

**T.C.  
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***VITREOSCILLA* HEMOGLOBİNİN MİKROBİYAL KONDROİTİN VE  
KONDROİTİN SÜLFAT ÜRETİMİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Ahmet Faruk CEYLAN**

**Biyoloji Anabilimdalı**

**Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ayşe Şebnem ERENLER**

**OCAK 2022**

**T.C.  
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***VITREOSCILLA* HEMOGLOBİNİN MİKROBİYAL KONDROİTİN VE  
KONDROİTİN SÜLFAT ÜRETİMİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Ahmet Faruk CEYLAN  
(36183611019)**

**Biyoloji Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ayşe Şebnem ERENLER**

**OCAK 2022**

## TEŐEKKÖR VE ÖNSÖZ

Mütevaziliđi ve hoşgörüsüyle bu satırlara sığmayacak Danışman Hocam Sayın Doç. Dr. Ayşe şebnem ERENLER'e,

Araőtırmamın her aőamasındaki katkıları için, birlikte çalışma imkanı bulmuő olmaktan onur ve mutluluk duyduğum Sayın Tuba ÜNVER'e,

Aileme,

FYL-2020-1961 No'lu yüksek lisans tez araştırma projemde maddi desteği sağlayan Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne,

teşekkür ederim.



## ONUR SÖZÜ

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum “*Vitreoscilla* Hemoglobinin Mikrobiyal Kondroitin ve Kondroitin Sülfat Üretimine Etkisinin Araştırılması” başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığına ve yararlandığım bütün kaynakların hem metin içinde hem de kaynakçada yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım

Ahmet Faruk CEYLAN



## İÇİNDEKİLER

|  |           |
|--|-----------|
| TEŞEKKÜR VE ÖNSÖZ .....                          | iii       |
| ONUR SÖZÜ .....                                  | iv        |
| İÇİNDEKİLER.....                                 | v         |
| ŞEKİLLER DİZİNİ.....                             | vi        |
| ÇİZELGELER DİZİNİ.....                           | vii       |
| ŞİMGELER VE KISALTMALAR.....                     | viii      |
| ÖZET .....                                       | ix        |
| ABSTRACT .....                                   | x         |
| <b>1. GİRİŞ.....</b>                             | <b>1</b>  |
| 1.1 Ekstrasellüler Matriks.....                  | 2         |
| 1.2 Proteoglikanlar .....                        | 3         |
| 1.3 Glikozaminoglikanlar (GAG).....              | 4         |
| 1.4 Kondroitin Sülfat .....                      | 7         |
| 1.5 Mikrobiyal Polisakkaritler.....              | 9         |
| 1.6 Mikrobiyal Kondroitin Sülfat .....           | 10        |
| 1.6.1 Mikrobiyal kondroitin sülfat üretimi ..... | 11        |
| 1.7 Kondroitin Kaynakları.....                   | 13        |
| 1.8 Vitreoscilla Hemoglobin .....                | 16        |
| <b>2. MATERYAL VE YÖNTEM .....</b>               | <b>19</b> |
| 2.1 Kullanılan Malzemeler .....                  | 19        |
| 2.2 Kullanılan Cihazlar.....                     | 19        |
| 2.3 Deneyde Kullanılan Mikroorganizmalar .....   | 20        |
| 2.4 Kullandığımız Besiyeri.....                  | 20        |
| 2.5 Çalışmada Kullandığımız Çözeltiler .....     | 20        |
| 2.6 Kullanılan Plazmidler .....                  | 21        |
| 2.7 Mikrobiyal Kondroitin Sülfat Üretimi.....    | 24        |
| 2.7.1 Kondroitin Sülfatlama İşlemi .....         | 25        |
| 2.7.2 Membran aktivasyonu .....                  | 26        |
| 2.8 HPLC Analizi .....                           | 26        |
| 2.9 NMR Analizi .....                            | 27        |
| 2.10 Spektrofotometrik Analiz .....              | 27        |
| 2.11 FT-IR Analizi .....                         | 27        |
| <b>3. ARAŞTIRMA VE BULGULAR .....</b>            | <b>28</b> |
| 3.1 Kondroitin Sülfat Üretimi.....               | 28        |
| 3.2 Spektrofotometrik Analiz Sonuçları .....     | 28        |
| 3.3 NMR Sonuçları.....                           | 29        |
| 3.4. HPLC Sonuçları.....                         | 32        |
| 3.5 FT-IR Sonuçları.....                         | 35        |
| <b>4. TARTIŞMA.....</b>                          | <b>39</b> |
| <b>5. SONUÇ .....</b>                            | <b>42</b> |
| <b>KAYNAKÇA.....</b>                             | <b>44</b> |
| <b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>                            | <b>49</b> |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|   |    |
|---|----|
| Şekil 1.1: Ekstrasellüler Matriks Bileşenleri.....  | 2  |
| Şekil 1.2: Proteoglikanların çeşitleri .....  | 4  |
| Şekil 1.3: Glikozaminoglikan yapıları .....   | 5  |
| Şekil 1.4: Glikozaminoglikanların sentez aşamaları.....   | 6  |
| Şekil 1.5: Kondroitin Sülfat'ın bileşik türleri gösterilmektedir .....  | 8  |
| Şekil 1.6: Gram negatif ve Gram pozitif Bakterilerinde glikokonjugat.....   | 10 |
| Şekil 1.7: <i>E. coli</i> kapsüler polisakkarit üretimi ve kondroitin oluşumu.....  | 11 |
| Şekil 1.8: <i>Vitreoscilla stercoraria</i> 'da mevcut VHB'in 3 boyutlu yapısı.....  | 17 |
| Şekil 2.1: pETM6-PACF plazmidi.....   | 22 |
| Şekil 2.2: pUC8:15 plazmidinin fiziki haritası .....  | 23 |
| Şekil 2.3: pETM6-PACF- <i>vgb</i> plazmidinin fiziki haritası .....   | 24 |
| Şekil 3.1: <i>E. coli</i> pETM6-PACF üreme eğrisi .....   | 28 |
| Şekil 3.2: <i>E. coli</i> pETM6-PACF- <i>vgb</i> üreme eğrisi .....   | 29 |
| Şekil 3.3: <i>E.coli</i> pETM6-PACF- <i>vgb</i> suşuna ait NMR sonuçları .....  | 30 |
| Şekil 3.4: <i>E.coli</i> pETM6-PACF NMR sonuçları .....   | 31 |
| Şekil 3.5: Sığır trakesi kaynaklı kontrol ticari KS'ye ait NMR sonuçları .....  | 32 |
| Şekil 3.6: <i>E.coli</i> pETM6-PACF- <i>vgb</i> HPLC grafiği .....  | 33 |
| Şekil 3.7: <i>E.coli</i> pETM6-PACF HPLC grafiği .....  | 34 |
| Şekil 3.8: Sığır trakesi kaynaklı kontrol ticari KS'ye ait HPLC analiz sonucu .....   | 34 |
| Şekil 3.9: a) <i>E.coli</i> pETM6-PACF kaynaklı KS b) <i>E.coli</i> pETM6-PACF- <i>vgb</i> kaynaklı<br>KS c) Ticari KS FT-IR analiz sonuçları .....                           | 35 |
| Şekil 3.10: a) <i>E.coli</i> pETM6-PACF kaynaklı KS b) <i>E.coli</i> pETM6-PACF- <i>vgb</i> kaynaklı<br>KS c) Ticari KS Termogravimetrik Analiz Sonuçları .....               | 36 |
| Şekil 3.11: a) <i>E.coli</i> pETM6-PACF kaynaklı KS b) <i>E.coli</i> pETM6-PACF- <i>vgb</i> kaynaklı<br>KS c) Ticari KS Diferansiyel termal analiz sonuçları .....            | 37 |
| Şekil 3.12: a) <i>E.coli</i> pETM6-PACF kaynaklı KS b) <i>E.coli</i> pETM6-PACF- <i>vgb</i> kaynaklı<br>KS c) Ticari KS Diferansiyel termal kalorimetre analiz sonuçları..... | 38 |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

|   |    |
|---|----|
| <b>Çizelge 1.1:</b> KS üreten mikroorganizmalar.....                                    | 13 |
| <b>Çizelge 1.2:</b> Kondroitin sülfat (KS) türlerinin doğal kaynaklarına örnekler ..... | 15 |
| <b>Çizelge 2.1:</b> Sıvı kültürümüzde oluşturulan içerik (2 L besiyeri için).....       | 20 |
| <b>Çizelge 2.2:</b> Kondroitin sentezi için kullanılan parçalama tamponu .....          | 20 |
| <b>Çizelge 2.3:</b> HPLC için kullandığımız parçalama tamponu bileşimi.....             | 21 |
| <b>Çizelge 2.4:</b> Tris-NaCl-İmidazol stok çözeltisi bileşimi .....                    | 21 |



## SİMGELER VE KISALTMALAR

|                         |  |
|-------------------------|--|
| °C                      | Santigrat derece   |
| Rpm                     | Dakikadaki döngü sayısı  |
| g L <sup>-1</sup>       | 1 litredeki gram molekül miktarı   |
| rpm                     | Dakikada dönme sayısı  |
| GAG                     | Glikozaminoglikanlar   |
| KS                      | Kondroitin 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 rekombinantı       |
| <i>E. coli</i>          | <i>Escherichia coli</i>  |
| <i>kfoA, kfoC, kfoF</i> | <i>E. coli</i> K4 suşunun kapsüler kondroitin sentezi için görevli gen grubu |
| EPS                     | Ekzopolisakkarit   |
| LPS                     | Lipopolisakkarit   |
| KPS                     | Kapsüler Polisakkarit  |
| nm                      | Nanometre  |
| MurNAc                  | N-Asetilmuramik asit   |
| aPTT                    | aktive edilmiş protromboplastin testi  |
| PTT                     | Protrombin zamanı testi  |
| TT                      | Trombin Testi  |
| GlcNAc                  | N-Asetilglukozamin   |
| UDP                     | Üridin difosfat  |
| GlcN                    | Glukozamin   |
| Kbp                     | Kilobaz çifti(kilobase pair)   |
| bp                      | Baz çifti (base pair)  |
| NMR                     | Nükleer Manyetik Rezonans  |
| HPLC                    | Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi                                      |
| MS                      | Kütle Spektrometresi   |



## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### *VITREOSCILLA* HEMOGLOBİNİN MİKROBİYAL KONDROİTİN VE KONDROİTİN SÜLFAT ÜRETİMİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Ahmet Faruk CEYLAN

İnönü Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

49+viii sayfa

2022

Danışman: Doç. Dr. Ayşe Şebnem ERENLER

Günümüzde, hayvansal ürünlerin taşıdığı potansiyel riskler, biyoteknolojik metodlarla üretilen mikrobiyal kaynakları cazip hale getirmektedir. Tıp, veterinerlik, eczacılık ve kozmetik sektöründe çeşitli uygulamalarda kullanılan kondroitin sülfatın üretiminde kullanılan geleneksel kaynak ve yöntemlerin dezavantajları, mikrobiyal üretimi önemli bir alternatif haline getirmiştir. Çalışmamızda, ekibimizce üretilen mikrobiyal kondroitin sülfatın üretim düzeyine *vgb* geninin etkisi tartışılmıştır.

Araştırmamızda, ekibimizce oluşturulan (pETM6-PACF-*vgb*) plazmidinin patojenik olmayan *E. coli* bakterisine transferi ile oluşturulmuş olan *E. coli* pETM6-PACF-*vgb* suşu ve *vgb* genini taşımayan pETM6-PACF plazmidinin bulunduğu *E. coli* pETM6-PACF bakterisi ile kondroitin üretimi gerçekleştirilmiştir. Son aşamada kondroitine selektif sülfasyon yöntemi ile sülfatlama işlemi uygulanmış ve kondroitin sülfat üretilmiştir. Üretilen Kondroitin Sülfatın moleküler yapısı yine HPLC ve NMR analizleri neticesinde kanıtlanmıştır.

Çalışmamız, *vgb* geninin bakteri büyüme karakteristiklerindeki destekleyici etkisini kanıtlamakta ve *vgb* geni içeren suşların MKS üretimi için sağladığı avantajları da ortaya koymaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** *Vitreoscilla*, *vgb*, kondroitin, kondroitin sülfat, mikrobiyal üretim

## ABSTRACT

Master Thesis

### INVESTIGATION OF THE EFFECT OF VITREOSCILLA HEMOGLOBIN ON MICROBIAL CHONDROITIN AND CHONDROITIN SULFATE PRODUCTION

Ahmet Faruk CEYLAN

Inonu University  
Graduate School of Nature and Applied Sciences  
Department of Biology

49+viii Page

2022

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ayşe Şebnem ERENLER

Today, the potential risks of animal products make microbial resources produced by biotechnological methods attractive. The disadvantages of traditional sources and methods used in the production of chondroitin sulfate, which is used in various applications in medicine, veterinary, pharmacy and cosmetics sectors, have made microbial production an important alternative. In our study, the effect of the *vgb* gene on the production level of microbial chondroitin sulfate produced by our team was discussed.

In this study, *E. coli* pETM6-PACF-*vgb*<sup>+</sup> strain was formed by transferring (pETM6-PACF-*vgb*<sup>+</sup>) plasmid to non-pathogenic *E. coli* bacteria, and *E. coli* pETM6-PACF bacteria with plasmid pETM6-PACF without the *vgb* gene were used for chondroitin production. In the last stage, sulfation was applied to chondroitin using the selective sulfation method, and chondroitin sulfate was produced. The molecular structure of the produced Chondroitin Sulfate was proven using HPLC and NMR analyzes.

Our study proves the supportive effect of the *vgb* gene on bacterial growth characteristics and also reveals the advantages of strains containing the *vgb* gene for MCS production.

**Keywords:** Vitreoscilla, *vgb*, microbial chondroitin, chondroitin sulfatemicrobial production

## 1. GİRİŞ

Mikrobiyal polisakkaritler ile ilgili çalışmalar, bazı patojenik bakterilerin kapsül yapılarının ökaryotik glikozaminoglikanlara benzemesi ve bu kapsüllerden glikozaminoglikan (GAG) benzeri polimerler üretilmesi nedeniyle önemli görülmektedir (Wang ve diğerleri, 2016). Mevcut yöntemlerle KS üretimi için, sığır trakesi, domuz burun septumu, horoz ibiği ve köpek balığı yüzgeci gibi hayvansal kaynaklar kullanıldığı bilinmektedir (Abdallah ve diğerleri 2020).

Bakteriyel kapsüller, bakterilerin dış yüzeyinde bulunan ve bağışıklık yanıt oluşumunu sağlayan koruyucu kaplamalar olarak tanımlanmaktadır (Cress ve diğerleri, 2014). Kapsüller polisakkaritlerin (KPS) moleküler bileşimleri, organizmalar arasında ve hatta tek bir tür içindeki suşlar arasında bile büyük ölçüde farklılık gösterdiği belirtilmiştir. Ancak bu çeşitliliğe rağmen, farklı düzenlerden bazı türlerin özdeş KPS yapılarını biyosentezlediği gösterilmiştir. Mikrobiyal polisakkaritlerin bu benzerliği hayvansal üretime ciddi bir alternatif olarak görülmektedir (Wang ve diğerleri, 2016).

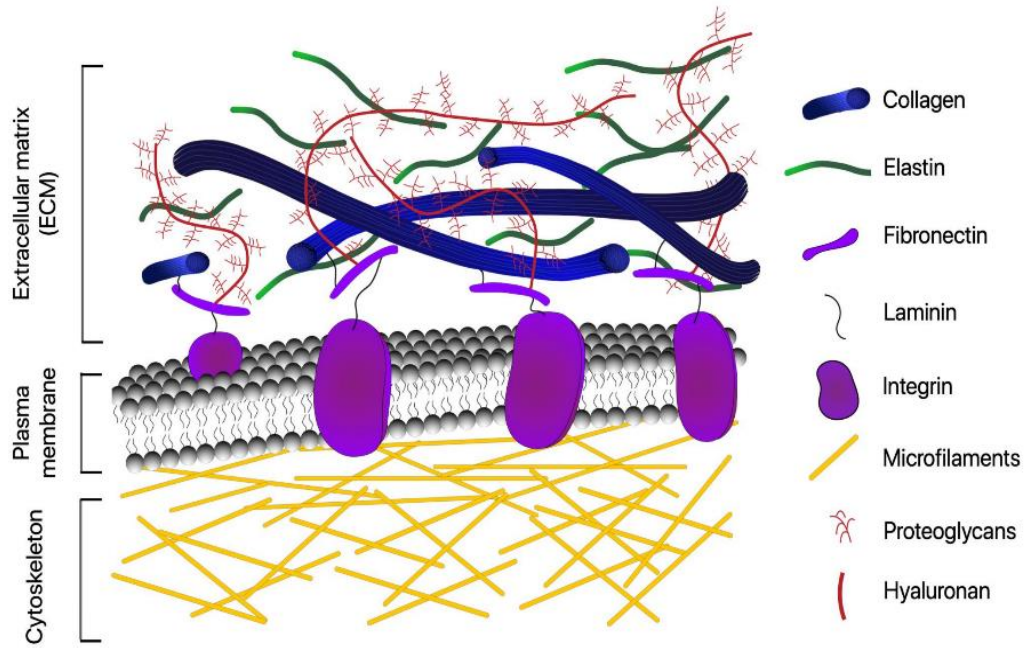
*E.coli* K4 suşunda sentezlenen kapsüller polisakkarit, kondroitin benzeri bir yapı göstermekte ve bu yapıdan çeşitli işlemlerle kondroitin elde edilebilmektedir (Koffas ve diğerleri, 2018). Mikrobiyal üretim; metabolik mühendislik yolu ile basit karbon kaynaklarından katma değerli nutrosötiklerin üretimi için çevre dostu bir alternatif yaklaşım olarak geliştirilmektedir (Wang ve diğerleri, 2016;Zhou ve diğerleri, 2018). Bu şekilde ekolojik dengeye saygılı, viral ve prionik kaynaklara göre daha güvenli KS üretimi gerçekleştirilebildiği belirtilmektedir (Volpi, 2019).

Kondroitin Sülfat (KS), neredeyse tüm omurgasızlarda ve omurgalılarda (ve dolayısıyla insanlarda) bol miktarda bulunan ve birçok biyolojik süreçte yer alan doğal bir biyomakromoleküldür (Volpi, 2019). Hücre dışı matriksin (ECM) ana bileşeni olarak hücre dışı mikro ortamda, besin dağıtımı, sinoviyal sıvının ve hatta kıkırdağın bozulmasından sorumlu enzimlerin inhibisyonu ve yeni eklem kıkırdağının oluşumunun arttırılması gibi çeşitli işlevleri vardır (Koffas ve diğerleri, 2018). KS, ileri düzeyde biyofiziksel özelliklerinden dolayı tıpta, veterinerlikte, ilaçlarda ve kozmetik ürünlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (He ve diğerleri, 2017).

Tez çalışmamızda KS' nin mikrobiyal üretiminde pETM6-PACF ve pUC8:15 plazmidinin taşıdıkları *kfoA*, *kfoC*, *kfoF* ve *vgb* gen bölgelerinin pETM6-PACF plazmidi üzerinde ortak ifadesi amacı ile oluşturulan plazmidin klonlandığı *E.coli* pETM6-PACF-*vgb* suşu ve *vgb* genini içermeyen *E.coli* pETM6-PACF suşu kullanılmıştır. Çalışmamızda kondroitin ve MKS üretimi üzerine *vgb* geninin etkisinin tartışılması amaçlanmaktadır.

## 1.1 Ekstrasellüler Matriks

Hücre dışı matriks (ECM), tüm doku ve organlarda bulunan hücresel olmayan bileşendir (Frantz ve diğerleri, 2010). ECM; Biyolojik süreçlerin düzenlenmesi, fiziksel koruma ve sinyal moleküllerinin; göç, proliferasyon, farklılaşma, gibi hücre davranışlarının yönlendirilmesi ve kolaylaştırılması için aktif bir rol oynayan hücrelerin canlılığının kaynağı olan çok boyutlu bir yapı olarak kabul edilmektedir (Üçgül ve diğerleri, 2018).



**Şekil 1.1:** Ekstrasellüler Matriks Bileşenleri (Poole, Joshua J. A.,2021)

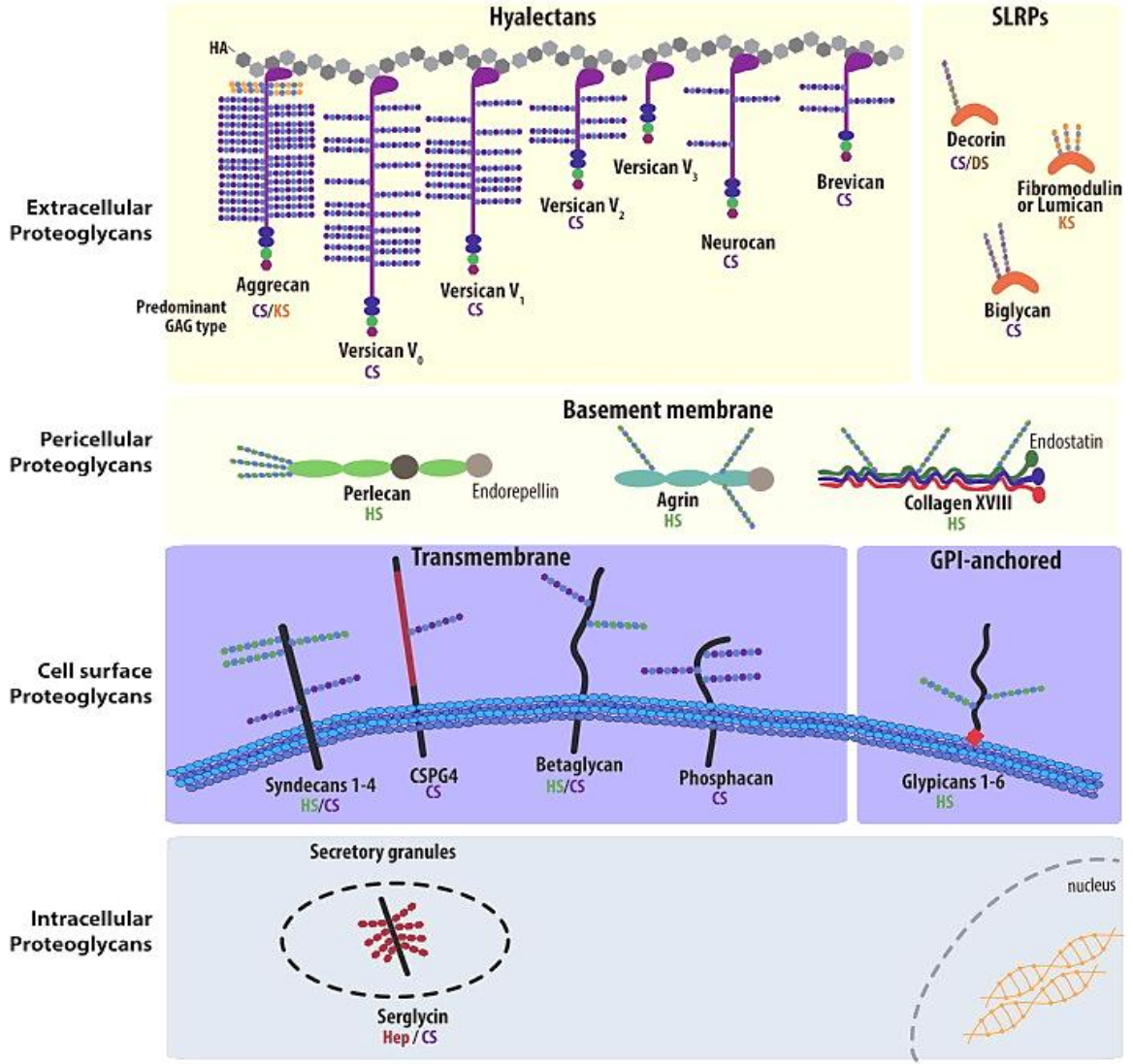
ECM' de, yüksek oranda asidik ve hidratlı moleküller olan kollajen, elastin, fibronektin (FN), lamininler, glikoproteinler, proteoglikanlar (PG'ler) ve glikozaminoglikanlar (GAG'ler) gibi lifli yapısal proteinler bulunmaktadır. ECM molekülleri birbirine bağlı karmaşık üç boyutlu matriks ağını (Şekil 1.1) oluşturarak birbirleriyle ilişki kurmaktadır (Mouw ve diğerleri, 2014; Theocharis ve diğerleri, 2016).

ECM moleküllerinin farklı organlarda beyin ve spinal kanalda çok az bulunurken kemik ve kıkırdakta çok fazla bulunduğu, her dokuda dokunun fonksiyonel özelliklerine göre farklı özellik taşıdığı kemik ve dişte kalsifiye (kireçleşmiş), kornea da şeffaf, tendonlarda güçlü bir ip benzeri bir yapısında olduğu belirtilmektedir (Theocharis ve diğerleri, 2016). ECM'ler normal homeostaz için çok önemlidir. Bir çok metabolik sorunun kaynağının ECM bileşenlerinin oransal anormalliklerinden kaynaklandığı belirtilmektedir (Diehl ve diğerleri, 2021).

## 1.2 Proteoglikanlar

Proteoglikanlar (PG), ECM'e gömülü olan ve bir protein çekirdeği ve protein çekirdeğine kovalent olarak bağlı bir veya daha fazla glikozaminoglikan (GAG) zinciri içeren karmaşık moleküller olarak tanımlanmıştır (Diehl ve diğerleri, 2021). Yapılarında % 95 karbonhidrat, % 5 oranında protein içerdiği belirtilmiştir (Yılmaz ve diğerleri, 2007). Proteoglikanlar, kıkırdak, beyin, intervertebral diskler, tendonlar ve kornealar gibi karmaşık matrikslerin yapısal bileşenleri olarak işlev görmektedir. Proteoglikanların işlevleri; viskoelastik özellikler sağlamak, ozmotik basıncı korumak, kolajen organizasyonunda görev almak ve kornea şeffaflığının düzenlenmesi de dahil geniş bir alanı kapsamaktadır. Proteoglikanlar hücre yüzeyindeki büyüme faktörü sinyalini modüle etmektedirler (Takemura ve diğerleri, 2020). Hücre membranı PG'leri genellikle hücre içi domeinlerinin hücre iskeleti ve kinazlardan proteinlere bağlanma yeri olarak hizmet etmesiyle hücre yapışması ve göçü ile ilişkilidir (Mellai ve diğerleri, 2020).

Proteoglikanlar hücre içi proteoglikanlar, hücre yüzeyi proteoglikanları, perisellular (bazal membran bölgesi) proteoglikanlar ve ekstrasellular proteoglikanlar olarak sınıflandırılmaktadır (Iozzo ve Schaefer, 2015). Proteoglikanların sınıflandırılması Şekil 1.2. de gösterilmiştir.

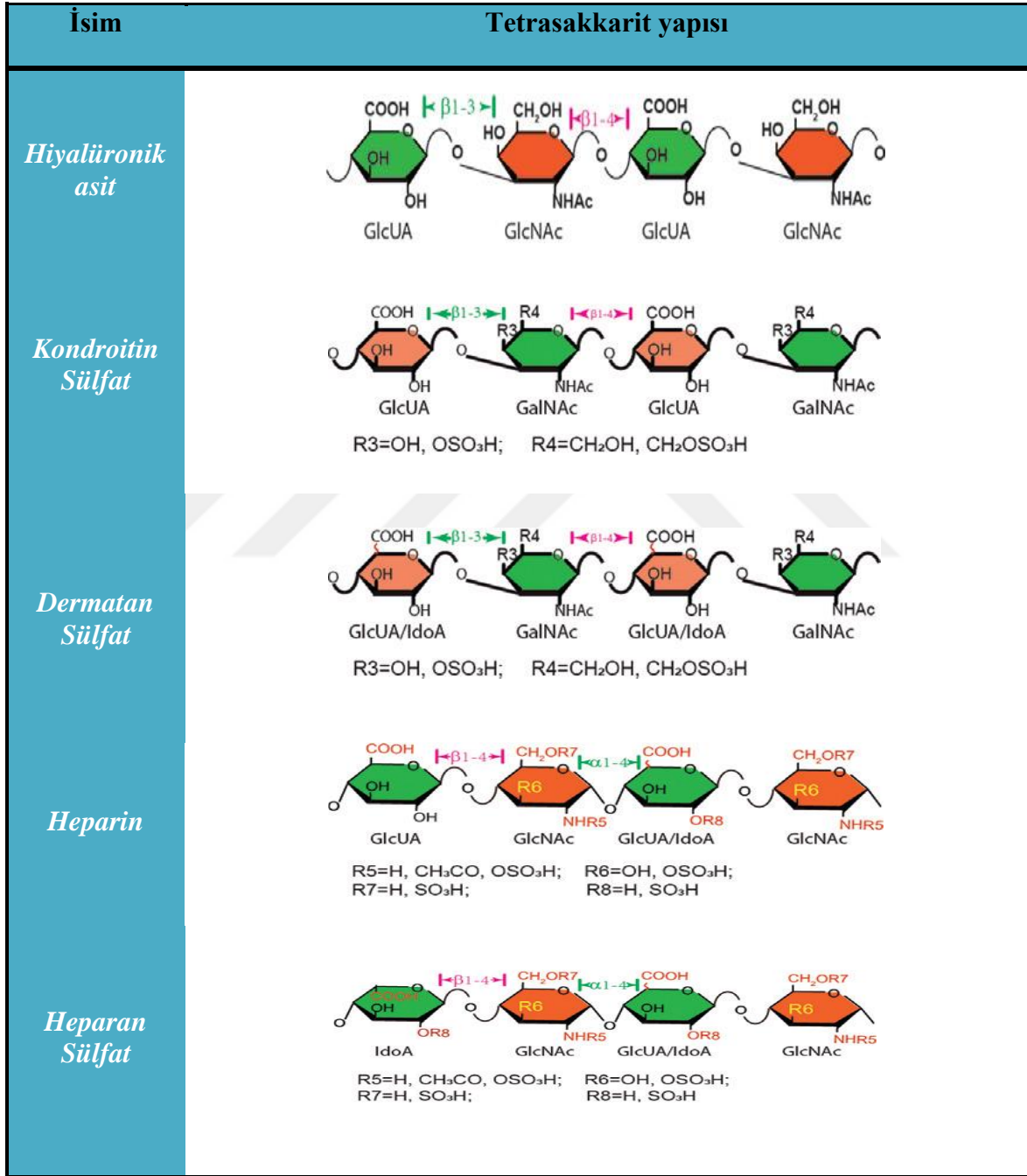


Şekil 1.2: Proteoglikanların çeşitleri (Listik ve diğerleri, 2019)

### 1.3 Glikozaminoglikanlar (GAG)

Heksosamin içeren tekrarlayan disakkarit birimlerinden oluşan doğrusal polisakkaritlerin bir sınıfı olan glikozaminoglikanlar, birçok organizmada bulunan önemli karbonhidratlardır. Omurgalılar, yapısal, tanıma, yapışma ve sinyal rollerinde glikozaminoglikanları kullanmaktadır (DeAngelis, 2002). Glikozaminoglikanlar, tekrarlayan disakkaritteki iki şeker molekülünden biri sülfatlanmış amino şekerlerdir (*N*-asetilglukozamin veya *N*-asetilgalaktozamin). Dermatan sülfatta ikinci şeker galaktoz olup, diğer glikozaminoglikanlarda üronik asittir (glukuronik veya iduronik) (Sugahara ve Kitagawa, 2000). GAG'lar, bileşiminde sülfat veya karboksil gruplarının bulunması nedeniyle negatif yük kazanmaktadır. Disakkarit moleküllerinin bileşim şekli ve sülfat gruplarının konumuna bağlı olarak, GAG'ler dört ana gruba ayrılmaktadır: (1) Hyaluronik asit, (2) Kondroitin

Sülfat (KS) ve Dermatan Sülfat (DS), (3) Heparan Sülfat ve Heparin ve (4) Keratan Sülfat'dır (Schiraldi ve diğerleri, 2010). Doğrusal sülfatlanmış GAG'ler, KS/dermatan sülfat (DS) ve HS/heparin (Hep) olarak sınıflandırılır, ilki galaktozaminoglikanlar ve sonuncusu glikozaminoglikanlardır. Her iki tür GAG zinciri, GAG-protein bağlantı bölgesi adı verilen Gal ( $\beta$ 1-3) Gal ( $\beta$ 1-4) Xyl $\beta$ 1- O aracılığıyla kendi çekirdek proteinlerine kovalent olarak bağlanmaktadır (Sugahara ve Kitagawa, 2000).

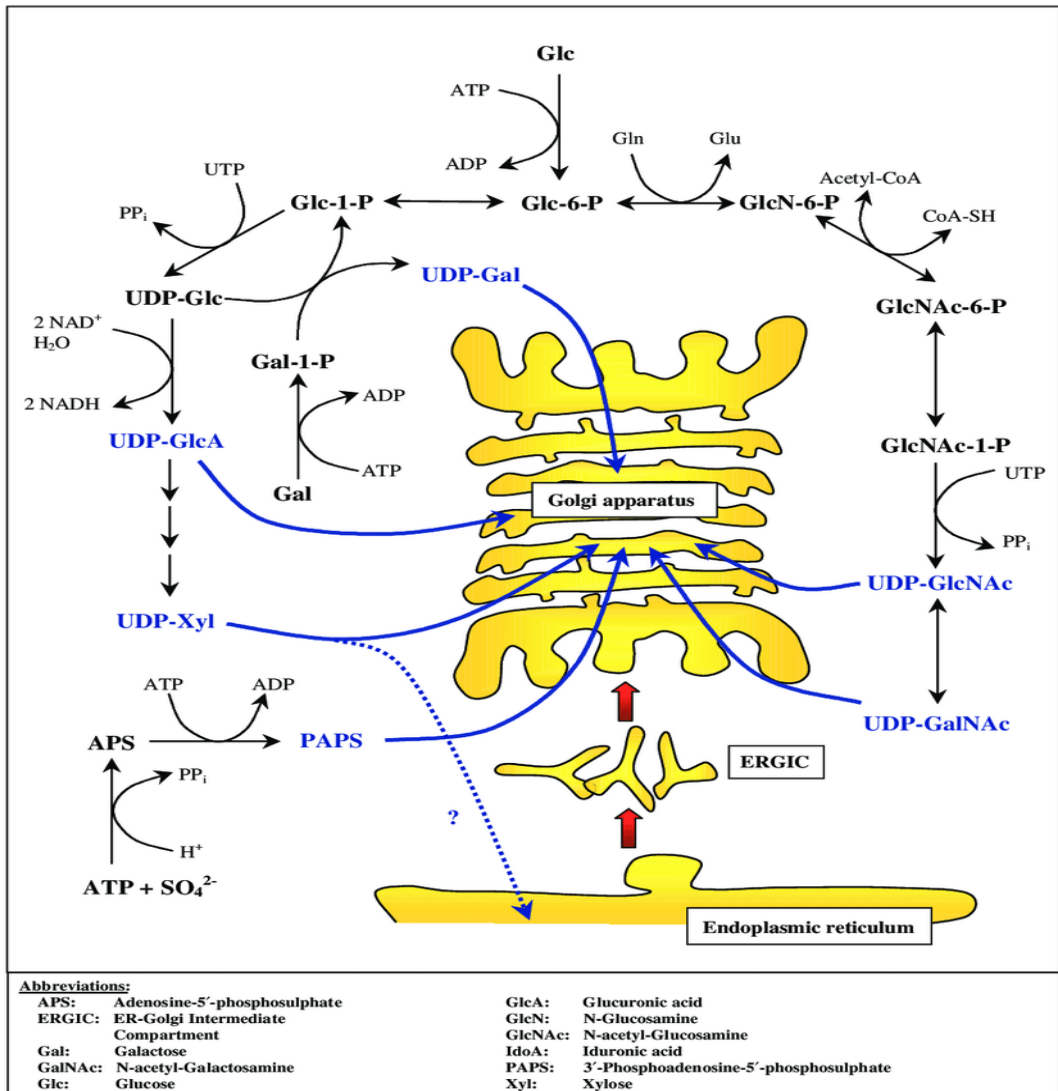


Şekil 1.3: Glikozaminoglikan yapıları (Z. Kang ve diğerleri, 2018).



GAG'lar genellikle farklı fizyolojik fonksiyonlara sahip bir proteoglikan oluşturmak için bir çekirdek proteine kovalent olarak bağlanmaktadır. Glikozaminoglikanlar zincir uzunluğuna, protein bağına, sülfatlaşma derecesine ve üronik asitlerin oranına göre farklılık göstermektedirler (DeAngelis, 2002).

Hayvan hücrelerinde, iki ana glikozaminoglikan (GAG) polisakkarit türü olan, heparan sülfat ve kondroitin sülfat, 40'tan fazla gen tarafından kodlanan enzimler tarafından polimerize ve modifiye edilebilmektedir (L. Zhang, 2010). Glikozaminoglikanların ksiloz ilavesi endoplazmik retikulumda meydana gelirken, uzama işlemi Golgi aygıtında meydana gelmektedir. (Şekil 1.4) GAG'ların sayısız fizyolojik işlevi, protein ligandı ile etkileşimleri yoluyla gerçekleştirildiği belirtilmektedir (Iozzo ve Schaefer, 2015).

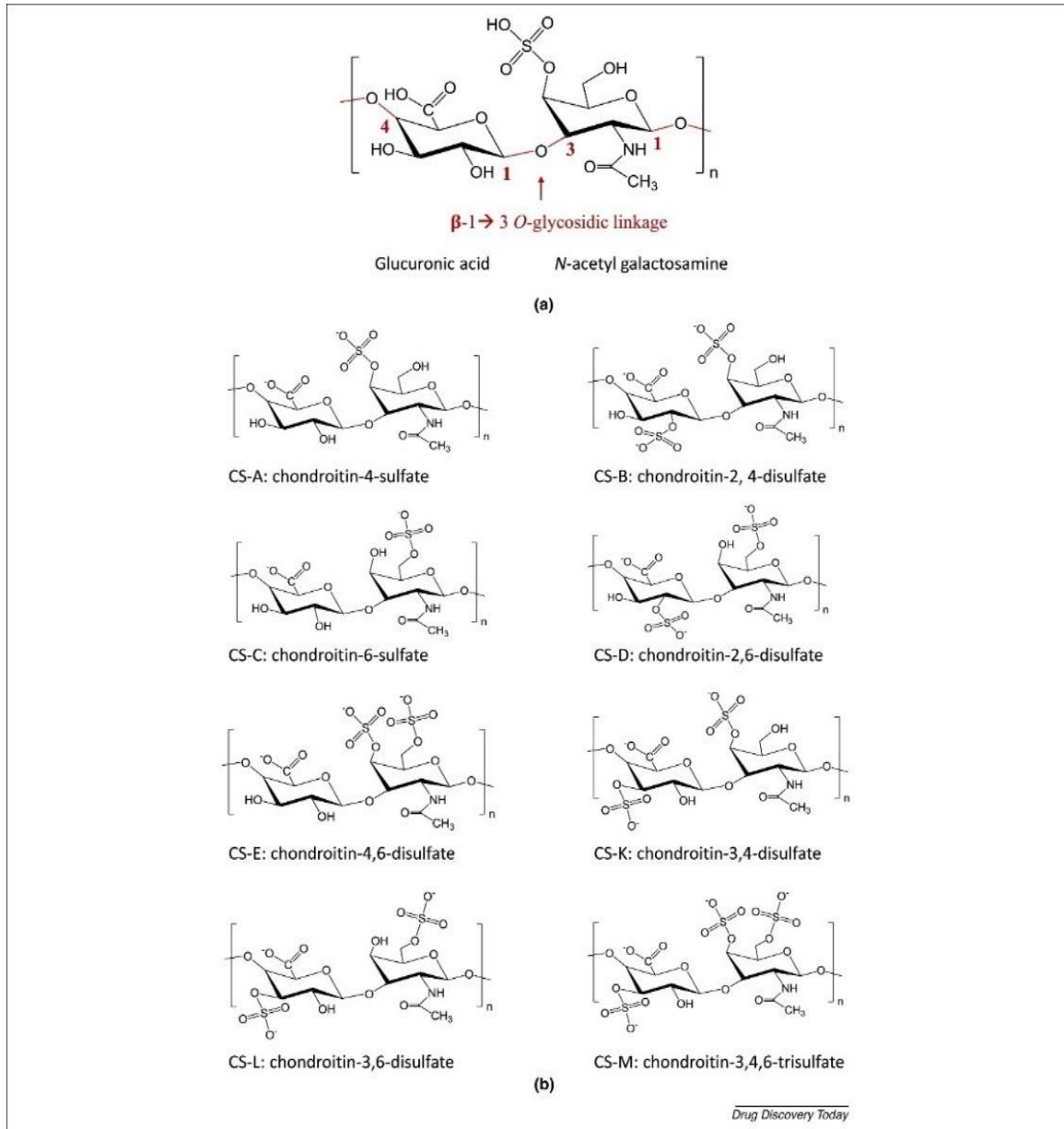


Şekil 1.4: Glikozaminoglikanların sentez aşamaları (Prydz ve Dalen, 2000).



#### 1.4 Kondroitin Sülfat

KS, ilk olarak 1913'te hiyaluronik asitten önce keşfedilmiş ve en iyi bilinen glikozaminoglikan (GAG) olmasına rağmen 2000 yılına kadar çalışmaların odak noktası olmamıştır (Koffas ve diğerleri, 2018). KS hücre dışı matriksinin önemli bir bileşenidir ve yapısal olarak *N*-asetil galaktozamin ve glukuronik asitten oluşan bir polisakkarit zincirinden oluşan sülfatlanmış bir glikozaminoglikandır (Schiraldi ve diğerleri, 2010). Bağı dokusunun önemli bir bileşeni olarak KS, vücutta doğal olarak oluşan bir moleküldür ve memeli dokularında jel benzeri bir yapıda bulunmaktadır (Badri ve diğerleri, 2021). KS, insan vücudunda en bol bulunan GAG olup hem kendi başına hem de kolajen, fibronektin ile birlikte sayısız biyolojik aktivite gerçekleştirdiği bilinmektedir. Hücre büyümesi ve gelişimi dahil olmak üzere hücrel fizyolojilerde önemli rollere sahip olduğu belirtilmiştir. Kondroitin Sülfat'ın hücre yüzeylerinde, hücre dışı matrikslerde bulunmakta olduğu ve diğer GAG'larla birlikte kemiklerde, kıkırdakta, beyinde, deride, sinir dokusunda, damarlarda ve korneada bulunduğu gösterilmiştir (Abdallah ve diğerleri, 2020a; Cai ve diğerleri, 2012; Mikami ve Kitagawa, 2013).



**Şekil 1.5:** Kondroitin Sülfat'ın bileşik türleri gösterilmektedir ( Mishra ve Ganguli, 2021).

KS, yüksek viskoziteli bir muko-polisakarittir. Tekrarlayan disakkarit birimleri ve sülfat grupları çeşitli pozisyonlarda bulunmaktadır (Khwaldia, 2018).1960'larda KS polisakaritlerinin, Glukuronik asit (GlcA)—Galaktoz (Gal)—Galaktoz (Gal)—Ksiloz (Xyl) kimyasal bileşik yapısı tanımlanmıştır (Lindahl ve diğerleri, 1966). Farklı sülfatlama modellerine göre, yapısal olarak heterojen KS dört tipe ayrılmıştır: Kondroitin Sülfat A (KSA) ; GlcA-GalNAc (4S), Kondroitin Sülfat C (KSC) ; GlcA-GalNAc (6S), Kondroitin Sülfat D (KSD); GlcA (2S)-GalNAc (6S) ve Kondroitin Sülfat E (KSE) ; GlcA-GalNAc (4S, 6S). KS zincirleri, endoplazmik retikulum ve golgide ortak bir tetrasakkarit bağlayıcı (Ksiloz-Galaktoz-Galaktoz-Glukronik asit) üzerine bir serin tortusu yoluyla protein çekirdeğine

bağlanır ve enzimler aracılığıyla KSPG zincirleri oluşturur (Badri ve diğerleri, 2021; He ve diğerleri, 2017; Schiraldi ve diğerleri, 2010)

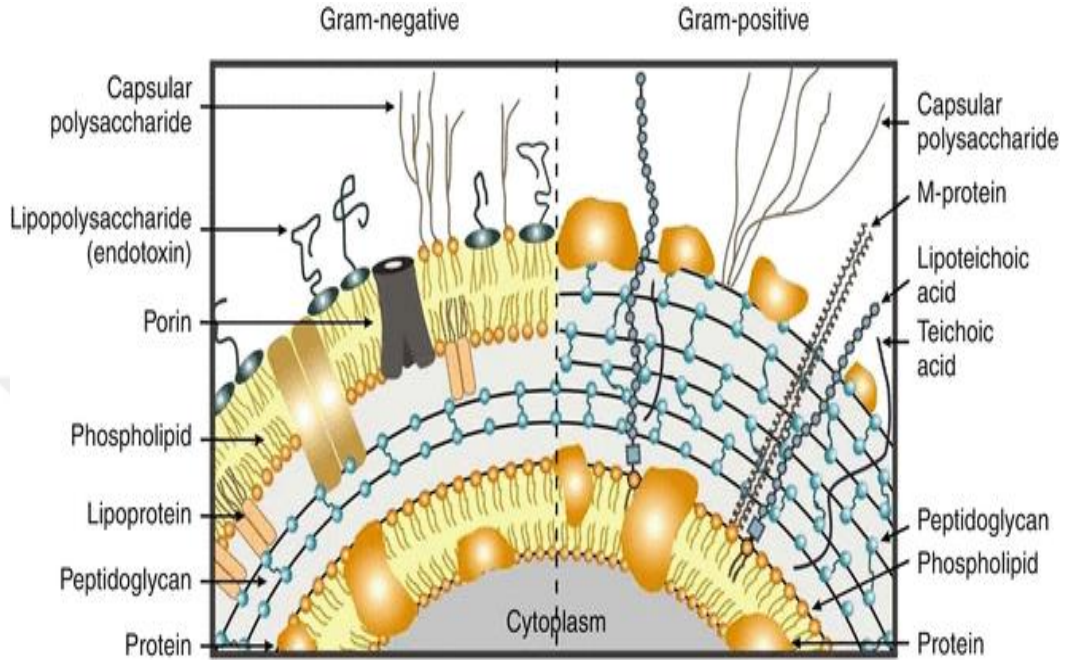
KS'in yapısı ve modifikasyon enzimlerinin ekspresyon yeteneğiyle, KS zincirleri, her bir hayvan hücresine potansiyel olarak hedef hücreye özgü bir sülfatlama modelinde, zincir uzunluğunda bulunmaktadır (Zhang, 2010). Organizmadan, organizmaya ve dokudan dokuya yapısal çeşitliliğe sahip olmakla birlikte KS, hücrelerin birbirine tutunması, hücre bölünmesi ve farklılaşması, morfogenez, organogenez ve sinirsel gibi moleküler, hücresel ve organ düzeyinde spesifik biyolojik işlevler sağlamaktadır (Schiraldi ve diğerleri, 2010; Volpi, n.d.). Kondroitin Sülfat (KS), Kondroitin Sülfat Proteoglikanlar (KSPG) hücre yüzeyinde ve hücre içi salgı granüllerinde de bulunabilmektedirler (He ve diğerleri, 2017) KS'in; büyüme faktörleri, sitokinler, kemokinler, adezyon molekülleri ve lipoproteinler gibi çok çeşitli anahtar elementlerle hücredeki sinyalleşme sürecini doğrudan veya dolaylı olarak etkileyen, sayısız fizyolojik aktivitede yer alan, çok işlevli bir sinyal molekülü ve düzenleyicisi olduğu bildirilmiştir (Ji ve diğerleri, 2020b) KSPG'lerin, büyüme faktörlerini yakalayıp kök hücrelere veya nöronal hücrelere sunarak sinir ağının oluşumunda rol oynadığı belirtilmektedir (Nemoto ve diğerleri, 2018)

### **1.5 Mikrobiyal Polisakkaritler**

Tüm canlı hücreler yüzeylelerinde karbonhidratları bulundurmaktadır. Bu yapılar, hücrelerarası etkileşimlerde ve hücrelerin çeşitli moleküllerle reaksiyonlarında yer almaktadırlar. Antikorlar, aglutininler, toksik maddeler hücreye bağlı karbonhidratlarla etkileşime girerek, sinyal iletimini veya metabolik olayları tetiklemektedir. Ökaryotik hücrelerin yüzey karbonhidratları, glikokaliks adı verilen bir yüzey tabakası oluşturan glikoproteinler, glikolipidler, proteoglikanlar, proteinler ve belirli glikoproteinlerden oluşan karmaşık bir ağ-hücre dışı matriks çoğu zaman birçok ökaryotik hücrenin temeli ve yakın komşusudur (Jann Klaus, 1987). Mikrobiyal polisakkaritler; hücre için karbon ve enerji depolamada görevli olan intraselüler polisakkaritler, hücre duvarının ayrılmaz bileşeni olarak etki gösteren, lipopolisakkarit ve teikoik asit gibi hücre yapılarının bileşeni olan yapısal polisakkaritler ve EPS'ler olarak adlandırılan ekstraselüler polisakkaritler olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır (Yılmaz ve diğerleri 2007).

Bakteriyel glikom, gram-negatif bakterilerin lipopolisakaritler (LPS, endotoksinler), gram negatif patojenlerde, flagella (ve ilişkili) kemotaksis proteinleri, fimbrial adezinler, salgılanan proteinler, lipopolisakkaritler (LPS) ve kapsüller dahil olmak üzere önemli yüzey

ve hücre dışı bileşenleri içermektedir (Willis ve Whitfield, 2013). Gram-pozitif bakterilerin hücre duvarı anyonik polisakkaritler, mikobakteriyel lipoglikanlar, kapsüller ve hücre dışı polisakkaritler (EPS) dahil olmak üzere geniş bir hücre yüzeyi polisakkaritleri, S-tabaka glikokonjugatlardan oluşmaktadır (Şekil 1.7) (Veeramachineni ve diğerleri, 2021).



**Şekil 1.6:** Gram negatif ve Gram pozitif Bakterilerinde glikokonjugat

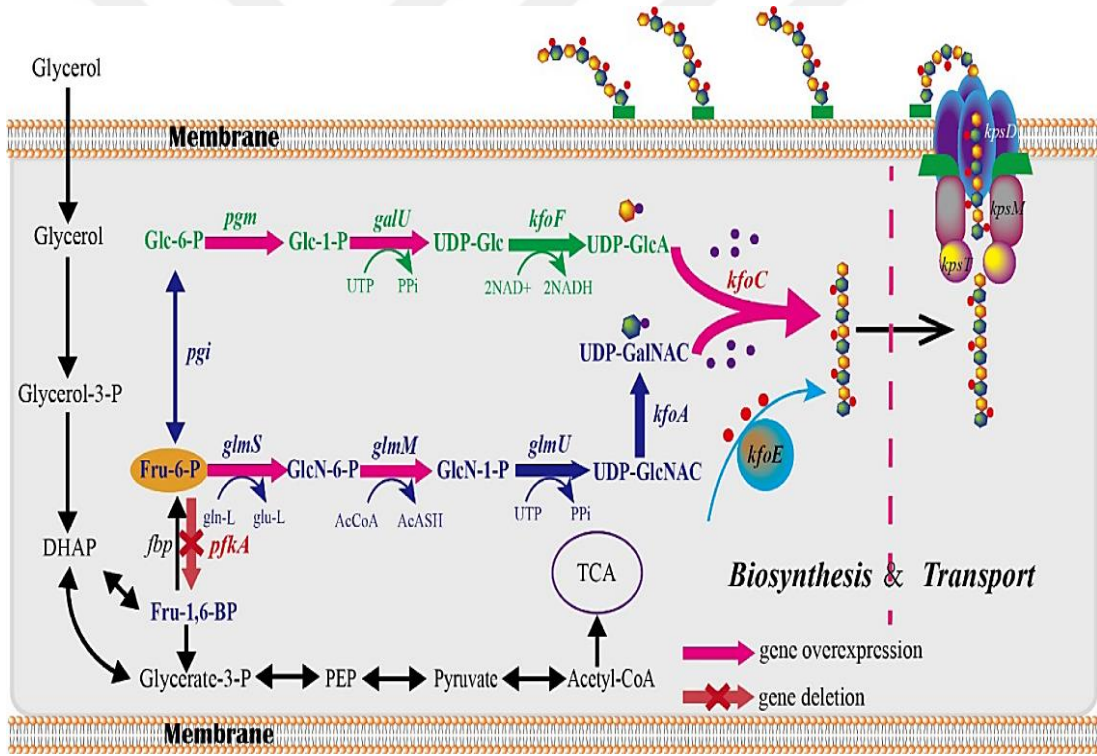
Bakteriyel kapsüller esas olarak tekrar birim yapılarına sahip uzun zincirli mikrobiyal polisakkaritlerden oluşur. Farklı bakteri türleri, farklı yapıya sahip kapsüller polisakkaritler (KPS) üretebilmektedir (Willis ve Whitfield, 2013). Örnek olarak, *E. coli* izolatları genellikle bir yüzey yapısal tabakası oluşturan kapsüller polisakkaritlere (K antijenleri) sahiptir. Bunlar çok çeşitli tekrar birim yapılarına bulunmaktadır (Whitfield ve diğerleri, 2020). Kapsüller polisakkaritler (KPS), tipik olarak negatif yüklü ve bu nedenle oldukça hidratlı bir kapsül tabakası ve uzun polisakkarit zincirlerinden oluşmaktadır. Kapsüller polisakkaritler D-glikoz, D-galaktoz, L-ramnoz veya N-asetilglikozamin, N-asetilgalaktozamin ve glukronik asit içeren birimlerin tekrarlanmasıyla oluşmaktadır (Yılmaz ve diğerleri, 2007).

## 1.6 Mikrobiyal Kondroitin Sülfat

KS'nin mikrobiyal sentezi, hayvan dokularından ekstraksiyonunun dezavantajları nedeniyle cazip bir alternatif olarak görülmektedir (Volpi, 2019). Yapılan araştırmalarla patojenik bakterilerde doğal olarak karbon omurga içeren sülfatlanmamış kondroitin ile özdeş,

sülfatlama ile KS olarak kullanılabilen bir kapsüler polisakkarit (KPS) ürettiği rapor edilmiştir (Koffas ve diğerleri, 2018). Patojenik bakteriler, kapsüler polisakkaritlerin yapı taşı olarak UDP-GalNAc ve UDP-GlcA'yı sentezlemektedirler ( Zhang ve diğerleri, 2018).

*E.coli* de kapsüler polisakkarit sentezi ve kondroitin oluşumu Şekil 1.8'de gösterilmiştir. Bu sentez esnasında, Fru-6-P, sırasıyla GlcN (Glukozamin)-6-P sentaz (GlmS) ve fosfogluco izomeraz. (Pgi) tarafından glukozamin-6-fosfat ve glukoz-1-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 ise, UDP-GalNAc ve UDP-GlcA kondroitin polimeraz. (*kfoC*) ile kondroitin oluşturulmaktadır (Ülke, 2019).



Şekil 1.7: *E. coli* kapsüler polisakkarit üretimi ve kondroitin oluşumu (Zhang ve diğerleri, 2018)

### 1.6.1 Mikrobiyal kondroitin sülfat üretimi

GAG'ların üretimi 4 tipe sınıflandırılmıştır;

1. Hayvansal kaynaklardan ekstraksiyon
2. Kimyasal sentez

### 3. Enzimatik sentez

#### 4. Mikrobiyal hücrelerin fermantasyonudur (Couto ve diğerleri, 2022)

KS, genellikle köpek balığı, sığır, domuz, tavuk ve bazı deniz canlıları gibi hayvan kaynaklarından kimyasal olarak ekstrakte edilmektedir (Volpi, 2019) Kimyasal sentez araştırmalarının 2003'ten beri başladığı bildirilmektedir (Shi ve diğerleri, 2014). Örneğin; *N* - trikloroasetil içeren koruma gruplarının dahili modelleri ile -asetil grubu, sülfonathı hidroksil grupları için benziliden ve benzil grupları ve serbest hidroksil ve karboksilik asit için sırasıyla benzoil ve metil esterler, glikozidik bağlantıların stereoselektif oluşumu kullanılarak fukozil kondroitin sülfatın kimyasal sentezi gerçekleştirilmektedir (Xu ve diğerleri, 2020). Enzimatik yöntemler, KS polimerlerinin parçalanarak veya KS oligosakaritlerini/polimerlerinin polimerizasyon yoluyla sentezlenmesi yolu ile KS oligosakaritleri üretilmesi için kullanılabilir. Kimyasal sentezlere göre, enzimatik yöntemlerin kullanılmasının başlıca avantajları, enzimlerin stereoselektif ve regioselektif reaksiyonları katalize etmesi ve potansiyel olarak daha çevre dostu ve daha hızlı bir şekilde homojen KS ile sonuçlandırılabilen reaksiyonlar olarak sayılabilir (Ji ve diğerleri, 2020a).

Mikrobiyal üretim, patojen bakterilerin kapsül yapılarının kondroitin sülfata benzerliği kullanılarak biyoteknolojik proses ile elde edilmektedir. *E. coli* K4'ün (K4CPS) kapsül polisakaritinin, farmasötik uygulamalarda yaygın olarak kullanılan ticari olarak değerli bir biyopolimer olan kondroitin sülfata dönüştürülebilen fruktosillenmiş kondroitin ile aynı olduğu tespit edilmiştir. Ekibimizce yapılan çalışmalarda da, kondroitinin mikrobiyal bir kaynaktan farmakolojik KS'a özdeş KS-A ve KS-C'ye dönüşümü gerçekleştirilmiştir (Erenler, 2019; Erenler ve diğerleri, 2019; Ülke, 2019).

Kondroitin sülfat üreten mikroorganizmalar Çizelge 1.1'te gösterilmiştir.

**Çizelge 1.1:** KS üreten mikroorganizmalar (Zhang ve diğerleri, 2018)

| Bakteriyel Türler                    | Kondroitin Sülfat (ng/ml) |
|--------------------------------------|---------------------------|
| <i>Bacillus cereus</i>               | 8.6                       |
| <i>Bacillus circulans</i>            | 11.7                      |
| <i>Bacillus coagulans</i>            | 8.5                       |
| <i>Bacilluslicheniformis</i>         | 9.0                       |
| <i>Bacillusmegalerium</i>            | 8.8                       |
| <i>Bacillus subtilis</i>             | 8.9                       |
| <i>Laclobacillus acidophilus</i>     | 8.9                       |
| <i>Corynebaclerium glulamicum</i>    | 80.8                      |
| <i>Microbaclerium arborescens</i>    | 8.0                       |
| <i>Micrococcus varians</i>           | 8.7                       |
| <i>Monascus purpureus</i>            | 10.1                      |
| <i>Streptomyces olivochromogenes</i> | 8.3                       |
| <i>Streptomyces rubiginosus</i>      | 8.0                       |
| <i>Escherichia Coli</i>              | 8.8                       |

### 1.7 Kondroitin Kaynakları

Günümüzde, KS için potansiyel bir kaynak olarak horoz ibiği, göbek bağları, domuz ve sığır kıkırdağı ve bazı deniz canlılarının dokuları kullanılmaktadır (Abdallah ve diğerleri, 2020a). Sülfat desenlerinin derecesi de çoğunlukla KS kaynaklarına bağlıdır ve bu fark esas olarak disakkaritinin bileşenine yansımaktadır (de Oliveira ve diğerleri, 2015). Tavuk, domuz ve sığır trakeasından elde edilen KS'da KS-A'nın oranı KS-C'dan fazla olduğu, köpek balığı kıkırdağından türetilen KS'de KS-C'nin içeriğinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Higashi ve diğerleri, 2015). Kondroitin sülfat A (KS-A) ve Kondroitin Sülfat C (KS-C) esas olarak sığır ve domuz gibi karasal hayvanlarda bulunur ve sülfat grupları sırasıyla GalNAc'ın C4 veya C6'sında meydana gelir. 2-O-sülfatlanmış ve ara sıra 3-O-sülfatlanmış GlcA içeren kondroitin sülfat D, E, F, H, K, L ve M, esas olarak köpekbalıkları ve Mersin balığı gibi deniz hayvanlarında bulunduğu belirtilmektedir (Han ve diğerleri, 2018).

KS köpekbalığı, vatoz balığı, ahtapot, kalamar, mavi köpekbalığı ve maymunbalığı, morina balığı, dikenli köpek balığı, somon, ton balığı ve mersin balığı kemiklerinde bulunmaktadır. *Isurus oxyrinchus*, *Prionace glauca*, *Scyliorhinus torazame*, *Dasyatis akajei*, *Dalatias licha*, *Mitsukurina owatoni* türleri dahil olmak üzere farklı köpekbalığı türlerinin yüzgeçlerinde KS olduğunu göstermiştir (Abdallah ve diğerleri, 2020b).

Deniz hıyarlarının vücut duvarından izole edilen glikozaminoglikanlarda, kondroitin sülfat bulunduğu belirtilmektedir (Jun-ichi ve diğerleri, 2013). Bugüne kadar 30'dan fazla farklı



deniz hıyarı türünden fKS (fukosilat kondroitin sülfat) incelendiği belirtilmiştir (Ustyuzhanina ve diğerleri, 2018)

Denizsel kaynaklar için yapılan bir çalışmada *Sciaena umbra corb* balık türünün kemiğinden GAG'ların çıkarılması kapsamlı kompozisyon analizi ve karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Balığın kılçığında GAG (CBG: Corb Bone Glycoseaminoglycan), 3'e 1 oranında KS/DS zincirleri içerdiği belirtilmiştir. Kemikli balıklardan elde edilen KS/DS karışımının omurgasında sülfatlanmış disakkarit birimlerinin varlığı, pıhtılaşma önleyici aktivitelerinin nedeni olduğu düşünülmüş, sülfatlanmış CBG'nin in vitro antikoagülasyon aktivitesi incelenmiştir. 1000 µg/mL konsantrasyonda CBG'nin, kontrole kıyasla aPTT ile pıhtılaşmanın 2,6 kat uzamasına ve PT süresinde 1,2 kat artış sağladığı bulunmuştur. TT için test edildiğinde CBG, kontrole kıyasla 3.5 kat uzama göstermiştir. CBG pıhtılaşma kademesinin aracılık ettiği bir pıhtılaşma önleyici etki göstermektedir (Bougatef ve diğerleri, 2018).

KS ile ilgili bir çalışmada deniz hıyarlarının (Echinoidea, Holothuroidea) vücut duvarında bulunan ve inflamasyon, hiperglisemi, ateroskleroz, hücrel büyüme, metastaz, anjiyogenez ve kanser ile ilgili çeşitli potansiyel biyomedikal uygulamaları gösteren bir glikozaminoglikan olan fukosilat Kondroitin Sülfat (fKS)'ın önemi belirtilmiştir (Ustyuzhanina ve diğerleri, 2018)

Kondroitin Sülfatın üretimine katkı sağlamak amacıyla kimyasal sentezine yönelik çalışmalarda yapılmıştır. Lei ve arkadaşları, KS-E karboksil parçasının karakteristik gruplarının ve bir asetamid grubunun, oligosakkaritlerin birleştirilmesini takiben dahil edildiği bir postglikosilasyon-dönüşüm stratejisi geliştirilmiştir. İki monosakkaritten toplam %34 ve %13 verimle 10 ve 12 adımda KS-E tetrasakarit ve heksasakarit öncülerini ürettiklerini belirtmiştir (Koike ve diğerleri, 2012).

Bir diğer kimyasal sentez çalışmasında Suzanna Maza ve arkadaşları 4,6-O-di-tert-bütülsililen grubu içeren bir *N*-trifloroasetil galaktozamin yapı bloğunu kullanarak glikosilasyon reaksiyonları ve koruyucu grup dağılımıyla kimyasal sentezi gerçekleştirmişlerdir (Maza ve diğerleri, 2013).

KS türlerinin doğal kaynakları Çizelge 1.2' de gösterilmiştir.



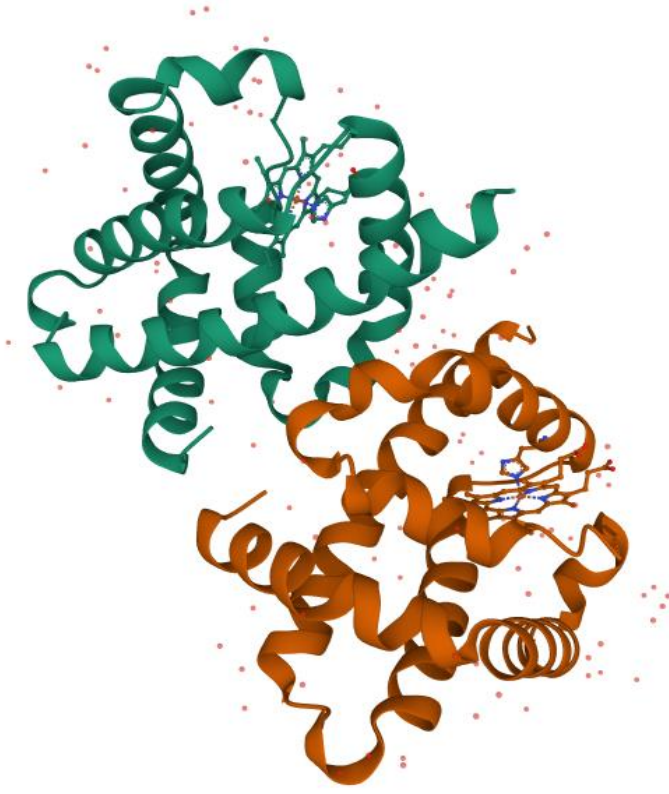
**Çizelge 1.2:**Kondroitin sülfat (KS) türlerinin doğal kaynaklarına örnekler (Couto, ve diğerleri, 2022; Han ve diğerleri, 2018)

| <b>GAG tipi</b>                | <b>Tekrarlayan Disakkarit Ünitesi</b>  | <b>Doğal Kaynağı</b>   |
|--------------------------------|--|--|
| KS-A                           | GlcA(β1-3)GalNAc(4S)(β1-4)   | Köpek balığı, köpek balığı ve balina kıkırdağı; insan, sığır, domuz ve tavuk kıkırdak dokusu |
| KS-B                           | GlcA/IdoA(2S)(β/α1-3)GalNAc(4S)(β1-4)  | Hayvan derisi, kornea, kıkırdak, kalp kapakçığı, tendonlar, kan damarları ve kemik           |
| KS-C                           | GlcA(β1-3)GalNAc(6S)(β1-4)   | Köpek balığı ve köpek balığı kıkırdağı; insan, sığır, domuz ve tavuk kıkırdak dokuları       |
| KS-D                           | GlcA(2S)(β1-3)GalNAc(6S)(β1-4)   | Köpek balığı ve beyin dokusu   |
| KS-E                           | GlcA(β1-3)GalNAc(4, 6diS)(β1-4)  | Köpek balığı Kalamar, akciğer dokusu   |
| Fruktozillenmiş KS (fKS, KS-F) | Genellikle GlcA biriminin O-3'üne bağlı L-fukosil dalları olan farklı CS türleri | Deniz Hıyarları  |
| KS-G                           | GalNAc ünitesinin O-6'sına glikoz eklenmiş farklı CS türleri                     | Köpek balığı Kalamar   |
| KS-H                           | IdoA(α1-3)GalNAc(4S, 6S)(β1-4)   | Köpek balığı Hagfish   |
| KS-K                           | GlcA(3S)(β1-3)GalNAc(4S) (β1-4)  | Köpek balığı Kalamar, Kral Yengeç ve Ahtapot   |
| KS-L                           | GlcA(3S)(β1-3)GalNAc(6S) (β1-4)  | Köpek balığı Kalamar   |
| KS-M                           | GlcA(3S)(β1-3) GalNAc(4,6diS)( β1-4)   | Köpek balığı Kalamar   |
| Sülfatlanmamış Kondroitin      | GlcA(β1-3)GalNAc(β1-4)   | Pasteurella multocoda Tip F Avibacterium paragallinarum genotip 1 E.coli K4                  |

## 1.8 *Vitreoscilla* Hemoglobin

Bakteriyel hemoglobinler 3 grup halinde sınıflandırılmaktadır. Bunlar Single Domain Hemoglobin (SDHb)'ler, yapısı omurgalı hemoglobin yapısına çok benzeyen sadece bir globin alanına sahip tek bir bölge hemoglobin, Flavohemoglobin (FHb)'ler bir flavin bağlayıcı alana kaynaşmış VHb tipi bir globin alanına sahip olan flavohemoglobin ve Truncated Hemoglobin (trHb)'ler ise SDHb'lerden yaklaşık %20 daha küçük olan tek bir bölgeye sahip kesilmiş hemoglobinler olarak tanımlanmaktadır (Stark ve diğerleri, 2015).

*Vitreoscilla* hemoglobin (VHb) ilk olarak 1960'larda çalışılmıştır ve 1966'da Dale Webster, gram-negatif *Vitreoscilla* sp.'de VHb olarak bilinen ilk bakteriyel hemoglobini keşfetmiştir (Webster ve Hackett, 1966). VHb, oksijen ayrışma hızı yüksek olup (Yu ve diğerleri, 2021a), çözünür bir protein olmasına rağmen, spektral özelliklerinin terminal solunum oksidazına (sitokrom o) benzerlikleri nedeniyle başlangıçta "çözünür sitokrom o" olarak tanımlanmıştır (Wakabayashi ve diğerleri, 1986). *Vitreoscilla* hemoglobinin işlevleri; düşük oksijen koşulları altında oksijenazlara ve solunum zincirine oksijen verilmesini; oksijen algılama, transkripsiyon faktörü aktivitesinin modülasyonu, NO'nun detoksifikasyonu ve VHb'nin "ortak proteinler" ile etkileşimleri olarak belirtilmiştir. Ayrıca VHb ifadesi ATP ve NADH düzeylerini ve birçok ara metabolizma bileşiğinin seviyesini etkileyebilmekte ve birçok genin ekspresyon seviyelerini değiştirebilmektedir (Stark ve diğerleri, 2012). Oksijene bağımlı VHb promotörünün, mikroaerobik koşullar altında (çözünmüş oksijen seviyelerinin hava doygunluğunun %2'sinden daha az olması) maksimum düzeyde indüklendiği belirtilmiştir. VHb'nin hücrel fizyolojiyi enerjetik olarak daha verimli aerobik duruma taşıyarak terminal oksidazların aktivitesini artırabileceği öne sürülmüştür (Guo ve diğerleri, 2018). Yetersiz oksijen koşullarında VHb'nin heterolog bakterilerde ifadesi, bakteriyel büyümeyi ve rekombinant proteinlerin verimini artırdığı belirtilmektedir (Park ve diğerleri, 2002).



**Şekil 1.8:** *Vitreoscilla stercoraria*'da mevcut VHb'in 3 boyutlu yapısı (<http://rcsb.org/>).

Farklı çevresel koşullar altında, VHb üç farklı durumda bulunabilmektedir. Bunlar; oksitlenmiş, indirgenmiş ve oksijenli durum olarak tanımlanmıştır. VHb'nin hem grubundaki demir atomu indirgenmiş halde bulunmakta ve oksijenle geri dönüşümlü olarak birleşebilmektedir. Oksijenli durum, indirgenmiş durum ile oksitlenmiş durum arasındaki geçiş durumudur ve aynı zamanda oksijenle ilgili metabolik yollara katılan ve solunum hücrelerinde oksidatif fosforilasyonun etkinliğini artıran kararlı durum olarak tanımlanmaktadır (Yu ve diğerleri, 2021b).

Yapılan araştırmalar neticesinde ökaryotik hemoglobinlere nazaran, VHb'nin oksijene bağlanma hız sabitinin ( $k_{on} = 78 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ) ortalama düzeyde olduğu, ancak VHb ve oksijenin ayrışma hızı sabitinin ( $k_{off} = 5000 \text{s}^{-1}$ ) yüzlerce kat daha yüksek olduğu tespit edilmiş, bunun da VHb'nin büyük miktarda oksijen salma eğiliminde olduğu anlamına geldiği belirtilmiştir (Aydın ve Kılıç, 2000). *Vitreoscilla* ve *E. coli*'de, hücresel VHb periplazmik boşlukta ve hücre zarına yakın lokalize olduğu, bu durumun hipoksik koşullar altında hücre zarına oksijen taşımak için bir solunum cihazı olarak çalışmasını kolaylaştırdığı kaydedilmiştir. Mayada ise, VHb'nin *sitokrom bo* ubiquinol oksidazın alt

birimi ile etkileşime girebildiği ve aktivitesini artırabildiği iki hibrit deneyle doğrulanmıştır. VHb, lipid bağlama özelliklerine de sahiptir. VHb sadece doğal fosfolipidlerin oluşturduğu tek tabakalarla etkileşime girebilmekte ve aynı zamanda serbest yağ asitlerine geri dönüşümlü olarak bağlanmaktadır (Rinaldi ve diğerleri, 2006).

VHb, mikroorganizmalarda, bitkilerde ve hayvanlarda metabolik mühendislik alanında oksijenle sınırlı koşullarda yüksek hücre yoğunluklu fermentasyonun gerçekleştirilmesi, ürün sentezinin artırılması ve stres toleransının geliştirilmesi için kullanılabilir bir ajan olarak önerilmektedir (Yu ve diğerleri, 2021b).

Zang Huidan ve ark. tarafından yapılan örnek bir çalışmada *Mortierella alpina*'da VHb'nin başarılı ekspresyonunun, araşidonik asit ve lipid üretimini önemli ölçüde artırdığı, ayrıca hücre büyümesini desteklediği ve hem düşük hem de normal çözünmüş oksijen koşulları altında canlılığı artırdığı belirtilmiştir (H. Zhang ve diğerleri, 2017). *vgb* geni farklı konakçılarda hücre büyümesi, kimyasallar/proteinler üretiminin artırılması için başarılı bir şekilde klonlanmış ve eksprese edilmiştir. Literatürde *vgb* teknolojisine dair birçok uygulama mevcut olduğu bildirilmiştir (Stark ve diğerleri, 2012, 2015).

Çalışmamızda rekombinant suş *E.coli* pETM6-PACF-*vgb* ile *E. coli* pETM6-PACF suşu karşılaştırılmış *vgb* rekombinatı suşun oksijensiz ortama dayanıklılığının *vgb* suşa göre daha fazla olduğu görülmüştür.

## 2. MATERYAL VE YÖNTEM

### 2.1 Kullanılan Malzemeler

Bakterilerin saklanması için oluşturulan sıvı besiyeri içeriği hazırlanan her 2 L için maya özütü, pepton, NaCl, ampisilin ve distile su kullanılmıştır. Kondroitin üretimi için saf etil alkol, deoksiribonükleaz (DNase), proteinaz K, parçalama tamponu olarak tris, magnezyum klorür ( $MgCl_2$ ), kalsiyum/klorür ( $CaCl_2$ ) kullanılmıştır. HPLC için gerekli kimyasallar, amonyum asetat, kalsiyum asetat, NaCl, imidazol tampondimetil sülfoksit (DMSO), 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; distile su, piridin sülfotrioksit, aseton, sodyum hidroksit, hidroklorik asit, diyaliz tüpü selüloz membran, dimetil formamid, sodyum sülfür ve sülfürik asit olmaktadır.

### 2.2 Kullanılan Cihazlar

1. Etüv Nüve ES 252
2. Otoklav OT 90 L Nüve
3. Hassas Terazî RADVAG ST 3100
4. pH metre OHAUS ST3100
5. Isıtıcılı manyetik karıştırıcı Biosan Htelli-Stirrer MSH 300İ
6. Vortex HEİDOLPH REAX TOP
7. Santrifüj cihazı UNİVERSAL 320 R Hettich ZENTRİFUGEN
8. Liyafilizatör
9. Spektrofotometre Agilent Technologies Company Cary 60 UV-Vis Spectrophotometer
10. FT-IR Cihazı Perkin Almer UATR Two

### 2.3 Deneyde Kullanılan Mikroorganizmalar

Çalışmamızda, mikrobiyal kondroitin ve mikrobiyal kondroitin sülfat eldesi için ekibimizce oluşturulan *E.coli* pETM6-PACF-*vgb* suşu ve *E.coli* pETM6-PACF suşları 30 günde bir LB amp plaklarına ekimi yapılarak, 4°C’de taze pasaj alınarak muhafazası edilmiştir. Ekibimizin önceki çalışmalarında üretilen (Erenler ve diğ, 2019; Erenler, 2019) bu suşlar *vgb* geninin, kondroitin üretimindeki etkinliği açısından karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır.

### 2.4 Kullandığımız Besiyeri

Araştırmada; hücrelerin büyüme ve ayırım geçişi için amfisilinli (80 mg/ml) Lauria Broth (LB) sıvı besiyeri kullanılmıştır. Sıvı kültürler 2 litrelik erlenlerde hazırlanıp 25 dk. boyunca 120 °C’de ve 1 atm basınçta otoklavda sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Lauria Broth sıvı kültüründe bulunan bileşim tablo halinde aşağıda belirtilmiştir (Çizelge 2.1).

**Çizelge 2.1:** Sıvı kültürümüzde oluşturulan içerik (2 L besiyeri için)

|            |       |
|------------|-------|
| Pepton     | 10 gr |
| NaCl       | 10 gr |
| Maya özütü | 5 gr  |
| pH         | 7,5   |

### 2.5 Çalışmada Kullandığımız Çözeltiler

Kondroitin Sülfat sentezinin ayrıştırma aşaması için deneyde kullandığımız parçalama tamponu Çizelge 2. 2.’de verilmiştir.

**Çizelge 2.2:** Kondroitin sentezi için kullanılan parçalama tamponu

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

Yukarıda belirtilen bileşimde bir stok çözelti hazırlanmıştır. Deneyler süresince bu stok çözelti kullanılmıştır.

**Çizelge 2.3:** HPLC için kullandığımız parçalama tamponu bileşimi

|                 |       |
|-----------------|-------|
| Amonyum asetat  | 50 Mm |
| Kalsiyum asetat | 2 Mm  |
| pH              | 7.5   |

Tabloda gösterdiğimiz bileşimi içeren stok çözelti hazırlanmıştır. Deneylerimizde bu stok çözelti kullanılmıştır.

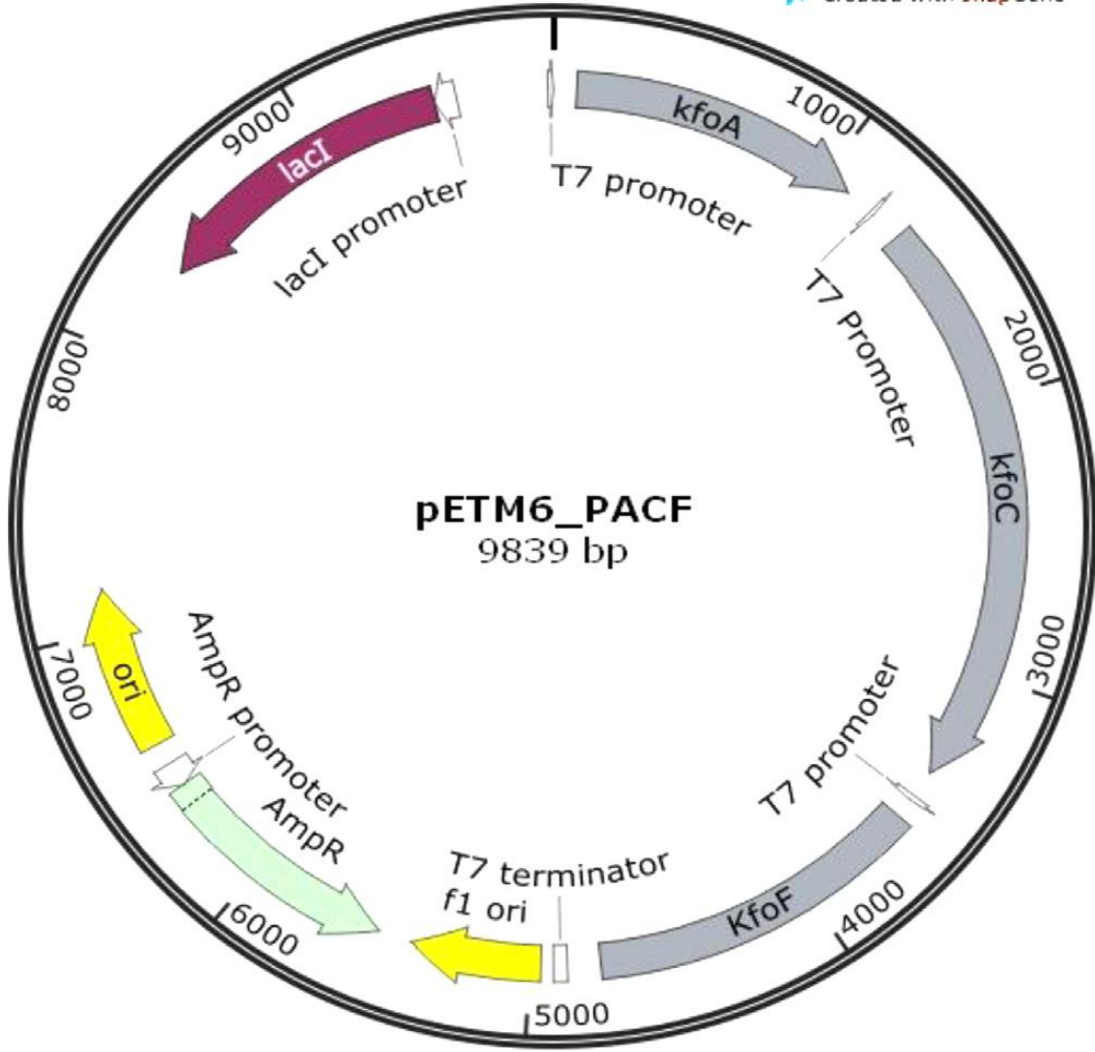
**Çizelge 2.4:** Tris-NaCl-İmidazol stok çözeltisi bileşimi

|                 |        |
|-----------------|--------|
| Tris            | 25 Mm  |
| NaCl            | 500 Mm |
| İmidazol tampon | 300 Mm |
| pH              | 7.5    |

Tabloda gösterdiğimiz bileşimi içeren stok çözelti hazırlanmıştır. Deneylerimizde bu stok çözelti kullanılmıştır.

## 2.6 Kullanılan Plazmidler

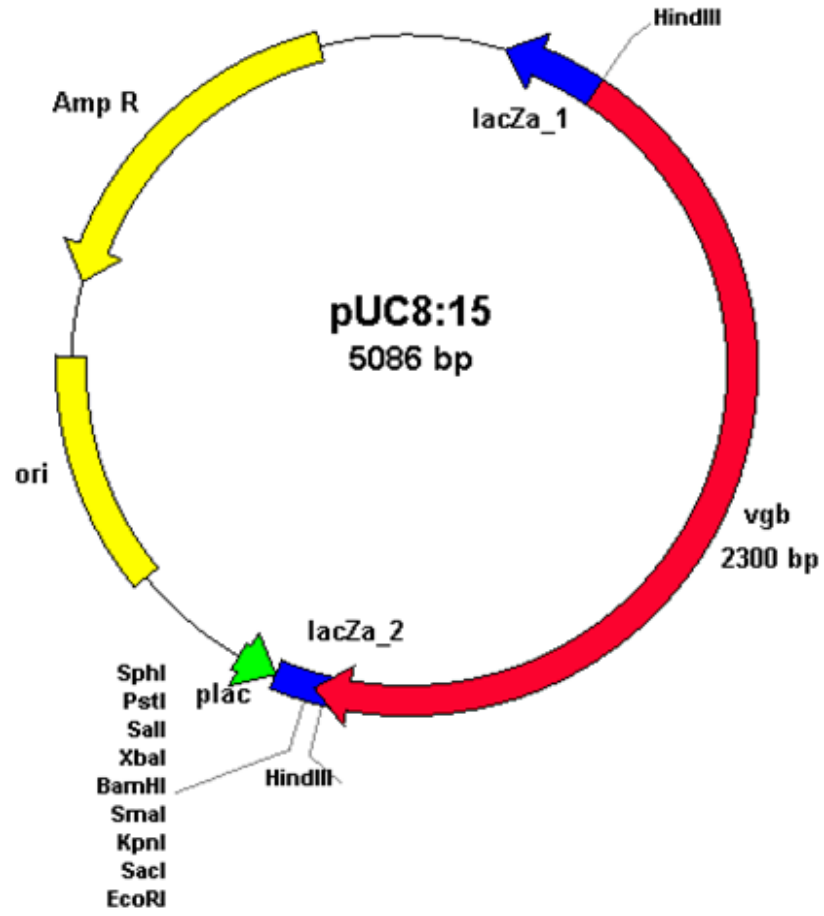
Çalışmamızda daha önceden laboratuvarımızda Rensselaer Polytechnic Institute, Troy, NY'dan Mattheos Koffas'dan pETM6-PACF plazmidi alınarak, *E. aerogenes* NRRL ARS Culture Collection B-427 izole edilen pUC8:15 plazmidi ile birleştirilmiş ve *E.coli* pETM6-PACF-*vgb* suşu oluşturulmuştur (Ülke, 2019). Çalışmamızda *vgb* geni pETM6-PACF plazmidinin genetik haritası Şekil 2.1'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1: pETM6-PACF plazmidi

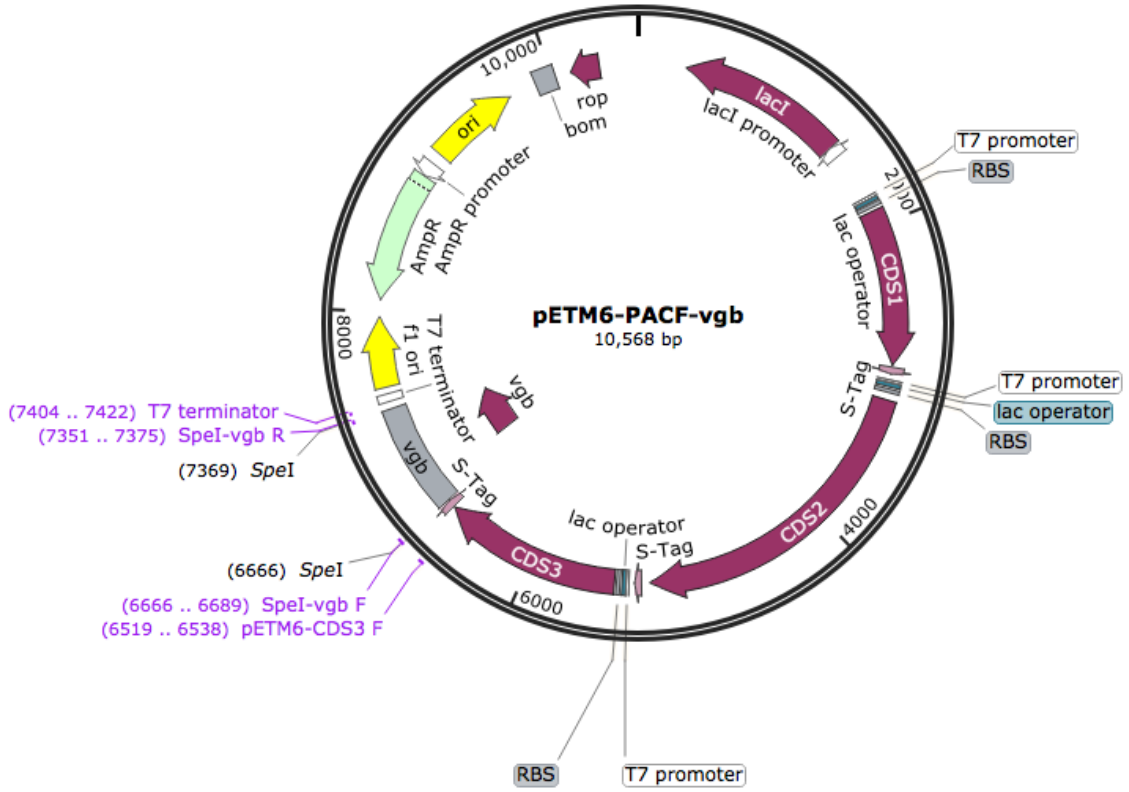
Çalışmamızda kullanılan pUC8:15 plazmidinin genetik haritası Şekil 2.2'de gösterilmektedir.





Şekil 2.2: pUC8:15 plazmidinin fiziki haritası

Çalışmamızda kullanılan pETM6-PACF-*vgb* plazmidinin fiziki haritası Şekil 2.3'te gösterilmiştir.



Şekil 2.3: pETM6-PACF-vgb plazmidinin fiziki haritası

## 2.7 Mikrobiyal Kondroitin Sülfat Üretimi

1. Kullanılan bakteri suşlarından LB-amp besiyerine iki ayrı suşta ilk 2 L erlenlerde besiyeri hazırlanmıştır. İlk etapta *vgb* geni içeren *E.coli* pETM6-PACF-*vgb* suşu ile ekim yapılmış daha sonra *E.coli* pETM6-PACF suşu ile ekim yapılmıştır. Bu iki suş için eşdeğer hacimde sıvı kültürler ile karşılaştırma yapılması planlanmıştır.
2. Ekimi yapılan suşların gece kültürleri yapılmıştır.
3. Kültürlerin 50 ml falkon tüplerde 6'lı 2 grup halinde +4 °C 'de 9000 rpm de santrifüjü gerçekleştirilmiştir.
4. Tüplerin içinde biriken pelletler toplanarak tek bir falkon tüpünde biriktirilmiştir.
5. Biriken pelletlerin bulunduğu tüp 15 dk otoklavda steril edilmiştir.
6. Sterilizasyon işleminden sonra soğumaya bıraktığımız pellet içeren tüp +4 °C 9000 rpm de santrifüje edilmiştir.
7. Santrifüj işleminden sonra %80 oranında alkol içerecek şekilde soğuk alkol eklenmiştir.

8. Alkol ilavesinden sonra -20°C’de dondurucuda bekletilerek çökeltme işlemi sürdürülmüştür.
9. Gece boyu bekleyen numune 9000 rpm’de 5 dk santrifüj edilmiştir.
10. Santrifüj sonrası elde edilen pelletler toplanmış ve parçalama tamponunda yeniden süspanse edilmiştir.

|                                     |          |
|-------------------------------------|----------|
| Parçalama Tamponu: 500 ml için Tris | 6,05 gr. |
| MgCl <sub>2</sub>                   | 2,38 gr. |
| CaCl <sub>2</sub>                   | 0,55 gr. |

11. Numunelerin üzerine DNAase eklenmiş (1mg/L) ve numuneler 37 °C de 1 saat inkübe edilmiştir.
12. Sonraki aşamada numunelerin üzerine Proteinaz K eklenmiş (2,5 mg/ml) ve 56 °C 2 saat inkübe edilmiştir.
13. Toplam hacim 45 ml olacak şekilde numunenin üzerine soğuk alkol (+4 °C) eklenmiştir. Numuneler 9000 rpm’de 5 dk santrifüj edilerek süpernatant atılmıştır.
14. Kalan pelet santrifüj tüpünün içerisinde 15 ml distile su ile tamamlanacak şekilde vortexle çözünmesi sağlanmıştır.
15. 15 ml olan son hacmin hepsi tek bir spin kolon plastik kabı içerisine dökülmüştür. Üzeri alüminyum folyo ile kapatılıp delikler açılarak spin kolonda – 20 °C’ de dondurularak filtreleme için hazır hale getirilmiştir. Filtrelemeden sonra geriye kalan kısım NMR analizi için vakumla liyofilize edilmiştir.

İki ayrı suşda 126 L için yukarıdaki aşamalarizlenerek yapılan işlemlerle elde edilen kondroitinin doğrulanması için High Pressure Liquid Cromatography (HPLC) ve Nuclear Magnetic Resonance (NMR) analizleri yapılmıştır.

### 2.7.1 Kondroitin Sülfatlama İşlemi

*E.coli* pETM6-PACF-*vgb* suşu ve *E.coli* pETM6-PACF suşundan aldığımız numuneleri analizi yapıldıktan sonra sülfasyon yöntemi ile sülfatlama yapılmıştır.

1. Üretilen kondroitin miktarı *E.coli* pETM6-PACF-*vgb* için 5,67g, *E.coli* pETM6-PACF için 4,62 g ölçüsünde elde ettiğimiz kondroitin 0-5°C’ye kadar soğutulmuştur.

2. Soğutulan numunelere 5,67 gr için 17,01 g ve 4,62 gr için 13,86 g Sülfür Trioksit Piridin eklenmiştir.
3. Solüsyon oda sıcaklığına geldiğinde 5,67 gr için 570 ml, 4,62 gr için 460 ml NaCl doymuş aseton ilave edilerek çökertme işlemi yapılmıştır.
4. Çökeltinin üzerinde kalan doymuş aseton pipetle çekilerek geri kalan çökelti spin kolonlara dökülmüştür. Kalan çökelti liyofilizatörde kurutma işlemi yapılmıştır.
5. Kurutma işleminin ardından elde edilen katı miktarlardan 5,67 gr kondroitin için 280 ml deiyonize su ve 1,25 N NaOH ile 4,62 gr kondroitin için 200 ml deiyonize su ve 0,75 N NaOH ile nötralizasyon sağlanmıştır.
6. Nötralizasyon sağlandıktan sonra 40 °C'ye kadar ısıtılmış ve pH nötrleşmesi için HCl eklenmiş nötrleşme sağlanmıştır.
7. Çözelti 10 µs'den küçük geçirgenlik iletkenliğe sahip zar (membran) aracılığıyla filtrelenmiştir. Öncelikli olarak membran aşağıdaki protokolle aktive edilerek kullanıma hazır hale getirilmiştir.
8. Son olarak çözelti spin kolonlara bölünüp liyofilize edilerek kurutulmuştur.

### 2.7.2 Membran aktivasyonu

1. İki ayrı üretim için membranlar kesilerek gliserolün giderilmesi için akan suyun altında yıkanıp distile su içerisinde bir gece bekletilmiştir.
2. Kükürt bileşiklerinin uzaklaştırılması için membran 1 dk boyunca 80 °C'de % 0,3 (w/v) sodyum sülfür solüsyonuyla muamele edilmiştir.
3. Membran, 60 °C distile suda 2 dk boyunca yıkanmış bunu takiben %0,2'lik (v/v) sülfirik asitle muamele edilmiştir.
4. Daha sonra asiti uzaklaştırmak için sıcak su içerisinde membranlar durulanmıştır.

### 2.8 HPLC Analizi

Yüksek performanslı Likit Kromatografi (HPLC) karışımdaki bileşenlerin ayrıştırılmasında nitelik ve niceliklerinin belirlenmesinde kullanılan bir analitik kimya yöntemi olarak tanımlanmaktadır. Çalışmamızda *E.coli* pETM6-PACF-*vgb* suşu ve *E.coli* pETM6-PACF suşu ile üretilen KS'lerin, HPLC analizleri İBTAM ( İnönü Üniversitesi Bilimsel Teknik

Araştırma Merkezi) bünyesinde gerçekleştirilmiştir. *E.coli* pETM6-PACF-*vgb* suşu ve *E.coli* pETM6-PACF suşları ile ürettiğimiz KS nin kontrolü için ticari kondroitin sülfat kullanılmıştır.

## 2.9 NMR Analizi

Çalışmamızda *E.coli* pETM6-PACF-*vgb* suşu ve *E.coli* pETM6-PACF suşu ile ürettiğimiz KS'lerin NMR analizi, İBTAM (İnönü Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Merkezi) bünyesinde yapılmıştır. Tüm NMR deneyleri, bir Bruker Avance III 600 HD spektrometre (Bruker BioSpin, Billerica, MA) üzerinde Topsin 3.1.7 yazılımı (Bruker) ile gerçekleştirilmiştir. Tek boyutlu 1H NMR spektrumları için koşullar şu şekildedir: 12.3 kHz'lik titreme alanı, 2.66 s'lik toplama süresi, 8.00 s'lik gevşeme gecikmesi, 24.8 °C sıcaklıktır.

## 2.10 Spektrofotometrik Analiz

Çalışmamızda *E.coli* pETM6-PACF-*vgb* suşu ve *E.coli* pETM6-PACF suşu ile üreme düzeylerinin spektrofotometrik analizleri Agilent Technologies Cary 60 UV-Vis Spektrofotometre cihazı ile gerçekleştirilmiştir. İlk 1. ve 12. Saatler arası bir saat arayla 12. saatten sonra 24., 48. ve 72. saatlerde alınan numunelerin OD 600 nm'de absorbans değerlerinin ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

## 2.11 FT-IR Analizi

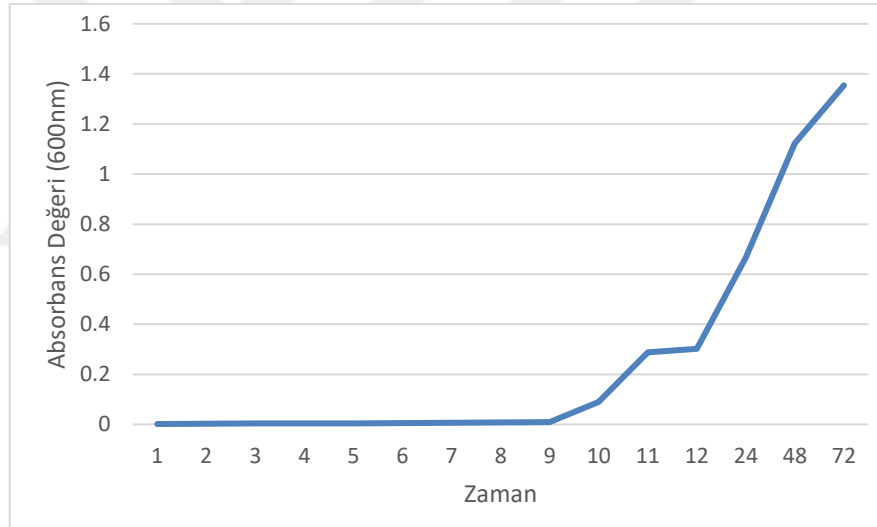
Çalışmamızda *E.coli* pETM6-PACF-*vgb* ile *E.coli* pETM6-PACF'den üretilen mikrobiyal kondroitin sülfat ve ticari kondroitin sülfat arasındaki moleküler düzeydeki farkın belirlenmesi için yapısal analizi İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Kimya Bölümü laboratuvarında, Perkin Elmer UATR Two cihazı ile FT-IR analizi gerçekleştirilmiştir. FT-IR cihazı ile molekül içi bağların tayini, molekül yapısının tayini, molekül içi fonksiyonel grupların belirlenmesi işlemleri yapılabilmektedir.

### 3. ARAŞTIRMA VE BULGULAR

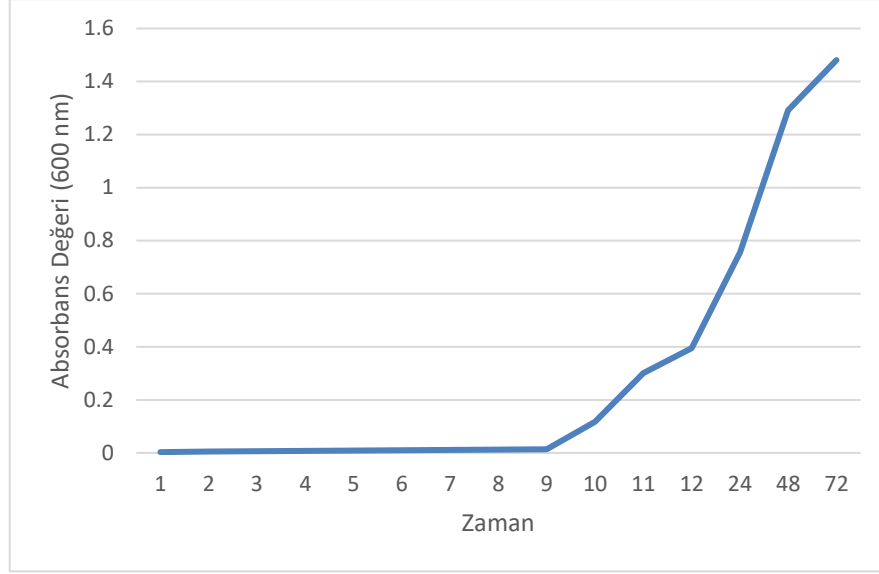
#### 3.1 Kondroitin Sülfat Üretimi

Çalışmamızda *E.coli* pETM6-PACF-*vgb* ve *E.coli* pETM6-PACF'den toplamda 126 lt iki eşit hacim olacak şekilde iki grup olarak planlanmış ve protokol bu şekilde yürütülmüştür. Bu gruplardan ürettiğimiz KS'nin miktarı *E.coli* pETM6-PACF-*vgb* suşundan 4,96 gr. Ve *E.coli* pETM6-PACF suşundan 4,03 gr.'dır. İki suş arasında üretim artışı tespit edilmiştir.

#### 3.2 Spektrofotometrik Analiz Sonuçları



Şekil 3.1: *E. coli* pETM6-PACF üreme eğrisi



**Şekil 3.2:** *E. coli* pETM6-PACF-vgb üreme eğrisi

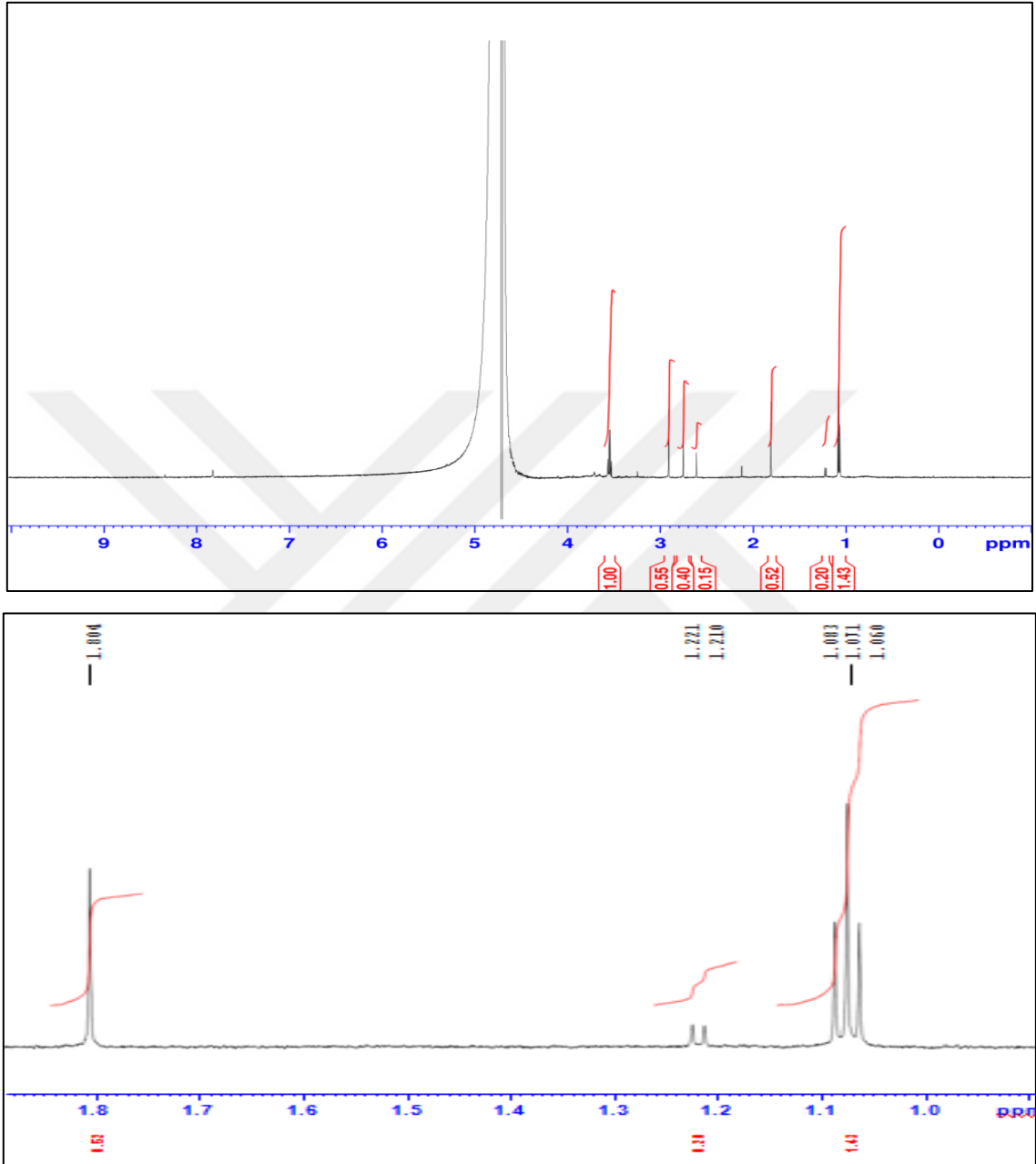
Çalışmamızda iki suşun ilk 1. ve 12. saatler arası, bir saat arayla 12. saatten sonra 24.,48. ve 72. saatlerde alınan numunelerin OD 600 nm’de alınan absorbans değerleri grafikte gösterilmiştir. *E.coli* pETM6-PACF (Tablo 3.1) ve *E.coli* pETM6-PACF-vgb (Tablo 3.2) suşlarından için izlenen zaman periyodunda *E.coli* pETM6-PACF-vgb suşunda, *E.coli* pETM6-PACF suşuna oranla üreme artışı gerçekleştiği gözlemlenmiştir.

### 3.3 NMR Sonuçları

Çalışmamızda ürettiğimiz KS’nin NMR analizleri İnönü Üniversitesi Bilimsel Teknik Araştırma Laboratuvarı (İBTAM) bünyesinde gerçekleştirilmiştir ve NMR sonuçları aşağıda verilmiştir (Şekil 3.1, Şekil 3.2). Öncelikle elde ettiğimiz KS, Kondroitinaz ABC enzimi ile muamele edilmiş ve yapısında bulunan disakkarit birimleri serbest hale geçirilmiştir. Bu disakkarit birimleri NMR sonucunda yan yana iki spektrum vermiştir. Bu spektrumlar, sülfatladığımız *N*-asetil- $\beta$ -galaktozamin-6-sülfat ve sülfatlanmamış  $\beta$ -glukuronik asit birimleri olarak görülmüştür. Ticari KS’nin enzim ile parçalanması sonucu açığa çıkan 4-S ve 6-S birimleri ise aşağıdaki Şekil 3.3’ de gösterilmiştir. Mikrobiyal olarak biyoteknolojik yöntemlerle ürettiğimiz KS’nin verdiği NMR spektrumları, kontrol ticari KS ve literatürdeki diğer kaynaklardan elde edilen KS’nin NMR spektrumları ile eşleştiği rapor edilmiştir.

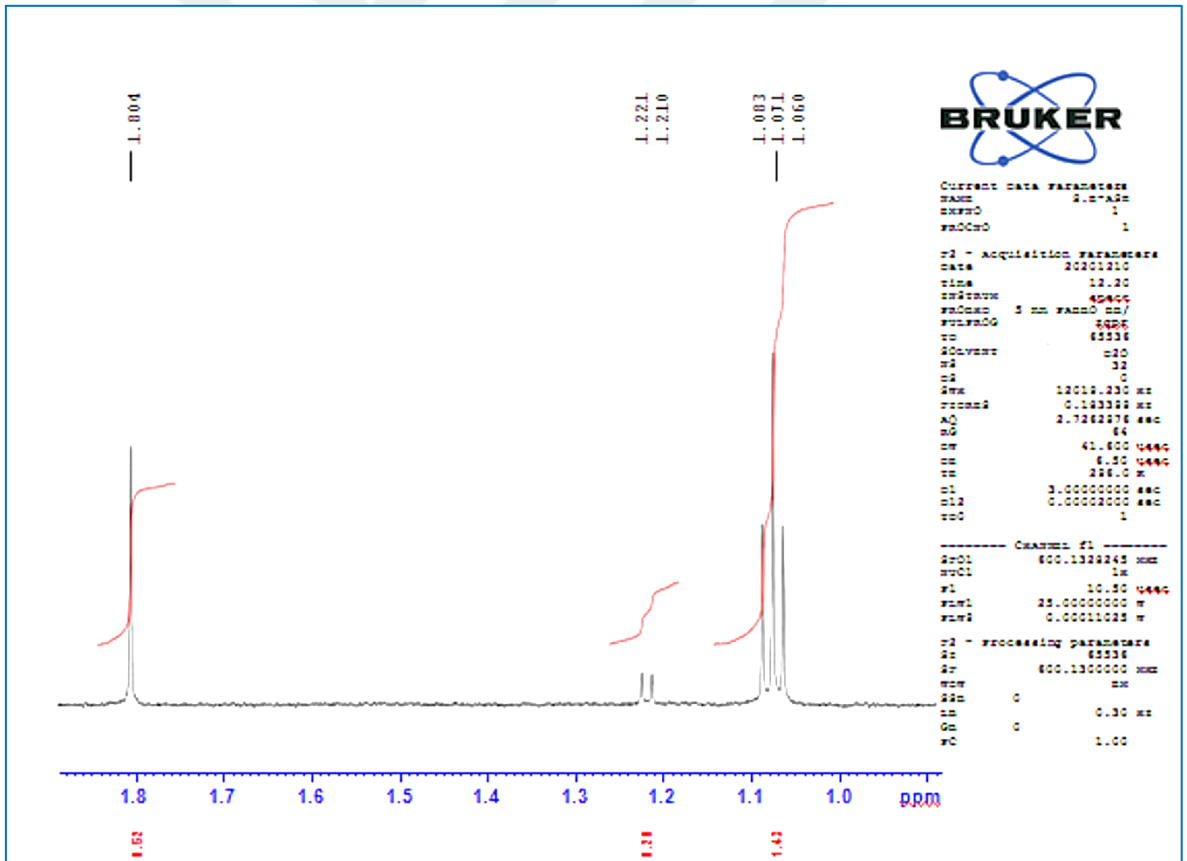
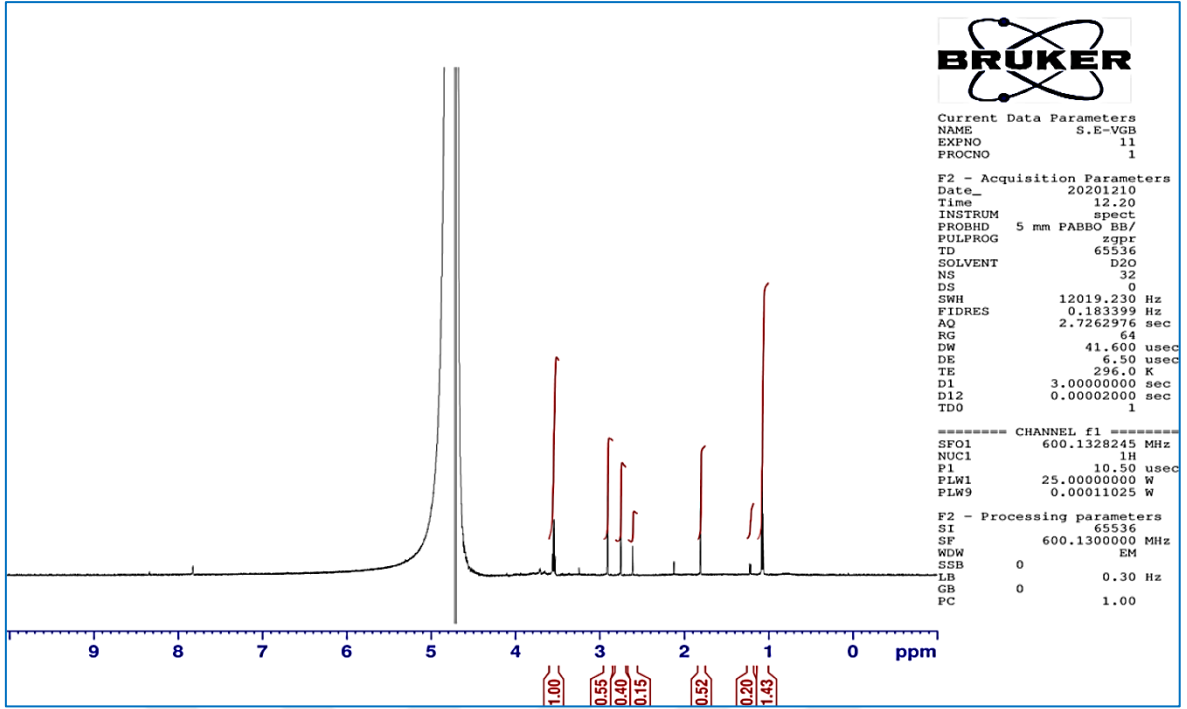
Doğal ürünlerdeki KS, C-4 konumunda sülfat grubu yalnız başına bulunmayıp C-6 konumundaki sülfat grubuna birleşik halde bulunmaktadır. Genellikle ticari kaynaklı bir KS, % 40 oranında C-4 konumunda, % 60 oranında ise C-6 konumunda sülfat grubu içermektedir. Çalışmamızda ticari KS’ye özdeş nitelikte, 6-konumunda sülfat deseni

oluşturulmuştur. Aynı zamanda, ticari kontrol KS'nin molekül ağırlığı yaklaşık olarak 18.000-20.000 D. arasında belirtilmiştir. Mikrobiyal KS'de ise NMR analizi sonucu moleküler ağırlığın 300-3000 D. aralığında olduğu belirtilmiştir.

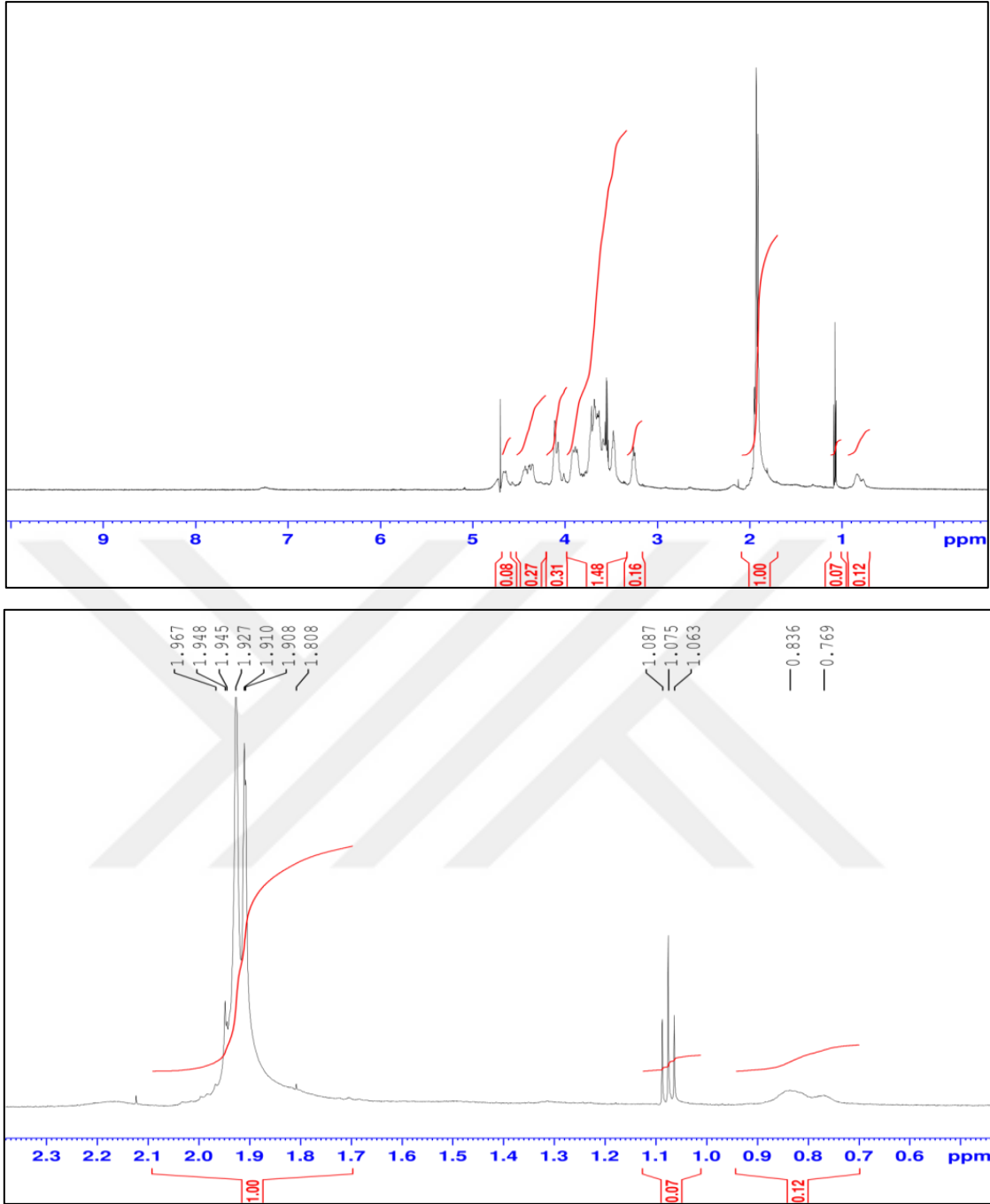


Şekil 3.3: *E.coli* pETM6-PACF-vgb suşuna ait NMR sonuçları





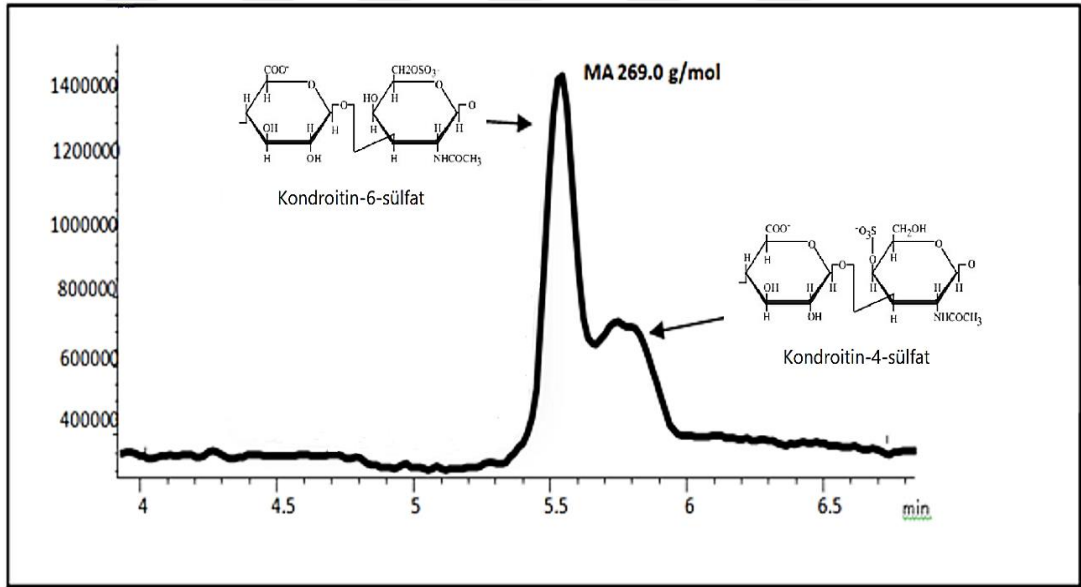
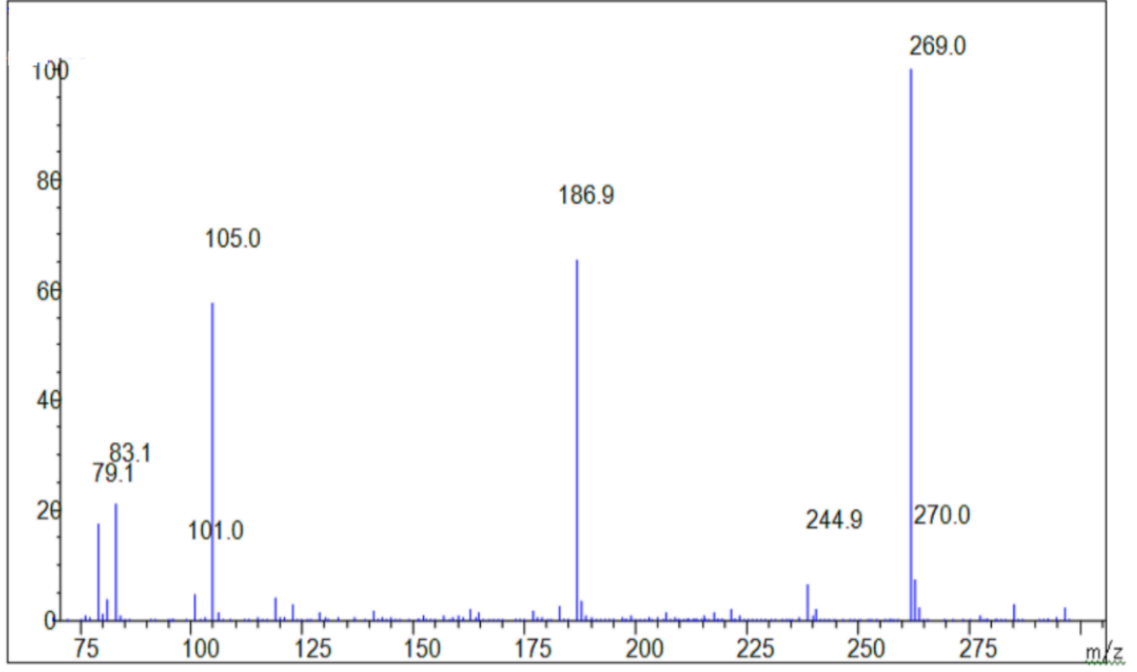
Şekil 3.4: *E.coli* pETM6-PACF NMR sonuçları



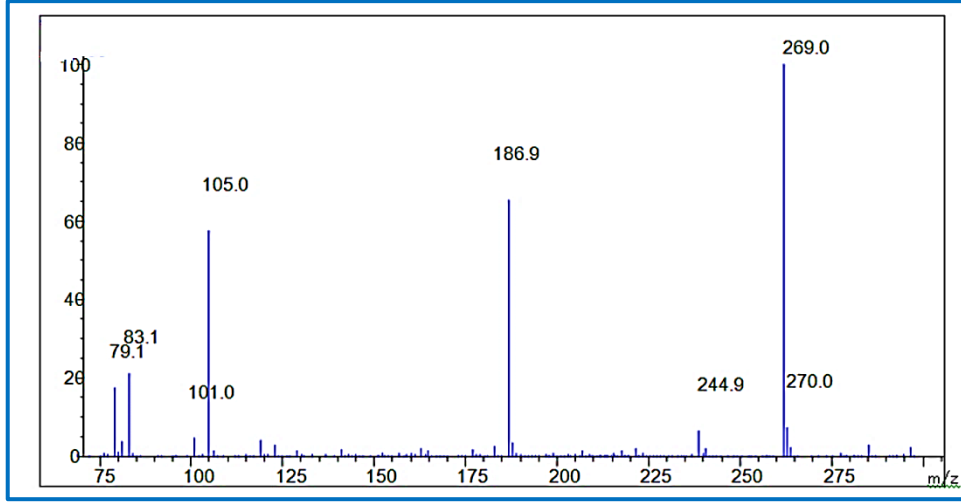
Şekil 3.5: Sığır trakesi kaynaklı kontrol ticari KS'ye ait NMR sonuçları

### 3.4. HPLC Sonuçları

HPLC analizleri, İBTAM (İnönü Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Merkezi) bünyesinde yapılmıştır ve elde edilen HPLC sonuçları aşağıda verilmiştir.

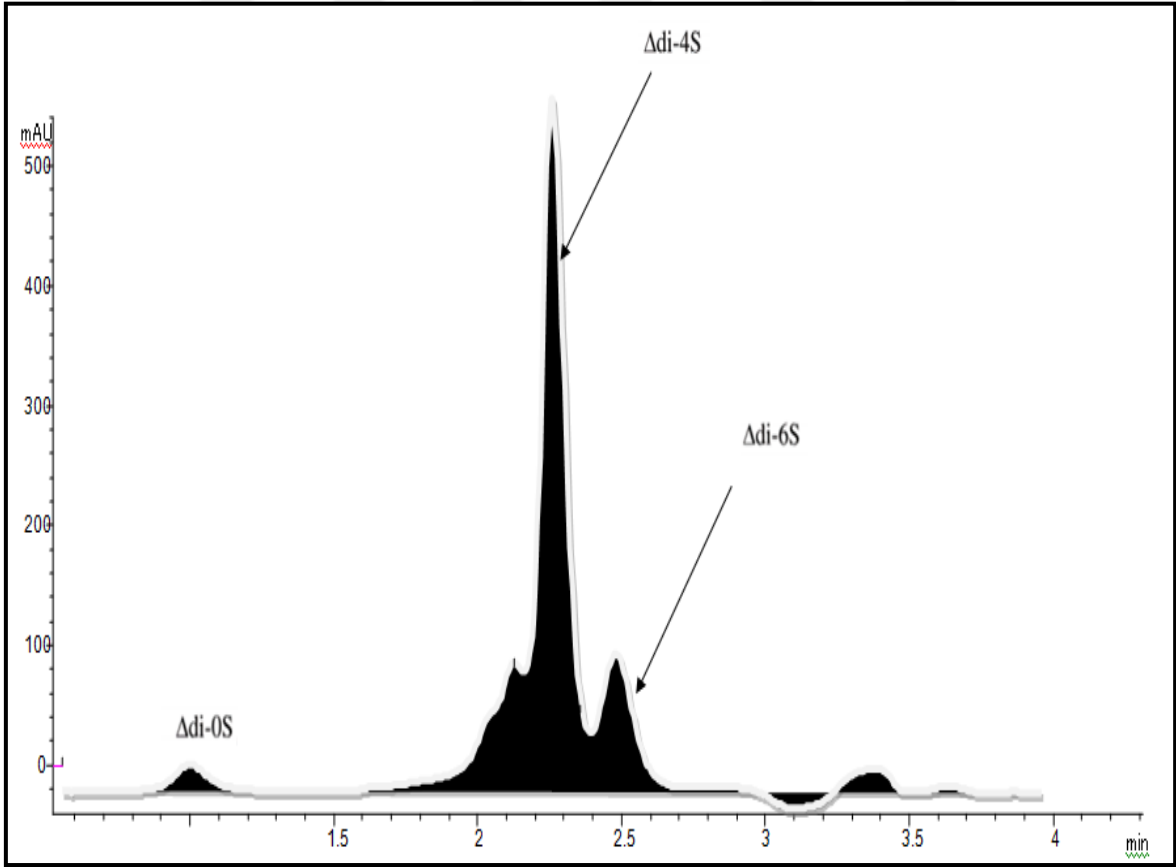


Şekil 3.6: *E.coli* pETM6-PACF-*vgb* HPLC grafiği



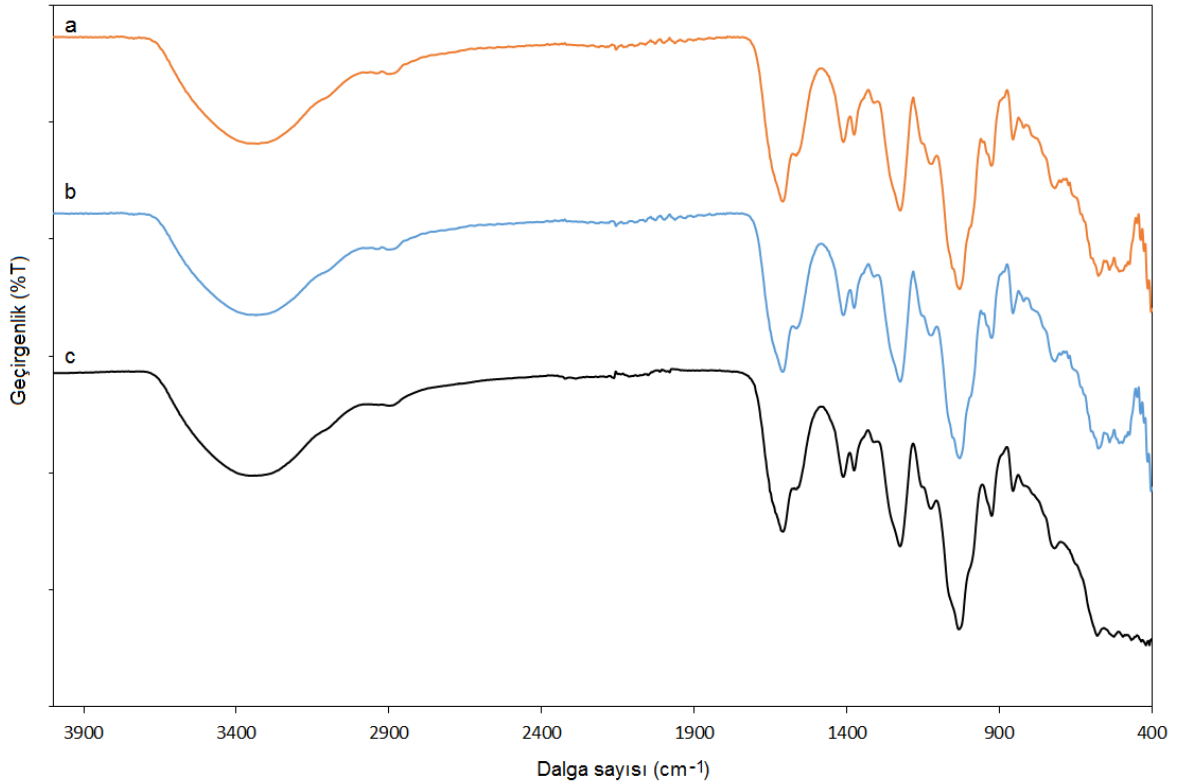
Şekil 3.7: *E.coli* pETM6-PACF HPLC grafiği

Çalışmamızda *E.coli* pETM6-PACF-*vgb* ve *E.coli* pETM6-PACF suşları ile ürettiğimiz Kondroitin Sülfat'ın HPLC analiz sonuçları yukarıdaki tabloda gösterilmiştir (Şekil 3.6, Şekil 3.7). Sığır trakesi kaynaklı kontrol ticari KS'ye ait HPLC analiz sonucu ise Şekil 3.8'de gösterilmiştir.



Şekil 3.8: Sığır trakesi kaynaklı kontrol ticari KS'ye ait HPLC analiz sonucu

### 3.5 FT-IR Sonuçları

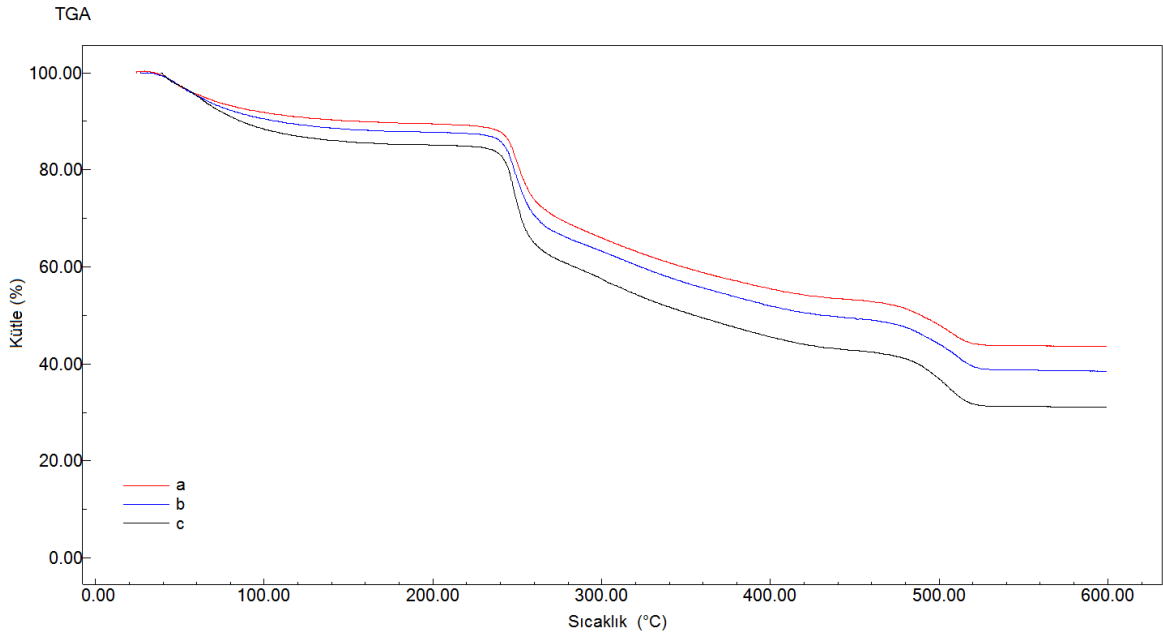


**Şekil 3.9:** a) *E.coli* pETM6-PACF kaynaklı KS b) *E.coli* pETM6-PACF-*vgb* kaynaklı KS  
c) Ticari KS FT-IR analiz sonuçları

*E.coli* pETM6-PACF-*vgb* suşu ve *E.coli* pETM6-PACF suşundan ürettiğimiz mikrobiyal kondroitin sülfat ve ticari kondroitin sülfata ait FT-IR Şekilde 3.9’da verilmiştir. Bu şekilde ticari kondroitin sülfat yapısında özellikle 3000-3600  $\text{cm}^{-1}$  aralığında geniş bir bant piki görüldü. Bu pik OH gruplarına ait serbest hidroksil ünitelerinin yapmış olduğu H bağından kaynaklanmaktadır. Ayrıca 2850-2950  $\text{cm}^{-1}$  aralığında alifatik CH gruplarına ait gerilme titreşimi görüldü. Karboksil gruplarından kaynaklı olarak 1600  $\text{cm}^{-1}$  geniş C=O piki tespit edildi. 1538  $\text{cm}^{-1}$  N-H gerilme piki görülmektedir. 1360-1398  $\text{cm}^{-1}$  CO gerilme titreşimi ve COO serbest gerilme titreşimi görüldü. Özellikle 1120 ve 1000  $\text{cm}^{-1}$  aralığında şiddetli bir bant piki olarak C eterik gerilme titreşimi tespit edildi. 538  $\text{cm}^{-1}$  amid piki ve yaklaşık 990  $\text{cm}^{-1}$  CO-NH pikleri kondroitin sülfat yapısını doğrulamaktadır.

Özellikle sülfat gruplarında kaynak olarak 1200  $\text{cm}^{-1}$  civarında çift bağ oksijen piki görülmektedir. Bu pikler referans alındığında üretilen kondroitin sülfat yapısına ait IR spektrumunda istenen yapının elde edildiğini doğrulamaktadır. Özellikle 1220  $\text{cm}^{-1}$  deki S=O pikinin görülmesi yapının sülfatlandığını net olarak koymaktadır. Sadece molekül

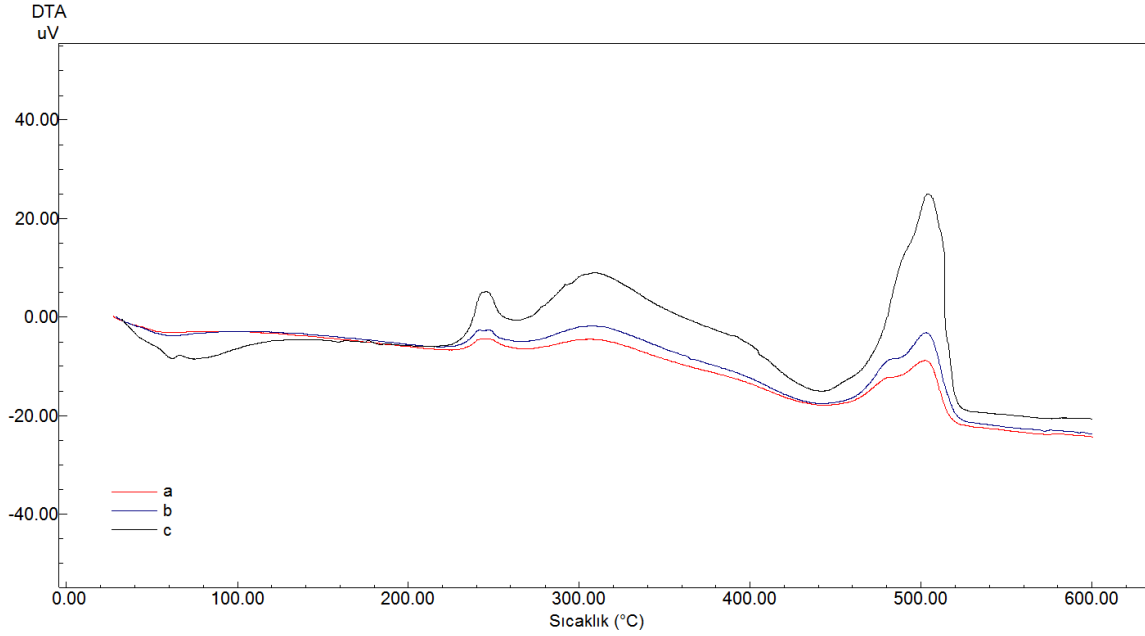
kütlesinin küçük olmasından yüzey OH sayısı düşüktür. Buna bağlı olarak 3000-3600  $\text{cm}^{-1}$  arasındaki H piklerinin titreşimi düşüktür. Diğer tüm pikler birbiri ile benzeşmekte ve yapıyı doğrulamaktadır. Bu molekül kütlesindeki düşüklük ise literatür ile uyumlu olarak beklenen bir sonuçtur. Ticari olarak kondroitin sülfat yapısı yüksek molekül kütlesine sahip olduğundan dolayı pikler daha belirgin ve şiddetlidir. Ayrıca 400 ve 538  $\text{cm}^{-1}$  civarında bant görünümünü almıştır. Bu büyük pik yapısı molekül kütlesindeki değişimi direk olarak göstermektedir. Ayrıca çalışmalar kısmında molekül kütlesindeki artışa bağlı olarak termal özelliklerde de belirgin değişiklikler söz konusudur. Bu nedenle elde edilen iki farklı kondroitin sülfat ve ticari kondroitin sülfat yapılarını termal özellikleri; termal kararlılıkları termogrametrik analiz (TGA), diferansiyel termal analiz (DTA) ve diferansiyel termal kalorimetre (DSC) kullanılarak tespit edildi. Bu analizlere ait sonuçlar Şekil 3.10, 3.11 ve 3.12’de verildi.



**Şekil 3.10:** a) *E.coli* pETM6-PACF kaynaklı KS b) *E.coli* pETM6-PACF-*vgb* kaynaklı KS c) Ticari KS Termogravimetrik Analiz Sonuçları

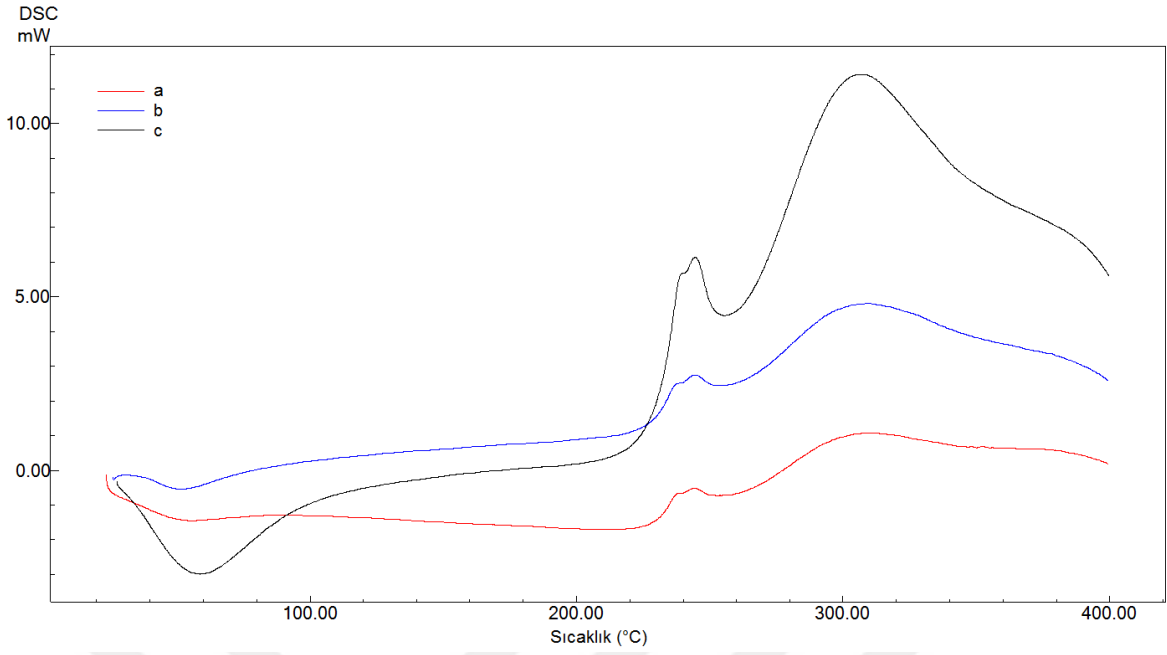
TGA termogramı incelendiğinde; *E.coli* pETM6-PACF-*vgb* suşu ve *E.coli* pETM6-PACF suşundan ürettiğimiz Mikrobiyal Kondroitin Sülfat ve Ticari Kondroitin Sülfat’a ait numunelerde 3 temel kütle kaybı görüldü. Birinci kütle kaybı yaklaşık 60-100 °C arasında görülmektedir ve yapısal nemin uzaklaşmasından kaynaklıdır. Yüzey hidrosillerinin miktarı arttıkça ilgili yapının nem bağlama özelliği artmaktadır. Bu nedenle ticari kondroitin sülfat molekül kütlesi büyük olduğundan dolayı yüzey hidroksil grup sayısı fazladır ve bu pikin şiddetini yaklaşık %18 kadar artmaktadır. İkinci kütle kaybı 250 ve 300 °C civarındadır.

Buna bağı olarak kondroitin sülfat yapısındaki yan grupların degradasyonundan kaynaklanmaktadır. Son kütle kaybı ise 400 °C ile 550 °C arasındadır ve yapının karbonizasyonunu gösterir. Tüm TGA figürler birbirine benzer yapıda olup üretilen Mikrobiyal Kondroitin Sülfatında termal stabilitesinin yaklaşık 200 °C civarında olduğunu göstermektedir.



**Şekil 3.11:** a) *E.coli* pETM6-PACF kaynaklı KS b) *E.coli* pETM6-PACF-vgb kaynaklı KS c) Ticari KS Diferansiyel termal analiz sonuçları

Şekil 3.11’deki DTA termogramı TGA’daki yorumlamayı güçlendirmektedir. 100 °C civarında olan düşüşler yapısal nemin uzaklaştığını göstermektedir. Mikrobiyal Kondroitin Sülfatlarda bu pik daha küçük olmakla birlikte ticari kondroitin sülfatta (c) daha yüksek pik düzeyi görülmüştür. 200 °C civarında başlayarak 450 °C ye kadar ve 450-500 °C civarında 4 adımlı bir bozunma yapısı söz konusudur. Bu bozunma kondroitin sülfatın yapısal gruplarının bozunmasından kaynaklanır. Örneğin; *N*-asetilgalaktozamin yapılarının degradasyonu, sülfat gruplarının degradasyonu karbon oksijen karbon bağının degradasyonu ve glukronik asit ünitelerinin degradasyonu olmak üzere 4 adet ünitenin degradasyonu görülmektedir. Ticari Kondroitin Sülfattaki piklerin şiddetinin fazla olması molekül kütesinin fazla olmasından kaynaklanmaktadır.



**Şekil 3.12:** a) *E.coli* pETM6-PACF kaynaklı KS b) *E.coli* pETM6-PACF-vgb kaynaklı KS c) Ticari KS Diferansiyel termal kalorimetre analiz sonuçları

Şekil 3.12’deki DSC termogramında çalışmamızda elde edilen mikrobiyal kondroitin sülfat ve ticari kondroitin sülfat yapılarının 30-400°C arasındaki değişimi görülmektedir. Burada mikrobiyal kondroitin sülfat (a,b) ve ticari kondroitin (c) sülfat yapılarının DSC’leri incelendiğinde kondroitin sülfat yapılarının düşük şiddetli ve benzer pikler gösterdiği görülmektedir. Bu nedenle her iki yapısında aynı kimyasal özelliği gösterdiği anlaşılmaktadır.



#### 4. TARTIŞMA

Metabolik mühendislikle; mikrobiyal metabolizma, doğal metabolitlerin üretimini artırmak veya doğal olmayan metabolitler üretmek için modifiye edilmektedir. Bu yaklaşımın avantajları; enzimatik sistemlerdeki pahalı substrat gerekliliğinin azalması ve kimyasal sentezde var olan çevreye zararlı kimyevi madde gerekliliğinin ortadan kalkması, hayvanlardan ekstraksiyonda mevcut olan türlerarası viral kontaminasyon riskinin elimine edilmesi olarak sayılabilir (Couto et al., 2022). Keşfedildiği tarihten günümüze kadar yapısı ve işlevi ile ilgili bir çok araştırmayla kapsamlı incelenmiş olan *Vitreoscilla* hemoglobinin (VHb)/ *vgb* gen ekspresyonunun, metabolik mühendislik çalışmaları ile oksijen verilmesini teşvik ederek oksijen gerektiren belirli metabolik yolların üretkenliğinin artırıldığı bilinmektedir. Bu özelliğiyle VHb, antibiyotiklerin üretimi ve mikroorganizmalar tarafından petrokimyasal ikamelerin, bitkilerde artan stres toleransına kadar çok çeşitli uygulamalarda kullanıldığı belirtilmiştir (Stark et al., 2012).

VHb, çamurlu su birikintileri gibi oksijenin tükenmiş olduğu ortamlarda zorunlu aerobik bakteri olan *Vitreoscilla*'nın hayatta kalmasını sağlamaktadır. Bu durum, çoğunlukla aerobik mikroorganizmaların tercih edildiği fermantasyon endüstrisinde, VHb'nin değerini göstermektedir. VHb; yüksek hücre yoğunluğunun olduğu fermentasyon işlemlerinde, sınırlı oksijen koşulları altında, hücre içi terminal oksidazlara oksijen transferini teşvik ederek solunum ve enerji metabolizmasını desteklemektedir (Park et al., 2002).VHb'nin *S. cerevisiae*'deki aerobik etkilerinin elektron taşıma zinciriyle bağlantılı olduğu belirtilmiş olup (Chen et al., 1994), VHb'nin aerobik koşullar altında *P. pastoris*'in canlılığını, biyokütlesini ve rekombinant protein üretimini arttırdığını gösterdiği belirtilmiştir (J. M. Wu & Fu, 2012).

VHb'nin CHO-K1 (CHO: Çin Hamster Ovaryum) hücre kültürü sırasında büyüme ve laktat birikimi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Çalışmada CHO-K1 hücrelerine; VHb veya yeşil floresan proteini (GFP) ekspresyonu için *vgb* veya *gfp* genini taşıyan plazmidler transfer edilmiştir. VHb ekspresyonu, glikoz ve glutamin üzerindeki spesifik büyüme oranını ve biyokütle verimini %60 oranında artırmış ve hücre başına üretilen laktat miktarını *gfp*

ekspresyonu kontrollerine kıyasla %40 oranında azaltmıştır. İmmüno floresan mikroskopisi, VHB'nin sitoplazmada ve organellerde dağıldığını göstermiştir; bu, VHB'nin oksijen taşıyıcısı olarak hizmet edebileceği ve aerobik solunumu artırabileceği hipotezini desteklemektedir (Juárez ve diğerleri, 2017) *Vitreoscilla* hemoglobin *Agrobacterium sp.* tarafından üretilen bir ekzopolisakkarit olan Salecan'ın üretimi için *Agrobacterium sp.* bakterisine *vgb* geni transforme edilerek yerleştirilmiş ve rekombinant *Agrobacterium sp. ZX09*'da Salecan üretim verimini %30 artırdığı kaydedilmiştir (Yun ve diğerleri, 2014).

Başka bir çalışmada E vitamini üretimi üzerinde çalışılmış ve VHB bulunduran suşun, VHB bulundurmeyen suşa göre yaklaşık 2 kat daha yüksek hücre dışı E vitamini üretimi gösterdiği belirtilmiştir (Giray, 2021).

Çalışmamızda daha önceden ekibimizce oluşturulmuş rekombinant *E.coli* pETM6-PACF-*vgb* ile *E.coli* pETM6-PACF'nin üreme düzeyleri için yaptığımız spektrofotometrik analizde; *E.coli* pETM6-PACF-*vgb* suşunun OD 600 absorbans değerlerinin, *E.coli* pETM6-PACF suşuna oranla daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Elde ettiğimiz kondroitin sülfat değerleri arasında *E.coli* pETM6-PACF-*vgb* suşunun, *E.coli* pETM6-PACF suşuna göre % 23.07'lük bir üretim artışı görülmüştür. Hücrelerde VHB'nin fonksiyon ve kompozisyon üzerindeki etkisi bir seri çalışmanın konusunu oluşturmuştur. Bu çalışmalarda VHB'nin daha etkin bir enerji sağlayıcı terminal oksidaz olan sitokrom oksidaz o'nun hücre içi seviyelerinde ve aktivitesinde artışa, sitoplazmik membran boyunca pH farkında artışa ve ATP yapım ve kullanımında artışa neden olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bu proteini bulunduran hücrelerin daha oksitlenmiş durumda bulunmaları, VHB'nin hücrelerin karbon metabolizması akış şemalarında önemli yeniden düzenlemelere sebep olması ile ilgilidir. Her ne kadar bunun nasıl sağlandığı kesin ortaya konmamışsa da, NAD<sup>+</sup>/NADH ve ADP/ATP oranlarında olan önemli değişimlerin esas teşkil ettiği sanılmaktadır. VHB içeren hücrelerde NADH seviyesinde düşüş ATP miktarında ise artış gözlenmektedir. Dolayısı ile NAD<sup>+</sup>/NADH ve ADP/ATP oranlarında meydana gelen önemli değişimler hücrenin karbon bileşiklerini kullanımı yollarında önemli değişime neden olmaktadır. Bu bağlamda VHB ekspresyonu yapan suşta gözlenen artışın bu tür bir metabolik akış şeması değişikliğinden olabileceği düşünülmektedir. Kondroitin bakteri hücrelerinin yapısal bir bileşenidir, bu nedenle biyokütledeki artış KS prosesi için oldukça önemlidir. Yüksek biyokütle yüksek kondroitin/KS üretimi anlamına gelmektedir. Çalışmamızda *vgb* etkisi net olarak gözlenmiş, yüksek kondroitin/KS oranı ile MKS üretim işlemine katkısı net olarak ortaya konmuştur. Geniş DNA fragmentlerinin aktarımı, artan plazmid büyüklükleri çoğu zaman bakteri

metabolizmasını yavaşlatmaktadır. İlgili gen ekspresyonu hücre bazda etkilenmemekte ancak kültür süresi kısalmaktadır. *vgb* geni ve oluşan VHb proteini Rekombinant DNA teknolojisinin bu handikapı için ideal bir çözüm sunmaktadır. Çalışmamız, bu konuda literatüre kayda değer bir katkı sunmaktadır.

Çalışmamızda elde ettiğimiz bu değerler, literatürde zengin bir geçmişi olan *vgb* geninin kondroitin/ kondroitin sülfat üretimine ilişkin ilk verileri olma özelliğindedir. Tezimiz, literatürde genel olarak ifade edilen *vgb*'nin fermantasyon proseslerine olan yüksek katkısının doğrulandığı bir çalışma olmuştur.



## 5. SONUÇ

KS, yıllardır en etkili nutrasötik satış listesinde yer almaktadır(J. Wang et al., 2016). Rapor edilen çok yönlü metabolik katkıları ile etkin bir sitoprotektif olan KS'nin küresel farmakoloji pazarındaki yeri gittikçe artmaktadır. Küresel KS pazar büyüklüğünün; bir araştırma şirketinin yayınladığı rapora göre, 2022'de 1,17 milyar ABD doları değerinde olduğu rapor edilmiş ve 2022'den 2028'e kadar %3,0 yıllık bileşik büyüme oranında büyümesinin beklendiği bildirilmiştir (<http://www.grandviewresearch.com/>). Tüm dünyada artan vegan ürün eğilimi ve yıllardır mevcut olan helal tüketim tercihi MKS gibi mikrobiyal ürünleri oldukça değerli kılmaktadır. Hayvansal kaynakların taşıdığı viral ve prionik riskler de mikrobiyal ürün tercihinin bilimsel bir anlam katmaktadır. KS üretimi ile ilgili küresel pazarın ulaştığı boyut, inanış ve yaşayış biçimlerine göre KS kaynağı tercihi göz önünde bulundurulduğunda mikrobiyal üretim, diğer kondroitin sülfat kaynaklarına göre daha fazla sürdürülebilir görülmektedir.

Sanayileşme ve artan dünya nüfusuna bağlı olarak klasik endüstri yöntemlerinin yerini biyoteknolojik yöntemlere bıraktığı görülmektedir. Biyoteknolojik yöntemler, gelişen teknolojik imkanlar doğrultusunda, GAG'ların ve oligosakkaritlerin üretimi için de alternatifler sunmaktadır. Biyoteknolojik gelişmelere paralel olarak ilerleyen mikrobiyal sentez çalışmaları; enzimatik ve kimyasal sentez süreçlerinde var olan pahalı substratların kullanılması, çevreye zararlı kimyasal kullanımı, enfeksiyon ve kontaminasyon riski, deneysel süreçleri kontrol etmekten kaynaklanan çeşitli zorlukları ortadan kaldırmaktadır.

VHb, mikrobiyal üretimde uygulanan metabolik mühendislik çalışmalarında, hücre büyümesini, ürün sentezini ve stres toleransını artırabildiğinden, yaygın olarak uygulanmaktadır. Son yıllarda, biyoinformatik ve sentetik biyolojinin gelişmesiyle birlikte, VHb'nin fizikokimyasal özelliği ve metabolik düzenleyici etkileri keşfedilmiştir ve çeşitli konaklarda VHb'nin ekspresyon seviyesini arttırmak için birçok çalışma yapılmıştır. Tezimiz bu yaklaşımların devamı olarak oldukça özel bir ürün olan sitoprotektif etkiye sahip, KS molekülünün mikrobiyal üretiminde *vgb* gen etkisini araştırmış ve elde edilen verilerle

MKS üretimine yüksek bir katkı sağladığı sonucuna ulaşmıştır. Bu sonuç, ekibimizin sonraki çalışmaları ve bu konuda araştırmalar yapan diğer bilim insanları için yol gösterici olacaktır.



## KAYNAKÇA

- Abdallah, M. M., Fernández, N., Matias, A. A. ve Bronze, M. do R. (2020). Hyaluronic acid and Chondroitin sulfate from marine and terrestrial sources: Extraction and purification methods. *Carbohydrate Polymers*, 243, 116441. doi:10.1016/J. CARBPOL. 2020.116441
- Aydın, S., Kılıç, N. (2000). Bakteriyel Hemoglobin Vitreoscilla Hemoglobin. *Türk Biyokimya Dergisi*, 25(4), 152–157.
- Badri, A., Williams, A., Awofiranye, A., Datta, P., Xia, K., He, W., ... Koffas, M. A. G. (2021). Complete biosynthesis of a sulfated chondroitin in *Escherichia coli*. *Nature Communications*, 12(1), 1–10. doi:10.1038/s41467-021-21692-5
- Bougatef, H., Krichen, F., Capitani, F., Amor, I. ben, Maccari, F., Mantovani, V., ... Sila, A. (2018). Chondroitin sulfate/dermatan sulfate from corb (*Sciaena umbra*) skin: Purification, structural analysis and anticoagulant effect. *Carbohydrate Polymers*, 196(April), 272–278. doi:10.1016/j.carbpol.2018.05.019
- Cai, C., Solakyildirim, K., Yang, B., Beaudet, J. M., Weyer, A., Linhardt, R. J. ve Zhang, F. (2012). Semi-synthesis of chondroitin sulfate-E from chondroitin sulfate-A. *Carbohydrate polymers*, 87(1), 822. doi:10.1016/J.CARBPOL.2011.08.075
- Chen, W., Hughes, D. E. ve Bailey, J. E. (1994). Intracellular Expression of Vitreoscilla Hemoglobin Alters the Aerobic Metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Progress*, 10(3), 308–313. doi:10.1021/BP00027A011
- Chen, Y. mei, Xu, H. yang, Wang, Y., Zhang, J. fa ve Wang, S. ming. (2014). Vitreoscilla hemoglobin promotes Salecan production by *Agrobacterium* sp. ZX09. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 15(11), 979. doi:10.1631/JZUS.B1400123
- Couto, M. R., Rodrigues, J. L. ve Rodrigues, L. R. (2022). Heterologous production of chondroitin. *Biotechnology Reports*, 33, e00710. doi:10.1016/J.BTRE.2022.E00710
- Cress, B. F., Englaender, J. A., He, W., Kasper, D., Linhardt, R. J. ve Koffas, M. A. G. (2014). Masquerading microbial pathogens: Capsular polysaccharides mimic host-tissue molecules. *FEMS Microbiology Reviews*, 38(4), 660–697. doi:10.1111/1574-6976.12056
- de Oliveira, G. B., do Vale, A. M., dos Santos, A. C., de Moura, C. E. B., Rocha, H. A. de O. ve de Oliveira, M. F. (2015). Composition and significance of glycosaminoglycans in the uterus and placenta of mammals. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 58(4), 512–520. doi:10.1590/S1516-8913201500281
- DeAngelis, P. L. (2002). Microbial glycosaminoglycan glycosyltransferases. *Glycobiology*, 12(1), 9R-16R. doi:10.1093/GLYCOB/12.1.9R
- Diehl, V., Huber, L. S., Trebicka, J., Wygrecka, M., Iozzo, R. v. ve Schaefer, L. (2021). The Role of Decorin and Biglycan Signaling in Tumorigenesis. *Frontiers in oncology*, 11. doi:10.3389/FONC.2021.801801
- Erenler, A. S., (2019). Capsular Polysaccharide Biosynthesis from Recombinant *E. coli* and Chondroitin Sulfate Production, *Cellular and molecular biology*, 65(6), 17–21.
- Erenler, A. S., Geckil, H., Karabulut, A. B., Akpolat, N., Sevimli, R., Ulke, E., Aliyeva, A. (2019). Cloning and Expression *vgb-kfo* Genes in *E. coli* and Microbial Chondroitin Sulfate Production, *Science of Advanced Materials*, 11(12), 1745-1754.

- Frantz, C., Stewart, K. M. ve Weaver, V. M. (2010). The extracellular matrix at a glance. *Journal of Cell Science*, 123(123), 4195–4200. doi:10.1242/jcs.023820
- Giray, A. (2021). Production of vitamin A and vitamin E: expression of vitreoscilla hemoglobin gene in *Erwinia herbicola*. <https://doi.org/10.1080/10826068.2021.2004548>. doi:10.1080/10826068.2021.2004548
- Guo, Z., Tan, H., Lv, Z., Ji, Q., Huang, Y., Liu, J., ... Zhang, L. (2018). Targeted expression of *Vitreoscilla* hemoglobin improves the production of tropane alkaloids in *Hyoscyamus niger* hairy roots. *Scientific reports*, 8(1). doi:10.1038/S41598-018-36156-Y
- Han, W., Li, Q., Lv, Y., Wang, Q. C. ve Zhao, X. (2018). Preparation and structural characterization of regioselective 4-O/6-O-desulfated chondroitin sulfate. *Carbohydrate Research*, 460, 8–13. doi:10.1016/J.CARRES.2018.01.010
- He, W., Zhu, Y., Shirke, A., Sun, X., Liu, J., Gross, R. A., ... Li, M. (2017). Expression of chondroitin-4-O-sulfotransferase in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(18), 6919–6928. doi:10.1007/s00253-017-8411-5
- Higashi, K., Okamoto, Y., Mukuno, A., Wakai, J., Hosoyama, S., Linhardt, R. J. ve Toida, T. (2015). Functional chondroitin sulfate from *Enterocypris doylei* containing a 3-O-sulfo glucuronic acid residue. *Carbohydrate Polymers*, 134, 557–565. doi:10.1016/j.carbpol.2015.07.082
- Iozzo, R. v. ve Schaefer, L. (2015). Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans. *Matrix Biology*, 42, 11–55. doi:10.1016/J.MATBIO.2015.02.003
- Ji, Y., Zhang, S., Qiao, M., Jiao, R., Li, J., Song, P., ... Huang, H. (2020). Synthesis of structurally defined chondroitin sulfate: Paving the way to the structure-activity relationship studies. *Carbohydrate Polymers*, 248(July). doi:10.1016/j.carbpol.2020.116796
- Juárez, M., González-De la Rosa, C. H., Memún, E., Sigala, J. C. ve Lara, A. R. (2017). Aerobic expression of *Vitreoscilla* hemoglobin improves the growth performance of CHO-K1 cells. *Biotechnology journal*, 12(3). doi:10.1002/BIOT.201600438
- Jun-ichi, T. H. T. A. N. N. T. (2013). Synthesis of a novel trisaccharide unit of chondroitin sulfate with a fucose branch | Elsevier Enhanced Reader. *Tetrahedron Letters* . <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0040403913008320?token=FB138903D7E722679D73CE66B36B0AC9A8D1C4086E3A2D72AA8FC8488D761B1DB8A28638573F392224AF6B74B0BD2C31&originRegion=eu-west-1&originCreation=20211221180058> adresinden erişildi.
- Khwaldia, K. (2018). *Chondroitin and glucosamine. Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements*. Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-812491-8.00004-7
- Klaus, J., & Klaus, B. (1992). Capsules of *Escherichia coli*, expression and biological significance. *Canadian Journal of Microbiology*, 705-710.
- Koffas, M. A. G., Linhardt, R. J., Cimini, D., Restaino, O. F. ve Schiraldi, C. (2018). Microbial production and metabolic engineering of chondroitin and chondroitin sulfate. *Emerging Topics in Life Sciences*, 2(3), 349–361. doi:10.1042/ETLS20180006

- Koike, T., Izumikawa, T., Tamura, J. I. ve Kitagawa, H. (2012). Chondroitin sulfate-E fine-tunes osteoblast differentiation via ERK1/2, Smad3 and Smad1/5/8 signaling by binding to N-cadherin and cadherin-11. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 420(3), 523–529. doi:10.1016/J.BBRC.2012.03.024
- Lindahl, U. ve Rodén, L. (1966). The chondroitin 4-sulfate-protein linkage. *Journal of Biological Chemistry*, 241(9), 2113–2119. doi:10.1016/s0021-9258(18)96674-3
- Listik, E., Azevedo Marques Gaschler, J., Matias, M., Neuppmann Feres, M. F., Toma, L. ve Raphaelli Nahás-Scocate, A. C. (2019). Proteoglycans and dental biology: the first review. *Carbohydrate Polymers*, 225(May). doi:10.1016/j.carbpol.2019.115199
- Maza, S., Mar Kayser, M., MacChione, G., López-Prados, J., Angulo, J., de Paz, J. L. ve Nieto, P. M. (2013). Synthesis of chondroitin/dermatan sulfate-like oligosaccharides and evaluation of their protein affinity by fluorescence polarization. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 11(21), 3510–3525. doi:10.1039/C3OB40306H
- Mellai, M., Annovazzi, L., Bisogno, I., Corona, C., Crociara, P., Iulini, B., ... Schiffer, D. (2020). Chondroitin Sulphate Proteoglycan 4 (NG2/CSPG4) Localization in Low- and High-Grade Gliomas. *Cells 2020, Vol. 9, Page 1538*, 9(6), 1538. doi:10.3390/CELLS9061538
- Mikami, T. ve Kitagawa, H. (2013). Biosynthesis and function of chondroitin sulfate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1830(10), 4719–4733. doi:10.1016/J.BBAGEN.2013.06.006
- Mouw, J. K., Ou, G. ve Weaver, V. M. (2014). Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. *Nature Publishing Group*, 15, 771. doi:10.1038/nrm3902
- Nemoto, W., Yamada, K., Nakagawasai, O., Ogata, Y., Chiba, M., Yamagata, R., ... Tanno, K. (2018). Effect of repeated oral administration of chondroitin sulfate on neuropathic pain induced by partial sciatic nerve ligation in mice. *Journal of Pharmacological Sciences*, 137(4), 403–406. doi:10.1016/j.jpsh.2018.03.003
- Pan, J., Qian, Y., Zhou, X., Pazandak, A., Frazier, S. B., Weiser, P., ... Zhang, L. (2010). Oversulfated chondroitin sulfate is not the sole contaminant in heparin. *Nature Biotechnology*, 28(3), 203–207. doi:10.1038/nbt0310-203
- Park, K. W., Kim, K. J., Howard, A. J., Stark, B. C. ve Webster, D. A. (2002). Vitreoscilla hemoglobin binds to subunit I of cytochrome bo ubiquinol oxidases. *The Journal of biological chemistry*, 277(36), 33334–33337. doi:10.1074/JBC.M203820200
- Prydz, K. ve Dalen, K. T. (2000). Synthesis and sorting of proteoglycans. *Journal of Cell Science*, 113(2), 193–205. doi:10.1242/JCS.113.2.193
- Rinaldi, A. C., Bonamore, A., Maccone, A., Boffi, A., Bozzi, A. ve di Giulio, A. (2006). Interaction of Vitreoscilla hemoglobin with membrane lipids. *Biochemistry*, 45(13), 4069–4076. doi:10.1021/BI052277N/ASSET/IMAGES/BI052277N.SOCIAL.JPEG\_V03
- Sarita Mishra and Munia Ganguli. (2021). Functions of, and replenishment strategies for, chondroitin sulfate in the human body. *Drug Discovery Today*, 26(5), 1185–1199. doi:10.1016/J.DRUDIS.2021.01.029
- Schiraldi, C., Cimini, D. ve de Rosa, M. (2010). Production of chondroitin sulfate and chondroitin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(4), 1209–1220. doi:10.1007/s00253-010-2677-1



- Shi, Y., Meng, Y., Li, J., Chen, J., Liu, Y. ve Bai, X. (2014). Chondroitin sulfate: extraction, purification, microbial and chemical synthesis. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 89(10), 1445–1465. doi:10.1002/JCTB.4454
- Stark, B. C., Dikshit, K. L. ve Pagilla, K. R. (2012). THE BIOCHEMISTRY OF VITREOSCILLA HEMOGLOBIN. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 3(4), e201210002. doi:10.5936/CSBJ.201210002
- Stark, B. C., Pagilla, K. R. ve Dikshit, K. L. (2015). Recent applications of Vitreoscilla hemoglobin technology in bioproduct synthesis and bioremediation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(4), 1627–1636. doi:10.1007/s00253-014-6350-y
- Sugahara, K. ve Kitagawa, H. (2000). Recent advances in the study of the biosynthesis and functions of sulfated glycosaminoglycans. *Current Opinion in Structural Biology*, 10(5), 518–527. doi:10.1016/S0959-440X(00)00125-1
- Takemura, M., Noborn, F., Nilsson, J., Bowden, N., Nakato, E., Baker, S., ... Nakatoa, H. (2020). Chondroitin sulfate proteoglycan Windpipe modulates Hedgehog signaling in Drosophila. *Molecular biology of the cell*, 31(8), 813–824. doi:10.1091/MBC.E19-06-0327
- Theocharis, A. D., Skandalis, S. S., Gialeli, C. ve Karamanos, N. K. (2016). Extracellular matrix structure. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 97, 4–27. doi:10.1016/J.ADDR.2015.11.001
- Ustyuzhanina, N. E., Bilan, M. I., Dmitrenok, A. S., Nifantiev, N. E. ve Usov, A. I. (2018). Fucosylated chondroitin sulfates from the sea cucumbers *Holothuria tubulosa* and *Holothuria stellati*. *Carbohydrate Polymers*, 200, 1–5. doi:10.1016/J.CARBPOL.2018.07.035
- Üçgül, İ., Aras, S. ve Elibüyük, U. (2018). Ekstraselüler Matris Yapısı ve Görevleri. *Uludağ University Journal of The Faculty of Engineering*, 23(1), 295–310. doi:10.17482/uumfd.327376
- Veeramachineni, V., Vionnet, J., Ming, S. A. ve Vann, W. F. (2021). In: Glycome: The Hidden Code in Biology Bacterial Capsular Polysaccharides of Pathogens-A Toolbox for Vaccines and Therapeutics <https://www.researchgate.net/publication/354762538> adresinden erişildi.
- Volpi, N. (n.d.). molecules Chondroitin Sulfate Safety and Quality. doi:10.3390/molecules24081447
- Wakabayashi, S., Matsubara, H. ve Webster, D. A. (1986). Primary sequence of a dimeric bacterial haemoglobin from *Vitreoscilla*. *Nature* 1986 322:6078, 322(6078), 481–483. doi:10.1038/322481a0
- Wang, J., Guleria, S., Koffas, M. A. G. ve Yan, Y. (2016). Microbial production of value-added nutraceuticals. *Current Opinion in Biotechnology*, 37, 97–104. doi:10.1016/j.copbio.2015.11.003
- Webster, D. A. ve Hackett, D. P. (1966). The purification and properties of cytochrome o from *Vitreoscilla*. *The Journal of biological chemistry*, 241(14), 3308–3315. doi:10.1016/s0021-9258(18)96464-1
- Whitfield, C., Wear, S. S. ve Sande, C. (2020). Assembly of Bacterial Capsular Polysaccharides and Exopolysaccharides. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-011420-075607>, 74, 521–543. doi:10.1146/ANNUREV-MICRO-011420-075607

- Willis, L. M. ve Whitfield, C. (2013). Structure, biosynthesis, and function of bacterial capsular polysaccharides synthesized by ABC transporter-dependent pathways. *Carbohydrate Research*, 378, 35–44. doi:10.1016/J.CARRES.2013.05.007
- Wu, J. M. ve Fu, W. C. (2012). Intracellular co-expression of *Vitreoscilla* hemoglobin enhances cell performance and  $\beta$ -galactosidase production in *Pichia pastoris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 113(3), 332–337. doi:10.1016/J.JBIOOSC.2011.10.014
- Wu, Q., Yang, A., Zou, W., Duan, Z., Liu, J., Chen, J. ve Liu, L. (2013). Transcriptional engineering of *Escherichia coli* K4 for fructosylated chondroitin production. *Biotechnology progress*, 29(5), 1140–1149. doi:10.1002/BTPR.1777
- Xu, P., Yu, B., Zhang, L. ve Liu, B. (2020). Chemical synthesis of fucosylated chondroitin sulfate oligosaccharides. *Journal of Organic Chemistry*, 85(24), 15908–15919. doi:10.1021/ACS.JOC.0C01009/SUPPL\_FILE/JO0C01009\_SI\_001.PDF
- Yılmaz, M. ve Çelik, G. Y. (n.d.). Bakteriye Ekstraselüler Polisakkaritler (EPS) 1 EPS' in Genel Özellikleri. [www.mikrobiyoloji.org/pdf/702070202.pdf](http://www.mikrobiyoloji.org/pdf/702070202.pdf) adresinden erişildi.
- Yu, F., Zhao, X., Wang, Z., Liu, L., Yi, L., Zhou, J., ... Du, G. (2021a). Recent Advances in the Physicochemical Properties and Biotechnological Application of *Vitreoscilla* Hemoglobin. *Microorganisms* 2021, Vol. 9, Page 1455, 9(7), 1455. doi:10.3390/MICROORGANISMS9071455
- Yu, F., Zhao, X., Wang, Z., Liu, L., Yi, L., Zhou, J., ... Du, G. (2021b). Recent Advances in the Physicochemical Properties and Biotechnological Application of *Vitreoscilla* Hemoglobin. *Microorganisms*, 9(7). doi:10.3390/MICROORGANISMS9071455
- 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.
- Zhang, H., Feng, Y., Cui, Q. ve Song, X. (2017). Expression of *Vitreoscilla* hemoglobin enhances production of arachidonic acid and lipids in *Mortierella alpina*. *BMC biotechnology*, 17(1). doi:10.1186/S12896-017-0388-8
- Zhang, L. (2010). Glycosaminoglycan (GAG) Biosynthesis and GAG-Binding Proteins. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 93(C), 1–17. doi:10.1016/S1877-1173(10)93001-9
- Zhang, Q., Yao, R., Chen, X., Liu, L., Xu, S., Chen, J. ve Wu, J. (2018). Enhancing fructosylated chondroitin production in *Escherichia coli* K4 by balancing the UDP-precursors. *Metabolic Engineering*, 47(March), 314–322. doi:10.1016/j.ymben.2018.04.006
- Zhou, Z., Li, Q., Huang, H., Wang, H., Wang, Y., Du, G., ... Kang, Z. (2018). A microbial–enzymatic strategy for producing chondroitin sulfate glycosaminoglycans. *Biotechnology and Bioengineering*, 115(6), 1561–1570. doi:10.1002/bit.26577

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı:** Ahmet Faruk CEYLAN

## EĞİTİM BİLGİLERİ

**Lisans** : İnönü Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü (2010-2015)

