyoteknolojik kondroitin sülfat üretimi gerçekleştirilmiştir. Tasarladığımız rekombinant bakteri, üzerinde taşıdığı kondroitin sentez genlerine ek olarak, büyüme ve çoğalma karakteristiklerinde ve metabolit üretiminde sağladığı avantajları birçok çalışma ile kanıtlanan *Vitreoscilla* hemoglobin (*vgb*) genini de üzerinde bulundurmaktadır. Böylece daha verimli ve özgün bir kondroitin üretimi sağlanmıştır. Bu çalışmada; kondroitin üretim suşu olarak patojen olmayan bir suş kullanılmıştır. KS üretim sürecimiz temel olarak şu 7 adımı içermektedir:

(1) *Enterobacter aerogenes* (*E. aerogenes*) (NRRL (ARS Culture Collection) B-427) bakterisinin *vgb* genini içeren rekombinantı *Ea* [pUC8:15] suşundan, bu genin izole edilmesi (2) *vgb* geninin, *Escherichia coli* (*E. coli*) K4 suşunun sadece kapsüler kondroitin sentezinden sorumlu genlerini [*kfoA*, *kfoC* ve *kfoF* genleri] üzerinde taşıyan pETM6-PACF plazmidine aktararak, kondroitin üretiminde, temel plazmid olarak kullanılacak pETM6-PACF-pUC8:15 plazmidinin oluşturulması (3) pETM6-PACF-pUC8:15 plazmidinin *E. coli* (C2987) suşuna entegre edilerek kondroitin kaynağı bir suşun oluşturulması (4) Uygun optimizasyon stratejisi

geliştirilerek bu rekombinant *E. coli* suşlarının kültürlenmesi (5) Kondroitinin kültürden toplanması-uygun teknikler ile moleküler yapının analiz edilip doğrulanması (6) Kondroitinin seçici olarak sülfatlanması-uygun teknikler ile moleküler yapının analiz edilip doğrulanması (7) Elde edilen kondroitin sülfatın, literatür araştırmalarına dayalı olarak, özgünlüğünün ve çeşitli alanlardaki kullanılabilirliğinin tartışılması.

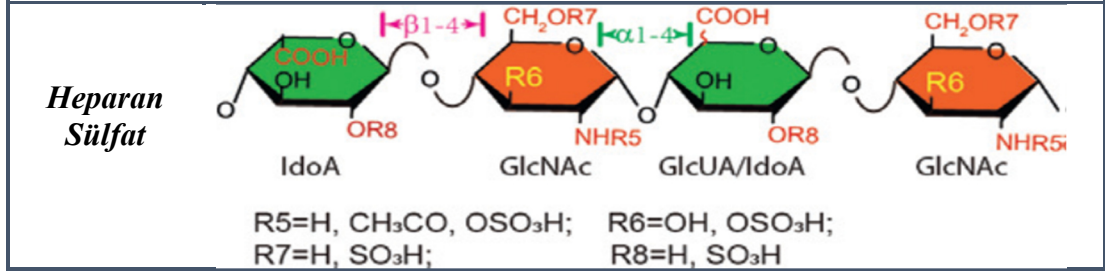
### **1.1. Glikozaminoglikan (GAG)**

GAG'lar; hücre yüzeyi ve hücre dışı matrisi üzerinde yaygın olarak dağılan ve çeşitli fizyolojik süreçlerde yer alan negatif yüklü asidik polisakkaritlerdir. Bu polisakkaritler, kozmetikte, sağlıkta ve trombüs, osteoartrit, romatizma ve kanser gibi klinik tedavilerdeki çeşitli uygulamalarda kullanım potansiyeline sahiptir [12-14]. Monosakkarit bileşenlerine, glikozit bağlarına ve sülfasyon modellerine göre GAG'lar dört gruba ayrılmaktadırlar: hiyalüronik asit, kondroitin sülfat/dermatan sülfat (KS'in bir stereoizomeri), heparin/heparan sülfat (düşük sülfasyonlu bir heparin türü) ve keratan sülfat (Çizelge 1.1.) [22].

Çizelge 1.1. GAG'ların yapıları [22]

İsim	Tetrasakkarit yapısı
<i>Hyalüronik asit</i>	<p>GlcUA      GlcNAc      GlcUA      GlcNAc</p>
<i>Kondroitin Sülfat</i>	<p>GlcUA      GalNAc      GlcUA      GalNAc</p> <p>R3=OH, OSO<sub>3</sub>H;    R4=CH<sub>2</sub>OH, CH<sub>2</sub>OSO<sub>3</sub>H</p>
<i>Dermatan Sülfat</i>	<p>GlcUA/IdoA      GalNAc      GlcUA/IdoA      GalNAc</p> <p>R3=OH, OSO<sub>3</sub>H;    R4=CH<sub>2</sub>OH, CH<sub>2</sub>OSO<sub>3</sub>H</p>
<i>Heparin</i>	<p>GlcUA      GlcNAc      GlcUA/IdoA      GlcNAc</p> <p>R5=H, CH<sub>3</sub>CO, OSO<sub>3</sub>H;    R6=OH, OSO<sub>3</sub>H; R7=H, SO<sub>3</sub>H;                    R8=H, SO<sub>3</sub>H</p>

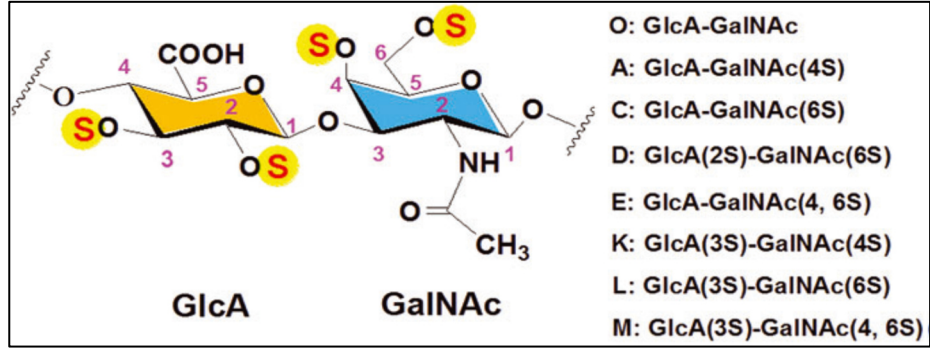
Çizelge 1.1. Devam



## 1.2. Kondroitin Sülfat (KS)

KS fonksiyonel olarak; ökaryotik hücre yüzeyinin ve hücre dışı matriksin bir bileşenidir. GAG ailesinin bir üyesi olan KS, köken aldığı dokulara göre hem moleküler ağırlık hem de sülfat deseni açısından değişim gösteren, doğrusal, asidik bir polisakkarittir. İnsanlarda, kondroitin sülfat Tip A, bağ dokularında ve hücre dışı matriksde, örneğin; kıkırdak, kornea, kemik, deri ve arter duvarlarında yaygın olarak bulunmaktadır [6]. KS ayrıca proteoglikanlar olarak da bulunmakta, sentezlenmekte ve spesifik çekirdek proteinlerine bağlanmaktadır [23]. KS'nin kıkırdak dokularını koruyucu bariyer özelliği ve eklemleri kayganlaştırma fonksiyonu kanıtlanmıştır bu nedenle antiartrit ve osteoartrit ilacı olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır [24].

Yapısal olarak; KS,  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) glikozidik bağlar ile bağlanmış N-asetilgalaktozaminin (GalNAc) ve glukuronik asidin (GlcA) tekrarlayan disakkarit birimlerinden oluşan polimerik bir karbonhidrattır [6,25] ve farklı karbon pozisyonlarında sülfatlanmaktadır (ChS-O; KS'nin sülfatsız halidir) (Şekil 1.1) [11]. En yaygın sülfasyon modelleri Çizelge 1.2.'de listelenmiştir [11]: GalNAc birimlerinin yaygın olarak 4 ve/veya 6 pozisyonları sülfatlanırken, GlcA ünitelerinin nadiren 2 veya 3 pozisyonları sülfatlanmaktadır. Bununla birlikte, hayvan kaynaklarından elde edilen KS'lar genellikle farklı sülfasyon desenlerinin bir kombinasyonuna sahiptir. Yakın zamandaki çalışmalarda, KS'nin, sakkarit omurgasında bulunan sülfat dizilerine ait fonksiyonel bilgileri spesifik olarak kodlayabildiği öne sürülmüştür. Bu dizilim, in vivo olarak kompleks bir şekilde düzenlenmiş gibi görünmektedir ve dokuya/yaşa özgüdür. Ancak, bu "sülfasyon kodunun" ayrıntıları henüz tam olarak açıklığa kavuşturulmamıştır [25].



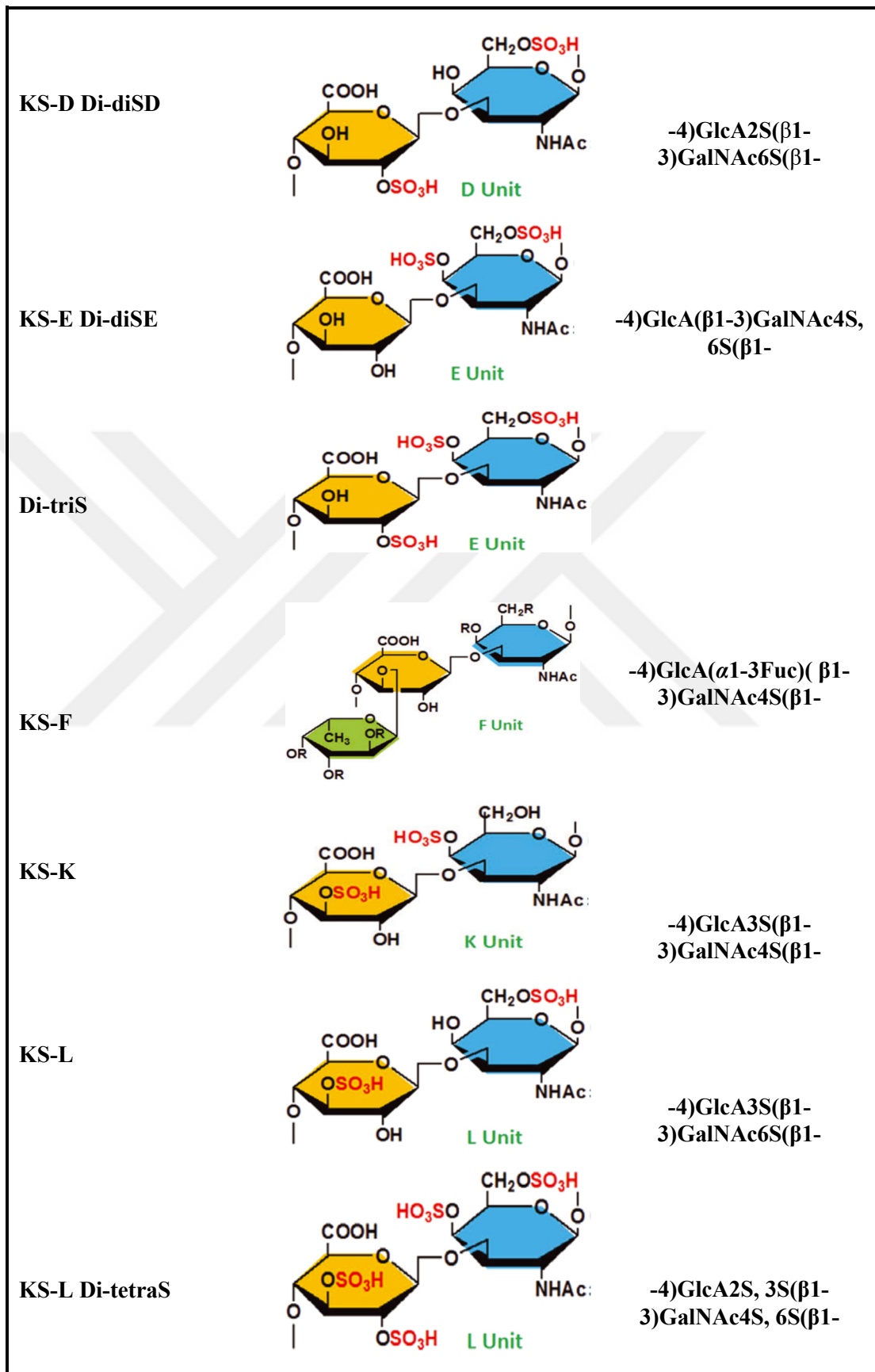
Şekil 1.1. KS'in temel yapısı [11]

Çizelge 1.2. Kondroitin sülfatta bulunan tipik disakkarit alt üniteleri [11]

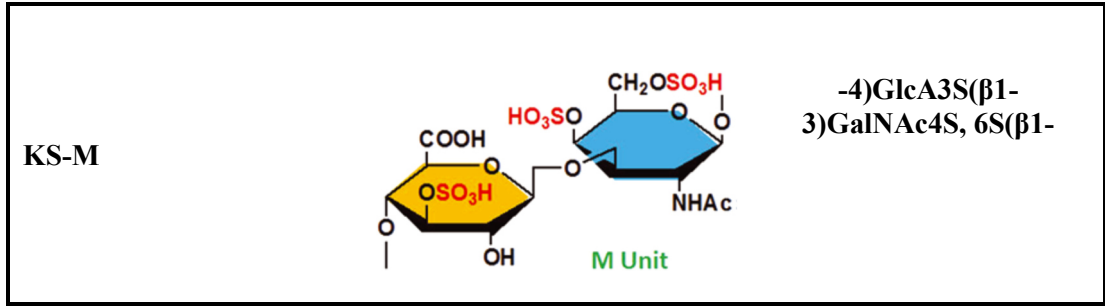
İsim	Yapı
KS-O Di-Os	<p>O Unit</p> <p>-4)GlcA(β1-3)GalNAc(β1-</p>
KS-A Di-A	<p>A Unit</p> <p>-4)GlcA(β1-3)GalNAc4S(β1-</p>
KS-B Di-B	<p>B Unit</p> <p>-4)GlcA2S(β1-3)GalNAc4S(β1-</p>
KS-C Di-C	<p>C Unit</p> <p>-4)GlcA(β1-3)GalNAc6S(β1-</p>



Çizelge 1.2. Devam



## Çizelge 1.2. Devam



### 1.3. Mikrobiyal Kondroitin

#### 1.3.1. Bakteriye kapsül polisakkaritler (KPS)

Hücre yüzey polisakkaritleri, çeşitli bakteriyel türler tarafından üretilen kompleks karbonhidratlardır [2]. Bunlar; hücre yüzeyine bağlanma türüne ve davranışlarına göre üç kategoride sınıflandırılmaktadır: Lipopolisakkaritler (LPS), kapsül polisakkaritler (KPS) ve ekzopolisakkaritlerin (EPS) bir parçası olan O-antijenleri. LPS'ler, bir oligosakkarit çekirdeği ve gram-negatif bakterilerin dış hücre membranı üzerinde O-antijenlerine güçlü bir şekilde bağlanan bir lipidik bileşen (lipid-A) tarafından oluşturulmaktadır. KPS, hücre zarındaki fosfolipitlere veya lipid-A moleküllerine kovalent olarak bağlanır, fakat aynı zamanda polisakkarit ve fosfolipit membran bağlantısı arasındaki fosfodiester bağının dengesizliğinin bir sonucu olarak serbest bırakılabilirler. EPS'ler ise genellikle hücrenin etrafında şekilsiz bir tabaka oluştururlar, hücre yüzeyine kovalent olarak bağlanmazlar ve bu nedenle buldukları ortamda serbest bırakılmaktadırlar [1,2,26].

Bakteriyel patojenler, konakçı organizmada uygun bir yer bularak burada yerleşmesine izin verecek karmaşık fizyolojik uyarılar geliştirmişlerdir. Patojen bir mikroorganizmanın enfektivitesi; konakçı organizmaya girme kabiliyeti ile yayılabilme ve çoğalabilme olmak üzere iki bileşenden oluşmaktadır. Bu işlemlerden biri veya daha fazlası için gerekli olan hücresel bileşenler: "Virülans faktörleri" olarak adlandırılmaktadır. Gram-negatif patojenlerde, bunlar: flagella (ve ilişkili) kemotaksis proteinleri, fimbrial adhezinler, salgılanan proteinler, LPS ve kapsüller olmak üzere önemli yüzey ve hücre dışı bileşenleri içermektedir [2,26].

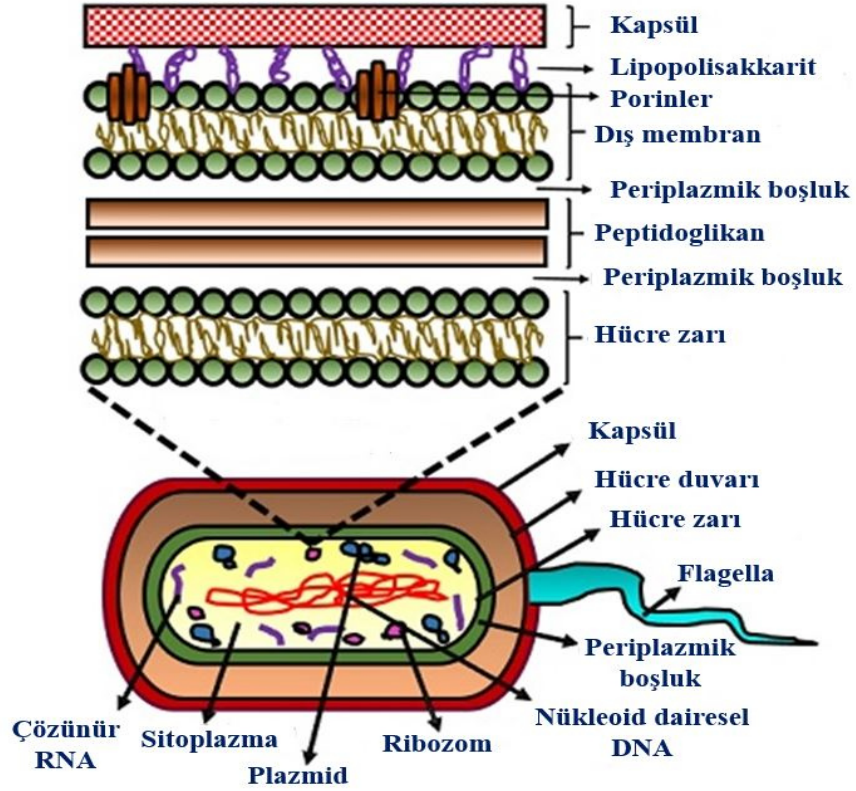
Kapsüller, *E. coli*, *Neisseria meningitidis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Sinorhizobium meliloti* türlerinin yanı sıra *Staphylococcus aureus* ve *Streptococcus*

*pneumoniae* gibi önemli gram-pozitif patojenlerde de bulunmaktadır. Bakteriyel kapsül, hücre etrafını saran geniş bir tabaka olarak mikroskop ile görülebilen hücre dışı bir yapıdır. Bazı *E. coli* izolatlarında, bu tabaka yaklaşık 100-400 nm çapındadır ve 200 şekerden daha uzun glikan zincirleri tarafından oluşturulmaktadır [2,26].

Memeli glikanları ile özdeş kapsüler polisakkaritler taşıyan bakteriyel patojenler, konakçı immün tepkisine karşı ilave bir koruma seviyesine sahiptirler. Bakterilerde antibiyotik dirençliliğinin artması ve bakteri enfeksiyonlarına karşı özellikle de çoklu ilaç direnci olan organizmalara karşı uygulanan rutin terapötik yaklaşımların yetersiz kalması, yakın gelecekte post-antibiyotik bir döneme işaret etmektedir. Çoğu bakteriyel patojenler için ilk savunma hattı, gram-pozitif bakterilerdeki hücre duvarına veya birçok gram-negatif bakteride sıklıkla dış zarın lipitlerine kovalent olarak bağlanan yaygın bir viskoz karbonhidrat tabakasından oluşan kapsül olarak bilinen fiziksel ve immünolojik bir bariyerden oluşmaktadır [2]. Bakteriyel kapsüler polisakkaritler, bağırsakta, akciğerde, idrar yolunda ve diğer konakçı dokularda, konakçı immün tepkisine yol açabilecek hücre yüzeyi bileşenlerini gizleyerek, birçok insan patojeninin virülansına katkıda bulunan, yüksek moleküler ağırlıklı polisakkaritlerin farklı bir sınıfıdır. Bu tür immünojenik olmayan tabakalar, patojenleri belirli immün tepkilere karşı duyarsız hale getirmekte, konakçı dokularda kalma süresini etkili bir şekilde arttırmakta ve patolojik popülasyon yoğunluklarına ulaşılmasını sağlamaktadır [26].

KPS'ler, hayvan konakçılarının enfeksiyonu sırasında immün sisteme karşı olmak üzere çok çeşitli çevresel baskılara karşı taşıyıcılarına koruyucu etkiler sağlayan temel virülans faktörleridir. Çok sayıda kapsüllü patojen olmasından dolayı, kapsüllerin genellikle patojenik bakteriler tarafından oluşturulduğu düşünülmektedir. Ancak patojen olmayan ve kommensal bakteriler de kapsül oluşturma özelliğine sahiptirler [27]. Gram-negatif bakterilerde, kapsüler polisakkaritler, genellikle çift tabakalı membrana yerleştirilen kovalent olarak bağlanmış lipidler aracılığıyla, indirgen ucunda, dış membrana bağlanır. Bu özellik, zor çevresel koşullar karşısında kurumaya karşı koruyan, çoğu bakteriyofajın neden olduğu enfeksiyonu bloke eden ve hücre yüzey antijenlerine girişi fiziksel olarak kısıtlayarak fagositozu ve diğer konakçı immün tepkilerini engelleyen, suya-doymuş bir yüksek moleküler ağırlıklı polisakkarit tabakası sağlamaktadır. Şekil 1.2'de tipik bir gram (-) bakterinin hücre

duvarı gösterilmektedir [28]. Mikrobiyal enfeksiyonların antibiyotik tedavisinin yerini almayı veya tedaviyi tamamlamayı amaçlayan geniş spektrumlu terapötik bileşiklerin rasyonel hedefleri bu polisakkarit tabakadır, çünkü kapsülün kaybı, bakterileri, kompleman sisteminin aktivasyonu ile devreye giren rutin immün cevaba maruz bırakmaktadır [26].



**Şekil 1.2.** Tipik bir gram negatif bakterinin bakteriyel hücre duvarını oluşturan tabakaların şematik gösterimi [28]

Gram-pozitif bakterilerin, peptidoglikan üzerinde bir dış tabakaya sahip olmaması nedeniyle, peptidoglikan tabakası gram-negatif bakterilere kıyasla daha kalındır. Lipoteikoik asitler, peptidoglikanın iç katmanlarını sitoplazmik zarı uzanan bir glikolipide bağlarken, hücre duvarıyla ilişkili teikoik asitler ise, dış tabakaları, MurNAc (N-Asetilmuramik asit) kalıntılarına kovalent bağlar vasıtasıyla bağlamaktadır. Gram-pozitif bakteriler tarafından sentezlenen KPS'ler, iç membrana, peptidoglikan içerisindeki oligopeptid çapraz bağlayıcılara veya peptidoglikan kafesindeki GlcNAc (N-Asetilglukozamin) kalıntılarına bağlanmaktadır [26]. Bazı durumlarda kapsül; GAG benzeri polimerlerden oluşmaktadır. Mikrobiyal KPS ve ökaryotik hücre dışı matriks bileşenleri arasındaki bu benzerlik, bu molekülleri

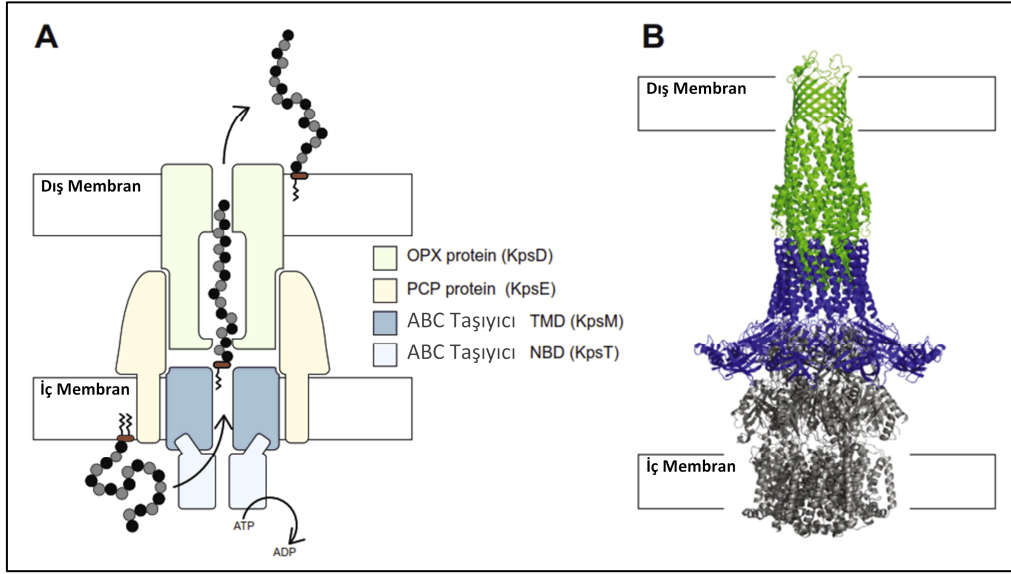
biyoteknolojik uygulamalar için oldukça ilginç kılmaktadır [1]. Bu uygulamalardan biri de; K4 kapsülünü biyosentezleyen *E. coli* suşlarının kültürlerinden bir KS öncülünün elde edilmesidir. Bu benzerlik, *E. coli* metabolizmasını yönlendirerek K4 KPS'nin biyosentezini geliştirmeye yönelik biyoteknolojik uygulamaları mümkün kılmıştır [26].

### 1.3.2. *E. coli* bakteriyel kapsüler polisakkariti

Kapsül üreten *E. coli* suşları, kapsüllü gram-negatif bakteri modelleri olarak kabul edilmiş ve kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. *E. coli* kapsüler antijenleri; oligosakkaridik bileşim, dallanma ve yük yoğunluğu bakımından farklılaşan asidik polisakkaritlerdir [1]. Bunlar; serolojik özellikleri, genetik ve biyosentez kriterleri temel alınarak dört grupta sınıflandırılmıştır. Grup I ve IV KPS yapıları, enteropatojenik (EPEC), enterotoksijenik (ETEC) ve enterohemorajik (EHEC) *E. coli* suşlarında bulunmaktadır. Grup I KPS tekrar ünitelerinde üronik asit şekerleri yaygın iken, Grup IV KPS tekrar üniteleri asetamido şekerlerinin varlığı ile karakterize edilir. Grup I ve IV KPS'ler arasındaki bu belirgin yapısal farklılığa rağmen, ikisi de polimerize edilir ve hücre yüzeyine benzer şekilde taşınırlar. Grup II ve III *E. coli* KPS'ler genel olarak ekstraintestinal enfeksiyonlar (ExPEC) ile ilişkili suşlarda üretilirken, hayvan glikanlarıyla özdeş yapıda olan, bilinen tüm *E. coli* KPS'ler Grup II'ye aittir. Grup I ve IV KPS'lerin aksine, Grup II ve III KPS'lerin tekrar birimleri yapısal olarak geniş çeşitlilik göstermekte ve ayrıca sitoplazmada tamamen polimerize edilip daha sonra hücre çeperi boyunca hücrenin dışına taşınmaktadırlar [26]. Grup II kapsüler polisakkaritler; yapısal özellikleri ve zenginlikleri açısından oldukça ilgi çekicidir. Bu gruba ait olan; *E. coli* K4 ve K5 suşları, sırasıyla, sülfatlanmamış kondroitin ve heparosana benzer yapıda olan kapsüler polisakkaritleri eksprese etmektedirler [1].

Gram-negatif bakteriler, kapsüler polisakkaritleri iki yaygın birleşme sisteminden biri ile üretmektedirler, bunlar: Wzy-bağlı ya da ATP-bağlayıcı kaseti (ABC) taşıyıcıya bağlı metabolik yol [29,30]. *E. coli*'nin kapsüler K antijenleri, bu metabolik yolların her biri için etkili modeller sunmuştur. *E. coli* kapsül sistemleri; birleşme sistemine, anahtar genlerin organizasyonuna ve düzenleyici özelliklere dayalı olarak 4 gruba ayrılmıştır. Wzy-bağlı yol, çoğunlukla gastrointestinal hastalığa neden olan izolatlarda bulunan grup 1 ve 4 kapsülleri için kullanılmaktadır [31]. Bu

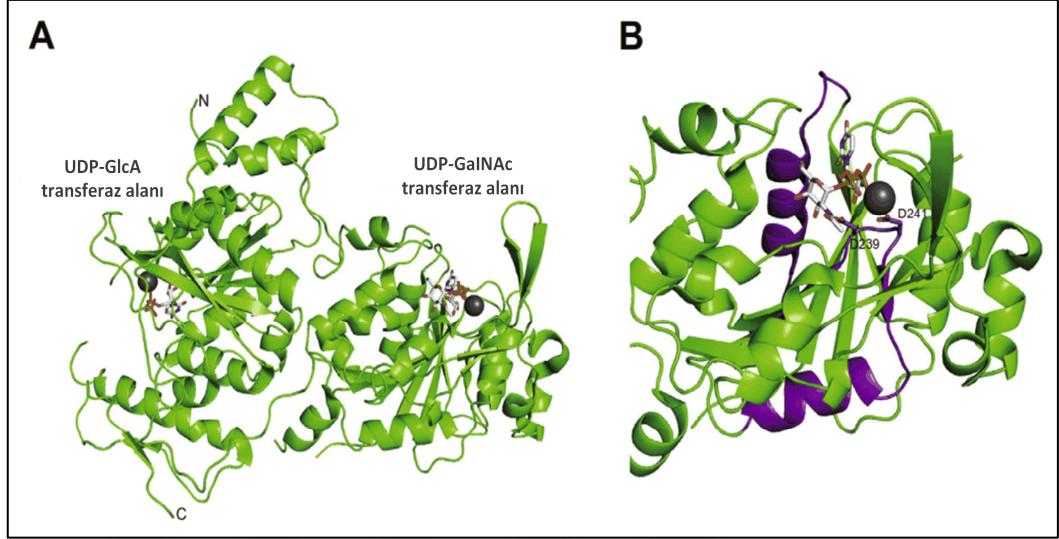
yol, sitoplazmada poliprenole bağlı KPS tekrar birimlerinin sentezini içermektedir, bunlar daha sonra bir Wzx proteini tarafından iç zar boyunca ters çevrilir ve bir Wzy proteini tarafından tam uzunluktaki KPS'ye polimerize edilir. Özel bir yoldan dışa aktarıldıktan sonra, KPS zincirleri hücre yüzeyi üzerinde bir kapsül yapısına eklenir ancak hücre yüzeyinde nasıl tutundukları tam olarak net değildir ve muhtemelen işlem çok faktörlüdür [32]. Grup 2 ve 3'e ait kapsüller ise, bir ABC- taşıyıcıya bağlı birleşme sistemi gerektirir. ABC taşıyıcıya bağlı yol ile birleştirilen KPS'lerin karakteristik özelliklerinden birisi; polisakkarit zincirinin indirgenme ucunda bir fosfolipidin varlığıdır [2]. İn vivo sentetik mekanizma; UDP (Üridin difosfat)-şeker öncüllerinin tedarikinden, polisakkarit zincirinin birleşiminden, periplazma ve hücre zarı boyunca taşınımından sorumlu olan farklı katalitik aktiviteleri içermektedir. Özellikle, sitoplazmada bulunan glikoziltransferazlar, indirgenmeyen uca kalıntıları ekleyerek yeni oluşan zinciri ilerletmektedir. Kapsüllerin biyosentezine, polimerizasyonuna ve taşınımına katılan proteinler, *kps* adı verilen genler tarafından kodlanır ve özellikle grup II *kps* lokusunun genetik organizasyonu, kapsamlı bir şekilde incelenmiştir [1]. Nükleotid bağlayıcı alan (NBD) polipeptitlerinden (*E. coli* nomenklatüründe KpsT) ve integral membran polipeptidinden (KpsM) oluşan bir ABC-taşıyıcı sistemi vasıtasıyla, KPS, sitoplazmada sentezlenir ve iç zar boyunca aktarılır. Periplazmadan hücre yüzeyine taşınımın tamamlanması, farklı iki karakteristik bileşen gerektirir: polisakkarid ko-polimeraz (PCP-3) familyasının (KpsE) bir üyesi ve bir dış zar polisakkarit (OPX) proteini (KpsD). Protein KpsD, dış zar boyunca zincirin taşıyıcısı rolünü üstlenir. Bu proteinlerin, üç bölümden oluşan ilaç akış pompalarının hareketine benzer olduğu ileri sürülen koordineli bir süreçte, sitoplazmadan hücre yüzeyine sentez ve translokasyonu sağlayan bir protein kompleksi oluşturdukları düşünölmektedir. *kpsTMED* genlerinin homologlarının varlığı, ABC taşıyıcıya bağlı KPS'lerin üretimini yönlendiren genetik lokusların ayırt edici özelliği olarak işlev görmektedir (Şekil 1.3.) [2].



**Şekil 1.3.** ABC taşıyıcıya bağlı yol vasıtasıyla KPS aktarım modeli [2]

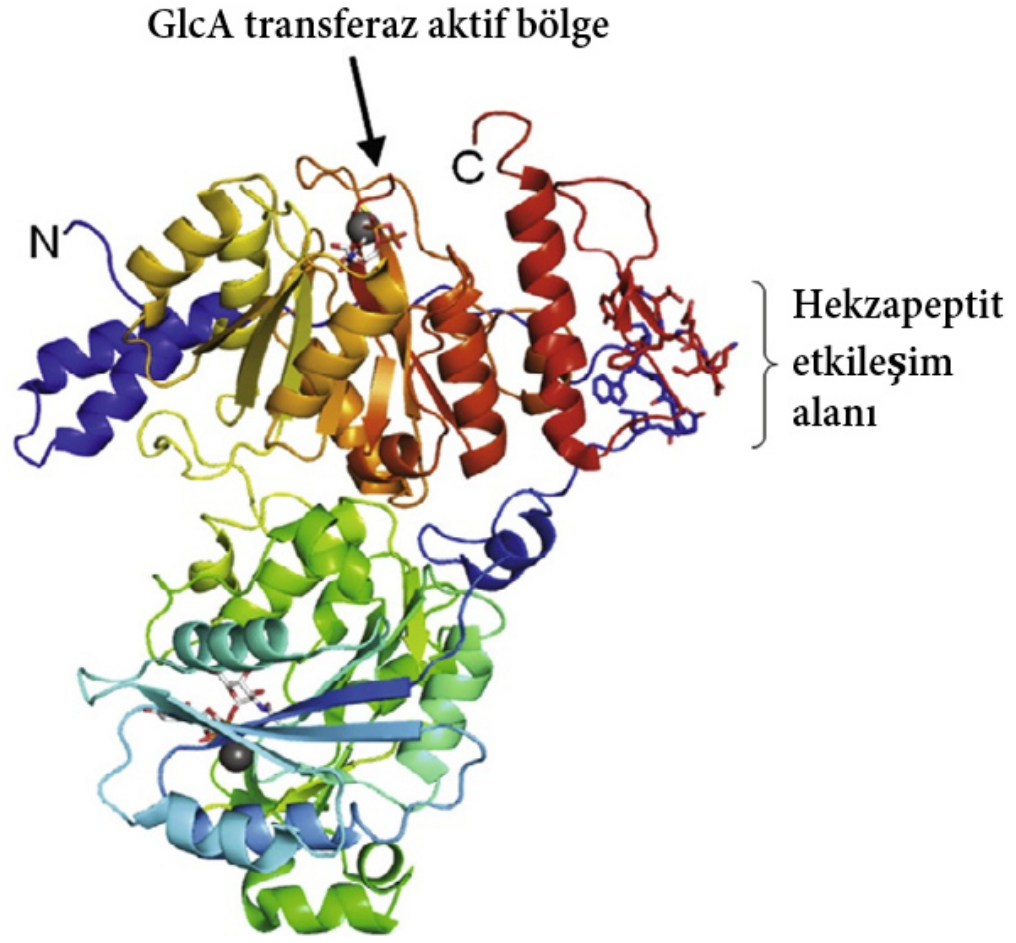
*E. coli* KPS dizi varyasyonunun çoğunluğu, N-asetilheksozamin glikoziltransferaz alanının bulunduğu bölge olan N-terminal bölgesi içinde gerçekleşmektedir. Hibrit enzimler ile yapılan deneyler sonucu, bu alanın ortasına yakın 44 aminoasitlik bir bölge bulunmuştur; bu bölge, UDP-GlcNAc özgülüğünü kontrol etmektedir. *E. coli* K4 tarafından üretilen kondroitin türevinde, KPS omurgası, GlcA'nın C3'ünde  $\beta$ -fruktoz ile modifiye edilmektedir. KfoC enzimi, kondroitin omurgasının sentezinden sorumlu iken, hala tanımlanamayan bir enzim ise polimeri fruktozilemektedir. *E. coli* K4 kondroitin sentaz, yapısı belirlenmiş olan bir ABC taşıyıcıya bağlı yol ile ilişkili tek polimerazdır (Şekil 1.4.) [2]. Neredeyse aynı iki glikoziltransferaz alanından oluşur; N terminal bölgesi; GalNAc-transferaz aktivitesini içerir iken, C terminal bölgesi; GlcA-transferaz aktivitesini içermektedir. Önce gelen, N-terminal GlcNAc transferaz alanı, GlcA alanının etrafını saran uzun ve çoğunlukla düzensiz bir bölgedir (Şekil 1.5.) [2]. Polimerizasyon aktivitesi için, iki alan arasındaki etkileşim önemlidir. N-terminal ucundan 107 amino asitin silinmesi polimerizasyonu ayrıştırır yani elde edilen protein, tek bir GlcNAc veya GlcA kalıntısını in vitro olarak uygun bir akseptöre aktarabilir, ancak polimerize edemez. Burada çok önemli bir hidrofobik etkileşim vardır; biri N-terminal bölgesinde, diğeri ise proteinin aşırı C-terminal ucunda. Bu etkileşimin yokluğunda, substrat artık GlcA aktif bölgesini bağlayamaz ve substrat bağlayıcı cebin bir konformasyon değişikliği nedeniyle muhtemelen polimerizasyon gerçekleşemez. Bu

etkileşim, bir şekilde iki transferazın faaliyetini koordine etmektedir ancak bunun nasıl gerçekleştiği henüz net olarak ortaya konamamıştır [2].



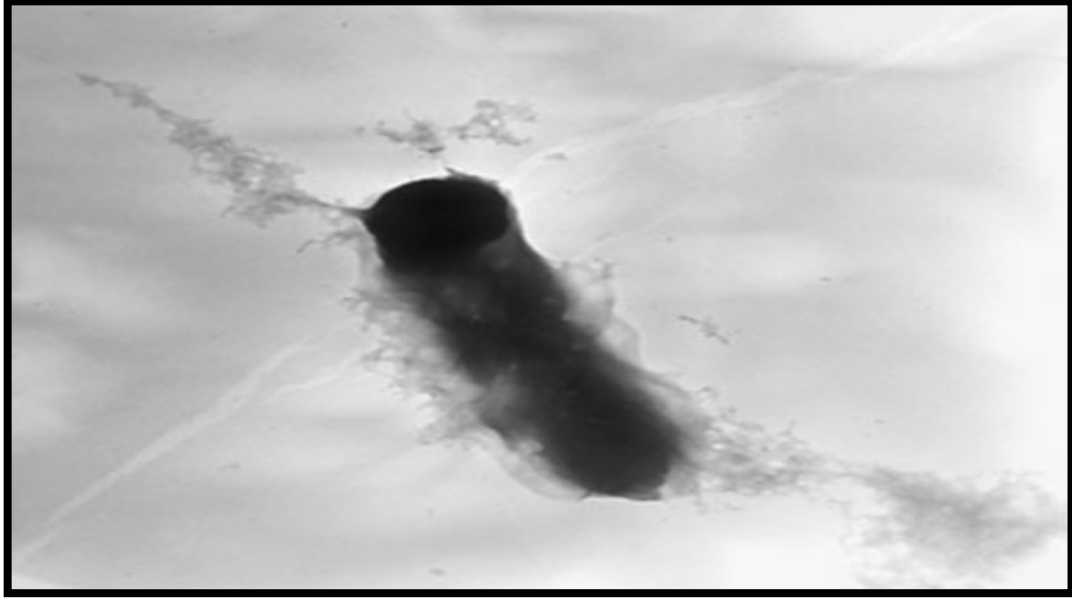
**Şekil 1.4.** UDP-GlcNAc'lı *E. coli* K4 kondroitin sentazın kristal yapısı [2]





**Şekil 1.5.** N- ve C-terminal hekzapeptitleri (çubuklarla gösterilmiştir) arasındaki etkileşimi gösteren *E. coli* K4 kondroitin sentazın kristal yapısı [2]

*E. coli* K4, koruyucu özelliklere sahip bir kapsül üretmektedir. *E. coli* K4 transmisyon elektron mikroskop görüntüsü Şekil 1.6.'da gösterilmektedir [1]. *pgm* ve *galU* endojen genleri, karbonhidrat metabolizmasında kritik bir ara madde olan ve UDP-glukuronik asitin biyokimyasal öncülü olan UDP-glikoz biyosentezinde yer almaktadırlar. Kapsül biyosentezi için, şeker vericisi olarak, UDP-*N*-asetilgalaktozamin ile birlikte UDP- glukuronik asit kullanılmaktadır [26].

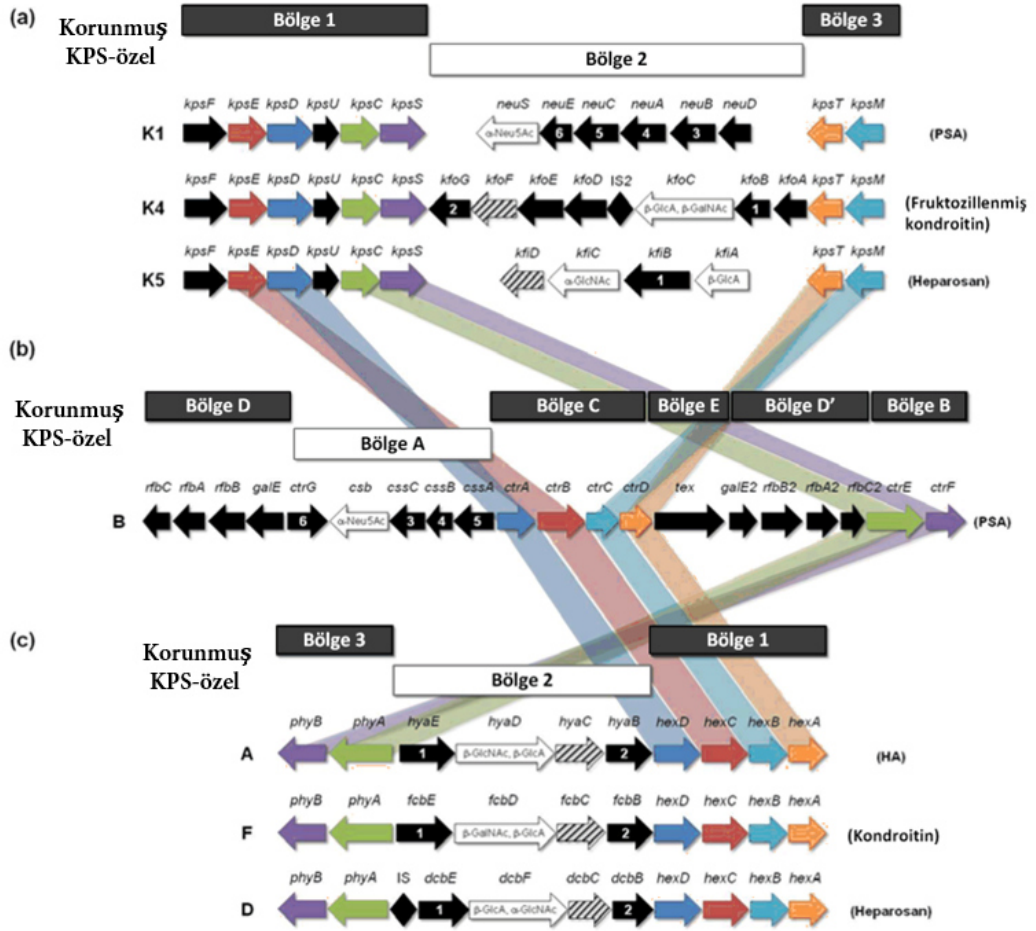


**Şekil 1.6.** *E. coli* K4'ün transmisyon elektron mikroskopisi (büyütme: 28.000 ×) [1]

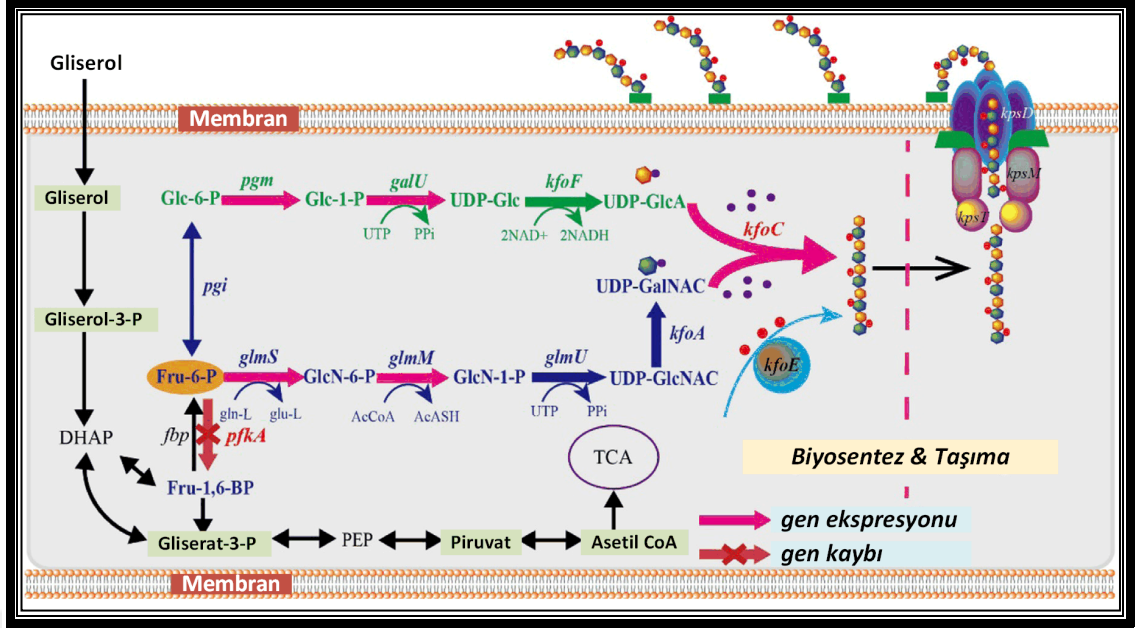
KS ve K4 KPS, alternatif glukuronik asit (GlcA) ve *N*-asetil-D-galaktozamin (GalNAc)  $\beta$ -bağlı kalıntılardan oluşmaktadır ve iki polimer arasındaki fark; mikrobiyal molekülde, çeşitli pozisyonlarda sülfat gruplarının yokluğu ve GlcA'nın C3'ünde bir asit-kararsız fruktozun varlığıdır [26].

K4 polisakkaridinin biyosentezi, üçlü bir küme tarafından kontrol edilmektedir, bunlardan iki bölge (I ve III), grup II *E. coli* suşları arasında korunmaktadır ve bu bölgeler, KPS'nin taşınımından ve salınımından sorumludur. Merkez bölge olan, bölge II ise; doğrudan serotip spesifik polisakkaritlerin sentezinde yer alır ve Uridin difosfat (UDP)-şeker öncüllerinin biyosentezinde son aşamadan sorumlu olan ve polimerin toplanması ve fruktozilasyonu için gereken enzimleri kodlamaktadır ve muhtemelen, iç hücre zarının sitozolik tarafında bir biyosentetik kompleks oluşturmaktadırlar (Şekil 1.7.(a)) [26]. Bölge II; 14 Kb uzunluğundadır. Bu bölge; 7 gen (*kfoA-kfoG*) ve ilave bir IS2 geni içermektedir [1]; Bu genler, kondroitin benzeri bir polisakkaritin doğrudan sentezlenip toplanmasını sağlayan enzimleri kodlamaktadır. *kfoB*, *kfoD* ve *kfoG*'nin fonksiyonu hala bilinmemektedir. Pek çok çalışmada, bu genlerin kapsüler polisakkarit üretimine doğrudan dahil olmayabilecekleri öne sürülmüştür. *kfoA* geni; UDP GlcNAc'ın UDP-GalNAc'a epimerizasyonundan sorumlu olan enzim, UDP-GlcNAc 4-epimerazı kodlamaktadır. *kfoF* geni;  $NAD^+$  'nın  $NADH$ 'a indirgendiği ve UDP-glukozun UDP-GlcA'ya

oksidlendiği redoks reaksiyonunda görev alan UDP-glukoz dehidrojenaz enzimini kodlamaktadır. *kfoC* geni; bir oligosakkarit/polisakkarit alıcısının indirgen olmayan ucuna hem GlcA hem de GalNAc tortularını transfer etmek için çift yönlü çalışan bir kondroitin polimerazı kodlamaktadır. *kfoE* geninin; GlcA'nın 3 pozisyona bir fruktoz grubunun eklenmesinden sorumlu olan bir fruktozil-transferazı kodladığı düşünülmektedir. Bu reaksiyonun; kondroitin omurgasının biyosentezi esnasında ya da sentez tamamlandıktan sonra meydana geldiği tahmin edilmektedir [18]. *E. coli* K4 KPS'nin ayrıntılı bir biyosentetik yolu, Şekil 1.8.'de gösterilmektedir [17]. Buna göre; substrat olarak gliserol mevcut olduğunda, fruktoz-6-fosfat, kondroitin ve kondroitin benzeri polisakkaritlerin sentezinde ilk yaygın öncül olmuştur. Fru-6-P, sırasıyla GlcN (Glukozamin)-6-P sentaz (GlmS) ve fosfoglukoz izomeraz (Pgi) tarafından glukozamin-6-fosfat ve glukoz-6-fosfata dönüştürülmektedir. GlcN-6-P, daha sonra GlcN sentaz (GlmM), UDP-N-asetilglukozamin pirofosforilaz (GlmU) ve UDP-glikoz-4-epimeraz (KfoA) tarafından UDP-GalNAc'ye dönüştürülmektedir, Glc-6-P ise, fosfoglukomutaz (Pgm), UTP-glukoz-1-fosfat üriditiltransferaz (GalU) ve UDP-glukoz dehidrojenaz (KfoF) tarafından UDP-GlcA'ya dönüştürülmektedir. Son olarak, UDP-GalNAc ve UDP-GlcA kondroitin polimeraz (KfoC) ile kondroitin oluşturulmaktadır [17].



Şekil 1.7. ABC-taşıyıcıya bağlı KPS'yi eksprese eden gram-negatif bakterilerdeki *kps* geni lokusu birleşme yolları [26]



Şekil 1.8. *E. coli* K4’de kapsüler polisakarit sentezi [17]

#### 1.4. Kondroitin Sülfatın Mikrobiyal Üretimi

KS’in mevcut ekstraksiyon ve saflaştırma prosedürleri, viral kontaminasyon riskleri, düşük ürün verimi, birçok organik kimyasalın ve protein artığının neden olduğu ciddi seviyede kirlilik, stabil olmayan ürün kalitesi gibi dezavantajları taşıyan karmaşık ve pahalı yöntemlerdir. Bu sorunları aşabilmek için son yıllarda KS veya KS-benzeri ürünlerin biyoteknolojik üretimi için farklı stratejiler önerilmiştir. Bu konudaki araştırma faaliyetleri başlıca iki temel işlem ile yürütülmektedir:

1. Enzimatik reaksiyon ile
2. Mikrobiyal üretim ile KS ekstraksiyonu ve saflaştırma işlemidir [11].

##### 1.4.1. Kondroitin üreten mikroorganizmalar

Doğada bazı bakteriler ve mantarlar KS veya KS-benzeri bileşikler üretebilmektedirler. Mikrobiyal kapsüler polisakaritlerin bu biyomoleküllere yapısal benzerliği, bu mikroorganizmaları glikozaminoglikan türevlerinin hayvansal olmayan kaynağı olarak ideal adaylar haline getirmektedir. Bunlar, potansiyel endüstriyel üretim suşları olarak şu ön koşulları taşımak zorundadırlar:

- (1) Güvenli olmalıdırlar
- (2) Kolayca erişilebilen ham şeker materyallerinden verimli bir şekilde faydalanabilmelilerdir
- (3) Fermantasyon dönemleri kısa olmalıdır
- (4)

Tanımlanmış genetik altyapıya sahip olmalıdırlar (5) Çok sayıda KS veya bunun analoglarının verimli bir şekilde sentezini gerçekleştirebilmelidirler [11].

Örnek bakteriler arasında, Actinobacteria (örn: *Corynebacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Monascus* ve *Streptomyces*), Proteobacteria (örn. *Escherichia*) ve Firmicutes (örn., *Bacillus* ve *Lactobacillus*) bulunmaktadır. Bu yöntem için uygun bakterilerin teknikte iyi bilinenlerden olması ve ticari bir tedarikçiden, gıda ürününden veya toprak gibi doğal kaynaklardan kolaylıkla elde edilebilir olması gerekmektedir [33]. İlgili araştırmalar şu ana kadar çoğunlukla *Pasteurella multocida*, *E. coli* ve *Bacillus subtilis* üzerine odaklanmıştır [11]. KS üreten bakteriler, Çizelge 1.3.'de verilmiştir [33].

**Çizelge 1.3.** Kondroitin üreten bakteriler [33]

<b>Bakteriyel Türler</b>	<b>Kondroitin (mg/L)</b>
<i>Bacillus cereus</i>	86.10 <sup>-4</sup>
<i>Bacillus circulans</i>	117.10 <sup>-4</sup>
<i>Bacillus coagulans</i>	85.10 <sup>-4</sup>
<i>Bacillus licheniformis</i>	9.10 <sup>-3</sup>
<i>Bacillus megalerium</i>	88.10 <sup>-4</sup>
<i>Bacillus subtilis</i>	89.10 <sup>-4</sup>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	89.10 <sup>-4</sup>
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	808.10 <sup>-4</sup>
<i>Microbacterium arborescens</i>	8.10 <sup>-3</sup>
<i>Micrococcus varians</i>	87.10 <sup>-4</sup>
<i>Monascus purpureus</i>	101.10 <sup>-4</sup>
<i>Streptomyces olivochromogenes</i>	83.10 <sup>-4</sup>
<i>Streptomyces rubiginosus</i>	8.10 <sup>-3</sup>
<i>Escherichia coli</i>	88.10 <sup>-4</sup>

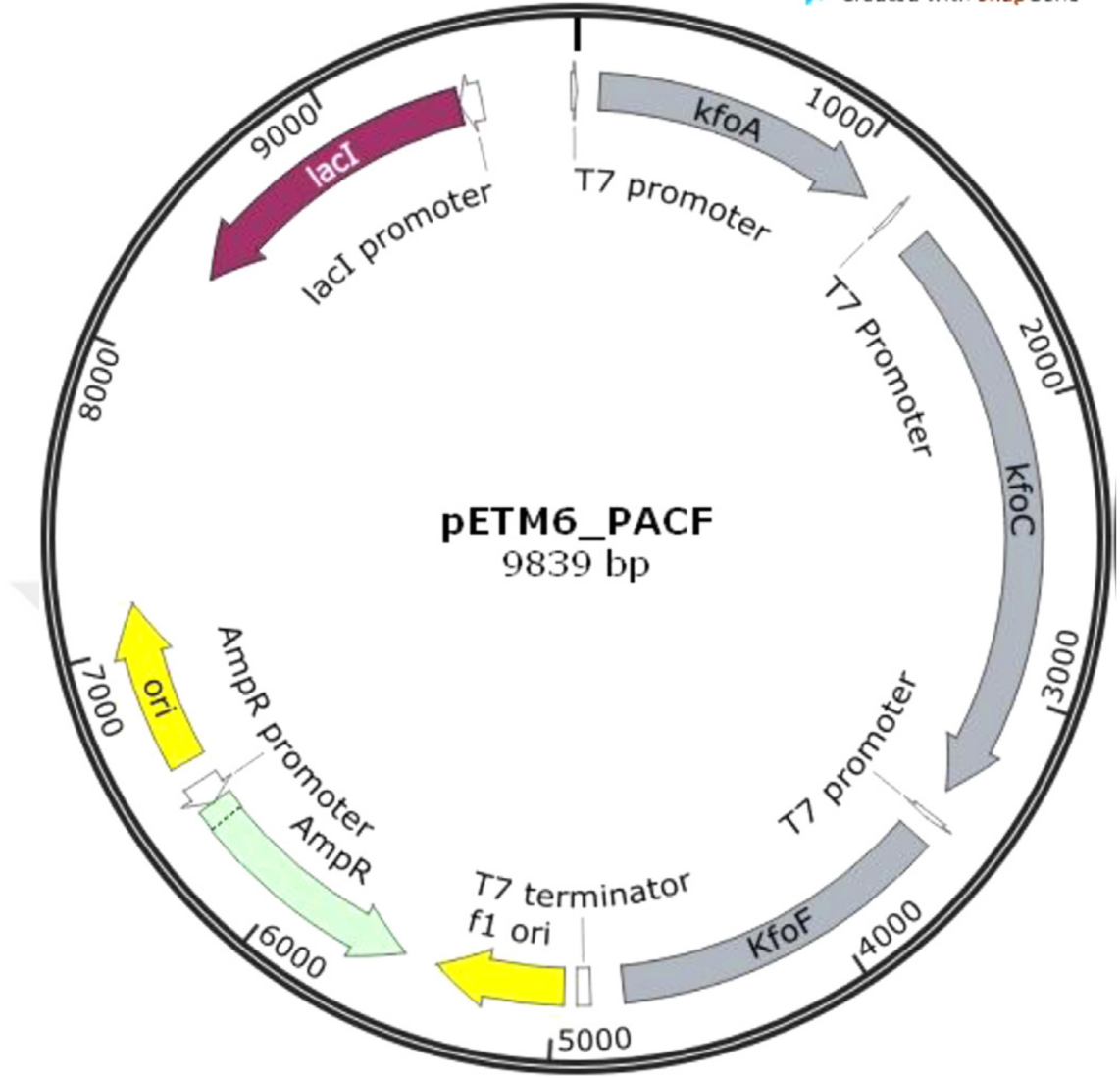
Örnek mantarlar, Deuteromycota (örn., *Aspergillus*), Ascomycota (örneğin, *Endomycopsis*, *Hansenula*, *Hasegawaea*, *Penicillium*, *Pichia*, *Monascus*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Eurotium*, *Galaktomycetes*, *Geotrichum*, *Saccharomyces*, *Trichoderma*, *Kluveromyces*), *Schizosaccharomyces*, *Talaromyces Torulopsis*, *Yamadazyma*, *Yarrowia* ve *Zygosaccharomyces*), Zygomycota (örneğin, *Mucor*, *Mortierella*, *Rhizomucor* ve *Rhizopus* türleri), Basidiomycota (örneğin, cins *Cryptococcus*, *Dipodascus* ve *Trichosporon*). Bu proses için uygun mantarlar, sanayide iyi bilinen ve ticari bir tedarikçiden, gıda ürününden veya toprak gibi doğal kaynaklardan erişimleri kolay olan mikroorganizmalardır [33].

KS veya KS benzeri bileşik üretimi için çeşitli mikroorganizmalar kültürlenebilir. Uygulanan bazı sistemlerde, genetik olarak tasarlanmamış olan doğal mikroorganizmalar kullanılırken bazılarında ise KS veya KS benzeri bileşik üretmek üzere rekombinant olarak dönüştürülmüş mikroorganizmalar kullanılmaktadır [33].

## **1.5. Çalışmamızda Kullanılan Vektörler ve Özellikleri**

### **1.5.1. pETM6-PACF plazmidi**

pETM6-PACF plazmidi; üzerinde kondroitin sentez genleri olan; *kfoA*, *kfoC* ve *kfoF*'yi taşımaktadır. pETM6-PACF plazmidinin genetik haritası Şekil 1.9.'da gösterilmiştir [18].

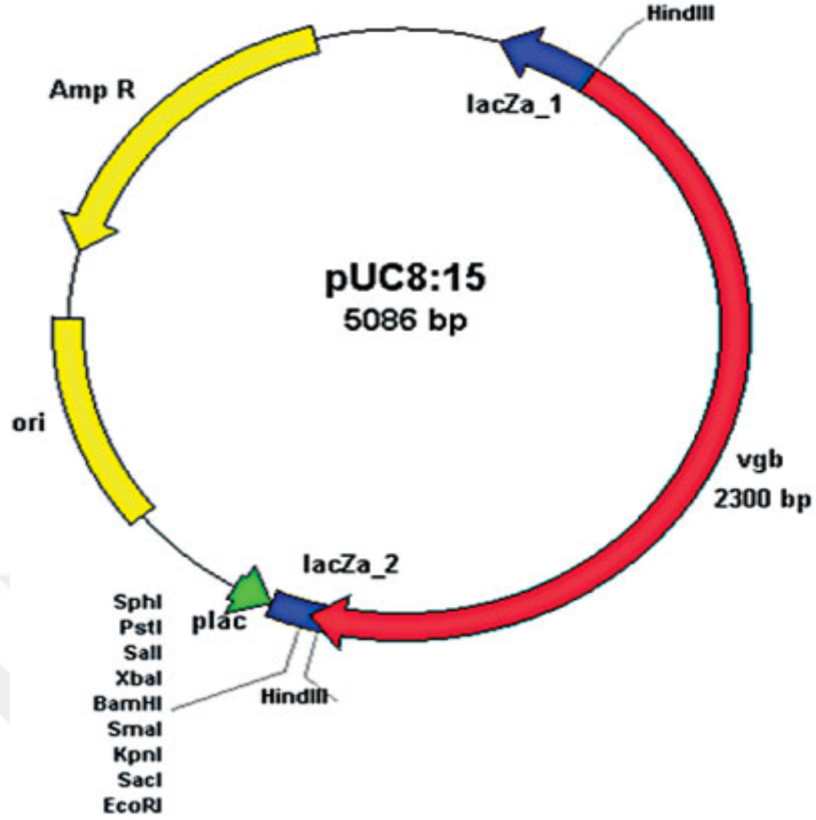


Şekil 1.9. pETM6-PACF plazmidi [18]

### 1.5.2. pUC8:15 plazmidi

pUC8:15 plazmidi, 5 kb'lık bir büyüklüğe sahip, 2.3 kb uzunluktaki multi klonlama bölgesine *vcb* geninin yerleştirildiği ve bu gene ait genetik mühendislik çalışmalarında sıklıkla tercih edilen bir plazmittir. pUC8:15 plazmidinin genetik haritası Şekil 1.10.'da gösterilmiştir [34].





**Şekil 1.10.** pUC8:15 plazmidi. Ori; pMB1 plazmidinin replikasyon orjini, Amp R; amfisilin direnç geni, lacZa; enzimin alfa monomerini (peptid) kodlayan  $\beta$ -galaktosidaz geni, plac;  $\beta$ -galaktosidaz gen promotörü [34]

### 1.6. *Vitreoscilla* Hemoglobin

Bakteriyel hemoglobinler üç kategoriye ayrılmaktadır. VHb; yapısı omurgalı globininkine çok benzeyen sadece bir globin alanına sahip tek bir bölge hemoglobindir (SDHb'ler). Daha yaygın olanı; bir flavin bağlayıcı alana kaynaşmış *Vitreoscilla* tipi bir globin alanına sahip olan flavohemoglobinlerdir (FHb'ler). Diğer grup ise; SDHb'lerden yaklaşık %20 daha küçük olan tek bir bölgeye sahip kesilmiş hemoglobinlerdir (trHb'ler) [35].

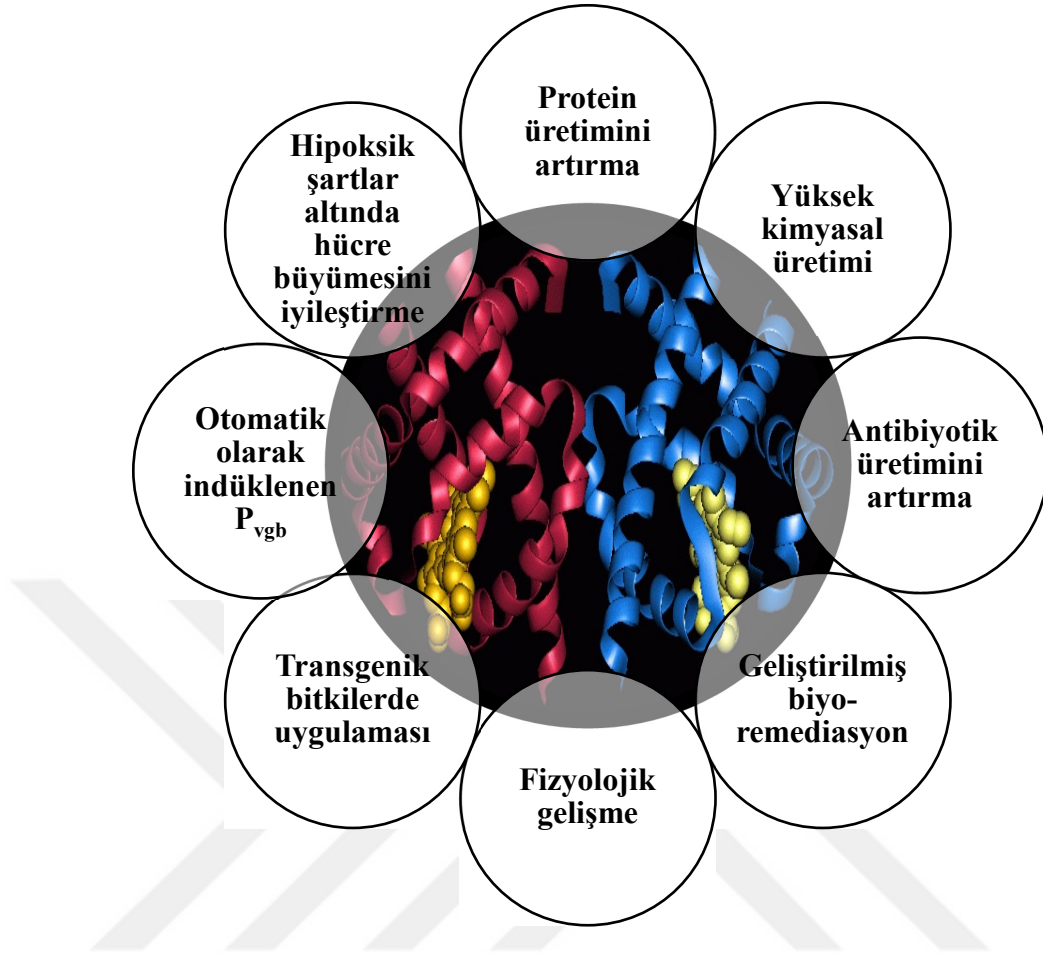
*Vitreoscilla* hemoglobin (VHb), hipoksik şartlar altında, solunum ve enerji metabolizmasını artırabilen zorunlu aerobik bakteri *Vitreoscilla*'da bulunan bir bakteriyel hemoglobindir [36]. Bu hemoglobin ilk kez, 70'li yıllarda, Amerikalı bilim adamları Tyree ve ark. tarafından, zorunlu aerobik bir bakteri olan *Vitreoscilla*'da keşfedilmiştir [37]. Keşfedilen ilk bakteriyel hemoglobindir ancak gelişen genomik analizler sayesinde, takip eden yıllarda, bakteri türlerinin yaklaşık

üçte ikisinin bir veya daha fazla hemoglobini kodladığı anlaşılmıştır [35]. VHb, diğer hemoglobinlerden yüzlerce kat daha yüksek,  $5600 \text{ s}^{-1}$  oksijen ayrışma hızı sabitine sahiptir [38].

Bu hemoglobinin sentezinin, son derece düşük çözünmüş oksijen koşulları altında arttığı belirlenmiştir, bu durum, çamurlu su birikintileri gibi oksijenin tükenmiş olduğu ortamlarda zorunlu aerobik bakteri olan *Vitreoscilla*'nın hayatta kalmasını sağlamaktadır. Bu durum, aerobik mikroorganizma fermantasyon endüstrisinde, VHb'nin değerini göstermektedir. VHb; yüksek hücre yoğunluğu fermentasyon işlemlerinde, sınırlı oksijen koşulları altında, hücre içi terminal oksidazlara oksijen transferini teşvik ederek solunum ve enerji metabolizmasını desteklemektedir [37].

VHb'yi kodlayan *vgb* geni, endüstriyel uygulamalar için hücre yoğunluğunu, metabolit sentezini ve oksidatif metabolizmayı optimize etmek üzere çeşitli bakterilere [39,40] ve ökaryotlara [41,42] başarıyla entegre edilmiştir. VHb'nin ekspresyonu, hücresel oksijen iletimini artırarak hücrede çözünmüş oksijen seviyesini yükseltmektedir. İlâveten, VHb ekspresyonu doğrudan oksijen iletimi yoluyla oksijenaz aktivitesini de uyarabilmektedir [43].

*vgb* geni, *E. coli*, *B. subtilis*, *Pseudomonas*, *Rhodobacter sphaeroides* gibi birçok konakçıya ve ayrıca hücre büyümesini, kimyasallar/proteinler üretimini artırmak üzere memeli hücrelerine de başarılı bir şekilde klonlanmış ve eksprese edilmiştir. Literatürde *vgb* teknolojisine dair birçok uygulama mevcuttur [36]. Şekil 1.11.'de; VHb ve promotorunun potansiyel uygulamaları gösterilmektedir [35].



**Şekil 1.11.** Vhb ve promotorunun potansiyel uygulamaları [[35]'den değiştirilerek alınmıştır].

### 1.7. Kondroitin Sülfat Ekstraksiyonu ve Saflaştırma İşlemleri

Hayvan kaynaklı KS bileşikleri tipik olarak 20.000–50.000 Da arasında bir boyuta sahip iken mikrobiyal kaynaklı KS bileşikleri 300-20.000 Da arasında bir boyuta sahiptirler [33]. Doğal ürünlerde, kondroitin-4-sülfat hiçbir zaman tek başına bulunmaz fakat %10-73 arasında değişen oranlarda, kondroitin-6-sülfat zincirine katılır ve sonra bu zincirler güçlükle ayrılabilir. Genellikle ticari bir kondroitin sülfat; yaklaşık olarak %40 KS-4 ve %60 KS-6 içermektedir [44].

KS veya KS-türevi materyallerin formülasyonları için uygulama türleri ve bu nedenle piyasa fiyatları, ticari ürünlerdeki glikozaminoglikanın kalitesi ve saflığına dayanmaktadır [45,46]. Bu nedenle, KS'ın kalitesini ve saflığını koruyarak düşük maliyetli ve yüksek verimli ekstraksiyon prosesleri geliştirmek özellikle

önemlidir. Klinik uygulamalar; gıda bileşenleri, diyet takviyeleri ve kozmetiklere kıyasla daha yüksek oranda konsantre ve saf KS talep etmektedir [11].

Endüstriyel açıdan bakıldığında, kıkırdaktan KS izolasyonu yöntemleri genellikle aşağıdaki adımları içermektedir [11]:

- (1) Kıkırdağın kimyasal hidrolizi
- (2) Proteoglikan çekirdeğinin parçalanması
- (3) Proteinlerin ayrıştırılması ve KS geri kazanımı
- (4) KS'in saflaştırılması.

İlk iki aşama çoğunlukla, yüksek konsantrasyonda NaOH, üre, sistein veya guanidin HCl'de alkalın hidroliziyle gerçekleştirilir, daha sonra katyonik kuaterner amonyum kimyasalları (ör. Setilpiridinyum klorür), noniyonik deterjanlar, potasyum tiyosiyanat veya alkolik çözeltiler ve trikloroasetik asit ile deproteinizasyon kullanılarak GAG'ın seçici olarak çökeltilmesi ile birleştirilir, son olarak jel filtrasyonu ve/veya iyon değişimi ve boyut-eksklüzyon kromatografisi ile saflaştırma işlemi gerçekleştirilir [47-50].

Sürdürülebilirlik arayışı içinde geleneksel olanların yerine çeşitli alternatif izolasyon yöntemleri denenmiştir. Bu işlemler şu şekilde özetlenebilir: (1) Kıkırdak ve proteinlerin enzimlerle sindirimi (2) Alkollü çözeltilerle seçici çökeltiler (3) Tuz çözeltileri ile yeniden süspansiyon ve nötralizasyon (4) Ultrafiltrasyon-diyafiltrasyon teknolojilerini (UF-DF) kullanarak molekül ağırlığına göre ayırma [50].

### **1.7.1. Seyreltik alkali-enzimatik hidroliz**

Seyreltik alkali-enzimatik hidroliz KS'yi ekstre etmek için en sık kullanılan yöntemlerden biridir. KS, genellikle hücre dışı matrikste proteoglikanlar formunda bulunur. KS'yi açığa çıkarmak için, alkali işlem vasıtasıyla, KS ve çekirdek protein arasındaki kovalent bağlar parçalanabilir. Alkali ortamda, sülfürik asit grubu nispeten karardır, bu yüzden KS moleküllerinin hem büyüklüğünde hem de yapısında değişikliklere yol açacak bağ kopması meydana gelmemektedir. Artan alkali konsantrasyonu, KS üretim süreçleri sırasında proteoglikanların ayrışmasını

desteklese de, diğ er taraftan ç evre kirliliğ ini artırmaktadır. Bu nedenle, bu yöntem genellikle seyreltik alkali koş ullar altında gerç ekleş tirilmektedir. Bunun yanı sıra, KS'yi serbest bırakmak için proteinlerin enzimatik hidrolizi, proteazın spesifitesine bağ lıdır ve yaygın olarak kullanılan proteazlar: papain, alkalaz, tripsin, pepsin, subtilisin vs.'dir [51,52].

### **1.7.2. Seyreltik alkali-iki ař amalı enzimatik hidroliz**

Farklı enzimler genellikle farklı aktivite gösterdiğ inden, bileş ik enzimler genellikle hidroliz reaksiyonunda tek bir tür enzimden daha etkilidirler. Böylece proteinler daha fazla hidroliz edilebilir. Bu yöntem ile iki tür enzim kullanılarak KS eldesinin verimli bir şekilde gerç ekleş tirildiğ i ç alış malar mevcuttur. Ayrıca bu yöntem sayesinde iç lem süresi de kısaltılabilmektedir [49,50,53-55].

### **1.7.3. Mekanokimyasal destekli ekstraksiyon yöntemi**

Mekanokimya, mekanik enerji ve kimyasal enerji arasındaki enerji dönüş ümünü ifade etmektedir. Bu iç lem; kimyasal reaksiyonlar, sürtünme, polimerlerin mekanik bozunması, kavitasyon etkisi, mekanik stres vb. kimyasal reaksiyonları kapsayan moleküler seviyede mekanik iç lemlerin ve kimyasal reaksiyonların bir kombinasyonudur. Bu yöntem ile KS verimi ve saflığ ı artırılıp ekstraksiyon süresi de önemli derecede azaltılabilmektedir [56].

### **1.7.4. Ultrason destekli ekstraksiyon yöntemi**

Bu yöntemin temel prensibi, tanımlanan ç özgen ortamında "kavitasyon" (mekanik etki) sağ lamak için ultrasonla iliş kili termal mekanizmanın ve mekanik mekanizmanın özelliklerini birleş tirmektir. Ekstraksiyon etkinliğ indeki bu belirgin artış, bir kabarcığ ın ř iddetli bir şekilde ç öktüğ ü geçici "kavitasyon" olgusuyla ilgilidir. Bir yandan, sesin basıncını azaltma döngüsü sırasında dalga kavitasyon kabarcıkları üretilir ve ç özücü buharla doldurulmaktadır. Sıkış tırma döngüsü sırasında, içindeki kabarcıklar ve gaz da sıkış tırılır, bu da sıcaklık ve basınçta bir artışa neden olmaktadır. Bu, son olarak, karış ımı artırmak için ç özücünün içinden geçen bir "ř ok dalgası" ile kabarcığ ın ç ökmesine yol açmaktadır. Ultrason ayrıca, ç özücü maddenin numune gövdesine daha fazla nüfuz etmesini sağ layan mekanik bir etki de uygulamaktadır. Bu, artan kütle transferi ile kavitasyon kabarcığ ı ç ökmesi

yoluyla hücrelerin bozulması birleştiğinde, hücre içeriklerini yığın ortamına bırakma etkisine sahip olmaktadır [57].

#### **1.7.5. Organik çözücü ile çökeltme**

Hidrolizattaki temel proteinlerden KS'in seçici olarak çökmesi çok önemli olduğu için genellikle birkaç araştırmacı tarafından alkolik arıtmanın sonraki aşaması da bildirilmektedir [49,50,58,59]. Bu işlemin etkinliği alkolün tipine ve konsantrasyonuna bağlıdır ve bazı durumlarda işlem sıcaklığı da önemlidir [49]. %40-60 konsantrasyonlarındaki etanol, bu tür çökeltme için en yaygın olarak seçilen reaktiftir [49,50,59]. Alkol ile tekrarlanan çökeltmede, çözeltinin polaritesini değiştirmek için yavaş yavaş alkol ilavesi yapılır bu sayede karma sistemdeki bazı bileşenlerin çözünürlüğü ile çözeltiden safsızlıkları uzaklaştırmak mümkün olabilmektedir [50].

#### **1.7.6. Kuaterner amonyum tuzlarıyla çökeltme yoluyla fraksiyonlama**

Kuaterner amonyum tuzları (örneğin setiltrimetilamonyum bromür (CTAB), setilpiridinyum klorür (CPC)), nispeten düşük suda çözünürlüğü olan bir kuaterner amonyum tuzu kompleksi elde etmek için polianyonik bileşenler (KS gibi) ile birleştirilebilir. Bu kompleksler, düşük iyonik gücü olan sulu çözelti içinde çözünmezken, çözeltinin iyonik gücünün kritik değere yükselmesiyle ayrışma ve çözünme meydana gelmektedir. Bu durum, KS'in ayrıştırılması ve saflaştırılması için kullanılabilir [11].

#### **1.7.7. Kolon kromatografisi**

KS'in ayrıştırılması/saflaştırılması için kolon kromatografisi uygulamaları, polisakkaritlerin yapısını ve biyolojik aktivitesini daha iyi koruyabilmektedir. Bunlar arasında çoğunlukla jel-kolon kromatografisi ve iyon değişim kromatografisi kullanılmaktadır [57]. Bileşiklerin farklı özelliklerine göre uygun bir kromatografik paketleme seçilir. DEAE-selüloz, iyon değiştirme kromatografisinde kullanılan en yaygın dönüştürücüdür. Sadece polisakkaritleri saflaştırmakla kalmaz, aynı zamanda çeşitli asidik polisakkaritleri ve nötr polisakkaritleri ayrıca mukopolisakkaritleri de ayırmak için kullanılmaktadır [60].

### **1.7.8. Membran ayırma işlemleri**

Membran ayırma teknikleri, faz dönüşümünü içermez ve ikincil tip kirlilik ile ilgisi yoktur. Membranlar, ayırıştırma verimlilikleri, maliyet etkinlikleri, kolay ölçeklendirmeleri, çeşitli tipte olmaları, basit kullanımları ve kontrollerinin kolay olması nedeni ile çoğu biyomakromolekülün (1 kDa'lık daha yüksek ebatlarda) saflaştırma işleminin son safhası olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadırlar [11]. Bu konudaki çalışmalarda yaygın olarak, KS çoğunlukla alkali işlem ile birlikte ekstre edilip ardından bir ultrafiltrasyon prosedürü ile saflaştırılmıştır [47,50].

### **1.8. Kondroitin Sülfatın Mikrobiyal Üretim Yöntemleri**

Kondroitin üreten mikroorganizmalar arasında, genetik olarak yapılandırılmamış ya da KS veya KS-benzeri bir bileşik üretmek üzere rekombinant olarak dönüştürülmüş mikroorganizmalar bulunmaktadır [44,61-65]. Mikrobiyal KS veya KS-benzeri bileşikler, bunları üreten herhangi bir mikroorganizmayı kültürlenmek suretiyle elde edilmektedir. Gece boyunca çoğalması sağlanan sıvı besiyeri kültürlerindeki KS veya KS benzeri bileşikleri ayırmak için santrifüj işlemi yapılmaktadır. Fungal mikroorganizmalar da benzer şekilde, uygun bir besiyeri ortamı üzerinde, sıvı fermentasyon veya katı hal fermentasyonu dahil olmak üzere standart koşullar altında kültürlenebilir [33].

Kondroitin üreten bir mikroorganizmanın kültür ortamı için çeşitli alternatifler mevcuttur. Örneğin, kullanılacak bir ortam: glikoz, sakkaroz, gentiyobiyoz, çözünür nişasta, gliserol, dekstrin, melas ve organik asitler gibi karbon kaynakları, amonyum sülfat, amonyum karbonat, amonyum fosfat, amonyum asetat, pepton, maya özütü, mısır maserasyon sıvısı, kazein hidrolizat, buğday kepeği ve et özü gibi nitrojen kaynakları ve potasyum, magnezyum, sodyum, manganez, demir, çinko tuzları gibi inorganik tuzlar ve fosfatlar içerebilir [17,33].

Bazı uygulamalarda, KS benzeri bileşiğin üretimini artırmak için ortama bir indükleyici eklendiği bildirilmiştir. Uygun indükleyicilerin örnekleri arasında; gentoz, gentiyobiyoz ve gentiyo-oligosakkarit gibi sakkaritler yer almaktadır. Eklenecek indükleyici miktarı %0.01 ila %5 arasında değişmektedir [33].

İsteğe bağlı olarak, kondroitin üretimi için, iyon değişim kromatografisi, jel filtrasyonu, ultrafiltrasyon, tuz varlığında etanol çökeltimi veya farklı alkol çökeltimi gibi adımlar kullanılarak ek saflaştırma işlemleri yapılabilmektedir [33].

### 1.9. Üretilen Mikrobiyal KS'ın Analiz Edilmesi

KS içeriği, teknikte bilinen herhangi bir yöntemle ölçülebilmekte ve analiz edilebilmektedir. Örneğin, Kondroitinaz muamelesi ve Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) veya Enzim-bağlı İmmüno sorbent (ELISA) metodolojisi, çeşitli boya deneyleri, kromatografik araçlar ve elektroforetik teknikler kullanılarak saptanabilmekte ve analiz edilebilmektedir [66]. Teknolojide, glikozaminoglikanların saptanması ve nicel olarak tayin edilmesi için kullanılabilen çok sayıda boya deneyi mevcuttur. Örneğin; toluen mavisi deneyi [67], alsiyen mavisi deneyi [68], dimetilmetilen mavisi deneyi [69] gibi. KS içeriği ve bileşiminin nicel olarak tayin ve karakterize edilmesi için çeşitli kromatografi teknikleri kullanılmaktadır [70-73]. Uygun kromatografi teknikleri arasında; HPLC, iyon değişim kromatografisi ve boyut eleme kromatografisi bulunmaktadır [66,74]. Genel olarak, daha az konsantre olan ve ayrıntılı şekilde saflaştırma yapılmamış numuneleri karakterize etmek için ELISA yöntemi kullanılmaktadır [75,76]. Fluorofor destekli karbonhidrat elektroforezi (FACE) gibi elektroforetik teknikler de GAG zincirindeki sülfasyon derecesini ve yerini değerlendirmek için kullanılmaktadır [33].

Yine bir alternatif olarak KS, asit ile hidrolize edilebilmekte ve ortaya çıkan şeker bileşenleri HPLC ile belirlenebilmektedir. Asit hidrolizi; muhtemelen sülfat gruplarını ortaya çıkaracağı için sülfat içeriği, teknolojide bilinen yöntemler kullanılarak KS'ın sülfür içeriğinin belirlenmesiyle analiz edilmektedir [33].

Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) ve Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (HPLC-MS) gibi modern analitik yöntemler, KS yapısının belirlenmesi için yaygın olarak kullanılmaktadır. Modern spektroskopik teknikler, KS polisakkaritinin tam yapısı hakkında sınırlı bilgi sağladığından, daha ayrıntılı bir yapısal tayin yapmak için kondroitin liyazları kullanarak oligosakkaritler hazırlamak genellikle daha yararlı bir yöntemdir [77].



## 1.10. Kondroitin Sülfat Uygulamaları

KS'in temel uygulama alanlarından biri aynı zamanda anti-inflamatuar etki göstererek osteoartritin tedavisi olarak rapor edilmiştir [78,79]. Diğer taraftan, KS'in antiviral ve anti-enfektif olarak potansiyel kullanımı, doku rejenerasyonu ve mühendisliğinde KS'in kullanımı sonucunda kanserli hücrelerde ve dokularda biyolojik bir fonksiyon oluşturulması bundan dolayı da KS uygulamalarının biyobelirteç olarak öngörülmesi KS'ye dair yeni rapor edilmiş araştırmalardır [80]. Yakın zamanda, KS'in sülfasyon modeli ile ilgili olarak farklı potansiyel farmasötik uygulamalar da tanımlanmıştır [81-84].

### 1.10.1. Antiviral ve antienfektif olarak potansiyel kullanım

Yüksek miktarda, aşırı sülfatlanmış E birimleri, [KS-E, GlcAy1-3GalNAc (4,6-O-disülfat)] içeren KS zincirlerinin, *Herpes simplex* virüsü enfeksiyonlarının güçlü inhibitörleri olduğu gösterilmiştir. Özellikle, KS-E birimlerinin dört tekrarından oluşan spesifik bir oktasakkarid dizisinin, bu işlem için önemli bir rol oynadığı belirtilmiştir [85]. Bir grup araştırmacı tarafından, maternal sıtmaya karşı yeni aşılarda geliştirilmesi için potansiyel bir hedef keşfedilmiştir. Araştırmacılar, *Plasmodium falciparum*'un (kırmızı kan hücrelerini enfekte eden sıtma paraziti) plasental KS-proteoglikana bağlanmasının, hem KS-A [Glc1-3GalNAc (4S)] hem de KS-O [Glc1-3GalNAc] içeren spesifik bir dodesakkarid sülfatlanmış oligosakkarid gerektirdiğini bulmuşlardır. Aslında bu oligosakkarit, enfekte hücrelerin, plasentanın kondroitin sülfat-proteoglikanlarına yapışması için gereken minimum yapısal motifi gibi görüldüğü ifade edilmiştir [1].

### 1.10.2. Doku rejenerasyonunda ve mühendislikte KS

Hidrojellerin, hücre dışı matrikste, doku rejenerasyonu sırasında üretilen sitokinler ve büyüme faktörleri için bir depo alanı olarak işlev görebileceğini öneren araştırmacılar, hayvan modellerinde, KS-hidrojellerin (KS-ADH/polietilen glikol dialdehit), sinonazal mukozada yara iyileşmesini hızlandırdığını kanıtlamışlardır [86]. KS-C'nin, hücre adezyonu, hücre proliferasyonu ve hücre migrasyonunu düzenleyerek palatal yara iyileşme seviyesini arttırdığı bulunmuştur [87].

KS'in merkezi sinir sisteminin onarım mekanizmasında da rol oynadığı bildirilmiştir. Özellikle sülfatlanmış monosakkaritlerin ve disakkaritlerin GAG

kaynaklı amiloid liflerinin oluşumunda etkili inhibitörler olduğu gösterilmiştir [88]. Ayrıca, KS-proteoglikanların indirgeme ürünlerinin aksonal büyümeyi desteklediği, mikrogliyal aktivasyonu arttırdığı ve T hücre fonksiyonunu kontrol ettiği gösterilmiştir [89]. Yüksek oranda sülfatlanmış KS/DS'nin, karaciğer rejenerasyonu sırasında hepatositlerin gelişmesinde önemli bir rolü olan heparin bağlayıcı EGF-benzeri büyüme faktörünü bağladığı bulunmuştur [90]; bundan dolayı, KS/DS'nin veya fonksiyonel alanlarının ekzojen uygulamasının, hepatik dokuların fizyolojisini düzenleyerek karaciğer rejenerasyonu için terapötiklerin geliştirilmesi yönünde faydalı olabileceği düşünülmüştür [1].

### **1.10.3. Kanser tanısındaki ve tedavisindeki ilişkisi**

Son çalışmalara göre; metastazın, kanser sürecinin ve kanserli hücre davranışının düzenlenişinde GAG'ların ve proteoglikanların ilişkisini anlamada büyük gelişmeler sağlanmıştır. Aslında, çok sayıdaki çalışmada, tümör hücrelerinin/dokularının KS birimlerinde zincir uzunluğu ve sülfasyon modeli açısından bir modifikasyon olduğu gösterilmiştir: öyle ki normal dokularda yaygın olan KS-A'nın yerini, malign tümörlerde tekrarlanan KS-C üniteleri almıştır [1], ayrıca agresif melomamlarda daha yüksek miktarda KS-E bulunmuştur [91].

Yapılan çalışmalarda, yumurtalık kanserinde, KS'in biyobelirteç olarak potansiyel bir rolü önerilmiştir. Bu çalışmaların sonuçları, yumurtalık epitel kanserinin erken tespitine yönelik serum kondroitin sülfat epitopu WF6'nın değerini vurgulamaktadır. Sonuçlar, KS (WF6) epitopunun bu tür tümörlerde yüksek oranda arttığını göstermiştir [92]. Diğer taraftan yapılan başka çalışmalar ile, ileri evre prostat kanseri dokularının benign prostat hiperplazisi dokularına kıyasla daha yüksek seviyede KS-O sergilediği bulunmuştur. Bu nedenle, peritümöral stromada immün boyama yoluyla ortaya çıkan KS-O seviyesi, prostat kanseri nüksünün bağımsız bir belirleyicisi olabileceği ifade edilmiştir [93].

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Literatürde mevcut araştırmalarda, KS veya KS benzeri ürünlerin saflaştırılmasına yönelik biyoteknolojik bir platform geliştirme çalışmalarına odaklanılmıştır. Bu amaçla, kondroitin üreten suşlar tespit edilmiş, bu suşlara dair üretim prosesleri oluşturularak kondroitin üretimi gerçekteştirilmiştir. İlgili araştırmalar çoğunlukla *P. multocida*, *E. coli* ve *B. subtilis* üzerine odaklanılmıştır.

2003’de, E. Roman ve ark., aşırı eksprese eden suşlarda UDP-GlcA düzeylerini 3 kat arttırmışlardır. Beklenmedik bir şekilde, UDPGDH’nin aşırı ifadesi, K5 polisakkarit (-GlcA $\beta$ 1,4-GlcNAc $\alpha$ 1,4-) oluşumunun azalmasına yol açmıştır. Bu nedenle, hücre dışı bir polisakkarit kapsülü üretiminin, şeker metabolizmasını, şeker nükleotid teminini, enzim kinetiğini ve zar taşıma proteinlerini içeren karmaşık bir işlem olduğunu vurgulamışlardır. Kapsüler polisakkarit üretiminin düzenli bir şekilde artması için, bu adımların birçoğunda eş zamanlı olarak değişiklikler gerektirdiği açıklanmıştır [63].

2009 ve 2010’da P.L. De Angelis adlı araştırmacı, GAG üreten *P. multocida* suşları üzerinde çalışmıştır; araştırmacı, özellikle *P. multocida* tip F; pmCS’yi izole edip glikoziltransferazını karakterize etmiştir ve pmCS glikosiltransferazın in vitro kullanımını için bir üretim yöntemi açıklamıştır. Kondroitin-benzeri molekülleri *P. multocida* da sentezleyebilmesine rağmen, *P. multocida*’nın iyi bilinen kolera patojenitesi bu amaç için kullanımını engellemiş ve bu alanda ona olan ilgiyi azaltmıştır [64,94].

Aynı yıllarda, *E. coli* K4 gibi kondroitine benzer kapsüler polisakkarit üreten bir suş kullanılarak mikrobiyal fermentasyon yoluyla kondroitin üretilmiştir ve bu çalışma 1.4 g/L’ye eşit olan bir kapsüler polisakkarit titresi ile sonuçlanmıştır [65].

2010 yılında, bir patentte; birçok bakteri, maya ve mantar suşu kullanılarak doğrudan düşük moleköl ağırlıklı KS üretme olasılığı bildirilmiştir. Bu yöntemde; özellikle, *B. natto*’nun DIFCO ortamında, çalkalamalı şişelerde kültivasyonu ile 0.2377 g L<sup>-1</sup>konsantrasyonda KS üretme yöntemi detaylıca açıklanmıştır [33].

K. Suzuki ve ark.’na ait patentte ise; UDP-GlcA-üreten suş *E. coli* K5, *E. coli* K4’den elde edilen *kfoA* ve *kfoC* genlerini içeren bir IPTG indüklenebilir plazmid

(pTrcHis) ile dönüştürülerek yüksek verimlilikte kondroitin üretmek için bir yöntem oluşturulmuştur. Bu yöntemde; kullanılan rekombinant suşlar CYG ortamında (%2 casamino asitler, %0.5 maya özütü ve %0.2 glukoz) yetiştirilerek 0.052 g L<sup>-1</sup> nihai kondroitin konsantrasyonu elde edilmiştir [62].

E. Bedini ve ark., çoğunlukla KS-A ve KS-C'den oluşan KS polisakkarit sentezi için bir mikrobiyolojik-kimyasal strateji uygulamışlardır. KPS yapısı, fruktoz monomerinin birbirini izleyen hidrolizine ve kimyasal sülfasyonuna ihtiyaç duyan, fruktozun bir furanoz kalıntısını içeren kondroitinin sülfatsız bir yapısı olarak açıklanmıştır. Bu çalışmada; GlcA ünitelerinin O-3 pozisyonunda bağlanmış ilave β-fruktoz kalıntısı içeren *E. coli* O5:K4:H4' ün fermantasyonu ve ardından hidrolizi ile fruktozillenmemiş kondroitin elde edilmiştir [95].

Mikrobiyal kondroitin sülfat üretimine dair yapılan güncel çalışmalara baktığımızda ise; bu üretim yöntemini etkileyen parametrelerin saptanmasına ve değerlendirilmesine, bu parametrelerin optimizasyonunun sağlanarak KS üretim etkinliğini ve verimini artırmaya yönelik araştırma-geliştirme çalışmaları yürütüldüğünü görmekteyiz.

D.H. Doherty ve ark., *E. coli* K4 fruktozillenmiş kondroitin kapsüler polisakkaritin (K4P) biyosentezinde yer alan proteinleri kodlayan *E. coli* K4 gen kümesini sekanslamış, sentezlemiş ve doğal diziye bağlı olarak DNA segmentlerini birleştirmişlerdir, daha sonra bu genleri büyük ölçekli fermantasyon için uygun alternatif konak hücrelere aktararak bu konak hücrelerde rekombinant fruktozile kondroitin kapsüler polisakkarit üretimini göstermişlerdir. Alternatif konakçı hücrelerin fruktozile edilmemiş kondroitin üretmesi tercih edildiğinden, *E. coli* K4 tarafından üretilen kondroitinin fuktozilasyonundan sorumlu genler tanımlanmış ve alternatif konaklara aktarılan *E. coli* K4 kondroitin biyosentez gen kümesinden bu genler silinmiştir. Sonuç olarak, bu gen setini içeren alternatif konaklar fruktozile edilmemiş kondroitin üretmiştir. Bu konak hücrelerden 24-72 saat gibi değişen zaman aralıklarına bağlı olarak 1-50 g/L kondroitin üretildiği rapor edilmiştir. Alternatif konakçı tarafından üretilen bu rekombinant kondroitinin (rCH), kondroitin sülfat üretmek için sülfatlanabileceği bildirilmiştir [61].

Araştırmacılar, KPS üretimini geliştirmek için merkezi karbon metabolizmasındaki akışların nasıl gerçekleştiğini ve dengelendiğini anlamaya çalışmaktadırlar. Diğer taraftan da çoğunlukla *E. coli* K4 suşlarını kullanarak hayvan kaynaklarından kullanılan ekstraksiyon prosedürlerine alternatif olarak uygulanabilir üretim platformları geliştirmeye çalışmaktadırlar. Pek çok mühendislik stratejisi; verimi artırmaya yönelik olarak K4 KPS üretiminin biyosentezinde yer alan genleri aşırı üretmeye odaklanmaktadır. Diğer çalışmalarda, birkaç transkripsiyonel faktör gerektiren karmaşık bir işlem olan KPS biyosentez kümesinin ekspresyonunun düzenlenmesi amaçlanmıştır; bunlardan RfaH ve SlyA'nın aşırı ekspresyonunun son zamanlarda KPS üretimini arttırdığı gösterilmiştir. Bir çalışmada, Glukoz-6-fosfat'ın UDP-Glu'ya artan dönüşümünün, UDP-GlcA havuzlarını ve bu nedenle de yabancı tip *E. coli* K4'te ve mutant tip EcK4r3'te K4 CPS'nin üretimini nasıl etkilediği incelenmiştir. Bu çalışmada, ayrıca, ortama glutamin takviyesinin, polisakkarit üretimini daha da artırdığı, belki de maksimum ürün titrelerine ulaşmak için hücre içindeki UDP-şeker öncülünün miktarını dengelemek gerektiği de gösterilmiştir. Literatüre göre; bu çalışma, *E. coli* K4'deki KPS biyosentezi sürecinin kritik bir yönü üzerinde yapılan ilk araştırmadır [96].

En iyi karakterize edilen gram-pozitif bakteri olan *B. subtilis*, güvenli olarak kabul edilen bir suştur ve gıda endüstrisinde kullanılan üretim enzimleri ve kimyasalları için yaygın olarak kullanılmaktadır. Yapılan bir çalışmada; *E. coli*'den elde edilen kritik sentez genleri (*kfoA*, *kfoC* ve *kfoF*) *B. subtilis* genomuna entegre edilerek, *B. subtilis*'te kondroitin üretim metabolik yolu tasarlanmıştır. Çalışmada, ilk olarak kondroitin yolağı genleri *kfoA* ve *kfoC*, *E. coli* K4 suşundan amplifiye edilip pAX01-*kfoC-kfoA* plazmidini oluşturacak şekilde pAX01 entegrasyon vektörüne klonlanmıştır. Daha sonra plazmidler *B. subtilis*'e transforme edilmiş ve eritromisin direnç plakaları üzerinde pozitif transformantlar seçilmiştir. Kondroitin (*kfoC-kfoA*) ekspresyon bölgeleri, indüklenebilir promotör P<sub>xylA</sub>'nın kontrolü altında *B. subtilis* genomunun lacA lokusunda entegre edilmiştir böylece rekombinant E168C suşu elde edilmiştir. Daha sonra, rekombinant suşlardaki entegre ekspresyon dizileri P<sub>xylA-kfoC-kfoA</sub>, PCR analizi ve DNA dizilemesi ile doğrulanmıştır. Kondroitin üretimini sağlayacak oluşturulan bu rekombinant suşlardan kesikli beslemeli fermentasyon ile kondroitin üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu metabolik yolağın optimizasyonu ile de kondroitin üretimi 5.22 g L<sup>-1</sup> seviyesine

yükseltilmiştir. Bu çalışma ile elde edilen kondroitinin moleküler ağırlığı 114.07 kDa olarak tespit edilmiştir. Ayrıca, üretilen kondroitinin kalitesi (moleküler ağırlık ve polidispersite) doğal hayvan kaynaklı KS'ye çok benzerdir. Bu çalışma, *B. subtilis*'de kondroitin metabolik mühendisliği için daha güvenli sentetik yollar ve üretimi arttırmaya yönelik yararlı bir yaklaşım sağlamıştır [21].

A. Stellavato ve ark.'nın gerçekleştirdiği yeni ve patentli bir biyoteknolojik üretim çalışmasında; elde edilmiş sülfatlanmamış biyoteknolojik kondroitin (BK) biyopolimeri ve ticari bir KS'in in vitro kültürdeki insan kondrositleri üzerindeki etkileri araştırılmış ve karşılaştırılmıştır. KS'in, osteoartritte, proteoglikanların sentezini uyarabildiği ve proteolitik enzimlerin, doku bozulmasına katkıda bulunan diğer faktörlerin inhibisyonu yoluyla kondrositlerin katabolik aktivitesini azaltabildiği rapor edilmiştir. Ek olarak, KS'in in vitro kondrositler üzerinde anti-enflamatuar etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmanın amacı, biyoteknolojik kondroitinin tıbbi cihazlarda kullanım için biyomedikal potansiyelini değerlendirmektir. Sonuçlar; hem biyoteknolojik kondroitinin hem de KS'in oksidatif stresi azalttığını göstermiştir. Ayrıca BK'nın, in vitro kondrosit enflamasyon modelinde sitokin seviyelerinin azaltılmasında KS'den daha iyi olduğu gözlenmiştir. Bu araştırmanın sonuçları, translasyonel tıpta biyoteknolojik kondroitinin önemini dikkate değer şekilde desteklemektedir [97].

Bir çalışma, moleküler olarak klonlanan ilk kondroitin sentazı olan *P. multocida* Tip F PmCS'yi tanımlamıştır; bu "kondroitin polimeraz" olarak kodlanan *E. coli* K4 enzimine (kfoC) çok benzemektedir, ayrıca iki enzim aktivitesi oldukça benzerdir. Bu araştırma grubu daha sonra bilinen proteobakteriyel enzimlere oldukça benzer olan, sıra dışı bir kaynaktan; bir sülfür bakterisi olan *Chlorobium phaeobacteroides*'ten bir başka kondroitin sentazını açıklamışlardır [98].

KPS, dış hücre duvarını örter; ancak, üstel veya sabit büyüme fazında, çevreyici ortamda serbest bırakılmaktadır. Bakteri çoğalması sırasında hücre içi UDP-şeker prekürsörü konsantrasyon varyasyonlarının belirlenmesi ve bunun toplam KPS üretimi ile korelasyonu (içtekilerin ve serbest bırakılanların toplamı olarak), zincirin biyosentez mekanizmasını ve karmaşıklığını daha iyi anlamaya yardımcı olabilir. Yapılan bir çalışmada; ilk kez, UDP-glikoz (UDP-Glc), UDP-galaktoz (UDP-Gal), UDP-N-asetilgalaktozamin (UDP-GalNAc), UDP-N-asetilglukozamin

(UDP-GlcNAc), UDP-glukuronik asit (UDP-GlcA) ve aynı zamanda bakteriyel biyokütlelerden ekstre edilen iç KPS kısmını eş zamanlı olarak analiz etmek için yeni bir kapiller elektroforez yöntemi oluşturulmuştur ve ayırma, borat bazlı bir tamponla 18 °C'de ve 18 kV'de gerçekleştirilip 200 nm'de tespit edilmiştir. Bu prekursorlerin varlığının, üretilen toplam KPS'yi önemli ölçüde etkilediği saptanmıştır [99].

Konjuge GAG'lar, spesifik moleküllerin vektörünü içeren tıbbi uygulamalar için umut vaat etmektedir. Yapılan bir çalışmada, metabolik olarak tasarlanmış *E. coli* suşları kullanılarak konjuge bir öncüden bakteriyel kondroitin üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu işlemde temel sorun; polimerizasyon için gereken bir laktosil akseptörün glukuronilasyonudur. Bu engeli aşmak için, fare  $\beta$ -1,3-glukuronil transferazı ve *E. coli* K4 kondroitin sentazı eksprese eden *E. coli* suşları tasarlanmıştır. Bu mühendislik suşları, bir laktosil-furil öncülü varlığında yüksek yoğunlukta çoğaltılmışlardır. Laktosil öncülü üzerinde meydana gelen enzimatik polimerleşme ile sitoplazmada biriken 15 ila 30 kDa arasında değişen küçük zincirler oluşmuştur. Geleneksel suşlar için rapor edilene benzer bir verimlilikte, 1 g/L Furil-sonlu polisakkaritler üretilmiştir. Diels-Alder siklo-tepkime reaksiyonu kullanılarak sulu ve katalizörsüz koşullarda meydana gelen etkili bir şekilde birleşme, aynı zamanda model dienofil olarak *N*-metil-metimidit kullanılarak da doğrulanmıştır. Bu çalışma; bakterilerde konjuge GAG'lar hazırlayarak, GAG'ların ve biyomateryallerin kimyası için yeni perspektifler sunmaktadır [100].

Kondroitin sülfatların biosentezinde yer alan enzimler iyi bilinmesine rağmen, çeşitli zorlukların üstesinden gelmek için bu membrana bağlı golgi enzimlerinin klonlanması ve ekspresyonu devam etmektedir. Majör kondroitin-4-sülfotransferaz, *Homo sapiens* C4ST-1, daha önceden memeli CHO, COS-7 ve HEK 293 hücrelerinden klonlanmış ve eksprese edilmiştir ve aktivitesinin glikozilasyon gerektirdiği gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada; bir C4ST-1 yapısı tasarlanıp hem *E. coli* hem de *Pichia pastoris*'in glikozile ve glikozile olmayan formlarında eksprese edilmiştir. Her iki yapı da mikrobiyal olarak hazırlanmış sülfatlanmamış kondroitin üzerine etki ederek farklı kinetik parametreler de olsa benzer aktivite göstermiştir. Ayrıca, C4ST-1'in glikozile edilmiş formu glikozile edilmemiş formundan daha düşük kararlılık göstermiştir. Sonuç olarak, C4ST-1 hem bakteri hem de mayada ilk kez klonlanmış ve ifade edilmiştir. Bu rekombinant enzimin,

bakteriyel kondroitini, kondroitin-4-sülfata dönüştürmek için kullanılabilceği açıklanmıştır [14].

Yayınlanan bir patente; KS'ın biyosentezine dair yeni bir yöntem açıklanmıştır. Bu yöntemde; PAPS (3'-fosfoadenosin-5p-fosfosülfat) rejenerasyon sistemi ile desteklenmiş C4ST (Kondroitin 4-sülfotransferaz) veya C6ST (Kondroitin 6-sülfotransferaz) kullanılarak kondroitinin sülfatlanması ile KS üretilmektedir. Patente göre; C4ST veya C6ST'yi eksprese etmek için konakçı olarak *E. coli* veya *P. pastoris* kullanılmaktadır, dolayısıyla, rekombinant ekspresyon için kullanılan plazmidler pET veya pPIC olmaktadır. C4ST veya C6ST ise hayvan kaynaklarından elde edilmektedir. Yöntemde, kondroitin sentezi, rekombinant *B. subtilis* 168 suşu ile gerçekleştirilmiştir. Rekombinant *B. subtilis* 168 suşu, genomdaki *kfoC* ve *Kfotk*'nın eksprese edilmesi ve UDP-glukuronik asit (UDP-GlcUA) veya UDP-N-asetilglukozamin (UDP-GlcNAc)'nin sentetik yolu ile ilgili genler gibi kondroitinin sentetik yolu ile ilgili ortak genlerin birlikte ifade edilmesi yoluyla oluşturulmuştur. Birlikte ekspresyon yolu genleri için kullanılan pP43-DBA, pP43-UMS, pP43-DU ve pP43-DU-PBMS rekombinant plazmidler, ana ekspresyon plazmid pP43NMK (metabolik olarak yapılandırılmış *B. subtilis* 168 ile spesifik-moleküler ağırlıklı hiyalüronik asit üretimi) baz alınarak inşa edilmiştir. Bu rekombinant suşlarla yapılan fermentasyon deneyleri sonucunda 84.36 kDa, 97.02 kDa, 72.78 kDa ve 119.20 kDa molekül ağırlığında kondroitin üretilmiştir. Daha sonra bu kondroitinin C4ST veya C6ST ile sülfatlanması sağlanmıştır [101].

Metabolik mühendislikte doğal metabolitlerin üretimini artırmak ve hızlandırmak için yaygın kullanılan bir strateji; öncüllerin endojen stoğunu artırmak ya da metabolik yolların verimini geliştirmeye yönelik uygulamalar yapmaktır. Yayınlanan bir çalışmada, bu stratejiye benzer bir şekilde, fruktozillenmiş kondroitin üretimi arttırılmaya çalışılmıştır. Bu amaçla, öncelikle bu yoldaki hız sınırlayıcı adımlar belirlenmiştir. Daha sonra UDP-GalNAc ve UDP-GlcA sentezini artırmak için pfkA enzimi ve aşırı eksprese edilen metabolik yol enzimleri devre dışı bırakılmıştır. Daha sonra, UDP-GalNAc sentezini, UDP-GlcA sentezini ve kondroitin polimerizasyonunu aynı anda optimize etmek için modüler yol mühendisliği denenmiştir. Kontrollü kültür koşulları altında, hücre içi UDP-GalNAc'nin UDP-GlcA'ya oranının, yabanıl tip suşta 0.17 iken, tasarlanmış ZQ25



suşunda 1.05 değerine yükseldiği bulunmuştur. Fruktozillenmiş kondroitin titresi ve verimliliği de 8.43 g/L ve 227,84 mg/L/saat çıkmıştır; bu değer, bu zamana kadar elde edilen en yüksek verimlilik düzeyini temsil etmektedir. Bu veriler; mikrobik fabrikalarda, glikozaminoglikanların verimli bir şekilde üretilmesi için metabolik akışın dengelenmesinin önemini ortaya koymaktadır [17].

*E. coli* K4, patojen bir suş olduğundan [102], *E. coli* BL21 [18] ve *B. Subtilis* 168 [21] gibi diğer suşlarda kondroitin biyosentez yolları oluşturulup optimize edilmiştir. KS sentezi için, GlcA ünitelerinin O-3 pozisyonunda  $\beta$ -fruktoz kalıntısını kaldırarak ve GalNAc kalıntılarının 4 ve 6 pozisyonlarına kimyasal sülfasyon grupları eklenerek mikrobiyolojik-kimyasal stratejiler geliştirilmiştir [103]. Ancak bu stratejiler; nadir ve pahalı substratlar gerektiren zaman alıcı işlemleri kapsamaktadır [104]. Bu nedenle, J. Chen ve ark.'nın yaptığı çalışmada, KS-A ve KS-C'nin de novo biyosentezi için yeni bir biyolojik yaklaşım geliştirilmiştir. Bu çalışmada, ilk olarak, karbon kaynağı olarak sükroz kullanılarak rekombinant bir *B. subtilis* suşunda kondroitin biyosentez yolu sistematik olarak optimize edilmiş ve kondroitin titresi 7.15 g/L olarak önemli ölçüde yükseltilmiştir. Daha sonra, saflaştırılmış aril sülfotransferaz IV (ASST IV), kondroitin 4-sülfotransferaz (C4ST) ve kondroitin 6-sülfotransferaz (C6ST) birleştirilerek başarılı bir şekilde spesifik sülfasyon transformasyon sistemleri oluşturulmuştur [105].

Kaynağına bağlı olarak, KS esas olarak, GalNAc'nin 4. pozisyonunda veya 6. pozisyonunda (sırasıyla disakkaritler A ve C) monosülfatlanmış iki tip disakkarit biriminin değişken yüzdelere kadar oluşmaktadır. Yayınlanan bir patentte; kondroitin sülfatın, sülfatlanmamış bir kondroitin omurgasından başlayarak kimyasal sülfatlama ile üretilmesi için sunulan bir yöntemden bahsedilmektedir. Patente göre işlem, aynı polisakkarit zinciri içinde, N-asetil-D-galaktozamin kalıntısının pozisyon 4 veya pozisyon 6'ya eş zamanlı olarak sülfatlanmasına izin vermektedir. Bu yöntem ile kondroitin; doğrudan *E. coli* O5:K4:H4 suşundan veya *E. coli*'nin genetik olarak modifiye edilmiş bir suşundan üretilmektedir. Burada tarif edilen bakteri suşu, K4'ün fruktozileştirilmesi için *kfoE* geninin inaktivasyonuna neden olan bir mutasyon taşımaktadır. Elde edilen KS'nin moleküler ağırlığı; ortalama 10-30 kDa arasındadır. Bu şekilde elde edilen KS, Avrupa Farmakopesinde tarif edilen analitik metotlara dayanarak %95'i aşan titre ile doğal bir KS'nin özelliklerini göstermektedir. Mevcut

buluş ayrıca düşük molekül ağırlıklı KS üretimi ile de ilgilidir ki bu da oral alım sonrası daha yüksek absorbans ve dolayısıyla insanlarda biyoteknolojik/kimyasal prosesler tarafından üretilen yüksek saflıkta kondroitin sülfattan daha iyi biyoyararlanım sağlamaktadır. Burada üretilen KS, yüksek derecede saf doğal kondroitin sülfat ile karşılaştırılabilir anti-enflamatuar ve anti-artritik etkinliğe sahiptir. Böylece, enflamatuar ve osteoartrit/artrit işlemlerin tedavisinde kullanım için uygundur [106].

Yapılan bir çalışmada; KS'nin in vivo ve in vitro immün yanıtta hayati rol oynadığı bildirilmiştir. Bununla birlikte, bağışıklık artırıcı aktiviteleri hakkında sınırlı bilgi mevcuttur. KS'nin immüno-uyarıcı aktivitesi hakkında daha kesin bilgiler elde etmek için bir çalışma yapılmıştır. İn vitro deneylerde KS'nin, RAW264.7 hücrelerinin, tedavi edilmeyen gruba kıyasla 100-1000 µg/mL doz aralığında, pinositik, fagositik aktivitesi ve ROS üretimini önemli ölçüde desteklediği bulunmuştur. Diğer deneylerde, KS'nin, toll-benzeri reseptör 2N(TLR2) vasıtasıyla makrofajlardaki benzer mRNA ekspresyonunu aktive ederek, NO, TNF-a, IL-6 ve IL-10'un salgı seviyelerini artırabildiği gösterilmiştir. Bu sonuçlar, KS'nin immün tepkileri arttırmak için bir immüno-stimülant işlevi görebileceğini ve immüno-lojik hastalıklarda veya fonksiyonel gıdalarda uygulama için potansiyel bir aday olabileceğini göstermiştir [107].

Osteoartrit ve trombozun neden olduğu yapısal değişiklikleri iyileştirmek ve klinik semptomları tedavi etmek için araştırılan çoklu bileşikler arasında en yaygın kullanılanı KS'dir. Bazı çalışmalar insanlarda KS'nin oral olarak alındığında yeterli düzeyde absorbe edilebildiğini ve bu absorpsiyonun onun moleküler ağırlığı ile ters orantılı olduğunu göstermiştir. Bildirildiği üzere, alınan KS'nin kan dolaşımına ulaşan büyük kısmı düşük moleküler ağırlıklı türevlerden oluşmaktadır. KS'nin anti-enflamatuar ilaç olarak kullanımını da moleküler ağırlığından etkilenmektedir. Molekül ağırlığındaki değişiklikler; bu mekanizmadan ve KS'den sorumlu moleküller arasındaki etkileşimin engellenmesi nedeniyle hücre tanımayı etkilemektedir. Bu durum farklı bağışıklık yanıtlarına ve hatta farmakolojik etkinin bozulmasına neden olmaktadır. Literatürde, bu tür bir kısıtlamanın üstesinden gelmek için açıklanan çeşitli stratejiler arasında, en çok tercih edileni; enzimatik yolla KS'nin depolimerizasyonudur. Bu işlem, KS'nin ve diğer GAG'ların

büyükliğini düzenleyen bazı enzimlerin bulunduğu in vivo ortamlarda doğal olarak gerçekleşmektedir. Diğer taraftan, daha çok kimyasal ve fiziksel işlemlere göre gerçekleştirilen enzimatik depolimerizasyon tercih edilmektedir, çünkü bu tür bir işlem, daha özgün bir depolimerizasyon reaksiyonuna izin vermesinin yanında, çevre dostu koşullara sahiptir ve daha az sayıda istenmeyen reaksiyonlara neden olmaktadır. Bu nedenle, laboratuvar ortamında, in vivo ortamdakileri taklit etmek için birçok spesifik ve spesifik olmayan enzim kullanılmıştır. Bir grup araştırmacı, 5000 Da'dan düşük moleküler ağırlığa sahip KS oligomerleri elde etmek için *Proteus vulgaris*'ten kondroitinaz ABC kullanımını araştırmışlardır. Ayrıca araştırmacılar, oligomerizasyon işlemine farklı kaynaklardan (sığır, domuz ve köpek kıkırdakları) ekstre edilen kondroitin sülfat örneklerinin etkisini de araştırmış ve hiyalüronidaz enzimini kullanarak KS'in moleküler ağırlığını azaltmaya yönelik yeni bir yaklaşım sunmuşlardır [108].

Son zamanlarda, gümüş nanopartiküller (AgNPs), antimikrobiyal, antiviral ve antiinflamatuvar aktiviteler gibi benzersiz özellikleri nedeniyle biyomedikal uygulamalarda oldukça ilgi çekmişlerdir. Antiseptikler olarak fonksiyon göstermeleri ve mikroorganizmalara karşı geniş bakterisidal etkiye sahip olmaları nedeniyle yara örtülerine, kremlere, spreylere ve kumaşlara AgNP'ler eklenmiştir. Kitosan-hiyalüronik asit/nano KS üçlü kompozit sünger, yara pansumanları için potansiyel bir aday olarak bildirilmiştir. Ayrıca, KS'in kolonik mikroflora ile yıkıldığı ve çeşitli tümör hücrelerinin yüzeyi üzerinde aşırı eksprese edilen CD44 ile bağlanma yoluyla tümör hedeflemesi sergilediği bildirilmiştir. Böylece, KS kolon spesifik ve kanser hedefli ilaç salım sistemleri için bir matris malzemesi olarak araştırılmıştır. Yapılan bir çalışmada; KS-stabilize AgNP'ler sentezlenmiştir. İndirgeyici madde, dengeleyici ve bazın konsantrasyonları dâhil olmak üzere yapım koşulları ayrıntılı olarak incelenmiştir. KS-AgNP'lerin fiziksel ve kimyasal özellikleri, UV-görünür (UV-Vis) spektroskopisi, foton korelasyon spektroskopisi, lazer Doppler anemometrisi, transmisyon elektron mikroskobu (TEM), X-ışını difraksiyonu (XRD) ve X-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS) kullanılarak karakterize edilmiştir. Sonuç olarak; KS-AgNP'lerin etkili katalitik aktivite gösterdiği bulunmuştur [109].

Yaşlanmaya bağlı değişikliklere en hassas beyin bölgelerinden biri olan striatum; motor, bilişsel ve duygusal kontrol gibi birçok merkezi sinir sistemi

fonksiyonlarının bir parçasıdır. Striatumda kondroitin sülfat proteoglikan (KSPG) ile ilişkili 2 temel tip Ekstrasellüler Matriks (ECM) tanımlanmıştır: perinöral ağlar ve difüzyif ECM. Her iki tip ECM de yaşlanmaya bağlı olarak bir şekilde birikmektedir. Yaşlanmaya bağlı olarak, KSPG ile ilişkili ECM'nin birikimi, motor öğrenme ve çalışma belleği dahil olmak üzere, striatumla ilgili bilişsel işlevlerdeki düşüşle ilişkilidir. Kondroitinaz ABC ile yaşlı farelerde KSPG ile ilişkili ECM'nin enzimatik eksilmesinin gerçekleştirildiği bir çalışmada, nöral ECM KSPG'lerindeki değişikliklerin striatal plastisiteyi düzenlediği ve motor öğrenmenin önemli ölçüde iyileştirildiği rapor edilmiştir. Bu çalışma, normal ve patolojik yaşlanma için uygun terapötik stratejilerin tasarlanmasında önemli bir nokta olan striatal plastisitenin altında yatan nöral ECM'nin rolünün daha iyi anlaşılmasını sağlamıştır [110].

Melanom agresif özellikleri olan ölümcül bir malignitedir ve son birkaç yıldır özellikle dünyadaki beyaz popülasyonlarda insidansı giderek artmaktadır. Son dönemde yapılan çalışmalardan birinde, tümör büyümesini ve metastazı inhibe ederek melanomu tedavi etmek için akıllı redoks/enzime cevap veren kondroitin sülfat bazlı nanopartiküller tasarlanmıştır. Elde edilen deney sonuçlarına göre; bu KS-bazlı nanopartiküllerin, spesifik olarak tümör dokularına tutunacak, çift internal tetikleyiciler sayesinde ilacı selektif olarak salıverebilecek ve iyi bir antitümör ve antimetastaz etki sergileyebilecek akıllı ilaç salım sistemleri için aday olabileceği gösterilmiştir [111].

KS'nin, doku mühendisliği iskelesine dahil edilmesi literatürde çalışılmıştır. Bu çalışmaların bir örneğinde; KS kullanılarak epidermal-dermal iyileşme süreçlerini destekleyen biyofonksiyonel dermal yara sargı materyalleri olarak kullanılacak, biyomimetik elektrospun iskeleleri geliştirilmiştir. Bu çalışma; KS'li bu nanolifli iskelelerin, fibroblast ve keratinosit çoğalmasını arttırdığını ve dolayısıyla epidermal-dermal yara iyileşmesini güçlendirdiğini göstermiştir [112].

Literatürde KS'nin antikoagülan etkisinin olduğu rapor edilmiştir. H. Bougateg ve ark.'nın yaptığı çalışmada; klasik antikoagülasyon testleri kullanılarak, plazmada, saflaştırılmış KS kombine dermatan sülfat (DS) preparatların in vitro antikoagülan aktivitesi ölçülmüştür, bu testler: kısmen aktif tromboplastin zamanı (aPTT), trombin zamanı (TT) ve protrombin zamanı (PT) testleridir. Bulgular, saflaştırılmış

KS/DS'nin belirgin şekilde yüksek bir antikoagulan etki sergilediğini göstermiştir [10].

Diyabetik bireylerin yaklaşık %90'ı tip 2 diyabete sahiptir. Bir çalışmanın sonuçları; düşük moleküler ağırlıklı KS'nin  $\alpha$ -glukosidazın in vitro aktivitesini inhibe ettiğini ve düşük moleküler ağırlıklı KS'nin ICR (İsviçre albino fareleri) farelerinde postprandiyal kan glikoz seviyesinin yükselmesini engellediğini göstermiştir. Ayrıca, bu çalışmanın sonuçları, düşük moleküler ağırlıklı KS'nin diyabetik farelerde açlık kan şekerinin yükselmesini ve insülin direncinin artışıını inhibe ettiğini göstermiştir. Bu sonuçlar, düşük moleküler ağırlıklı KS'nin, tip 2 diyabetin gelişmesini ve ilerlemesini önlemek için yararlı olduğunu göstermektedir [113].

siRNA dağıtımında, daha çok katyonik lipozomlar gibi viral olmayan vektörler kullanılmaktadır. Ancak, katyonik lipopleksler ve anyonik eritrositler arasındaki elektrostatik etkileşimler aglütinasyona neden olabilir. Aglutinatlar ise, oldukça genişlemiş akciğer kılcal damarlarında lipoplekslerin birikmesine neden olmaktadır. Bu problemi çözmek için yapılan bir çalışmada; KS gibi anyonik polimerler ile siRNA lipopleksleri elektrostatik kapsüllenmiştir. Bu çalışma ile, KS'nin, karaciğere güvenli siRNA iletimi için değerli bir materyal olabileceği gösterilmiştir [114].

Negatif yüklü olan heparin, hücre dışı histonlara bağlanabilir; ancak heparin, pıhtılaşma aktivasyonunu kuvvetle inhibe eder. Bu nedenle, ölümcül trombozlu kanama hastalarının tedavisi için heparin önerilmemektedir. KS, koagülasyon sistemi üzerinde heparinin yaptığından daha az etki gösterdiğinden, ölümcül trombozda KS'nin terapötik mekanizmalarını aydınlatmak için, KS ve hücre dışı histonlar arasındaki etkileşimi araştıran bir çalışma yapılmıştır. Çalışma sonuçları, KS'nin kanama riski yüksek hastalar için etkili bir ilaç olma potansiyelinin olduğunu göstermiştir [115].

KS'nin nöropatik ağrı üzerindeki etkisi belirsizliğini korumaktadır. Bu konudaki bir çalışmada; KS'nin kısmi siyatik sinir ligasyonu (PSNL) ile ilişkili nöropatik ağrıya karşı etkili olup olmadığı incelenmiştir. Farelerde gerçekleştirilen tekrarlanan oral KS uygulaması (300 mg/kg, 20 gün boyunca), PSNL'den sonra gözlenen 21 günde dokusal allodini inhibisyonuna yol açmıştır. 21. günde, spinal p38 mitojenle

aktifleştirilen protein kinaz (MAPK) fosforilasyonu, KS sayesinde hafiflemiştir. KS ayrıca, A $\beta$ -fiber sınırları alan eş taraflı derin dorsal korna (lamina III – IV) nöronlarında c-Fos artışını da inhibe etmiştir. Bu bulgular, KS'ın spinal p38 MAPK fosforilasyonunu ve A $\beta$ -fiber aktivasyonunu inhibe ederek PNL'nin indüklediği dokusal allodini zayıflattığını göstermiştir. Bu çalışmanın sonuçlarının nöropatik ağrıyı hafifletmek için kullanılabilir etkili KS-bazlı ilaçlar geliştirmeye yardımcı olabileceği bildirilmiştir [116].

Literatür taramalarından edinilen bilgiye göre; araştırmacılar, hayvan kaynaklarından elde edilen KS'ın taşıdığı riskler ve olumsuz bazı faktörlerden dolayı alternatif kaynaklardan üretimine yoğunlaşmışlardır. Bu alternatif yöntemler: enzimatik dönüşümler ve mikrobiyal kaynaklardan üretim olmuştur. Enzimatik dönüşümler, pahalı substratlar gerektirdiği için, nispeten daha az maliyetli bir işlem olan mikrobiyal kaynaklardan KS üretimi, araştırmacılar tarafından dikkat çekici bulunmaktadır. Bu amaçla bakterilerin ve mantarların kullanımı bildirilmiştir. Literatüre baktığımızda; Mikrobiyal Kondroitin için daha çok bakterilerin tercih edildiği saptanmıştır. Bunun için araştırmacılar ilk zamanlar *E. coli* K4 bakterisini kullanırken bu suşun patojenitesi nedeniyle suştaki kondroitin sentez genlerinin patojen olmayan yeni suşlara aktarımı sağlanarak kondroitin üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu zamana kadar yapılan çalışmalarda, yeni bakteri suşları oluşturmaktan ziyade mevcut suşlar kullanılarak üretim verimini etkileyen parametrelerin optimizasyonu sağlanmaya çalışılmıştır. Böylece büyük ölçekli üretim hedeflenmiştir.

Düşük moleküler ağırlıklı kondroitinin oral alım sonrası daha iyi bir emilim göstererek oldukça iyi bir aktivite sergilediği rapor edilmiştir [117,118]. Bu nedenle; çalışmamızda; düşük moleküler ağırlıkta kondroitin üretimi amaçlanmıştır. Üretilen bu kondroitine daha sonra seçici bölge sülfatlama işlemi uygulanmasıyla Kondroitin-6-sülfat üretimi hedeflenmiştir. Böylece, biyolojik işlevini ayarlamak için doğal ürünlerde meydana gelenlere benzeyen spesifik sülfatlama modellerine sahip moleküller elde etmek ve sülfatlama motifini iyileştirmek amaçlanmıştır.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Bu çalışmada, besiyeri hazırlanması ve bakteri stoklarının korunması için; Pepton, sodyum klorür (NaCl), maya özütü, agar, amfisilin ve gliserol, Mikrobiyal Kondroitin üretim aşamasında; Saf etil alkol, deoksiribonükleaz (DNAse), proteinaz K, tris, magnezyum klorür (MgCl<sub>2</sub>), kalsiyum klorür (CaCl<sub>2</sub>), Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi- Kütle Spektrometresi (HPLC-MS) analizinde; amonyum asetat, kalsiyum asetat, NaCl, imidazol tampon, Kondroitinaz ABC, 2-aminoakridon (AMAC), sodyum siyano borhidür, dimetil sülfoksit, Mikrobiyal Kondroitin Sülfat üretimi aşamasında; piridin sülfotrioksit, aseton, sodyum hidroksit, hidroklorik asit, diyaliz tüpü selüloz membran ve dimetil formamid, Diyaliz Tüpü Selüloz Membran aktivasyonu için; sodyum sülfür ve sülfürik asit, Kompetan Hücre oluşturulması için; CaCl<sub>2</sub>, Agaroz Jel Elektrofrezisi için ise; TBE tamponu (Tris baz, borik asit, EDTA), agaroz ve Etidyum bromid kullanılmıştır.

#### 3.2. Çalışmada Kullanılan Bakteriler ve Saklama Koşulları

Çalışmada; pUC8:15 plazmidinin izolasyonu için, *E. aerogenes* (NRRL (ARS Culture Collection) B-427) (Peoria'daki USDA kültür koleksiyonundan elde edilmiştir) bakterisinin *vgb*<sup>+</sup> rekombinantı olan *E. aerogenes* (pUC8:15) kullanılmıştır. *Ea* [pUC8:15] suşu 665 baz çifti büyüklüğünde olup pUC8 plazmidinin multi klonlama bölgesindeki Hind III restriksiyon bölgesine 2.3- Kb'lık promotörü ile birlikte *vgb* geni taşıyan *Vitreoscilla* genomik fragmanının klonlaması ile oluşturulmuş rekombinant bir bakteri suşudur.

Mikrobiyal Kondroitin üretimi prosesinde ise; pUC8:15 plazmidi üzerinde bulunan, uygun restriksiyon enzimleri ile kesilerek elde edilen *vgb* gen bölgesinin eklendiği temel plazmid olan; pETM6-PACF plazmidinin aktarılacağı konak bakteri/kondroitin üretim suşu olarak *E. coli* (C2987) (NEB (New England Biolabs)'den satın alınmıştır) kullanılmıştır. Bakteriler, -20 °C'de gliserollü stokta muhafaza edilmiştir. Kullanılan rekombinant suşlar, her otuz günde bir LB plaklarına öze vasıtasıyla pasaj yapılarak gece boyu üremeleri sağlanmış ve ertesi gün plakların etrafı parafilmle kapatılarak 4 °C'de muhafaza edilmiştir. Deneyler için bu stoklar kullanılmıştır.

### 3.3. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri

Araştırmada; hücre büyümesi ve ayırım transformasyonu için amfisilinli (80 mg/ml) Lauria Broth (LB) sıvı besiyeri kullanılmıştır. Besiyerleri 2 litrelik erlenlerde hazırlanıp 25 dk boyunca 120 °C’de ve 1 atm basınçta otoklavda steril edilmiştir. LB besiyerinin içeriği Çizelge 3.1.’de verilmiştir.

**Çizelge 3.1.** LB besiyeri içeriği (g L<sup>-1</sup>)

Pepton	10 gr
NaCl	10 gr
Maya özütü	5 gr
pH	7.5

Katı LB besiyeri için; ortama %1.5 agar eklenmiştir.

### 3.4. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler

Kondroitin üretimi için kullanılan parçalama tamponu Çizelge 3.2.’de verilmiştir.

**Çizelge 3.2.** Kondroitin üretiminde kullanılan parçalama tamponu

Tris	100 mM
MgCl <sub>2</sub>	50 mM
CaCl <sub>2</sub>	10 mM
pH	7.5

HPLC-MS analizi için kullanılan parçalama tamponu ve Tris-NaCl-İmidazol çözeltisi sırasıyla Çizelge 3.3. ve 3.4.’de verilmiştir.



**Çizelge 3.3.** HPLC-MS analizinde kullanılan parçalama tamponu

Amonyum asetat	50 mM
Kalsiyum asetat	2 mM
pH	7.5

**Çizelge 3.4.** HPLC-MS analizinde kullanılan Tris-NaCl-İmidazol çözeltisi

Tris	25 mM
NaCl	500 mM
İmidazol tampon	300 mM
pH	7.4

Yukarıdaki çizelgelerde (Çizelge 3.2, 3.3. ve 3.4.) verilen kimyasallardan belirtilen miktarlarda kullanılarak istenilen hacimde stok çözeltiler hazırlanmış ve deneyler süresince bu stok çözeltiler kullanılmıştır.

### 3.5. Kullanılan Plazmidler

Yeni vektörün yapımında kullanılacak pETM6-PACF plazmid, Rensselaer Polytechnic Institute, Troy, NY'dan Mattheos Koffas'dan temin edilmiştir.

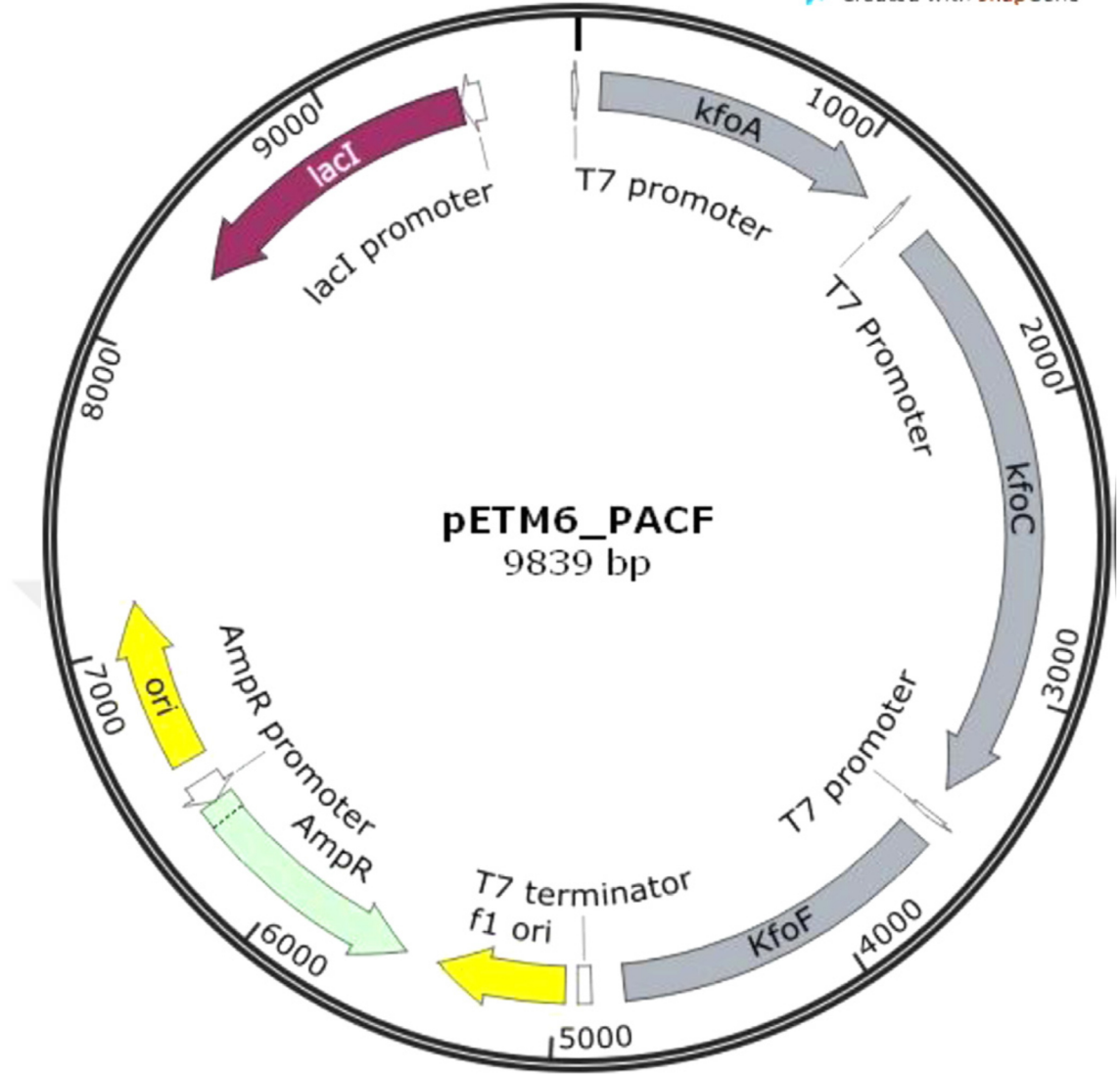
pUC8:15 plazmid ise, *E. aerogenes* (NRRL (ARS Culture Collection) B-427) [pUC8:15] suşundan izole edilmiştir.

#### 3.5.1. pETM6-PACF plazmid

Bu plazmid, üzerinde kondroitin sentez genleri olan; *kfoA*, *kfoC* ve *kfoF*'yi taşımaktadır.

*E. coli* K4'ün genomik DNA'sı; genomik DNA ekstraksiyon kiti ile (Invitrogen) izole edilmiştir. Her bir hedef gen: *kfoA*, *kfoC* ve *kfoF*, Accuzymes karışımı (BIOLINE) kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılmıştır. Kullanılan primerler K4'ün tüm genom dizisine dayalı olarak dizayn edilmiştir ve ePathBrick sisteminde (Birden fazla gen ilavesinin ve ifadesinin düzenlenmesine sinyal kontrolü sağlayan vektör sistemi) en yüksek kopya sayılı

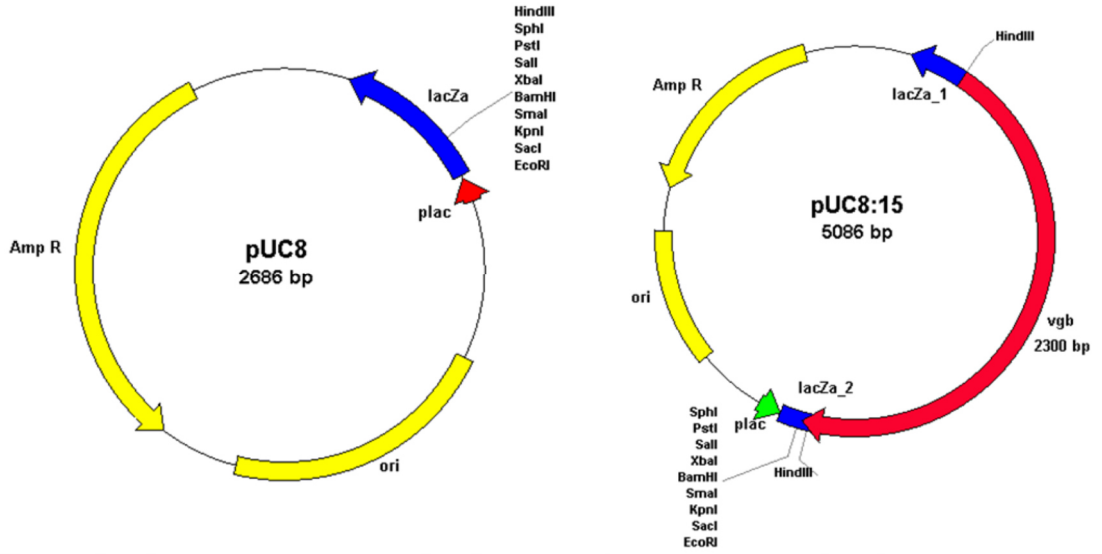
plazmid olan pETM6 vektörüne klonlanmıştır. Buna bağlı olarak; tüm üç gen, her bir hedef gen için bir T7 promotörü ve son genin ucunda tek bir sonlandırıcı içeren sözde bir operon konfigürasyonuna yerleştirilmiştir. Plazmid DNA'sı, E.Z.N.A.® Plazmid Mini Kit (OMEGA) ile hazırlanmış ve parçalanmış DNA fragmentleri E.Z.N.A. jel ekstraksiyon kiti (OMEGA) ile agaroz jelden (Bio-Rad) geri elde edilmiştir. Hem *kfoA* hem de *kfoC*; gen içerisinde bir SpeI restriksiyon bölgesi içermektedir. QuikChanges bölgeye-yönelik mutajenez kiti (Agilent) kullanılarak doğrudan mutajen bölge tarafından sessiz mutasyonlar (*kfoA* 15Thr (ta) ve *kfoC*, 432Leu (ct); 573Thr (ta)) meydana getirilmiştir. Her mutasyon kodonu, *E. coli* K4'de en çok kodon kullanımına optimize edilip hem çift endonükleaz kesimi hem de DNA dizilimi ile doğrulanmıştır. Plazmid yapımı; standart teknikleri ve ePathBrick platform protokolünü takip etmiştir. Son olarak plazmidler; Bio-Rad Gene PulserXcell™ transformasyon sistemi (2 mm küvetler, 2.5kV, 25 mF ve 200Ω) kullanılarak elektroporasyon ile *E. coli* BL21 Star™ (DE3)'e dönüştürülmüştür. Hücreler; 50 dakika boyunca katabolik baskı (SOC) ortam ile süper optimal sıvı besiyerinde geri kazanılmış ve tarama için 80 mg/ml amfisilin takviye edilip LB besiyerine eklenmiştir. pETM6-PACF plazmidinin genetik haritası Şekil 3.1.'de gösterilmiştir [18].



Şekil 3.1. pETM6-PACF plazmidi [18]

### 3.5.2. pUC8:15 plazmidi

pUC8:15 plazmidi, 5 kb'lık bir büyüklüğe sahip, 665 baz çiftine sahip pUC8 plazmidinin multi klonlama bölgesindeki Hind III restriksiyon alanına 2.3-Kb'lık promotörü ile birlikte *vgb* geninin yerleştirildiği ve bu gene ait genetik mühendislik çalışmalarında sıklıkla tercih edilen bir plazmittir. pUC8:15 plazmidinin genetik haritası Şekil 3.2.'de gösterilmiştir [34].



**Şekil 3.2.** pUC8 ve pUC8:15 plazmidlerinin fiziki haritası [34]

### 3.6. pETM6-PACF-pUC8:15 Plazmidinin Oluşturularak *E. coli* Suşuna Aktarılması ve Klonlamayı Doğrulayan Agaroz Jel Elektroforezi

Bu işlemde, plazmid olarak; *E. aerogenes* [pUC8:15] bakterisinden izole edilmiş ve stokta hazır bulunan pUC8:15 ve Rensselaer Polytechnic Institute, Troy, NY'dan Mattheos Koffas'dan temin edilen pETM6-PACF plazmidleri kullanılmıştır.

Bu kısımda, kondroitin sentezini sağlayan gen bölgesini ve *Vitreoscilla* hemoglobin proteinin sentezini sağlayan *vgb* gen bölgesinin her ikisini de taşıyan ve kondroitin sülfat üretimi için kullanacağımız yeni rekombinant bakteriye dair yeni bir plazmid yapımı işlemlerine yer verilmiştir.

Tez önerimizde KS üretimi amacıyla VHb/*vgb* rekombinant sisteminin entegre edildiği *E. coli* bakterileriyle çalışılacağı belirtilmiştir. *vgb* ve *kfo* olmak üzere, iki gen grubunu da taşıyan hibrit plazmid oluşturma aşamasının başlangıcında *vgb* geninin HindIII enzimi ile kesilmesi planlanmış ancak pETM6 vektöründe bu enzimin kesim bölgesi olmadığı tespit edilmiştir. Bu nedenle HindIII enzimi ile kesilen *vgb* genini, pETM6-PACF plazmidine aktarmanın mümkün olmayacağı belirlenmiştir. pETM6-PACF vektörü, çok uzun bir vektördür (9865 bp), bu nedenle *vgb* gen bölgesinin bu vektöre klonlanmasında ciddi sorunlarla karşılaşmıştır.

Birçok bölgede tekrarlı T7 promotor, lacI operator, S-Tag gibi bölgeler vardır, bu bölgeler klonlama sırasında homolog rekombinasyonlara sebep olabilmektedir. Ayrıca pUC8 vektöründe de *vgb* genini 5'den kesecek başka enzim kesim bölgesi olmadığının tespit edilmesi ile pUC8 vektöründeki *vgb* geninin her iki ucuna pETM6 vektöründe de bulunan bir enzim kesim bölgesi eklenmesine karar verilmiştir. Bu aşamada:

pETM6-PACF ve pUC8:15 plazmidlerine ait harita ve sekans bilgisi elimizde olmadığından Yeni Nesil Sekanslama (De novo NextGen) yapılmıştır. *vgb* gen bölgesinin [pUC8:15] vektöründen, pETM6-PACF vektöründe T7 terminator den önceki SpeI bölgesine klonlamanın yapılması kararlaştırılmış ve farklı bir opsiyon olarak denenmiştir. Ve bu deneme başarı ile sonuçlanmıştır. Bu amaçla PCR ile çoğaltılan genler, jel ekstraksiyonu kiti ile jelden izole edilmiştir. Klonlama için jelden izole edilen DNA'lar ve pETM6-PACF vektörü SpeI enzimi kullanılarak kesilmiş ve enzim kesiminde insert 250 ng, vektör 1000 ng olarak ayarlanıp alınmıştır. Kesim işlemi için hazırlanan mix (Çizelge 3.5.) ile DNA'lar bir gece 37 °C'de inkübe edilmiş ve enzim kesimi yapılmıştır.

**Çizelge 3.5.** Enzim kesimi için hazırlanan miktarlar

	<b>Enzimler</b>	<b>NEB 2:1</b>	<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>DNA</b>	<b>Total</b>
<i>vgb</i>	SpeI: 0,5	2	7,5	10	20
<b>pETM6-PACF</b>	SpeI: 0,5	2	12,5	5	20

Vektör olarak SpeI enzimleri ile enzim kesimi yapılmış olan pETM6-PACF kullanılmış ve 22 °C'de 2 saat inkübe edilmiştir (Heat Block).

### **Ligasyon:**

Kesimi yapılan insert (hedef gen) ile kesilmiş vektörün (pETM6-PACF) ligasyon işlemi Çizelge 3.6.'da gösterildiği gibi hesaplanarak hazırlanmış ve 22 °C'de 2 saat inkübasyona bırakılmıştır.

**Çizelge 3.6.** Ligasyon için kullanılan maddeler ve miktarları

	Vektör	Insert	Su	10X LigBuf	T4 Enzim	Total
<i>vgb</i>	1,5 µl	0,5 µl	15,5 µl	2 µl	0,5 µl	20 µl

### **Transformasyon:**

Ligasyon işleminden sonra örnekler kompetant bakteriye transformasyon yapılmıştır. Bu işlem, literatürdeki standart “ısı şoku” protokolüne [119] göre aşağıdaki şekilde yapılmıştır:

10 µl Ligasyon ürünü kompetant hücre (100 µl) üzerine eklenerek hafifçe karıştırılmış ve daha sonra 15 dakika buz üzerinde inkübasyon yapılmıştır. Bu aşamada plazmid DNA’sının hücreye yapışması sağlanmış ve buz üzerinde inkübasyonu yapılan bakterilerin porlarının açılıp, DNA’nın bakteri içerisine girmesi için örnekler 42 °C’de 1 dakika bekletilmiştir. Porların kapanması için ise 1 dakika sonunda örnekler buza alınmıştır. Bakteri ve ligasyon örnekleri, 200 µl S.O.C sıvı besiyeri ile 1,5’luk ependorf tüpüne alınmış ve 37 °C’de 20-30 dakika çalkalayıcıda karıştırılmıştır, daha sonra örnekler amp (+) olan LB agarlı petrilere ekilmiş ve 1 gece 37 °C’de inkübe edilmiştir.

### **Koloni PCR:**

Oluşan kolonilerden hangi kolonide genin doğru olarak klonlandığını görmek için koloni PCR yapılmıştır.

### **Agaroz Jel Elektroforezi:**

Klonlamayı doğrulamak için Agaroz Jel Elektroforezi uygulanmıştır. Agaroz Jel Elektroforezi, standart metotlar kullanılarak yapılmıştır. Jel hazırlama ve yürütme tamponu 5X stok TBE tamponununun 1X’e dilüe edilmiş halinden oluşmaktadır (1 litre 5X stok TBE tamponu: 54 g Tris baz (pH 8.3), 27.5 g borik asit, 20 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0)). Jellerin hazırlanması ve yürütülmesi için aşağıdaki protokol uygulanmıştır [120]:

Jeller için 50 ml 1X TBE tamponuna %1.5 (w/v) agaroz ilave edilmiş ve agaroz tamamen eriyip solüsyon berrak bir hal alıncaya kadar mikrodalga fırında

kaynatılmıştır. Solüsyon ısısı 60-70 °C'ye düşünce 10 mg/ml etidyum bromid stok solüsyonundan 30 µl ilave edilerek hava kabarcığı ya da köpürme olmayacak şekilde yavaşca karışması sağlanmıştır. Temiz ve kuru bir jel döküm kalıbına, tarak dişlerini kapatacak kalınlıkta yukarıdaki jel solüsyonundan dökülmüş ve yaklaşık 20 dk bekletilmiştir. Jel, döküm kalıbı ile beraber jel yürütme tankı içine alınarak taraklar çıkarılmış ve jeli yaklaşık 0.5 cm kaplayacak miktarda jel yürütme tamponu tank içerisine doldurulmuştur. Restriksiyon enzimi ile muamele edilmiş plazmid DNA'sı ve yine uygun restriksiyon enzimleri ile önceden kesilmiş lambda (λ) DNA'sı uygun kuyucuklara eklenerek sabit voltaj (40-50 Volt) ve akımda (20-25 mA) jeller elektroforeze tabi tutulmuştur. Jellerdeki DNA bantlaşma motifi UV ışıkta floresan ışık yayan Etidyum bromid ile belirlenmiştir. Bu boyanın DNA'ya bağlanarak (interkalasyon) 300 nm UV ışık altında emisyonu (ışık yayması) DNA bantlarının buldukları pozisyonlarda görünmelerini ve fotoğraflanmalarını mümkün kılmıştır. Belirtilen şekilde hazırlanan jellerin fotoğrafları çekilmiştir.

### **3.7. *E. coli kfo<sup>+</sup>-vgb<sup>+</sup>* Rekombinant Bakterinin Üreme Eğrisi**

Çalışmanın bu aşamasında; *E. coli kfo<sup>+</sup>-vgb<sup>+</sup>* bakterisinin üreme eğrisini teyit etmek için LB sıvı besiyeri hazırlanıp otoklavlanmış daha sonra bu steril besiyerlerine tasarlanan suşlardan ekim yapılarak stok kültürler oluşturulmuştur. Her bakteri için üç tekrarlı olmak koşuluyla, bu stok kültürlerden taze besi yerlerine 1/50 ml olacak şekilde ekim yapılmış ve 0. saatten itibaren 12. saate kadar her saat başı, sonrasında ise 24.saat, 48.saat ve 72. saatte bir örnekler alınarak 600 nm'de absorbans ölçümü yapılmıştır. Bu ölçümlere dayalı olarak üreme eğrisi grafiği oluşturulmuştur.

### **3.8. Mikrobiyal Kondroitin Üretimi**

pETM6-PACF ve pUC8:15 plazmidinin ikisinin de transforme edilmesiyle oluşturulan ve kondroitin sentezinden sorumlu *kfoA*, *kfoC*, *kfoF* genlerinin *Vitreoscilla* hemoglobin geni ile ortak ifade edildiği rekombinant bir sistem olan *E. coli* suşu ile kondroitin sentez işlemi gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın saflaştırma aşamasında, literatürdeki en yüksek kondroitin eldesinin rapor edildiği ve pETM6-PACF plazmidinin kullanıldığı çalışmadaki yöntem takip edilmiştir [11]. Yöntem; kültür süpernatandan başlayarak birkaç çöktürme aşamasına ve son olarak vakum altında kurutmaya dayanmaktadır. Öncelikle, bakteriyel büyümeyi ve

kondroitin üretimini en üst düzeye çıkarmak için kültür koşullarının optimizasyonu sağlanmıştır. Çalışmamızda; pETM6-PACF plazmidini oluşturma aşamasında, fruktozillenmeyi sağlayan gen (*kfoE*) aktarılmamıştır, böylece, fruktoz artıklarını ortamdaki uzaklaştırmak için ilave post-fermentasyon işlemlerine gerek duyulmamıştır. Yönteme göre [18]:

Oluşturulan rekombinant bakteri suşundan Luria bertani broth (LB) sıvı besiyerine ekim yapılarak, 37 °C'de, bakterilerin gece boyunca çoğalmaları sağlanmıştır. Ertesi gün bu rekombinant bakteri kültürü 9000 rpm'de 5 dakika süre ile santrifüj edilmiştir. Elde edilen hücre peleti suda yeniden süspansiyon edilmiş ve 15 dakika süre ile otoklav edilmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatant farklı santrifüj tüplerine aktarılmış ve çözünmez materyalin uzaklaştırılması için ayrıca santrifüj edilmiştir. Elde edilen yeni süpernatantlar ayrı tüplere aktarılıp Süpernatant 1 olarak etiketlenmiştir. Otoklavdan çıkan örnekler santrifüj edilmiş ve süpernatantları ayrı tüplere aktarılıp Süpernatant 2 olarak etiketlenmiştir. Süpernatant 1 ve Süpernatant 2 etiketli tüplerin üzerine alkol hacmi %80 olacak şekilde saf etanol eklenip çökeltme işlemi yapılmıştır. Alkol ilavesinin ardından örnekler -20 °C'lik dondurucuda bekletilerek çökeltme işlemi sürdürülmüştür. Çökeltme işlemi sonunda numuneler santrifüj edilerek elde edilen peletler toplanmış ve parçalama tamponunda yeniden süspansiyon edilmiştir. Numunelerin üzerine DNase eklenmiş (1 mg/l) ve örnek 37 °C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra örneklerin üzerine Protease K eklenmiş (2.5 mg/ml) ve 56 °C'de 2 saat inkübe edilmiştir. Alkol hacmi %80 olacak şekilde 2. bir alkol çökeltmesi yapılmış ve peletler toplanıp suda (yaklaşık 1 ml) çözünmüş sonrasında spin kolonla filtreleme yapılmıştır. Filtrelemeden sonra geriye kalan kısım vakumla liyofilize edilmiştir.

Yukarıdaki işlemlerle elde edilen kondroitinin HPLC-MS ve Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) ile moleküler yapı analizi gerçekleştirilmiştir.

### **3.9. Kondroitin Numunelerinin HPLC-MS Analizleri**

HPLC, bir kolondaki adsorban malzemelerle bileşiklerin farklı etkileşimlerine dayanarak, belirli bileşikler için farklı elüsyon sürelerine yol açan bir ayırma yöntemidir. HPLC, spesifik her bir GAG'yi analiz etmek için hassas, tekrarlanabilir ve doğru bir yöntemdir; ancak, kütle taramasına uygulanamaz çünkü yöntem karmaşık ve zaman alıcıdır. Bu nedenle, HPLC protokolleri, modifiye edilmiş ya da



edilmemiş, ayrıştırılmış disakkaritleri tanımlamak ve ölçmek için kütle spektrometrisi (MS) ile birleştirilmektedir.

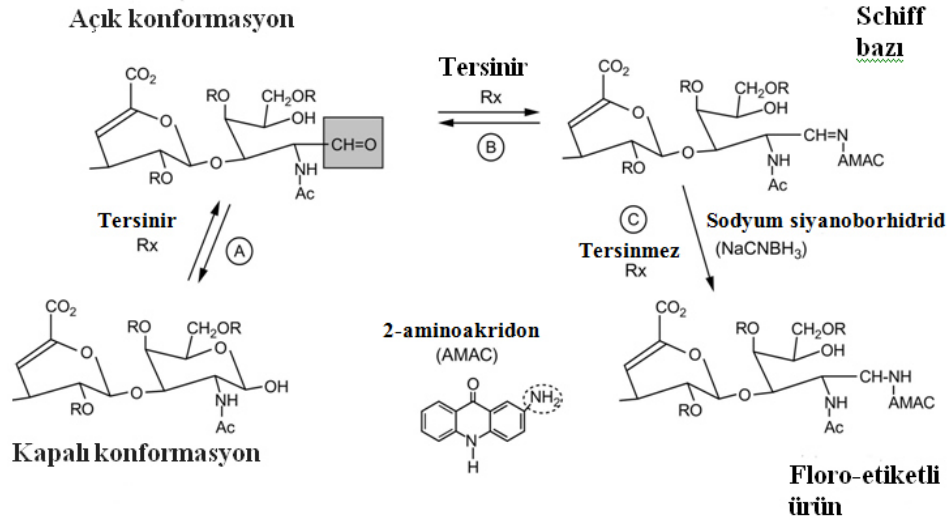
MS; kütle/yük oranlarına ( $m/Q$ ,  $m/q$ ,  $m/Z$  veya  $m/z$ ) dayanarak bileşikleri ölçen bir tekniktir. Farklı iyonizasyon kaynakları kullanılabilir, örneğin; Elektrosprey İyonizasyon (ESI), Atmosferik Basınçlı Kimyasal İyonizasyon (APCI), Hızlı Atom Bombardmanı (FAB), Kimyasal İyonizasyon (CI), Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon (MALDI). MS analizi, bilinmeyen bileşiklerin karışımlarındaki bütün bozulmamış iyonları tespit etmek için tam spektrumlu olabilir. Bir önceki aşamada elde edilen kondroitin için HPLC analizi, İBTAM (İnönü Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Merkezi) bünyesinde yapılmıştır. Üretilen kondroitin numuneleri, analize gönderilmeden önce, referans makaleden alınan HPLC prosedürü uygulanmıştır [18].

#### **HPLC-MS analiz öncesi uygulanan prosedür:**

Analize gönderilecek kondroitin 100 µl parçalama tamponunun içerisinde çözülmüştür. Tris- NaCl- İmidazol çözeltisinden 5 µl alınıp içerisine 20 mU Kondroitinaz ABC eklenmiştir. Oluşan yeni solüsyon ilk adımda parçalama tamponunda çözülmüş numuneye eklenmiş ve 35 °C'de 10 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra numune liyofilize edilmiştir. Liyofilize edilen numune; asetik asit/dimetil sülfoksit karışımındaki (3:17, v/v) 0.1 M'lık AMAC (2-aminoakridon) solüsyonunun 10 µl'si içerisine eklenmiş ve 5 dk vortekslenerek karışması sağlanmıştır. Daha sonra reaksiyon karışımına 1 M NaBH<sub>3</sub>CN'den 10 µl eklenmiş ve 45 °C'de 4 saat inkübe edilmiştir. Son olarak; AMAC-etiketli numune %50 (v/v) sulu DMSO kullanılarak 0.5-50 ng aralığında farklı konsantrasyonlara seyreltilerek analize gönderilmiştir [18]. Yapılan işlem Şekil 3.3.'de şematize edilmiştir [121].

Sıvı kromatografi kütle spektrometrisi (LC-MS) analizleri, bir 6300 iyon tutucu ve ikili pompa ile donatılmış bir Agilent 1200 LC/MSD cihazında gerçekleştirilmiştir. Kullanılan sütun, 55 °C'de bir Poroshell 120C18 sütunudur (3.0 x 30 mm<sup>2</sup>, 2.7 µm, Agilent). Elüent A: 80 mM amonyum asetat çözeltisidir, Elüent B ise: metanoldür. Kolondan 4 dakika boyunca, Elüent A ve %20 Elüent B, ardından 4-60 dakika arasında %40 Elüent B geçirilmiştir (200 µl/dak). MS tarafından sürekli bir tespitin sağlanabilmesi için sütun atık suyu, Elektrosprey İyonizasyon-MS

kaynağına girmiştir. Elektrosprey arayüzü, tam bir tarama spektrumunda (300–1200 Da) maksimum bollukta iyon elde etmek için –40.0 V kepçe potansiyeline, –40.0 V kılcal çıkışa ve 350 °C kaynak sıcaklığına sahip negatif iyonizasyon moduna ayarlanmıştır. Kurutma ve nebülize edici bir gaz olarak azot (8 l/dak, 40 psi) kullanılmıştır.



**Şekil 3.3.** 2-aminoakridon (AMAC) ve sodyum siyanoborhidrit ile indirgeyici aminleme yoluyla sakkarit floro-etiketlemesinin şematik gösterimi [121].

### 3.10. Kondroitin Numunelerinin NMR ile Karakterizasyonu ve Disakkarit Analizi

NMR spektroskopisi, karbohidratların yapısını aydınlatmak için üstün bir tekniktir [122]. Bu nedenle, GAG-protein komplekslerini araştırmak için en çok kullanılan ve bilgilendirici analitik tekniklerden biridir [123]. Ürettiğimiz kondroitin için NMR analizi, İBTAM (İnönü Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Merkezi) bünyesinde yapılmıştır. Tüm NMR deneyleri, bir Bruker Advance II 600 MHz spektrometre (Bruker BioSpin, Billerica, MA) üzerinde Topsin 2.1.6 yazılımı (Bruker) ile gerçekleştirilmiştir. Numunelerin her biri 0.5 ml D<sub>2</sub>O içinde çözülmüş ve değişebilir protonları uzaklaştırmak için tekrarlanan dondurma işlemi yapılarak kurutulmuştur. Numuneler, 0.4 ml D<sub>2</sub>O içinde yeniden çözülmüş ve NMR mikrotüplerine (dış çap; 5 mm) aktarılmıştır. Tek boyutlu <sup>1</sup>H NMR spektrumları için koşullar şu şekildedir: 12.3 kHz'lik titreme alanı, 2.66 s'lik toplama süresi ve 8.00 s'lik gevşeme gecikmesi. Sıcaklık ise; 298 K'dir.

### 3.11. Mikrobiyal Kondroitin Üretim Düzeyi Araştırması

Çalışmamızda hem hücre içi hem de hücre dışı kondroitin seviyesi belirlenmiştir. Bu amaçla, *E. coli kfo<sup>+</sup>-vgb<sup>+</sup>* suşunun, LB sıvı besiyeri bulunan 1 litrelik erlenlere toplamda 16 erlen olacak şekilde yeterli miktarda etüvde inoküle edilerek çoğaltılması sağlanmıştır. Daha sonra, 0. saatten başlayarak 12. saate kadar, sonrasında ise 24. 48. ve 72. saatte hem OD verileri alınmış hem de kondroitin üretim seviyesini gözlemlemek için her bir saatte kondroitin üretim prosesleri uygulanarak numuneler toplanıp etiketlenmiştir. Elde edilen numunelerin hassas terazi kullanılarak miktarları kaydedilmiştir. Kaydedilen bu veriler sayesinde; zaman, OD, kondroitin (süpernat) ve toplam kondroitin olmak üzere 4 veriden oluşan bir grafik oluşturulmuştur.

### 3.12. Mikrobiyal Kondroitin Sülfat Üretimi

Önceki aşamada elde edilen Mikrobiyal Kondroitinin analizi yapıp doğrulandıktan sonra seçici sülfasyon yöntemi ile bu kondroitine sülfatlama işlemi yapılmıştır. Doğal KS'larda GalNAc kalıntılarının neredeyse tamamı 4 ya da 6 konumunda sülfatlanmıştır. Yapılan araştırmalarda doğal KS'larda 6-pozisyonunda sülfat oranının daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Hedefimiz; doğal KS'a benzer bir KS üretimi olduğu için, yaptığımız işlem ile tüm GalNAc kalıntılarının 6. pozisyonundaki hidroksil gruplarının sülfatlanıp, uygun bir şekilde 4. pozisyonundaki hidroksil kalıntılarını koruyan bir polimer elde edilmesi amaçlanmıştır. Bu işlem için literatürde bize en uygun yöntem tercih edilmiştir [106]. İşleme göre:

Elde edilen Mikrobiyal Kondroitinin 4-6 gramı 80-120 ml sulu DMF (Dimetil formamid) içinde çözülmüş ve solüsyon 0-5 °C'ye kadar soğutulmuştur. Daha sonra solüsyona 12-15 gram piridin sülfotrioksit eklenmiştir. Solüsyonun oda sıcaklığına ulaşması beklenmiş ve 400-800 ml NaCl'li doymuş aseton ilave edilerek çöktürme işlemi yapılmıştır. Karışım filtrelenmiş ve katı kısım 200-400 ml demineralize suda çözünerek elde edilen çözelti 1 N NaOH ile nötralize edilmiştir. Nötralizasyon sağlandıktan sonra çözelti 30-50 °C'ye kadar ısıtılmış ve 0.2-0.3 N 60 ml NaOH eklenmiştir. Bu sıcaklıkta 1-3 saat bekletilmiş oda sıcaklığına ulaştıktan sonra 1 N HCl asit ile nötralize edilmiştir. Çözelti 10 µs'den küçük geçirgenlik iletkenliğine sahip bir zar aracılığı ile filtrelenmiştir (membrana kullanımdan önce aktivasyon işlemi yapılmıştır; işlem aşağıda verilmiştir). Son

olarak çözeltili vakum altında liyofilize edilerek kurutulmuştur. Elde edilen KS numunelerine kondroitin de olduğu gibi HPLC-MS ve NMR ile moleküler yapı analizi yapılmıştır.

#### **Membran Aktivasyonu:**

Membran, yapısına nemlendirici olarak dahil edilen gliserolün giderilmesi için suda 3-4 saat yıkanmıştır. Kükürt bileşiklerinin uzaklaştırılması için 1 dakika boyunca 80 °C'de %0.3 (w/v) sodyum sülfür solüsyonuyla muamele edilmiştir. Sıcak suyla (60 °C) 2 dakika boyunca yıkanmış, bu işlemi takiben %0.2'lik (v/v) sülfürik asit ile asitlendirilmiş daha sonra asidi çıkarmak için sıcak su ile durulanmıştır.



## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 4.1. Araştırmada Kullanılan Plazmidlerin Karakterizasyonları

#### 4.1.1. pETM6-PACF plazmidi

*E. coli* K4 genomik DNA'sından (*kfoA* 1.02 kbp, *kfoC* 2.06 kbp ve *kfoF* 1.17 kbp) kondroitin biyosentetik genleri çoğaltmak için PCR kullanılmıştır. pETM6-*kfoA*, pETM6-*kfoC* ve pETM6-*kfoF* bölgeleri çift endonükleaz parçalama ve DNA dizilemesi ile doğrulanmıştır. Bundan başka, pETM6-PACF yapımına dair klonlama ek olarak restriksiyon kesimi ile de (pETM6-PACF'nin EcoRI, SmaI ve SpeI ile parçalanması, sırasıyla 1.57, 2.32 ve 5.95 kbp'lik üç fragment oluşturur) doğrulanmıştır. pETM6-PACF plazmidinin operatör ve promotor bölgeleri ve restriksiyon enzimi kesim bölgeleri haritası aşağıda gösterilmiştir (Şekil 4.1. ve Şekil 4.2.).

#### **pETM6-PACF plazmidi baz dizisi ve genetik haritası:**

GAACATAATGGTGCAGGGCGCTGACTTCCGCGTTTCCAGACTTTACGAAA  
CACGGAAACCGAAGACCATTTCATGTTGTTGCTCAGGTCGCAGACGTTTTG  
CAGCAGCAGTCGCTTCACGTTTCGCTCGCGTATCGGTGATTCATTCTGCTA  
ACCAGTAAGGCAACCCCGCCAGCCTAGCCGGGTCCTCAACGACAGGAGC  
ACGATCATGCTAGTCATGCCCCGCGCCCACCGGAAGGAGCTGACTGGGTT  
GAAGGCTCTCAAGGGCATCGGTCGAGATCCCGGTGCCTAATGAGTGAGC  
TAACTTACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTCCAGTCGGGAAA  
CCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGC  
GGTTTTCGCTATTGGGCGCCAGGGTGGTTTTTCTTTTACCAGTGAGACGG  
GCAACAGCTGATTGCCCTTACC GCCTGGCCCTGAGAGAGTTGCAGCAAG  
CGGTCCACGCTGGTTTGGCCCAGCAGGCGAAAATCCTGTTTGATGGTGGT  
TAACGGCGGGATATAACATGAGCTGTCTTCGGTATCGTCGTATCCC ACTA  
CCGAGATGTCCGCACCAACGCGCAGCCCGGACTCGGTAATGGCGCGCAT  
TGCGCCCAGCGCCATCTGATCGTTGGCAACCAGCATCGCAGTGGGAACG  
ATGCCCTCATT CAGCATTTGCATGGTTTGTGAAAACCGGACATGGCACT  
CCAGTCGCCTTCCCGTTCCGCTATCGGCTGAATTTGATTGCGAGTGAGAT  
ATTTATGCCAGCCAGCCAGACGCAGACGCGCCGAGACAGA ACTTAATGG  
GCCCCGCTAACAGCGCGATTTGCTGGTGACCCAATGCGACCAGATGCTCCA  
CGCCCAGTCGCGTACCGTCTTCATGGGAGAAAATAACTGTTGATGGGT

GTCTGGTCAGAGACATCAAGAAATAACGCCGGAACATTAGTGCAGGCAG  
CTTCCACAGCAATGGCATCCTGGTCATCCAGCGGATAGTTAATGATCAGC  
CCACTGACGCGTTGCGCGAGAAGATTGTGCACCGCCGCTTTACAGGCTTC  
GACGCCGCTTCGTTCTACCATCGACACCACCACGCTGGCACCCAGTTGAT  
CGGCGCGAGATTTAATCGCCGCGACAATTTGCGACGGCGCGTGCAGGGC  
CAGACTGGAGGTGGCAACGCCAATCAGCAACGACTGTTTGCCCGCCAGT  
TGTTGTGCCACGCGGTTGGGAATGTAATTCAGCTCCGCCATCGCCGCTTC  
CACTTTTTCCCGCGTTTTTCGCAGAAACGTGGCTGGCCTGGTTCACCACGC  
GGGAAACGGTCTGATAAGAGACACCGGCATACTCTGCGACATCGTATAA  
CGTTACTGGTTTCACATTCACCACCCTGAATTGACTCTCTTCCGGGCGCTA  
TCATGCCATACCGCGAAAGGTTTTGCGCCATTCGATGGTGTCCGGGATCT  
CGACGCTCTCCCTTATGCGACTCCTGCATTAGGAAGCAGCCCAGTAGTAG  
GTTGAGGCCGTTGAGCACCGCCGCGCAAGGAATGGTGCATGCAAGGAG  
ATGGCGCCCAACAGTCCCCCGGCCACGGGGCCTGCCACCATACCCACGC  
CGAAACAAGCGCTCATGAGCCCGAAGTGGCGAGCCCGATCTTCCCATC  
GGTGATGTCGGCGATATAGGCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCCGGTG  
ATGCCGGCCACGATGCGTCCGGCGTAGCCTAGGATCGAGATCGATCTCG  
ATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAA  
CAATCCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACA  
TATGGCAGATCTATGAATATATTAGTTACAGGTGGAGCAGGCTATATTGG  
CTCGCATAACAAGTTTATGTCTTCTGAATAAAGGTTACAATGTTGTAATCA  
TTGACAACCTTAATTAATTCATCTTGCGAGAGCATTTCGAAGGATTGAATTA  
ATAGCTAAAAAAAAAAGTTACCTTCTATGAGTTGAACATCAACAATGAAA  
AAGAAGTTAATCAAATTCTAAAAAAAAACAAAATTTGATTGTATAATGCAT  
TTTGCCGGTGCAAAGTCTGTTGCTGAATCTTTAATAAAACCCATTTTTTAT  
TATGATAATAATGTTTCAGGGACGTTGCAATTAATTAATTGCGCTATAAA  
AAACGATGTGGCTAATTTTATTTTATAGCTCTTCTGCAACGGTTTATGGTGA  
AAGCAAAATAATGCCTGTTACAGAAGATTGCCATATAGGAGGAACATTA  
AATCCATATGGTACATCAAAGTATATATCAGAATTGATGATTAGAGATAT  
TGCAAAAAAATATAGCGATACTAATTTTTTGTGTCTGAGATATTTTAACC  
CAACAGGTGCTCACGAGTCGGGAATGATCGGTGAAAGTCCCGCTGATAT  
ACCAAGCAATTTAGTTCCTTATATATTACAAGTTGCTATGGGTAAACTAG  
AAAACTTATGGTGTGTTGGGGGGGATTACCCTACAAAGGATGGAACCGG  
TGTTCTGTGATTATATACACGTAATGGATTTAGCGGAAGGGCATGTGGCTG

CTTTATCTTACCTTTTCCGTGATAATAACACTAATTATCATGTTTTTAATTT  
AGGTACTGGTAAAGGATATTCTGTTTTAGAGCTGGTTTCTACCTTTGAAA  
AAATATCTGGGGTTAGAATTCCATATGAAATTGTTTCGAGAAGAGATGGG  
GATATTGCTGAAAGTTGGTCATCACCAGAAAAAGCAAATAAGTATCTCA  
ATTGGAAAGCTAAAAGGGAATTGGAAACAATGCTTGAGGATGCCTGGCG  
CTGGCAAATGAAAAACCCAAATGGTTATATTTAACTCGAGTCTGGTAAAG  
AAACCGCTGCTGCGAAATTTGAACGCCAGCACATGGACTCGTCTACTAGG  
ATCGAGATCGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGA  
ATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTA  
AGAAGGAGATATACATATGGCAGATCTCAATTGGATATCGGCCGGCCAC  
GCGATCGCATGAGTATTCTTAATCAAGCAATAAATTTATATAAAAACAAA  
AATTATCGCCAAGCTTTATCTCTTTTTGAGAAGGTTGCTGAAATTTATGAT  
GTTAGTTGGGTCGAAGCAAATATAAAATTATGCCAAACCGCACTCAATCT  
TTCTGAAGAAGTTGATAAGTTAAATCGTAAAGCTGTTATTGATATTGATG  
CAGCAACAAAAATAATGTGTTCTAACGCCAAAGCAATTAGTCTGAACGA  
GGTTGAAAAAATGAAATAATAAGCAAATACCGAGAAATAACCGCAA  
GAAATCAGAACGGGCGGAGTTAAAGGAAGTCGAACCCATTCTTTAGAT  
TGGCCTAGTGATTTAACTTTACCGCCGTTACCTGAGAGCACAAACGATTA  
TGTTTGGGCGGGGAAAAGAAAAGAGCTTGATGATTATCCAAGAAAACAG  
TTAATCATTGACGGGCTTAGTATTGTAATTCCTACATATAATCGAGCAA  
AATACTTGCAATTACACTTGCTTGTCTTTGTAACCAAAGACCATATACG  
ACTATGAAGTTATTGTTGCCGATGATGGAAGTAAAGAAAATATTGAAGA  
AATAGTAAGAGAATTTGAAAGTTTATTAAATATAAAATATGTACGTCAGA  
AGGATTATGGATATCAACTGTGTGCTGTTAGAAATCTTGGGCTTAGGGCT  
GCAAAGTATAATTATGTTGCAATTCTGGATTGTGATATGGCTCCGAACCC  
ACTATGGGTTTCAGTCATATATGGAACCTATTAGCGGTGGACGATAATGTTG  
CTCTAATTGGCCCTAGAAAATATATAGATACAAGCAAGCATAACATATTTA  
GATTTCTTTCCCAAAAATCACTAATAAATGAAATTCCTGAAATCATTAC  
TAATAATCAGGTTGCAGGCAAGGTTGAGCAAAACAAATCAGTTGACTGG  
CGAATAGAACATTTCAAAAATACCGATAATCTAAGATTATGCAACACAC  
CATTTCGATTTTTTAGCGGAGGTAATGTCGCTTTTGCGAAAAAATGGCTTT  
TCCGTGCAGGATGGTTTGATGAAGAGTTTACGCATTGGGGGGGGGAGGA  
TAATGAGTTTGGATATCGTCTCTACAGAGAAGGATGTTACTTTCGGTCTG  
TTGAAGGAGCAATGGCATATCATCAAGAACCACCCGGGAAAGAAAACGA

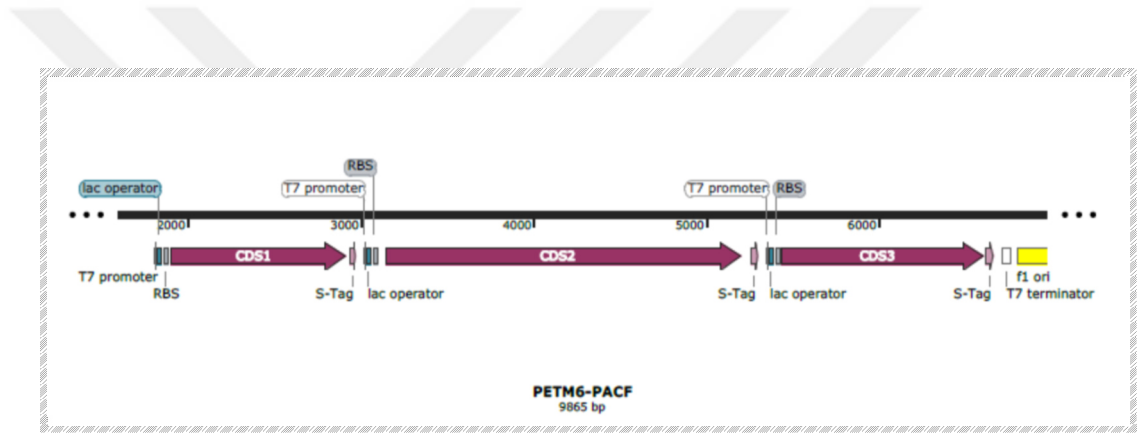
GACGGATCGTGCGGCAGGGAAAAATATTACTGTTCAATTGTTACAGCAA  
AAAGTTCCTTATTTCTATAGAAAAAAGAAAAAATAGAATCCGCGACAT  
TAAAAAGAGTACCATTAGTATCTATATATATTCCCGCCTATAACTGCTCT  
AAATATATTGTTTCGTTGTGTTGAAAGCGCCCTTAATCAGACAATAACTGA  
CTTAGAAGTATGCATATGCGATGATGGTTCACAGATGATACATTGCGGA  
TTCTTCAGGAGCATTATGCAAACCATCCTCGAGTTCGTTTTATTTACAAA  
AAAACAAAGGAATTGGTTCAGCATCTAATACAGCAGTTAGATTGTGTCG  
GGGATTCTATATAGGTCAGTTAGACTCTGATGACTTTCTTGAACCAGATG  
CTGTTGAACTATGTCTAGATGAATTTAGAAAAGATCTATCATTGGCATGT  
GTTTATACAACCTAACCGTAATATAGATCGTGAAGGTAATTTGATATCAAA  
TGGCTATAATTGGCCCATTTATTCGCGAGAAAACTTACAAGTGCAATGA  
TATGTCATCATTTCAGGATGTTACAGCAAGAGCATGGAACCTAACTGAA  
GGTTTCAACGAATCGATCAGCAACGCAGTTGATTACGATATGTATTTAAA  
ACTTAGTGAAGTTGGACCGTTCAAGCATATAAACAAAATTTGTTATAATC  
GCGTATTGCATGGTGAAAATACGTCTATAAAAAAGTTGGATATTCAAAA  
GGAAAATCATTTTAAAGTTGTTAACGAATCATTAAAGTAGGCTAGGCATAA  
AAAAATATAAATATTCACCATTAACCTAATTTGAATGAATGTAGAAAATAT  
ACCTGGGAAAAAATAGAGAATGATTTATAATTATTGATATATTACAAGTG  
ATAAACATGTAGACTGGCCGGGTACCCTCGAGTCTGGTAAAGAAACCGC  
TGCTGCGAAATTTGAACGCCAGCACATGGACTCGTCTACTAGGATCGAGA  
TCGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGA  
GCGGATAACAATTCCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGA  
GATATACATAGGCATATGAAAATTGCAGTTGCTGGTGTAGGATATGTTGG  
TATATCAATTGCTATATTACTTTCACAAAAACATGATATTATCGCTCTCGA  
TATAGATCCTAAGAAAGTTCAGTTGATTAATAAAAAAATATCACCAATAT  
GTGATCCTGAAATACAAAAATTTTTATCTAATAGAAAATTAACCTATAT  
GCTACAACAGAAAAATACGAAGCGTATAGAGATGCTGATTATGTTATAA  
TCGCAACACCAACCAATTATGATCCCATTAATAAATAACTTCGATACACTC  
TCAGTAGAATCAGTAGCATGTGACGTAAGTATAAATCCTAATGCAAC  
TATCATAATTAATCTACAGTCCCCGTCGGATTTACTGAACGACTAAAAC  
GCGATCTAAACACGAATAATATTATCTTTTCCCCAGAATTTTACGTGAA  
GGTAAAGCTCTTTATGACAACCTATATCCATCTCGTATAGTTGTGGGAGA  
GAGTAGCGAACGAGCAAGAAAGTTCGCAGAGCTTCTCAGTGAAGGCGCT  
ATAAAAAAAGATATTCCAATATTGTTAACGGATAGCCCTGAAGCTGAAG



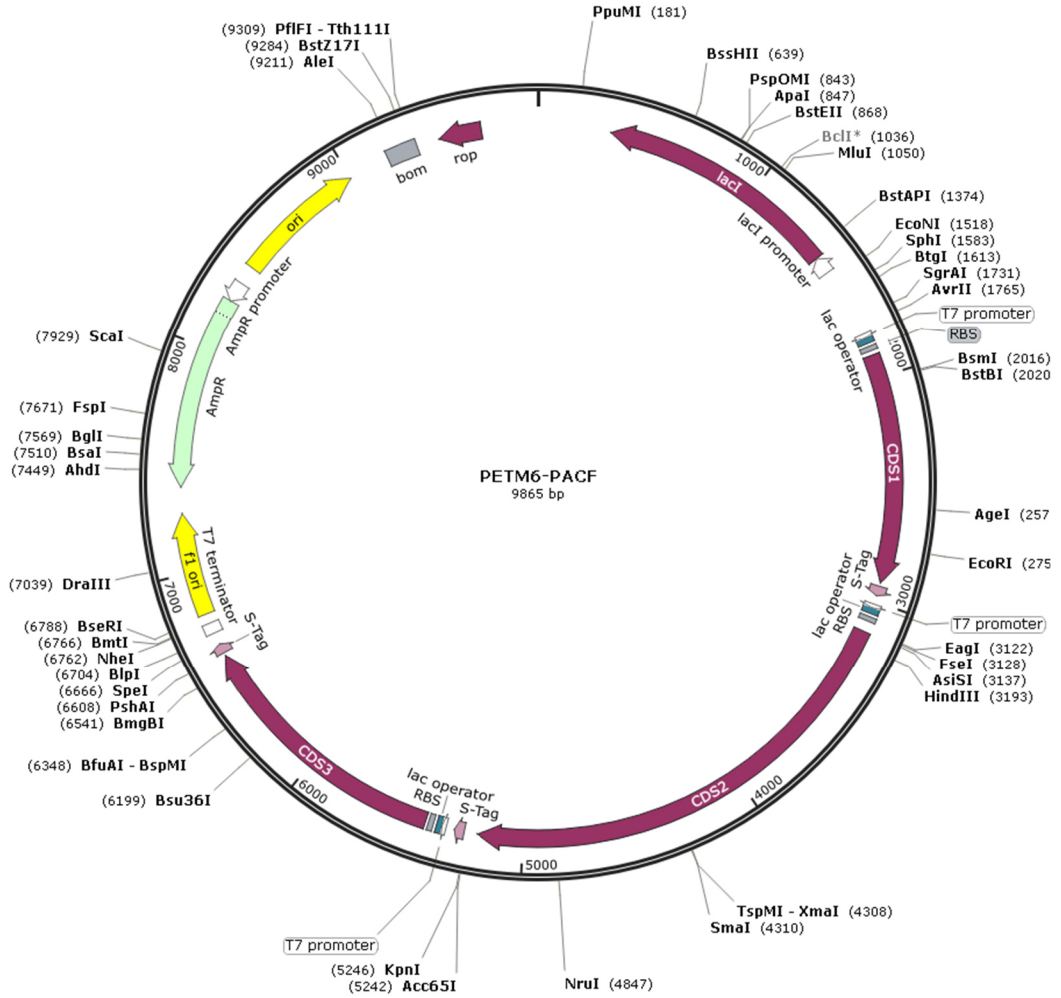
CCATTAAACTTTTTGCAAATACTTACCTTGCAATGCGGATTGCTTATTTCA  
ATGAATTGGATACTTATGCCTCCGTTTCATGGTTTAGATACAAAGCAAATT  
ATAGAGGGTGTAGTTTAGATCCTAGAATTGGTCAACATTATAATAATCC  
TTCTTTTGGTTATGGAGGTTACTGCTTACCTAAGGATACCAAGCAATTACT  
CGCAAATTATCGTGATGTTCCGCAGAACTTAATCCAGGCTATTGTTCGATG  
CCAATACTACCCGAAAAGACTTTGTTGCGGAGGATATATTAAGTCGTAAA  
CCAAAAGTTGTAGGAATCTATCGCCTCATAATGAAAGCAGGTAGTGATA  
ACTTTAGAGCAAGTAGTATTCAAGGTGTAATGAAACGACTCAAAGCCAA  
AGGAATTGAGATAGTTGTATATGAACCTGTACTAAAAGAGCCTTATTTCT  
TTGGTTCTTATGTTGAGCGTGATATTAATTCTTTTAAAGAACGTGTTGATG  
TTATAGTAGCCAATCGCCGCACGTCAGAATTAGAAGATGTAAGTGAAAA  
AGTTTATACGCGAGATTTATTTGGTGTTCGACTCTTGACTCGAGTCTGGTA  
AAGAAACCGCTGCTGCGAAATTTGAACGCCAGCACATGGACTCGTCTACT  
AGTCGCAGCTTAATTAACCTAAACTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAG  
CATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGCTAGCG  
AAAGGAGGAGTCGACTATATCCGGATTGGCGAATGGGACGCGCCCTGTA  
GCGGCGCATTAAAGCGCGGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGC  
TACTTGGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTCCTCCCTTCCTT  
TCTCGCCACGTTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCC  
CTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTT  
GATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTT  
TCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCA  
AACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAG  
GGATTTTGCCGATTTCCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAA  
AAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGTTTACAATTTCTGGCGG  
CACGATGGCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAA  
TTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGT  
CTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGT  
CTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACG  
ATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAG  
ACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGG  
AAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGT  
CTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGT  
TTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTC

GTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTCCCAACGATCAAGGCGAGTTA  
CATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCG  
ATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGC  
AGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGT  
GACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGGCGAC  
CGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGC  
AGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAAC  
CTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTG  
CACCCAAGTATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAG  
CAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACAC  
GGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATCATGATTGAAGCATT  
TATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAA  
AAATAAACAAATAGGTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTC  
CACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATC  
CTTTTTTCTGCGGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTA  
CCAGCGGTGGTTTGTGGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAA  
GGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGT  
AGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATAC  
CTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTC  
GTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAG  
CGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAA  
CGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGC  
CACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGG  
GTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGT  
ATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTT  
TGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGC  
GGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTT  
CCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGA  
GCTGATAACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGA  
GCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACACATCTG  
TGCGGTATTTACACCGCAATGGTGCCTCTCAGTACAATCTGCTCTGAT  
GCCGCATAGTTAAGCCAGTATACTCCGCTATCGCTACGTGACTGGGTC  
ATGGCTGCGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGG  
CTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGG

AGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTTCACCGTCATCACCGAAACGCGCGAGGCA  
GCTGCGGTAAAGCTCATCAGCGTGGTCGTGAAGCGATTCACAGATGTCTG  
CCTGTTTCATCCGCGTCCAGCTCGTTGAGTTTCTCCAGAAGCGTTAATGTCT  
GGCTTCTGATAAAGCGGGCCATGTTAAGGGCGGTTTTTTTCTGTTTGGTC  
ACTGATGCCTCCGTGTAAGGGGGATTCTGTTCATGGGGGTAATGATAACC  
GATGAAACGAGAGAGGATGCTCACGATACGGGTTACTGATGATGAACAT  
GCCCGTTACTGGAACGTTGTGAGGGTAAACAACACTGGCGGTATGGATGC  
GGCGGGACCAGAGAAAAATCACTCAGGGTCAATGCCAGCGCTTCGTTAA  
TACAGATGTAGGTGTTCCACAGGGTAGCCAGCAGCATCCTGCGATGCAG  
ATCCG



Şekil 4.1. pETM6-PACF operatör ve promotor bölgeleri



Şekil 4.2. pETM6-PACF plazmidi restriksiyon enzimi kesim bölgeleri haritası

#### 4.1.2. pUC8:15 plazmidi

*E. aerogenes* [pUC8:15] suşundan "Plazmid İzolasyonu" protokolüne göre gerçekleştirilen işlemler sonucu plazmid izolasyonu yapılmıştır. Daha sonra Agaroza Jel Elektrofrezisi uygulanarak jel görüntüleme vasıtasıyla ilgili plazmidin varlığı doğrulanmıştır. pUC8:15 plazmidi *vgb* gen bölgesi ve restriksiyon enzimi kesim bölgeleri haritası aşağıda gösterilmiştir (Şekil 4.3. ve Şekil 4.4.).

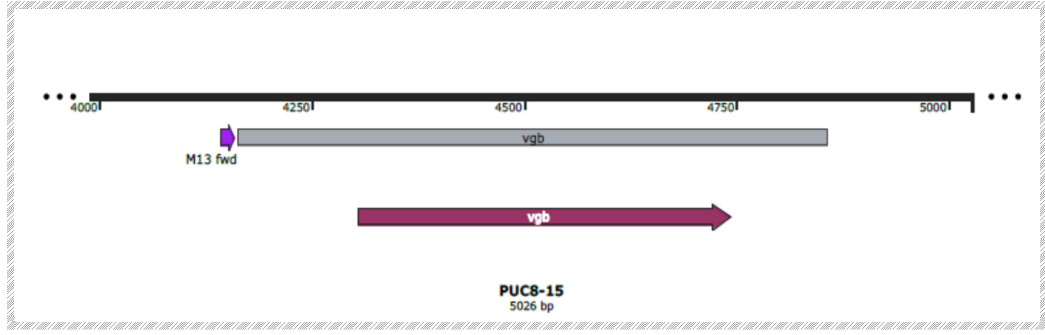
#### pUC8:15 plazmidi baz dizisi ve genetik haritası:

CGCTTAAAAGGCAAAGGCAACAGCATCGTCATCATCGAACACAATTTAG  
 ATGTCATCAAACCGCCGATTACATCATTGATTTGGGTCCCTGAAGGTGGC  
 GATGGTGGCGGACGCATCATTGCCAAGGCACACCTGAAGACGTCGCAG  
 CAACGGCGGGCTCTTACACAGGGCAATATTTGTCCCAAGTTTTGGCCAAC

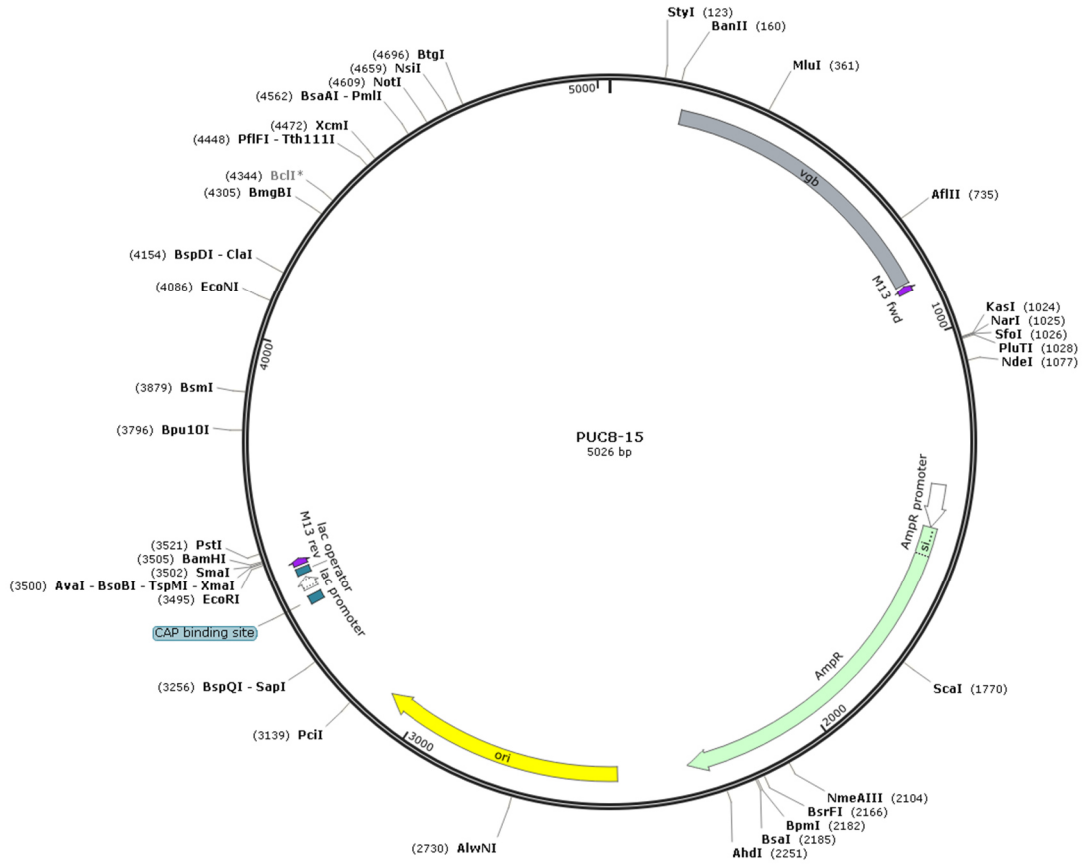
AGCCAAACTGCTGCTGTGTAAATATCAGACGTAAAAAACGCACCATAA  
GGTGCGTTTTTTATGTCCTGAAAGCGGCCTGAAACTTTATTCAACCGCTTG  
AGCGTACAAATCTGCTTCCACTTGAATAAACACATCTGCAATCACGCCAT  
AAGCCTTGCCCCACGCGTCCAAAATGTCATCGGTTGCGGCATCGCCCAAT  
ACTTCTTTAATCGCACCCAACAATTCTTGACCGACAATCGGATAATGCGC  
TGCTGCCACGCCTGCTTGACAATGTTTGACTGCAATTTTTTTGACCGCAGG  
CAAATAGCTGGCAAATTTTCAATGTTTTGCGCTGCCGCCAATACCGTCA  
TCGCCAAAGCCTTAGGCTGCTCCAAAGATTCTTGCGGACCCATATCAAAC  
AAAGGACGTACTTCAGGGTGTTTGGCAAACAAGTTTTTATAAAAAGTCGT  
GGTAATGGTAACGCCATGCTCCTTCAATACAGGAACAGTGGCTTTGATGA  
TGTTAATGGTTTGCTGGTCTAACATGAGGGTCTTCCTTAAGTTCATTATTA  
TGTTTTTGCCATACATCAGTATGGTGTAGCAGCACTTATTATAATCTTTAT  
TGCTCTTAAACTTAATCCACATCAAACTCAAATACTTTTAACCCAG  
CGTCCTGTAAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGA  
AAACCCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTCG  
CCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCAACA  
GTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTA  
CGCATCTGTGCGGTATTTACCCCGCATATGGTGCCTCTCAGTACAATC  
TGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACCCCCGCCAACACCCGC  
TGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAG  
CTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTACCGTCATCA  
CCGAAACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGT  
TAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGG  
GAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATA  
TGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGA  
AAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTT  
TTTTGCGGCATTTTGCCCTTCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAA  
AGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAA  
CTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAACG  
TTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATC  
CCGATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGCATACACTATTCTC  
AGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGAT  
GGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATA  
ACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCT

AACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTT  
GGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCAC  
GATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAACCTGGCGAA  
CTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGA  
TAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTA  
TTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCA  
GCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGAC  
GGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATA  
GGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATA  
TATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGT  
GAAGATCCTTTTTTGATAATCTCATGACCAAATCCCTTAACGTGAGTTTTC  
GTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAG  
ATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCG  
CTACCAGCGGTGGTTTGTGGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCC  
GAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAG  
TGAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACA  
TACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAA  
GTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAAGGCGC  
AGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCG  
AACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGC  
GCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCA  
GGGTCCGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCT  
GGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGAT  
TTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAA  
CGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTT  
CTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGA  
GTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCA  
GTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCG  
CGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGG  
AAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATT  
AGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGA  
ATTGTGAGCGGATAACAATTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATT  
ACGAATTCCCGGGGATCCGTCGACCTGCAGCCAAGCTTTGGCTCGTGCTA  
TTCGTGTACATGGCAAGCTAGAGCCGATTTATGTGGAAACGGTTGCTGAG

TTGCCTGAAAGCTTCCGCGCTTGTACCACTTGTGGCGGCGCACGTTTGCG  
CAAAGAAGCCCGCTTTGTGTATGTCGGTGGCGAAAATTTACACCATATCA  
GCGCATGGCCTTTGAGCAAACTTTGGATTTTTTCCAAAATTGGATTTG  
GGCGGCAACAAACAGCAAATTGCCGAAAAGTCTTGAAGGAAATCACCG  
AACGCTTAGGCTTTTTAATCAATGTCGGCTTGAATTATTTGTCACTCGCCC  
GCTCTGCTGAAACCTTATCAGGCGGCGAAGCGCAGCGCATTTCGCTTGCC  
AGCCAAATCGGTTTCGGGTTTAACTGGCGTGATGTACGTCTTGGATGAGCC  
GTCTATTGGTTTGCACCAACGTGACAACGACCGTTTGCTTGGCAGCTCA  
AACATTTGCGTGATTTGGGCAACAGTGTGATTGTGGTCGAACATGACGAA  
GATGCCATTTCGTGCGGCCGATTATGTGGTGGATATGGGTCCTGGCGCAGG  
TGAATTGGGCGGCGCGGTACTGATTGCCGATACACCTGAAAAAATCGCC  
GCATGCGAGCAATCGATTACAGGACGCTATTTAAGCGGCAAAGAAGCGA  
TTTACATTCCGGCACAGCGCACGCCAAAGATGCAGAACGCATGTTGGTA  
TTGAAAGGTGCTTCGGGCAACAACCTAAAAGATGTGACTTTGGAATTGCC  
CTTAGGTTTGATGACGTGCATCACTGGCGTGTGAGGCAGCGGCAAATCGA  
CTTTGATCAACGATACTTTGGCCAAAATCGCCGCGCGTGATTTGAACCGT  
GCCACCAAAGACGAGCCATCGCCTTATACCGAGATTCAAGGCTTGGAGC  
AATTGGACAAAGTCATCAATGTCGACCAAAGCCCAATTGGACGCACGCC  
CCGCTCCAACCCTGCAACCTATACAGGTGTATTCACACCGATTTCGTGAAT  
TGTTTGCAGGCGTGCCTGTTTCACGTGAACGCGGTTACAACGTCGGTCGC  
TTCTCGTTCAACGTCAAAGGCGGCCGCTGCGAAGCGTGTCAAGGCGATG  
GCGTTTTAAAAGTAGAGATGCATTTCTTGCCCGATGTGTATGTACCGTGT  
GAGGTTTGCCACGGCAAACGCTACAACCGTGAAACTTTGGAAATTTTGTA  
CAAAGGCAAAAACATTCACCAAGTATTGGAAATGACGGTTGCCGAAGCG  
CATGCTTTTTTTGAAGCCGTTCCACCTTATCACGCAAATTACAACTTTG  
ATGGATGTGGGTTTGAGTTATGTGCGTTTGGGTCAAAGCGCGACCACATT  
ATCAGGCGGTGAAGCGCAACGGGTGAAATTGGCATTGGAATTGTCCAAA  
CGCGATACAGGCCGCACTTTGTACATTTTGGATGAACCAACCACAGGTTT  
GCATTTTGCCGACATCGCTTTATTGCTAGAAGTTATCACC



Şekil 4.3. pUC8:15 *vgb* gen bölgesi



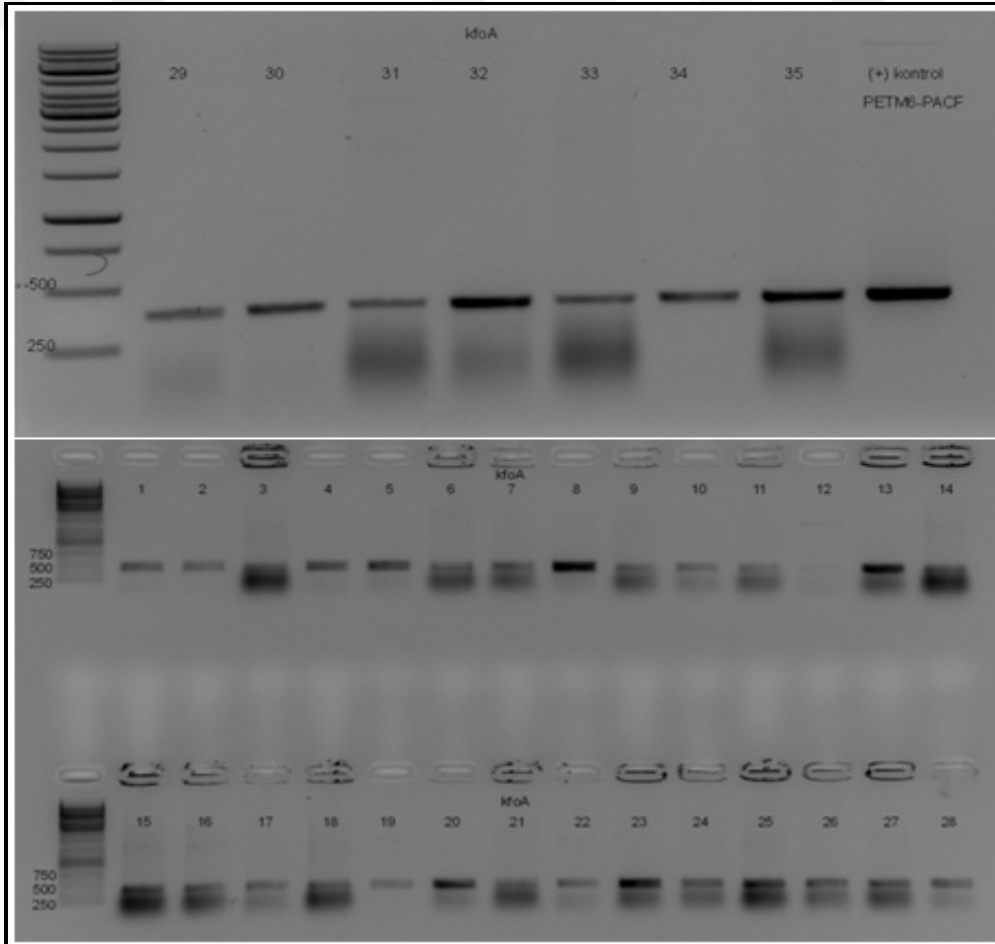
Şekil 4.4. pUC8:15 plazmidi restriksiyon enzimi kesim bölgeleri haritası



## 4.2. *E. coli*'nin Transformasyon Öncesi Doğrulama Jel Görüntüleri:

### 4.2.1. pETM6-PACF plazmidi jel görüntüsü

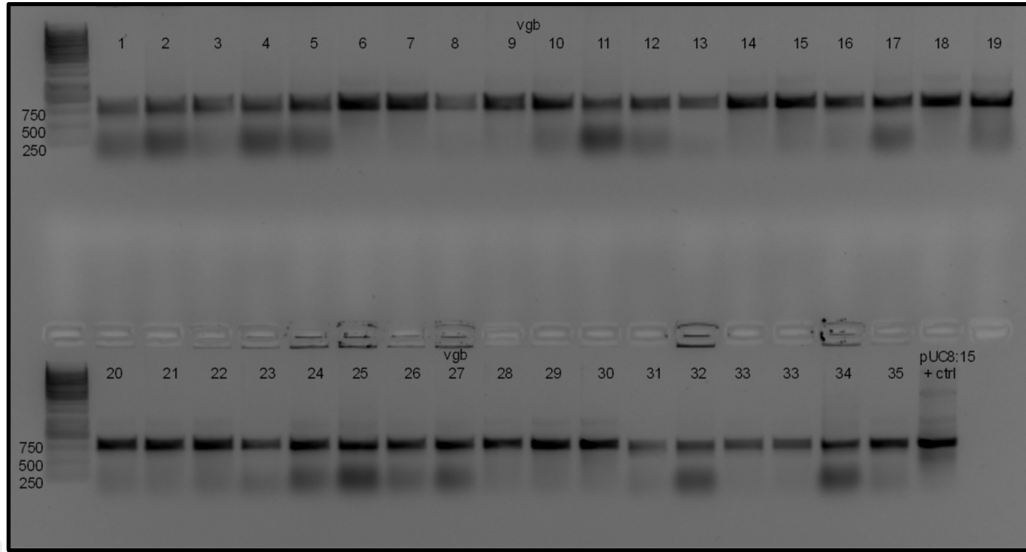
SphI ve AvrII enzimlere ait kesim bölgesine sahip 'insert' oluşturulmuştur. %1 agaroz jelde yürütülüp jelden ekstre edilen PCR ürünü SphI ve AvrII enzimler ile kesildikten sonra aynı enzimler ile kesilen pETM6-PACF ile T4 DNA ligaz ile birleştirilmiş ve elde edilen yapı bakteriye aktarılmıştır. Enzim kesimi sonrasında kesilen vektör ve insert %1 agaroz jelde yürütülüp jelden ekstre edilmiş ve jel görüntüleri aşağıda verilmiştir (Şekil 4.5.).



Şekil 4.5. pETM6-PACF plazmidi jel görüntüsü

(+) kontrol ile aynı boyda bant görülen kolonilerde ilgili plazmidin varlığı pozitif olarak belirlenmiştir.

#### 4.2.2. pUC8:15 plazmidin jel görüntüsü

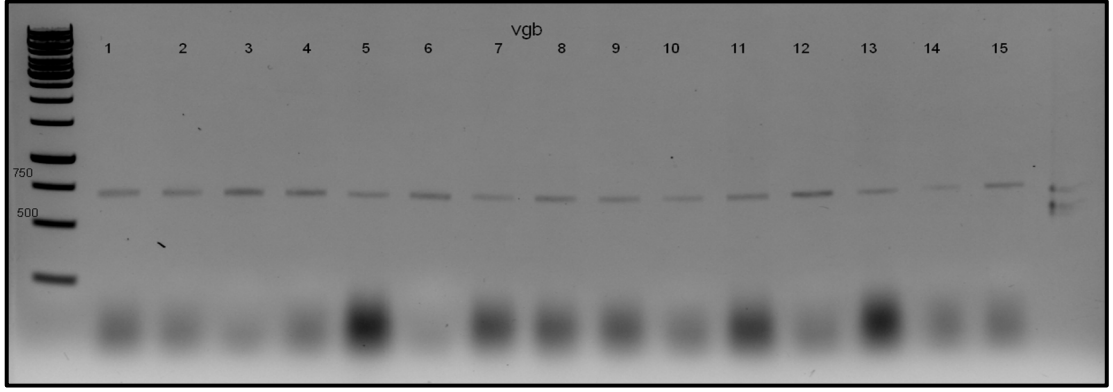


Şekil 4.6. pUC8:15 plazmidinin jel görüntüsü

(+) kontrol ile aynı boyda bant görülen kolonilerde ilgili plazmidin varlığı pozitif olarak belirlenmiştir.

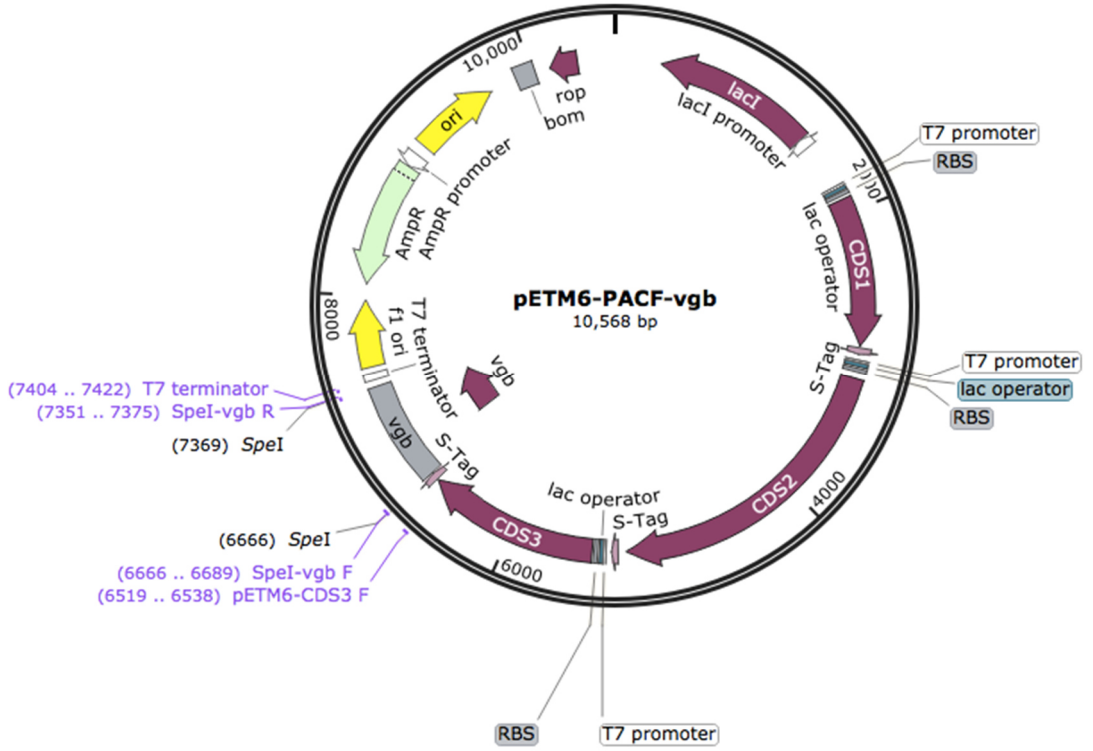
#### 4.3. pETM6-PACF-pUC8:15 Plazmidinin Transformasyonunu Doğrulayan Agaroz Jel Elektrofrezisi

Bu aşamada; *vgb* geni, pETM6-PACF vektörü üzerindeki SphI ve AvrII enzim kesim bölgeleri arasına "restriction cloning" ile yerleştirilmiştir. Bu amaçla SphI ve AvrII enzim kesim bölgelerini içeren primerler kullanılarak *vgb* geni pUC8:15 vektöründen Q5 PCR ile çoğaltılmıştır. *vgb* geni jel görüntüsü ile pETM6-PACF-*vgb* plazmidin genetik haritası ve jel görüntüsü aşağıda gösterilmiştir (Şekil 4.7., 4.8. ve 4.9.).

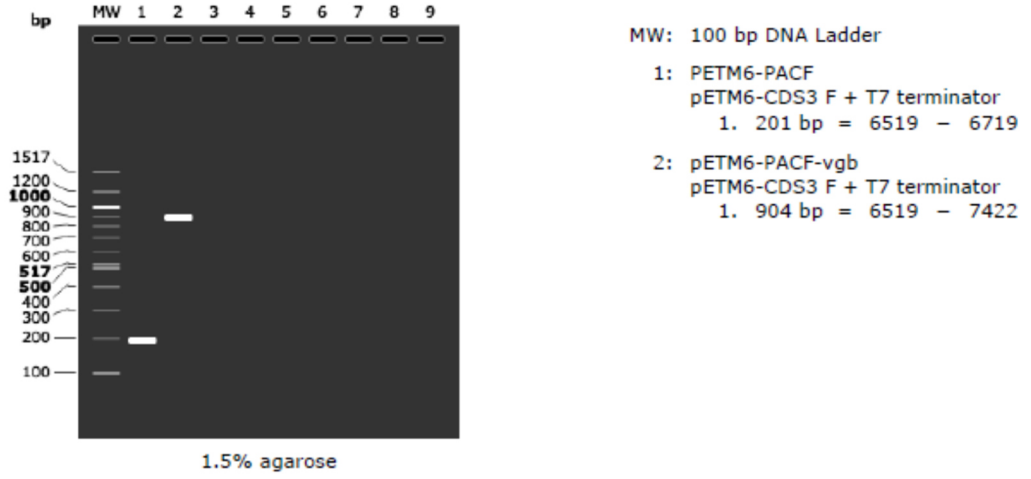
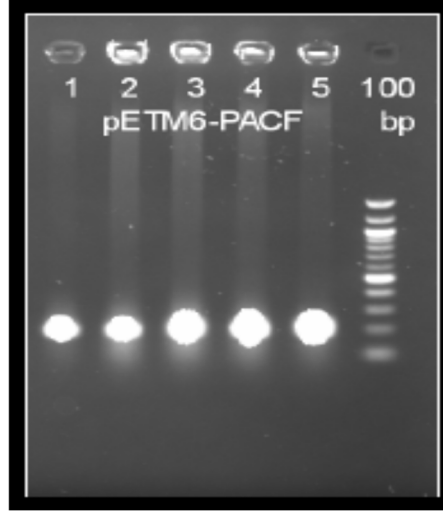


Şekil 4.7. *vgb* geni jel görüntüsü

Bant varlığı ilgili kolonilerde *vgb* içeren plazmid varlığını göstermektedir.



Şekil 4.8. pETM6-PACF-*vgb* plazmidi genetik haritası

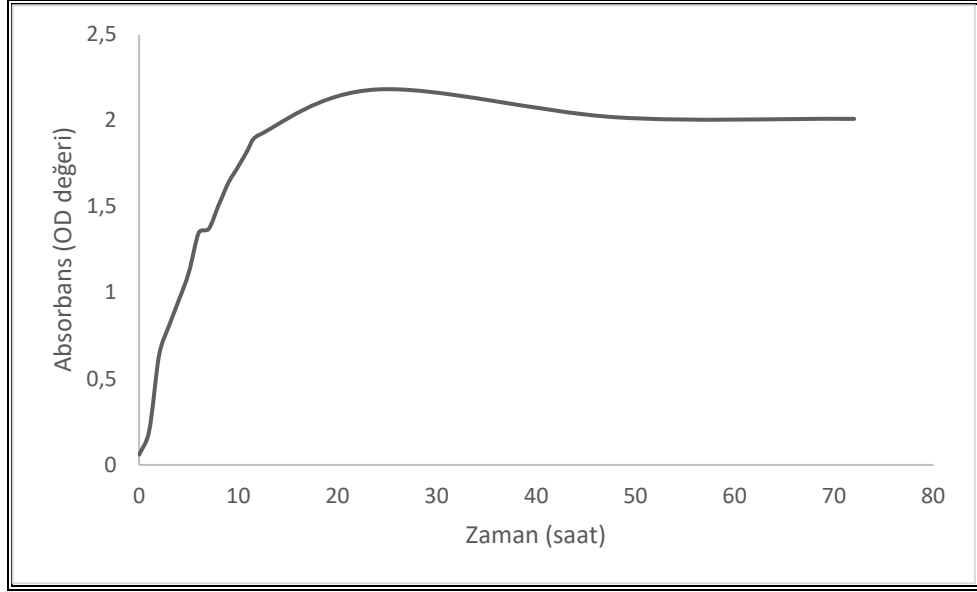


Şekil 4.9. pETM6-PACF-vgb plazmidi jel görüntüsü

pETM6-PACF'ye ait 201 baz çifti uzunluğundaki fragment ve *vgb*'ye ait 904 baz çifti uzunluğundaki fragment yeni vektör oluşumunun başarı ile gerçekleştirildiğini kanıtlamaktadır.

#### 4.4. *E. coli kfo<sup>+</sup>-vgb<sup>+</sup>* Rekombinant Bakterinin Üreme Eğrisi

*E. coli kfo<sup>+</sup>-vgb<sup>+</sup>* rekombinant bakterinin OD<sub>600</sub>'de absorbans ölçümü yapılarak üreme eğrisi tespit edilmiştir. Absorbans değerlerine göre elde edilen üreme grafiği aşağıda gösterilmiştir (Şekil 4.10.).



**Şekil 4.10.** *E. coli kfo<sup>+</sup>-vgb<sup>+</sup>* rekombinant bakterinin zamana bağlı üreme grafiği

Grafiğe göre; OD değeri, 0-30 saat arası belirli bir hızda, bakterilerin sıvı besiyeri içinde çoğalmalarına bağlı olarak artış gösterirken, bu saatten sonra OD değerinde düşme saptanmıştır ve fermentasyonu sonlandırdığımız saate kadar sabit bir değerde stabil kalmıştır.

#### 4.5. Mikrobiyal Kondroitin Üretimi

Kondroitin üretimi prosesinde örneklere uygulanan alkolle çöktürme işlemi Şekil 4.11.'de gösterilmiştir.



**Şekil 4.11.** Kondroitin üretimi prosesinde örneklere uygulanan alkolle çökteltme işlemi

Toz formda elde etmek için, ürettiğimiz numuneler yaklaşık 15 ml'lik kaplara aktarılarak ağızları alüminyum folyo yardımı ile kapatılıp suyun uzaklaşması için bir kürdan yardımı ile folyo üzerine gözenekler açılmıştır (Şekil 4.12.).



**Şekil 4.12.** Vakumla liyofilize edilmesi için hazırlanan örnekler

Hazırlanan örnekler liyofilize edildikten sonra toz haline gelen kondroitin (Şekil 4.13.) toplanmış ve analize gönderilmek üzere HPLC ve NMR için hazırlanmıştır.



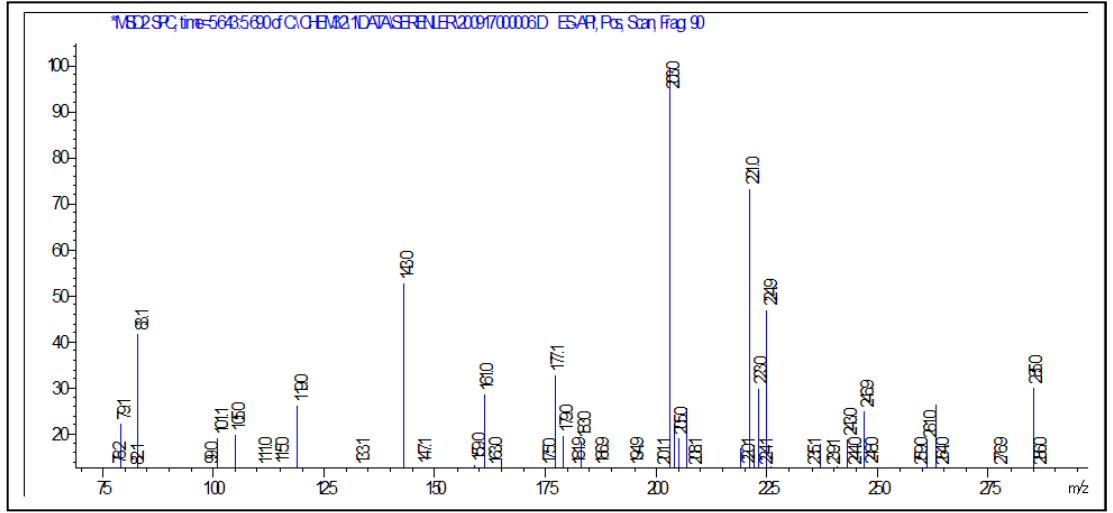


**Şekil 4.13.** *E. coli kfo<sup>+</sup>-vgb<sup>+</sup>* rekombinant bakterisi ile elde edilen mikrobiyal kondroitin

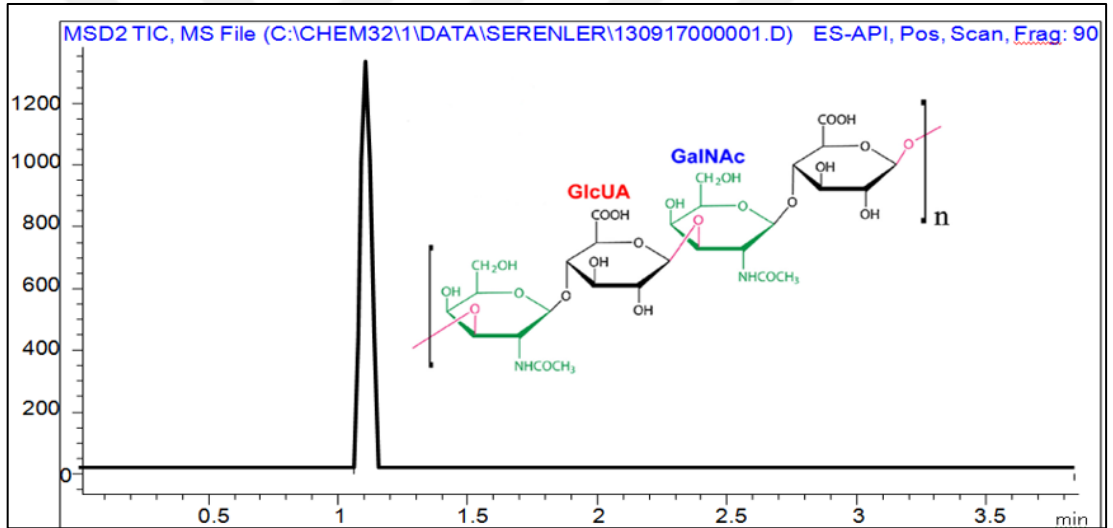
#### **4.6. Kondroitin Numunelerinin HPLC-MS Analizleri**

HPLC-MS analizleri, İBTAM (İnönü Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Merkezi) bünyesinde yapılmış olup elde edilen HPLC spektrum ve kromatogram sonuçları aşağıda sırasıyla verilmiştir (Şekil 4.14. ve Şekil 4.15.).



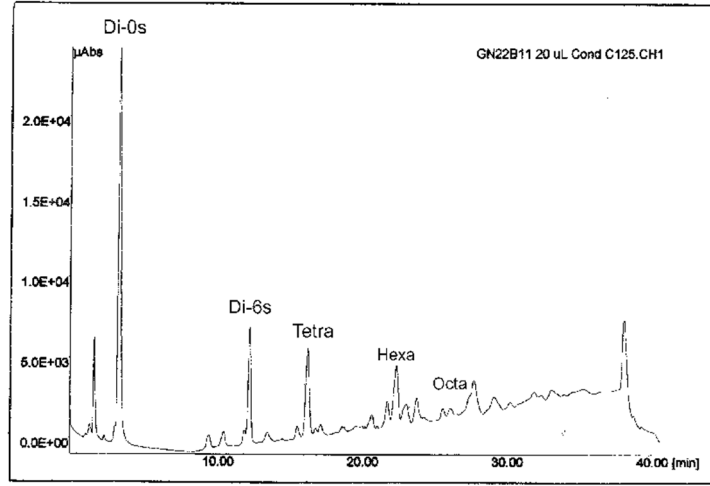


Şekil 4.14. *E. coli kfo<sup>+</sup>-vgb<sup>+</sup>* suşundan elde edilen kondroitinin HPLC-MS spektrum analizi

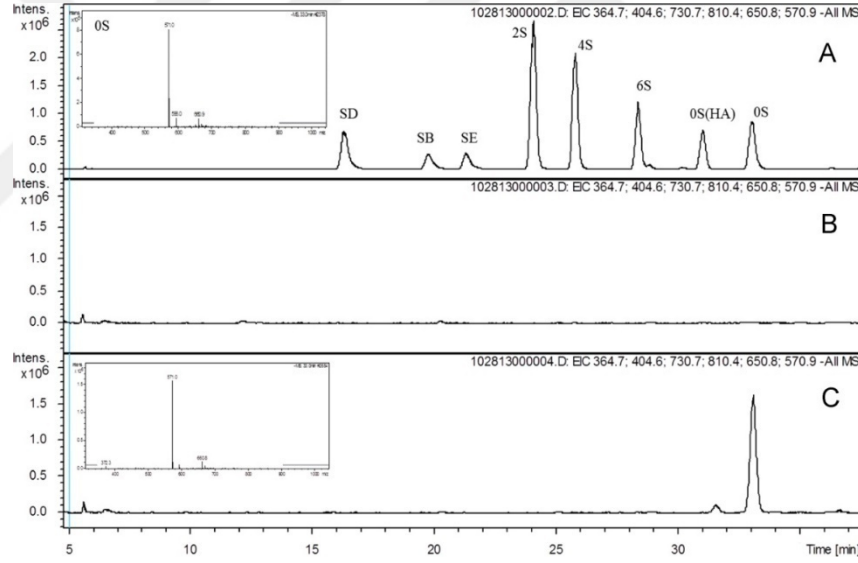


Şekil 4.15. *E. coli kfo<sup>+</sup>-vgb<sup>+</sup>* suşundan elde edilen kondroitinin HPLC-MS kromatogram analizi

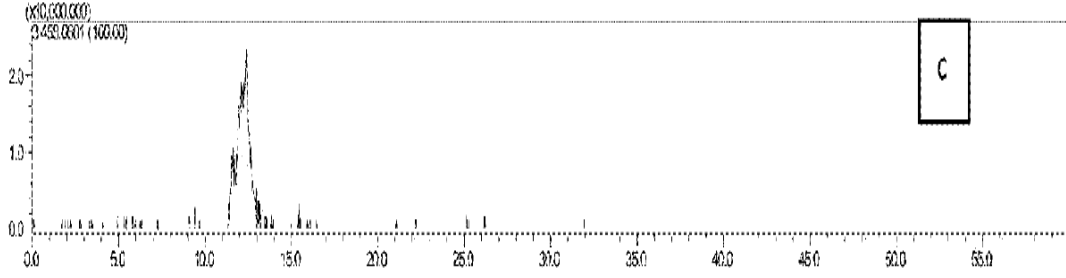
Oluşturduğumuz *kfo<sup>+</sup>-vgb<sup>+</sup>* vektörünü taşıyan rekombinant *E. coli* suşundan elde ettiğimiz ve hazırladığımız kondroitin numunelerinin HPLC sonuçları değerlendirildiğinde, literatürdeki çalışmalarda elde edilen mikrobiyal kondroitin kromatogramlarıyla (Şekil 4.16., 4.17., 4.18. ve 4.19.) özdeş şekilde, ürünün varlığını gösteren OS (kondroitin) ile ilişkili pik gözlenmiştir. Ayrıca; kondroitin standardının imza piki ile de eşleşmiştir (Şekil 4.17. (C)). Kondroitin varlığını gösteren HPLC analiz sonucumuza göre elde ettiğimiz mikrobiyal kondroitin; **203.0 Da** MA'ya sahiptir.



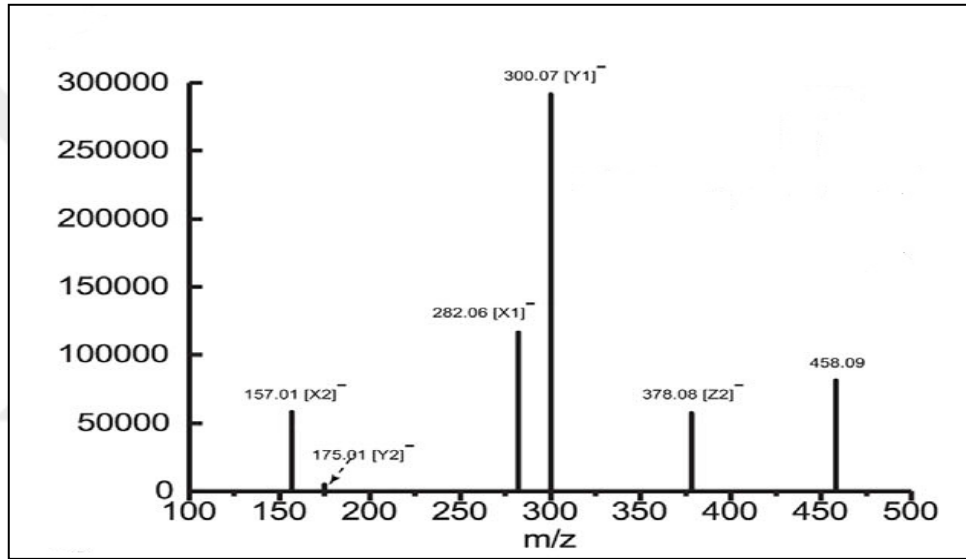
**Şekil 4.16.** Rekombinant *E. coli* O5:K4:H4 suşu ile üretilen biyoteknolojik kondroitinin HPLC kromatogramı. 0S birimi: sülfatlanmamış disakkarit ünitesini yani kondroitinin varlığını göstermektedir. Diğer birimler iz miktarda mevcut olan oligosakkaritleri göstermektedir [106]



**Şekil 4.17.** Kondroitinin disakkarit analizi kromatogramı. (A) Kütlelerine bağlı olarak 8 farklı disakkarit bileşimini göstermektedir. 0S (kondroitin) kütlesi solda gösterilmiştir. (B) Bir negatif kontrol olarak, pETM6 vektörlü *E. coli* BL21 Star™ (DE3) suşunun fermentasyonundan örnek hazırlanmıştır. Biyosentez genleri eksprese edilmediğinde disakkarit kompozisyonlarına ait herhangi bir pik gözlenmemektedir. (C) pETM6-PACF vektörlü *E. coli* BL21 Star™ (DE3) suşunun fermentasyonundan hazırlanan numune. Ürünün varlığını gösteren standartta 0S (kondroitin) ile ilişkili imza pik gözlenmektedir [18]



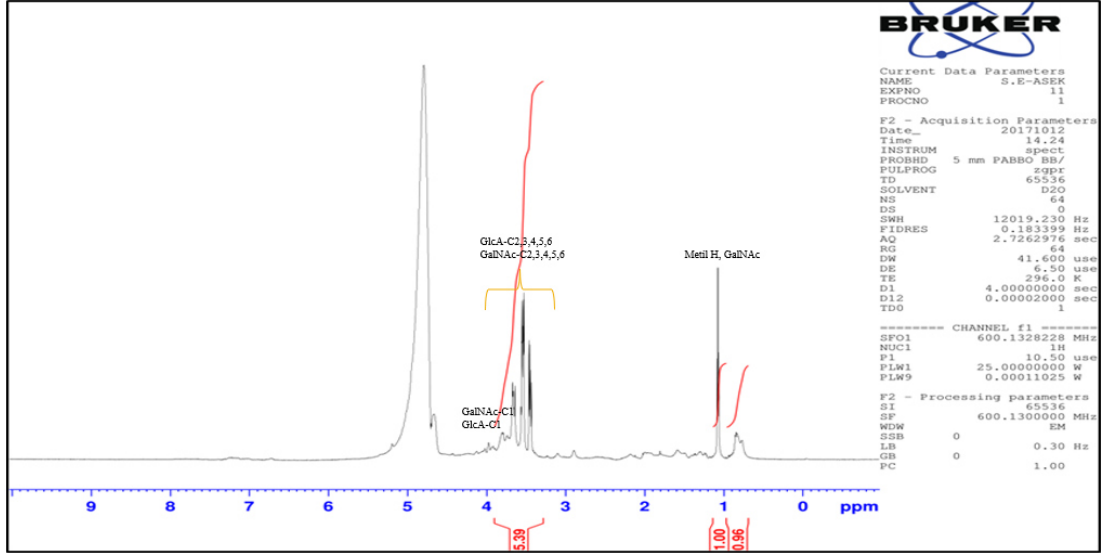
**Şekil 4.18.** *E. coli* BL21 suşu ile üretilen kondroitinin disakkarit HPLC-MS spektrumu [101]



**Şekil 4.19.** Konak organizma olarak *E. coli* JM109 suşunun kullanıldığı rekombinant DNA teknolojisi ile oluşturulan suşta üretilen kondroitine ait HPLC-MS spektrumu [105]

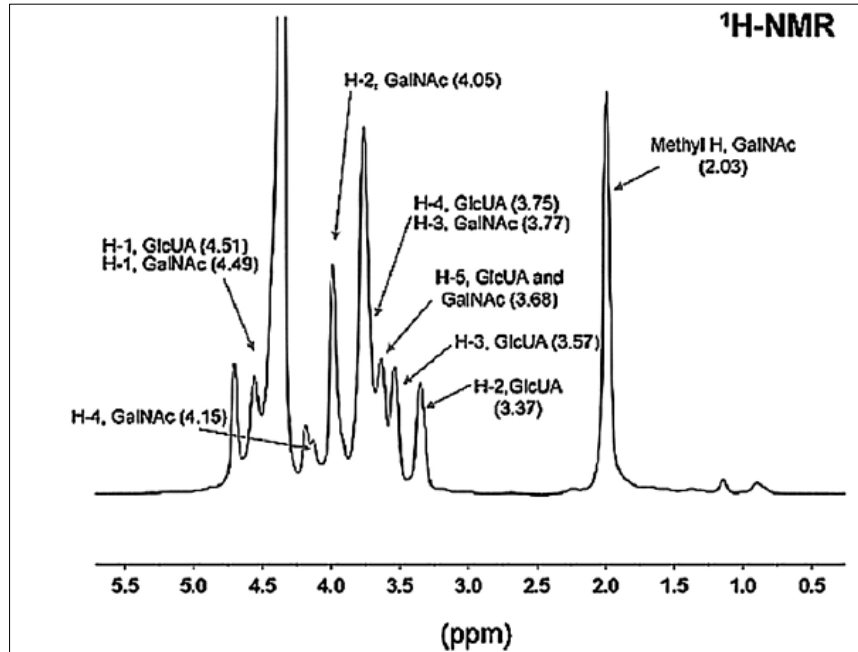
#### 4.7. Kondroitin Numunelerinin NMR ile Karakterizasyonu ve Disakkarit Analizi

NMR analizi, İBTAM (İnönü Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Merkezi) bünyesinde yapılmış olup NMR sonucu aşağıda verilmiştir (Şekil 4.20.).

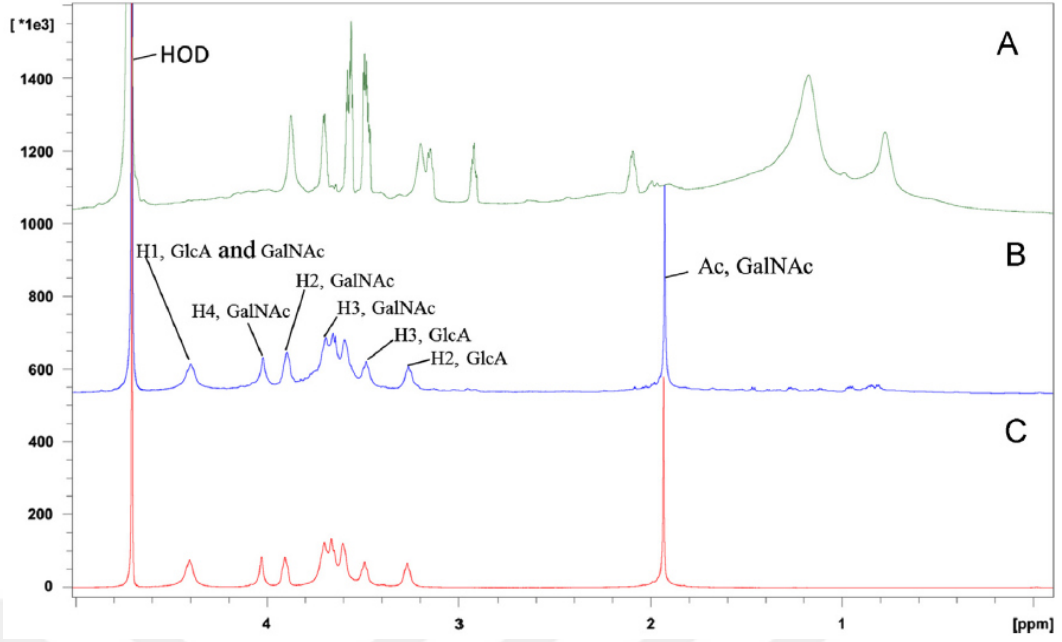


Şekil 4.20. *E. coli kfo<sup>+</sup>-vgb<sup>+</sup>* suşundan elde edilen kondroitinin NMR spektral analizi

Spektrumda, glcA ve GalNAc'ın anomerik proton sinyalleri ve *N*-asetil grubu sinyalleri gözlenmektedir. Tüm proton sinyalleri, referans makalelerde (Şekil 4.21. ve Şekil 4.22.) gösterildiği gibi özdeş şekilde eşleşmektedir. Ayrıca standart kondroitin spektrumları ile de eşleşmektedir (Şekil 4.22. (C)). Spektrumda az miktarda safsızlık tespit edilmiştir.



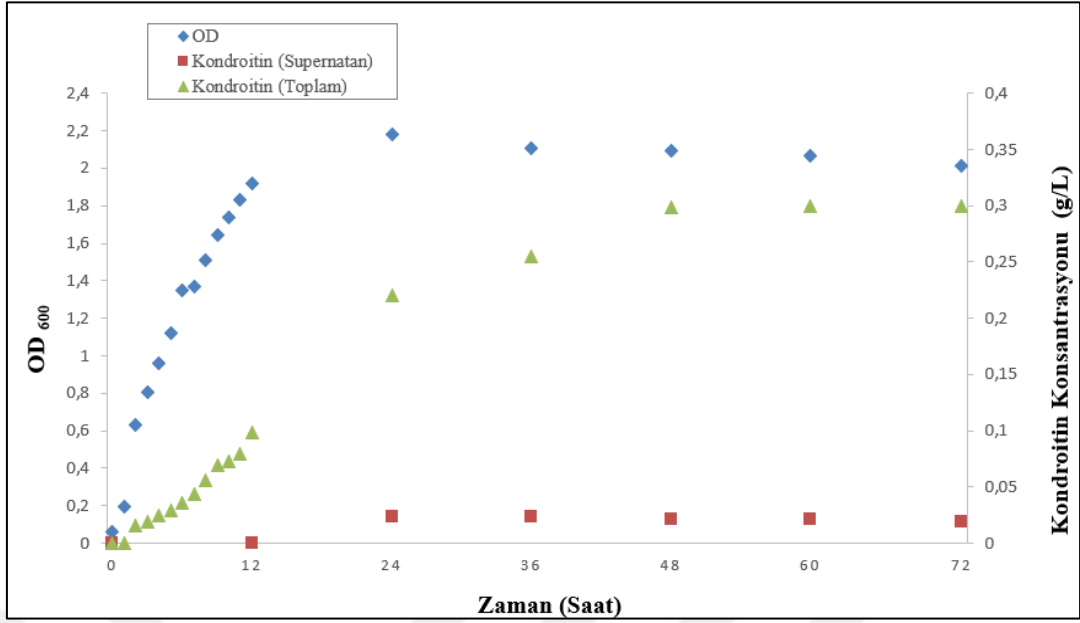
Şekil 4.21. *B. subtilis* suşundan üretilen kondroitinin NMR analizi [21]



**Şekil 4.22.** *E. coli* suşundan üretilen kondroitinin NMR analizi. (A) pETM6 vektörlü rekombinant *E. coli* suşuyla elde edilen numune negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Kondroitin için bariz sembolik pikler gözlenmemiştir. (B) pETM6-PACF vektörlü *E. coli* BL21 Star™ (DE3) suşundan örnekler hazırlanmıştır. Etiketlenmiş pikler, rekombinant kondroitinin, kondroitin ile aynı kimyasal yapıya sahip olduğunu kanıtlayan kondroitin standardının imza pikiyle yakından eşleştirilmiştir. (C) Standart kondroitin spektrumları [18]

#### 4.8. Mikrobiyal Kondroitin Üretim Düzeyi Araştırması

*E. coli kfo<sup>+</sup>-vgb<sup>+</sup>* suşunun zamana karşı OD ve fermentasyon yoluyla ürettikleri kondroitin üretim miktarları saptanmıştır. Bu aşamada kaydedilen verilerden yola çıkarak bir grafik oluşturulmuştur (Şekil 4.23).



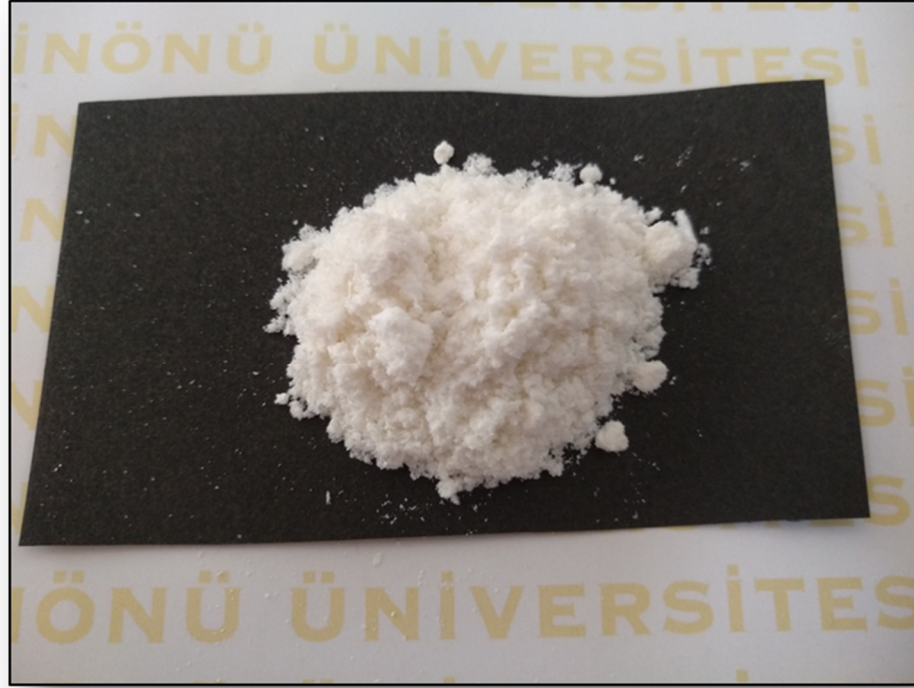
**Şekil 4.23.** *E. coli kfo<sup>+</sup> vgb<sup>+</sup>* suşunun kondroitin (supernatan), kondroitin (toplam) üretim seviyesi ve OD<sub>600</sub> verileri

Yaptığımız çalışmaya göre; induksiyon sonrası ilk iki saat boyunca gerek supernatantta gerekse hücre peletinde kondroitin tespit edilmemiştir. 11 saat sonra, supernatan sabit bir pelete ulaştığında; hücre peletinin supernatana oranı yaklaşık olarak 9:1'dir. 20 saat sonra bu oran daha fazla olmuştur ve fermantasyon durana kadar supernatandaki ürün konsantrasyonu nispeten düşük kalmıştır.

Ayrıca grafikte; en yüksek kondroitin miktarının durağan fazda özellikle de OD'nin düşmeye başlayıp hücre ölüm fazına girdiği esnada olduğu gözlemlenmiştir.

#### 4.9. Mikrobiyal Kondroitin Sülfat Üretimi

*E. coli kfo<sup>+</sup> vgb<sup>+</sup>* suşundan üretilen kondroitine sülfatlama prosesi uygulanarak Kondroitin-6-sülfat elde edilmiştir. Elde ettiğimiz KS, aşağıda gösterilmiştir (Şekil 4.24.). Ayrıca ürettiğimiz kondroitin ve kondroitin sülfat görsel açıdan karşılaştırılmıştır (Şekil 4.25.). Elde edilen kondroitin ve kondroitin sülfat görsel açıdan incelendiğinde; kondroitinin sarımsak renkte ve pudransı yapıda olduğu, kondroitin sülfatın ise beyaz ve kristalimsi yapıda olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 4.24. *E. coli kfo<sup>+</sup>-vgb<sup>+</sup>* suşundan üretilen kondroitin sülfat



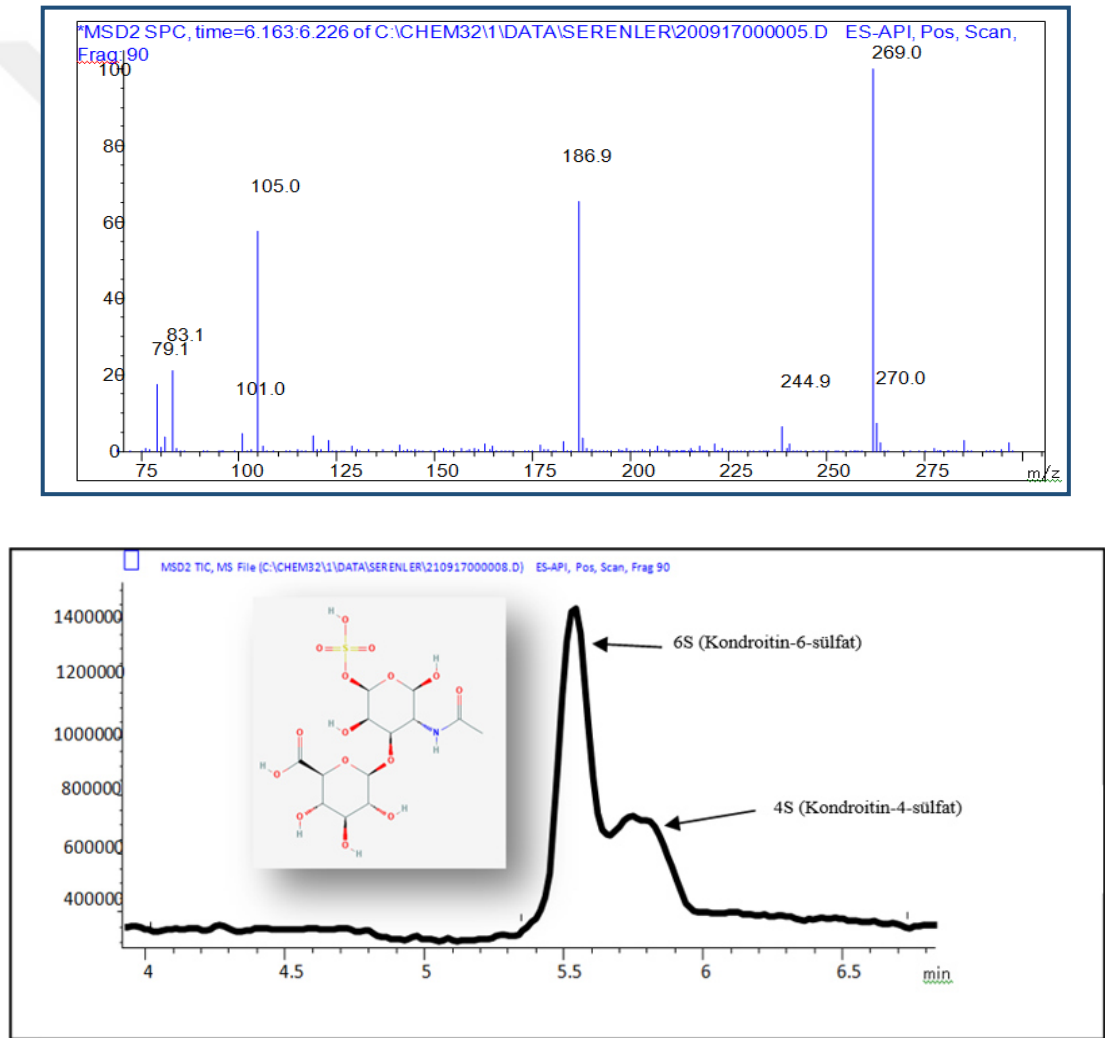
Şekil 4.25. *E. coli kfo<sup>+</sup>-vgb<sup>+</sup>* suşundan üretilen kondroitin ve kondroitin sülfat

Elde ettiğimiz kondroitin sülfatın HPLC-MS ile moleküler yapı analizi, NMR ile de yapısal karakterizasyonu ve disakkarit analizi gerçekleştirilmiştir.



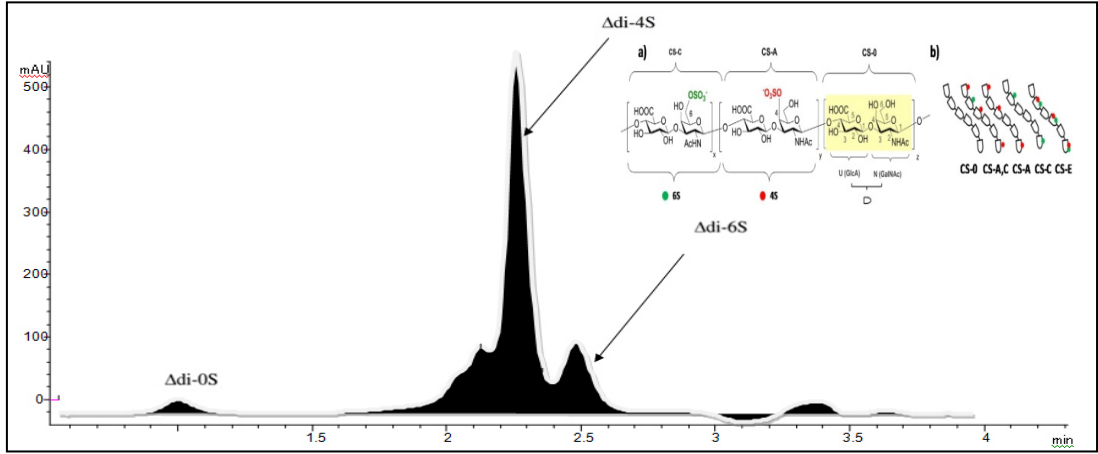
#### 4.10. Kondroitin Sülfat Numunelerinin HPLC-MS Analizleri

HPLC-MS analizleri, İBTAM (İnönü Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Merkezi) bünyesinde yapılmış olup elde edilen HPLC sonucu aşağıda verilmiştir (Şekil 4.26.). Ayrıca, ürettiğimiz KS için referans olarak kullanılmak üzere, sığır trakesi kaynaklı kondroitin sülfat da Kondroitinaz ABC enzimi ile muamele edilerek HPLC analizi gerçekleştirilmiştir. Bu analiz sonucu (Şekil 4.27.) ve aşağıda verilen literatür spektrumları elde edilen KS için referans olarak kullanılmıştır (Şekil 4.28., 4.29., 4.30., 4.31. ve 4.32., 4.33., 4.34. ve 4.35.).



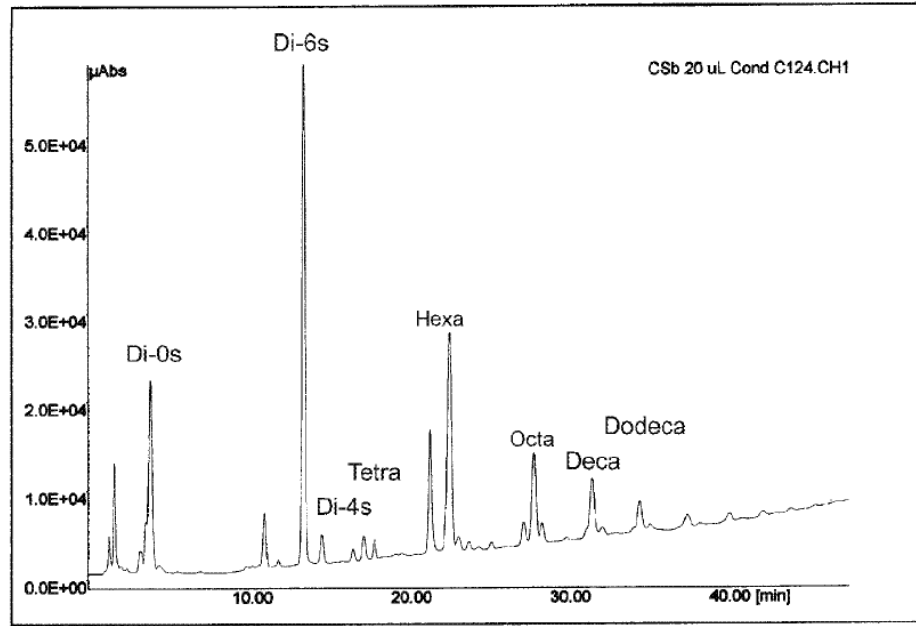
Şekil 4.26. *E. coli kfo<sup>+</sup>-vgb<sup>+</sup>* suşundan üretilen KS'ın HPLC-MS analiz sonuçları



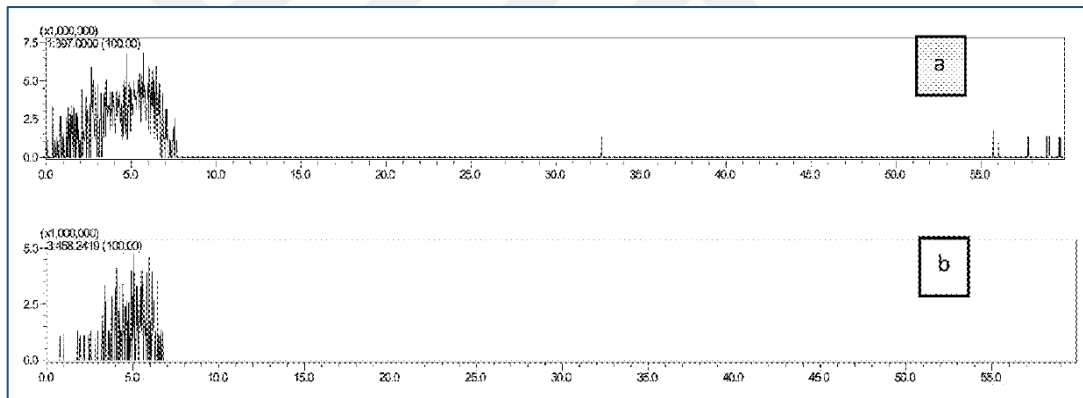


**Şekil 4.27.** Sığır trakesi kaynaklı kondroitin sülfatın HPLC analizi sonucu (Laboratuvarımızda mevcut olan örnek kullanılmıştır)

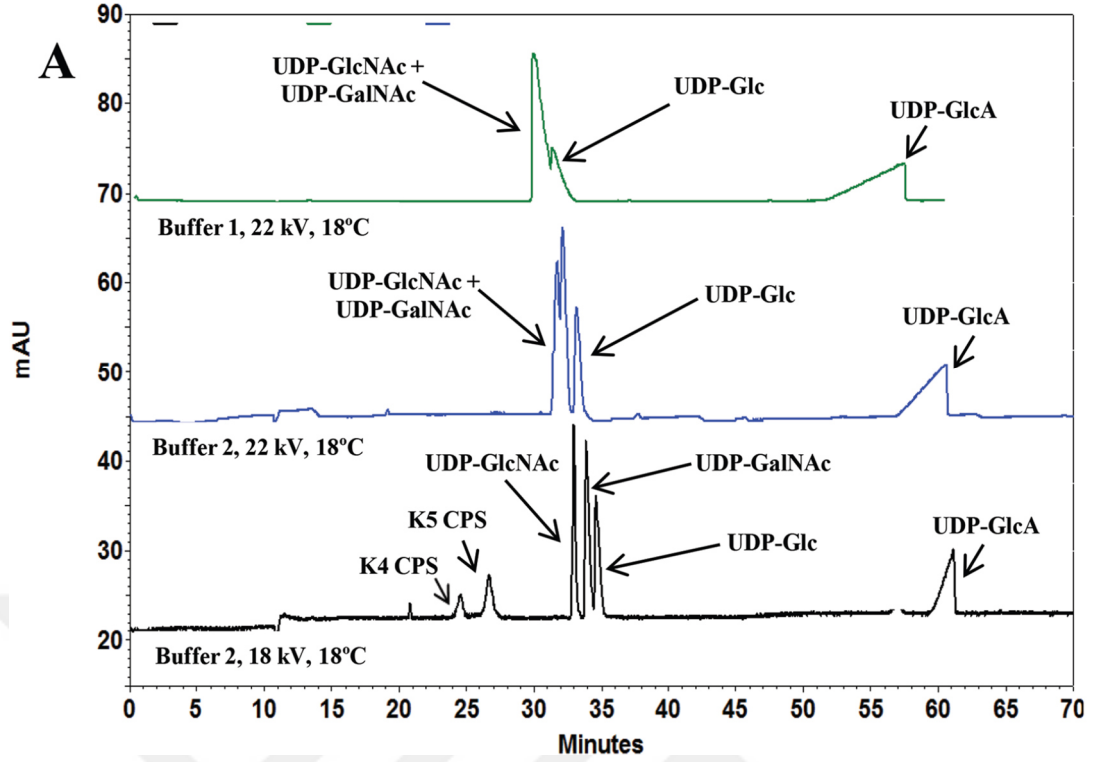
Doğal kaynaklardan üretilen kondroitin sülfatta; 4-konumunda sülfat grubu yalnız başına bulunmaz yalnızca 6-konumundaki sülfat grubuna birleşik halde bulunmaktadır. Genellikle ticari bir kondroitin sülfat; %40 oranında 4-konumunda, %60 oranında ise 6-konumunda sülfat grubu içermektedir. Ürettiğimiz mikrobiyal KS için de 6-konumunda sülfat deseni oluşturulmuştur. Elde ettiğimiz KS'ın Kondroitinaz ABC enzimi ile muamele edilmesi sonucu yapısında bulunan disakkarit birimleri serbest hale geçerek yan yana iki spektrum vermiştir. Bunlar; seçici olarak süfatsızladığımız N-asetil-β-galaktozamin-6-sülfat ve daha az süfatsızlanan 4S birimleridir. Ticari KS'ın enzim ile parçalanması sonucu ise açığa çıkan 4-S ve 6-S birimleri aşağıda gösterilmiştir (Şekil 4.27.). Elde ettiğimiz KS'ın verdiği HPLC spektrumlarının, referans ticari KS ve literatürdeki HPLC spektrumları ile eşleştiği görülmektedir. Ticari ürünlerin molekül ağırlığı yaklaşık olarak 18.000-20.000 Da arasında belirtilmiştir. Mikrobiyal kondroitin sülfatın ise moleküler ağırlığının 300-3000 Da ve daha fazla olabileceği belirtilmiştir. HPLC analiz sonucumuza göre; **269 Da** molekül ağırlığında KS üretilmiştir.



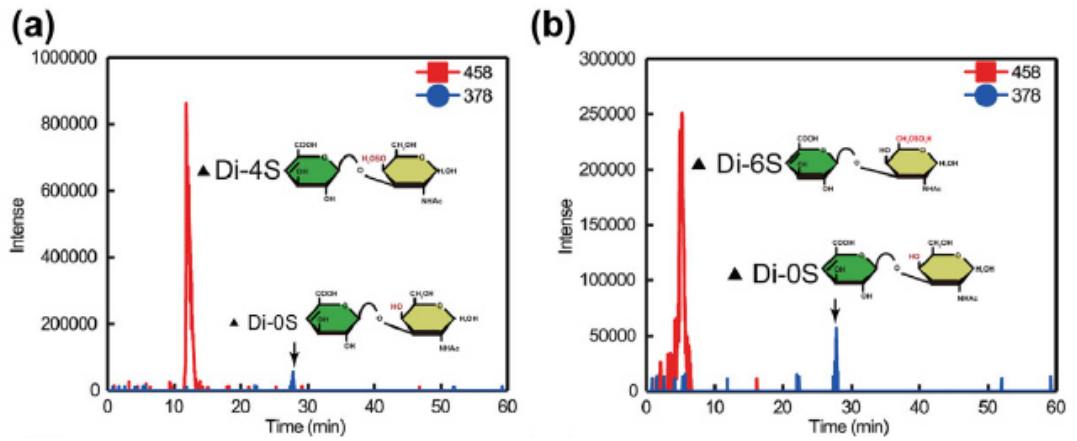
**Şekil 4.28.** Rekombinant *E. coli* O5:K4:H4 suşu ile üretilen biyoteknolojik kondroitin sülfatın HPLC analiz sonucu [106]



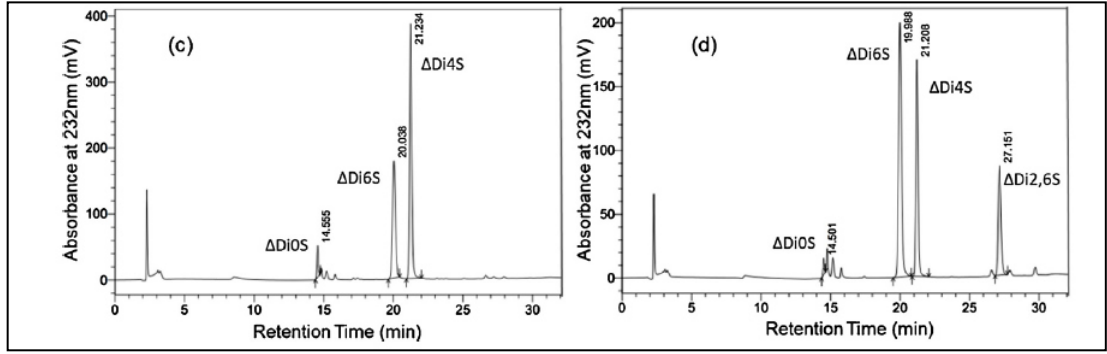
**Şekil 4.29.** KS disakkarit fraksiyon analizi. (a) KS-C (KS-6-sülfat) disakkaritlerin HPLC-MS spektrumu (b) KS-A (KS-4-sülfat) disakkaritlerin HPLC-MS spektrumu [101]



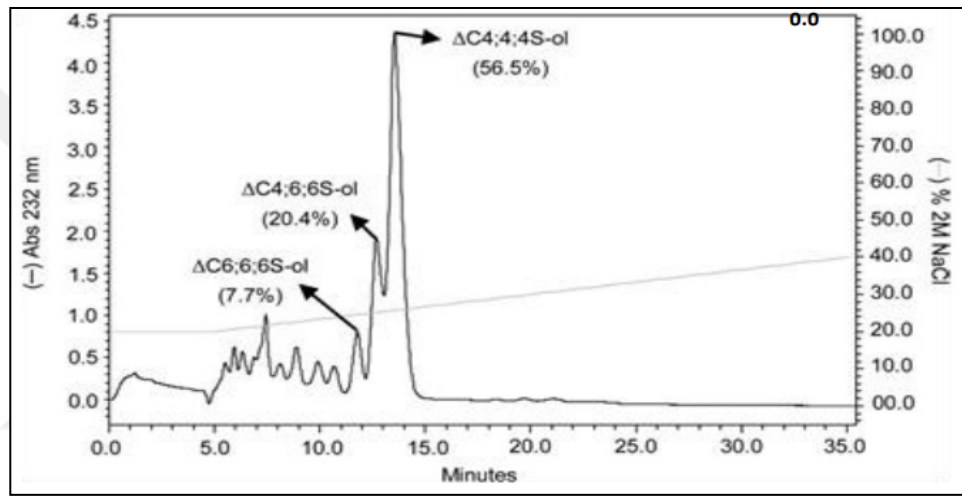
Şekil 4.30. *E. coli* K4 suşundan elde edilen KS'a ait HPLC analiz sonucu [99]



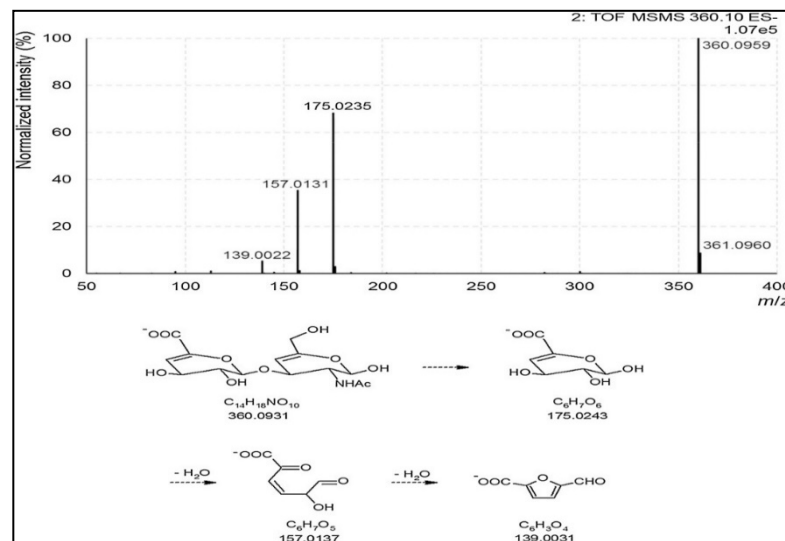
Şekil 4.31. (a) KS-A disakkaritlerin HPLC-MS spektrumu (b) KS-C disakkaritlerin HPLC-MS spektrumu [105]



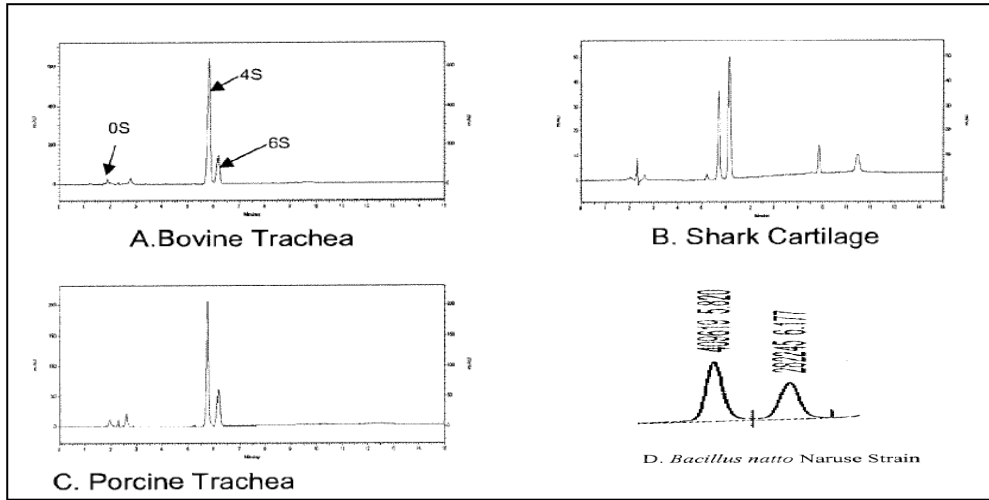
Şekil 4.32. (c) sığır KS (d) köpek balığı KS [16]



Şekil 4.33. Sığır trakesi kaynaklı KS'a ait HPLC analiz sonucu [123]



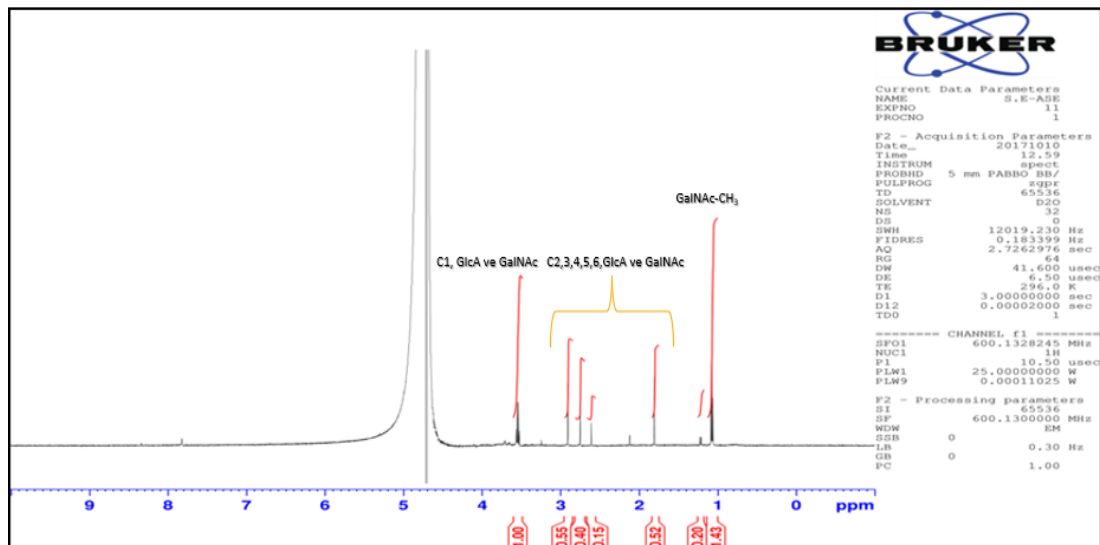
Şekil 4.34. Domuz kıkırdağından ekstre edilen KS disakkaritinin HPLC-MS analiz sonucu [9]



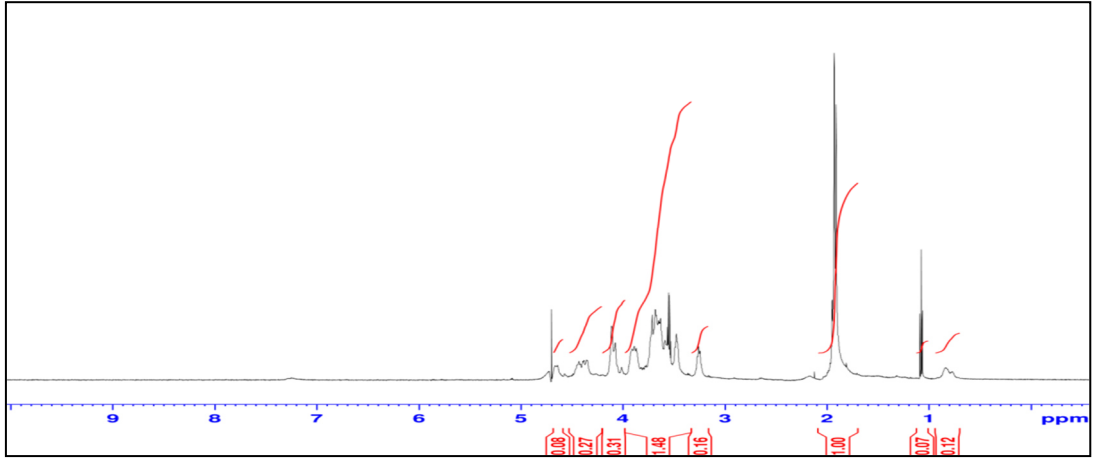
Şekil 4.35. Sığır trakesinden, köpek balığı kıkırdağından, domuz trakesinden ve *Bacillus natto* suşundan elde edilen KS'a ait HPLC-MS analiz sonuçları [33]

#### 4.11. Kondroitin Sülfat Numunesinin NMR ile Karakterizasyonu ve Disakkarit Analizi

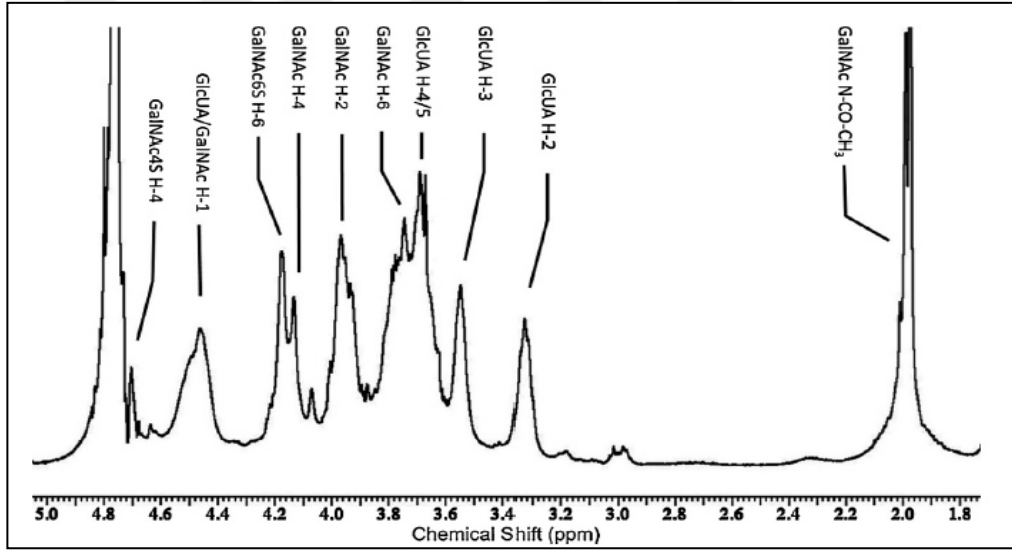
NMR analizi, İBTAM (İnönü Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Merkezi) bünyesinde yapılmış olup NMR sonuçları aşağıda verilmiştir (Şekil 4.36.). Elde ettiğimiz sonuçlar incelendiğinde; sığır trakesi kaynaklı KS (Şekil 4.37.) ve referans makalelerdeki (Şekil 4.38., 4.39. ve 4.40.) KS NMR spektrumları ile özdeş spektrumlar tespit edilmiştir.



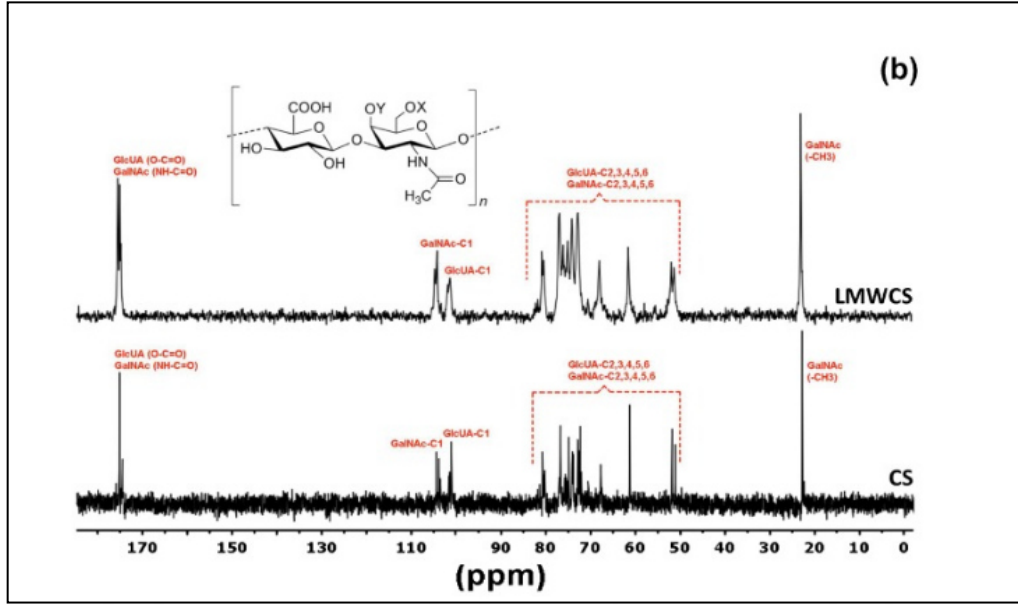
Şekil 4.36. *E. coli kfo<sup>+</sup> -vgb<sup>+</sup>* suşundan elde edilen KS'a ait NMR sonuçları



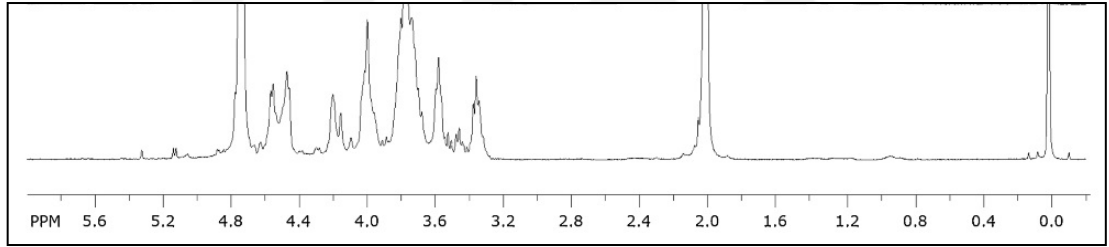
Şekil 4.37. Sığır trakesi kaynaklı KS'a ait NMR sonucu



Şekil 4.38. *Andrias davidianus* kıkırdağından çıkarılan KS'a ait NMR analiz sonucu [16]



Şekil 4.39. KS'a ait NMR spektral analiz. CS; kondroitin sülfat, LMWCS; düşük moleküler ağırlıklı KS [108]



Şekil 4.40. Domuz kıkırdağından ekstre edilen KS disakkaritinin NMR analiz sonucu [9]

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Literatürde, mikrobiyal kondroitin üretim yöntemlerinde; daha çok kondroitin (*P. multocida*) veya kondroitin benzeri (*E. coli* K4) polisakkaritleri ürettiği bilinen mikroorganizmalar kullanılmıştır, ancak bu mikroorganizmalar, patojen oldukları için fermantasyon için uygun bulunmamaktadırlar. Özellikle, *P. multocida*, düşük verim, pahalı ortam gereksinimi ayrıca özel ve pahalı tesisler gerektiren Biyolojik Tehlike Seviyesi 2 (BL2) statüsü nedeniyle kondroitinin ticari üretimi için uygun değildir. P.L. De Angelis adlı araştırmacı, rekombinant kondroitin eldesi için *Lactococcus* veya *Bacillus* gibi konakçı hücrelerde pmCS (*Pasteurella chondroitin synthase*) eksprese etme olasılığını açıklamıştır [61]. Ancak, *Bacillus* gram pozitif bir bakteri olduğundan *E. coli* ve *P. multocida* gibi gram negatif organizmalardan çok farklı bir hücre duvarı yapısına sahiptir. Bu durum ve gereken ek işlemler, *Bacillus*'ta kondroitinin verimli bir şekilde üretimini kısıtlamaktadır. Diğer taraftan, kondroitin yöntemlerinde sıkça kullanılan, *E. coli* K4 suşu, gen yapısı nedeni ile kondroitin üretmez, fruktozillenmiş bir kondroitin formu üretir. Kondroitin üretmek için bu polisakkaritin kapsamlı bir şekilde kimyasal veya enzimatik modifikasyonu gerekir. Bu değişiklik, işlemin toplam maliyetini artırır. Ayrıca böyle bir değişikliğin tamamlandığını ve uygun bir ürün üretildiğini belirlemek için daha fazla proses ve kalite kontrol önlemlerinin kullanılmasını gerektirir. Bu nedenle, oluşturduğumuz patojen olmayan *E. coli* *kfo*<sup>+</sup>-*vgb*<sup>+</sup> suşu ile kondroitin üretimi; verimli, güvenli ve literatürdeki diğer uygulamalara göre uygun maliyetli bir işlem olmuştur.

*E. coli* K4 kapsül polisakkaritinin (K4KPS) moleküler yapısının, GlcA tortularının C3 pozisyonunda fruktoz yan dallarına sahip bir kondroitin omurgası içerdiği bildirilmiştir [124]. Kondroitin eldesi için uzun zamandır, K4KPS'nin fruktoz tortusunu, kondroitin omurgasından uzaklaştırmak üzere araştırmalar yapılmaktadır [62,95,103,106,125,126]. Bu amaçla glikoziltransferaz kullanılarak enzimatik bir uzaklaştırma denenmiş ancak başarılı olunamamıştır [127], kondroitin üretmek için, kimyasal veya enzimatik modifikasyonu gerekliliği bildirilmiştir [61,104,128]. Kondroitin üretimini iyileştirmek için metabolik yol optimizasyonları [129,130] ve farklı kültürasyon işlemleri [99,125,131] üzerine birçok çalışma gerçekleştirilmektedir. Bununla birlikte, *E. coli* K4, üropatojenik bir suştur [11,102,132]. Patojen mikroorganizmaların geniş ölçekli üretilmesi ile ilgili düşük



verim ve güvenlik sorunları nedeniyle, bu organizmalar kullanılarak kondroitinin endüstriyel ölçekte biyoteknolojik üretimi yapılamamaktadır [1]. Bu nedenle, kondroitin biyosentezi yolu, patojen olmayan suşlarda optimize edilmeye çalışılmaktadır [105,133,134]. Böyle bir biyoteknolojik tasarım için W. He ve ark. [18], *E. coli* K4'deki kondroitin benzeri kapsüler polisakkarit omurgasının biyosentezi için ana enzimleri kodlayan üç geni; *kfoA*, *kfoC* ve *kfoF*,’yi tek bir plazmidde ayarlanabilir bir gen kopya sayısına ve promotor kuvvetine izin veren ePathBrick sistemi vektörlerine (pETM6) klonlamış ve daha sonra elde ettikleri bu pETM6-PACF plazmidini patojenik olmayan *E. coli* suşlarına entegre etmişlerdir. Bu sayede, oluşturdukları patojen olmayan rekombinant hücrelerden doğrudan kondroitin üretimi gerçekleştirmişlerdir. Tez çalışmamızda, *kfo* ve *vgb* genlerinin ortak ifade edildiği bir sistem tasarlamak temel amacımız olmuştur. Bu yolda öncelikle iki gen grubunu içeren bir plazmid dizayn edilmiş (pETM6-PACF-pUC8:15) ve bu tasarım moleküler teknikler ile doğrulanmıştır. Bu plazmid *E. coli* (C2987) suşuna klonlanmış ve gen ekspresyonu sağlanmıştır. Elde edilen kondroitinden, belirlenen sülfatlama yöntemi ile hedeflenen sülfat deseni oluşturulmuştur. Aşağıda literatürdeki benzer strateji ve deneysel çalışmalar, çalışmamız ve kullandığımız yöntemler göz önüne alınarak tartışılmıştır.

*E. coli* kapsüler polisakkarit üretimi, genel olarak, büyüme ile ilişkili olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle, *E. coli* suşlarının kondroitin üretim verimini optimize etmek için araştırmacılar tarafından yaygın olarak kullanılan strateji; hücre yoğunluğunun maksimize edilmesine dayanmaktadır [18]. Literatürde, mikrobiyal kondroitin üretim verimini arttırmak için; besiyeri optimizasyonunu, havalandırma koşullarının iyileştirilmesini ve bir mikrofiltrasyon biyoreaktör kullanımını birleştiren yaklaşımlar kullanılmıştır [17,96,99,129]. Bu yöntemler, ek maliyet ve zaman gerektiren işlemlerdir. Çalışmamızda ise; *vgb* geninin sağladığı avantajlar sayesinde bu yaklaşımlara kıyasla daha düşük maliyette ve daha kısa zamanlı işlemler ile kondroitin üretimi mümkün olmuştur. Literatürde; pETM6-PACF plazmidinin entegre edildiği sistem ile gerçekleştirilen bir çalışmada, maksimum olarak 213 mg/L kondroitin elde edilmiştir [18]. Çalışmamızda tasarladığımız *E. coli kfo<sup>+</sup>-vgb<sup>+</sup>* suşunda ise maksimum olarak 300 mg/L kondroitin elde edilmiştir. Bu sonuç; tasarladığımız *vgb* genini içeren pETM6-PACF plazmidli *E. coli* bakterisindeki kondroitin üretiminin, sadece pETM6-PACF plazmidine sahip bakteri

ile W. He ve ark.'nın [18] yaptığı çalışmaya kıyasla daha verimli olduğunu göstermektedir. Bu durum; *vgb* geni kaynaklı biyokütle ve kondroitin üretimi artışının sisteme sağladığı avantajı açıkca ortaya koymaktadır. Birçok çalışmada, *vgb* entegre organizmalarda çözünmüş oksijen kullanımının arttığı ve buna bağlı olarak da bu organizmalardan elde edilen ürünlerin miktarında artış olduğu bildirilmiştir [36,135-137]. VHb'nin *E. coli*'de büyüme ve çoğalma karakteristiklerini artırdığı, birçok çalışma ile gösterilmiştir [38,138-140]. VHb'nin, hücre büyümesini ve oksijen alınımını sadece *E. coli*' de değil, diğer bakteri ve maya türlerinde de arttırdığına yönelik farklı çalışmalar da bildirilmiştir [43,135,141,142]. Literatürdeki bu bilgilerden yola çıkarak; çalışmamızda, *Vitreoscilla* hemoglobinin (VHb), solunum ve enerji metabolizmasını artırması sonucunda biyokütle üretiminde ve buna bağlı olarak da kondroitin üretiminde artış sağladığını söyleyebiliriz.

Tezimizde, hem hücre içi hem de hücre dışı kondroitin üretimi üzerine araştırma yapılmıştır. Araştırmamız sonucu; ilk iki saat boyunca süpernatant veya hücre pelletinde kondroitin saptanmamıştır. 11 saat sonra, hücre pelletindeki kondroitinin süpernatanttaki kondroitine oranı yaklaşık olarak 9:1 şeklinde saptanmıştır; bu oran, polisakkaritin süpernatana taşınmasının oldukça kısıtlı olduğunu göstermektedir. 20 saat sonra bu oranın arttığı ve süpernatant içindeki ürün konsantrasyonunun bu süre zarfında düşük kaldığı tespit edilmiştir. Kondroitin üretiminde kullanılan *E. coli* suşlarının tüm polisakkariti hücre dışına transfer ettiği çoğu literatür kaydında var olmasına rağmen çalışmamızda hücre içine de biriken kondroitin bulunmuştur. Bu durum için olası bir açıklama; etkili bir polisakkarit yer değiştirme mekanizmasının olmasıdır. Ancak, taşınan polisakkaritlerin çoğu, poli-KDO bağlayıcıyla bağlantılı olan bakteri membran yüzeyinde tutulmaktadır. Diğer taraftan, *E. coli* suşlarının genomunda polisakkarit dağılmasından sorumlu olan bir kondroitin liyazı kodlayıcı herhangi bir gene rastlanmamıştır. Bu nedenle, polisakkaritin süpernatant içerisine salınması ciddi şekilde kısıtlanabilir. Bir başka olası açıklama ise; *E. coli* 'de, taşıma mekanizmasının tamamen kapatıldığı ve süpernatanda bulunan kondroitinin, sadece hücre ölümü yoluyla hücre içi kondroitinin salınmasından kaynaklandığıdır [18]. Bundan sonraki çalışmalarımızda, bu durumu netleştiren araştırmalar planlanmayı hedeflemekteyiz.

Kondroitin ve KS yapısının belirlenmesi için literatürde yaygın olarak NMR ve HPLC-MS gibi modern analitik yöntemler kullanılmaktadır. Modern spektroskopik teknikler, KS polisakkaritinin tam yapısı hakkında sınırlı bilgi sağladığından, daha ayrıntılı bir yapısal tayin yapmak için kondroitin liyazları kullanarak oligosakkaritler hazırlamak genellikle daha yararlı bir yöntemdir [77]. Çalışmamızda elde ettiğimiz kondroitin ve KS'nin moleküler yapı tayini, numunelerin, kondroitin liyaz grubundan Kondroitinaz ABC enzimi ile muamele edilerek HPLC-MS ve NMR analizlerinin yapılması ile gerçekleştirilmiştir. GAG ölçümü için birkaç yöntem geliştirilmiştir, ancak daha önce geliştirilen yöntemlerin çoğu büyük miktarlarda örnek gerektirir ve spesifik GAG'lar hakkında sınırlı bilgi sağlar. Yine çoğu çalışmada; bakteri fermentasyonundan elde edilen GAG ölçümü için karbazol gibi kolorimetrik deneylerin kullanımı; ortam ve hücre kalıntılarının müdahalesi nedeniyle sınırlıdır. Kütle spektrometresi yöntemleri; doğruluk, hız, hassasiyet ve özgüllük bakımından diğer tespit yöntemlerinden üstündür ve uygulanan en başarılı ve yararlı tekniklerin biri olarak kabul edilmektedir [66]. GAG'ların kimyasal ve biyolojik yönleriyle ilgili çalışmalarda, dikkat çekici bir şekilde NMR metodolojinin önemine değinilmiştir. NMR spektroskopisi, GAG-protein komplekslerini araştırmak için en çok kullanılan ve bilgilendirici analitik tekniklerden biridir [123]. NMR analizleri, GAG bazlı ilaçların kalitesi ile ilgili değerlendirmeler için de vazgeçilmezdir. 2008 yılında, aşırı sülfatlanmış kondroitin sülfat ile kontamine olmuş heparinin farmasötik preparatlarının 200'den fazla hastanın ölümüne neden olduğu dönemde NMR analizi oldukça önemli olmuştur. Bu olay sırasında, aşırı sülfatlanmış kondroitin sülfat kontaminantının kimliği ve yapısı NMR teknikleri ile açıklığa kavuşturulmuştur. Bu nedenle farmasötik tüm GAG bazlı preparatların NMR analizi önem taşımaktadır [122]. Bundan dolayı tezimizde, kondroitin ölçümü için yapısal analizlerde HPLC-MS ve NMR gibi teknikler kullanılmıştır. Oluşturduğumuz rekombinant *E. coli* suşundan elde ettiğimiz ve hazırladığımız kondroitin numunelerinin HPLC sonuçları değerlendirildiğinde, literatürdeki çalışmalarda elde edilen mikrobiyal kondroitin kromatogramlarıyla [18,101,105,106] özdeş şekilde, ürünün varlığını gösteren OS (kondroitin) ile ilişkili pik gözlenmiştir. Ayrıca; kondroitin standardının imza piki ile eşleşmiştir [18]. NMR spektrumunda; glcA ve GalNAc'ın anomerik proton sinyalleri ve *N*-asetil grubu sinyalleri gözlenmektedir. Tüm proton sinyalleri, referans makalelerde [18,21] gösterildiği gibi özdeş şekilde eşleşmektedir. Ayrıca standart kondroitin spektrumları ile de eşleşmektedir [18]. Bu NMR sonuçları, tasarlanan *E.*

*coli kfo<sup>+</sup>-vgb<sup>+</sup>* suşlarının saf kondroitin omurgasıyla aynı disakkarit tekrar birimlerini ürettiğini doğrulamaktadır. Doğruluğu kanıtlanan kondroitine daha sonra sülfatlama işlemi yapıp elde edilen KS'in da analizi yine aynı yöntemlerle gerçekleştirilmiştir. Elde edilen KS'in Kondroitinaz ABC enzimi ile muamele edilmesi sonucu yapısında bulunan disakkarit birimleri serbest hale geçerek bitişik iki spektrum vermiştir. Bunlar; seçici olarak süfplatadığımız N-asetil-β-galaktozamin-6-sülfat ve az miktarda süfplatlanan 4S birimleridir. Ticari KS ve literatürdeki [9,16,33,99,101,105,106,123] HPLC spektrumları incelendiğinde, elde ettiğimiz KS'in verdiği HPLC spektrumlarının bunlarla eşleştiği görünmektedir. Elde ettiğimiz NMR KS sonuçları incelendiğinde; sığır trakesi kaynaklı KS ve referans aldığımız makalelerdeki [9,16,108] KS NMR spektrumları ile özdeş spektrumlar tespit edilmiştir. Böylece, ürettiğimiz KS'in moleküler yapısı HPLC-MS analizine ek olarak NMR analizi ile doğrulanmıştır.

Kökenine bağlı olarak, KS, esas olarak GalNAc'in 4. pozisyonunda veya 6. pozisyonunda monosülfatlanmış iki tip disakkarit ünitesinden oluşmaktadır (sırasıyla A ve C disakkaritler). Farklı hayvan kaynaklarından kaynaklanan KS örnekleri ayrıca farklı moleküler ağırlıklar ve yük yoğunlukları ile karakterize edilir, bu son parametre doğrudan spesifik süfplatlanmış gruplarla koreledir. Genellikle, omurgalı hayvanlardan elde edilen KS'da iz miktarda disülfatlanmış disakkaritler bulunur ve doğal KS'da polisüfplatlanmış disakkaritler (tri ve tetra süfplatlar) gözlenmez. Biyosentez prosesleri nedeniyle, tüm doğal KS'ların her zaman aynı polisakkarit zincirinde GalNAc'in 4. veya 6. pozisyonunda monosülfatlanmış disakkaritlere sahip olduğu bildirilmiştir [113]. Çalışmamızda; elde ettiğimiz kondroitine seçici olarak 6-konumunda süfplatlama yapılarak Kondroitin-6-sülfat elde edilmiştir. Biyoteknolojik ve biyomedikal öneme sahip olmaları nedeniyle, son zamanlarda, sülfat dağılımının kimyasal modifikasyonu ve ayrıca süfplatlı olmayan polisakkaritler üzerine sülfat gruplarının bölgesel seçici olarak yerleştirilmesi hakkında birçok rapor yayınlanmıştır. KS'in sülfasyon deseni biyolojik aktivitesinde çok önemli bir rol oynar ve tanımlanmış bir yapıya sahip KS hazırlanması doğru farmakolojik çalışma için çok önemlidir. Bu amaçla farklı pozisyonlarda süfplatlanmış KS'lardaki bu sülfat gruplarının çıkarılması yoluyla yapı-aktivite ilişkisinin değerlendirildiği çalışmalar mevcuttur [143]. Tüm bu bilgiler ışığında; ürettiğimiz kondroitinin bölgesel seçici bir şekilde 6-konumunda süfplatlanması; hem istenmeyen alerjik durumların önlenmesi

hem de etkili bir biyolojik aktivite sergilemesi açısından önemlidir. Çalışmamızda, biyolojik işlevini ayarlamak için doğal ürünlerde meydana gelenlere benzeyen spesifik sülfatlama modellerine sahip moleküller elde edilmiştir; bu sayede sülfatlama motifi iyileştirilmiştir. Uyguladığımız işlem ayrıca, doğal KS'da mevcut olanlara benzer, bölgeye özgü sülfasyonun modüle edilmesine de izin vermektedir.

J.F. Jolly ve ark. tarafından patenti alınan yöntem ile 237.7 mg/L konsantrasyonda KS üretilbileceği açıklanmıştır [33]. Patent uygulamalarında, K. Suzuki ve ark.'nın oluşturdukları yöntem ile 52 mg/L nihai kondroitin konsantrasyonu elde edilmiştir [62]. W. He ve ark.'nın çalışmaları sonucunda 213 mg/L kondroitin üretilmişken [18], Q. Zhang ve ark.'nin *E. coli* bakterisini kullanarak yaptıkları çalışmada maksimum olarak 227.84 mg/L kondroitin elde edilmiştir [17]. D. Cimini ve ark.'nin yaptıkları çalışma sonucunda ise  $28\pm 300$  mg/L kondroitin üretildiği bildirilmiştir [144]. Çalışmamızdan elde ettiğimiz maksimum 300 mg/L'lik verim bu son güncel çalışmalara kıyasla sistemimizin oldukça verimli olduğunu göstermiştir.

Önceki çalışmalarda KS üretim yönteminin biyoaktivitesini önemli ölçüde etkilediği gösterilmiştir. Örneğin; düşük moleküler ağırlıklı KS, daha yüksek antioksidan aktiviteye ve gelişmiş bir biyoyararlanıma sahiptir [16]. Mikrobiyal kaynaklardan elde edilen KS'ın hayvan kaynaklarından üretilen KS'a eşdeğer olduğu [15,21] ayrıca hayvan kaynaklarından üretilen türevlerine (bunlar genel olarak 20.000–50.000 Da moleküler ağırlığına (MA) sahiptirler) göre daha düşük molekül ağırlığına (300-20.000 Da) sahip olduğu böylece oral kullanım sonrasında daha yüksek bir absorbe göstererek tedavi sürecinde daha etkin olduğu belirtilmektedir [15,24,106,108]. Literatüre göre, kan dolaşımına ulaşan absorbe edilmiş KS'ın büyük kısmı düşük molekül ağırlıklı türevlerden oluşmaktadır. Molekül ağırlığındaki değişiklikler; bu mekanizmadan ve KS'den sorumlu moleküller arasındaki etkileşimin engellenmesi nedeniyle hücre tanımayı etkilemektedir. Bu durum farklı bağışıklık yanıtlarına ve hatta farmakolojik etkinin bozulmasına neden olmaktadır [108]. Ayrıca, son güncel çalışmaların birinde düşük moleküler ağırlıklı KS'ın diyabetin gelişmesini ve ilerlemesini önlemede yararlı olacağı rapor edilmiş ve etkin antienflamatuar etkisinden bahsedilmiştir [113]. Bu bilgiler doğrultusunda en önemli hedeflerimizden biri; düşük MA'ya sahip kondroitin üretmekti. Yaptığımız deneyler

sonucunda 203.0 Da moleküler ağırlığında düşük bir MA'ya sahip kondroitinin üretildiği HPLC-MS analiziyle doğrulanmıştır. Yine diğer taraftan, elde ettiğimiz kondroitinin yapı ve etkisi (moleküler ağırlık ve polidispersite yönünden) doğal hayvan kaynaklı KS ile çok benzerdir. W. He ve ark.'nin [18] pETM6-PACF vektörlü bir sistem kullanarak hazırladıkları kondroitin numunesinin MA'sı 571 Da olarak bulunmuştur. D. Cimini ve ark.'nin [144] yaptıkları çalışmada ise elde edilen kondroitinin moleküler ağırlığı 25000 Da olarak rapor edilmiştir. D. Bianchi ve arkadaşlarının [106] uyguladığı bir başka çalışmada 15000 Da ağırlığında KS elde edilmiştir. Konak organizma olarak *E. coli* JM109 suşunun kullanıldığı bir başka çalışmada ise üretilen kondroitinin MA'sı 300.07 Da olarak bulunmuştur [105]. Başka bir araştırma grubu tarafından 114070 Da mikrobiyal kondroitin üretilmiştir [21]. Z. Kang ve ark.'nin [101], tasarladıkları rekombinant suşlarla yapılan fermentasyon deneyleri sonucunda 84360, 97020, 72780 ve 119200 Da molekül ağırlığında kondroitin üretilmiştir. Çalışmamızdan elde ettiğimiz 203.0 Da kondroitinin, bu mevcut güncel çalışmalara kıyasla oldukça düşük MA'lı olduğu belirlenmiştir. Ayrıca ürettiğimiz kondroitinin sülfatlanması ile elde ettiğimiz KS da 269 Da'luk bir MA'ya sahiptir. Bu bilgi doğrultusunda, elde ettiğimiz KS'nin oral uygulamadan sonra, kimyasal işlemlerle üretilen kondroitin sülfattan daha iyi biyoyararlanım sağlayacağını söyleyebiliriz. Bu sayede, ürettiğimiz KS; doğal kondroitin sülfatla yakın antienflamatuar ve antiartritik aktiviteye sahip olacaktır. Böylece, enflamatuar ve osteoartritik/artritik işlemlerin tedavisinde kullanım için oldukça uygun olacaktır.

*E. coli* K4 suşlarının, kondroitin ile aynı omurga yapısına sahip olan bir kapsüler polisakkarit (K4 polisakarit) üretebildiği rapor edilmiştir. Bu K4 polisakkariti; bir D-glukuronik asit (GlcUA) parçasından, bir  $\beta$ 1-3 (GlcUA $\rightarrow$ GalNAc) bağı ile bağlanmış bir N-asetil-D-galaktozamin (GalNAc) parçasından ve GlcUA parçasının C3-hidroksil grubuna bağlı bir fruktoz kalıntısından meydana gelen tekrarlayan trisakkarit ünitesinden oluşmaktadır. Bu fruktoz artıkları, ortaya çıkan doğrusal polisakkaritin dallarını oluşturmaktadır. Kaliteli ve düşük moleküler ağırlıklı bir kondroitin elde etmek için bu fruktoz kalıntılarının, kondroitin omurgasından uzaklaştırılmaları gerekir. Bu yüzden, literatürde mevcut çoğu mikrobiyal kondroitin üretimine yönelik yaklaşımda; fruktoz artıklarını uzaklaştırmak için ilave post-fermantasyon işlemleri gerekmektedir. [*kfoE*]

geninin; bir fruktozil-transferaz aktivitesine sahip bir proteini kodlayan gen olduğu düşünülmektedir. Bu genin, kondroitin biyosentezi için gerekli olmadığı bildirilmiştir [61]. Çalışmamızda; kullandığımız pETM6-PACF plazmidi tasarlanırken, fruktozillenmeyi gerçekleştiren gen [*kfoE*] aktarılmadığı için bu plazmidi taşıyan bakteriler, kondroitini fruktoz kalıntıları olmadan sentezleyerek, ilave bir post-fermantasyon işlemine gerek duyulmamıştır. Çalışmamızda; ek proseslere ihtiyaç duymayan ve nonpatojen, doğrudan kondroitin üretebilen, rekombinant bir mikroorganizma ile çalışılmıştır. Çalışmamızdan elde ettiğimiz kondroitine seçici sülfasyon yöntemi uygulanmış ve kondroitin sülfat üretimi başarı ile gerçekleştirilmiştir. Böylece oluşturduğumuz rekombinant suş, kondroitin açısından potansiyel endüstriyel değerine ek olarak kondroitin sülfat için de uygun ve etkin bir organizma niteliği taşımaktadır. Bu çalışmadaki mevcut biyolojik strateji; kondroitin sülfatın biyosentezi için daha da geliştirilebilme potansiyeline sahip olmasıdır ve bu yöntemin, geleneksel KS üretim yöntemleri için tercih edilebilecek bir alternatif olabileceği düşünülmektedir.

Tez çalışmamızın sonucunda; ülkemizde, ilk kez, mikrobiyal bir kaynaktan KS üretimi gerçekleştirilmiştir. Çalışmamız; ülkemizde mevcut olan araştırma eksikliğini tamamlama, genel literatür açısından ise güvenilir, yüksek saflıkta KS üretimindeki eksiklikleri tamamlama hususunda katkı sağlayacak bir nitelik taşımaktadır.

## 6. KAYNAKLAR

- [1] C. Schiraldi, D. Cimini and M. De Rosa, *Production of chondroitin sulfate and chondroitin*, **Appl Microbiol Biotechnol**, 87 (2010) 1209–1220.
- [2] L.M. Willis and C. Whitfield, *Structure, biosynthesis and function of bacterial capsular polysaccharides synthesized by ABC transporter-dependent pathways*, **Carbohydr Res**, 378 (2013) 35–44.
- [3] S. Mizumoto, S. Yamada and K. Sugahara, *Molecular interactions between chondroitin-dermatan sulfate and growth factors/receptors/matrix proteins*, **Curr Opin Struct Biol**, 34 (2015) 35–42.
- [4] M. Gui, J. Song, L. Zhang, S. Wang, R. Wu, C. Ma and P. Li, *Chemical characteristics and antithrombotic effect of chondroitin sulfates from sturgeon skull and sturgeon backbone*, **Carbohydr Polym**, 123 (2015) 454–460.
- [5] D. Soares da Costa, et al., *Sulfation of glycosaminoglycans and its implications in human health and disorders*, **Annu Rev Biomed Eng**, 19 (2017) 1–26.
- [6] P. Datta, R.J. Linhardt, S.T. Sharfstein, *Industrial Production of Glycosaminoglycans*, **Ref Modul Life Sci**, (2017) 1–10.
- [7] X. Yu, G. Qian, S. Chen, D. Xu, X. Zhao, C. Du, *A tracheal scaffold of gelatin-chondroitin sulfate-hyaluronan-polyvinyl alcohol with orientated porous structure*, **Carbohydr Polym**, 159 (2017) 20-28.
- [8] E.L. Stephenson and V.W. Yong, *Pro-inflammatory roles of chondroitin sulfate proteoglycans in disorders of the central nervous system*, **Matrix Biol**, 71:72 (2018) 432-442.
- [9] T. Bobula, R. Buffa, M. Hermannová, H. Vágnerová, I. Dolečková, V. Velebný, *The synthesis of a new unsaturated derivative of chondroitin sulfate with increased antioxidant properties*, **Carbohydr Polym**, 190 (2018) 175–183.
- [10] H. Bougatef, F. Krichena, F. Capitanib, I.B. Amorç, F. Maccarib, V. Mantovanib, F. Galeottib, N. Volpib, A. Bougatefa, A. Silaa, *Chondroitin sulfate/dermatan sulfate from corb (*Sciaena umbra*) skin: Purification, structural analysis and anticoagulant effect*, **Carbohydr Polym**, 196 (2018) 272–278.
- [11] Y. Shi, Y. Meng, J. Li, J. Chen, Y. Liu, and X. Bai, *Chondroitin sulfate: extraction, purification, microbial and chemical synthesis*, **J Chem Technol Biotechnol**, 89 (2014) 1445–1465.
- [12] M. Sufliita, L. Fu, W. He, M. Koffas, R. Linhardt, *Heparin and related polysaccharides: synthesis using recombinant enzymes and metabolic engineering*, **Appl Microbiol Biotechnol**, 99 (2015) 7465–7479.



- [13] J. Wang, S. Guleria, M. Koffas, Y. Yan, *Microbial production of value-added nutraceuticals*, **Curr Opin Biotechnol**, 37 (2016) 97–104.
- [14] W. He, Y. Zhu, A. Shirke, X. Sun, J. Liu, R. Gross, M. Koffas, R. Linhardt, M. Li, *Expression of chondroitin-4-O-sulfotransferase in Escherichia coli and Pichia pastoris*, **Appl Microbiol Biotechnol**, 101 (2017) 6919–6928.
- [15] N. Miraglia, D. Bianchi, A. Trentin, N. Volpi, M. Soni, *Safety assessment of chondroitin sulfate sodium: Subchronic study in rats, genotoxicity tests and human bioavailability*, **Food Chem Toxicol**, 93 (2016) 89–101.
- [16] W. Zhu, Y. Ji, Y. Wang, D. He, Y. Yan, N. Su, C. Zhang, X. Xing, *Structural characterization and in vitro antioxidant activities of chondroitin sulfate purified from Andrias davidianus cartilage*, **Carbohydr Polym**, 196 (2018) 398–404.
- [17] Q. Zhang, R. Yao, X. Chen, L. Liu, S. Xu, J. Chen, J. Wu, *Enhancing fructosylated chondroitin production in Escherichia coli K4 by balancing the UDP-precursors*, **Metab Eng**, 47 (2018) 314–322.
- [18] W. He, L. Fu, G. Li, J. A. Jones, R. J. Linhardt and M. Koffas, *Production of chondroitin in metabolically engineered E. coli*, **Metab Eng**, 27 (2015) 92–100.
- [19] N. Lin, X. Mo, Y. Yang, H. Zhang, *Purification and sequence characterization of chondroitin sulfate and dermatan sulfate from fishes*, **Glycoconj J**, 34:2 (2017) 241–253.
- [20] Q. Li, C. Cai, Y. Chang, F. Zhang, R.J. Linhardt, C. Xue, G. Yu, *A novel structural fucosylated chondroitin sulfate from Holothuria Mexicana and its effects on growth factors binding and anticoagulation*, **Carbohydr Polym**, 181 (2018) 1160–1168.
- [21] P. Jin, L. Zhang, P. Yuan, Z. Kang, G. Du, J. Chen, *Efficient biosynthesis of polysaccharides chondroitin and heparosan by metabolically engineered Bacillus subtilis*, **Carbohydr Polym**, 140 (2016) 424–432.
- [22] Z. Kang, Z. Zhou, Y. Wang, H. Huang, G. Du and J. Chen, *Bio-Based Strategies for Producing Glycosaminoglycans and Their Oligosaccharides*, **Trends Biotechnol**, 36:8 (2018) 806–818.
- [23] T. Mikami, H. Kitagawa, *Biosynthesis and function of chondroitin sulfate*, **Biochim Biophys Acta**, 1830 (2013) 4719–4733.
- [24] O.F. Restaino, S. Vinciguerra, L. Carcarino, L. Andrezzi, A. Alfano, D. Cimini, R. De Mattia, C. Schiraldi, *Molecular weight studies on chondroitin-like microbial capsular polysaccharides*, **N Biotechnol**, 25 (2009) 179–180.
- [25] E. Bedini and M. Parrilli, *Synthetic and semi-synthetic chondroitin sulfate oligosaccharides, polysaccharides and glycomimetics*, **Carbohydr Res**, 356 (2012) 75–85.

- [26] B.F. Cress, J.A. Englaender, W. He, D. Kasper, J. Robert and M. A. G. Koffas, *Masquerading microbial pathogens: Capsular polysaccharides mimic host-tissue molecules*, **FEMS Microbiol Rev**, 38 (2013) 660–697.
- [27] S. Dasgupta and D.L. Kasper, *Novel tools for modulating immune responses in the host polysaccharides from the capsule of commensal bacteria*, *Advances in Immunology*, **Elsevier Inc**, 106 (2010) 61–91.
- [28] Anonymous. (2019). <https://biologyreader.com/difference-between-gram-and-gram-negative-bacteria.html> (on-line Access on 23 Nov, 2019).
- [29] L. Cuthbertson, I.L. Mainprize, J.H. Naismith, C. Whitfield, *Pivotal Roles of the Outer Membrane Polysaccharide Export and Polysaccharide Copolymerase Protein Families in Export of Extracellular Polysaccharides in Gram-Negative Bacteria*, **Microbiol Mol Biol Rev**, 73 (2009) 155-177.
- [30] L. Cuthbertson, V. Kos, C. Whitfield, *ABC Transporters Involved in Export of Cell Surface Glycoconjugates*, **Microbiol Mol Biol Rev**, 74 (2010) 341-362.
- [31] C. Whitfield, *Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in Escherichia coli*, **Annu Rev Biochem**, 75 (2006) 39-68.
- [32] S.R. Bushell, I.L. Mainprize, M.A. Wear, H. Lou, C. Whitfield, J.H. Naismith, *Wzi Is an Outer Membrane Lectin that Underpins Group 1 Capsule Assembly in Escherichia coli*, **Structure**, 21 (2013) 844–853.
- [33] J.F. Jolly et al., *Microbial-derived chondroitin sulfate*, US Patent 2010/0063001 A1, Mar. 11, 2010.
- [34] U. Ozer, B. Ates and H. Geckil, *Production of L -DOPA and dopamine in recombinant bacteria bearing the Vitreoscilla hemoglobin gene*, **Biotechnol J**, 4:7 (2009) 1077-1088.
- [35] B.C. Stark, K.R. Pagilla and K.L. Dikshit, *Recent applications of Vitreoscilla hemoglobin technology in bioproduct synthesis and bioremediation*, **Appl Microbiol Biotechnol**, 99 (2015) 1627–1636.
- [36] Q. Wang, H. Yu, M. Wang, H. Yang and Z. Shen, *Enhanced biosynthesis and characterization of surfactin isoforms with engineered Bacillus subtilis through promoter replacement and Vitreoscilla hemoglobin co-expression*, **Process Biochem**, 70 (2018) 36–44.
- [37] X. Liu, P. Zhu, R. Jiang, L. Wu, X. Feng and S. Li, *Enhancement of welan gum production in Sphingomonas sp. HT-1 via heterologous expression of Vitreoscilla hemoglobin gene*, **Carbohydr Polym**, 156 (2017) 135–142.
- [38] T. Zhao et al., *Improved production of trans-4-hydroxy-L-proline by chromosomal integration of the Vitreoscilla hemoglobin gene into recombinant Escherichia coli with expression of proline-4-hydroxylase*, **J. Biosci Bioeng**, 123:1 (2017) 109–115.

- [39] W. Zhang, H. Xie, Y. He, J. Feng, W. Gao, Y. Gu, S. Wang, C. Song, *Chromosome integration of the *Vitreoscilla hemoglobin* gene (*vgb*) mediated by temperature-sensitive plasmid enhances  $\gamma$ -PGA production in *Bacillus amyloliquefaciens**, **FEMS Microbiol Lett**, 343 (2013) 127–134.
- [40] S. Wang, F. Liu, Z. Hou, G. Zong, X. Zhu, P. Ling, *Enhancement of natamycin production on *Streptomyces gilvosporeus* by chromosomal integration of the *Vitreoscilla hemoglobin* gene (*vgb*)*, **World J Microbiol Biotechnol**, 30 (2014) 1369–1376.
- [41] Y.L. Suen, H. Tang, J. Huang, F. Chen, *Enhanced production of fatty acids and astaxanthin in *Aurantiochytrium* sp. by the expression of *Vitreoscilla hemoglobin**, **J Agric Food Chem**, 62 (2014) 12392–12398.
- [42] H.J. Li, D.H. Zhang, T.H. Yue, L.X. Jiang, X. Yu, P. Zhao, T. Li, J.W. Xu, *Improved polysaccharide production in a submerged culture of *Ganoderma lucidum* by the heterologous expression of *Vitreoscilla hemoglobin* gene*, **J Biotechnol**, 217 (2016) 132–137.
- [43] H. Li, Y. He, D. Zhang, T. Yue, L. Jiang, N. Li, *Enhancement of ganoderic acid production by constitutively expressing *Vitreoscilla hemoglobin* gene in *Ganoderma lucidum**, **J Biotechnol**, 227 (2016) 35–40.
- [44] G. Zoppetti et al., *Process for the preparation of chondroitin sulfates from K4 polysaccharide and obtained products*, US Patent. 6,777,398 B2, Aug. 17, 2004.
- [45] N. Volpi, *Quality of different chondroitin sulphate preparations in relation to their therapeutic activity* **J Pharm Pharmacol**, 61 (2009) 1271–1277.
- [46] J.A. Vázquez, I. Rodríguez-Amado, M.I. Montemayor, J. Fraguas, M.P. González and M.A. Murado, *Chondroitin sulfate, hyaluronic acid and chitin/chitosan production using marine waste sources: characteristics, applications and eco-friendly processes: a review*, **Mar Drugs**, 11 (2013) 747–774.
- [47] B. Lignot, V. Lahogue and P. Bourseau, *Enzymatic extraction of chondroitin sulfate from skate cartilage and concentration desalting by ultrafiltration*, **J Biotechnol**, 103 (2003) 281–284.
- [48] L. Mollard, A. Montillet, C. Horriere, J. Legrand and T.H. Nguyen, *Method for obtaining avian biological products*, US Patent. 6844424 B1, 2005.
- [49] E. Tadashi, *Sodium chondroitin sulfate, chondroitin-sulfate-containing material and processes for producing the same*, US Patent. 20060014256 A1, 2006.
- [50] M.A. Murado, J. Fraguas, M.I. Montemayor, J.A. Vázquez and M.P. González, *Preparation of highly purified chondroitin sulphate from skate (*Raja clavata*) cartilage by-products. Process optimization including a new procedure of alkaline hydroalcoholic hydrolysis*, **Biochem Eng J**, 49 (2010) 126–132.

- [51] A.R.C. Souza, E.O. Kozłowski, V.R. Cerqueira, M.T.L. Castelo-Branco, M.L. Costa and M.S.G. Pavão, *Chondroitin sulfate and keratan sulfate are the major glycosaminoglycans present in the adult zebrafish *Danio rerio* (Chordata-Cyprinidae)*, **Glycoconj J**, 24 (2007) 521–530.
- [52] V. Gargiulo, R. Lanzetta, M. Parrilli and C. De Castro, *Structural analysis of chondroitin sulfate from *Scyliorhinus canicula*: a useful source of this polysaccharide*, **Glycobiol**, 19 (2009) 1485–1491.
- [53] S. Sakai, W.S. Kim, I.S. Lee, Y.S. Kim, A. Nakamura, T. Toida and T. Imanari, *Purification and characterization of dermatan sulfate from the skin of the eel, *Anguilla japonica**, **Carbohydr Res**, 338 (2003) 263–269.
- [54] G.Q. Liu, Q.Z. Ling and J.F. Sun, *Optimization of extraction technology of chondroitin sulfate from eggshell membrane*, **Chin Food Sci**, 28 (2007) 283–286.
- [55] S.B. Kim, C.I. Ji, J.W. Woo, J.R. Do, S.M. Cho, Y.B. Lee, S.N. Kang and J.H. Park, *Simplified purification of chondroitin sulphate from scapular cartilage of shortfin mako shark (*Isurus oxyrinchus*)*, **Int J Food Sci Technol**, 47 (2012) 91–99.
- [56] P. Wang and J. Tang, *Solvent-free mechanochemical extraction of chondroitin sulfate from shark cartilage*, **Chem Eng Process**, 48 (2009) 1187–1191.
- [57] S.X. Hao, L.H. Li, X.Q. Yang, Y. Wei, H. Huang, W.L. Lin, J.C. Deng, J.W. Cen, B. Qi, Y.Y. Wu, H. Shi and S.Q. Diao, *Method for preparing chondroitin sulfate from sturgeon cartilage*, CN Patent. 102924624 A, 2013.
- [58] T. Sumi, H. Ohba, T. Ikegami, M. Shibata, T. Sakaki, I. Salay and S.S. Park, *Method for the preparation of chondroitin sulfate compounds*, US Patent. 6342367 B1, 2002.
- [59] H. Kono and M. Takai, *Salmon-origin chondroitin sulphate*, US Patent. 0162744 A1, 2003.
- [60] Z. Zhang, F.S. Geng and H. Gao, *Isolation and purification of chondroitin sulfate from porcine cartilage*, **Chin J Biochem Pharm**, 25 (2004) 144–146.
- [61] D.H. Doherty et al., *Compositions and methods for bacterial production of chondroitin*, US Patent 8,697.398 B2, Apr. 15, 2014.
- [62] K. Suzuki, K. Miyamoto, H. Kaseyama, *Chondroitin-producing bacterium and method of producing chondroitin*. US Patent 2010/0151532 A1, Jun. 17, 2010.
- [63] E. Roman, I. Roberts, K. Lidholt and M. Kusche-Gullberg, *Overexpression of UDP-glucose dehydrogenase in *Escherichia coli* results in decreased biosynthesis of K5 polysaccharide*, **Biochem J**, 374 (2003) 767–772.

- [64] P.L. De Angelis, *Chondroitin synthase gene and methods of making and using same*, US Patent 7,569,386 B2, Aug. 4, 2009.
- [65] D. Cimini, O.F. Restaino, A. Catapano, M. De Rosa and C. Schiraldi, *Production of capsular polysaccharide from Escherichia coli K4 for biotechnological applications*, **Appl Microbiol Biotechnol**, 85 (2010) 1779–1787.
- [66] F. Kubaski et al., *Glycosaminoglycans detection methods: Applications of mass spectrometry*, **Mol Genet Metab**, 120 (2017) 67–77.
- [67] G. Sridharan, A.A. Shankar, *Toluidine blue: a review of its chemistry and clinical utility*, **J Oral Maxillofac Pathol**, 16 (2012) 251–255.
- [68] Z. Zhang, J. Xie, F. Zhang, R.J. Lindhardt, *Thin layer chromatography for the analysis of glycosaminoglycan oligosaccharides*, **Annal Biochem**, 371 (2007) 118–120.
- [69] P. Mabe, A. Valiente, V. Soto, V. Cornejo, E. Raiman, *Evaluation of reliability for urine mucopolysaccharidosis screening by dimethylmethylene blue and berry spot tests*, **Clin Chim Acta**, 345 (2004) 135–140.
- [70] N. Weng, *Mini-review: important roles of chromatography in the quantitation of biomarkers using liquid chromatography and mass spectrometry (LC–MS)*, **Austin Chromatogr**, 1 (2014) 1–4.
- [71] C.K. Chuang, H.Y. Lin, T.J. Wang, C.C. Tsai, H.L. Liu, S.P. Lin, *A modified liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for predominant disaccharide units of urinary glycosaminoglycans in patients with mucopolysaccharidoses*, **Orphanet J Rare Dis**, 9 (2014) 1–10.
- [72] M.J. Kailemia, M. Park, D.A. Kaplan, A. Venot, G.J. Boons, L. Li, R.J. Lindhardt, I.J. Amster, *High-field asymmetric-waveform ion mobility spectrometry and electron detachment dissociation of isobaric mixtures of glycosaminoglycans*, **J Am Soc Mass Spectrom**, 25 (2014) 258–268.
- [73] H. Zhu, X. Chen, X. Zhang, L. Liu, D. Cong, X. Zhao, G. Yu, *Acidolysis-based component mapping of glycosaminoglycans by reversed-phase high-performance liquid chromatography with off-line electrospray ionization-tandem mass spectrometry: evidence and tags to distinguish different glycosaminoglycans*, **Anal Biochem**, 466 (2014) 63–69.
- [74] N. Volpi, F. Maccari, F. Galeotti, L. Zampini, L. Santoro, L. Padella, T. Galeazzi, O. Gabrielli, G.V. Coppa, *Plasmatic dermatan sulfate and chondroitin sulfate determination in mucopolysaccharidoses*, **J Pharm Biom Anal**, 85 (2013) 40–45.
- [75] J.A. Yang, E.S. Kim, J.H. Kwon, H. Kim, J.H. Shin, S.H. Yun, K.Y. Choi, S.K. Hahn, *Transdermal delivery of hyaluronic acid-human growth hormone conjugate*, **Biomaterials**, 33 (2012) 5947–5954.

- [76] S. Aydin, *A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA*, **Peptides**, 72 (2015) 4–15.
- [77] A. Rani, S. Patel, A. Goyal, *Chondroitin Sulfate (CS) Lyases: Structure, Function and Application in Therapeutics*, **Curr Protein Pept Sci**, 19:1 (2018) 22-33.
- [78] M. Bishnoi, A. Jain, P. Hurkat, S.K. Jain, *Chondroitin sulphate: a focus on osteoarthritis*, **Glycoconj J**, 33 (2016) 693-705.
- [79] N.E. Lane, K. Shidara, B.L. Wise, *Osteoarthritis year in review 2016: clinical*, **Osteoarthr**, **Cartil**, 25 (2017) 209-215.
- [80] Q. Chen, X. Shao, P. Ling, F. Liu, G. Han and F. Wang, *Recent advances in polysaccharides for osteoarthritis therapy*, **Eur J Med Chem**, 139 (2017) 926–935.
- [81] M. Wu, D. Wen, N. Gao, C. Xiao, L. Yang, L. Xu, W. Lian, W. Peng, J. Jiang, J. Zhao, *Anticoagulant and antithrombotic evaluation of native fucosylated chondroitin sulfates and their derivatives as selective inhibitors of intrinsic factor Xase*, **Eur J Med Chem**, 92 (2015) 257-269.
- [82] G. Sandri, M.C. Bonferoni, S. Rossi, A. Delfino, F. Riva, A.I. Cornaglia, G. Marrubini, G. Musitelli, C. Del Fante, C. Perotti, *Platelet lysate and chondroitin sulfate loaded contact lenses to heal corneal lesions*, **Int J Pharm**, 509 (2016) 188-196.
- [83] J.F. Piai, M.A. da Silva, A. Martins, A.B. Torres, S. Faria, R.L. Reis, E.C. Muniz, N.M. Neves, *Chondroitin sulfate immobilization at the surface of electrospun nanofiber meshes for cartilage tissue regeneration approaches*, **Appl Surf Sci**, 403 (2017) 112-125.
- [84] J.A. Roman-Blas, S. Castaneda, O.S. Sanchez-Pernaute, R. Largo, G. Herrero-Beaumont, *Combined treatment with chondroitin sulfate and glucosamine sulfate shows No superiority over placebo for reduction of joint pain and functional impairment in patients with knee osteoarthritis: a six-month multicenter, randomized, double-blind, placebo-con*, **Arthritis Rheum**, 69 (2017) 77.
- [85] S. Yamada and K. Sugahara, *Potential therapeutic application of chondroitin sulfate/dermatan sulphate*, **Curr Drug Discov Technol**, 5:4 (2008) 289–301.
- [86] M.E. Gilbert, K.R. Kirker, S.D. Gray, P.D. Ward, J.G. Szakacs, G.D. Prestwich, R.R. Orlandi, *Chondroitin sulfate hydrogel and wound healing in rabbit maxillary sinus mucosa*, **Laryngoscope**, 114:8 (2004) 1406–1409.
- [87] X.H. Zou, W.C. Foong, T. Cao, B.H. Bay, O.H. Wand, G.W. Yip, *Chondroitin Sulfate in Palatal Wound Healing*, **J Dent Res**, 83:11 (2004) 880–885.
- [88] P.E. Fraser, A.A. Darabie, J.A. McLaurin, *Amyloid-beta interactions with chondroitin sulphate-derived monosaccharides and disaccharides. Implications for drug development*, **J Biol Chem**, 273:9 (2001) 6412–6419.

- [89] A. Rolls, H. Avidan, L. Cahalon, H. Shori, S. Bakalash, V. Litvak, S. Lev, O. Lider, M. Schwartz, *A disaccharide derived from chondroitin sulphate proteoglycan promotes central nervous system repair in rats and mice*, **Eur J Neurosci**, 20:8 (2004) 1973–1983.
- [90] C. Mitchell, M. Navison, L.F. Jackson, R. Fox, D.C. Lee, J.S. Campbell, N. Fausto *Heparin binding epidermal growth factor links hepatocyte priming with cell cycle progression during liver regeneration*, **J Biol Chem**, 280:4 (2005) 2562–2568.
- [91] T.F. Smetsers, E.M. van de Westerlo, G.B. ten Dam, I.M. Overes, J. Schalkwijk, G.N. van Muijen, T.H. van Kuppevelt, *Human single-chain antibodies reactive with native chondroitin sulphate detect chondroitin sulphate alterations in melanoma and psoriasis*, **J Invest Dermatol**, 122:3 (2004) 701–716.
- [92] P. Pothacharoen, S. Siriaunkgul, S. Ong-Chai, J. Supabandhu, P. Kumja, C. Wanaphirak, K. Sugahara, T. Hardingham, P. Kongtawelert, *Raised Serum Chondroitin Sulfate Epitope Level in Ovarian Epithelial Cancer*, **J Biochem**, 140:4 (2006) 517–524.
- [93] A.J. Sakko, M.S. Butler, S. Byers, B.J. Reinboth, J. Stahl, J.G. Kench, L.G. Horvath, R.L. Sutherland, P.D. Stricker, S.M. Henshall, V.R. Marshall, W.D. Tilley, D.J. Horsfall, C. Ricciardelli *Immunohistochemical level of unsulfated Chondroitin disaccharides in the cancer stroma is an independent predictor of prostate cancer relapse*, **Cancer Epidemiol Biomark Prev**, 17 (2008) 2488–2497.
- [94] P.L. De Angelis, *Methods of expressing Gram-negative glycosaminoglycan synthase genes in Gram-positive hosts*, US Patent 7642071 B2, Jan. 5, 2010.
- [95] E. Bedini, C. De Castro, M. De Rosa, A. Di Nola, A. Iadonisi, O.F. Restaino, C. Schiraldi and M. Parrilli, *A microbiological-chemical strategy to produce chondroitin Sulfate A, C*, **Angew Chem Int Ed Eng**, 50 (2011) 6160–6163.
- [96] D. Cimini, E. Carlino, A. Giovane, O. Argenzio, I.D. Iacono, M.D. Rosa, and C. Schiraldi, *Engineering a branch of the UDP-precursor biosynthesis pathway enhances the production of capsular polysaccharide in Escherichia coli O5:K4:H4*, **Biotechnol J**, 10 (2015) 1307–1315.
- [97] A. Stellavato, V. Tirino, F.De. Novellis, A.D. Vecchia, F. Cinquegrani, M. De. Rosa, C. Schiraldi, *Biotechnological Chondroitin a Novel Glycosaminoglycan*, **J Cell Biochem**, 117 (2016) 2158–2169.
- [98] D.E. Green and P.L. Deangelis, *Glycan Synthesis Identification of a chondroitin synthase from an unexpected source, the green sulfur bacterium Chlorobium phaeobacteroides*, **Glycobiology**, 27 :5 (2017) 469–476.
- [99] O.F. Restaino, I. Lauro, R. Di Nuzzo, M. De Rosa and C. Schiraldi, *New insight into chondroitin and heparosan-like capsular polysaccharide synthesis by profiling of the nucleotide sugar precursors*, **Biosci Rep**, 37 (2017) 1–12.
- [100] B. Priem, J. Peroux, P. Colin-morel, S. Drouillard and S. Fort, *Chemo-bacterial synthesis of conjugatable glycosaminoglycans*, **Carbohydr Polym**, 167 (2017) 123–128.

- [101] Z. Kang et al., *Method for do novo biosynthesis of chondroitin sulfate*. US Patent 2018 / 0135089 A1, May 17, 2018.
- [102] J.H. Nash, A. Villegas, A.M. Kropinski, R. Aguilar-Valenzuela, P. Konczyk, M. Mascarenhas, B.K. Coombes, *Genome sequence of adherent-invasive Escherichia coli and comparative genomic analysis with other E. coli pathotypes*, **BMC Genomics**, 11:1 (2010) 667.
- [103] S. Fujikawa, M. Ohmae and S. Kobayashi, *Enzymatic synthesis of chondroitin 4-sulfate with well-defined structure*, **Biomacromolecules**, 6:6 (2005) 2935–2942.
- [104] T.J. Boltje, T. Buskas and G.J. Boons, *Opportunities and challenges in synthetic oligosaccharide and glycoconjugate research*, **Nat Chem**, 1:8 (2009) 611–622.
- [105] J. Chen, Z. Zhou, Q. Li, H. Huang and H. Wang, *A microbial-enzymatic strategy for producing chondroitin sulfate glycosaminoglycans*, **Biotechnol Bioeng**, 115:20 (2018) 1–10.
- [106] D. Bianchi et al., *Biotechnological sulphated chondroitin sulphate at position 4 or 6 on the same polysaccharide chain, and process for the preparation thereof*, US Patent 9, 908, 947 B2, Mar. 6, 2018.
- [107] F. Wu, C. Zhou, D. Zhou, S. Ou, Z. Liu and H. Huang, *Immune-enhancing activities of chondroitin sulfate in murine macrophage*, **Carbohydr Polym**, 198 (2018) 611–619.
- [108] J. F. De Souza, E. F. Lessa, A. Nörnberg, M. S. Gularte, R. F. N. Quadrado and A. R. Fajardo, *Enzymatic depolymerization – An easy approach to reduce the chondroitin sulfate molecular weight*, **Process Biochem**, 74 (2018) 118–124.
- [109] J. Young et al., *Chondroitin sulfate-stabilized silver nanoparticles: Improved synthesis and their catalytic, antimicrobial and biocompatible activities*, **Carbohydr Res**, 457 (2018) 14–24.
- [110] A. D. Richard, X. Tian, M. W. El-saadi and X. Lu, *Neurobiology of Aging Erasure of striatal chondroitin sulfate proteoglycan e associated extracellular matrix rescues aging-dependent decline of motor learning*, **Neurobiol Aging**, 71 (2018) 61–71.
- [111] M. Liu, H. Du, A. R. Khan, J. Ji, A. Yu and G. Zhai, *Redox / enzyme sensitive chondroitin sulfate-based self-assembled nanoparticles loading docetaxel for the inhibition of metastasis and growth of melanoma*, **Carbohydr Polym**, 184 (2018) 82–93.
- [112] S. Bhowmick et al., *Biomimetic electrospun scaffolds from main extracellular matrix components for skin tissue engineering application–The role of chondroitin sulfate and sulfated hyaluronan*, **Mater Sci Eng C**, 79 (2017) 15–22.



- [113] M. Moto, N. Takamizawa, T. Shibuya, A. Nakamura and K. Katsuraya, *Anti-diabetic effects of chondroitin sulfate on normal and type 2 diabetic mice*, **J Funct Foods**, 40 (2018) 336–340.
- [114] Y. Hattori, A. Nakamura, S. Hanaya and Y. Miyanabe, *Effect of chondroitin sulfate on siRNA biodistribution and gene silencing effect in mice after injection of siRNA lipoplexes*, **J Drug Deliv Sci Technol**, 41 (2017) 401–409.
- [115] F. Nagano et al., *Chondroitin sulfate protects vascular endothelial cells from toxicities of extracellular histones*, **Eur J Pharmacol**, 826 (2018) 48–55.
- [116] W. Nemoto et al., *Effect of repeated oral administration of chondroitin sulfate on neuropathic pain induced by partial sciatic nerve ligation in mice*, **J Pharmacol Sci**, 137:4 (2018) 403–406.
- [117] J. Wang, L. Zhang and Z. Jin, *Separation and purification of low-molecular-weight chondroitin sulfates and their anti-oxidant properties*. **Bangladesh J Pharmacol**, 11 (2016) 61–68.
- [118] N. Lin, X. Mo, Y. Yang, and H. Zhang, *Purification and sequence characterization of chondroitin sulfate and dermatan sulfate from fishes*, **Glycoconj J**, 34:2 (2017) 241–253.
- [119] M.R. Green, J. Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012, fourth edition, 3 volumes (1890 pages).
- [120] P.Y. Lee, J. Costumbrado, C.Y. Hsu, Y.H. Kim, *Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments*, **J Vis Exp**, 62 (2012) 1-5.
- [121] R.J. Midura, V. Cali, M.E. Lauer, A. Calabro and V.C. Hascall, *Quantification of hyaluronan (HA) using a simplified fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis (FACE) procedure*, **Methods Cell Biol**, 143 (2018) 297-316.
- [122] E. Vilanova and P.A.G. Soares, *Unveiling the structure of sulfated fucose-rich polysaccharides via nuclear magnetic resonance spectroscopy*, **Curr Opin Struct Biol**, 50 (2018) 33–41.
- [123] V.H. Pomin, *Glycosaminoglycan-Protein Interactions by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy*, **Molecules**, 23:9 (2018) 1-25.
- [124] B.F. Cress, Z.R. Greene, R.J. Linhardt and M.A. Koffas, *Draft genome sequence of Escherichia coli strain ATCC 23502 (Serovar O5:K4:H4)*, **Genome Announc**, 1:2 (2013) e00046-13.
- [125] Q. Wu, A. Yang, W. Zou, Z. Duan, J. Liu, J. Chen and L. Liu, *Transcriptional engineering of Escherichia coli K4 for fructosylated chondroitin production*, **Biotechnol Prog**, 29:5 (2013) 1140–1149.
- [126] A. Trilli, I. Busiello, S. Daly, F. Bagatin, *Biotechnological production of chondroitin*, International Patent WO 2012/004063 A1, January 12 2012.

- [127] J. Krahulec, J. Krahulcova, M. Medova, V. Velebny, *Influence of KfoG on capsular polysaccharide structure in Escherichia coli K4 strain*, **Mol Biotechnol**, 30 (2005) 129–134.
- [128] P.L. DeAngelis, *Glycosaminoglycan polysaccharide biosynthesis and production: today and tomorrow*, **Appl Microbiol Biotechnol**, 94 (2012) 295–305.
- [129] D. Cimini, M. De Rosa, E. Carlino, A. Ruggiero and C. Schiraldi, *Homologous overexpression of rfaH in E. coli K4 improves the production of chondroitin-like capsular polysaccharide*, **Microb Cell Fact**, 12:46 (2013) 1-12.
- [130] D. Cimini, M. De Rosa, A. Viggiani, O.F. Restaino, E. Carlino and C. Schiraldi, *Improved fructosylated chondroitin production by kfoC overexpression in E. coli*, **J Biotechnol**, 150 (2010) 324–331.
- [131] O.F. Restaino, D. Cimini, M. De Rosa, A. Catapano, M. De Rosa and C. Schiraldi, *High cell density cultivation of Escherichia coli K4 in a microfiltration bioreactor: A step towards improvement of chondroitin precursor production*, **Microb Cell Fact**, 10 (2011) 1-10.
- [132] T.J. Wiles, R.R. Kulesus and M.A. Mulvey, *Origins and virulencemechanisms of uropathogenic Escherichia coli*, **Exp Mol Pathol**, 85 (2008) 11–19.
- [133] D. Cimini et al., *Physiological characterization and quantitative proteomic analyses of metabolically engineered E. coli K4 strains with improved pathways for capsular polysaccharide biosynthesis*, **Biotechnol Bioeng**, 115 (2018) 1801–1814.
- [134] D. Cimini, O.F. Restaino, C. Schiraldi, *Microbial production and metabolic engineering of chondroitin and chondroitin sulfate*, **Emerg Top Life Sci**, 2:3 (2018) 349-361.
- [135] H. Zhang, Y. Feng, Q. Cui and X. Song, *Expression of Vitreoscilla hemoglobin enhances production of arachidonic acid and lipids in Mortierella alpina*, **BMC Biotechnol**, 17:68 (2017) 1–10.
- [136] R. Gao, H. Deng, Z. Guan, X. Liao and Y. Cai, *Enhanced hypocrellin production via coexpression of alpha-amylase and hemoglobin genes in Shiraia bambusicola*, **AMB Express**, 8:71 (2018) 4–13.
- [137] M. Li, Y. Sun, S. Pan and W. Deng, *Engineering a novel biosynthetic pathway in Escherichia coli for the production of caffeine*, **RSC Adv**, 7 (2017) 56382–56389.
- [138] F. Sumer, B.C. Stark, M.Y. Akbas, *Efficient ethanol production from potato and corn processing industry waste using E. coli engineered to express Vitreoscilla haemoglobin*, **Environ Technol**, 36:18 (2015) 2319–2327.

- [139] T. Sar, G. Seker, A. Gokce, B.C. Stark, M. Yesilcimen, *Repeated batch fermentation of immobilized E. coli expressing Vitreoscilla hemoglobin for long-term use*, **Bioengineered**, 8:5 (2017) 651–660.
- [140] W. Wu, X. Guo, M. Zhang, Q. Huang, F. Qi, J.Z. Huang, *Enhancement of L-phenylalanine production in Escherichia coli by heterologous expression of Vitreoscilla hemoglobin*, **Biotechnol Appl Biochem**, 65:3 (2017) 476–483.
- [141] R. Mora-lugo, M. Madrigal, V. Yelemane, *Improved biomass and protein production in solid-state cultures of an Aspergillus sojae strain harboring the Vitreoscilla hemoglobin*, **Appl Microbiol Biotechnol**, 99 (2015) 9699–9708.
- [142] T. Mu, M. Yang, J. Zhao, M. Mohammed, *Improvement of desulfurizing activity of haloalkaliphilic Thiobacillus versutus SOB306 with the expression of Vitreoscilla hemoglobin gene*, **Biotechnol Lett**, 39:3 (2017) 447–452.
- [143] W. Han et al., *Preparation and structural characterization of regioselective 4-O/6-O-desulfated chondroitin sulfate*, **Carbohydr Res**, 460 (2018) 8–13.
- [144] D. Cimini, I. Dello Iacono, E. Carlino, R. Finamore, O.F. Restaino and P. Diana, *Engineering S. equi subsp. zooepidemicus towards concurrent production of hyaluronic acid and chondroitin biopolymers of biomedical interest*, **AMB Express**, 7:61 (2017) 1-11.

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı:** Esra Nezafed ÜLKE  
**Doğum yeri ve tarihi:** Malatya- 07.05.1989  
**Adres:** Derviş Paşa Mah. Alparslan Türkeş  
Bulv. 27 Ağustos Piyade Loj. No:25  
Daire:3 Afyon/Merkez  
**E-posta:** esraaguclu@gmail.com

## EĞİTİM BİLGİLERİ

**Lisans:** İnönü Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü (2004-2008)  
**Yüksek Lisans:** Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Bil. Enst., Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı (2010-2011: İnönü Üniversitesine geçiş)  
İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enst., Biyoloji Anabilim Dalı (2011-2013)  
**Pedagojik Formasyon:** İnönü Üniversitesi, Eğitim Fakültesi (2018)  
**Doktora:** İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enst., Biyoloji Anabilim Dalı (2013-2019)

## BİLİMSEL SUNUMLAR/YAYINLAR

- Erenler, Ş., Ülke, E., Aliyeva, A. (2017). Dirençli Bakteri Oluşumuna karşı Biyoteknolojik Mücadelede bir Deneme: Deterjan Atık Suyunun MYH Sisteminde Kullanılması. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi*, **15** (2), 6-13.
- Erenler, A.Ş., Ülke, E. (2018). Mikrobiyal Yakıt Hücre Teknolojisini Kullanarak Gıda Endüstrisi Atıklarından Elektrik Enerjisi Üretimi. *Batman University Journal of Life Sciences*, Volume 8, Issue 2/2.
- Erenler, A.Ş., Ülke, E. (2019). Design of High-Performance Microbial Fuel Cell With *Enterobacter aerogenes* Carrying The *Vitreoscilla* Hemoglobin Gene. *Fresenius Environmental Bulletin*, **28** (7), 5155-5162.
- Erenler, A.S., Geckil, H., Bay Karabulut, A., Akpolat, N., Sevimli, R., Ülke, E and Aliyeva, A. (2019). Cloning and Expression *vgb-kfo* Genes in *E. coli* and Microbial Chondroitin Sulfate Production. *Sci. Adv. Mater.*, **11**, 1745-1754.

- Erenler, A.Ş., Güçlü, E. (2016). *Ea [pUC8:15] Suşunun Kullanıldığı Mikrobiyal Yakıt Hücresinde Çeşitli Elektrodların Performans Değerlendirmesi*, 23. Ulusal Biyoloji Kongresi, Poster, 5-9 Eylül, Gaziantep Üniversitesi, Gaziantep.
- Erenler, A., Güçlü, E. (2013). *Industrial Waste Usage in Microbial Fuel Cell*, ICOEST Kapadokya Enerji Kongresi, Poster, 18-21 Haziran, Nevşehir Üniversitesi, Kapadokya.
- Erenler, A.Ş., Ülke, E., Aliyeva, A. (2017). *Application of an Alternative Recombinant System for Chondroitin Sulfate Synthesis*, 5th International Symposium on Innovative Technologies in Engineering and Science, 29-30 Eylül, Baku, Azerbaijan.
- Erenler, A.Ş., Ülke, E., Aliyeva, A., (2017). *Assessment of Microbial Chondroitin NMR Results*, Joint Science Congress of Materials and Polymers, 25-28 Ağustos, Ohrid, Macedonia.
- Erenler, A.Ş., Ülke, E., Aliyeva, A., (2017). *Investigation of Biochemical Characterization of Microbial Chondroitin Sulphate Based Hydrogels*, Joint Science Congress of Materials and Polymers, 25-28 Ağustos, Ohrid, Macedonia.
- Erenler, A.Ş., Ülke, E., Aliyeva, A. (2017). *Kondroitin Sülfatın Mikrobiyal Yakıt Pili Sisteminde Etkinliğinin Araştırılması*, International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies, 26-29 Nisan, İstanbul.
- Erenler, A.Ş., Ülke, E., Aliyeva, A. (2017). *Kişiyeye özel Kondroitin Sülfat Preparatları ile Osteoartrit Tedavisi Yaklaşımı*, International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies, 26-29 Nisan, İstanbul.
- Erenler, A.Ş., Aliyeva, A., Ülke, E. (2017). *Karboksimetil Selüloz bazlı kondroitin Sülfat katkılı Doğal Hidrojellerin Biyokimyasal Karakterizasyonunun Araştırılması*, International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies, 26-29 Nisan, İstanbul.
- Erenler, A.Ş., Güçlü, Ülke, E.N. (2016). *Electricity generation in a microbial fuel cell run by Enterobacter aerogenes carrying the Vitreoscilla hemoglobin gene*, 1st International Mediterranean Science and Engineering Congress (IMSEC), 26-28 Ekim, Çukurova Üniversitesi, Adana.
- Erenler, A.Ş., Sevimli, R., Karabulut, A., Akpolat, N., Aliyeva, A., Ülke, E. (2018). *Mikrobiyal Kondroitin Sülfat Katkılı Hidrojellerin İlaç Salım Etkinliğinin Araştırılması*, Uluslararası Katılımlı VII. Polimer Bilim ve Teknoloji Kongresi, 9-12 Eylül, Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir.
- Erenler, A.Ş., Sevimli, R., Karabulut, A., Akpolat, N., Aliyeva, A., Ülke, E. (2018). *Mikrobiyal Kondroitin Sülfat Bazlı Hidrojellerin Şişme Potansiyeli ve Yapısal Karakterizasyon Özelliklerinin Araştırılması*, Uluslararası Katılımlı VII.

Polimer Bilim ve Teknoloji Kongresi, 9-12 Eylül, Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir.

*Kondroitin sentezinden sorumlu kfoA, kfoC, kfoF genlerinin Vitreoscilla hemoglobin geni ile ortak ifade edildiği rekombinant bir sistem kullanılarak mikrobiyal Kondroitin Sülfat üretimi ve Osteoartritteki etkinliğinin araştırılması.* (2016-2018). (TUBİTAK 215S861 nolu araştırma projesi, bursiyer)

ÜLKE Esra Nezafed. Zeytin Karasuyundan Elektrik Üretimi (5. Uluslararası Gıda Ar-Ge Proje Pazarı, Proje Yürütücüsü, 2017)

Güçlü E. (2013). *Enterobacter aerogenes ve Rekombinant Suşlarında Mikrobiyal Yakıt Pili Uygulaması.* Yüksek lisans tezi. (Bilimsel araştırma projesi, 2011/119) İnönü Üniversitesi, Malatya.

Mutant G Protein Eşlikli Reseptörler ve Neden Oldukları Hastalıklar (Cumhuriyet Üniversitesi, Seminer, 2011)

Mikrobiyal Hidrojen Enerjisi ve Yakıt Pili Teknolojisi (İnönü Üniversitesi, Seminer, 2012)

Üç boyutlu Biyoyazıcı Teknolojisi (İnönü Üniversitesi, Seminer, 2015)

Biyoyakıt Teknolojisi (İnönü Üniversitesi, Seminer, 2015)