

TEKNOFEST

HAVACILIK, UZAY VE TEKNOLOJİ FESTİVALİ BİYOTEKNOLOJİ İNOVASYON YARIŞMASI

PROJE DETAY RAPORU

TAKIM ADI

GriENZymes

PROJE ADI

Biyokütleden Biyoyakıt Üretimine Yeni Nesil Biyoteknolojik

Katkılar

BAŞVURU ID

399176

KATEGORİ

FİKİR KATEGORİSİ

1. Proje Özeti (Proje Tanımı)

Enzimler biyolojik sistemlerde meydana gelen reaksiyonların çoğunu sağlayan biyolojik katalizörlerdir. Oldukça spesifik biyokimyasal transformasyonları icra etmeleri endüstriyel proseslerde kullanımını artırmaktadır. Lignoselülozik enzimler polimer şekerleri parçalayabilme kapasitesindeki hidrolitik enzimlerdir. Bu enzimler enzim aracılı bir süreç olan biyokütleden biyoyakıt üretiminde selüloz tabanlı oligosakkaritlerden monomerik şekerler üreterek biyokütle hidrolizinde anahtar rol oynar. Bu enzimlerin biyoyakıt üretimi haricinde tekstil, gıda, hayvancılık içecek ve medikal endüstrisi doğrudan kullanılmaktadır. Son yıllarda, alternatif enerji kaynağı olarak lignoselülozdan etanol üretiminde kullanılan enzimlerin yetersiz kalması, iyileştirmeye açık yönlerinin bulunması ve geleneksel biyoetanol üretiminde uygulanan yöntemlerin çevreye verdiği zarar nedeniyle uygulamalar, lignoselülozik enzimlerin muamelesine yönelmiştir. Böylece selüloz, hemiselüloz ve lignin polimerlerinin sakkarifikasyonu sağlanmış olduğundan bu durum enzimlere endüstriyel talebi artırmıştır. Ülkemizde enzim üretimi üzerine son birkaç yılda bazı girişimler olsa da enzimlerin çeşitliliği göz önüne alındığında henüz alınması gereken önemli mesafelerin olduğu aşikârdır. Bu sebeple lignoselülozik polimerlerin hidrolizinde gerek endüstriyel bir katalizör olarak kullanımı, gerekse gıda, tarım, yem sanayii ve sağlık alanındaki öneminden dolayı proje önerisinde Ekzo-1,4-β-D-Glukanaz, β-Glukosidaz, Endo-1,4-β-D-Glukanaz, β-1,4-Endoksilanaz, β-1,4-Ksilosidaz, β-Endomannanazlar (Glukuronidaz), Lakkaz, Lignin Peroksidaz, Mangan Peroksidaz enzimlerinin rekombinant olarak üretilmesi hedeflenmektedir. Türkiye’de bu enzimlere olan gereksinim ithalat yoluyla karşılanmaktadır. Bu enzimlerin yerli üretilmesi ile ulusal ölçekte bir eksikliğin giderilmesine katkı sağlanacaktır. Proje fikrimizde belirtilen enzimlerin, vektörler aracılığıyla E. coli ekspresyon sisteminde yüksek saflıkta, yüksek aktivitede, yüksek stabilitede ve düşük maliyetli yerli üretimi amaçlanmaktadır. Projede ilk olarak üretimi hedeflenen proteinleri kodlayan genler biyoinformatik çalışmalar sonucunda tasarlanıp ticari olarak sentezlettirilecektir. Bir vektör içerisinde gelen genin E.coli DH5Alpha hücrelerine transformasyonu yapılacaktır. Ardından proteinlerin üretimi için uygun hücrelere (E.coli BL21 pLysE hücrelerine) transformasyonu yapılarak proteinler üretilecektir. Üretilen proteinler afinite kolon kromatografisi yöntemiyle saflaştırılacak ve aktivite tayini yapılacaktır. Son olarak üç farklı enzim kokteyli oluşturulacaktır.

2. Problem/Sorun:

Dünya’da genel olarak enerji tüketiminde yenilenemeyen enerji kaynakları hakimdir. Dünya enerji tüketiminin yaklaşık yüzde seksenini fosil yakıtlar oluşturmaktadır. Uluslararası Enerji Ajansı (2020b) verilerine göre, tüm enerji tüketiminin sadece yüzde yirmisi yenilenebilir temiz enerji kaynaklarından yararlanılmaktadır. Bu sebeple enerjinin arz güvenliği için kaynaklarını çeşitlendirilmesi çok önemlidir. Küresel enerji tüketiminin, 2035 yılına gelindiğinde 1998 yılında tüketilen enerji miktarının iki katı, 2055 yılında ise üç katı olacağı öngörülmektedir. Bu kapsamda, zaman açısından “sürdürülebilir” olmakla birlikte dünyanın her bölgesinde var olabilme özelliğini de taşıyan yenilenebilir enerji kaynaklarına yönelmek ve bu konuda yatırım

yapmak gerekmektedir.

Dünyada ve ülkemizde yenilenebilir enerji olarak biyoetanol üretimi yapılmaktadır. Hammadde olarak selüloz içeren fabrika atıkları, evsel atıklar, bitkisel atıklar ve biyoetanol üretimi için yetiştirilmiş bitkiler kullanılmaktadır. Bu hammaddelerin işlenmesinde doğrudan yakma, piroliz (Selülozik atıkların anaerobik ortamda yüksek sıcaklıkta işlenmesi), gazlaştırma ve anaerobik ortamda işleme (Biyokütlenin oksijensiz ortamda çürütülerek parçalanması) yöntemleri kullanılmaktadır. Fakat bu yöntemler lignoselülozik polimerlerin parçalanmasında yetersiz kalmaktadır. Ayrıca bu tekniklerin kullanımı sonucu ortama fazla miktarda ısı, karbondioksit ve kullanılan kimyasalların salınımı gerçekleşmektedir. Ardından hava kirliliği, kimyasallardan dolayı toprak kirliliği ve sera gazı emisyon miktarı artmaktadır. Biyokütleden yenilenebilir enerji elde edilirken diğer taraftan da çevreye zarar verilmektedir. Bu zarar fosil yakıtların kullanımıyla ortaya çıkan zarara benzemekte ve biyokütle enerjisinin farkındalığını azaltmaktadır.

3. Çözüm

Enerji eldesine yenilenebilir enerji kaynaklarının kullanımı gelişmiş ülkelerle birlikte ülkemizde de yıldan yıla artmaktadır. Bu durum enerji problemlerine yönelik alternatif çözümler üretmemizi gerektirmektedir (Horuz vd.2015). Bu sebeple, ana enerji kaynağı olarak fosil yakıtların yerini alacak en avantajlı seçenek biyoyakıtlar olacaktır. Birinci nesil biyoyakıtlar toplu olarak, gıda kaynaklarından elde edilen bu biyoyakıtlardır. Birinci nesil biyoyakıtların birçok faydası olmasına rağmen, bu biyoyakıtların hammaddelerinin üretimine yer açmak için biyolojik çeşitlilik açısından zengin ve nesli tükenmekte olan tropik ormanlar feda edilmektedir. Birinci nesil biyoyakıtlarla ilgili tartışmalara yol açan bu konular doğrultusunda, uygun ana enerji arzı kaynağı olarak görülmemektedir. Bu doğrultuda özellikle ikinci nesil biyoyakıt olan biyoetanol, günümüzde mevcut olan en iyi seçenek olarak görülmektedir. Bu ikinci nesil biyoetanol, hammadde olarak sadece dünya genelinde kolayca erişilebilen ve maliyeti düşük olan selülozik biyokütle gerektirir (Tan vd.,2018).

Proje önerimizde yenilenebilir enerji olan biyoetanol üretiminde yeni nesil bir yöntem olan enzim aracılı biyoteknolojik yöntemin kullanılmasıyla polimer şekerler daha iyi hidrolize edilecek ve yüksek verimde üretim yapılacaktır. Enzimlerin yerli üretimi sağlanarak maliyet düşürülecek ve daha verimli biyoetanol üretimi gerçekleştirilecektir. Enzimlerin kullanılması sayesinde eski yöntemlerin çevreye verdiği zarar ortadan kaldırılacaktır. Çevreye verilen ısı ve karbondioksit miktarının azaltılmasıyla sera gazı emisyon değeri düşürülecektir. Hammadde olarak maddi değeri olmayan lignoselülozik yapıdaki ayçiçeği sapı kullanılarak tarım arazilerindeki hasat sonrası artıklar değerlendirilecek ve artıkların çevreye verdiği zarar ortadan kaldırılacaktır.

Proje fikrimizde belirtilen enzimlerin, vektörler aracılığıyla *E.coli* ekspresyon sisteminde yüksek saflıkta, yüksek aktivitede, yüksek stabilitede ve düşük maliyetli yerli üretimi amaçlanmaktadır. Projede ilk olarak üretimi hedeflenen proteinleri kodlayan genler biyoinformatik çalışmalar sonucundan tespit edilerek sipariş edilecektir. Bir vektör içerisinde gelen gen uygun restriksiyon enzimleriyle kesilerek jelden izolasyonu yapılacaktır ve aynı

restriksiyon enzimleri ile kesimi yapılan vektör ile ligasyon (birleştirme) işlemi gerçekleştirilip *E.coli* DH5 α hücrelerine transformasyonu yapılacaktır. Uygun şekilde birleşmiş plazmitlerin jelden izolasyonu sağlanacak ve ardından proteinlerin üretilmesi için uygun hücrelere (*E.coli* BL21 pLysE hücrelerine) transformasyonu yapılacaktır. Ardından protein üretilecektir. Üretilen proteinler afinite kolon kromatografisi yöntemiyle saflaştırılacak ve aktivite tayini yapılacaktır. Son olarak da ayçiçeği sapındaki selüloz, hemiselüloz ve lignin polimerlerini hidrolize edecek spesifik 3 enzim kokteyli oluşturulacaktır.

4. Yöntem

1. Hedef Genin Belirlenmesi

Ekzo-1,4- β -D-Glukanaz, β -Glukosidaz, Endo-1,4- β -D-Glukanaz, β -1,4-Endoksilanaz, β -1,4-Ksilosidaz, β -Endomannanazlar (Glukuronidaz), Lakkaz, Lignin Peroksidaz, Mangan Peroksidaz enzimlerini kodlayan gen dizileri gerekli literatür taramaları yapılarak NCBI veri tabanından elde edilecektir. *E. coli*'de üretimi için dizinin kodon optimizasyonu ve tasarımı yapılan gen vektöre klonlanmak üzere belirlenen genomik dizi yapay olarak sentezlettirilecektir. Nükleotid dizilerinin başına ve sonuna vektör sistemlerine spesifik restriksiyon enzim kesim bölgeleri eklenir. Ayrıca nükleotid dizisi üretilen proteinin kolaylıkla saflaştırılmasını sağlamak için vektör sistemlerinin His-tagları kullanılacak şekilde dizayn edilir. Yapay olarak sentezlettirilen gen laboratuvarında klonlama amaçlı kullanılan hedef vektöre klonlaması gerçekleştirilecektir.

2. Belirtilen Enzimlerin Genlerini Taşıyan Vektörlerin *E. coli* Hücrelerine Transformasyonu

Gen dizisini taşıyan plazmitlerin *E.coli* hücrelerine aktarımı için öncelikle bu hücreler kompetent hale getirilir. Petri besi ortamındaki *E.coli* (DH5 α ve BL21(DE) pLysE) kültüründen tek koloni olmasına dikkat edilerek 4 ml LB (Luria Bertani) besi yeri içeren cam tüplere inoküle edilir. Cam tüpler 1 gece (12-14 saat) 120 rpm ve 37°C'de inkübasyona bırakılır. Bu kültüründen 100 μ l alınarak içerisinde 50 ml LB bulunan 250 mL'lik steril erlenlere inoküle edilir ve 37 °C ve 240 rpm'de inkübasyona bırakılır. Optik dansite kontrol edilir ve yaklaşık 3 saat sonra 600 nm'de absorbans yaklaşık olarak 0,7 olduğunda erlen inkübatörden alınır ve +4 °C 5 000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenir. Süpernatant uzaklaştırılır, pelet üzerine +4°C'de saklanan soğuk FSB (dondurulmuş saklama tamponu) çözeltisinden 50 ml eklenir ve pelet tamamen çözünene kadar vortekslenir. Ardından 1 saat buz banyosunda inkübe edilir. Daha sonra +4 °C 4000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenir. Süpernatant uzaklaştırılır ve elde edilen pellet üzerine 8 ml soğuk FSB çözeltisi eklenir ve pellet vortekslemeden nazikçe çözülür. Pelletin tamamı çözününce üzerine 560 μ l DMSO eklenir ve yaklaşık 2-3 saat buza gömülür. Bu sürenin ardından transformasyon için hazır hale gelen hücreler endorf tüplere alınarak -80 °C'de stoklanmıştır.



Şekil 1: Kompatent *E.coli* bakterisine hedef genlerin transformasyonu, Bartın Üniversitesi Biyokimya Laboratuvarı

Transformasyon için hazır hale getirilmiş buz banyosu içindeki kompotent hücrelerden 200'er µl alınarak soğutulmuş gerekli sayıda ependorf tüplerine pipetleme yapılmıştır. Üzerine 2-3 µl plasmid DNA eklenip hassas bir şekilde karıştırılarak 1 saat buz banyosunda bekletilir. Ardından 2 dakika 42°C'de ısı şokuna maruz bırakılıp, tekrar buza gömülerek 5 dakika inkübe edilir. Daha sonra hücreler antibiyotikli petriye yayma yöntemi ile ekilir ve 37°C'de 1 gece inkübasyona bırakılır (Hao vd., 2020).

3. Hedef Enzimlerin Üretimi

Transformasyon işleminin başarılı bir şekilde gerçekleştirildikten ve koloni oluşumu görülen BL21(DE3) pLysE petrilerinden birer koloni alınarak; antibiyotik içeren 4 ml lik steril LB bulunan tüplerine inoküle edilir ve 250 rpm de 37°C de bir gece de inkübe edilir. Ardından 600 ml besi yeri içeren 2L'lik antibiyotikli erlenlerde inoküle edilen kültürler, 37 °C 240 rpm de inkübasyona bırakılır. Sonrasında belirli aralıklarla kültürden örnekler alınarak spektrofotometrede 600 nm de ölçümler yapılır, OD değeri yaklaşık 0.5-0.7 olduğunda erlenlerdeki kültür ortamına 600 µl 1 M IPTG ilavesi ile BL21(DE) pLysE *E. coli* hücreleri indüklenir. Kültürler aynı koşullarda 3-4 saat tekrar inkübasyona bırakılır. Daha sonra 250 ml'lik tüplerinde +4°C'de 8000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenir. Santrifügasyon ile elde edilen peletteki *E. coli* BL21(DE3) pLysE hücreleri saflaştırma işlemlerinde kullanılmak üzere -20°C'de saklanır (İbrahim vd., 2018).



Şekil 2: Gen aktarımı yapılmış *E.coli* bakterisinin üretimi, Bartın Üniversitesi Biyokimya Laboratuvarı

4. Üretilen Enzimlerin His-tag Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması

-20 °C’de saklanan indüklenmiş haldeki *E. coli* hücreleri buzda bekletilir. Üzerine 100 mM Tris/HCl (pH = 7,5) tamponundan 10 ml eklenerek süspansiyon haline getirilir. Süspansiyona 100 mM benzamidinden 100 µl eklenip ve vortekslendikten sonra tekrar üzerine 100 mM PMSF’den 100 µl eklenerek buz üzerinde bekletilir. *E. coli* BL21(DE3) pLysE hücreleri buz banyosu içine gömülü halde 6 mm ucu olan sonikatör ile 1 saat parçalama işlemi gerçekleştirilir. Parçalanmayan hücreleri ayırmak amacıyla +4°C ve 6000 rpm’de 10 dakika santrifüj yapılır. Süpernatant ayrı bir tüpe alınır. Pelet üzerine Tris/HCl (pH = 7,5) tamponundan 10 ml eklenerek önceki işlemler tekrar edilir. Bu şekilde tekrarlanan işlemlerin ardından parçalanmış hücreleri içeren süpernatantlar birleştirilir. Bu işlemleri takiben süpernatant 30 000 rpm ve +4 °C’de 1 saat santrifüj edilir ve istenmeyen hücre materyalleri çöktürülerek kromatografi uygulanacak kısımdan ayrıştırılacaktır.



Şekil 3: *E.coli* bakterisinin 8 000 ve 30 000 rpm’de santrifüj sonucu, Bartın Üniversitesi Biyokimya Laboratuvarı

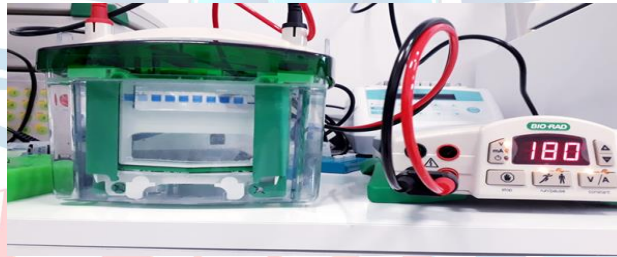
Saflaştırmanın gerçekleştirileceği polikarbonat kolona “QiagenNi-NTA agaroz Protein Purification Resin” reçineden 4 ml kadar konulduktan sonra, kolon 50 ml 100 mM Tris/HCl (pH = 7,5) tamponuyla yıkanır. Santrifüj sonrasında elde edilen süpernatant kolona tatbik edilir ve kolondan gelen bütün fraksiyonlar toplanır. Protein yüklenmiş kolon 50 ml 100 mM Tris/HCl (pH = 7,5) tamponuyla yıkanır. Ardından kolon 50 ml 25 mM imidazol içeren 100 mM Tris/HCl (pH = 7,5) tamponuyla yıkanarak kolonda tutunmuş histidince zengin diğer proteinlerden arındırılır. Daha sonra 300 mM imidazol içeren, 100 mM Tris/HCl (pH = 7,5) tamponuyla kolona tutunmuş olan protein 1’er ml’lik fraksiyonlar halinde 5 ml ile elüe edilir ve bütün fraksiyonlar toplanarak +4 °C’de saklanır. Kolondan elüe edilen her fraksiyondan alınan numuneler SDS-PAGE’de analiz edilecektir (Hao vd., 2020; Ibrahim vd., 2018).



Şekil 4: Üretilen proteinlerin saflaştırılması, Bartın Üniversitesi Biyokimya Laboratuvarı

5. SDS-PAGE Analizi

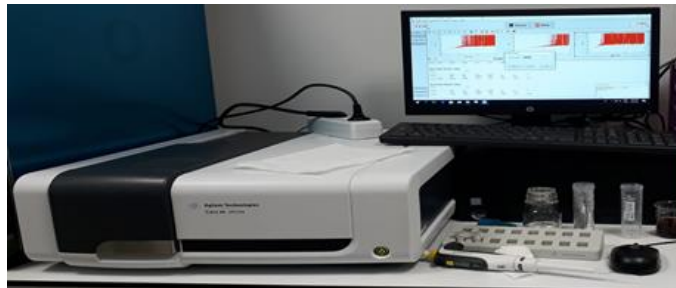
Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) %15'lik poliakrilamidte Laemmli metodu kullanılarak gerçekleştirilecektir (Laemmli,1970). Küçük miktarlarda proteinler 3 dk kaynatılıp jele yüklenecek, Coomassie brilliant blue R 250 ile boyanarak proteinlerin varlığı ve saflığı belirlenecektir. Toplanan her fraksiyondan ve yıkama sonrası elde edilen çözeltilerden alınan 100 µl'lik numuneler 500 µl jel yükleme tamponuyla karıştırılıp, 100°C'de 2 dakika denatüre edilerek önceden hazırlanan SDS-PAGE jelinin kuyucuklarına 10'ar µl yüklenir. SDS-PAGE tamamlandıktan sonra distile su ile yıkanan jel Coomassie mavisi ile boyanır. Boyanan jelden boya "destain" solüsyonu ile uzaklaştırıldıktan sonra oluşan bantlar görüntülenir (Laemmli, 1970).



Şekil 5: SDS-PAGE, Bartın Üniversitesi Biyokimya Laboratuvarı

6. Saflaştırılan Enzimlerin Aktivite Ölçümü

Saflaştırılan enzimlerin aktivitesi uygun substratlar kullanılarak belirlenecektir. Reaksiyon karışımı oluşturulur. Uygun absorbans değerlerinde mikropłaka okuyucuda ölçüm yapılarak aktivite belirlenir.

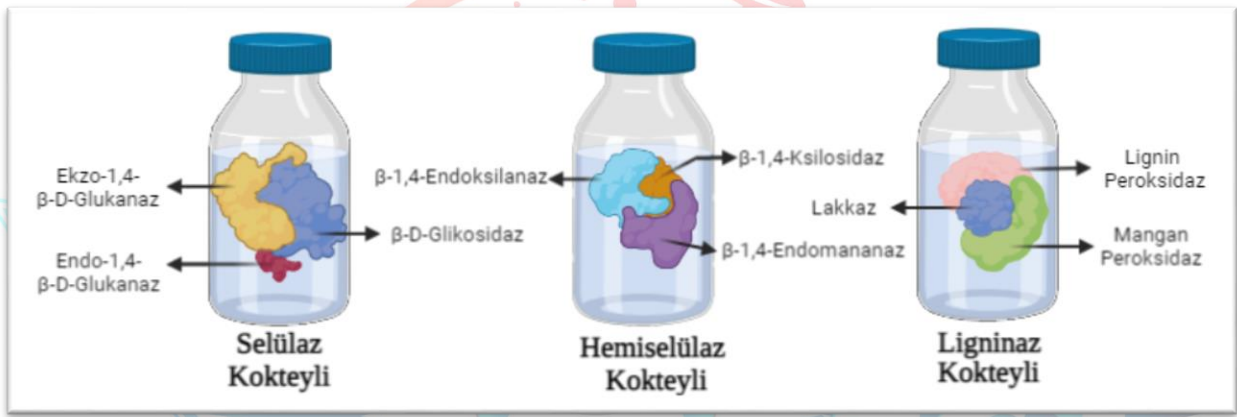


Şekil 5: Saflaştırılan enzimlerin spektrofotometrik aktivite ölçümü, Bartın Üniversitesi Biyokimya Laboratuvarı

7. Enzim Kokteyllerinin Oluşturulması

Biyoyakıt üretimi için oluşturulacak kokteyldeki enzimler hammadde olarak kullanılacak olan ayçiçeği sapındaki selüloz, hemiselüloz ve lignine göre belirlenmiştir. Bu polimerlerin yapıda bulunma oranlarına göre enzim türü ve oranı optimize edilecektir. Yapılan literatür taraması sonucu kokteyllerde kullanılacak enzim türleri belirlenmiştir. Bunlar;

- **Selüloz Kokteyli:** Ekzo-1,4- β -D-Glukanaz, β -glükosidaz, Endo-1,4- β -D-Glukanaz,
- **Hemiselüloz Kokteyli:** β -1,4-endoksilanaz, β -1,4-ksilosidaz, β -endomannanazlar (Glukuronidaz),
- **Lignin Kokteyli:** Lakkaz, Lignin Peroksidaz, Mangan Peroksidaz'dır.



Şekil 6: Proje Sonucunda Elde Edilecek Ürünler

Yukarıda belirtilen kokteyllerde yer alan enzimlerin kokteylde bulunma oranı optimizasyon çalışmaları sonucunda belirlenecektir.

5. Yenilikçi (İnovatif) Yönü

Projemizin ürünleri biyoetol endüstrisi, gıda, sağlık ve hayvan yemi işlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Günümüzde biyoetanol üretiminde doğrudan yakma, piroliz, gazlaştırma ve anaerobik ortamda işleme gibi geleneksel yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler sonucu ortama fazla miktarda ısı, karbondioksit ve kullanılan kimyasalların salınımı gerçekleşmektedir. Ardından hava kirliliği, kimyasallardan dolayı toprak kirliliği ve sera gazı emisyon miktarı artmaktadır. Ayrıca ülkemizde biyoetanol üretimi biyokimyasal yöntemle yapılamamaktadır. Projemizde geleneksel biyoetanol üretim yöntemlerinden farklı olan biyokimyasal yöntemin kullanılmasına yönelik ürün üretimi hedeflenmektedir. Biyokimyasal yöntemde lignoselülozik biyokütlenin sakarifikasyonu için kullanılan enzim kokteyllerinin kullanılması yenilikçi yöndür. Geleneksel yöntem olan kimyasal hidroliz, kısa sürede yüksek konsantrasyonlarda fermente edilebilir şeker vermesine rağmen, bu yöntem sert reaksiyon

koşulları gerektirir, sonraki fermantasyon işlemi için engelleyici yan ürünler üretir ve bol miktarda bertaraf işlemleri gerektirir. Buna karşılık, enzimatik hidroliz, inhibitör yan ürünler üretmeden, daha az enerji harcayarak ılımlı koşullar altında yüksek miktarlarda fermente edilebilir şekerler üretir (Chen ve ark. 2013; Raj vd.,2021).

Günümüzde biyokütlenin enzimatik işlenmesi ile ilgili araştırmalar polisakkaritlerin dönüştürülmesine odaklanmış olsa da biyokütlenin şekere dönüştürülmesi ve enzimler tarafından lignin modifikasyonunun birbiriyle bağlantılı olduğuna dair kanıtlar artmaktadır. Selüloz, lignin ve hemizelüloz gibi biyokütlenin işlenmesine yönelik ürün oluşturmayı hedefleyen çalışmalara ilgi artmaktadır (Heidi,2020).

Yenilenebilir biyolojik kaynakların gelişimi, fosil kaynaklara dayalı ekonominin en azından bir kısmını azaltarak karbon ayak izini azaltmanın bir yolu olarak görülmektedir. Bu bağlamda, biyoteknolojik ürünlerin biyopolimerleri verimli bir şekilde parçalamak, değiştirmek ve biyolojik molekülleri sentezlemek amacıyla kullanımının artacağına inanılmaktadır (Filiatrault vd.,2021).

Geçmişte yapılmış bir çalışmada, bir dizi kimyasal ön işlem, enzimatik hidroliz ve fermantasyon süreçleri ile tarımsal artıklardan ve kuru otlardan (arpa, buğday vb.) biyoetanol üretimi incelenmiştir. Novozym 188 (selobiaz)- Celluclast 1.5 L enzim kombinasyonu ile kimyasal olarak ön işleme tabi tutulmuş (%2,0 NaOH veya H₂SO₄) ve katıların enzimatik hidrolizi, Spezyme® CP-ksilanaz kombinasyonuna göre eşit veya daha yüksek glukoz ve ksilan dönüşümü olduğu görülmüştür. (Chen vd.,2007). Bu çalışma biyoyakıt üretiminde enzimlerin kullanılmasıyla yüksek verimde monomer elde edilebileceğini göstererek proje fikrimizi desteklemektedir. Proje fikrimizde ise ayçiçeğinin değerlendirilmeyen atıklarından biyoetanol üretimi için yeni enzim kokteyli oluşturulup polimer şekerlerdeki spesifik bölgeleri parçalanarak diğer yöntemlere göre daha verimli hidrolizasyon beklenmektedir.

6. Uygulanabilirlik

Proje fikrimizde belirtilen enzimlerin, vektörler aracılığıyla *E.coli* ekspresyon sisteminde yüksek saflıkta, yüksek aktivitede, yüksek stabilitede ve düşük maliyetli yerli üretimi amaçlanmaktadır. Projede ilk olarak üretimi hedeflenen proteinleri kodlayan genler biyoinformatik çalışmalar sonucundan tespit edilerek sipariş edilecektir. Bir vektör içerisinde gelen gen uygun restriksiyon enzimleriyle kesilerek jelden izolasyonu yapılacaktır ve aynı restriksiyon enzimleri ile kesimi yapılan vektör ile ligasyon işlemi gerçekleştirilip *E.coli* DH5 α hücrelerine transformasyonu yapılacaktır. Uygun şekilde birleşmiş plazmitlerin jelden izolasyonu sağlanacak ve ardından proteinlerin üretilmesi için uygun hücrelere (*E.coli* BL21 pLysE hücrelerine) transformasyonu yapılacaktır. Son olarak üretilen proteinler afinite kolon kromatografisi yöntemiyle saflaştırılacak ve aktivite tayini yapılacaktır.

Biyokütleden biyoyakıt dönüşümü için gerekli olan enzimlerin üretimi, Bartın Üniversitesi Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarında bulunan cihazlar (<http://laboratuvar.bartın.edu.tr/Arama/CihazListesi>) ve kimyasal maddeler aracılığıyla üretilmektedir.

GriENZymes ekip danışmanı olan Doç. Dr. Dursun KISA, Bartın Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümü öğretim üyesidir. Genel biyoloji, moleküler biyoloji, biyokimya ve biyoteknoloji alanlarında ders vermekte ve bu alanlarda bilimsel çalışmalar yürütmektedir. Ulusal ve uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan 23 makalesi, ulusal ve uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan 23 bildirisi bulunmaktadır. 2017 yılında kurulmuş olan medikal, sağlık, kimya, gıda, mühendislik ve ziraat vb. alanlarda faaliyet gösteren HidroGen Biyoteknoloji Ltd. Şti. 'nin kurucu ortağıdır. Şu an da biyokimya ve protein üretimi laboratuvarı çalışmalarında yürütücü ve danışman olarak görevine devam etmektedir.

GriENZymes ekip danışmanı Dr. Öğr. Üyesi Rizvan İMAMOĞLU, Bartın Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümü öğretim üyesidir. Genetik mühendisliği, rekombinant DNA teknikleri, moleküler biyoloji, biyoteknoloji ve biyoinformatik alanlarında ders vermekte ve bu alanlarda bilimsel çalışmalar yürütmektedir. Ulusal ve uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan 9 makalesi, ulusal ve uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan 32 bildirisi bulunmaktadır. 2017 yılında kurulmuş olan medikal, sağlık, kimya, gıda, mühendislik ve ziraat vb. alanlarda faaliyet gösteren HidroGen Biyoteknoloji Ltd. Şti. 'nin kurucu ortağıdır. Şu an da biyokimya ve protein üretimi laboratuvarı çalışmalarında yürütücü ve danışman olarak görevine devam etmektedir.

Takım lideri Ahmet ÇELİK, Bartın Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümü 4. Sınıf öğrencisidir. Biyokimya ve rekombinant enzim üretimi laboratuvarında 1 yıllık iş deneyimi vardır. Bu iş deneyiminde proje yazma, deney tasarlama, fikir üretme ve laboratuvar cihazları kullanımı gibi konularda tecrübe edinmiştir. Araştırma projelerinde yürütücü ve stajyer görev yapmıştır. Görev aldığı proje konuları "Çeşitli endemik bitkilerin tıbbi öneme sahip enzimler üzerine inhibitör etkilerinin ve fenolik içeriklerinin araştırılması" konulu projede TÜBİTAK STAR programı kapsamında 6 ay bursiyer olarak staj yaptı. "β-Glikosidaz enziminin rekombinant üretimi ve inhibisyonu" konulu proje TÜBİTAK 2209-A programı kapsamında desteklendi ve yürütücüsü olduğu projeye devam etmektedir. *Agaricus bisporus*'tan tirozinaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu" konulu proje üzerinde lisans bitirme tez çalışmasına devam etmektedir. Başvuruda bulunduğumuz projemiz '1512 GİRİŞİMCİLİK DESTEK PROGRAMI BİGG YEŞİL BÜYÜME ÇAĞRISI' kapsamında 1.Aşamayı geçmiş bulunmaktadır. Şu an 2. Aşama olan Panel Değerlendirme aşamasındadır.

Ekibimiz üyelerinin tecrübeleri ve laboratuvarımız koşullarının elverişliliği ile hedef enzimler rekombinant DNA teknolojisiyle üretilerek ticari ürüne dönüştürülebilecektir.

Takım Lideri: Ahmet ÇELİK

Danışman: Doç. Dr. Dursun KISA

7. Tahmini Maliyet ve Proje Zaman Planlaması

No	İş Paketlerinin Adı ve Hedefleri	Zaman Aralığı (Ay)	Kimler Tarafından Gerçekleştirileceği
1	Hedef Genin Belirlenmesi	1-2.	Ahmet ÇELİK ve Doç. Dr. Dursun KISA
2	Her bir enzime ait DNA dizilerinin klonlanması		
3	Ekspresyon için transformasyon işlemlerinin yapılması	3.	
4	Enzimlerin üretimi	4-6.	Ahmet ÇELİK ve Doç. Dr. Dursun KISA
5	Enzimlerin Saflaştırılması ve SDS-PAGE Analizi	7-8.	
6	Aktivite Tayini	9.	
7	Enzim Kokteyllerinin Oluşturulması	10-12.	

Sarf Giderleri		
Adı	Kullanım Gerekçesi	Bedeli
Otoklavlanabilir otomatik Mikropitet Seti, Isolab, 1 set	Her türlü mikrobiyoloji ve moleküler biyoloji deneylerinde kullanılacak Set içeriği; 1x 0,2-2µl, 1x 2-20µl, 1x 20-200µl, 1x 100-1000µl	3.398,00 TL
DMSO	PCR malzemesi ve nonpolar moleküller için çözücü, 1L	492,00 TL
dNTP Set, 100Mm Solutions	PCR malzemesi, 4x1ml	4.518,00 TL
Magnesium Chloride Hexahydrate	Besiyeri hazırlanmasında ve koloni PCR'da 1 kg	578,00 TL
Glycerol	<i>E. coli</i> kompeten hücre hazırlığı ve bakterilerin uzun süreli muhafazasında, 1 L	985,00 TL
Kalsiyum klorit dihidrat	<i>E. coli</i> kompetan hücre hazırlığı, 1 kg	743,00 TL
0.2 cm electroporation cuvettes	Elektroporasyon işlemlerinde, 5 adet	530,00 TL
LB broth	Besiyeri (<i>E. coli</i> için), 2 kg	3.960,00 TL
Agar	Katı besiyeri hazırlanmasında, 1 kg	2.121,00 TL
Agarose	Elektroforez jel hazırlanmasında, 500 g	2.339 TL
Ampicillin Sodium Salt	Antibiyotik (<i>E. coli</i> için selektif besiyeri hazırlama), 25 g	833,00 TL
Kanamycin Sulfate	Antibiyotik (<i>E. coli</i> için selektif besiyeri hazırlama), 25 g	606,00 TL
T4 DNA ligaz	Ligasyon, plasmid konstrüksiyonu, 100 reaksiyon, 2 adet	1.894,00 TL
Taq DNA polimeraz	Koloni PCR işlemlerinde, 500 units, 1 adet	1.669,00 TL
EDTA	Lizis tamponu ve plazmid ekstraksiyonu için TAE tampon hazırlanmasında, 500 g	492,00 TL
İzopropanol	Plazmid ekstraksiyonunda, 2,5 L	454,00 TL
Etanol	Temizlik ve plazmid ekstraksiyonunda, 5 L	622,00 TL

Plazmid izolasyon kiti	Plazmid ekstraksiyonu, 250 preps, 1 kit	3.740,00 TL
Steril kapaklı kültür tüpleri	Hücrelerin büyütülmesinde, 1 kutu	6.002,00 TL
Restriksiyon enzimi EcoRI	Restriksiyon dijesti, Plazmid konstrüksiyonu ve insert kontrolü, 1000 reaksiyon	842,00 TL
Restriksiyon enzimi HindIII	Restriksiyon dijesti, Plazmid konstrüksiyonu ve insert kontrolü, 250 reaksiyon	1.782,00 TL

RNAse I	Plazmid ekstraksiyon tamponu hazırlığında, 100 mg	1.953,00 TL
Potasyum asetat	Plazmid ekstraksiyonu için tamponunun hazırlanmasında, 500 gr	530,00 TL
Hidroklorik asit	pH ayarlamasında, 2,5 L	236,00 TL
Potasyum klorür	Fosfat tamponu hazırlanmasında, 1 kg	236,00 TL
Disodyum hidrojen fosfat dihidrat	Fosfat tamponu hazırlanmasında, 1 kg	307,00 TL
Potasyum dihidrojen fosfat	Fosfat tamponu hazırlanmasında, 1 kg	348,00 TL
Falcon santrifüj tüp (50 ml)	Ekstraksiyon işlemi için hücrelerin ayrıştırılmasında, 20 paket	767,00 TL
Santrifuj tüp (15 ml)	Ekstraksiyon işlemi için hücrelerin ayrıştırılmasında, 20 paket	614,00 TL
Cryotüp Kutusu	-80 °C'de saklanacak suşların düzenli muhafazası için, 5 adet	366,00 TL
PCR Standı	PCR işlemlerinde tüplerin konulması için, 3 adet	103,00 TL
Tüp Standı, 4 Yüzeyle	Santrifüj tüplerin konulması için, 5 adet	616,00 TL
Mikrosantrifüj Tüp Standı	Santrifüj tüplerin konulması için, 5 adet	248,00 TL
PCR tüpleri	PCR işlemlerinde, 2 paket	437,00 TL
Polistiren yarı-mikro küvet	UV-Spektrofotometre ile yapılan ölçümlerde, 1 paket	95,00 TL
Plaka- hücre kültürü- 0,2 ml-96 kuyulu	in vitro reaksiyonların gerçekleştirilip florimetrede ölçülmesinde, 1 paket	833,00 TL
Sterilizasyon filtresi	Substrat ve ısıya hassas besiyeri bileşenlerinin sterilasyonunda, 1 paket	894,00 TL
IPTG	Rekombinant genlerin ekspresyonunun indüklenmesi, 5 gr	682,00 TL
Hispur Ni-Nta Resin	Rekombinant protein saflaştırmasında, 100 mL	14.337,00 TL
Pierce Centrifuge Columns, 10 mL	Rekombinant protein saflaştırmasında, 1 paket	1.304,00 TL
Monosodyum fosfat	Rekombinant protein için tampon hazırlığında, 1 kg	307,00 TL
Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)	Protein ekstraksiyonunda, 5 g	606,00 TL
Bovine serum albumin	Proteinin in vitro reaksiyon tamponunda, 10 g	820,00 TL
Glycine	SDS-PAGE loading tampon hazırlanmasında ve besiyeri malzemesi, 500 g	574,00 TL
Ammonium persulfate	SDS-PAGE jel hazırlanmasında, 100 g	790,00 TL
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	SDS-PAGE jel hazırlanmasında, 25 ml	354,00 TL
Acrylamide-bis ready-to-use solution 40%	SDS-PAGE jel hazırlanmasında, 500 mL	676,00 TL
Bromophenolblue	SDS-PAGE loading tampon hazırlanmasında, 25 g	657,00 TL
Ethidium bromide	Jel elektroforezde DNA fragmanlarının görüntülenmesinde, 5 g	909,00 TL
Prestained Protein Ladder,10 to 180 kDa	SDS-PAGE analizinde protein büyüklüğünün belirlenmesinde, 1 tüp	2.704,00 TL

Coomassie Brilliant Blue R-250 Dye	SDS-PAGE analizinde protein boyama işleminde, 25 g	657,00 TL	
Tris Base	TAE tamponu ve SDS-PAGE hazırlanmasında, 1 kg	201,00 TL	
Glacial Asetik asit	SDS-PAGE jel hazırlık ve boyanmasında, plazmid ekstraksiyon tamponunun hazırlanmasında, 5 L	637,00 TL	
Tris-HCl	Lizis tamponu, Elüsyon ve SDS-PAGE running tamponlarının hazırlanmasında, 500 g	1.054,00 TL	
Sodyum dodesil sülfat	Plazmid ekstraksiyonu için P2 tamponunun hazırlanmasında, SDS-PAGE jel hazırlığı, 500 g	791,00 TL	
Sodyum hidroksit	Lizis tamponu, Elüsyon ve SDS-PAGE running tamponlarının hazırlanmasında, 1 kg	212,00 TL	
CMC (karboksimetil selüloz)	Ekzo-1,4- β -D-Glukanaz ve Endo-1,4- β -D-Glukanaz enzimlerinin aktivite ölçümünde,	65,00TL	
Pnpg	β -glikosidaz enziminin aktivite ölçümünde,	788,00 TL	
ABTS (2,2'-azino-bis (3- etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)	Lakkaz enziminin aktivite ölçümünde,	771,00 TL	
Azure B	Ligin peroksidaz enzimini aktivite ölçümünde,	647,00 TL	
fenol kırmızı	Mangan peroksidaz enziminin aktivite ölçümünde,	603,00 TL	
4-Nitrofenil- β -ksilobiyosit	β -1,4-endoksilanaz ve β -1,4-ksilosidaz enzimlerinin aktivite ölçümünde,	771,00 TL	
Galactomannan	β -1,4-endomannanazın aktivite ölçümünde,	773,00 TL	
Ekzo-1,4- β -D-Glukanaz Geni	Rekombinant protein üretiminde kullanılacaktır.	6.435,00 TL	
β -glikosidaz Geni		6.542,00 TL	
Endo-1,4- β -D-Glukanaz Geni		6.445,00 TL	
Lakkaz Geni		6.734,00 TL	
Ligin Peroksidaz Geni		6.685,00 TL	
Mangan Peroksidaz Geni		6.854,00 TL	
β -1,4-endoksilanaz Geni		6.783,00 TL	
β -1,4-ksilosidaz Geni		6.752,00 TL	
β 1,4-endomannanaz Geni		6.770,00 TL	
		TOPLAM=	139.873,00 TL

Makine ve Techizat Giderleri		
Kuruluşta Bulunan Altyapı/Ekipman Türü (Laboratuvar, Araç, Makine- Teçizat, vb.)	Projede Kullanım Amacı	Kullanım Bedeli (TL)
FPLC	Protein saflaştırma çalışmalarında	

Elektroporatör	Hücelere vektör transformasyonunda	
Yüksek Hızlı Santrifüj	Yüksek Hızda Protein çöktürme işlemlerinde	
Biyoreaktör	Enzim/proteinlerin yüksek kapasiteli üretiminde	
Spektrofotometre/Mikro plate okuyucu	Protein tayini, aktivite ve inhibisyon çalışmalarında	
-80 dondurucu	Örneklerin uzun süre muhafazasında	
Liyofilizatör	Protein ve enzimlerin kristilizasyonunda	
Çalkalamalı inkübatör	Bakterilerin çoğaltım aşamalarında	
Buz makinesi	Soğuk ortam çalışmaları için kar eldesinde	
Buz dolapları	Örnek ve çözeltilerin saklanmasında	
Etüv	İnkübasyon ortamı ve çözeltilerin evaporasyonu için gerekli inkübasyonun sağlanması	
Evaporatör	Çözücü maddelerin karışımdan uzaklaştırılması	
Manyetik Karıştırıcı	Çözelti karışımlarının hazırlanması	
Saf su cihazı	Çözeltilerde kullanılacak olan saf suyun temini	
Ultrasonik banyosu	Ekstraksiyon ve çözündürme işlemlerinde	
Santrifüj	Çöktürme çalışmalarında	
pH metre	Çözeltilerin pH düzenlemelerinde	
Terazi	Çözeltilerin hazırlanmasında gerekli miktar tartım işlemlerinde	
Vorteks	Çözeltilerin karıştırılması	
	TOPLAM=	12.000,00 TL

8. Proje Fikrinin Hedef Kitlesi (Kullanıcılar):

İş fikrimizin ilk hedef aldığı alan biyoetanol endüstrisidir. Bu alandaki üretim yapan firmalara geleneksel yollardan farklı olan biyolojik üretim yöntemi anlatılarak ürünümüzün çevreye ve ekonomiye katkısı vurgulanacaktır. Geleneksel yöntem olan kimyasal hidroliz, kısa sürede yüksek konsantrasyonlarda fermente edilebilir şeker vermesine rağmen, bu yöntem sert reaksiyon koşulları gerektirir, sonraki fermantasyon işlemi için engelleyici yan ürünler üretir ve bol miktarda bertaraf işlemleri gerektirir. Buna karşılık, enzimatik hidroliz, inhibitör yan ürünler üretmeden, daha az enerji harcayarak ılımlı koşullar altında yüksek miktarlarda fermente edilebilir şekerler üretir (Chen ve ark. 2013; Raj vd.,2021). Bu yöntemin kullanılmasıyla hem üretimde verim artacak hem de çevreye zarar veren CO₂ salınımı gibi olayların azaltılması sağlanacaktır.

Ürün tanıtımı ilk önce ülkemizde üretim yapan firmalara yapılarak pazara giriş yapılacaktır. Ülkemizdeki pazarda yer edindikten sonra internet üzerinde oluşturulan şirket sitesi üzerinden yurt dışındaki biyoetanol üreticilerine de satış gerçekleştirilecektir. Biyoetanol endüstrisi ticari olarak değer taşıdığı için gelecekte bu alana yönelik farklı ürünlerin üretimi hedeflenmektedir. Ülkemizdeki biyoetanol

üreticileri ile görüşmelerimiz devam etmektedir.

Türkiyede müşteri olarak hedeflediğimiz biyoetanol üreticileri; Tezkim Tarımsal Kim. San. Ve Tic. A.Ş., Tarımsal Kimya Teknolojileri San. Ve Tic. A.Ş, Konya Şeker San. ve Tic. A.Ş. Çumra Biyoetanol Tesisi Şubesi ve Türkiye Şeker Fabrikaları A.Ş. Eskişehir Şeker Fabrikasıdır. Dünya genelinde hedeflediğimiz biyoetanol üreticileri; AVA GmbH A.Ş. KG. Herrsching/ALMANYA, Abengoa Biyoenerji Chesterfield/MONTANA (ABD), Bunge Limited, Archer Daniels Midland Company, Valero Energy Corp., Petrobras, Renewable Energy Corp., Wilmar International, Pacific Ethanol Inc., Flint Hills Resources, The Andersons, Inc., Raizen S.A., Copersucar S.A., Abengoa, S. A., Alpha Biofuelsdir. Ürünümüzü ürettikten sonra ilk yukarıda belirtilen şirketlere tanıtım gerçekleştirilecektir.

Ürünlerimiz biyoetanol endüstrisi dışında tekstil, gıda, tarım, hayvancılık, içecek ve medikal endüstrisi alanlarında doğrudan kullanılmaktadır. Biyoetanol sektörü dışında bu sektörlerde satış gerçekleştirilecektir. Ülkemizde bu alanlarda kullanılan enzimler ithal edilmektedir, ürünümüz piyasaya sürüldüğünde ithalat azaltılacak ve ülke ekonomisine katkıda bulunulacaktır.

9. Riskler:

İP No	En Önemli Riskler	Risk Yönetimi (B Planı)
1	Hedef Geni Taşıyan Vektörün <i>E.coli</i> Hücrelerine Transformasyonu	Proje önerisinde belirtilen vektörlerin dışında laboratuvarında mevcut olan farklı vektör tiplerine klonlama yapılacaktır. Isı şoku tekrar edilecek ya da laboratuvarında mevcut olan elektroporatör ile transformasyon gerçekleştirilecektir.
2	Enzimlerinin Üretimi	İnkübatör koşullar, IPTG konsantrasyonu ve büyüme ortamı yeniden düzenlenecektir.
3	Enzimlerin His-tag Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması	Kolon optimizasyonu yapılacaktır.
4	SDS-PAGE Analizi	Jel koşulları optime edilecek ve hedef enzimlere uygun markör tercih edilecek
5	Aktivite Tayini	GOX enzime en uygun olan tampon pH'sı, substrat konsantrasyonu, sıcaklık ve enzim miktarı yeniden düzenlenecektir.

10. Kaynaklar

11. Heidi Østby, Line Degn Hansen, Svein J Horn, Vincent G H Eijnsink, Anikó Várnai, Enzymatic processing of lignocellulosic biomass: principles, recent advances and perspectives, Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, Volume 47, Issue 9-10, 1 October 2020, Pages 623–657, <https://doi.org/10.1007/s10295-020-02301-8>

12. Chen, Y., Sharma-Shivappa, R.R., Keshwani, D. et al. Potential of Agricultural Residues and Hay for Bioethanol Production. *Appl Biochem Biotechnol* 142, 276–290 (2007). <https://doi.org/10.1007/s12010-007-0026-3>
13. Filiatrault-Chastel, C., Heiss-Blanquet, S., Margeot, A., & Berrin, J. G. (2021). From fungal secretomes to enzymes cocktails: The path forward to bioeconomy. *Biotechnology Advances*, 107833.
14. Raj, T., Chandrasekhar, K., Kumar, A. N., Banu, J. R., Yoon, J. J., Bhatia, S. K., ... & Kim, S. H. (2021). Recent advances in commercial biorefineries for lignocellulosic ethanol production: Current status, challenges and future perspectives. *Bioresource Technology*, 126292.
15. Adsul, M., Sandhu, S. K., Singhania, R. R., Gupta, R., Puri, S. K., & Mathur, A. (2020). Designing a cellulolytic enzyme cocktail for the efficient and economical conversion of lignocellulosic biomass to biofuels. *Enzyme and microbial technology*, 133, 109442.
16. Lopes, A. D. M., Ferreira Filho, E. X., & Moreira, L. R. S. (2018). An update on enzymatic cocktails for lignocellulose breakdown. *Journal of applied microbiology*, 125(3), 632-645.
17. Bayraç, H. Ü. S. E. Y. İ. N., & Çemrek, F. A. T. İ. H. (2021). Avrupa Birliği ve Türkiye’de Biyoetanol Üretimi ve CO2 Emisyonunun Ekonomik Büyüme Üzerindeki Etkisinin Panel Veri Analizi Aracılığıyla İncelenmesi. *YENİ TÜRKİYE*, 1(117).
18. Göncü, B., Gülşen, H., & Hoşgün, E. Z. (2021). Bioethanol production from pistachio (*pistacia vera* L.) shells applying ozone pretreatment and subsequent enzymatic hydrolysis. *Environmental Technology*, 42(15), 2438-2446.
19. Victoria, J., Odaneth, A., & Lali, A. (2017). Importance of cellulase cocktails favoring hydrolysis of cellulose. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 47(6), 547-553.
20. Sant’Ana da Silva, A.; Souza, M.; Ballesteros, I.; Bon, E.P.S. High-solids Content Enzymatic Hydrolysis of Hydrothermally Pretreated Sugarcane Bagasse Using a Laboratory-made Enzyme Blend and Commercial Preparations. *Process Biochem.* 2016. doi: 10.1016/j.procbio.2016.07.018 [Crossref], [PubMed], [Web of Science ®], [Google Scholar]
21. Santoro, N., Cantu, S. L., Tornqvist, C. E., Falbel, T. G., Bolivar, J. L., Patterson, S. E., ... & Walton, J. D. (2010). A high-throughput platform for screening milligram quantities of plant biomass for lignocellulose digestibility. *BioEnergy Research*, 3(1), 93-102.
22. <https://www.statista.com/statistics/281606/ethanol-production-in-selected-countries>, Erişim Tarihi: 26.02.2021
23. http://www.tim.org.tr/files/downloads/Raporlar/Tarim_Raporu_2017.pdf).