

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

***Pichia pastoris* MAYASINDA REKOMBİNANT TİBET ÖKÜZÜ KİMOZİNİ  
EKSPRESYONU VE KARAKTERİZASYONU**

**Özge ADIGÜZEL**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**2016**

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

***Pichia pastoris* MAYASINDA REKOMBİNANT TİBET ÖKÜZÜ KİMOZİNİ  
EKSPRESYONU VE KARAKTERİZASYONU**

**Özge ADIGÜZEL**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**Bu tez TÜBİTAK Araştırma Destek Programları Başkanlığı (ARDEB) tarafından  
1002-Hızlı Destek Programı Kapsamında 115O105 nolu proje ile desteklenmiştir.**

**2016**

T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

*Pichia pastoris* MAYASINDA REKOMBİNANT TİBET ÖKÜZÜ KİMOZİNİ  
EKSPRESYONU VE KARAKTERİZASYONU

Özge ADIGÜZEL



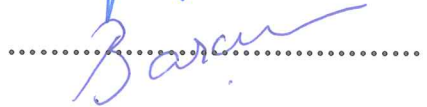
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Bu tez 13/07/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile  
kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mehmet İNAN (Danışman)

Doç. Dr. Yahya TÜLEK

Yrd. Doç. Dr. Barçın KARAKAŞ BUDAK

  
.....  
  
.....  
  
.....

## ÖZET

### ***Pichia pastoris* MAYASI İLE REKOMBİNANT KİMOZİN ENZİMİ ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU**

**Özge ADIGÜZEL**

**Yüksek Lisans Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı**

**Danışman: Prof. Dr. Mehmet İNAN**

**Ocak 2016, 53 sayfa**

Kimozin peynir endüstrisinde kullanılan ve sütün pıhtılaşmasını sağlayan proteolitik bir enzimdir. Kimozin yeni doğmuş geviş getiren memeli hayvanların midesinin dördüncü bölgesi olan şirdenden (abomasum) elde edilir. Ancak bu şekilde elde edilen kimozin, endüstrinin talebini karşılayacak nicelikte ve nitelikte değildir. Bu sebeple rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak üretilen kimozin, süt ürünleri endüstrisi için alternatif bir yöntem olmuştur. Günümüzde, rekombinant olarak daha yüksek miktarlarda kimozin üretilmektedir.

Rekombinant kimozin üretiminde gen kaynağı olarak sığır, deve, keçi, manda gibi hayvanlar kullanılmıştır. Bu projede gen kaynağı olarak ilk kez Tibet öküzü (*Bos grunniens*) kullanılarak *Pichia pastoris* mayasında rekombinant kimozin üretimi gerçekleştirilmiştir.  $\alpha$ -MF (*Saccharomyces cerevisiae*  $\alpha$ -eşleşmesi faktörü), HSA (İnsan serum albümini), PIR1 (*P. pastoris* Protein with Internal Repeats) ve PHO1 (*P. pastoris* asit fosfataz) sekresyon sinyallerini taşıyan ekspresyon kasetleri oluşturulmuş ve farklı sekresyon sinyallerinin üretim üzerindeki etkilerine bakılmıştır.

Engelli erlende yapılan ön çalışmalar sonrasında,  $\alpha$ -MF sekresyon sinyali taşıyan ekspresyon kaseti ile fermentör koşullarında AOX1 kullanılarak rekombinant kimozin üretilmiştir. Tibet öküzü kimozinin kısmi karakterizasyonu yapılmıştır. Böylece literatüre, ilk kez Tibet öküzünün gen kaynağı olarak kullanıldığı rekombinant kimozin enzimi ile ilgili katkıda bulunulmuştur.

**ANAHTAR KELİMELER:** Kimozin, Rekombinant DNA, *Pichia pastoris*, Tibet öküzü

**JÜRİ:** Prof. Dr. Mehmet İNAN (Danışman)

Doç. Dr. Yahya TÜLEK

Yrd. Doç. Dr. Barçın KARAKAŞ BUDAK

## ABSTRACT

### EXPRESSION AND CHARACTERIZATION OF RECOMBINANT CHYMO SIN in *Pichia pastoris*

Özge ADIGÜZEL

MSc Thesis in Food Engineering  
Supervisor: Prof. Dr. Mehmet İNAN  
January 2016, 53 pages

Chymosin is a proteolytic enzyme that coagulates milk efficiently and widely used in cheese industry. It obtained from fourth stomach of nerwborn ruminants. But its quality and quantitiy can not meet demand of the market. Recombinant chymosin is the best alternative for cheese industry. Present day high quantitiy of chmosin can be produced with recombinant enzyme technology.

Until now, bovine; camel; goat; buffalo were used as a gene sources for chymosin expression. In the present study, yak (*Bos grunniens*) prochymosin gene was used as gene source and recombinant chymosin was expressed in *P. pastoris*. Expression cassettes have *Saccharomyces cerevisiae*  $\alpha$ -mating factor ( $\alpha$ -MF), HSA (Human Serum Albumin), PIR1 (*P. pastoris* Protein with Internal Repeats) ve PHO1 (*P. pastoris* Acid Phosphatase) signal sequences were constructed to observe impact of secretion signals on expression of enzyme.

Active chymosin expression was achieved into supernatant under the control of methanol-inducible AOX1 promoter. Trials continued in bioreactor only expression cassette which have  $\alpha$ -MF secterion signal. Recombinant chymosin production was analyzed in flusk cultures then continued with the bioreactor which included basal salt medium. Eznyne characterization was performed with raw supernatant obtained from bioreactor. Present study will contribute to literature about recombinant chmosin which its gene source is yak.

**KEYWORDS:** Chymosin, recombinant DNA, *Pichia pastoris*, Yak

**COMMITTEE:** Prof. Dr. Mehmet İNAN (Supervisor)  
Assoc. Prof. Yahya TÜLEK  
Asst. Prof. Barçın KARAKAŞ BUDAK

## ÖNSÖZ

Biyoteknoloji günümüzde birçok alanda hayatı kolaylaştıran, endüstriyel anlamda maliyetten ve zamandan kazandıran gelişmeler göstermektedir. Genetik manipülasyonlar ve biyoteknolojik uygulamalar günümüzde olduğu gibi gelecekte de bilimsel gelişmelere aracı olacaktır. Bu sebeple bana gelişme kaydeden ve yeniliklere açık bir alanda çalışma yapabilme şansı veren, cihaz ve ekipmanlar bakımından eksiksiz bir laboratuvar imkanı sunan ve tez çalışmamın her aşamasında bana yol gösteren; yardımını hiç esirgemeyen Danışman Hocam Sayın Prof. Dr. Mehmet İnan'a çok teşekkür ediyorum.

Çalışmalarımın başından beri her konuda bana yardımcı olan, deneylere başlarken ve devamında yaşadığım sorunlara çözüm getirmeye çalışan ve tecrübelerini benimle paylaşan çalışma arkadaşlarım Mert Karaoğlan'a, Fidan Karaoğlan'a, Fatma Ersöz'e ve Gürkan Yılmaz'a çok teşekkür ediyorum.

Zorlandığım her yerde ve her konuda desteğini hiç esirgemeyen, her tökezlediğimde beni cesaretlendiren Semiramis Yılmaz'a ne kadar teşekkür etsem az kalır.

Bu süreçte maddi ve manevi olarak desteğini benden hiç esirgemeyen ve her zaman anlayış gösteren sevgili annem Birsen Adıgüzel ve sevgili babam Adem Adıgüzel'e binlerce kez teşekkür ediyorum.

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ .....	iii
İÇİNDEKİLER .....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	x
1.GİRİŞ .....	1
2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI.....	3
2.1. Kimozin Nedir?.....	3
2.2. Kimozin Kaynakları.....	4
2.3. Kimozinin Yapısı .....	5
2.4. Sütün Yapısı ve Kimozinin Çalışma Mekanizması .....	5
2.5. Rekombinant Kimozin .....	6
2.6. Rekombinant Kimozin İçin Kullanılan Konakçılar .....	7
2.6.1. <i>Escherichia coli</i> .....	9
2.6.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	9
2.6.3. <i>Aspergillus niger</i> .....	9
2.6.4. <i>Kluyveromyces lactis</i> .....	10
2.6.5. <i>Pichia pastoris</i> .....	10
2.7. <i>Pichia pastoris</i> Ekspresyon Sistemi.....	11
2.8. Ekspresyon İçin Uygun Vektörün Seçilmesi .....	14
3. MATERYAL VE METOT .....	15
3.1. Materyal .....	15
3.1.1. Kimyasallar ve restriksiyon enzimleri .....	15
3.1.2. Tampon ve stok çözeltileri.....	15
3.1.3.Gen kaynağı, mikroorganizmalar ve pilazmidler.....	15
3.1.4. Besiyerleri, gelişim ortamları ve antibiyotikler .....	18
3.1.5. Primerler.....	18
3.2. Metot .....	19
3.2.1. Liyofilize gelen pilazmid DNA'nın hazırlanması.....	19
3.2.2. <i>E. coli</i> ve <i>P. pastoris</i> hücrelerinin transformasyona kompetan (competent) hale getirilmesi.....	19
3.2.3. Pilazmidlerin <i>E. coli</i> 'ye transformasyonu ve doğrulanması .....	19
3.2.4. Kimozin genine 6histidin kodu (His-etiketi) eklenmesi .....	20
3.2.5. Kimozin geninin ve ekspresyon vektörünün ligasyona hazır hale getirilmesi.....	21
3.2.6. Plazmit ve kromozomal DNA'ların konsantrasyonlarının belirlenmesi....	22
3.2.7. DNA parçalarının pilazmide ligasyonu.....	22
3.2.8. Kompetan <i>E. coli</i> hücrelerine transformasyon.....	22
3.2.9. Kompetan <i>P. pastoris</i> hücrelerine transformasyon.....	22
3.2.10. Engelli erlenmayerde fermentasyon ile kimozi enzimi ekspresyonu.....	23
3.2.11. Süt pıhtılaşma testi ve enzim aktivitesi (IMCU) tayini.....	23
3.2.12. SDS-PAGE ve Western blot analizleri .....	23
3.2.13. Fermentörde kimozi enzimi üretimi.....	24

3.2.14. Enzimin optimum çalışma sıcaklığının ve sıcaklık stabilitesinin belirlenmesi .....	25
3.2.15. Enzimin optimum çalışma pH'ının ve pH stabilitesinin belirlenmesi .....	26
3.2.16. Toplam protein tayini .....	26
3.2.17. His-etiketli kimozinin saflaştırılması .....	26
4. BULGULAR .....	28
4.1. Prokimozin Genine Histidin Etiketini Eklenmesi ve Prokimozin Geni Taşıyan Ekspresyon Vektörlerinin Oluşturulması .....	28
4.2. His-etiketli Ekspresyon kasetlerinin <i>Pichia pastoris</i> Mayasına Transformasyonları .....	31
4.3. Histidin Etiketsiz Prokimozin Geninin Ekspresyon Vektörüne Ligasyonu ve <i>Pichia pastoris</i> Mayasına Transformasyonu .....	34
4.4. Fermentörde Kimozin Ekspresyonu .....	37
4.5. Enzim Karakterizasyonu .....	39
5. TARTIŞMA .....	42
6. SONUÇ .....	46
7. KAYNAKÇA .....	47
8. EKLER .....	49
Ek 1. Tibet öküzü prokimozin gen sekansı ve aa dizilimi .....	49
Ek 2. Çalışmada Kullanılan DNA ve Protein Standartları .....	50
Ek 3. Toplam Protein Tayini Standart Grafiği .....	52
Ek 4. pPICZ ve pPICZ $\alpha$ vektörlerinin şematik gösterimi .....	53
ÖZGEÇMİŞ	



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

bç	baz çifti
aa	amino asit
kbç	kilo baz çifti
$\mu$	mikro ( $10^{-6}$ )
mg	mili gram
g	gram
M	molar
n	nano ( $10^{-9}$ )
OD	optik yoğunluk
S	saniye
$T_m$	çözülme sıcaklığı
U	ünite
g	santrifüj kuvveti
rpm	devir/dakika
$^{\circ}\text{C}$	santigrat derece (sıcaklık birimi)
l	litre
ml	mili litre
sa	saat
s	saniye
v	volt
w/v	ağırlık/hacim

## **Kısaltmalar**

AOX	alkol oksidaz
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
BMGY	Buffered Glycerol-Complex besiyeri
BMMY	Buffered Methanol-Complex besiter
BSA	Bovine Serum Albumin
BSM	Basal Salt Medium
DIG	Digoksjenin
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DTT	Dithiothreitol
FDA	ABD Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration)
GRAS	Genel olarak güvenli kabul edilen (Generally Regarded As Safe)
IMCU	Uluslararası süt pıhtılaştırma birimi (Internation milk clotting unit)
LB	Luria-Bertani Besiyeri
LiAc	Lityum Asetat
OD	Optical Density (Optik yoğunluk)
PAGE	Poliakrilamid Jel Elektrofrez
PBS	Fosfat tamponlu tuzlu çözelti (Phosphate-buffered saline)
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PVDF	Polivinilden florür
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
TAE	Jel Elektrofrez Tamponu, Tris Asetat EDTA
TCA	Triklora asetik asit
TGS	Tris-glisin-SDS
YNB	Maya Azot Bazı
YPD	Maya Pepton Dekstroz, Yeast Pepton Dextrose

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Kimozinin sütün $\kappa$ -kazein moleküllerini etkisinin şematik anlatımı.....	3
Şekil 2.2. (A) Kimozinin yapısının ve (B) çeşitliliğinin şematik gösterimi .....	4
Şekil 2.3. Sığır kimozinin üç boyutlu yapısı.....	5
Şekil 2.4. Kazeinin misel yapısının şematik gösterimi .....	6
Şekil 2.5. PDI aşırı üretici pilazmiti pPIZ3.5K-PDI şematik gösterimi .....	13
Şekil 3.1. Fermentasyon besleme profili.....	25
Şekil 4.1. pUC57 klonlama vektörü içinde gelen prokimozin geninin şematik gösterimi.....	28
Şekil 4.2. XL1-Blue hücrelerine klonlanan pUC57YAK plazmitinin <i>EcoRI/XbaI</i> enzimleriyle kesilerek doğrulanması.....	28
Şekil 4.3. PZR sonrası elde edilen 6His-etiketli kimozin geminin (YAKhis) agaroz jelde görüntülenmesi .....	29
Şekil 4.4. <i>EcoRI/xbalI</i> enzimleriyle doğrusallaştırılan pPICZ $\alpha$ A, pPICZBPIR1, pPICZBHSAYAKhis ve pPICZBPHO1YAKhis vektörlerin jel elektroforezinde görüntülenmesi ve jelden kesilmesi. ....	29
Şekil 4.5. Ligasyon sonrası elde edilen ekspresyon kasetlerinin şematik gösterimi.....	30
Şekil 4.6. pPICZ $\alpha$ AYAKhis, pPICZBPIR1YAKhis, pPICZBHSAYAKhis ve pPICZBPHO1YAKhis ekspresyon kasetlerinin restriksiyon analizinin <i>EcoRV</i> ile yapılması ve agaroz jelde kontrol edilmesi .....	31
Şekil 4.7. pPICZ $\alpha$ AYAKhis, pPICZPIR1YAKhis, pPICZHSAYAKhis ve pPICZBPHO1YAKhis transformantların 96. saatteki süpernatantlarına ait SDS-PAGE görüntüleri. ....	32
Şekil 4.8. pPICZ $\alpha$ AYAKhis, pPICZBPIR1YAKhis, pPICZBHSAYAKhis, pPICZBPHO1YAKhis ekspresyon kasetlerini taşıyan transforman <i>P. pastoris</i> GS115(PDI) mayasından elde edilen süpernatantların SDS-PAGE’te görüntülenmesi .....	33
Şekil 4.9. pPICZ $\alpha$ AYAKhis, pPICZBPIR1YAKhis, pPICZBHSAYAKhis, pPICZBPHO1YAKhis ekspresyon kasetlerini taşıyan transforman <i>P. pastoris</i> GS115(PDI) mayasından elde edilen süpernatantların Western blot membran görüntüleri. ....	33
Şekil 4.10. His-etiketli üretilen kimozin saflaştırmasının SDS-PAGE görüntüsü.....	34

Şekil 4.11. <i>EcoRI/xbalI</i> enzimleri ile kesilerek lineer hale getirilen YAKkimozin geni ve pPICZ $\alpha$ A vektörünün agaroz jelde görüntülenmesi ve kesilerek alınması.....	34
Şekil 4.12. pPICZ $\alpha$ AYAK ekspresyon kasetlerinin <i>EcoRV</i> ile kontrol edilmesi.....	35
Şekil 4.13. Farklı kaynaklardan elde edilen süpernatantların kimozin aktivitesinin süre ve IMCU/ml cinsinden sonuçları .....	36
Şekil 4.14. Sırasıyla 1-20 numaralı pPIC $\alpha$ AYAK (PDI) klonlarına ait süpernatant örneklerinin SDS-GEL görüntüsü.....	37
Şekil 4.15. Fermentörde geliştirilen hücrelerin yaş ağırlığının, hücrelerden elde edilen süpernatantın oluşturduğu pıhtılaşma süresinin ve süpernatantların enzim aktivitesinin grafikleri .....	38
Şekil 4.16. pPICZ $\alpha$ AYAK(PDI) hücrelerinin farklı fermentasyon saatlerindeki süpernatantlarına ait SDS-PAGE görüntüleri .....	39
Şekil 4.17. Fermentörde geliştirilen pPICZ $\alpha$ AYAK(PDI) hücrelerine ait farklı zamanlarda toplanan süpernatantlardaki toplam protein miktarı grafiği ....	39
Şekil 4.18. Rekombinant Tibet öküzü kimozinine ait sıcaklık karakterizasyonu grafikleri.....	40
Şekil 4.19. Rekombinant Tibet öküzü kimozinine ait pH karakterizasyonu grafikleri...	41

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Günümüze kadar rekombinant kimoziin için kullanılan kaynaklar, plazmitler, promotörler ve konakçılar .....	8
Çizelge 2.2. <i>Pichia pastoris</i> yapısal ve tetiklenebilir promotörleri .....	11
Çizelge 2.3. <i>P. pastoris</i> suşlarının karakteristik özelliklerinin listelenmesi .....	12
Çizelge 2.4. <i>P. pastoris</i> mayası için uygun olan plazmitler.....	14
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılacak olan mikroorganizmalar .....	16
Çizelge 3.2. Hücre dışı protein ekspresyonu için kullanılacak olan vektörler.....	17
Çizelge 3.3. PZR’de kullanılacak olan primerler.....	18
Çizelge 3.4. Kimoziin geninin sonuna 6his-etiketi eklemek için yapılacak olan PZR için gerekli malzemeler, miktarlar ve son konsantrasyonlar.....	21
Çizelge 3.5. Gliserol (A) ve metanol (B) besleme fazları sırasında hücrelere gönderilen gliserol ve metanolün zamana göre gönderiliş hızı ve miktarı.....	25
Çizelge 4.1. Kimoziin geni taşıyan ekspresyon kasetlerine yapılan restriksiyon analizi sonrası beklenen bç uzulukları .....	31

## 1. GİRİŞ

Eski çağlardan beri buzağı midесinin ekstraktı, peynir yapımı sırasında sütün pıhtılaştırma basamağı olarak kullanılmıştır. Bu pıhtılaşmaya sebep olan enzimin izolasyonu ilk olarak 1840 yılında Deschamps adında bir araştırmacı tarafından yapılmış ve enzimin adının kimozin olması önerilmiştir. Daha sonra, 1980 yılında Lea ve Dickenson isimli araştırmacılar tarafından bu enzim rennin olarak anılmış ve hatta İngiliz literatürünün büyük bir kısmında bu isimle geçmiştir. Son olarak 1970 yılında araştırmacı Foltman, orijinal isim olan kimozinin kullanılmasını önermiş ve bu öneri IUBMB (Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği) tarafından kabul edilmiştir. Böylece enzim çoğu kaynakta kimozin ismiyle kullanılmıştır (Barret vd 2004).

Kimozin sütte bulunan kazein proteinin spesifik peptid bağlarını (Phe105-Met106) hidrolize eder ve para- $\kappa$ -kazein makropeptidlerini oluşturarak süt koagülasyonunu gerçekleştirir. Kimozinin, kazein üzerine olan yüksek spesifik aktivitesi sayesinde süt ve peynir endüstrisinde en çok tercih edilen süt koagülant proteazıdır (Rao vd 1998).

Kimozin mikroorganizmalardan memelilere birçok kaynaktan doğal olarak elde edilebilir. Bunlar yeni doğan memelilerin mide mukozası, bazı bitkilerin salgıları ve mikroorganizmalar (*Mucor pusillus*, *Aspergillus niger* gibi) (Chitpinyol ve Crabb 1997) gibi kaynaklardır. Ancak bu kaynaklardan elde edilen kimozin dünya pazarının talebini karşılayacak nitelikte ve nicelikte olmadığından, rekombinant kimozin, endüstri için etkili bir alternatif olmuş ve birçok avantaj sağlamıştır (Jiang vd 2012).

Endüstriyel ihtiyacı karşılamak için birçok bakteri, maya ve küfte rekombinant kimozin doğal formunda üretilmiştir (Kumar vd 2010). *Escherichia coli* K-12 ile üretilen rekombinant sığır kimozinin, gıdalarda kullanımı Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından kabul edilen ilk rekombinant enzim olmuştur (Olempska-Beer vd 2006). Rekombinant kimozin düşük proteolitik aktivite göstererek istenmeyen protein parçalanmalarına yol açmaz, standart hale getirilebildiğinden beklenmedik koagülasyon şartları oluşturmaz, vejetaryenlerce rahatlıkla kullanılabilir. Ayrıca en büyük avantajı az miktarda proteoliz (100% kimozin) ile yüksek miktarda verim elde sağlayabilmesidir (Kumar vd 2010).

*Pichia pastoris* genetik mühendisliğinde sıkça kullanılan metilotrofik bir mayadır. *P. pastoris* ile akademik araştırmalar düzeyinde ve/veya endüstriyel kullanım amacıyla binlerce çeşit protein ekspresyonu yapılmıştır. *P. pastoris*'in rekombinant protein üretmeye elverişli olmasının üç ana sebebi vardır: (1) genetik manipülasyon için gerekli tekniklerin kolaylığı (2) hücre içi veya hücre dışı olarak yüksek miktarda protein ekspresyonu sağlanması; çünkü *P. pastoris* çok düşük miktarlarda endojen protein salgılar, bu sebeple mayanın salgıladığı proteinin çok büyük miktarı-neredeyse tamamı-istenen rekombinant proteindir ve heterolog proteinin doğrudan supernatant içine salgılanabilmesi saflaştırma aşaması için çok büyük kolaylıktır. (3) birçok 'yüksek ökaryotik' protein modifikasyonlarını (disülfid bağ oluşumu, glikozilasyon gibi) gerçekleştirebilir. Ayrıca *P. pastoris* heterolog ekspresyon işlemini yürütecek birçok sayıda güçlü promotora sahiptir (Cereghino vd 2002, Cereghino vd 2013).

Yabancı bir genin *P. pastoris*te ekspresyonu üç basamakta gerçekleşir; 1) genin ekspresyon vektörüne aktarılması 2) ekspresyon vektörünün *P. pastoris*te yerleştirilmesi, 3) genin ekspresyonunun kontrol edilmesi. *P. pastoris*'te yapısal ve tetiklenebilir birçok promotor bulunmaktadır. Ancak heterolog proteinlerin üretilmesi için bugüne kadar elde edilen veriler sonucunda en başarılı sistemin metanol varlığında yapılan ekspresyon sistemleri olduğu belirlenmiştir. Bu sebeple en çok tercih edilen promotorlar metanol ile tetiklenen AOX promotorlarıdır (Macauley-Patrick vd 2005).

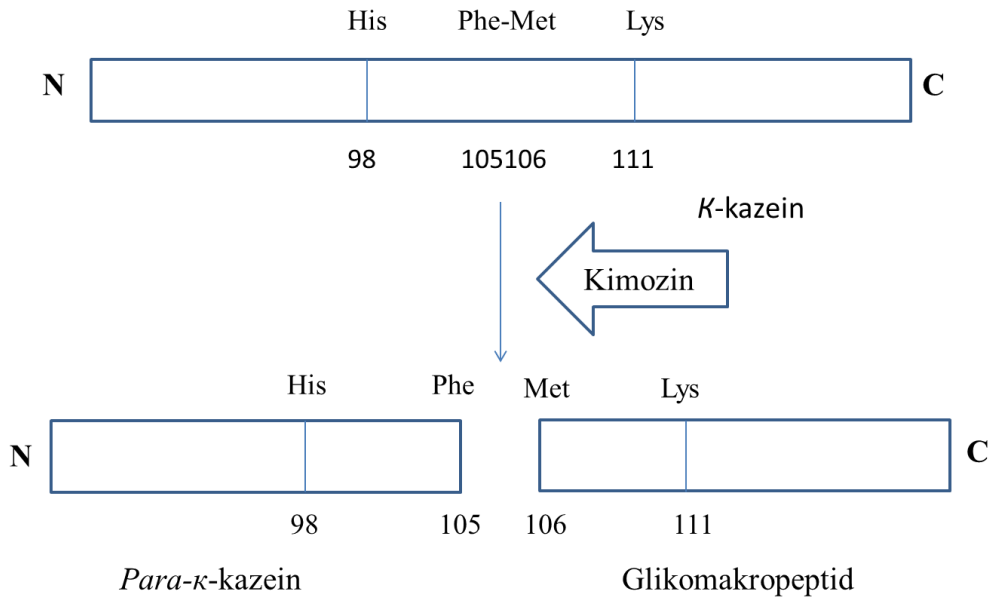
Bu çalışmada aktif kimozinin hücre kültürü süpernatantına salgılanabilmesi için *Saccharomyces cerevisiae*  $\alpha$ -eşleşmesi faktörü( $\alpha$ -MF), HSA (İnsan serum albümini), PIR1(*P. pastoris* Protein with Internal Repeats) ve PHO1 (*P. pastoris* Acid Phosphatase) sekresyon sinyalleri taşıyan ekspresyon vektörleri kullanılmış, ancak sadece  $\alpha$ -MF sekresyon sinyali taşıyan ekspresyon kasetiyle yapılan çalışmada süpernatanta rekombinant kimozin enzimi salgılanabilmiştir. Ayrıca ilk kez gen kaynağı olarak Tibet öküzü prokimozin geni kullanılmıştır. Oluşturulan ekspresyon kaseti (pPICZ $\alpha$ AYAK) ile AOX1 promotoru altında *P. pastoris* mayası ile rekombinant Tibet öküzü kimozini engelli erlenmayer ve fermentör ölçeğinde üretilmiştir. Kısmi karakterizasyonu yapılmıştır.

## 2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI

### 2.1. Kimozin Nedir?

Peynir üretimi en eski biyoteknolojik enzim uygulamalarından birisidir. Peynirin ilk elde edilişi; sütün, geniş getiren bir hayvanın midesine koyularak muhafaza edilmesiyle, tesadüfen olmuştur. Bu süreçte aktif olarak rol oynayan maddeler, genel anlamıyla “rennet” olarak adlandırılan, pepsin ve kimozin proteolitik enzimleridir (Jensen vd 2013).

Kimozin, peynir endüstrisinde ticari olarak büyük öneme sahip bir enzimdir. Bir çok organizma ve dokuda farklı fizyoloji ve fonksiyonel özelliklerde bulunabilen aspartik proteinazlar ailesine aittir (Chitpinyol ve Crabb 1997). Proteazların çalışma prensibi temel olarak şöyledir; proteazlar aktif bölgelerinde iki önemli aspartik asit amino asidi (Asparajin) bulundurlar; Asp<sup>32</sup> ve Asp<sup>215</sup>. Aktif bölgenin iki lobül arasında bulunduğu bu üç boyutlu bilobül yapı, sütün  $\kappa$ -kazein mükülleri içinde bulunan Phe<sup>105</sup>-Met<sup>106</sup> bağına etki eder. Bu etkileşim sonucunda *para*- $\kappa$ -kazein oluşarak süt koagülasyonu gerçekleşir (Şekil 2.1). Kimozin diğer aspartik proteazlar gibi endüstride kullanıldığında süt kazeinlerinin farklı şekillerde parçalanmasına, acı tada ve protein miktarında kayba yol açmaz. Peynir yapımında yüksek miktarda verim sağlar. Bu özellikler sayesinde kimozin peynir endüstrisinde kullanılan en önemli aspartik proteinazdır (Vallejo vd 2008).

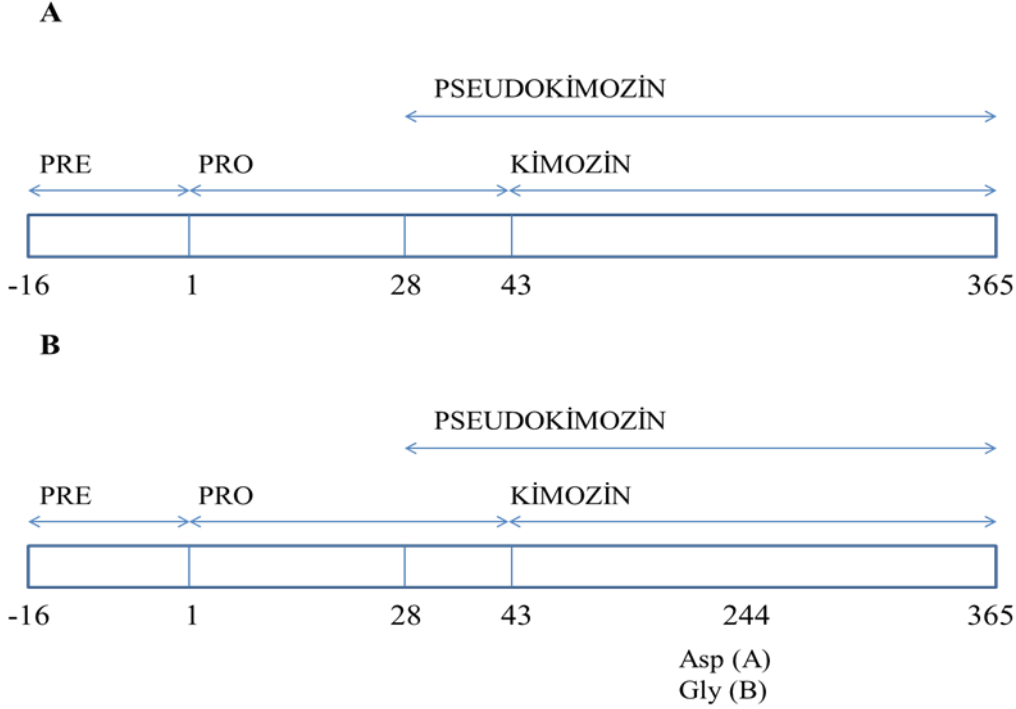


Şekil 2.1. Kimozinin sütün  $\kappa$ -kazein moleküllerini etkisinin şematik anlatımı

Kimozin mide mukoza hücreleri tarafından preprokimozin olarak sentezlenir. Preprokimozinden 16 aminoasit uzunluğundaki sinyal peptidinin ayrılması ile prokimozin elde edilir (Attalah 2007). Sığır prokimozini 365 adet amino asit içerir ve moleküler ağırlığı 40.777 Da'dır. Pro segmenti doğru katlanma, hedefleme ve aktivasyon için önemlidir. Katalitik olarak inaktif formda olan prokimozin pH değerine



bağlı olarak iki türe dönüşebilir: N-terminalden 42 amino asitin uzaklaşmasıyla aktif kimoziin (pH 4.2, 323 aa, 35,6 kDa) ve 27 amino asitin uzaklaştırılmasıyla aktif pseudokimoziin (pH 2, 338 aa) (Şekil 2.2 A). Üçün altındaki ve altının üstündeki pH'larda kararlı olan pseudokimoziin, pH 4.5'ta kimoziine dönüşebilir (Kumar vd 2010) (Şekil 2.2 A).



Şekil 2.2. (A) Kimoziinin yapısının ve (B) çeşitliliğinin şematik gösterimi

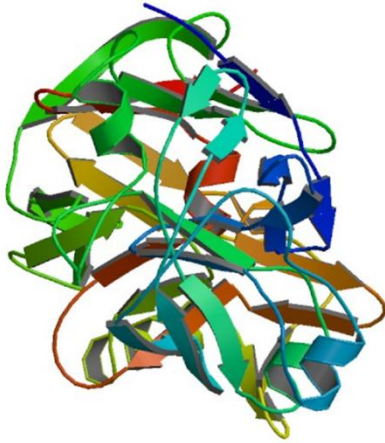
## 2.2. Kimoziin Kaynakları

Peynir endüstrisinin kullandığı rennet kaynaklarını dört grup altında toplayabiliriz; 1) bitkisel, 2) mikrobiyal, 3) hayvansal ve 4) rekombinant rennet. Farklı kaynaklardan elde edilen rennetler farklı karakteristik özellikler gösterir ve bu onların uygulama şekillerinde belirleyici olur. Bitki kaynaklı rennetler belli coğrafi bölgelerdeki bazı özel peynirlerin üretimi için kullanılırlar. Mesela *Cynara scolymus* veya *Ficus carica* Güney ve Kuzey Cezayirin tarımsal bölgelerinde üretilen bir çeşit peynirin yapımında kullanılan bitkilerdir (Jiang vd 2012). Birçok bakteri ve küf potansiyel rennet kaynağı olarak gösterilebilir. Genellikle kullanılan küfler *Mucor pussillus*, *Mucor meihei*, *Endothica parasitica*, *Aspergillus oryzae*, *Bacillus subtilis*, *Mycococcus xanthus*, *Bacillus licheniformis* ve *Irpex*. Sütün koagülasyonunu sağlayan rennet, bu mikroorganizmaların kültür süpernatantından elde edilir. Ancak mikrobiyal rennet içinde bulunan spesifik süt koagülant enzim miktarı düşüktür. Ayrıca mikrobiyal rennet kullanımı peynirin katı yapısının oluşmaması, acı tadın ortaya çıkması ve yağ- protein miktarında düşüş olması gibi sorunlar ortaya çıkarır (Mohanty vd 1999, Jiang vd. 2012). Kimoziin, geleneksel olarak koyun, keçi, inek gibi yeni doğmuş geviş getiren hayvanların midesinin dördüncü bölgesinin (abomasum) doğrudan preslenmesiyle elde edilir. Oluşan peynirin yapısı ve aroması itibariyle son zamanlardaki en etkili enzim

buzacı kaynaklı kimoindir. Fakat bu şekilde elde edilen kimozin dünya pazarının talebini karşılayamaz. Ayrıca bulaşıcı ajanların ortaya çıkmasından ve saflaştırma problemlerinden dolayı sağlık için riskli olabilir (Vallejo vd 2008). Bu geleneksel yöntem her yıl çok sayıda hayvanın kesilmesine sebep olur ve ayrıca dünya peynir pazarı talebini de karşılayamaz. Bunun üzerine peynir endüstrisi buzağı kimozinine alternatif olarak yeni ve stabil bir enzim kaynağı bulmuştur. Rekombinant kimozin, endüstri için etkili bir alternatif olmuş ve birçok avantaj sağlamıştır (Jiang vd 2012).

### 2.3. Kimozinin Yapısı

Kimozinin birincil yapısı bir çok türde (sığır, keçi, koyun...) amino asit veya nükleotid dizilimine göre, insanda ise pseudo-gene göre belirlenir. Sığır kimozinini üç farklı türde ortaya çıkar. Bu çeşitlilik proteinin 244. amino asidinde meydana gelen mutasyondan kaynaklanır. Amino asit diziliminde 244. sırada asparajin (Asp) var ise A formu, glisin (Gly) var ise B formu olarak adlandırılır (Şekil 2.2 B). C formundaki kimozin ise A formunun bozunma ürünü olarak ortaya çıkar. Bu bozunma Asp243-Glu244-Phe245 amino asitlerinin otolitik ayrılmasıyla gerçekleşir. Kimozinin C formu ise A formundaki kimozine göre %50 daha düşük proteolitik aktivite ve %25 süt koagülasyon aktivitesi gösterir (Szecsi ve Harboe 2013). Kimozinin ikincil yapısı genel olarak  $\beta$ -sheet, az miktarda da  $\alpha$ -helix yapılarından oluşur (Şekil 2.3). Aspartik proteinazların (domuz pepsini, pepsinojen, insan renini, penisilo pepsin, rhizopus proteaz gibi) üçüncül yani üç boyutlu yapısı ise X-ray kristalografi yöntemiyle ortaya çıkarılmıştır. Spesifik olarak rekombinant sığır kimozinini 2.3 Å ve 2.2 Å çözünürlüklerinde görüntülenmiştir (Fox 2004).

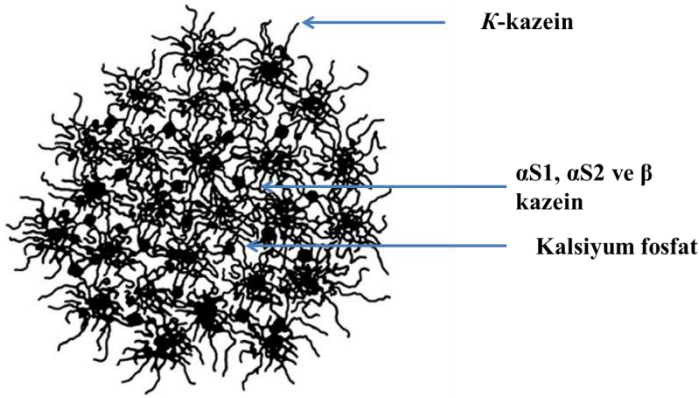


Şekil 2.3. Sığır kimozinin üç boyutlu yapısı (Gilliland 1990)

### 2.4. Sütün Yapısı ve Kimozinin Çalışma Mekanizması

Süt; su, yağ, laktoz, sitrik asit gibi organik bileşikler ve kalsiyum fosfat gibi inorganik bileşenlerle birlikte, özellikle besinsel olarak önem taşıyan proteinleri içeren biyolojik bir sıvıdır.

Süt proteinleri; kazeinler, peynir altı suyu proteinleri ve lipid fazla ilişkili proteinler olarak sınıflandırılabilir. İnek sütü ve diğer hayvanlardan elde edilen sütlerde bulunan parakazein proteini genel olarak iki farklı grupta incelenir. Birincisi 20 °C ve 4.6 pH'da çözünemeyen fosfoproteinler, ikincisi ise peynir altı suyu proteinleridir (whey). Kazein, inek sütündeki toplam azot miktarının %80'ini oluşturur. Kazein dört temel proteinden oluşur; %40 alfa S1, %10 alfa S2, %35 beta ( $\beta$ ) ve %12 kappa ( $\kappa$ ) (Şekil 2.4). Bütün kazeinler fosforile haldedir ve özellikle alfa S1, alfa S2 ve  $\beta$  kazeinleri yüksek fosfor içeriğinden dolayı  $Ca^{+2}$  ile çok güçlü bir bağ yaparak çöktürür. Fakat  $\kappa$  kazeinin yalnızca bir fosfatı olduğundan  $Ca^{+2}$  ile güçlü bir bağ oluşturamaz ve yüksek  $Ca^{+2}$  konsantrasyonunda çözülebilir haldedir.  $\kappa$ -Kazein, alfa S1, alfa S2 ve  $\beta$  kazein ile hidrofobik olarak etkileşim halindedir.  $\kappa$ -Kazein, kalsiyuma hassasiyeti olan diğer kazein proteinlerinin rastgele kümeleşerek kalsiyumu çöktürmesini engeller. Sütte misel ya da koloidal olarak %95'ten fazla kazein bulunur (Mohanty vd 1999).



Şekil 2.4. Kazeinin misel yapısının şematik gösterimi (Gaucheron 2005)

Kimozinin ilk etkisi,  $\kappa$ -kazeine proteolitik olarak bağlanarak çözünemeyen para- $\kappa$ -kazein ve TCA'da çözünebilir makropeptid oluşturmasıdır. Bu ilk etkinin sonrası kalsiyum varlığında çözünemeyen para- $\kappa$ -kazeinler 20°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda pıhtı oluşturur. Kalsiyum yokluğunda, kalsiyumda çözünemeyen para- $\kappa$ -kazeinler, kalsiyuma hassas kazeinlerle etkileşerek presipitasyonu engeller. Diğer yandan ise kalsiyum varlığında para- $\kappa$ -kazeinler ile kazeinler pıhtı oluştururlar.

Sıcaklık, pH, iyonik güç, tuzlar ve enzim konsantrasyonu gibi birçok faktör süt pıhtılaşma sürecine etki eder. Yüksek pH değerleri (6.6-6.7) pıhtı süresini ve pıhtı dayanıklılığını azaltır, düşük pH değerleri (3-4) ise yüksek hidrolitik aktivite yüzünden pıhtı miktarını azaltır. Sütün başlangıç koagülasyon oranında, kimozin ve süt kaynağı da sütün bileşenleri ve ön uygulama süreçleri kadar etkilidir. Ayrıca süt koagülasyonu kalsiyum iyonlarının varlığından pozitif yönde etkilenir (Kumar vd 2010).

## 2.5. Rekombinant Kimozin

Yirminci yüzyılın sonlarında araştırmacılar gıda endüstrisinde kullanılan ilk rekombinant proteini üretmeyi başarmışlardır. *Escherichia coli* K-12 ile üretilen rekombinant sığır kimozini, gıdalarda kullanımı ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA)

tarafından kabul edilen ilk rekombinant enzim olmuştur (Olempska-Beer vd 2006). Bundan sonra endüstri bu uygulamayı geliştirebilmek için araştırmalara ve çalışmalara devam etmiştir. Bu biyoteknolojinin optimizasyonu ve rekombinant DNA teknolojisindeki gelişmeler sonucunda yeni ve daha iyi özelliklerde çeşitli proteinlerin elde edilmesinin önü açılmıştır (Spohnera vd 2015).

Mikrobiyal sistemlerde rekombinant protein üretimi biyokimya alanında devrimsel niteliktedir. Geleneksel yöntemlerle çok az miktarda bir enzim elde edebilmek için bile kilolarca hayvan, bitki dokusu veya biyolojik sıvılara ihtiyaç vardır. Oysa istenen proteininin recombinant olarak yüksek miktarda elde edilebilmesi ve saflaştırılabilmesi, biyokimyasal karakterizasyonunun yapılması, endüstride kullanılması ve ticari ürünlerin geliştirilmesi bakımından oldukça önemlidir. (Rosano ve Ceccarelli 2014).

Süt ürünleri endüstrisi için saf, çözünebilir ve aktif kimozi ana ihtiyaçlardır. Fakat doğal yollardan elde edilen kimozi miktar ve kalite açısından ihtiyacı karşılayacak nitelikte ve boyutta değildir. Bu sebeple genetik mühendisleri kimozi doğal şekliyle bakteri, küf veya mayalardan rekombinant olarak üretme çözümünü geliştirmişlerdir (Çizelge 2.1). Rekombinant kimozi FDA tarafından kabul görmüş ve peynir endüstrisinde kullanımı için güvenli gıdalar (GRAS) kategorisinde değerlendirilmiştir. Rekombinant kimozinin avantajlarını şu şekilde sıralayabiliriz; düşük proteolitik aktivite gösterir, standart hale getirilebildiğinden beklenmedik koagülasyon şartları oluşmaz, vejetaryenlerce rahatlıkla kullanılabilir. Ayrıca en büyük avantajı az miktarda proteoliz (100% kimozi) ile yüksek miktarda verim elde edilebilmesidir (Kumar vd 2010).

## **2.6. Rekombinant Kimozi için Kullanılan Konakçılar**

Konakçı organizmanın seçimi sürecin tamamının başarısı için çok önemli bir basamaktır. Protein ekspresyonuna en uygun konakçıyı seçerken, konakçının biyokimyasal çevreye uyum sağlayabilmesi, RNA transkripsiyonunun translasyonunu sağlayabilmesi, translasyonu yapılmış proteini modifiye etme ve modifiye etmeyi sürdürme yetenekleri de eşit derecede önemli parametrelerdir (Çelik ve Çalık 2012).

Rekombinant protein üretimi için bir çok konakçı organizma kullanılabilir; bakteri, maya, bitki, küf, memeli hücresi veya transgenik hayvanlar gibi. Konakçı seçimi rekombinant proteinin spesifik gereklilikleri ve uygulama şekline bağlı olarak değişiklik gösterebilir. Konakçı seçimi sadece proteini çoğaltma işlemini değil aynı zamanda saflaştırma işlemlerini ve kolaylığını da etkiler. Konakçı seçilirken elde edilecek ürünün miktarı ve saflık derecesini değerlendirirken aynı zamanda konakçının biyolojik entegrasyonu ve genin toksik etkisi de göz önünde bulundurulmalıdır. Sözelimi fonksiyonel bir rekombinant protein üretebilmek için translasyon sonrası modifikasyon gerektiren bakteri ekspresyon sistemleri uygun değildir. Rekombinant protein ürününün bakteri sistemi tarafından salgılandığı yer de izolasyon ve purifikasyon metodlarını belirlemede önemli bir rol oynar. Sözelimi bir konakçı ürettiği rekombinant proteini hücre dışı olarak büyüme ortamına ya da hücre içi olarak sitoplazmaya salgılayabilir (Anonim 2012).

Çizelge 2.1. Günümüze kadar rekombinant kimoziin için kullanılan kaynaklar, plazmitler, promotörler ve konakçılar (Kumar vd 2010)

<b>Kimoziin Kaynağı</b>	<b>Kimoziin Formu</b>	<b>Plazmid</b>	<b>Promotör</b>	<b>Konakçı Organizma</b>	<b>Kaynak</b>
Buzağı	pro	pCR301	LacUV5	<i>Escherichia coli</i>	Nishimori vd 1982
Buzağı	pro	pCT66,67,70	Triptofan	<i>Escherichia coli</i>	Emtage vd 1983
Buzağı	pro	P501	Triptofan	<i>Escherichia coli</i>	Nishimori vd 1984
Buzağı	kimoziin	pGK2231	Serin Hidroksimetil Transferaz	<i>Escherichia coli</i>	Genex 1985
Buzağı	pro	pTaAc	Tac	<i>Escherichia coli</i>	Zhang vd 1991
Kuzu	met-pro	pKP1500	-	<i>Escherichia coli</i>	Rogelj vd 2001
Keçi	pro	pET43.la(+)	T7	<i>Escherichia coli</i>	Kumar vd 2007
Sığır	pro	pKM636, pKM 1361	SpeA	<i>Proteus mirabilis</i>	Klessen vd 1989
Sığır	pro	pSM316	Nötral proteaz	<i>Bacillus Subtilis</i>	Parente vd 1991
Keçi	pro	pQSec1	pGK	<i>Kluyveromyes lactis</i>	Vega-Hernandez vd 2004
Keçi	pro	pQFlag1	ADH2	<i>Saccharomyces Cerevisiae</i>	Vega-Hernandez vd 2004
Bufalo	prepro, pro, kimoziin	pGAPZαA	pGAP	<i>Pichia pastoris</i>	Vallejo vd 2008
Sığır	pro	pPICZαA	-	<i>Pichia pastoris</i>	Zhang vd 2009
Buzağı	kimoziin	-	glaA	<i>Aspergillus oryzae</i>	Tsuchiya vd 1993
Sığır	kimoziin	-	pdA&pepB	<i>Aspergillus awamori</i>	Cardoza vd 2003
Deve	pro	pGAMpR	glaA	<i>Aspergillus niger</i>	Kappeler vd 2006

### 2.6.1. *Escherichia coli*

*Escherichia coli* çoğunlukla insanların kalın bağırsağında bulunan bir bakteridir. Bazı yaban ve evcil hayvanların da ince bağırsağında görülür. *E. coli* gram negatif basıl şekilli bir gama proteobakteridir. Genellikle bakteri çalışmalarında model organizma olarak kullanılır. Genel olarak patojen olmamakla beraber, bazı türleri ishal ya da idrar yolu enfeksiyonlarına hatta ölüme sebep olabilir (El-Sohaimy vd 2010).

*E. coli* canlılar arasında üzerinde en derinlemesine çalışmalar yapılan organizmalardan biridir. Genetiği ve metabolizması detaylı olarak anlaşıldıktan sonra genetik mühendislerinin çalışmaları için favori organizma haline gelmiştir. *E. coli* hızlı büyüyen bir mikroorganizma olmakla beraber besiyeri ve büyüme şartları büyük maliyet gerektirmez.(El-Sohaimy vd 2010, Menzella 2011).

Rekombinant *E. coli* kimozinin enzimatik özellikleri doğal buzağı kimozininden ayırt edilemeyecek kadar aynıdır. Fakat *E. coli* rekombinant proteini hücre içi ara maddesi olarak salgıladığından, sekresyonu artırma ve elde etmek adına ekonomik bir dezavantaj oluşturur (Menzella 2011).

### 2.6.2. *Saccharomyces cerevisiae*

*S. cerevisiae* geleneksel biyoteknolojik bir organizmadır. Genomu tamamen sekans edilebilmiş ilk ökaryot olarak yaklaşık olarak son otuz yıldır çeşitli rekombinant proteinlerin ekspresyonunda kullanılmaktadır. İnsanlarda viral enfeksiyonları engelleyici hepatitis B aşısı ilk kez *S. cerevisiae*'da rekombinant olarak üretilmiştir. Günümüzde de FDA (Food and Drug Administration) ve EMEA (European Medicines Agency) tarafından kabul görmüş mikrobiyal ökaryotik hücreler tarafından üretilen ilaçların çoğunda *S. cerevisiae* kullanılmıştır.

*S. cerevisiae* mayasının FDA tarafından GRAS olarak kabul edilmesi; fizyolojisinin, genetiğinin ve fermantasyon tekniklerinin iyi bilinmesi bu mayayı endüstriyel anlamda da popüler hale getirmiştir. *S. cerevisiae*'nin rekabetçi oluşu, yüksek miktarda etanol üretme ve tüketme kapasitesinden ve düşük oksijen seviyesi gibi çevresel streslere toleranslı olmasından kaynaklanmaktadır.

Diğer maya türleri arasında *S. cerevisiae* yüksek glikolizasyon kapasitesine sahiptir; bu da hiperglikozilasyon ve düşük sekresyon oranına yol açar. Alternatif rekombinant protein ekspresyon sistemleri bulunsa da, *S. cerevisiae* hala en çok kullanılan ekspresyon sistemlerinden biridir (Çelik ve Çalık 2012).

### 2.6.3. *Aspergillus niger*

*Aspergillus niger* biyoteknolojide kullanılan en önemli mikroorganizmalardan birisidir. Uzun yıllardır genellikle gıdada hücre dışı enzimlerin ve sitrik asitin üretilmesinde kullanılmaktadır. *A. niger* enzimleri FDA tarafından GRAS olarak kabul edilmiştir. Bununla birlikte *A. niger* son yirmi yıldır biyotransformasyonlarda ve atık arıtma işlemlerinde de kullanılmaktadır. *A. niger* gıda enzimlerinde yüksek ekspresyon

elde edebilmek için önemli bir transformasyon konakçısı olarak geliştirilmiştir (Schuster vd 2002).

*A. niger* geniş bir çevrede bulunabilir ancak özellikle bitkilerden ve topraktan elde edilebilir. *A. niger* enfeksiyonları sadece bağışıklık sistemi zayıf insanlar için problem olabilir. Genellikle akciğer enfeksiyonlarına neden olur fakat diğer organlara da yayılabilir (Bennet ve Baker 2010).

*A. niger*'in önemi 1919 yılında endüstriyel olarak sitrik asit üretildiğinde anlaşılmış, bunu glukonik ve fumarik asit üretimleri takip etmiştir. Ancak 1960'lardan itibaren gıda endüstrisi için kullanılan enzimlerin kaynağı olmaya başlamıştır. *A. Niger*'i yabancı proteinlerin ekspresyonunda kullanabilmek ve üretim işlemini geliştirmek için gen teknolojisi kullanılmıştır. Sitrik asit, amilaz, selüloz, ksilenaz ve proteaz FDA tarafından da GRAS olarak kabul edildikten sonra, *A. niger* kimozenin üretimi için de önemli bir konakçı haline gelmiştir (Schuster vd 2002).

#### 2.6.4. *Kluyveromyces lactis*

*Kluyveromyces lactis* mayası üzerinde yıllardır çalışmalar yapılagelmekte ve gıda endüstrisi uygulamaları için güvenli olduğu bilinmektedir. *K. lactis* 1950'lerden itibaren laktozsuz süt ürünlerinin üretimi için çok önemli bir enzim olan laktazı ( $\beta$ -galaktosidaz) elde etmek için kullanılmıştır. Kurutulmuş ve inaktive edilmiş *K. lactis* ise 1960'larda gıdalarda protein ilavesi olarak kullanılmıştır. *K. lactis* 1980'lere gelindiğinde transformasyon sisteminin kurulduğu ilk mayalardan biri olmuştur. Bu durum *K. lactis*'in heterolog proteinlerin ekspresyonu için uygun bir konakçı olarak geliştirilmesine olanak sağlamıştır. Endüstrideki en iyi bilinen kullanımı sığır kimozenin ticari olarak üretimidir.

Genetik manipülasyonunun kolaylığı, integratif ve episomal ekspresyon vektörlerini kullanma yeteneği ve tamamen sekanslanmış olan genomunun bulunabilirliği *K. lactis*'in kullanımını avantajlı hale getiren faktörlerdir. Ayrıca *K. lactis* ile elde edilen enzimler FDA tarafından GRAS olarak kabul edilmiştir (Van Ooyen vd 2006).

#### 2.6.5. *Pichia pastoris*

Metilotrofik bir maya olan *P. pastoris*, günümüzde *Komagataella pastoris* olarak tekrar sınıflandırılmıştır (Spohnner vd 2015). *P. pastoris* biyoteknolojik süreçlerde ve özellikle heterolog protein üretiminde çok önemli bir ekspresyon sistemi haline gelmiştir. *P. pastoris* oldukça yüksek miktarlarda heterolog protein ekspresyonu sağlayan AOX1 promotor geni sayesinde 1980'li yıllarda protein ekspresyon sistemi olarak geliştirilmiştir. Bitki kaynaklı bir enzim olan hidrosinitril liyaz 1990'lı yıllarda litrede 20 gram protein ile ilk geniş ölçekli rekombinant protein üretimi olarak kayda geçmiştir. GS115 ve DSMZ 70382 protein ekspresyonunda kullanılan ilk *P. pastoris* suşlarıdır (Spohnner vd 2015).

Günümüze dek süregelen rekombinant protein üretimi çalışmalarına bakıldığında *P. pastoris* mayasının yaygın olarak kullanıldığı görülmektedir. *P. pastoris*, hem araştırma ölçeğinde hem de endüstriyel ölçekte, miligramdan grama

ulaşan miktarlarda protein ekspresyonu sağlar (Cereghino vd. 2002) (Macauley-Patrick vd. 2005). *Pichia pastoris*'in protein ekspresyonuna uygunluğuna üç temel sebep gösterilebilir: 1) Moleküler genetik seviyesinde kolayca manipüle edilebilir olması 2) Proteinleri hücre içine veya hücre dışına salgılayarak yüksek miktarlarda protein ekspresyonu sağlaması 3) Birçok “yüksek ökaryotik” protein modifikasyonunu (glikozilasyon, proteolitik işlem ve disülfid bağı oluşumu gibi) gerçekleştirebilmesi (Cereghino vd 2002). Bu özelliklere ek olarak *P. pastoris*, kompleks büyüme ortamları ve kültür şartları gerektirmez, az miktarda besiyeri kullanarak yüksek hücre konsantrasyonlarına ulaşabilir (Macauley-Patrick vd 2005). Ayrıca *Pichia pastoris* çok az hücre dışı endojen protein üretir, bu özelliği saflaştırma basamaklarında büyük kolaylık sağlamış olur (Creg vd 2000).

## 2.7. *Pichia pastoris* Ekspresyon Sistemi

*P. pastoris* metanolü karbon ve enerji kaynağı olarak kullanır. Metanolün maya tarafından kullanımında bazı özel enzimler rol oynar. İlk reaksiyonlar peroksizomlarda başlar ve takip eden metabolik olaylar sitoplazmada devam eder. Peroksizomlar büyüme esnasında metanol metabolizması için vazgeçilmez olan üç enzimden sorumludur; alkol oksidaz, katalaz ve dihidroksiaseton sentezi. Metanol asimilasyonu ve disimilasyonu sitozolde gerçekleşir.

Heterolog protein ekspresyonunda kullanılacak promotorun seçimi ürünün verimini önemli ölçüde etkileyen bir faktördür. Heterolog, homolog olduğu kadar yapısal ve tetiklenebilir maya promotorları geniş bir çeşitlilikte mevcuttur. *P. pastoris* için yapısal ve tetiklenebilir promotorlar Çizelge 2.2’de listelenmiştir (Çelik ve Çalık 2012).

Çizelge 2.2. *Pichia pastoris* yapısal ve tetiklenebilir promotorları

Promotor	Tür
AOX1	Tetiklenebilir (metanol)
AOX2	Tetiklenebilir (metanol)
FLD1	Tetiklenebilir (metanol, metilamin)
GAP	Yapısal
PEX8	Tetiklenebilir (metanol, oleat)
YPT1	Yapısal
ADH3	Tetiklenebilir (etanol)

AOX1 promotoru altında ekspresyon yapan suşlar uyarılmak, biyokütleyi arttırmak ve üretimi sağlayabilmek için genellikle metanolü kullanırlar. Metanolün alkol oksidaz tarafından oksidasyonunu sağlayan iki gen kullanılır; bunlar AOX1 ve AOX2 genleridir. Duruma göre bu genlerden birinin veya her ikisinin silinmesi halinde ortaya farklı fenotiplerde suşlar çıkar (Looser vd 2015).

*P. pastoris* suşları metanol kullanımına göre üç fenotipte incelenir; Mut<sup>+</sup>, Mut<sup>s</sup>, Mut<sup>-</sup>. Mut<sup>+</sup> fenotipindeki suşlar metanol varlığında büyür ve büyük ölçekli fermantasyon üretimlerinde yüksek metanol besleme oranı gerektirir. Mut<sup>s</sup>



fenotipindeki suşlarda, AOX1 geni silindiğinden metanol metabolizması AOX2 geni üzerinden devam eder. Bunun sonucunda yavaş büyüyen ve yavaş metanol metabolizması gösteren suşlar meydana gelir. Mut<sup>s</sup> fenotipindeki suşlarda AOX1 ve AOX2 genleri silindiğinden metanol varlığında gelişemezler (Looser vd 2015). Çizelge 2.3'te yaygın olarak kullanılan *P. pastoris* suşları genotip, fenotip, promotor ve tetikleyici özellikleriyle listelenmiştir. Bunlardan GS115, AOX1 ve AOX2 genlerinin ikisini de bulundurması, metanollü ortamda yabancı suş büyüme oranı kadar büyüme göstermesi gibi avantajlarından dolayı en yaygın kullanılan *P. pastoris* suşudur. Ayrıca GS115 büyük ölçekli fermentör üretimlerinde yüksek hücre yoğunluğuna ulaşabilme yeteneğinden dolayı da popülerlik kazanmıştır (Christian 2006).

Çizelge 2.3. *P. pastoris* suşlarının karakteristik özelliklerinin listelenmesi

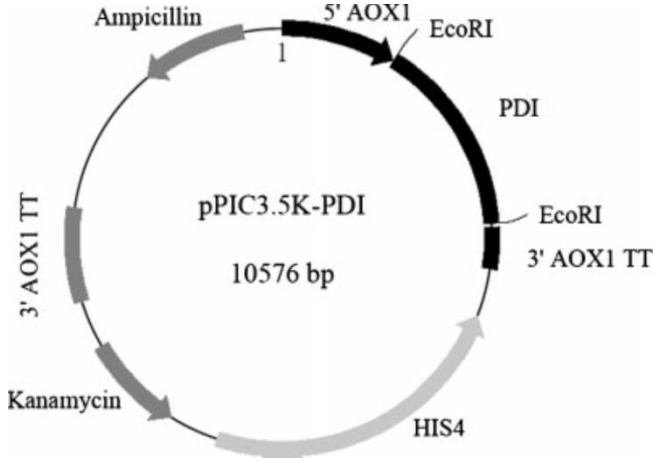
Suş	Genotip	Fenotip	Promotor	Tetikleyici
Y-11430	Yabancı suş	NRRL*	AOX1 ve AOX2	Metanol
GS115	<i>His4</i>	Mut <sup>+</sup> His <sup>-</sup>	AOX1 ve AOX2	Metanol
KM71	<i>Aox1::Sarg4 his4arg4</i>	Mut <sup>s</sup> His <sup>s</sup>	AOX2	Metanol
X-33	Yabancı suş	Mut <sup>+</sup>	AOX1 ve AOX2	Metanol
MC100-3	<i>Aox1::sarg4 Aox2::Phis4 his4arg4</i>	Mut <sup>+</sup> His <sup>-</sup>	-	Metanol
SMD1168	Pep4his4	Mut <sup>+</sup> His <sup>-</sup> Proteaz A noksan	AOX1 ve AOX2	Metanol
SMD1165	Prb1his4	Mut <sup>+</sup> His <sup>-</sup> Proteaz B noksan	AOX1 ve AOX2	Metanol

\*Northern Regiona Research Laboratories, Peoria, IL

Karbon kaynağı olarak yeterli miktarda metanol bulunan ortamlarda, Mut<sup>+</sup> fenotipindeki suşların 30°C'deki maksimum büyüme oranı ( $\mu_{max}$ ) 0,15 h<sup>-1</sup>'dir. Mut<sup>s</sup> fenotipindeki suşlarda bu oran daha düşüktür; 0,035 h<sup>-1</sup>. 30°C'nin altındaki sıcaklıklarda ve bazı kültür medyalarına göre  $\mu_{max}$  değeri düşüş gösterir (Looser vd 2015).

Bu çalışmada konakçı hücre olarak *P. pastoris* GS115(PDI) suşu kullanılmıştır. Endoplazmik retikulum proteinlerin disülfid sıralanmasının doğru yapılmasına yardımcı olan ve 'folding assistant' adı verilen bir takım proteinler içerir. Disülfid bağı oluşumu, proteinlerin endoplazmik retikulumda katlanmasında kritik bir rol oynar. Protein disülfid izomeraz (PDI) da 57 kDa büyüklüğünde, endoplazmik retikulumda bulunan bir şaperon proteindir. İzomeraz aktivitesi sayesinde yanlış sıralanan disülfid çiftlerinin düzeltilmesinde görev alır. Chinese Hamster Ovary (CHO) hücrelerinde ve *E. coli* hücrelerinde aşırı üretici (over-expressing) PDI sayesinde rekombinant protein ekspresyonunda iyileşme görülmüştür. Yine endoplazmik retikulum proteini olan ve bir

takım benzer özellikler gösteren başka şaperon proteinlerinin ise rekombinant protein ekspresyonuna herhangi bir iyileştirici etkide bulunmadığı da tespit edilmiştir. Inan ve ark. (Inan vd 2005) çalışmasında PDI'ın *P. pastoris*'te de aşırı üretici olduğu ve disülfid bağı içeren rekombinant proteinlerin sekresyonu için PDI'da bulunan tekrar katlama aktivitesinin önemi ispatlanmıştır. *P. pastoris* pPIC3.5K-PDI pilazmiti Inan ve ark. (2005) tarafından oluşturulmuştur (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. PDI aşırı üretici pilazmiti pPIC3.5K-PDI şematik gösterimi

Yabancı bir genin *P. pastoris*'te ekspresyonu üç basamakta gerçekleşir; 1) genin ekspresyon vektörüne aktarılması 2) ekspresyon vektörünün *P. pastoris*'e yerleştirilmesi 3) genin ekspresyonunun kontrol edilmesi (Macauley-Patrick vd 2005).

Heterolog proteinlerin üretilmesi için bugüne kadar elde edilen veriler sonucunda en başarılı sistemin metanol varlığında yapılan ekspresyon sistemleri olduğu belirlenmiştir. Metanol beslemeli sistemler için en çok kullanılan genler ise AOX genleridir. AOX1 geni sayesinde yabancı proteinlerin transkripsiyonu represyon ve derepresyon mekanizmalarıyla ayarlanır ve kontrol edilebilir. Yüksek miktarda protein ekspresyonu sağlanabilir; üstelik bu protein hücre için toksik etki yapsa bile hücre ekspresyona devam eder. Başlangıçtaki karbon kaynağı tarafından transkripsiyonun baskılanması, gen ürünlerinin elde edilmesinden önce iyi bir hücre gelişimi imkanı sunar. Transkripsiyonun indüksiyonu ise metanol eklemesiyle kolayca gerçekleştirilebilir. Ancak AOX1 geninin birtakım dezavantajları da bulunmaktadır; methanol konsantrasyonunun problemlerle izlenmesi oldukça zordur, metanol petrokimyasal kaynaklardan elde edildiğinden dolayı bazı gıdalarda ve katkı maddelerinde kullanılması sakıncalı olabilir. Ayrıca metanolün yanıcı etkiye sahip olması ve toksik madde içermesi de AOX1 promotorunun dezavantajları arasındadır (Macauley vd 2005) (Çelik ve Çalık 2012). AOX1 geni *P. pastoris*'in en çok kullanılan promotorudur. Yapısal promotor olan GAP (gliseraldehit 3-fosfatdehidrogenaz) promotoru ise yabancı proteinlerin *P. pastoris*'te üretilmesinde sitotoksik etki yapabileceği düşünülmektedir. AOX' geni de önce belirttiğimiz gibi alkol oksidaz üretebilir ancak bu promotorun verimi AOX1 promotorundan 10-20 kat daha düşüktür. Her ne kadar AOX2 geniyle de bazı başarılı sonuçlar elde edilmiş olsa da araştırmacılar yüksek verimliliği sayesinde çalışmalarında AOX1 genine daha çok yer vermişlerdir (Macauley-Patrick vd 2005).

## 2.8. Ekspresyon için Uygun Vektörün Seçilmesi

Bir genin vektöre klonlanması için vektörün kesim bölgeleri ve promotor bölgesi dikkate alınır. Vektör seçimi konakçı organizmaya göre belirlenir (Çizelge 2.4). Kullanılacak organizmaya göre belirlenen vektörler arasından, yapılacak çalışmaya uygun olan vektör seçilir. *Pichia pastoris* mayası ile yapılacak bir çalışma için pPICZ (Şekil 2.4) ve pGAPZ vektörleri uygundur (The Recombinant protein Handbook). Bizim çalışmamızda kimozin üretimi AOX1 promotoru altında gerçekleştirileceğinden, pPICZ $\alpha$ A ve pPICZB vektörleri kullanılmıştır (Ek 3).

Çizelge 2.4. *P. pastoris* mayası için uygun olan plazmitler (Routledge vd 2015)

Plazmid	Seçilim	Etiket	Promotor	Kaynak
pPICZ	Zeosin	His <sub>6</sub>	AOX1	Invitrogen
pGAPZ	Zeosin	His <sub>6</sub>	GAP	Invitrogen

### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Kimyasallar ve restriksiyon enzimleri

Çalışmada kullanılan tüm maddeler moleküler biyoloji kalitesinde olup Sigma-Aldrich Co. (MO, ABD), Difco (Fransa), Merck (Almanya) firmalarından temin edilmişlerdir. Restriksiyon enzimleri Thermo Fisher Scientific (MA, ABD) firmasından temin edilmiştir. Ticari kimozi enzimi (600 IMCU/ml) Mayasan'dan (Türkiye) temin edilmiştir.

##### 3.1.2. Tampon ve stok çözeltileri

Tüm tamponlar ve stok çözeltileri saf su ile hazırlanmış, 121°C'de 20 dakika otoklavlanarak yada 0,22 µm filtreden geçirilerek (Corning, MA, ABD) sterilize edilmiş, 4°C ya da oda sıcaklığında muhafaza edilmişlerdir.

##### 3.1.3. Gen kaynağı, mikroorganizmalar ve plazmitler

Kodon optimizasyonu yapılan Tibet sığı ( *Bos grunniens* ) kimozi gen (GenBank No: JX839990.1) GenScript firmasından pUC57 vektörüne klonlanmış bir şekilde (pUC57YAK) liyofilize olarak temin edilmiştir.

GenScript firmasının talimatları doğrultusunda distile su içinde çözdürülen pUC57YAK plazmitinin *Escherchia coli* XL1Blue hücrelerine klonlanmaları gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan kültürler -80 °C'de muhafaza edilmişlerdir. Çalışmada kullanılacak olan *E. coli* ve *Pichia pastoris* suşları genotip özellikleriyle birlikte Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar

Suş	Genotip	Kullanım yeri ve amacı	Kaynak
<i>E. Coli</i> XL1-Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔM15Tn10 (Tetr)]	Pilazmidlerin çoğaltılması ve saklanması	Stragene, CA, ABD
<i>P. pastoris</i> GS115 (PDI)	5 PDI geni kopyası	Konakçı	Nebraska Üniversitesi
<i>P. pastoris</i> X33	GS115 (His 4)	Konakçı	Invitrogen, CA, ABD

Tüm mikroorganizmalar %50 gliserol ve %50 hücre kültürü şeklinde -80°C'de muhafaza edilmişlerdir. Çalışmada kullanılacak olan suşlar ana stoktan YPD veya LB Miller agar plakalara tek koloni düşecek şekilde çizim yapılarak uygun sıcaklık ve süre boyunca (*P. pastoris* 30°C'de 3 gün , *E. coli* 37°C'de 1 gün) inkübatörlerde bekletilerek geliştirilmiş ve +4°C'de muhafaza edilmişlerdir. Enzimin hücre dışı ekspresyonunda kullanılan plazmitler Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Hücre dışı protein ekspresyonu için kullanılacak olan vektörler

<b>Plazmid</b>	<b>Direnç geni</b>	<b>Kullanım yeri ve amacı</b>	<b>Kaynağı</b>
pPICZ $\alpha$ A	Zeosin	Ekspresyon vektörü	Invitrogen, CA, ABD
pPICZBPIR1	Zeosin	Ekspresyon vektörü	Akdeniz Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Laboratuvarında üretilmiştir
pPICZBHSA	Zeosin	Ekspresyon vektörü	Akdeniz Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Laboratuvarında üretilmiştir
pPICZBPHO	Zeosin	Ekspresyon vektörü	Akdeniz Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Laboratuvarında üretilmiştir

### 3.1.4. Besiyerleri, gelişim ortamları ve antibiyotikler

Hücreler geliştirilirken *E. coli* için LB Miller (10 g/l tripton, 5 g/l maya özütü ve 10 g/l NaCl) ya da LB Lennox (10 g/l tripton, 5 g/l maya özütü ve 5 g/l NaCl), *P. pastoris* suşlarının gelişimi için ise YPD (%1 maya özütü, %2 pepton, %2 dekstroz) medyaları kullanılmıştır.

Kullanılan sıvı ve katı besi yerlerine kullanılan plazmitin üzerindeki direnç genine uygun antibiyotik ilaveleri yapılmıştır. *E.coli* suşları için 25 µg/ml zeosin veya 100-150 µg/ml ampisilin, *P. pastoris* suşları için ise 100 µg/ml zeosin olacak şekilde ilaveler yapılmıştır.

Kimozin ekspresyonunu gerçekleştirmek için rekombinant *P. pastoris* hücreleri Buffered Glycerol-Complex Medium (BMGY) (10 g/l maya ekstraktı, 20 g/l pepton, 13,4 g/l YNB,  $4 \times 10^{-5}$  g/l biotin, 10 g/l gliserol ve 0.1 M potasyum fosfat tamponu, pH 6.0) ve Buffered Methanol-Complex Medium (BMMY) (10 g/l maya ekstraktı, 20 g/l pepton, 13.4 g/l YNB,  $4 \times 10^{-5}$  g/l biotin, %10 saf metanol ve 0,1 M sodyum sitrat tamponu, pH 3.0) kullanılarak geliştirilmiştir.

Kimozin ekspresyonunu fermentörde gerçekleştirebilmek için BSM tuzları (26,7ml %85'lik fosforik asit, 0,93g kalsiyum sülfat, 18.2 g potasyum sülfat, 14,9 g magnezyum sülfat  $\cdot 7H_2O$ , 4,13 g potasyum hidroksit, 40 g gliserol) distile su ile 1 litreye tamamlandı. PTM<sub>1</sub> tuzları (6 g bakır sülfat-5H<sub>2</sub>O, 0,08 g sodyum iyodür, 3 g manganaz sülfat $\cdot H_2O$ , 0,2 g sodyum molibdat  $\cdot 2H_2O$ , 0,02 g borik asit, 0,5 g kobalt klorür, 20 g çinko klorür, 65 g demir sülfat  $\cdot 7H_2O$ , 0.2 g biotin) ve 5 ml sülfürik asit distile su ile 1 litreye tamamlandı. (Cregg vd 2007).

### 3.1.5. Primerler

Polimeraz zincir Reaksiyonunda (PZR) kullanılan primerler Çizelge 3.3'te verilmiştir.

Çizelge 3.3. PZR'de kullanılacak olan primerler

Primer	Sekans	Amaç	Yön	Kaynak
YAC-CHY-EcorIF	AAGAAT TCGGTGAAG TTGCCTCCG TTC	Kimozin genini çoğaltmak	Forward (İleri)	MetaBion
YAC-CHY-xbaIR	TTGATTAGA TGGCTTAGC AAGTCTA	Kimozin genini çoğaltmak	Reverse (Geri)	MetaBion
Yac-CHY-xbalhtR	TTTCTAGAT TAATGATGA TGATGATGA TGGATGGCT TTAGCAAG	Kimozin genine 6His kodu eklemek	Reverse (Geri)	MetaBion

### 3.2. Metot

#### 3.2.1. Liyofilize gelen pilazmid DNA'nın hazırlanması

Liyofilize gelen pilazmid DNA (GenScript, USA), üretici firmanın talimatlarına uygun olarak kapağı kapalı şekilde  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir. Tüp  $4^{\circ}\text{C}$ , 6000 g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. DNA'nın çözülmesi için 20  $\mu\text{l}$  TE tamponu eklenmiş ardından 1 dakika vortekslenmiştir.

#### 3.2.2. *E. coli* ve *P. pastoris* hücrelerinin transformasyona kompetan (competent) hale getirilmesi

*E. coli* hücreleri  $\text{CaCl}_2$  yöntemi ile kompetan hale getirilmiştir. LB Miller plakada tek koloni düşecek şekilde geliştirilen *E. coli* suşunun 3 ml LB Miller sıvı besiyerine tek koloniden ekimi yapılarak geceboyu  $37^{\circ}\text{C}$  çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün gelişen kültürün Biochrom spektrofotometre cihazı ile 1ml'lik küvetler içinde 600 nm'de optik yoğunluğu ölçülerek 50 ml LB Miller sıvı besi yerine başlangıç OD değeri 0,01 olacak şekilde ekilerek OD değeri 0.3 olana kadar (yaklaşık 3 saat)  $37^{\circ}\text{C}$  çalkalamalı inkübatörde geliştirilmiştir. Kültür beklenen OD değerine ulaştığında 3000xg'de  $4^{\circ}\text{C}$ 'de 5 dakika süre ile santrifüjlenerek hücreler hasat edilmiştir. İşlemler bu aşamadan sonra buz üzerinde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen hücre peleti 5 ml 0,1 M  $\text{CaCl}_2$  çözeltisi içinde süspanse edilmiş ve 30 dakika buz üzerinde bekletilmiştir. Bir önceki şartlarda santrifüjlenerek tekrar hasat edilen hücre peleti 1,5 ml %15 gliserol içeren 0,1 M  $\text{CaCl}_2$  çözeltisi içinde tekrar süspanse edilmiş ve 100  $\mu\text{l}$ 'lik sıvı bölüntüler halinde  $-80^{\circ}\text{C}$ 'ye kaldırılmıştır.

*P. pastoris* hücreleri lityum asetat (LiAc) yöntemine göre kompetan hale getirilmişlerdir. Kompetan yapılmak istenen *P. pastoris* hücreleri, donmuş kültürden ya da  $4^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan agar plakasındaki tek kolonilerden test tüpü içerisinde 2 ml YPD besi yerine ekilmiş, 250 dev/dak,  $30^{\circ}\text{C}$  çalkalamalı inkübatörde gece boyu geliştirilmiştir. Ertesi gün, gece boyu gelişen kültürden başlangıç  $\text{OD}_{600}$  değeri 0,1 olacak şekilde 250 ml hacimli engelli erlen içerisinde 80 ml YPD besiyerine ekim yapılmıştır.  $\text{OD}_{600}$  değeri 1,3-1,5 olana kadar 250 rpm,  $30^{\circ}\text{C}$  çalkalamalı inkübatörde geliştirilen hücreler,  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 5 dakika boyunca 3000 g devirde santrifüjlenerek hasat edilmişlerdir. Hücre peleti, 8 mL lityum asetat karışımı (100 mM LiAc, 10 mM DTT, 0,6 M Sorbitol, 10 mM Tris-HCl pH 7.4) içinde süspanse edilmiş ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır.  $4^{\circ}\text{C}$ 'de 3000xg hızında 5 dakika santrifüjlenerek tekrar hasat edilen hücreler 1,5 ml buz gibi soğuk 1 M sorbitol içinde süspanse edilmiş ve 2 ml hacimli santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Hücreler  $4^{\circ}\text{C}$ 'de 3000xg devirde 5 dakika santrifüjlenerek hasat edilip 3 kez 1,5 ml soğuk 1 M sorbitol ile yıkanmış, daha sonra son konsantrasyon  $10^{10}$  hücre/ml olacak şekilde buz soğukluğundaki maya resüspanسیون tamponu (1 M sorbitol, %20 gliserol) içinde süspanse edilmiş, 80  $\mu\text{l}$ 'lik sıvı bölüntüler halinde  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır.

#### 3.2.3. Plazmitlerin *E. coli*'ye transformasyonu ve doğrulanması

Buz üzerinde çözdürülen 100  $\mu\text{l}$  kompetan *E. coli* (XL1-Blue) hücresine 0.5  $\mu\text{l}$  TE içinde çözdürülmüş olan liyofilize plazmit eklenmiştir. Hücreler 30 dakika buz



üzerinde inkübe edilmiştir. Daha sonra 42°C’de 60 saniye süre ile ısı şokuna uğratılan hücreler 5 dakika buz üzerinde bekletilerek soğutulmuş, 200 µl LB sıvı besi yeri eklenerek 37°C çalkalamalı inkübatörde 60 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Hücreler 100 µg/ml ampisilin içeren LB plakalara ekilmiş ve 37°C’de gece boyu inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyon sonrası plakalarda oluşan kolonilerin kontrolü plazmit izolasyonu/restriksiyon analizi yöntemi ile yapılmıştır.

Restriksiyon analizi için elimizdeki pUC57YAK plazmitinin gen haritası incelenmiş ve elde edilmesi istenen kimozin genini başından ve sonundan olmak üzere 2 noktadan kesen enzimler belirlenmiştir. Plazmitlerin konsantrasyonları ölçüldükten sonra 1 µg plazmite 1 U enzim olacak şekilde, 10X enzim tamponu ve su eklenerek toplam 20 µl içinde reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Agaroz jel elektroforezi ile, 37°C’de 30 dakika inkübasyondan sonra kesilmiş plazmitler ile kontrol olarak kesilmemiş plazmitlerin değerlendirilmesi yapılmıştır.

Tartılan 1 gr agaroz (SeaChem, Lonza, ME, ABD), 100 ml 1X TAE tampon içinde (Tris/asetat/EDTA, 40 mM Tris asetat, 1 mM EDTA) mikrodalgada ısıtılarak çözündürülmesi ile hazırlanan jelle, 60°C’ye kadar soğutulduktan sonra %2 olacak şekilde etidyum bromür çözeltisi (10 mg/ml, Invitrogen, CA, ABD) eklenmiştir. Henüz katılaşmadan jel kasetine dökülen ve tarakları yerleştirilen jel katılaştıktan sonra, 6X yükleme boyası ile karıştırılan örnekler kuyucuklara yüklenmiş, 1X TAE tamponu içerisinde 100 V akımda 30 dakika yürütülmüştür. Jelde boyutlarına göre farklı hızda ilerleyen DNA parçaları böylelikle birbirlerinden ayrılmış ve DNA’ya bağlanan etidyum bromürün UV ışınları altında ışımaya yapması sayesinde UV jel görüntüleme kutusunda (Vilber Lourmat EBox-VX2, Fransa) görüntülenmişlerdir.

#### 3.2.4. Kimozin genine 6histidin kodu (His-etiketi) eklenmesi

pUC57YAK plazmitindeki kimozin geninin sonuna Western analizi uygulayabilmek için polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi Kod Hot Start DNA polymerase (Novagen) ile yapılmıştır. Altı adet histidin kodu (His-etiketi) kimozin geminin sonuna eklenmiştir. Bunun için YAC-CHY-*EcoR*IF ileri (forward) ve YAC-CHY-*xba*Iht geri (reverse) primerleri kullanılmıştır.

Elde edilmek istenen DNA parçasının büyüklüğüne ve kullanılan primerlerin çözülme sıcaklıklarına ( $T_m$ °C) göre uyarlama yapılarak uygulanan standart protokol aşağıdaki gibidir.

PZR tüplerinde (0.5 µl’lik) oda sıcaklığında ya da buz üzerinde aerosol filtreli pipet uçları ile hazırlanan 50 µl reaksiyon karışımı için malzemeler, miktarlar ve son konsantrasyonları çizelge 3.4’te verilmiştir.

Çizelge 3.4. Kimozin geninin sonuna 6his-etiketi eklemek için yapılacak olan PZR için gerekli malzemeler, miktarlar ve son konsantrasyonlar

Miktar (µl)	Malzeme	Son konsantrasyon
28	Steril ultra saf su	
5	10X KOD Buffer	1X
5	dNTP karışımı (10 mM)	0,2 mM
4	MgSO <sub>4</sub> (25 mM)	2,0 mM
3	YAC-CHY- <i>EcoRI</i> ileri (10 µM)	0,3 µM
3	YAC-CHY- <i>xbaI</i> ht geri (10 µM)	0,3 µM
1	KOD DNA Polimeraz (1 U/µl)	0,02 U/µl
1	Kalıp (pUC57YAK)	1 ng

Reaksiyonun gerçekleşeceği ısı döngü cihazında (Biometra Biomedizinische Analytik GmbH, Almanya) uygulanan programda polimeraz enziminin 2 dak boyunca 95°C’de tutularak aktive olmasını takiben aşağıdaki basamaklar uygulanmıştır:

Denatürasyon	95°C’de	20 s
Bağlanma	T <sub>m</sub> 56°C’de	20 s
Uzama	70°C’de	30 s/1 kb

Program 35 döngü boyunca tekrarlanmış ve 72°C’de 10 dk süren son uzama basamağı ile bitirilmiştir. Reaksiyonun kontrolü, karışımın 5 µl’sinin 1 µl 6X jel yükleme boyası ile karıştırılarak 0.5 µg/ml etidiyum bromür içeren %1 agaroz jelde yürütülmesi ve UV jel görüntüleme kutusunda (VILBER LOURMAT, E Box-vx2/20m), Almanya) hedef parçanın görüntülenmesi ile yapılmıştır

### 3.2.5. Kimozin geninin ve ekspresyon vektörünün ligasyona hazır hale getirilmesi

PZR sonrası elde edilen ürün MinElute PCR Purification Kit (QIAGEN, Almanya) ile üretici firmanın talimatları doğrultusunda saflaştırılıp, jel elektroforez yöntemiyle %1’lik agaroz jelde kontrol edilmiştir. Ardından histidin etiketini içeren kimozin geni *XbaI/EcoRI* enzimleri ile kesilip %1’lik agaroz jelde yürütülmüştür. Agaroz jelde yürütüldükten sonra jelden kesilerek alınan DNA parçalarının saflaştırılması MinElute Gel Extraction Kit (QIAGEN, Almanya) ile üretici talimatları doğrultusunda yapılmıştır. Aynı enzimler kullanılarak pPIZαA, pPICZBPIR1, pPICZBHSA ve pPICZBPHO vektörleri de kesilerek agaroz jelde yürütülmüş ve jelden kesilip alındıktan sonra kit yardımıyla saflaştırılmıştır.

### 3.2.6. Plazmit ve kromozomal DNA'ların konsantrasyonlarının belirlenmesi

Ligasyon için uygun hale getirilmiş ekspresyon vektörünün ve kimozin geninin konsantrasyonları Qubit dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen, CA, ABD) ile üretici talimatlarına uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Protokolde belirtilen oranlarda toplam 200 µl içinde hazırlanan Qubit tamponu/boya/örnek karışımının okumaları ve konsantrasyon hesaplamaları Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen, CA, ABD) cihazında yapılmıştır.

### 3.2.7. DNA parçalarının plazmite ligasyonu

Yapışkan uçlu DNA parçalarının vektörlere ligasyon işlemleri Rapid DNA Dephosphate and Ligation Kit (Roche, Almanya) kullanılarak, üretici talimatlarına uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Ligasyon reaksiyonunda 1:3 vektör:insert oranı (molar:molar) kullanılmıştır.

Ligasyon işlemi için toplam 10 µl içerisinde 50 ng vektör DNA'sı için hesaplanan miktarlarda insert DNA karıştırılmış, 1X T4 DNA ligasyon tamponu varlığında 5U T4 DNA ligaz eklenmiştir. Oda sıcaklığında (22°C) 5 dakika inkübasyon sonrası ligasyon karışımının 1/10'u ile kompetan bakteri hücrelerine transformasyon işlemine devam edilmiş, karışımın kalanı -20°C'de saklanmıştır.

### 3.2.8. Kompetan *E. coli* hücrelerine transformasyon

Buz üzerinde çözdürülen 100 µl kompetan *E. coli* (XL1-Blue) hücresine 2 µl ligasyon karışımı eklenmiş ve 30 dakika buz üzerinde inkübe edilmiştir. Daha sonra 42°C'de 60 saniye boyunca ısı şokuna maruz bırakılan hücreler 5 dakika buz üzerinde bekletilerek soğumaya bırakılmış, 200 µl LB sıvı besiyeri eklenerek 37°C çalkalamalı inkübatörde 60 dakika inkübe edilmiştir. Transfer edilen plazmite uygun antibiyotik içeren (100 µg/ml ampisilin) LB plakalara ekimi yapılan transformant hücreler 37°C'de geceboyu inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyon sonrası plakalarda oluşan kolonilerin kontrolü içi plazmit izolasyonu gerçekleştirilmiş ve restriksiyon analizi ile vektör entegrasyonu doğrulanmıştır.

### 3.2.9. Kompetan *P. pastoris* hücrelerine transformasyon

Kompetan *P. pastoris* hücrelerine gen transferleri elektroporasyon yöntemi ile yapılmıştır. Buz üzerinde bekletilerek çözdürülen 80 µl kompetan *P. pastoris* hücresine 3-5 µg doğrusal DNA eklenmiş, pipetlenerek karıştırılmış ve buz soğukluğundaki 2 mm elektroporasyon küvetine aktarılmıştır. Küvetler 5 dakika buz üzerinde bekletilerek elektroporasyon cihazında 5 ms süre ile 1500 V akıma tabi tutulmuştur. Hemen ardından çok soğuk 1 M sorbitol eklenmiş ve 1.5 ml'lik santrifüj tüpüne alınmıştır. 30°C'de 1-2 saat inkübe edilen hücreler uygun antibiyotik ve besiyeri içeren plakalara 50, 100, 200 µl olacak şekilde yayılmıştır. Plakalar, koloniler oluşana kadar 30°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası plakalarda oluşan kolonilerin kontrolü Southern blot yöntemi ile yapılmıştır.

### 3.2.10. Engelli erlenmayerde fermentasyon kimozin enzimi ekspresyonu

Plakalardan seçilen klonlar ile engelli erlende kimozin ekspresyonu yapılmıştır. kimozin gen parçasını taşıyan ekspresyon kasetini içeren *P. pastoris* hücreleri ile ekspresyon kasetini taşımayan *P. pastoris* hücreleri (negatif kontrol) 3 ml'lik YPD sıvı besiyerlerine inokule edilmiştir. YPD sıvı besi yerinde gelişen hücreler, BMGY'deki son konsantrasyonları 0,1 OD olacak şekilde BMGY'ye (pH: 6) inokule edilmiştir. Çalkalamalı inkübatörde 18-20 saat 30°C sıcaklıkta BMGY besiyerinde çoğalan hücreler yaklaşık 10 OD iken 4°C, 3000 g'de 15 dakika santrifuj edilerek hasat edilmiş ve süpernatantlar atılmıştır. Aynı hacimde BMMY (pH 3) eklenip, hücreler süspansiyon edildikten sonra protein ekspresyonu için 25°C'de çalkalamalı inkübatöre koyulmuştur. Protein ekspresyonu 120 saat boyunca sürdürülmüştür. Metilotrofik bir maya olan *P. pastoris*'in protein ekspresyonu için besiyerinin son konsantrasyonu %1 olacak şekilde 12 saatte bir saf metanol eklenmiştir. Hücreler 120 saat sonunda hasat edilmiş ve süpernatant devam edecek analizler için 4°C'ye kaldırılmıştır.

### 3.2.11. Süt pıhtılaşma testi ve enzim aktivitesi (IMCU) tayini

Süt pıhtı tahlili için substrat olarak %26(w/v) yağsız süt tozunun, 40 mM'lık CaCl<sub>2</sub> pH (6.5) çözeltisinin içinde çözündürülmesiyle elde edilen çözelti kullanılmıştır. Süt pıhtı testi ham süpernatantlar ile 37°C'de gerçekleştirilmiştir. Bir ml süt çözeltisine 20 µL süpernatant eklenmiş ve süt çözeltisinde ne kadar sürede pıhtı oluştuğu gözlenmiştir.

Üretilen rekombinant Tibet öküzü kimozinin süt pıhtılaştırma gücü RENMAX sığır kimozi (600 IMCU/ ml) (Mayasan, Türkiye) standart alınarak hesaplanmıştır. Buna göre standart sığır kimozi seri olarak seyreltilmiştir. Enzimin substratta gösterdiği kararlı pıhtılaşmanın başladığı dilüsyon oranı 10 kat olarak tespit edilmiş ve bu oranda seyreltilmiş enzimin süt çözeltisini pıhtılaştırdığı süre standart kabul edilmiştir. Üretilen rekombinant Tibet öküzü kimozinin enzim aktivitesini IMCU/ml cinsinden hesaplamak için pıhtı oluşturma süresi standart ile karşılaştırılmıştır.

### 3.2.12. SDS-PAGE ve Western blot analizleri

SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE), OWL P8D8 (Thermo Scientific, IL, ABD) cihazında (%5 polyakrilamid yükleme jeli ve %10 poliakrilamid ayırma jeli, 0,8 mm) hazırlanarak uygulanmıştır. Protein üretimi için geliştirilen hücrelerden ayrılan süpernatantlar, toplam 50 µl olacak şekilde 3:1 oranında 4X SDS jel yükleme tamponu (200 mM Tris-Cl, pH 6.8, %8 SDS, %0.4 bromphenol blue, %40 gliserol, 100 mM DTT) ile karıştırılarak 70 °C'de 10 dakika bekletilmiştir. 25'er µl'eri hazırlanan jellere yüklenmiştir. Elektrofrez işlemi, jelin, 1X TGS (0,025 M Tris base, 0,192 M glisin, %0,1 SDS, pH 8.3) tamponunda 150 V akımda 60 dakika yürütülmesi ile tamamlanmıştır. Daha sonra jel, IRDye Blue Protein Stain (Li-Cor, NE, ABD) ile 1 saat orbital çalkalayıcı üzerinde boyanmış, saf su ile 15 dakika yıkandıktan sonra Odyssey görüntüleme sistemi (Li-Cor, NE; ABD) ile görüntülenmiştir. Protein standardı olarak PageRuler Unstained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD) kullanılmıştır.

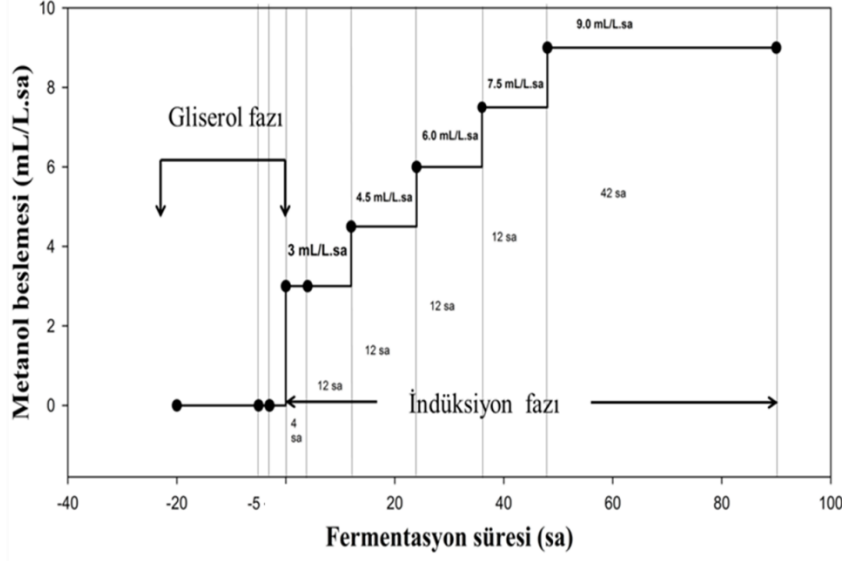
Western blot analizi için örnekler SDS-PAGE analizinde olduğu şekilde hazırlanmış, 10'ar µl olacak şekilde hazır jelle (Precise Protein Jels, %8-16, Thermo Scientific, IL; ABD) yüklenmişlerdir. Jel, 1X Tris-HEPES SDS tamponunda (0,1 M Tris, 0,1 M HEPES, 3 mM SDS), 100 V akımda 45 dakika yürütüldükten sonra 1X TGM tamponu (0,192 M glisin, 25 mM tris bazı, %2 metanol) ile yıkanmıştır. Jelde birbirinden ayrılan proteinler, jelden PVDF membrana (Millipore, MA, ABD) Owl HEP-1 Electrobloetter (Thermo Scientific, IL, ABD) cihazı kullanılarak (20 V, 60 dakika) aktarılmıştır. Daha sonra membran protein aktarılan yüzü yukarıya bakacak şekilde kapaklı kutuya aktarılmış ve 1X PBS tamponu (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) ile 2 kez 10'ar dakika yıkandıktan sonra kapatma tamponu (0.2X PBS+%0,1 kazein) içinde geceboyu orbital çalkalayıcının üzerinde bırakılmıştır. Histidin etiketli proteine ait bandı tespit edebilmek için birincil antikör olarak Penta-His Antibody (Qiagen, Almanya) 1:2000 seyreltilerek, ikincil antikör olarak ise Goat Anti-Mouse IRDye 800 CW (Li-Cor, NE, ABD) 1:20000 seyreltilerek kullanılmıştır. Antikörlerle hibridizasyonu tamamlanan membran Odyssey görüntüleme sistemi (Li-Cor, NE; ABD) ile görüntülenmiştir. Protein standardı olarak Odyssey Protein Molecular Weight Marker (Li-Cor, NE, ABD) kullanılmıştır.

### 3.2.13. Fermentörde kimozin enzimi üretimi

Fermentörde kimozin üretimi için besi yeri ve fermentasyon koşulları *Pichia* Fermentation Process Guidelines'a (Invitrogen, Thermofisher, USA) uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Bunun için uygun seçilen transformant 5 ml YPD sıvı besi yerine ekilmiştir. Ardından OD değeri 5 ile 9 arasındayken 100 mL BMGY'ye inokule edilerek geliştirilmeye devam edilmiştir. Fermentasyon için uygun OD'ye (yaklaşık 10 OD) gelen hücre kültürü kullanılmıştır.

Fermentasyon kesikli (batch), gliserol kesikli besleme (fed batch) ve indüksiyon fazları olmak üzere üç aşamada gerçekleştirilmiştir. İlk aşama olan kesikli faz, geliştirilen hücrelerin, %4 gliserol içeren 2l temel tuz besiyerine (Basal Salt Medium) inokule edilmesiyle başlatılmış ve yaklaşık olarak 18 saat sürmüştür. Çözünmüş oksijen düzeyi takip edilerek ortamdaki gliserolün varlığı izlenmiştir. Aynı şekilde çözünmüş oksijen miktarındaki ani yükseliş ile ortamdaki gliserolün tükendiği tespit edilip kesikli faz sona erdirilmiştir. Bu aşamada sıcaklık 30°C, pH 5 olarak sabit tutulmuştur. Kesikli gliserol aşamasının ardından gliserol besleme fazı başlatılmıştır. Bu aşamada %40 gliserol kullanılarak besleme 16,5 ml/l.sa akış hızı ile başlatılmış ve beş saat boyunca doğrusal azaltılarak sonlandırılmıştır (Çizelge 3.5 A). Gliserol beslemesinin ilk ve son saatlerinde hücrelerin karbon kaynağı olarak metanole alışabilmeleri için 2 ml/l saf metanol eklenmiştir. Ortamdaki karbon kaynaklarının hücreler tarafından tamamen kullanılması ile çözünmüş oksijen miktarında ani yükseliş gözlenmiş ve fermentasyonun 3. aşaması olan indüksiyon fazına geçilmiştir. İndüksiyon fazı 90 saat sürdürülmüştür. İndüksiyon fazında, besleme hızı 1.5 ml/l.sa'den 9 ml/l.sa düzeyine kadar kademeli olarak yükseltilmiştir. Rekombinant proteinin üretildiği metanol besleme fazı, 9ml/l sabit akış ile 90 saat sürdürülmüştür (Şekil 3.1, Çizelge 3.5 B). Kesikli ve gliserol besleme fazları boyunca sıcaklık 30°C, pH değeri 5.0, karıştırma hızı 1000 dev/dak ve hava beslemesi 1,5 vvm olacak şekilde sabit tutulmuş, indüksiyon fazında ise pH değeri 3.85 ve sıcaklık 25°C olarak değiştirilmiştir. Çözünmüş oksijen

miktarı ise %25'te sabit tutulmak üzere gerektiğinde saf oksijen eklenerek kontrol edilmiştir.



Şekil 3.1. Fermentasyon besleme profili

Çizelge 3.5. Gliserol (A) ve metanol (B) besleme fazları sırasında hücrelere gönderilen gliserol ve metanolün zamana göre besleme hızı ve miktarı

Süre (dak.)	Gliserol pompalama devri (rpm)	Akış (ml/l.sa)
0	1,1	16,5
30	0,9	13,10,55
60	0,7	9,0
90	0,6	6,0
120	0,4	3
150	0,2	1,5
165	0,1	0
180	0	0

Metanol besleme saat akışı	Metanol pompalama devri (rpm)	Akış (ml/l.sa)
0	0,2	3,0
4	0,2	3,0
12	0,3	4,5
24	0,4	6,0
36	0,5	7,5
48	0,6	9,0
48-90	0,6	9,0

Metanol ile kesikli besleme aşamasında 24 saatte bir alınan örneklerin yaş ağırlığı ölçülmüş ve süt pıhtılaşma analizi yapılmıştır. Alınan sonuçlar doğrultusunda fermentasyon işlemi 90. Saatte durdurulmuştur. Hücreler 4°C 3000 g'de 15 dk hasat edildikten sonra süpernatant 4°C'de saklanmıştır.

### 3.2.14. Enzimin optimum çalışma sıcaklığının ve sıcaklık stabilitesinin belirlenmesi

Enzimin stabil kalabildiği sıcaklıkları belirlemek için, süpernatant 1 saat boyunca 20-70 °C arasındaki sıcaklıklara tabi tutulmuştur. Ardından bu süpernatantlar ile 3 tekrarlı olarak süt pıhtılaşma testi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen pıhtılaşma sürelerine göre enzimin stabil kalabildiği sıcaklık aralığı belirlenmiştir.

Enzimin optimum çalışma sıcaklığının belirlenmesi için 4 °C'den alınan süpernatantlar ile 3 tekrarlı olarak, süt pıhtılaşma testi 20-70 °C ler arasında

gerçekleştirilmiştir. Elde edilen pıhtılaşma sürelerine göre enzimin optimum çalışma sıcaklığı belirlenmiştir.

### 3.2.15. Enzimin optimum çalışma pH'ının ve pH stabilitesinin belirlenmesi

Enzimin optimum çalışma pH'ını belirlemek için 50 mM sodyum sitrat (pH 2.0-3.5), 50 mM sodyum asetat (pH 4.0-5.5), 50 mM potasyum fosfat (pH 6-7.5) ve 50 mM Tris-HCl (pH 8.0-9.0) tamponları hazırlanmış ve yağsız süt tozu bu tamponlar içinde çözündürülmüştür (%26 w/v). Ardından hazırlanan süt çözeltileri 96 kuyucuklu plaka içine koyulmuştur. Süpernatantlar 10 mM sodyum asetat tamponu (pH 3.85) kullanılarak seyreltilmiştir. Seri olarak seyreltilmiş süpernatantlar ile 96 kuyucuklu plakada 37°C'de süt pıhtılaşma testi uygulanmıştır. Pıhtılaşmanın gözlemlendiği en yüksek dilüsyon değeri yüzde yüz kabul edilmiştir. Farklı pH'lardaki bağıl aktiviteler de referans aktivite değerine göre belirlenmiştir.

Enzimin pH stabilitesi, enzimin farklı pH'larda hazırlanan tamponlarlar (10 mM sodyum asetat tamponu, pH 2.0-5.5; 10 mM potasyum fosfat tamponu, pH 6.0-7.5; 10 mM Tris-HCl, pH8.0-9.0) ile 4-9 arasındaki pH'lara getirilmiştir. Hazırlanan süpernatantlar 8 saat boyunca 37 °C'de bırakıldıktan sonra enzim ile süt pıhtılaşma testi yapılmıştır. pH değeri değiştirilmeyen enzim ile aynı sürede pıhtı oluşturabilen pHı değiştirilmiş enzimler stabil olarak kabul edilmiştir.

### 3.2.16. Toplam protein tayini

Toplam protein tayini Coomassie plus™ (Bradford) Assay kit (ABD) ile üretici firmanın talimatlarına uygun şekilde gerçekleştirilmiştir. Protein miktarını hesaplayabilmek için albümin standardı (BSA) tampon çözeltisi (0.9 salin 0.05 sodyum azit) ile protokole uygun olarak (Thermo scientific) seyreltilmiştir (0 µg/ml, 25µg/ml, 125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 750 µg/ml, 1000 µg/ml, 1500 µg/ml, 2000 µg/ml). Ardından hazırlanan dilüsyonlar reaksiyon ayırıcı ile 1:30 oranında karıştırılıp oda sıcaklığında on dakika bekletildikten sonra 595 nm dalga boyunda absorban değerleri okutulmuştur. Paralel olarak ölçülen standart serisinden elde edilen absorban değerleri ile çizilen standart grafikten elde edilen denklem ile (Ek 3), bilinmeyen örneğin protein miktarı hesaplanmıştır.

### 3.2.17. His-etiketli kimozinin saflaştırılması

Histidin-tagli proteinin saflaştırılması için Ni-Charged MagBeads (GenScript, NJ, ABD) kullanılmış ve işlemler ürün protokolüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

Hücre dışı enzim ekspresyonunun yapıldığı süpernatanta manyetik boncuklardan eklenmiş ve etiketli proteinlerin manyetik boncukların üzerinde bulunan nikel bağlanmasını sağlamak için 30 dakika oda sıcaklığında karıştırılarak inkübasyona bırakılmıştır. Nikel bağlanan proteinler, yıkama tamponu (PBS tamponu içinde 10 mM imidazol) ile birkaç yıkama yapıldıktan sonra elüsyon tamponu (PBS tamponu içinde 250 mM imidazol) ile nikelden ayrılmış ve geri kazanılarak saflaştırılmıştır. Tüm bu işlemler sırasında toplanan yıkama ve elüsyon fraksiyonları SDS-PAGE analizi ile kontrol edilmiştir. Analizler sonucunda ilgili proteini taşıdığı doğrulanan fraksiyon,

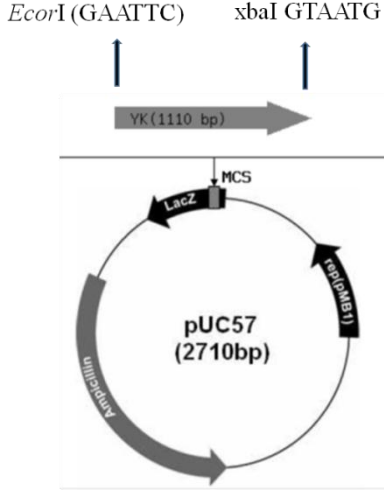
diyaliz kaseti ile (Slide-A-Lyzer 3.5 K Dialysis Cassette G2, Thermo Scientific, IL, ABD) CaCl<sub>2</sub> (0.5 g/L, pH: 6.5) içinde 2 saat diyaliz edilmiştir.



## 4. BULGULAR

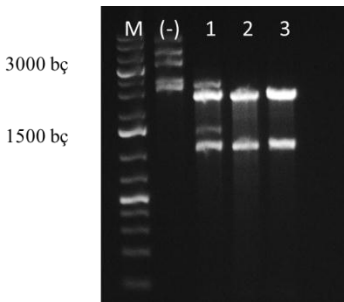
### 4.1. Prokimozin Genine Histidin Etiketi Eklenmesi ve Prokimozin Geni Taşıyan Ekspresyon Vektörlerinin Oluşturulması

Tibet sığırı (*Bos grunniens*) kimozin geni (GenBank No: JX839990.1) (1110 bç), GenScript (ABD) tarafından pUC57 klonlama vektörü içerisinde (pUC57YAK, 3820 bç) temin edilmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Genscript'ten pUC57 klonlama vektörü içerisinde temin edilen prokimozin geninin şematik gösterimi

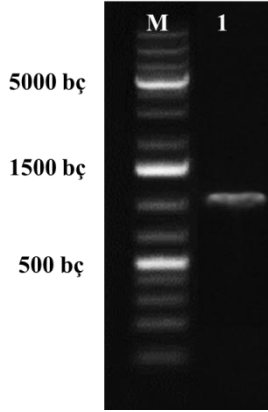
Liyofilize olarak gelen plazmid çoğaltılmak üzere *E. coli* XL1-Blue hücrelerine aktarılmıştır. LB Miller katı besiyerinde geliştirilen kolonilerden 3 adet seçilip geliştirildikten sonra izole edilen plazmitlere *Eco*RI/*Xba*I enzimleri ile restriksiyon analizi gerçekleştirilmiştir. Agaroz jelde 2710 ve 1110 bç fragmentlerinin görülmesi beklenmiş ve doğrulanmış 2 ve 3 numaralı klonlardan donmuş kültür hazırlanmıştır. Deneyle 3 numaralı klon ile devam edilmiştir (Şekil 4.2, sütun 3).



Şekil 4.2. XL1-Blue hücrelerine aktarılan pUC57YAK plazmitinin *Eco*RI/*Xba*I enzimleriyle kesilerek doğrulanması. Beklenen bç uzunlukları 2710, 1110. M: O'GeneRuler™ 100 bç Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD); (-): Restriksiyon enzimleriyle kesilmemiş olan pUC57YAK plazmiti. 1-3. sütunlar: Restriksiyon enzimleriyle kesilen pUC57YAK plazmitleri

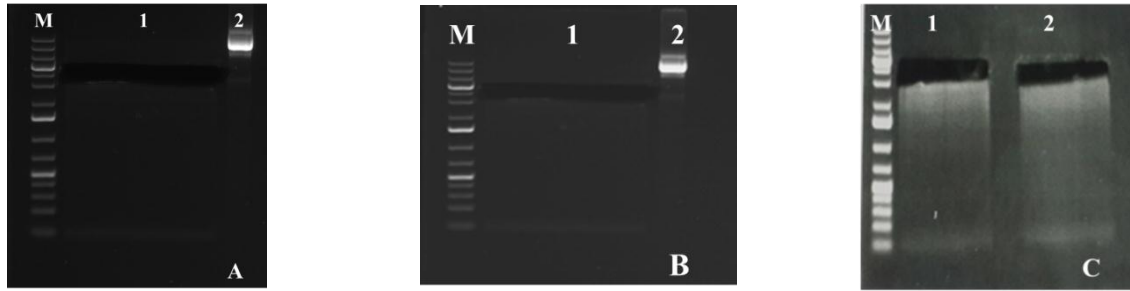
Üretilen kimoziin enzimini ortamdan afinite kromatografisi yöntemi ile saflaştırmak ve Western blot analizi ile tespit edebilmek amacıyla, YAK kimoziin geninin sonuna 6 adet histidin amino asidi (6His-etiketi) PZR yöntemiyle eklenmiştir. PZR işleminin, pUC57YAK plazmiti kalıbında YAC-CHY-*EcoRI* ileri ve YAC-CHY-*xbaI* geri primerleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.3).

Elde edilen PZR ürünleri saflaştırılmıştır. Kontrol için agaroz jelde yürütülmüş beklenen baz çifti (1128 bp) elde edilerek doğrulanmıştır (Şekil 4.3). Elde edilen histidin etiketli gen YAKHis olarak adlandırılmıştır.



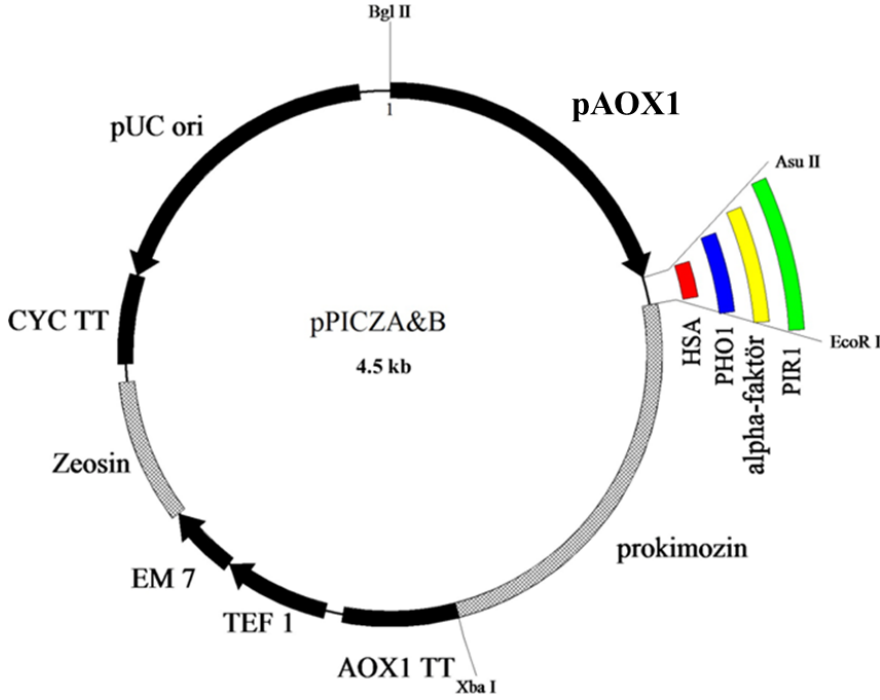
Şekil 4.3. PZR sonrası elde edilen 6His-etiketli kimoziin geninin (YAKHis) agaroz jelde görüntülenmesi. beklenen uzunluk 1128 bp

YAKHis geni jelden kesilmiş ve agaroz jel saflaştırması yapılmıştır. Yine *xbaI/EcoRI* enzimleriyle kesilen, farklı sinyal sekanslarına sahip ekspresyon vektörleri ise (pPICZ $\alpha$ A, pPICZBPIR1, pPICZBHSA, pPICZBPHO) jelden kesilerek alınmış ve jel saflaştırmaları yapılmıştır (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. *EcoRI/xbaI* enzimleriyle kesilen pPICZ $\alpha$ A, pPICZBPIR1, pPICZBHSA ve pPICZBPHO vektörlerin jel elektroforezinde görüntülenmesi ve jelden kesilmesi (A) 1. Sütun: pPICZ $\alpha$ A vektörünün jelden kesilmesi, 2. sütun: Enzimlerle kesilmeyen pPICZ $\alpha$ A (kontrol) (B) 1. sütun: pPICZBPIR1 vektörünün jelden kesilmesi, 2. sütun: enzimlerle kesilmeyen pPICZBPIR1 (kontrol) (C) 1. sütun: pPICZBHSA vektörünün jelden kesilmesi, 2. sütun: pPICZBPHO vektörünün jelden kesilmesi

YAKHis parçasının her bir vektöre ligasyonu ayrı bir şekilde gerçekleştirilerek aynı genin 4 farklı sinyal sekansında ekspresyonunu gerçekleştirecek olan 4 farklı ekspresyon kaseti oluşturulmuştur. Elde edilen ekspresyon kasetleri pPICZ $\alpha$ AYAKhis (4634 bç), pPICZBPIR1YAKhis (4567 bç), pPICZBHSAYAKhis (4489 bç), pPICZBPHOYAKhis (4437 bç) olarak adlandırılmıştır (Şekil 4.5).

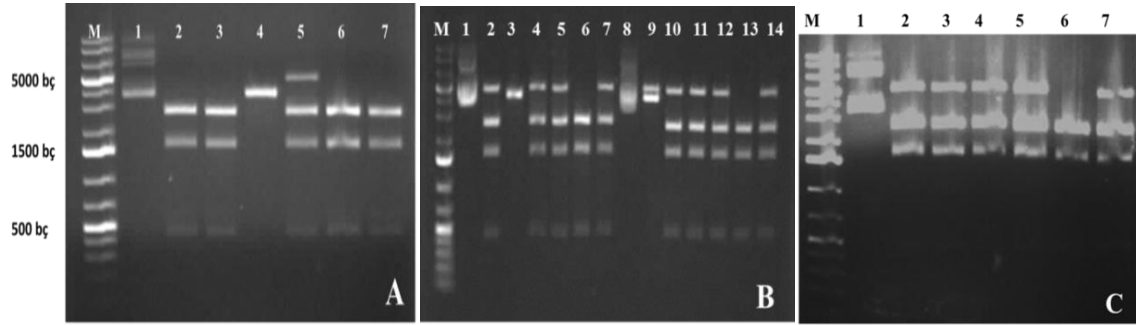


Şekil 4.5. Ligasyon sonrası elde edilen pPICZ $\alpha$ AYAKhis, pPICZBPIR1YAKhis, pPICZBHSAYAKhis ve pPICZBPHO1YAKhis ekspresyon kasetlerinin şematik gösterimi

Oluşturulan ekspresyon kasetlerinin her biri kompetan *E. coli* XL1-Blue hücrelerine aktarılmış, 100  $\mu$ g/mL zeosin içeren LB miller agar plakalara ekim yapılmıştır. Plakada gelişen kolonilerden 6'şar tanesi seçilerek geliştirilmiştir. Geliştirilen hücrelere plazmit izolasyonu yapılmış ve *EcoRV* enzimi ile restriksiyon analizi gerçekleştirilmiştir. Oluşturulan ekspresyon kasetleri için restriksiyon analizi sonrası beklenen bç uzunlukları çizelge 4.1'de verilmiştir. pPICZ $\alpha$ AYAKhis, pPICZBPIR1YAKhis ve pPICZHSAYAKhis ekspresyon kasetlerinin 5'er tanesi, pPICZBPHOYAKhis ekspresyon kasetlerinin ise tamamı doğrulanmıştır. pPICZ $\alpha$ AYAKhis, pPICZBPIR1YAKhis; pPICZHSAYAKhis ve pPICZBPHOYAKhis ekspresyon kasetlerinin 5 numaralı klonlarından donmuş kültür hazırlanmış ve transformasyon işlemine devam edilmiştir (Şekil 4.6).

Çizelge 4.1. Kimozin geni taşıyan ekspresyon kasetlerine yapılan restriksiyon analizi sonrası beklenen bç uzunlukları

Ekspresyon kaseti	Restriksiyon analizi sonrası beklenen bç uzunluğu
pPICZ $\alpha$ AYAKhis	457, 1570, 2625
pPICZBPIR1YAKhis	447, 1562, 2535
pPICZBHSAYAKhis	447, 1562, 2428
pPICZBPHOYAKhis	447, 1562, 2428

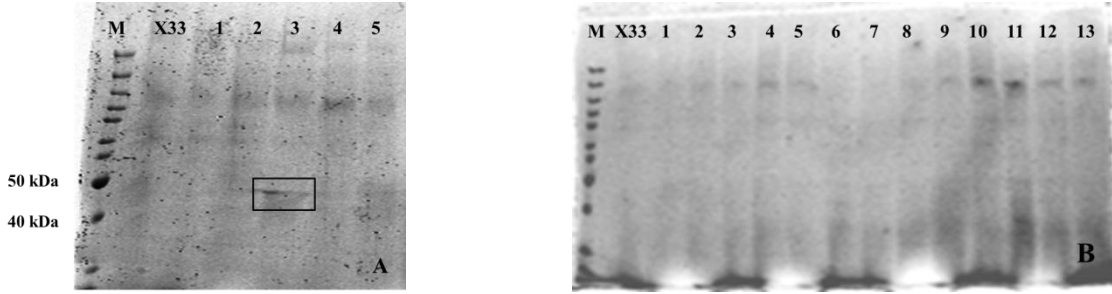


Şekil 4.6. pPICZ $\alpha$ AYAKhis, pPICZBPIR1YAKhis, pPICZBHSAYAKhis ve pPICZBPHO1YAKhis ekspresyon kasetlerinin restriksiyon analizinin *EcoRV* ile yapılması ve agaroz jelde kontrol edilmesi  
 (A) 1. sütun: pPICZ $\alpha$ AYAKhis (halkasal); 2-7. sütunlar: *EcoRV* ile kesilmiş pPICZ $\alpha$ AYAKhis  
 (B) 1. sütun pPICZBPIR1YAKhis (halkasal); 2-7. sütunlar: *EcoRV* ile kesilmiş pPICZBPIR1YAKhis; 8. Sütun: pPICZBHSAYAKhis (halkasal); 9-14. Sütunlar: *EcoRV* ile kesilmiş pPICZBHSAYAKhis  
 (C) 1. sütun: pPICZBPHOYAKhis (halkasal); 2-7. sütunlar: *EcoRV* ile kesilmiş pPICZBPHOYAKhis

#### 4.2. His-etiketili Ekspresyon Kasetlerinin *Pichia pastoris* Mayasına Transformasyonları

Doğrulan pPICZ $\alpha$ AYAKhi, pPICZBPIR1YAKhis, pPICZHSAYAKhis ve pPICZBPHOYAKhis Ekspresyon kasetlerinin herbirinden elde edilen plazmitler 2-5  $\mu$ g'ı *SacI* enzimi ile doğrusallaştırılmış ve kompetan *Pichia pastoris* X-33 suşuna ayrı ayrı transformasyonları gerçekleştirilmiştir. Transformant hücreler 100  $\mu$ g/mL ve 500  $\mu$ g/mL zeosin içeren YPD agar plakalara ekilmiştir. Plakalar 3 gün boyunca 30 °C'de gelişmeye bırakılmıştır. Yalnızca 100  $\mu$ g/mL zeosin içeren plakalarda gelişim gözlenmiş ve 5'er koloni seçilerek YPD besiyerinde inokulum olarak gece boyu geliştirilmiştir. Ardından hücreler BMGY medyasında 16 saat boyunca geliştirilip BMMY indüksiyon medyasına aktarılmıştır. Engelli erlenlerde geliştirilen kültürler 12 saatte bir besiyerindeki son konsantrasyonu % 1 olacak şekilde metanol eklemesi yapılarak 96 saat boyunca kimozin ekspresyonu gerçekleştirilmiştir. Ekspresyon sonunda bütün hücreler santrifüj ile çöktürülerek süpernatantlar toplanmış ve elde edilen

süpernatantlarla süt pıhtılaştırma testi yapılmıştır. pPICZBPIR1YAKhis; pPICZHSAYAKhis ve pPICZBPHOYAKhis transformantlarına ait süpernatantlarda herhangi bir pıhtı oluşumu gerçekleşmezken yalnızca 3 numaralı pPICZ $\alpha$ AYAKhis transformantına ait süpernatantla yapılan testte 30. dakikada pıhtılaşma gözlenmiştir. Daha sonra kimozen enziminin varlığını tespit edebilmek amacıyla süpernatantlara SDS-PAGE analizi uygulanmıştır (Şekil 4.7). Tibet öküzü prokimozen geninin büyüklüğü 1110 bp'dir. Genel olarak bir amino asit kalıntısının büyüklüğü 110 dalton olarak belirlenmiştir (Berg vd 2002). Kimozen geni teorik olarak 41,375 daltondur ancak kullandığımız Tibet öküzü kimozen geni 2 tane glikozilasyon bölgesi içerdiğinden, SDS-PAGE'de görmeyi beklediğimiz protein bandı daha yüksek olma ihtimali vardır. Yalnızca pPICZ $\alpha$ AYAKhis 3 numaralı transformantına ait SDS-PAGE görüntüsünde (Şekil 4.7. A, sütun 4) ~49 kDa büyüklüğünde protein bandı gözlenmiştir. SDS-PAGE jel görüntüsüyle de tutarlı olarak yalnızca beklenen aralıkta protein bandı görülen süpernatant süt çözeltisinde pıhtılaşmaya sebep olmuştur.

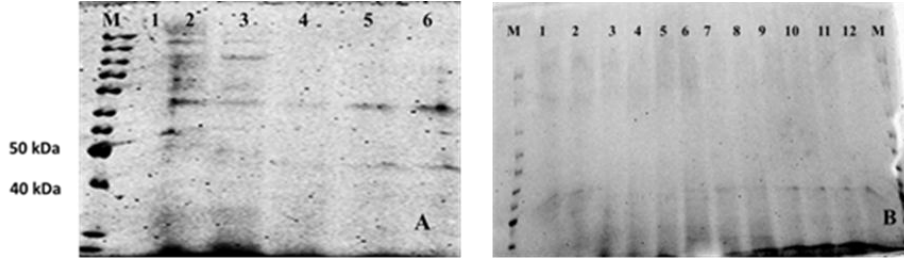


Şekil 4.7. pPICZ $\alpha$ AYAKhis, pPICZPIR1YAKhis, pPICZHSAYAKhis ve pPICZBPHOYAKhis transformantlarının 96. saatteki süpernatantlarına ait SDS-PAGE görüntüleri  
 (A) 1-5. sütunlar: pPICZ $\alpha$ AYAKhis transformantından elde edilen süpernatantlar  
 (B) 1-5. sütunlar: pPICZPIR1YAKhis transformantına ait süpernatantlar, 6-9. sütunlar: PICZHSAYAKhis transformantına ait süpernatantlar, 10-13. sütunlar: pPICZBPHOYAKhis transformantına ait süpernatantlar

X-33 transformantlarından yalnızca  $\alpha$ - mating faktör sekresyon sinyali taşıyan ekspresyon kasetinin hücre süpernatantında enzim aktivitesi tespit edilmiştir. Diğer sekresyon sinyallerini taşıyan ekspresyon kasetlerine ait hücre süpernatantında aktivite gözlenmemesi üzerine Protein disülfid izomeraz (PDI) proteininin enzim sekresyonunu artırıcı etkisinden dolayı (Inan vd 2006) doğrusal haldeki pPICZ $\alpha$ AYAKhis, pPICZPIR1YAKhis, pPICZHSAYAKhis ve pPICZBPHOYAKhis pilazmidlerinin *P. pastoris* GS115(PDI suşuna transformasyonu yapılmıştır. 100  $\mu$ g/mL zeosin içeren plakalardan 4'er koloni seçilmiş ve seçilen koloniler ile engelli erlenmayerde 120 saat protein ekspresyonu yapılmıştır.

Ekspresyon sonucunda yine yalnızca 3 numaralı pPICZ $\alpha$ AYAKhis transformantına ait süpernatantda enzim aktivitesi gözlenirken, diğer transformantların süpernatantlarında enzim aktivitesi gözlenmemiştir. PDI suşundaki 3 numaralı transformant süt çözeltisinde 5. dakikada pıhtı oluşturmuştur. Süpernatant örneklerine SDS-PAGE (Şekil 4.8) ve Western blot (Şekil 4.9) analizleri uygulanmıştır. Yine süt

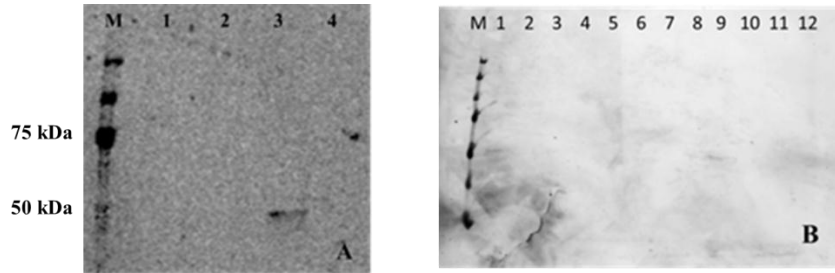
pıhtılaştırma testi ile tutarlı olarak, aktivite gözlenen süpernatantın SDS-PAGE gel görüntüsünde 49 kDa civarında bant görülürken diğer örneklerde bant görülmemiştir. Western blot görüntüsünde yalnızca pPICZ $\alpha$ AYAKhis 3 numaralı transformantına ait süpernatantda bant gözlenmiş (Şekil 4.8 A, sütun 3), diğer transformantların hiç birinde bant gözlenmemiştir.



Şekil 4.8. pPICZ $\alpha$ AYAKhis, pPICZBPIR1YAKhis, pPICZBHSAYAKhis pPICZBPHO1YAK ekspresyon kastlerini taşıyan transformant *P. pastoris* GS115(PDI) mayasından elde edilen süpernatantların SDS-PAGE’te görüntülenmesi

(A) 3 numaralı pPICZ $\alpha$ AYAKhis (PDI) transformantının süpernatantlarına ait SDS-PAGE görüntüsü; 1. sütun: negatif kontrol (enzim içermeyen süpernatant) PDI, 2-6. Sütunlar: sırasıyla 24, 48, 72, 96 ve 120. saatteki süpernatantlar

(B) 1-3. sütunlar: Sırasıyla 1, 2, 4 numaralı pPICZ $\alpha$ AYAKhis transformant süpernatantı, 4-6. sütunlar: sırasıyla 1, 2, 3 numaralı pPICZBPIR1YAKhis (PDI) transformant süpernatantı, 7-9. sütunlar: sırasıyla 1, 2, 3 numaralı pPICZBHSAYAKhis (PDI) transformant süpernatantı, 10-12. sütunlar: Sırasıyla 1, 2, 3 numaralı pPICZBPHO1YAK (PDI)his transformant süpernatantı

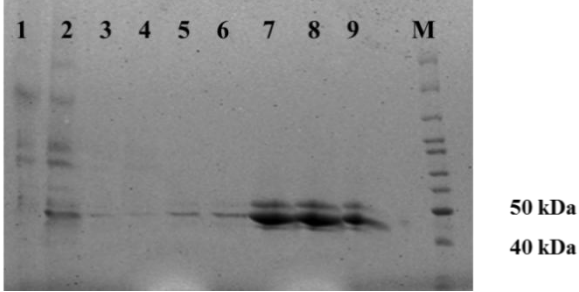


Şekil 4.9. pPICZ $\alpha$ AYAKhis, pPICZBPIR1YAKhis, pPICZBHSAYAKhis, pPICZBPHO1YAK ekspresyon kastlerini taşıyan transformant *P. pastoris* GS115(PDI) mayasından elde edilen süpernatantların Western blot membran görüntüleri

(A) 1-4. sütunlar: sırasıyla 1-4 numaralı pPICZ $\alpha$ AYAKhis transformantına ait 120. saatteki süpernatantlar

(B) 1-4. sütunlar: sırasıyla 1-4 numaralı pPICZBPIR1YAKhis, 5-8. Sütunlar: sırasıyla 1-4 numaralı pPICZBHSAYAKhis, 9-12. Sütunlar: sırasıyla 1-4 numaralı pPICZBPHOYAKhis transformantlarına ait süpernatantların 120. saatteki görüntüleri

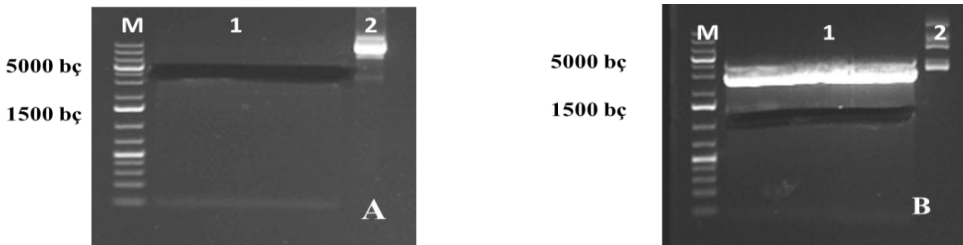
pPICZ $\alpha$ AYAK 3 numaralı transformantına ait süpernatanta histidin saflaştırması Ni-NTA resin ile yapılmış, ardından diyaliz edilip konsantre edilmiştir. İşlem sonrası elde edilen konstantre enzim ile süt pıhtılaştırma testini uyguladığımızda enzimin aktivitesini kaybettiği ancak SDS-PAGE görüntüsünde protein bandının yoğunluğunun arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. 6His-etiketli üretilen kimoziin saflaştırmasının SDS-PAGE görüntüsü. 1. sütun: negatif kontrol (kimoziinsiz süpernatant). 2. sütun : 120. Saatte elde edilen kimoziin süpernatantı. 3. sütun: Resin ile proteiniin toplanmasından sonra kalan süpernatant, 4-6. sütunlar: sırasıyla resin ile toplanan proteine ait yıkama 1, yıkama 2, yıkama 3. 7-8. sütunlar: sırasıyla elüsyon 2, elüsyon 3. 9. sütun: diyaliz ve konsantrasyon sonrası örneği

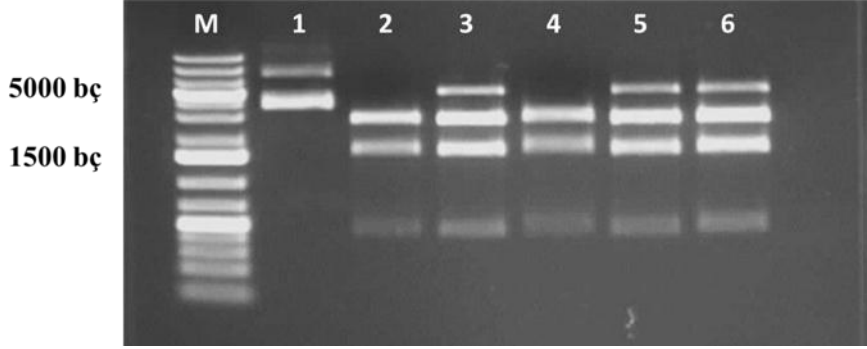
#### 4.3. Histidin Etiketsiz Prokimoziin Geninin Ekspresyon Vektörüne Ligasyonu ve *Pichia pastoris* Mayasına Transformasyonu

Alınan sonuçlar doğrultusunda kimoziin enzimiinin sadece  $\alpha$ -eşleşmesi faktörsekresyon sinyali taşıyan ekspresyon kasetiyle üretilibildiği görülmüştür. Bu sebeple çalışmaya pPICZ $\alpha$ A vektörü ile devam edilmiştir. Histidin etiketinin çalışmanın sonraki aşamalarında saflaştırma sorunu çıkarabileceği düşünülerek ve histidin amino asitleri bulunduran enzimiin kullanımın endüstride mümkün olmayışından dolayı, histidin etiketsiz prokimoziin geni pUC57YAK pilazmidinden *EcoRI/XbaI* enzimleriyle kesilmiş, jelden alınarak saflaştırılmıştır (Şekil 4.11). PDI suşundaki transformantın, X-33 suşundaki transformanta göre daha iyi bir üretici olduğu da göz önüne alınarak, transformasyon işlemlerine PDI suşuyla devam edilmiştir.



Şekil 4.11. *EcoRI/xbal* enzimleri ile kesilerek lineer hale getirilen YAK kimoziin geni ve pPICZ $\alpha$ A vektörünün agaroz jelde görüntülenmesi ve kesilerek alınması. (A) 1. Sütun : pPICZ $\alpha$ A vektörünün agaroz jelden alınması. 2. sütun: negatif kontrol (halkasal pPICZ $\alpha$ A vektörü) (B) 1. Sütun: YAK gen parçasının jelden alınması. 2. sütun: negatif Kontrol (halkasal PUC57YAK)

Enzimlerle kesilen vektöre ve gen parçasına ligasyon işlemi uygulanmıştır. İşlem sonrası ligasyon tüpündeki ürünlerden 5'er  $\mu$ L kompetan *E. coli* XL1-Blue hücrelerine aktarılmıştır. Zeosinli (100  $\mu$ g/mL) LB miller plakalarda gelişen kolonilerden 5 tanesi seçilmiş seçilen koloniler zeosinli LB miller sıvı besi yerinde geliştirildikten sonra plazmit izolasyonu yapılmıştır. Oluşturulan ekspresyon kasetine (pPICZ $\alpha$ AYAK) *EcoRV* enzimi ile restriksiyon analizi yapılmıştır. Doğrulanacak klonlar için beklenen fragmentler 447, 1562 ve 2625 bç'dir. Klonların tamamı doğrulanmış, 1 numaralı klon ile deneylere devam edilmiştir (Şekil 4.12). Elde edilen klonlar pPICZ $\alpha$ AYAK (4634 bç) olarak isimlendirilmiştir.



Şekil 4.12. pPICZ $\alpha$ AYAK ekspresyon kasetlerinin *EcoRV* ile kontrol edilmesi. 1. sütun: negatif kontrol (halkasal pPICZ $\alpha$ AYAK), 2-6. Sütunlar : *EcoRV* ile kesilen pPICZ $\alpha$ AYAK plazmitleri

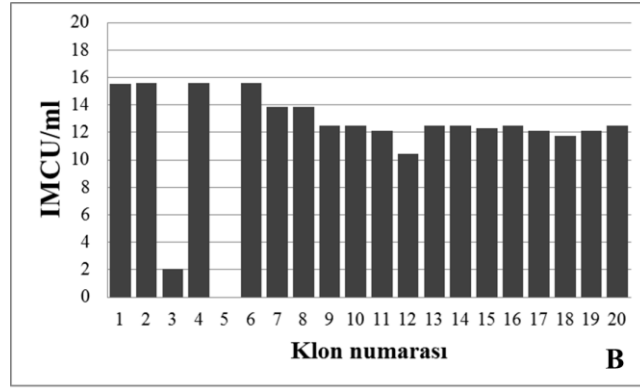
pPICZ $\alpha$ AYAK ekspresyon kasetininin 2-5  $\mu$ g kadarı *SacI* enzimi ile doğrusallaştırılmış ve kompetan *P. pastoris* PDI suşuna transformasyonu gerçekleştirilmiştir.

pPICZ $\alpha$ AYAK ekspresyon kaseti transformantlarının bulunduğu plakadan 20 adet koloni seçilmiş ve engelli erlende 120 saat protein ekspresyonu gerçekleştirilmiştir. 5 numaralı transformanta ait süpernatant süt çözeltisini hiç pıhtılaştıramamış, 3 numaralı klondan elde edilen süpernatant ise 30 dakikada pıhtılaştırmıştır. Geri kalan transformantların süpernatantları süt çözeltisini 240 saniye ile 300 saniye arasında pıhtılaştırmıştır (Şekil 4.13 A). Pozitif kontrol olarak kullandığımız ticari sıvı peynir mayası ise %10 seyreltildiğinde aynı miktar süt çözeltisinde 62,5. saniyede pıhtı oluşturmuştur. Klonlardan elde edilen süpernatantların sütü pıhtılaştırma gücü elimizdeki kimozi standardı referans alınarak IMCU/ml cinsinden hesaplanmıştır (Şekil 4.13).



Klon numarası	Sütü pıhtılaştırma süresi (s)	IMCU/ml
1	241	16
2	240	16
3	1800	2
4	240	16
5	Pıhtı yok	Değer yok
6	240	16
7	270	14
8	270	14
9	300	13
10	300	13
11	310	12
12	360	10
13	300	13
14	300	13
15	305	12
16	300	13
17	310	12
18	320	12
19	310	12
20	300	13
Pozitif kontrol (ticari maya)	6	600
Negatif kontrol	Pıhtı yok	Değer yok

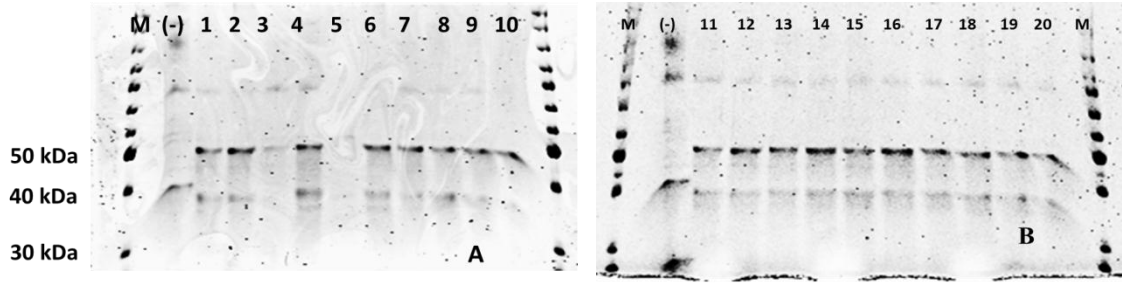
A



B

Şekil 4.13. Farklı klonlardan elde edilen süpernatantların kimoziin aktivitesinin süre ve IMCU/ml cinsinden sonuçları (A) pPICZ $\alpha$ AYAK klonlarından elde edilen süpernatantların sütte pıhtılaştırma gösterdiği süre (s) ve IMCU/ml değerleri. (+) kontrol: Ticari kimoziin standardı (RENMAX, Mayasan, Türkiye), (-) kontrol: Prokimoziin geni yerleştirilmemiş maya süpernatantı (B) Farklı pPICZ $\alpha$ AYAK klonlarına ait kimoziin içeren süpernatantların enzim gücünün IMCU/ml cinsinden grafik ile gösterimi

Yüz yirmi saat sürdürülen protein ekspresyonu sonunda 20 klondan elde edilen süpernatantlara SDS-GEL analizi uygulanmıştır (Şekil 4.14). Süt pıhtılaştırma testi ile tutarlı olarak 5 numaralı transformanta ait süpernatantda hiç bant gözlenmemiştir. 3 numaralı transformantın süpernatantına ait protein bandının yoğunluğu düşük iken diğer süpernatant örneklerinde gözlemlenen protein bandı hemen hemen eşit ve daha yoğundur. SDS-PAGE protein bant sonuçları transformantların enzim aktiviteleri ile tutarlı sonuçlar vermiştir Fermentasyon aşamasına en iyi üreticilerden biri olan 4 numaralı klon ile devam edilmiştir.

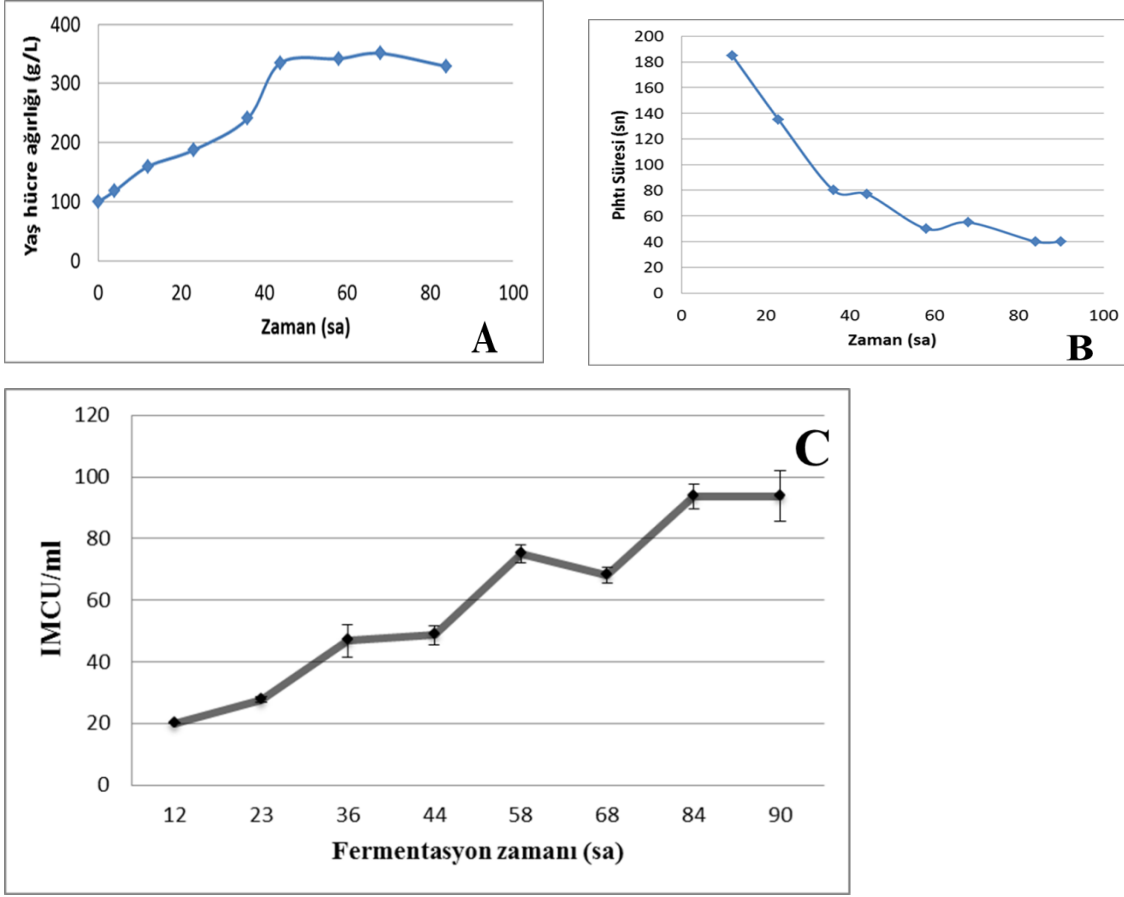


Şekil 4.14. pPIC $\alpha$ AYAK klonlarına ait süpernatantların SDS-PAGE görüntüleri. M: PageRuler Unstained Protein Ladder, (-): Negatif kontrol (kimozin içermeyen süpernatant)  
 (A) Sırasıyla 1-10 numaralı pPIC $\alpha$ AYAK (PDI) klonlarına ait süpernatant örneklerinin SDS-GEL görüntüsü  
 (B) Sırasıyla 11-20 numaralı klonlara ait süpernatant örneklerinin SDS-GEL görüntüsü

#### 4.4. Fermentörde Kimozin Ekspresyonu

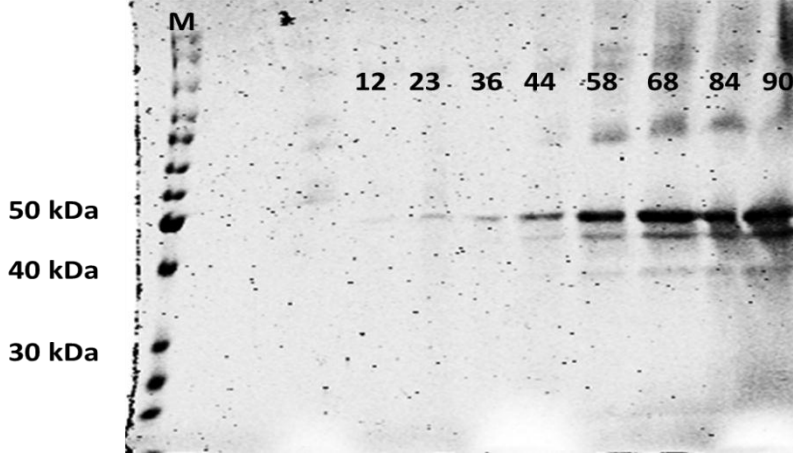
pPICZ $\alpha$ AYAK 4 numaralı transformant ile fermentörde kimozin ekspresyonuna başlanmıştır. Fermentörde sıcaklık ve pH koşulları kesikli ve kesikli gliserol besleme fazlarında 30°C; pH 5 olarak, metanol besleme fazında ise 25°C; Ph 3.85 olarak belirlenmiştir. Metanol besleme fazı 90 saat boyunca sürdürülmüş, belirli aralıklarla fermentörden alınan örneklerin yaş hücre ağırlığı ölçülmüş (Şekil 4.15 A) ve süt pıhtılaştırma testleri yapılmıştır (Şekil 4.15 B). Hücrelerin 40. saatten sonra durgun faza geçmiştir. Süpernatantların pıhtı oluşturma süresi ise 60. saatten sonra çok önemli bir değişiklik göstermemeye başlamıştır.

Fermentörden alınan 12, 23, 36, 44, 58, 68, 84 ve 90. saatlerine ait süpernatantların kimozin aktivitesi IMCU/ml cinsinden hesaplanmıştır. Buna göre 12. saatte alınan ilk enzimin gücü 20 IMCU/ml iken bu değer 84. saatte 93 IMCU/ml'ye çıkmış ve 90. saatte de aynı şekilde sabit kalmıştır (Şekil 4.15 C).



Şekil 4.15. Fermentörde geliştirilen hücrelerin yaş ağırlığının, hücrelerden elde edilen süpernatantın oluşturduğu pıhtılaşma süresinin ve süpernatantların enzim aktivitesinin grafikleri (A) Hücrelerin yaş ağırlığının zamana göre grafiği (B) Süpernatantların toplandığı saatin, süt çözeltisinde pıhtı oluşturdukları süreyle olan ilişkisinin grafiği (C) Kimozin aktivitesinin zamana göre IMCU/ml cinsinden ifadesi

Metanol beslemesi sırasında farklı saatlerde alınan süpernatant örnekleri, SDS-GEL analizi için uygun olarak hazırlanıp -20 °C'de saklanmıştır. Fermentasyon işlemi bittiğinde bütün örnekler SDS-PAGE analizi uygulanmıştır. Beklendiği üzere jelde 49 kDa büyüklüğünde protein bandı görülmüştür. Protein bantlarının yoğunluğunun 68. saatten sonra alınan örneklerdeki yoğunluğunun değişimi göz ile ayırt edilememiştir (Şekil 4.16).

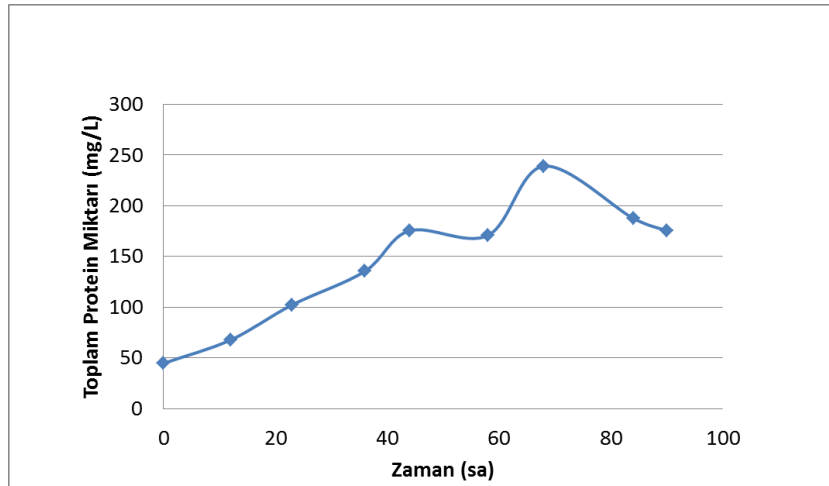


Şekil 4.16. pPICZ $\alpha$ AYAK(PDI) hücrelerinin farklı fermentasyon saatlerindeki süpernatantlarına ait SDS-PAGE görüntüleri

#### 4.5. Enzim Karakterizasyonu

Süpernatantlardaki toplam protein miktarı tayini için Bradford Protein Assay kullanılmıştır. Protein miktarını hesaplayabilmek için üretici firmanın talimatlarına uygun şekilde Bovine Serum albümin örnekleri hazırlanıp, 595 nm'deki optik yoğunluklarına göre standart eğri çizilmiştir

Fermentasyonun 12., 23., 36., 44., 58., 68., 84., ve 90. Saatlerinde alınan süpernatant örnekleri Bradford protein assay kit protokolüne göre hazırlanmış ve optik yoğunlukları ölçülmüştür. Elde edilen standart eğriye göre hesaplamalar yapılmıştır (Şekil 4.17).

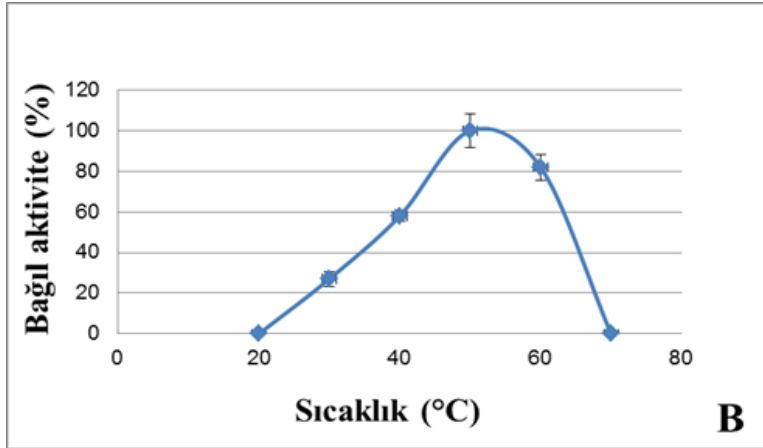
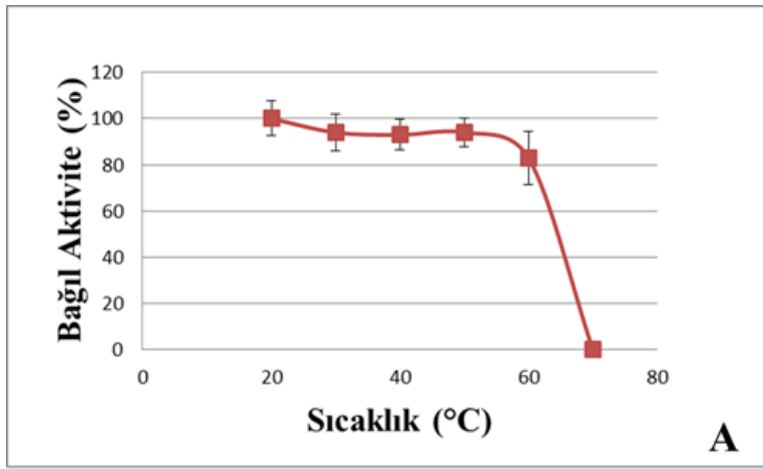


Şekil 4.17 Fermentörde geliştirilen pPICZ $\alpha$ AYAK(PDI) hücrelerine ait farklı zamanlarda toplanan süpernatantlardaki toplam protein miktarı grafiği

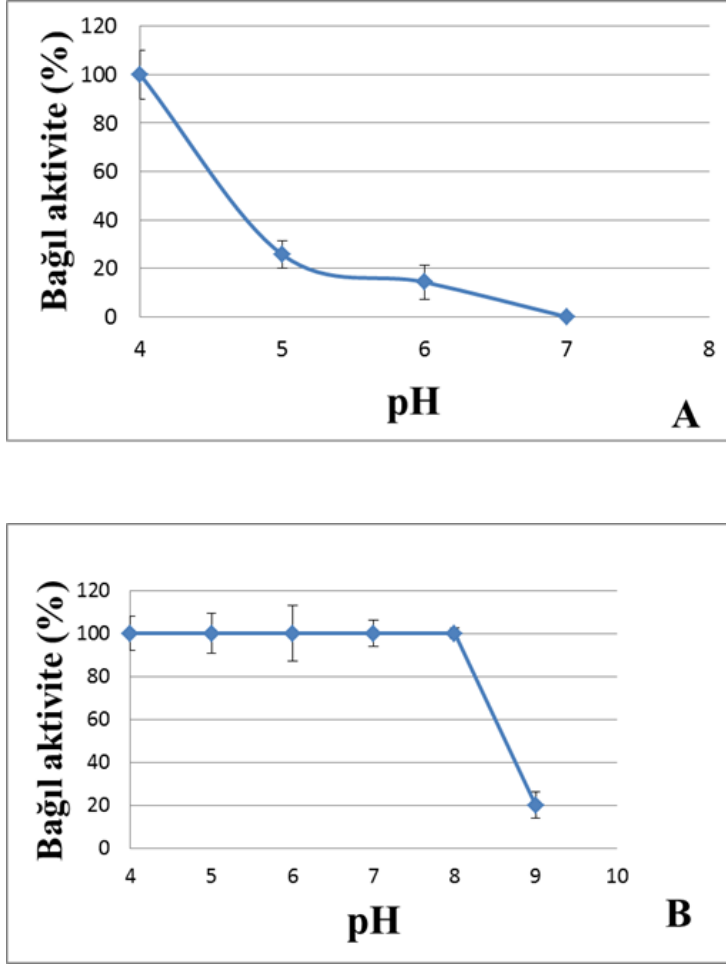
Fermentasyonun 90. saat süpernatant örneği ile enzimin sıcaklık ve pH karakterizasyonları yapılmıştır. Enzimin belirli sıcaklık (20-70°C) ve pH (4-7) aralıklarında stabil kalabildiği değerler ile optimum çalışma değerleri belirlenmiştir.

Supernatant örnekleri 20-70°C derecede tutulduktan sonra yapılan pıhtılaştırma testinden elde edilen pıhtılaştırma sürelerine göre rekombinant Tibet öküzü kimozin enziminin optimum çalışma sıcaklığı 50°C olarak bulunmuştur ve enzim 20°C'de maksimum (%100) dayanıklılık gösterirken, bu değer 50°C'de %83 olmuş ve 60°C'de aniden sıfıra düşmüştür (Şekil 4.18).

Enzimin aktivite gösterdiği substrat pH değerleri ise şu şekilde bulunmuştur: pH 4.0'da bağıl aktivite %100 (optimum) iken, pH 5.0'da %25, pH 6.0'da %14 ve pH 7'de 0'dır. Bu sonuçlar pH'ı değiştirilen süt çözeltisi ile yapılan pıhtılaştırma testinde elde edilen pıhtılaştırma sürelerine göre bağıl olarak belirlenmiştir. pH stabilitesini belirlemek için ise, pH'ı değiştirilen enzim ile süt pıhtılaştırma testi standart olarak yapılmıştır. Pıhtılaştırma testi sonuçlarına göre enzim pH 8'e kadar %100 stabil kalmış pH 9 ise %20'ye düşmüştür (Şekil 4.19).



Şekil 4.18. Rekombinant Tibet öküzü kimozinine ait sıcaklık karakterizasyonu grafikleri (A) stabilitesi ve (B) optimum çalışma sıcaklıkları



Şekil 4.19. Rekombinant Tibet öküzü kimozinine ait pH karakterizasyonu grafikleri (A) aktivite gösterdiği pH değerleri ve optimum pH değeri (B) stabilitesi (pH 3'te asitlikten dolayı süt çözeltiü kendiliğiden pıhtılaşma gösterdiği için pH 3'teki pıhtılaşma süreleri dikkate alınmamıştır)

## 5. TARTIŞMA

Bu çalışmada Tibet öküzü prokimozin geni kullanılarak *P. pastoris* mayasında hücre kültür süpernatantına aktif kimozin salgılanması ve bu aktif kimozinin karakterizasyonunun yapılması amaçlanmıştır. Kimozinin hücre dışı ekspresyonu için farklı sinyal sekansları taşıyan ekspresyon vektörleri kullanılmış, en iyi üretici ekspresyon kaseti ile fermentasyon ve karakterizasyon deneylerine devam edilmiştir. Tibet öküzü prokimozin geni GeneScript'ten liyofilize olarak pUC57 vektörü ile birlikte temin edilmiştir. Kimozin üretimi farklı ekspresyon kasetleriyle denendikten sonra, fermentasyon ve karakterizasyon aşamalarına *Saccharomyces cerevisia*  $\alpha$ -eşleşmesi faktörü( $\alpha$ -MF) sekresyon sinyalini taşıyan ekspresyon kaseti ile devam edilmiştir. Üretim AOX1 promotörü altında *P. pastoris* GS115 (PDI) suşu ile gerçekleştirilmiştir.

Preprokimozin, prokimozin ve kimozin genleriyle daha evvel yapılan rekombinant protein çalışmalarında görülmüştür ki, yalnızca prokimozin geni hücre süpernatantına aktif kimozin salgılayabilmiştir (Vallejo vd 2008). Çünkü prokimozinin N-terminus'unda bulunan 42 amino asitlik propeptidin, kimozinin üç boyutlu doğru katlanmasında etkin olduğu düşünülmektedir (Jiang vd 2012). Bugüne kadar sığır, deve, keçi gibi birçok hayvan rekombinant kimozin için gen kaynağı olarak kullanılmıştır. Rekombinant kimozin üretiminde konakçı olarak *Escherichia coli* otuz yılı aşkın bir süredir kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra günümüze kadar çeşitli filamentli funguslar da rekombinant kimozin üretimi için kullanılmıştır. Ancak mayalar rekombinant protein üretiminde genetik ve fermentasyon seviyelerinde enzim niceliği ve niteliği bakımından daha iyi sonuçlar verdiği için popüler hale gelmiştir.

Tibet öküzü prokimozin genine (1110 bç, YAK), histidin etiketi PZR yöntemiyle eklenmiştir. En iyi hücre dışı enzim üreticisi ekspresyon vektörünü belirleyebilmek için *Saccharomyces cerevisiae*  $\alpha$ -eşleşmesi faktörü( $\alpha$ -MF), HSA (İnsan serum albümini), PIR1(*P. pastoris* Protein with Internal Repeats) ve PHO1 (*P. pastoris* Acid Phosphatase) (Karaoğlan vd 2014) sinyal sekanslarını taşıyan ekspresyon vektörleri kullanılmıştır. Ardından histidin etiketli prokimozin geni (YAKhis); pPICZ $\alpha$ A, pPICZBPIR1, pPICZBHSA ve pPICZBPHO1 hücre dışı ekspresyon vektörlerine yerleştirilmiştir. Oluşturulan ekspresyon kasetleri pPICZ $\alpha$ AYAKhis, pPICZBPIR1YAKhis, pPICZHSAAYAKhis ve pPICZBPHOYAKhis olarak adlandırılmıştır. Ekspresyon kasetleri doğrusal hale getirildikten sonra *P. pastoris* X-33 suşuna transforme edilmiştir. Zeosin içeren YPD plakalardan 5'er tane transformant koloni seçilmiş ve geliştirildikten sonra engelli erlende enzim ekspresyonu gerçekleştirilmiştir. Ekspresyon sonunda elde edilen süpernatantlara süt pıhtılaşma testi yapıldığında yalnızca 3 numaralı pPICZ $\alpha$ AYAKhis transformantına ait süpernatantın pıhtı oluşturduğu gözlenmiştir. Yani  $\alpha$ -MF sinyal sekansını taşımayan diğer ekspresyon kasetleriyle yapılan üretimde kimozin elde edilememiştir. Yapılan SDS-PAGE analizi sonuçlarında da pPICZ $\alpha$ AYAKhis süpernatantı dışındaki süpernatantlarda protein bandı gözlenmemiştir (Şekil 4.7) Bunun üzerine diğer sinyal sekanslarının enzim sekresyonuna etkisinin olup olmadığından emin olmak için, ekspresyon kasetleri enzim sekresyonunu artırıcı etkisi bilinen bir başka suşa transforme edilmiştir.

*P. pastoris* GS115 (PDI) suşu Inan ve ark. (2006) tarafından laboratuvar şartlarında üretilmiştir (Inan vd 2006). Protein disülfid izomeraz (PDI)'ın heterolog

protein sekresyonunu arttırıcı etkisinden dolayı doğrusal haldeki pPICZ $\alpha$ AYAKhis, pPICZPIR1YAKhis, pPICZHSAYAKhis ve pPICZBPHOYAKhis ekspresyon kasetlerinin GS115(PDI) suşuna transformasyonu gerçekleştirilmiştir. Zeosinli plakalarda geliştirilen transformantlardan 4'er tane koloni seçilmiştir. Engelli erlende enzim ekspresyonu sonucunda yine yalnızca pPICZ $\alpha$ AYAKhis transformantlarından birine ait süpernatantda enzim aktivitesi gözlenirken, diğer transformantların süpernatantlarında enzim aktivitesi gözlenmemiştir. Süpernatantlara SDS-PAGE (Şekil 4.8) ve Western blot (Şekil 4.9) analizleri yapılmış ve yalnızca pPICZ $\alpha$ AYAKhis süpernatantında protein bantları gözlenmiştir.

Daha önce Akdeniz Üniversitesi Laboratuvarlarımızda yapılan rekombinant ksilanaz aktivitesi çalışmalarında PIR1 sekresyon sinyali en iyi üretici sinyal olurken bunu sırasıyla  $\alpha$ -MF, PHO1 ve HSA takip etmiştir (Karaoğlan vd 2014). Oysa bu çalışmada rekombinant kimoziin yalnızca  $\alpha$ -MF ile süpernatanta aktif olarak salgılanabilmiştir. Rekombinant kimoziin üretimi için *P. pastoris* ile yapılan son zamanlardaki çalışmalara bakıldığında da  $\alpha$ -MF sinyal sekansı taşıyan vektörlerin tercih edildiği görülmüştür (Vallejo vd 2008) (Jiang vd 2012) (Nosedo vd 2013) (Wang vd 2015).

Çalışmada elde edilen sonuçlara göre rekombinant kimoziin üretimi için uygun hücre dışı ekspresyon vektörünün  $\alpha$ -MF sinyal sekansı taşıyan pPICZ $\alpha$ A vektörü olduğuna karar verilmiş, fermentör çalışmalarına yalnızca bu vektör ile devam edilmiştir. Aynı şartlarda yapılan süt pıhtılaştırma analizinde, pPICZ $\alpha$ AYAKhis ekspresyon kasetinin aktarıldığı *P. pastoris* GS115(PDI) ve *P. pastoris* X-33 suşlarından, *P. pastoris* GS115(PDI) transformantından elde edilen enzim süpernatantının 6 kat daha hızlı aktivite gösterdiği saptanmıştır. Bunun üzerine çalışmalara konakçı olarak *P. pastoris* GS115(PDI) suşu ile devam edilmiştir.

Elde edilen süpernatanta histidin saflaştırması uygulandığında enzim aktivitesi kaybolmuştur. Ancak saflaştırma sonrasındaki SDS-PAGE görüntülerinde protein bandının daha yoğun olduğu görülmüştür (Şekil 4.10). Enzimin aktivitesini kaybetmesinin saflaştırma sırasında kullanılan tampon çözeltilerin pH'ı ile ilgili olabileceği düşünülmektedir. Histidin etiketi yalnızca Western blot analizi ile proteini görebilmek amacıyla eklenmiştir ve gıda endüstrisinde üretilen rekombinant enzim histidin etiketli olarak kullanılamaz. Bunun üzerine prokimoziin geni pUC57YAK plazmitinden enzimlerle kesilerek alınıp, pPICZ $\alpha$ A ekspresyon vektörüne yerleştirilmiştir. Elde edilen ekspresyon kaseti doğrulandıktan sonra *P. pastoris* GS115(PDI) suşuna transforme edilmiştir. Engelli erlenlerdeki üretimden sonra hücre süpernatantları direk olarak SDS-PAGE'de analiz edilmiş ve Jelde 49 kDa ve 37 kDa büyüklüklerinde iki bant gözlenmiştir (Şekil 4.14).

Bunun sebebi olarak yapılan çalışmalar ışığında bir takım görüşler öne sürülmüştür. Mayalarda üretilen proteinler çeşitli post translasyonel modifikasyonlar geçirdiğinden üretilen birçok rekombinant kimoziinin SDS-PAGE görüntüsünde iki bant gözlemlenmiştir. Bunun sonucunda mayalar tarafından sentezlenen bazı proteinlerin glikolizasyon geçirmiş olabileceği öne sürülmüştür. Deglikozilasyon işlemi sonrasında ise çift görünen bantların tek bir banda düştüğü gözlenmiştir (Wang vd. 2015). Gen kaynağına göre kimoziinin moleküler ağırlığı 23 ile 49 kDa arasında değişkenlik



gösterebilir. Önceki recombinant kimozin çalışmalarının SDS-PAGE jel görüntülerine bakıldığında manda kimozi için 23 kDa, 35.6 kDa ve ~36 kDa, sığır kimozi için 36.3-36.5 kDa, koyun u kimozi için 36 ve 37.5 kDa, keçi kimozi için 44 kDa ve 36 kDa (Kumar vd 2010), deve kimozi için ise 42 kDa büyüklüğünde protein bantları gözlemlenmiştir (Wang vd 2015). Fermentörde geliştirilen hücrelerin kültür süpernatantından alınan örneklerle yapılan SDS-PAGE analiz görüntüsünde de 49 kDa büyüklüğünde bir bant gözlemlenmiştir. Çalışmamızda elde ettiğimiz rekombinant kimozinin moleküler ağırlığındaki bu fark ise glikozile Tibet öküzü geni kullanılmasıyla kaynaklanmaktadır (Şekil 4.16).

Prokimozinin aktif hale gelebilmesi için, pro kısmının asidik ortamda parçalanması ve yalnızca kimozin halini alması gerekmektedir (Kumar vd 2010). Bu çalışmada enzimin salgılandığı süpernatanta herhangi bir asit-baz nötralizasyonu yapılmadan süt pıhtılaşma testi uygulanmış ve süpernatantın sütü pıhtılaştırdığı gözlemlenmiştir. Wang ve ark. (2015) çalışmasında, pH 4.25 ve üzerindeki besiyerlerinde geliştirilen rekombinant mayalardan elde edilen süpernatantların sütü pıhtılaştırmadığı görülmüştür. pH değeri düşükçe pıhtılaşma gözlemlenmiş ve 3.84'te en iyi süt pıhtılaşma aktivitesi gözlemlenmiştir. Engelli erlen ve fermentör üretimleri de pH'nın 3.85 olduğu besiyerinde gerçekleştirilmiştir. Rekombinant kimozin üretim besiyerinin pH değeri, prokimozinin pro- kısmının üretim aşamasında parçalanmasında ve böylece süpernatanta aktif kimozin salgılanmasında etkili olduğu düşünülmektedir.

Fermentörde üretilen kimozinin süt pıhtılaşma süresi 20 ile 40. Saatler arasında önemli bir düşüş göstermiş, 40 ile 60 arasında bu düşüş ivmesini biraz daha kaybetmiştir. 60. saatten sonra da pıhtılaşma süresinde önemli bir değişiklik olmamıştır. Süt pıhtı analizine paralel olarak hücrelerin yaş ağırlığının zamana göre grafiğine göre de hücrelerin 40. saatten sonra durgun faza geçtiği görülmüştür (Şekil 4.15). Vallejo ve ark. (2008) çalışmasına göre de üretilen rekombinant kimozinin aktivitesinin, 40. saatte maksimuma ulaştığı görülmüş ve 40 ile 100. saatler arasında aktivite korunmuştur.

Ürettiğimiz rekombinant Tibet öküzü kimozinin sütü pıhtılaşma gücü, 600 IMCU/ml kuvvetindeki ticari kimozin standart alınarak hesaplanmıştır. Buna göre 4 numaralı pPICZ $\alpha$ AYAK (PDI) transformantının engelli erlendeki üretimindeki enzimin gücü 120 saatte 16 IMCU/ ml iken bu miktar fermentör şartlarında 90. Saatte 93 IMCU/ml'ye ulaşmıştır. Fermentör koşullarında üretilen rekombinant Tibet öküzü kimozinin pıhtılaşma gücü yaklaşık 6 kat artmıştır (Şekil 4.13 ve 4.15).

Süt pıhtılaşma sürecinde sıcaklık çok önemli parametrelerden biridir. Bu çalışmada rekombinant Tibet öküzü kimozi için optimum çalışma sıcaklığı 50°C olarak bulunmuştur (Şekil 4.18 A). Ancak yak kimozi için daha evvel yapılan bir çalışma olmadığından karşılaştırmalar deve ve sığır kimozi üzerinden yapılabilmektedir. Enzim 50° derecede maksimum (%100) aktiviteye ulaşırken 20°C ve 70°C'de aktivite göstermemiştir. Wang ve ark (2015). deve kimozi için optimum çalışma sıcaklığını 45-55°C arası, Jiang ve ark. (2012) ise sığır kimozi için optimum çalışma sıcaklığını 37°C olarak bulmuşlardır. Ayrıca rekombinant Tibet öküzü kimozinin 20-70°C arasındaki sıcaklık stabilitesi belirlenmiştir. 20°C'de maksimum (%100) dayanıklılık

gösterirken, bu değer 50°C'de %83 olmuş ve 60°C'de aniden sıfıra düşmüştür (Şekil 4.18 B).

Rekombinant Tibet öküzü kimoziin enzimi için optimum çalıştığı ve stabilitesini koruduğu pH'lar belirlenmiştir. pH'ın 4'ten düşük olduğu ortamlarda süt çözeltiü asidik etkiden dolayı kendi kendine pıhtılaşma gösterdiğinden optimum pH çalışmaları pH:4'ten başlanarak gerçekleştirilmiştir. Yapılan deneylere göre pH 4.0'da bağıl aktivite %100 iken, pH 5.0'da, %25, pH 6.0'da %14 ve pH 7'de 0'dır (Şekil 4.19 A). Sonuçlara göre rekombinant yak kimoziinin için optimum pH'ın 4 olduğu ve asidik ortamda daha iyi sonuçlar verdiği görülmüştür. Kappeler ve ark. (2006) *Aspergillus niger*'de ürettikleri rekombinant sığır kimoziini için optimum pH'ı 6, Nosedá ve ark. (2013) *P. pastoris*'te ürettikleri sığır kimoziini için optimum pH'ı 5.5, Jiang ve ark. ise 4.0 olarak bulmuşlardır. Vallejo ve ark. (2008) rekombinant manda kimoziininin optimum pH'sını 4.5 olarak belirtmişlerdir. Wang ve ark. *p. pastoris*'te ürettikleri rekombinant deve kimoziini için optimum pH'ı 5.04 olarak bulmuşlardır. Önceki çalışmalar ile bizim çalışmamız arasındaki optimum pH farkı, kullandığımız gen kaynağının farklılığından kaynaklanıyor olabilir. Ayrıca ekspresyon medyamızın pH'ının 3.85 olması da optimum pH değerinde etkili olmuş olabilir. Hemen sonra rekombinant Tibet öküzü kimoziini için pH dayanıklılığı test edilmiş, enzim pH 8'e kadar %100 stabil kalmış pH 9 ise %20'ye düşmüştür (Şekil 4.19 B).

## 6. SONUÇ

Bu çalışmada Tibet öküzü prokimozin genini taşıyan rekombinant vektör oluşturulmuş, AOX1 promotörü altında *P. pastoris* mayası ile hücre dışı ekspresyonu gerçekleştirilmiştir.

Yapılan çalışmalar sonucunda rekombinant kimozinin hücre dışına ekspresyonu yalnızca  $\alpha$ -MF sinyal sekansı taşıyan pPICZ $\alpha$ A ile gerçekleştirilmiştir. PIR1, HSA ve PHO sinyal sekansları taşıyan pPICZB ekspresyon vektörleri ile başarı sağlanamamıştır. Oluşturulan rekombinant pilazmid pPICZ $\alpha$ AYAK olarak adlandırılmıştır

Konakçı olarak *P. pastoris* X-33 ve GS115(PDI) suşları seçilmiştir. Protein ekspresyonu sonrası alınan sonuçlara göre *P. pastoris* GS115(PDI) suşunun üretim için daha verimli olduğuna karar verilmiştir.

En iyi üretici klonu bulabilmek için deneyler önce engelli erlenlerde gerçekleştirilmiş ardından seçilen klon ile fermentör seviyesinde devam ettirilmiştir. Fermentasyon sonucu elde edilen süpernatantın kısmi karakterizasyonu yapılmıştır. Süpernatantların SDS-PAGE analizine göre kimozin enzimine ait protein bandı 49 kDa büyüklüğündedir (Şekil 4.13). Fermentasyon koşullarında yapılan ekspresyonun sonunda (90. Saat) ulaşılan protein miktarı 175 mg/L'dir. Fermentörde üretilen rekombinant kimozinin aktivitesi 60. saatten sonra önemli bir değişiklik göstermemiştir. 90 saat boyunca yapılan rekombinant Tibet öküzü kimozinini üretimi sonunda, enzimin sütü pıhtılaştırma gücü 93 IMCU/ml olarak hesaplanmıştır.

Rekombinant Tibet öküzü kimozininin aktivite gösterdiği optimum sıcaklık 50°C optimum pH 4.0'tür. Maksimum (%100) stabil kalabildiği sıcaklık 20°C iken 60°C'de stabilitesini tamamen kaybetmiştir. Rekombinant Tibet öküzü kimozin enzimi pH 4.0-8.0 arasında maksimum stabil kalmış, pH 9.0' da stabilitesi %80 azalmıştır.

**7. KAYNAKÇA**

- ATTALLAH, A. 2007. Characters of chymosin gene isolated from different animal sources at molecular level. *J. Appl. Sci. Res.*, 3: 904-907.
- BARRET, A. J., Rawlings, N. D., Woessner, J. F. 2004. Chymosin: Handbook of Proteolytic Enzymes, pp. 29-30. Elsevier Academic Press.
- BENNETT, J.W. and Baker, S.E. 2010. An Overview of the Genus *Aspergillus*. CNR Press, London, 238 p.
- BERG, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L. 2002. Primary structure: Amino acids are linked by peptide bonds to form polypeptide chains. WH Freeman , New York.
- ÇELİK, E. ve Çalık, P. 2012. Production of recombinant proteins by yeast cells. *Biotechnology Advances*, 30(5):1108-1118.
- CEREGHINO, G.P., Cereghino, J.L., Ilgen, C. and Cregg, J.M. 2002. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Current opinion in Biotech*, 13(4): 329-332.
- CEREGHINO, G. P., Starka, C. M., Kima, D. 2013. The Effect of  $\alpha$ -mating factor Secretion Signal Mutations on Recombinant protein Expression in *Pichia pastoris*. *Gene*, 519(2): 311-317.
- CHITPINITYOL, S., and Crabbe, M.J. 1997. Chymosin and aspartic proteinases. *Food Chemistry*, 61: 395-418.
- CHRISTIAN, J. 2006. Production of Humanlike Recombinant Proteins in *Pichia pastoris*. *BioProcess*, 22-30.
- CREGG, J.M., Careghino, L.J., Shi, J. and Higgins, D.R. 2000. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol. Biotechnol.*, 16: 23-52.
- CREGG, J.M. 2007. *Pichia* Protocols. Humana Press Inc, New Jersey, 261s.
- EL-SOHAIMY, S., Hafez, E.E. and El-Saadani, M. 2010. Cloning and In Vitro-Transcription of Chymosin Gene in *E. coli*. *The Open Nutraceuticals Journal*, 3: 63-68.
- FOX, P. 2004. CHEESE Chemistry, Phisics, and Microbiology. Elsevier Academic Press, pp. 21-30, London.
- GAUCHERON, F. 2005. The minerals of milk. *EDP Sciences*, 45(4): 472-483.

- GILLILAND, G.L., Winborne, E.L. “Three Dimensiona Structure of Recombinant Bovine Chymosin at 23 Angstroms Resolution”,  
<http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1cms>  
13.07.2011
- INAN, M., Aryasomayajula, D., Sinha, J. ve Meagher, M.M. 2006. Enhancement of Protein Secretion in *Pichia pastoris* by Overexpression of Protein Disulfide Isomerase. *Biotechnol Bioeng*, 93(4): 771-8
- JENSEN, J.L., Mølgaard, A., Poulsen, J.C.N., Harboe, M.K., Simonsen, J.B., Lorentzen, A.M., et al. 2013. Camel and bovine chymosin the relationship between their structures and cheese-making properties. *Biological Crystallography*, 69: 901-913.
- JIANG, X., Yin, M., Chen, P. and Yang, Q. 2012. Constitutive expression, purification and characterization of bovine prochymosin in *Pichia pastoris* GS115. *World J. Microbiol Biotechnol*, 28(5): 2087-2093.
- KAPPELER, S. R., Van den Brink, H. M., Rahbek-Nielsen, H.; Farah, Z., Puhan, Z., Hansen, E. B., Johansen, E. 2006. Characterization of recombinant camel chymosin reveals superior properties for the coagulation of bovine and camel milk. *Biochem Biophys Res Commun*, 342(2): 647-654
- KUMAR, A., Grover, S., Sharma, J. and Batish, V. 2010. Chymosin and other milk coagulants: sources and biotechnological interventions. *Critical Reviews in Biotechnology*, 30(4): 243-258.
- MACAULEY-PATRICK, S., Fazenda, M.L., McNeil, B. and Harvey, L.M. 2005. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*, 22(4): 249-270.
- MENZELLA, H.G. 2011. Comparison of two codon optimization strategies to enhance recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact*, 10(1): 1475-2859.
- MOHANTY, A., Mukhopahyay U.K., Grover, S. and Batish V.K., 1999. Bovine chymosin: Production by rDNA technology and. *Biotechnology Advances*, 17(2-3): 205-217.
- OLEMPSKA-BEER, Z.S., Merker, R.I., Ditto, M.D. and DiNovi, M.J. 2006. Food-processing enzymes from recombinant microorganisms. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 45(2): 144-158.
- RAO, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S, Deshpande V. V. 1998. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial proteases. *Microbial and Molecular Biology Reviews*, 10: 597-635

- ROSANO, G. and Ceccarelli, E. 2014. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbial*, 5: 7-23
- SARAH, J., Routledge, L.M. ET AL. 2016. the synthesis of recombinant membrane proteins in yeast for structural studies. *Integrated Structural Biology*, 95: 26-37.
- SCHUSTER, E., Dunn-Coleman, N., Frisvad, J.C., and van Dijck, P.W. 2002. On the safety of *Aspergillus niger*– a review. *Appl. Microbial Biotechnol*, 59: 426-435.
- SEBASTIAN, C., Spohnner, H.M., Müller, H., Quitmann, H. and Czermak, P. 2015. Expression of enzymes for the usage in food and feed industry with *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology*, 202: 118-135.
- SZECSI, P. B., & Harboe, M. 2013. Handbook of Proteolytic Enzymes (3rd Edition). Academic Press, London, 4104p.
- ANONIM. 2012. The Recombinant protein Handbook. Amersham Pharmacia Biotech. 112p
- LOOSER, V., Bruhlmann, B., Bumbak, F. et al. 2015. Cultivation strategies to enhance productivity of *Pichia pastoris*: A review. *Biotechnology Advances*, 33(6): 1177-1193.
- VALLEJO, J.A., Ageitos, J.M., Poza, M., and Villa, T.G. 2008. Cloning and Expression of Buffalo Active Chymosin in *Pichia pastoris*. *J. Agric. Food Chem.*, 56: 10606-10610.
- VAN OUYEN, A.J.J., Dekker, P., Huang, M. et al. 2006. Heterologous protein production in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *FEMs Yeast Research*, 6(3): 381-392.
- VEGA-HERNÁNDEZ, M., Gómez-Coello, A., Villar, J., and Claverie-Martín, F. 2004. Molecular cloning and expression in yeast of caprine prochymosin. *Journal of Biotechnology*, 114(1-2): 69-79.

## 8. EKLER

## Ek 1. Tibet öküzü prokimozin gen sekansı ve aa dizilimi

Total amino acid number: 368, MW=40805

Max ORF starts at AA pos 1(may be DNA pos 1) for 367 AA(1101 bases), MW=40718

```

10 20 30 40 50 60
1 GAATTTCGAGAAATCACCAGAAATCCCATTTGTATAAGGGTAAATCACTTAGAAAGGCATTG
1 E F A E I T R I P L Y K G K S L R K A L

70 80 90 100 110 120
61 AAGGAGCACGGTTTGTGGAAAGACTTTTGCAGAAGCAACAGTATGGTATTTCTTCCAAA
21 K E H G L L E D F L Q K Q Q Y G I S S K

130 140 150 160 170 180
121 TACTCGGTTTTGGAGAAGTTGCATCCGTCCTTACAACTACCTTGACTCTCAATAT
41 Y S G F G E V A S V P L T N Y L D S Q Y

190 200 210 220 230 240
181 TTCGGTAAAATCTACTTGGGTACCCACCTCAGGAGTTTACAGTCTTTTCGACACCGGT
61 F G K I Y L G T P P Q E F T V L F D T G

250 260 270 280 290 300
241 TCAAGTGATTTTGGGTTCTCTATCTATTGTAAGTCCAACGCTTGCAAGAACCATCAA
81 S S D F W V P S I Y C K S N A C K N H Q

310 320 330 340 350 360
301 AGATTCGATCCAAGAAAGTCTCCACCTCCAGAAGTGGGAAAACCTCTTCAATTAC
101 R F D P R K S S T F Q N L G K P L S I H

370 380 390 400 410 420
361 TATGGTACTGGAAGTATGCAAGTATCTTGGGATACGACACTGTCACAGTTTCAAATATT
121 Y G T G S M Q G I L G Y D T V T V S N I

430 440 450 460 470 480
421 GTTGATATCCAACAGACTGTCGGTTGTCTACACAAGAACCAGGAGACGTTTTTACTTAC
141 V D I Q Q T V G L S T Q E P G D V F T Y

490 500 510 520 530 540
481 GCCGAGTTCGATGGTATTTGGGAATGGCATATCCATCTTGTCTCCGAATACTCAATC
161 A E F D G I L G M A Y P S L A S E Y S I

550 560 570 580 590 600
541 CCTGTTTCGATAACATGATGAACAGACATTTGGTTGCTCAAGACCTTTTCTGTCTAT
181 P V F D N M M N R H L V A Q D L F S V Y

610 620 630 640 650 660
601 ATGGATAGAAACGGTCAGGAGTCCATGTTGACTCTGGAGCCATTGACCCATCATACTAT
201 M D R N G Q E S M L T L G A I D P S Y Y

670 680 690 700 710 720
661 ACTGGTAGTTTGCACCTGGGTCCTGTTCAGTCCAACAGTACTGGCAATTCAGTGTGAT
221 T G S L H W V P V T V Q Q Y W Q F T V D

730 740 750 760 770 780
721 TCCGTCACTATTGGTGGAGTTGCGTTGCCTGTGAAGGTGGATGCCAAGCAATCTTGGAC
241 S V T I G G V V V A C E G G C Q A I L D

790 800 810 820 830 840
781 ACCGGTACTTCTAAACTTGTGGACCATCAAGTGATATTTGAACATCCAACAGGCTATT
261 T G T S K L V G P S S D I L N I Q Q A I

850 860 870 880 890 900
841 GGTGCCACTCAAACCAGTACGATGAATTTGATATCGACTGTGATAACTGTCTTACATG
281 G A T Q N Q Y D E F D I D C D N L S Y M

910 920 930 940 950 960
901 CCTACAGTCGTTTTTCGAGATTAATGGAAAGATGTATCCACTTACACCTAGTGCTTACACC
301 P T V V F E I N G K M Y P L T P S A Y T

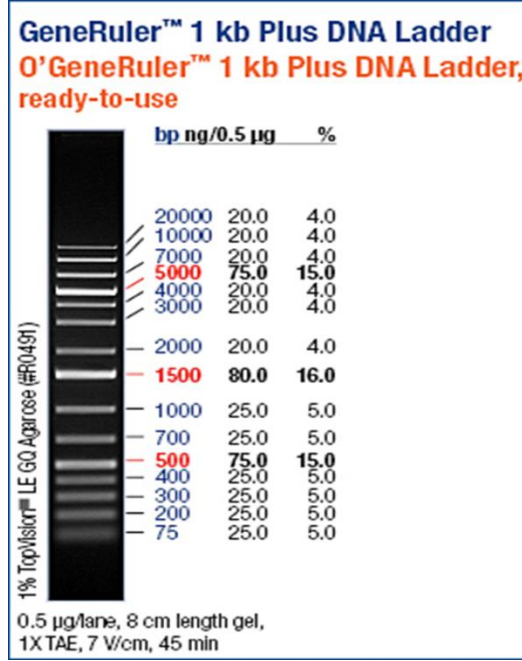
970 980 990 1000 1010 1020
961 TCTCAAGACCAGGTTTTTGCACCTCCGGATTCCAATCAGAGAATCATAGTCAGAAATGG
321 S Q D Q G F C T S G F Q S E N H S Q K W

1030 1040 1050 1060 1070 1080
1021 ATTTTGGGAGATTTTTTCATCAGAGAATACTACTCAGTTTTTGACAGAGCTAATAATCTT
341 I L G D V F I R E Y Y S V F D R A N N L

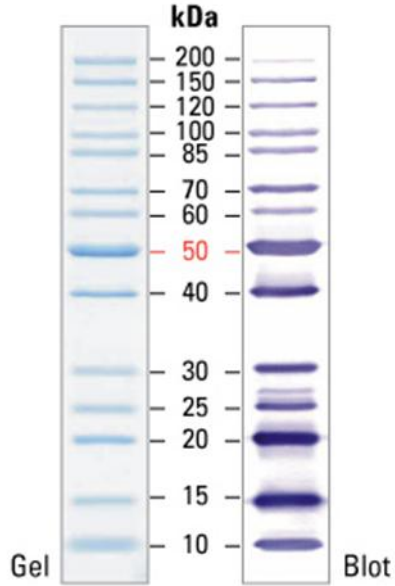
1090 1100 1110
1081 GTTGGTCTTGCTAAAGCCATCAATCTAGA
361 V G L A K A I * S R

```

## Ek 2. Çalışmada kullanılan DNA ve protein standartları



Agaroz jel elektroforezinde kullanılan DNA standardı: O'GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD)



SDS-PAGE analizinde kullanılan protein standardı: PageRuler Unstained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD)

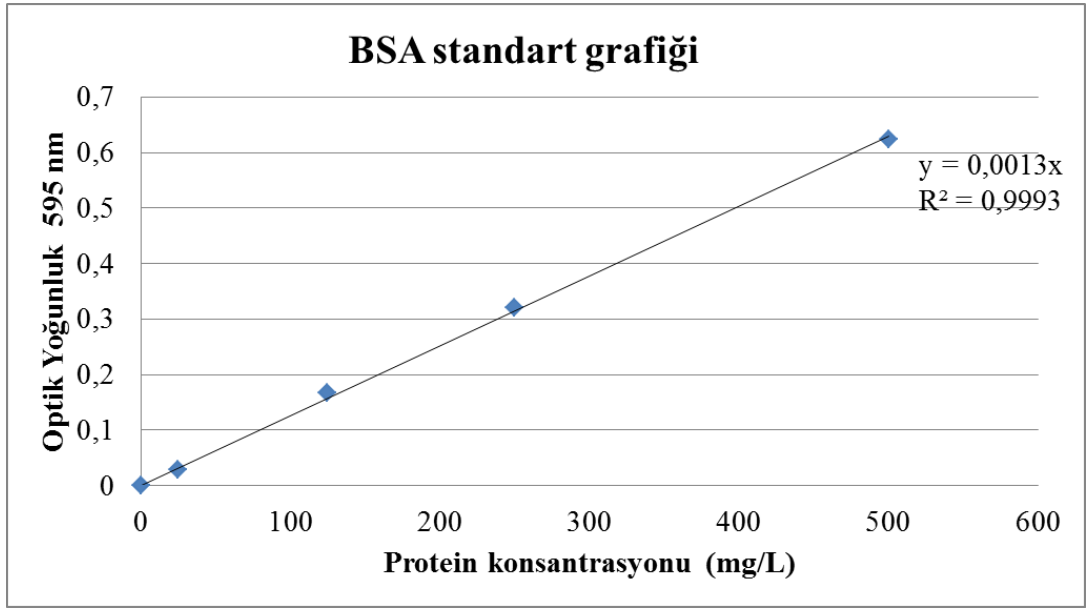


Ek 2'nin devamı. Çalışmada kullanılan DNA ve protein standartları.



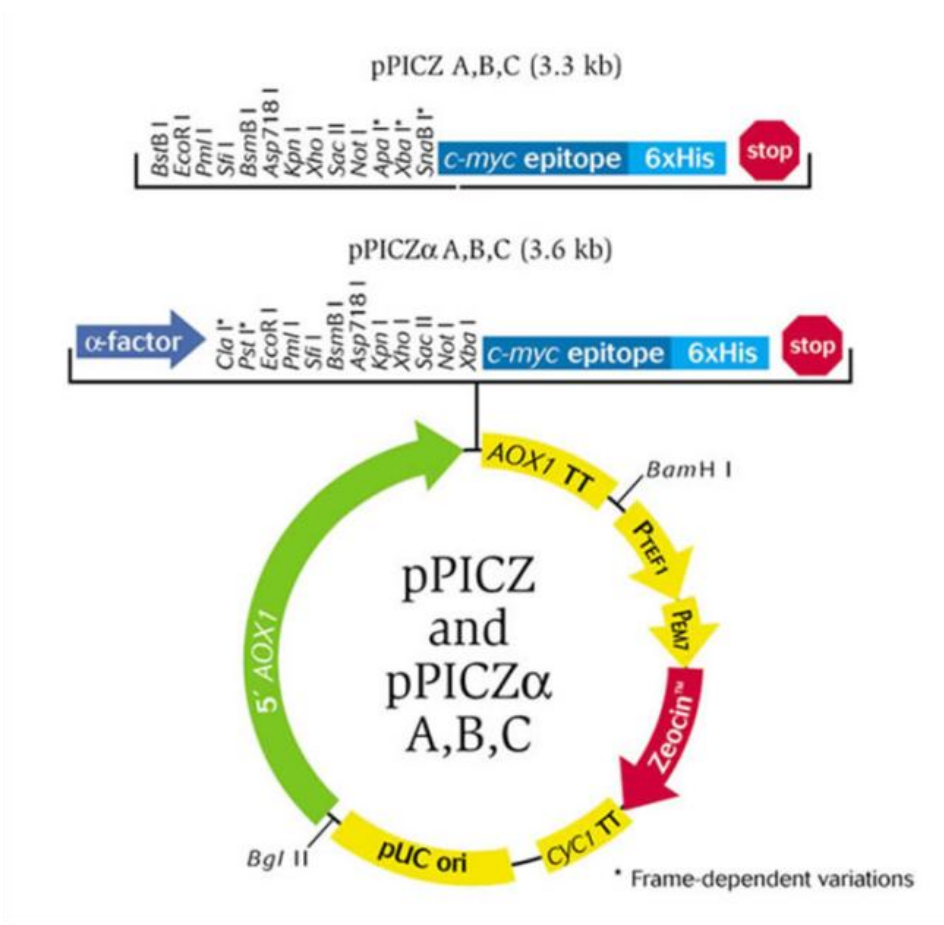
Western blot analizinde kullanılan protein standardı: Odyssey Protein Molecular Weight Marker (Li-Cor, NE, ABD)

Ek 3. Toplam protein tayini standart grafiği



Toplam protein tayini için farklı konsantrasyonlardaki BSA standardının 595 nm absorbans değerleri ile çizilmiş standart grafiği.

**Ek 4. pPICZ ve pPICZ $\alpha$  vektörlerinin şematik gösterimi**



## ÖZGEÇMİŞ



Özge Adıgüzel 1990 yılında Antalya’da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Antalya’da tamamladı. 2008 senesinde %100 YÖK burslu olarak kazandığı Yeditepe Üniversitesinden 2013 senesinde Gıda Mühendisi olarak mezun oldu. 2013 yılının Eylül ayında Akdeniz Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında Yüksek Lisans öğrenimine başladı.