

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



Aspergillus niger α -AMİLAZ ENZİMİNİN *Pichia pastoris*'te REKOMBİNANT
ÜRETİMİ

Fatmanur MAVİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

AĞUSTOS 2024

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



Aspergillus niger α -AMİLAZ ENZİMİNİN *Pichia pastoris*'te REKOMBİNANT
ÜRETİMİ

Fatmanur MAVİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

AĞUSTOS 2024

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Aspergillus niger α -AMİLAZ ENZİMİNİN *Pichia pastoris*'te REKOMBİNANT
ÜRETİMİ

Fatmanur Mavi

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez
Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 222O454
nolu proje ile desteklenmiştir.

AĞUSTOS 2024

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Aspergillus niger α -AMİLAZ ENZİMİNİN *Pichia pastoris*'te REKOMBİNANT
ÜRETİMİ

Fatmanur MAVİ

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 02/08/2024 tarihinde jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Aysun ÖZÇELİK

Doç. Dr. Münevver AKSOY

Doç. Dr. Aslıhan KURT KIZILDOĞAN

ÖZET

Aspergillus niger α -AMİLAZ ENZİMİNİN *Pichia pastoris*'te REKOMBİNANT ÜRETİMİ

Fatmanur Mavi

Yüksek Lisans Tezi, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Aysun ÖZÇELİK

Ağustos 2024; 45 sayfa

Amilaz enzimi nişastanın parçalanmasını kataliz eder. α -amilaz enzimleri α -1,4 glikozidik bağı üzerine etki ederler. Gıda endüstrisinde fırıncılık ve meyve suyu üretimi başta olmak üzere, deterjan, tekstil ve kağıt endüstrisi gibi alanlarda amilazların kullanımı oldukça yaygındır. Endüstriyel alanda bu kadar çok kullanımı olan enzimlerin rekombinant üretimi son yıllarda çok çalışılan bir konu olmuştur. *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) metilotrofik bir maya olup, rekombinant protein üretiminde başarılı bir şekilde kullanılan bir ekspresyon sistemidir. İndüklenebilen promotorlarının olması, ökaryotik proteinler için gerekli olan post-translasyonel modifikasyonları yapabilmesi, çok ucuz üreme ortamlarında gelişebilmesi ve çok yüksek hücre yoğunluklarına çıkabilmesi *P. pastoris*'in avantajları olarak sayılabilir.

Bu çalışmada, *Aspergillus niger* (*A. niger*) α -amilaz enziminin üretimi ilk kez *P. pastoris*'te etanol ile indüklenebilen SNT5 promotoru kontrolü altında yapılmıştır. Bu amaçla kodon optimize şekilde temin edilen *A. niger* α -amilaz geni *P. pastoris* MK115-PDI suşuna transforme edilmiştir. Zeosin antibiyotiği içeren plakalardan seçilen transformant *Pichia* hücreleriyle engelli erlenlerde 28 °C sıcaklık, pH 6.0 ve 225 rpm karıştırma hızında protein ekspresyonu yapılmıştır. Yapılan SDS-PAGE analizi sonucunda 58kDa büyüklüğünde α -amilaz enzimini ürettiği tespit edilen klon ile optimum protein üretim koşulları belirlenmiştir. Bu amaçla engelli erlenlerde farklı sıcaklık (20, 24 ve 28 °C) ve farklı pH (3, 4, 5, 6 ve 7) koşullarında protein üretimi yapılmış ve alınan örnekler analiz edilmiştir. 24 °C sıcaklık pH 6 ve pH 7'de yapılan üretimlerde sırasıyla 3349 U/mL ve 4519 U/mL enzim aktivitesi elde edilmiştir.

α -amilaz enzimi üretimi 5L biyoreaktörde iki aşamalı fermantasyon stratejisi ile gerçekleştirilmiştir. Fermantasyon 24 °C sıcaklık, pH 6 ve çözünmüş oksijen seviyesi %20'de sabit tutularak 107 saat sürdürülmüştür. Fermantasyon sonunda en yüksek 65. saatte 2223 mg/L protein üretilmiş ve 44062 U/mL enzim aktivitesi hesaplanmıştır. Üretilen enzim karakterize edilmiş ve optimum çalışma sıcaklığı 60 °C ve pH'sı 7 olarak belirlenmiştir.

Bu tez çalışması sonucunda, *A. niger* α -amilaz enziminin *P. pastoris* MK115-PDI suşunda etanol ile indüklenebilen SNT5 promotoru kontrolünde üretimi yapılmış ve endüstriyel boyutta üretimi için veriler elde edilmiştir.

ANAHTAR KELİMELELER: α -Amilaz, *Pichia pastoris*, Rekombinant enzim, SNT5

JÜRİ:

Doç. Dr. Aysun ÖZÇELİK

Doç. Dr. Münevver AKSOY

Doç. Dr. Aslıhan KURT KIZILDOĞAN



ABSTRACT

RECOMBINANT PRODUCTION of *Aspergillus niger* α -AMYLASE ENZYME IN *Pichia pastoris*

Fatmanur Mavi

MSc Thesis in Agricultural Biotechnology

Supervisor: Doç. Dr. Aysun ÖZÇELİK

August 2024; 45 pages

Amylase enzyme catalyzes the breakdown of starch. α -amylase enzymes act on the α -1,4 glycosidic bond. The use of amylases is quite common in areas such as baking and fruit juice production in the food industry, detergent, textile and paper industries. Recombinant production of enzymes, which have so many uses in the industrial field, has been a subject of much study in recent years. *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) is a methylotrophic yeast and has been successfully used in recombinant protein production as an expression system. The advantages of *P. pastoris* include having inducible promoters, to make post-translational modifications required for eukaryotic proteins, to grow in very cheap growth media, and to reach very high cell densities.

In this study, the production of *Aspergillus niger* (*A. niger*) α -amylase enzyme was carried out for the first time in *P. pastoris* under the control of the ethanol-inducible SNT5 promoter. For this purpose, the *A. niger* α -amylase gene, which was provided in a codon-optimized form, was transformed into the *P. pastoris* MK115-PDI strain. Protein expression was performed with transformant *Pichia* cells selected from plates containing the antibiotic zeocin in shake flasks at 28 °C temperature, pH 6.0 and 225 rpm. As a result of the SDS-PAGE analysis, optimum protein production conditions were determined with the clone that was found to produce the 58kDa α -amylase enzyme. For this purpose, protein was produced in shake flasks under different temperature (20, 24 and 28 °C) and different pH (3, 4, 5, 6 and 7) conditions and the samples taken were analyzed. In the productions carried out at 24 °C temperature, pH 6 and pH 7, enzyme activity of 3349 U/mL and 4519 U/mL was obtained, respectively.

α -amylase enzyme production was carried out with a two-stage fermentation strategy in a 5L bioreactor. Fermentation was continued for 107 hours by keeping the temperature at 24 °C, pH 6 and dissolved oxygen level at 20%. At the end of fermentation, 2223 mg/L protein was produced and 44062 U/mL enzyme activity was calculated. The produced enzyme was characterized and the optimum working temperature was determined as 60 °C and pH 7.

As a result of this thesis study, *A. niger* α -amylase enzyme was produced in *P. pastoris* MK115-PDI strain under the control of the ethanol-inducible SNT5 promoter and data was obtained for its industrial production.

KEYWORDS: α -Amylase, *Pichia pastoris*, Recombinant enzyme, SNT5

COMMITTEE: Assoc.Prof. Dr. Aysun ÖZÇELİK

Assoc. Prof. Dr. Münevver AKSOY

Assoc. Prof. Dr. Aslıhan KURT KIZILDOĞAN

ÖNSÖZ

Lisans eğitimimi Tarımsal Biyoteknoloji alanında yapmış olmama rağmen Moleküler Biyoloji ve Genetik her zaman ilgimi çeken, üzerine çalışmalar yapmak istediğim bir alan olmuştur. Bu nedenle bu alanın bir parçası olmak istediğime karar verdim. Çalışmalarımı gerçekleştirirken, değerli bilgilerini benimle paylaşan, kendisine ne zaman danışsam bana kıymetli zamanını ayırıp sabırla ve büyük bir ilgiyle bana faydalı olabilmek için elinden gelenden fazlasını sunan, her sorun yaşadığımda yanına çekinmeden gidebildiğim, güler yüzünü ve samimiyetini benden esirgemeyen kıymetli danışmanım Doç. Dr. Aysun ÖZÇELİK hocama sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Her aradığım da kıymetli zamanını ayırıp bıkmadan sorularımı cevaplayan, yönlendirmeleriyle bana rehberlik eden, değerli hocam Dr. Fatma ERSÖZ'e ve yine çalışmamda bana sürekli yardımda bulunarak yol gösteren ve gelecekteki hayatında çok daha başarılı olacağına inandığım kıymetli arkadaşım Ayça URAS'a teşekkür ederim.

Lisans hayatımdan beri desteğiyle bana güç veren canım dostum Ekin Ezgi ŞAHİN'e, hayatımın her anında benimle birlikte olan, desteğini hep üzerimde hissettiğim canım kuzenim Ayşe Arzu AKKAN'a çok teşekkür ederim.

Hayatımdaki şanslarım canım annem SARIYE MAVİ, canım babam Hasan MAVİ ve biricik abim Mehmet Tahir Mavi'ye her zaman yanımda oldukları için teşekkürü borç bilirim.

Projeye verdiği destekten dolayı Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu'na teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
AKADEMİK BEYAN.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI	3
2.1. Enzimler	3
2.2. Amilazlar	3
2.3. Substrat olarak nişasta	5
2.4. Amilaz enziminin kullanım alanları	6
2.4.1. Nişasta dönüşümü	7
2.4.2. Deterjan endüstrisi	7
2.4.3. Yakıt alkol üretimi	8
2.4.4. Gıda endüstrisi	8
2.4.5. Tekstil endüstrisi	8
2.5. <i>Aspergillus niger</i> α -amilaz geni.....	9
2.6. Ekspresyon sistemi olarak <i>Pichia pastoris</i>	10
3. MATERYAL VE METOT	12
3.1. Materyal	12
3.1.1. Gen Kaynağı.....	12
3.1.2. Suşlar ve plazmitler	12
3.1.3. Besiyerleri ve antibiyotikler	12
3.2. Metot	12
3.2.1. Liyofilize şekilde gelen plazmid DNA'nın hazırlanması	12
3.2.2. <i>E. coli</i> NEB5 α hücrelerinin transformasyona yetenekli hale getirilmesi.....	13
3.2.3. <i>P. pastoris</i> MK115-PDI hücrelerinin transformasyona yetenekli. hale getirilmesi.....	13
3.2.4. pUC57-AnAMY plazmidinin <i>E. coli</i> NEB5 α hücrelerine transformasyonu.	13

3.2.5. pSNT5 α vektörünün ve amilaz genini taşıyan pUC57 plazmid DNA'sının izolasyonu	14
3.2.6. Ligasyon için pSNT5 α vektörünün ve <i>Aspergillus niger</i> α -amilaz geninin jelden kesilmesi ve saflaştırılması.....	14
3.2.7. α -amilaz geninin pSNT5 α vektörüne ligasyonu ve pSNT5- α -Amilaz ekspresyon vektörünün <i>E. coli</i> NEB5 α hücrelerine transformasyonu	15
3.2.8 pSNT5 α -AnAMY ekspresyon vektörünün restriksiyon enzimleriyle doğrulanması	16
3.2.9 pSNT5 α -AnAMY ekspresyon vektörünün lineer hale getirilmesi ve <i>P. pastoris</i> MK115-PDI suşuna transformasyonu	16
3.2.10 Engelli erlenmayer ölçeğinde α -amilaz enzimi üretimi.....	16
3.2.11. Toplam protein ölçümü	17
3.2.12 α -amilaz enzim aktivitesinin ölçümü.....	17
3.2.13. Lugol çözeltisi kullanılarak ME+nişasta agar plakalarındaki kolonilerden α -amilaz salgılanmasının görüntülenmesi	17
3.2.14. SDS-PAGE analizi	18
3.2.15 EndoHf enzimi muamelesi.....	18
3.2.16. 5L hacimli biyoreaktörde α -amilaz enzimi üretimi	18
3.2.17. Enzimin karakterizasyonu.....	19
4. BULGULAR	20
4.1. pUC57-AnAMY vektörünün <i>E. coli</i> hücrelerine transformasyonu ve doğrulanması.....	20
4.2. pSNT5 α vektörünün ve AnAMY genine ait DNA parçasının jelden ekstraksiyonu.....	21
4.3. pSNT5 α -AnAMY ekspresyon vektörünün oluşturulması ve restriksiyon analizi ile doğrulanması.....	22
4.4. pSNT5 α -AnAMY ekspresyon vektörünün lineer hale getirilmesi ve <i>P. pastoris</i> MK115-PDI suşuna transformasyonu.....	24
4.5. Engelli Erlenmayer Ölçeğinde α -Amilaz Üretimi	25
4.6. Lugol çözeltisi ile klonların α -amilaz üretiminin kontrolü.....	25
4.7. α -amilaz üretim koşullarının optimizasyonu	26
4.8. α -Amilaz enziminin EndoHf ile deglikozilasyonu.....	28
4.9. Biyoreaktörde α -amilaz enzimi üretimi	29
4.10. Rekombinant α -amilaz enziminin biyokimyasal karakterizasyonu	31
5. TARTIŞMA	32
6. SONUÇLAR	35

7. KAYNAKLAR.....	36
8. EKLER.....	41
ÖZGEÇMİŞ	



AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*Aspergillus niger* α -amilaz enziminin *Pichia pastoris*’te rekombinant üretimi” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

02/08/2024

Fatmanur MAVİ

İmza

[Faint, stylized signature watermark]

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

a	: Ağırlık
bç	: Baz çifti
dk	: Dakika
g	: Gram
xg	: Göreceli santrifüj kuvveti
h	: Hacim
kDa	: Kilo dalton
l	: Litre
m	: Mili, Metre
M	: Molar
n	: Nano (10 ⁻⁹)
OD	: Optik yoğunluk
rpm	: Devir/dakika
sa	: Saat
s	: Saniye
T _m	: Çözülme sıcaklığı
U	: Ünite
V	: Volt
μ	: Mikro

Kısaltmalar

BSA	: Bovine serum albümin
BMGY	: Tamponlanmış kompleks gliserol besiyeri
BMEY	: Tamponlanmış kompleks etanol besiyeri
ÇO	: Çözünmüş oksijen
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DNSA	: Dinitro salisilik Asit
DTT	: Dithiothreitol
LB	: Luria-Bertani besiyeri
LiAc	: Lityum asetat
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
PDI	: Protein disülfid izomeraz

SDS	: Sodyum dodesil sülfat
TAE	: Tris-asetat-EDTA
TGS	: Tris-Glisin-EDTA
Yha	: Yaş hücre ağırlığı
YNB	: Maya azot kaynağı
YPD	: Maya özütü pepton dekstroz



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1. Nişastanın amilaz ve diğer enzimler tarafından parçalanması	4
Şekil 2. 2. Nişasta molekülü	6
Şekil 2. 3. Amilaz enziminin endüstriyel uygulamaları.....	7
Şekil 2.4. <i>Aspergillus niger</i> α -amilaz proteininin sekansı.....	9
Şekil 3. 1. pSNT5 α -AnAMY ekspresyon vektörünün haritası.....	15
Şekil 4.1. pUC57-AnAMY vektörünün yetenekli <i>E. coli</i> NEB5 α hücrelerine transformasyonu.....	20
Şekil 4. 2. pUC57-AnAMY plazmitlerinin <i>XhoI</i> ve <i>NotI</i> restriksiyon enzimleri ile kesimi.....	21
Şekil 4. 3. Vektör ve insert parçalarının agaroz jelden kesilmesi	21
Şekil 4. 4. pSNT5 α -AnAMY ekspresyon vektörünün yetenekli <i>E. coli</i> NEB5 α hücrelerine transformasyonu sonucu zeosinli plakalarda gelişen koloniler.....	22
Şekil 4.5. pSNT5 α -AnAMY ekspresyon vektörünün <i>XhoI</i> ve <i>NotI</i> restriksiyon enzimleriyle doğrulanması.....	23
Şekil 4. 6. pSNT5 α -AnAMY ekspresyon vektörünün <i>BsiWI</i> , <i>AdeI</i> , <i>Eco32I</i> , <i>HindIII</i> - <i>ScaI</i> enzimleriyle doğrulanması.....	23
Şekil 4.7. <i>BsiWI</i> restriksiyon enzimiyle lineer edilen pSNT5 α -AnAMY ekspresyon vektörünün agaroz jel görüntüsü.....	24
Şekil 4. 8. Lineer edilen pSNT5 α -AnAMY ekspresyon vektörünün <i>P. pastoris</i> MK115-PDI hücrelerine transformasyonu.....	24
Şekil 4. 9. Çalkalamalı inkübatörde engelli erlenlerde α -amilaz enzimi üretimi.....	25
Şekil 4. 10. α -amilaz enzimi üretimi için klonların taranması	25
Şekil 4. 11. α -amilaz ekspresyonunun (a) etanol ilaveli plakalara ekilmesi (b) lugol çözeltisi ile ME+nişasta agar plakalarda tespit edilmesi.	26
Şekil 4. 12. <i>P. pastoris</i> #2 klonunun farklı pH'larda (pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 ve 7.0) α -amilaz enzimi üretimi.....	26
Şekil 4. 13. <i>P. pastoris</i> #2 klonunun (a) pH 6.0'da farklı sıcaklıklarda (20°C, 24°C, 28°C) (b) pH 7.0'de farklı sıcaklıklarda (20°C, 24°C, 28°C) α -amilaz enzimi üretimi...	27
Şekil 4. 14. <i>P. pastoris</i> #2 klonunun a) pH 6.0'da farklı sıcaklıklarda (20°C, 24°C, 28°C) b) pH 7.0'de farklı sıcaklıklarda (20°C, 24°C, 28°C) toplam protein ve α -amilaz enzim aktivitesi.	27
Şekil 4. 15. <i>P. pastoris</i> #2 klonunun 24°C sıcaklık ve farklı pH'larda (3.0, 4.0, 5.0, 6.0 ve 7.0) α -amilaz enzimi üretiminin SDS-PAGE görüntüsü.	28
Şekil 4. 16 α -Amilaz enziminin <i>EndoHf</i> ile deglikozilasyonunun SDS-PAGE görüntüsü.....	28
Şekil 4. 17. Çalışmadaki fermentasyonların gerçekleştirildiği Biostat B biyoreaktörü...29	

Şekil 4. 18. İki aşamalı fermantasyon boyunca hücre gelişimi.....	29
Şekil 4. 19. 5L'lik biyoreaktörde SNT5 promotörü kontrolü altında yapılan rekombinant α -amilaz ekspresyonunun toplam protein miktarı ve enzim aktivitesi	30
Şekil 4. 20. 5L'lik biyoreaktörde SNT5 promotörü kontrolü altında yapılan rekombinant α -amilaz ekspresyonunun SDS-PAGE analizi.	30
Şekil 4. 21. Sıcaklık ve pH'nın α -amilaz enziminin aktivitesi ve stabilitesi üzerine etkileri.	31



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2. 1. Amilaz enziminin <i>Pichia pastoris</i> 'te üretildiği çalışmalar	9
Çizelge 3.1. Restriksiyon enzimleri ile Plazmid DNA'nın kesim reaksiyonu.....	15



1. GİRİŞ

Enzimlerin geçmişine bakıldığında ilk olarak antik dönemlerde kullanılmaya başlandığı tahmin edilmektedir. Enzimler yüzyıllardır mayalı ekmek, peynir, alkollü içecek ve sirke gibi gıda ürünlerinin üretiminin yanı sıra tekstil ürünlerinde ve derinin işlenmesinde kullanılmaktadır. Ancak son yüzyılda biyoteknolojik yöntemlerin gelişmesi ve modern üretim tekniklerinin kullanılmaya başlanmasıyla birlikte enzim endüstrisi önemli ölçüde gelişmiştir. Bu nedenle endüstriyel öneme sahip enzimlerin daha saf, daha çok miktarda ve daha ucuza üretilmesine yönelik çalışmalar her geçen gün artmaktadır. Şu anda tanımlanan 2.500'den fazla enzimin yaklaşık %10'u çeşitli endüstriyel sektörlerde ticari olarak kullanılmaktadır. Bu enzimlerin %29'u gıda endüstrisinde, %15'i hayvan yemlerinde, %56'sı deterjan, farmakoloji, alkol üretimi ve tekstil gibi diğer endüstri alanlarında kullanılmaktadır (Kirk ve ark., 2002; Özcan, 2005).

Enzimler bitkiler, hayvanlar, bakteriler ve mantarlar da dahil olmak üzere birçok canlı organizma tarafından üretilir (Fidancı; Demirkan, 2009; Lee, 1996). Bitki ve hayvanlar tarafından üretilen enzimlerin pahalı ve az miktarlarda olması, üretilen enzimlerin endüstriyel kullanıma uygun olmaması nedeniyle mikrobiyal enzimlere olan ilgi artmaktadır. Mikroorganizmalar, biyokimyasal çeşitlilikleri ve genetik değişikliklere yatkınlıkları nedeniyle büyük enzim deposu olarak kabul edilir. Bu nedenle son yıllarda sanayide kullanılan enzimlerin yaklaşık %90'ı mikroorganizmalar tarafından üretilmektedir (Rao ve ark., 1998; Wolfgang, 2004). Ayrıca, mikrobiyal kaynaklı enzimler, bitki ve hayvanlardan elde edilen enzimlerle kıyaslandığında çok daha güçlü katalitik aktiviteye sahiptir, daha stabildir, daha ucuz yollarla ve yüksek miktarlarda elde edilebilirler (Zeman ve Mccrea, 1985). Enzim üretiminin çoğunluğunu mikroorganizmaların oluşturması, üretimi arttırmak için modifiye edilmiş mikroorganizmaların kullanımını gündeme getirmiştir.

Günümüzde genetik mühendisliği teknikleri kullanılarak rekombinant protein üretimiyle yüksek miktarda ve saf formda enzim üretmek mümkün hale gelmiştir. Endüstriyel üretimde kullanılan enzimlere çok yüksek miktarlarda ihtiyaç duyulmaktadır. Doğal yollardan bir enzimin elde edilmesiyle, rekombinant protein üretimi ile enzim elde edilmesini kıyaslayacak olursak biyoteknolojik yöntemlerle daha ucuza daha fazla enzim üretilebileceği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Dolayısıyla endüstrideki ihtiyacı karşılamak adına rekombinant protein üretimi oldukça verimli bir işlemdir.

Bu tez çalışması kapsamında; endüstrinin çeşitli kollarında kullanımı olan α -amilaz enziminin *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) ekspresyon sisteminde etanol ile indüklenebilen SNT5 promotörü kontrolünde rekombinant olarak üretimi yapılmıştır. Bu amaçla *Aspergillus niger* gen kaynağı olarak tercih edilmiş ve α -amilaz enzimini kodlayan gen bölgesi *P. pastoris*'e göre kodon optimizasyonu yapılmış şekilde ticari olarak temin edilmiştir. Uygun restriksiyon enzimleriyle kesilen pSNT5 α vektörü ve α -amilaz geni ligasyon yöntemiyle birleştirilerek pSNT5 α -AnAMY ekspresyon vektörü elde edilmiştir. Elde edilen ekspresyon vektörü önce *E.coli* NEB5 α hücrelerine daha sonra *P. pastoris* MK115-PDI suşuna transforme edilmiştir. Zeosin antibiyotiği eklenen agar plakalarda transformant maya hücreleri seçildikten sonra, çalkalamalı erlenmayerlerde klonlar üretime alınmış ve α -amilaz enzimini üreten klonların taraması yapılmıştır. Yapılan SDS-PAGE analizi sonuçlarına göre α -amilaz enzimini üreten klon seçilmiş ve bu klon ile enzimin üretimi için optimum pH ve sıcaklık koşulları belirlenmiştir.

Belirlenen optimum pH ve sıcaklık koşulları altında 5L'lik biyoreaktörde 107 saat süren iki aşamalı fermantasyon yöntemiyle α -amilaz enzimi üretimi gerçekleştirilmiştir. Üretilen enzimin aktivitesi için optimum pH ve optimum sıcaklık değerleri belirlenmiş, pH ve sıcaklık stabilitesi test edilmiştir.



2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Enzimler

Enzimler, amino asit zincirlerinin katlanmasıyla oluşan üç boyutlu yapılara sahip proteinlerdir. Enzimler, benzersiz amino asit dizilimleriyle birbirlerinden ayırt edilebilirler. Enzimler birçok biyokimyasal reaksiyondan sorumludur ve hayvanlarda ve insanlarda önemli fonksiyonları katalize eder. Gıda sektöründe ürün kalitesinin artırılması, proses sürelerinin kısaltılması gibi temel görevleri bulunmaktadır. Enzimler, biyokimyasal reaksiyonları hızlandırma, bir reaksiyonu değişmeden tamamlama ve daha sonra başka bir reaksiyonu tetikleme yeteneğine sahiptir.

Enzimler biyokatalitik özelliğinden dolayı yiyecek ve içecek endüstrisinde her zaman kullanılmıştır. Gıda sektörünün yanı sıra tekstil, deterjan, ilaç, kağıt sanayi gibi birçok alanda da önemli rol oynamaktadırlar. Bir veya daha fazla polipeptit zinciri içermeleri bakımından proteinlerle aynı özelliklere sahiptirler. Enzimler reaksiyonları katalize etmek için kofaktörlere veya koenzimlere ihtiyaç duyabilirler (Koç, 2015).

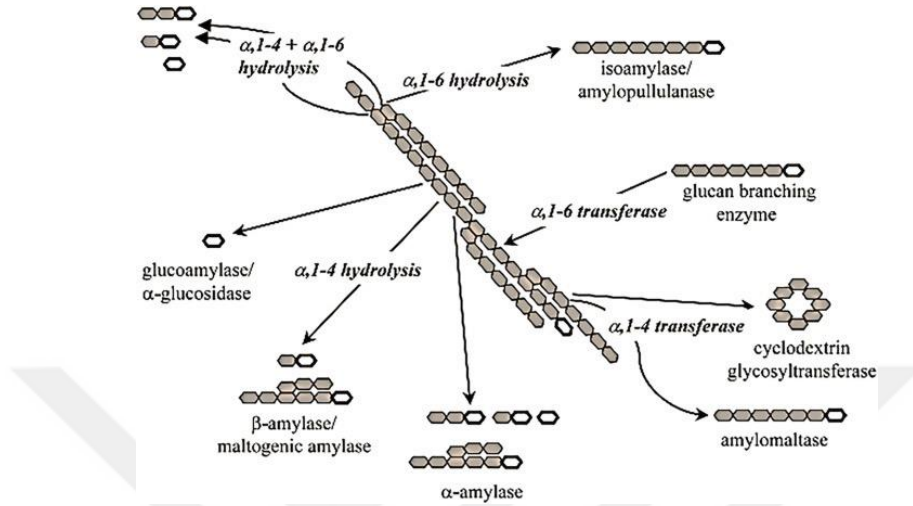
Enzimler hücrelerde biyokatalizör olarak görev yapar ancak biyolojik sistemlerdeki reaksiyonların yürütülmesine müdahale etmezler. Enzimler, bir hücrede meydana gelen tüm reaksiyonların hızını ve özgüllüğünü kendileri değişmeden düzenleyebilirler. Enzimler molekülleri parçalayarak belirli grupları bir molekülden diğerine aktarır veya birleştirir (Uçar, 2011). Enzimler için uygun çalışma koşulları genellikle orta sıcaklıklardır. Yüksek sıcaklıklar enzimlerin üç boyutlu yapısını bozar. Enzimler çok yüksek ya da çok düşük pH değerlerinde aktivite gösteremezler. Bu parametrelere ek olarak enzim substrat konsantrasyonu, inkübasyon süresi, yüzey aktif maddeler, metal iyonları ve mekanik strese bağlı olarak enzim aktivitesi etkilenmektedir. (Koç, 2015).

1970'li yılların başına kadar bitki ve hayvan materyalleri enzim kaynağı olarak kullanılmaktaydı (Cherry ve ark., 2004). Günümüzde mikroorganizmalardan elde edilen enzimler, hayvanlardan veya bitkilerden elde edilen enzimlere göre daha sık üretilmekte, daha ucuz, daha yüksek katalitik aktiviteye sahip ve daha stabil özelliklere sahiptir. Bu nedenlerden dolayı endüstriyel alanlardaki pek çok enzim mikrobiyal kökenlidir (Kıran ve ark., 2006). Bir mikroorganizmanın enzim üretme yeteneğinin yanı sıra toksisitesi veya patojenitesi de önemlidir. Enzimlerin mikroorganizmalar tarafından diğer kaynaklara göre daha fazla üretilmesinin nedenleri şu şekilde sıralanabilir (Novic ve ark., 2005). Mikroorganizmalar birçok reaksiyona adapte olmuşlardır. Farklı çevre koşullarına kolaylıkla uyum sağlarlar. Ucuz karbon ve nitrojen kaynakları kullanılarak kolaylıkla geliştirilebilirler. Basit tarama işlemleriyle mikroorganizmalar kısa sürede test edilebilmektedirler. Mikroorganizmaların çok farklı türleri olduğundan, çeşitli enzimleri sentezleyebilirler.

2.2. Amilazlar

Amilazlar nişasta molekülündeki glikosidik bağları hidrolize ederler (Sundarram ve ark., 2014). Amilazlar glikosid hidrolaz ailesi 13'ün üyesidirler (Kumar 2011).

Niştada bulunan α -1,4-glikosidik bağları amilazlar tarafından hidrolize edilirler (Şekil 2.1.). 1833 yılında ilk amilaz enzimi Anselme Payen tarafından izole edilmiştir (Sharma ve ark., 2015).



Şekil 2. 1. Niştanın amilaz ve diğer enzimler tarafından parçalanması (Maarel van der ve ark., 2002)

Amilaz enzimleri α , β ve γ olmak üzere üç ana başlık altında sınıflandırılır ve bunlardan en çok çalışılanları α ve β amilazlardır (Gopinath ve ark., 2017). Amilazlar, uluslararası enzim pazarındaki en popüler karbonazlardan biridir (%25-33) ve α -amilazlar bu grupta en yüksek orana sahiptir (Sun ve ark., 2018). α -Amilaz (α -1,4-glukan glukanohidrolaz, EC 3.2.1.1), nişasta moleküllerindeki α -1,4-D-glikosidik bağları rastgele hidrolize eder. Bunlar glikoz, maltoz, maltotrioz ve α -sınırlı dekstrinler üreten endoamilazlardır (Janeček, 1994). α -Amilaz endüstriyel bir enzimdir. Unlu mamuller, niştanın sakkarifikasyonu, kağıt, tekstil, ilaç ve biyoyakıt üretimi dahil olmak üzere geniş bir uygulama yelpazesine sahip en önemli biyokatalizörlerden biridir (Parashar ve Satyanarayana, 2016). α -amilaz ile nişasta hidrolizinin hızı; sıcaklık, pH, substrat konsantrasyonu ve yapısı, enzim konsantrasyonu ve Ca^{2+} iyonlarının ve diğer stabilize edici maddelerin varlığı gibi birçok koşula bağlıdır. Bu nedenle özellikleri uygulama alanına uygun olan α -amilazlar tercih edilmektedir (Sivaramakrishnan ve ark., 2006). α -amilazların özellikleri (molekül ağırlığı, optimal çalışma sıcaklığı, pH vb.) izole edildikleri kaynağa bağlı olarak büyük ölçüde değişiklik göstermektedir (Sharma ve Satyanarayana, 2013).

β -amilaz enzimi (EC 3.2.1.2) indirgenmemiş α -1,4-glikosidik bağlarını hidrolize eder. Amilopektin ve glikojende bulunan dallanmaları parçalayamazlar. β -amilaz pH 4-5,5 aralığında optimum aktivite gösterir (Das ve Kayastha, 2019).

Amilaz enzimleri ayrıca substrata etkileri açısından iki gruba ayrılırlar: endoamilazlar ve ekzoamilazlar (Van der ve ark., 2002).

Endoamilazlar, nişasta moleküllerini, α -1,4-glikosidik bağları içerdense parçalayarak hidrolize eder, sonucunda çeşitli uzunluklarda α -anomerik ürünler oluşturur. α -amilazlar, endoamilaz olarak bilinmektedirler (Pandey ve ark., 2000).

Ekzoamilazlar, nişasta moleküllerinin α -1,4- veya α -1,6-glikosidik bağlarını dışarıdan (indirgemeyen uçtan) hidrolize ederek hidroliz sonucu α - veya β -anomerik ürünler oluşturur. β -amilaz (EC 3.2.1.2) ve glukoamilaz (EC 3.2.1.3) ekzoamilazlar grubunun örnekleridir (Wong ve Robertson, 2002b).

Amilaz bitkilerden, hayvanlardan ve mikroorganizmalardan elde edilen farklı kökenlere sahip bir enzimdir (Sivaramakrishnan ve ark., 2006). Mikrobiyal α -amilazlar, *B. subtilis*, *B. stearothermophilus* ve *B. licheniformis* dahil olmak üzere birçok mantar, maya ve bakteriden izole edilebilir. *Amyloliuefaciens* gibi *Bacillus* bakterileri ve *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* ve *Aspergillus awamori* gibi *Aspergillus* türlerinin iyi birer α -amilaz üreticileri olduğu bilinmektedir (Pandey ve ark., 2000; Konsoula ve Liakopoulou-Kyriakides, 2007). Halihazırda ticari kullanımda olan amilaz enzimleri *Aspergillus* türlerinden, özellikle *Aspergillus niger*'den elde edilmektedir. Toksisite, düşük üretim verimliliği ve zor saflaştırma prosedürleri bu türlerin kullanımını sınırlamaktadır. Fungal morfolojinin, endüstriyel üretimde önemli avantajlara sahip olan, sıvı kültür ortamında filamentli organizmaların geliştirilmesinde fermantasyon verimliliğini olumsuz yönde etkileyen bir parametre olduğu bilinmektedir (Yang ve ark., 2013). Karmaşık morfolojik yaşam döngülerine sahip ve aşırı büyüme sergileyen mantar türlerinin oluşturduğu morfolojik yapıların kontrol edilmesi, fermantasyon çalışmalarında bazı zorluklar doğurmaktadır (Walisko ve ark., 2017). Bu problemler arasında aşırı büyüme, yetersiz substrat difüzyonu, yetersiz karıştırma ve havalandırma, düzensiz morfoloji, düşük enzim aktivitesi ve tekrarlanamayan sonuçlar yer alır. Bu sorunların üstesinden gelmek için rekombinant DNA teknolojisi, güçlü promotorların kullanımı (Karaoğlu ve ark., 2016-a) ve protein kodon optimizasyonu (Wang ve ark., 2016) kullanılmakta olup farklı sinyal peptidlerinin sekresyon için taranması (Barrero ve ark., 2018) ve glikozilasyon mühendisliği (Pena ve ark., 2018) umut verici yaklaşımlar sunmaktadır.

2.3. Substrat olarak nişasta

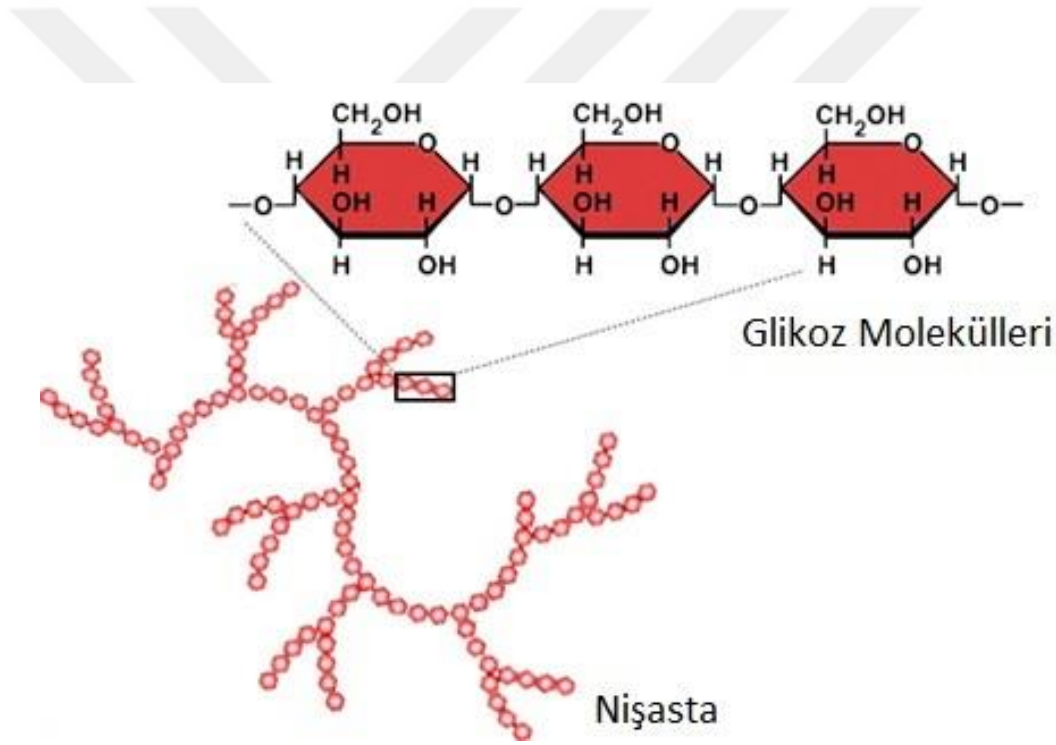
Bitkiler tarafından üretilen nişasta, suda çözünmeyen granüler bir yapı olup doğadaki en bol bulunan polisakkaritlerden biridir. Fotosentez sırasında güneş enerjisini kimyasal enerjiye dönüştüren bitkilerin temel ürünü olan nişasta, yaprakların kloroplastlarında ve tohum, yumru ve kök gibi organların amiloplastlarında en yaygın depolama şeklidir. (Martin ve Smith, 1995; Morell ve Myers, 2005). Patates, mısır, buğday, pirinç vb. gibi gıdalarda büyük miktarlarda bulunmaktadır (Polaina ve MacCabe 2007).

İnsan beslenmesinde önemli bir rol oynayan nişastanın temel kaynağı tahıllardır. Tahıllar, kuru madde içeriğinin yaklaşık %70'ini oluşturur ve toplam kalori ihtiyacının yaklaşık %80'ini karşılar (Hannah ve James, 2008). Kökleri ve yumruları da nişasta bakımından zengindir. Her yıl tahıllardan yaklaşık 2,05 milyar ton, kök ve yumrulardan ise yaklaşık 679 milyon ton nişasta üretilmektedir (Burrell, 2003).

Nişasta hem parçalanabilirliği hemde işlenebilirliği nedeniyle sadece besleyici bir gıda değil aynı zamanda gıda endüstrisi dışında birçok endüstride de hammadde olarak

kullanılabilir (Jobling, 2004). Nişasta biyosentezi, karmaşık glukanların üretimini ve bunların granüller içinde organize bir şekilde birikmesini içerir. Nişasta granüllerinin oluşumu, bitkilerde düzenli üç boyutlu polisakkarit yapılarının oluşumu için basit bir model gibi görünmektedir. Bu model, selüloz biyosentezi gibi diğer yüksek dereceli biyosentetik sistemlerdeki granül yapısının biyokimyasal temelini anlamak için büyük önem taşımaktadır (Delmer ve Amor, 1995).

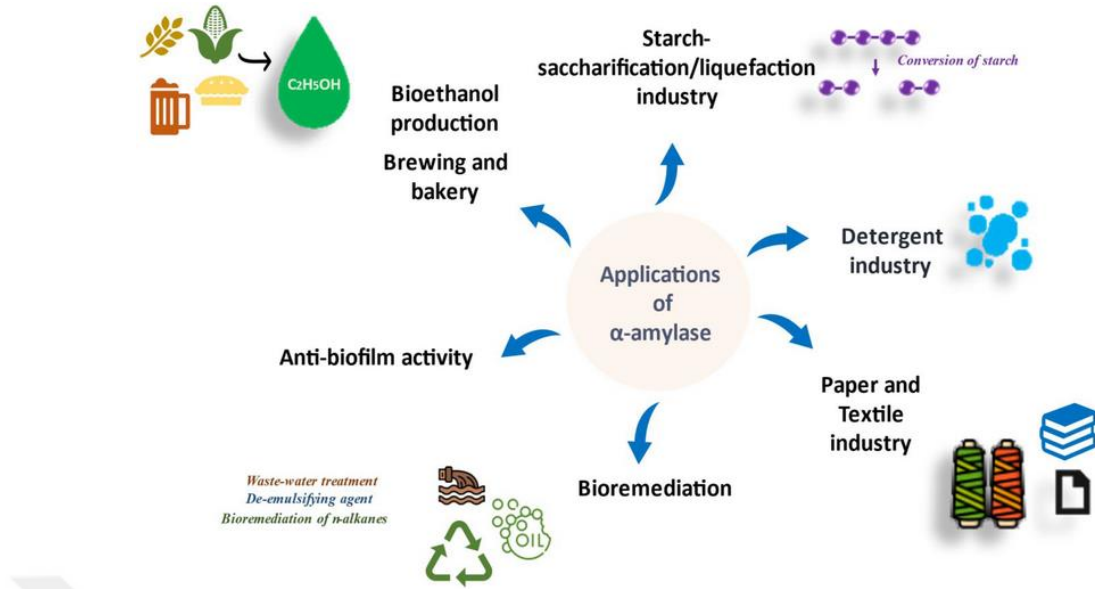
Nişasta granülleri, üç boyutlu, nadiren kristal yapılarda düzenlenmiş çeşitli glikoz polimerlerinden oluşur. Bu granüllerin içerdiği polimerler dallanma şekline, zincir uzunluğuna ve molekül ağırlığına bağlı olarak iki formu vardır: amiloz ve amilopektin'dir. Amiloz, molekül ağırlığı 10.000 ila 60.000 dalton arasında değişen, glikoz birimleri arasındaki α -1,4-D-glikosidik bağlarla bağlanan doğrusal bir polimerdir. Amilopektin ise molekül ağırlığı 50.000 ila 1.000.000 Dalton arasında değişen dallanmış bir polimer olup, glikoz birimleri arasındaki α -1,4 bağlantılarının yanı sıra α -1,6-D-glikosidik bağları da içerir (Şekil 2.2.) (John, 1987; James ve Lee, 2006).



Şekil 2. 2. Nişasta molekülü

2.4. Amilaz enziminin kullanım alanları

Nişastayı parçalayan bir enzim olan amilaz, ilaç, gıda, biracılık, kağıt, tekstil ve kimya gibi çeşitli endüstriyel işlemlerde önem kazanmıştır (Şekil 2.3.). α -amilazların en yaygın uygulamaları, nişastayı fruktoz ve glikoz şuruplarına dönüştüren nişasta sıvılaştırma işleminde nişasta hidrolizi için kullanılan nişasta endüstrisindedir (Nielsen ve Borchert, 2000).



Şekil 2. 3. Amilaz enziminin endüstriyel uygulamaları (Sharma ve ark., 2022)

2.4.1. Nişasta dönüşümü

α -amilazların en yaygın uygulamaları, nişastayı fruktoz ve glikoz şuruplarına dönüştüren nişasta sıvılaştırma işleminde nişasta hidrolizi için kullanılan nişasta endüstrisindedir (Nielsen ve Borchert, 2000). Tüm nişastanın enzimatik dönüşümü şunları içerir: nişasta granüllerinin çözünmesini içeren ve böylece viskoz bir süspansiyon oluşturan jelatinizasyon; kısmi hidrolizi ve viskozite kaybını içeren sıvılaştırma; daha fazla hidroliz yoluyla glikoz ve maltoz üretilmesini içeren sakkarifikasyon (Gupta ve ark., 2003).

2.4.2. Deterjan endüstrisi

Deterjan endüstrileri enzimlerin hem hacim hem de değer bakımından birincil tüketicileridir. Deterjan formülasyonlarında enzimlerin kullanılması, deterjanın zorlu lekeleri çıkarma yeteneğini artırır ve deterjanı çevre açısından güvenli hale getirir. Amilazlar, enzimatik deterjan formülasyonunda kullanılan ikinci tip enzimlerdir ve tüm sıvı deterjanların %90'ı bu enzimleri içerir (Gupta ve ark., 2003; Hmidet ve ark., 2009; Mitidieri ve ark., 2006). Bu enzimler çamaşır ve otomatik bulaşık yıkama deterjanlarında patates, sos, muhallebi, çikolata vb. gibi nişastalı gıdaların kalıntılarını dekstrinlere ve diğer küçük oligosakaritlere parçalamak için kullanılır (Mukherjee ve ark., 2009; Olsen ve Falholt, 1998). Amilazlar düşük sıcaklıklarda ve alkalik pH'ta aktiviteye sahiptir, deterjan koşullarında gerekli stabiliteyi korur ve amilazların oksidatif stabilitesi, yıkama ortamının çok zor olduğu deterjanlarda kullanımları için en önemli kriterlerden biridir (Kirk ve ark., 2002). Nişastanın yüzeylerden uzaklaştırılması beyazlık avantajı sağlamak açısından da önemlidir, çünkü nişasta birçok parçacıklı kir türü için cezbedici olabilir. Deterjan endüstrisinde kullanılan amilaz örnekleri *Bacillus* veya *Aspergillus*'tan türetilmektedir (Mitidieri ve ark., 2006).

2.4.3. Yakıt alkol üretimi

Etanol en çok kullanılan sıvı biyoyakıttır. Etanol üretimi için nişasta, düşük fiyatı ve dünyanın birçok bölgesinde kolayca bulunabilen hammaddesi nedeniyle en çok kullanılan substrattır (Chi ve ark., 2009). Bu üretimde nişasta çözündürülür ve daha sonra fermente edilebilir şekerler elde etmek için iki enzimatik aşamaya tabi tutulur. Nişastanın etanole biyolojik dönüşümü, sıvılaştırma ve sakkarifikasyonu içerir; burada nişasta, amilolitik bir mikroorganizma veya α -amilaz gibi enzimler kullanılarak şekere dönüştürülür ve ardından fermantasyon yapılır; burada şeker, *Saccharomyces cerevisiae* gibi etanolü fermente eden bir mikroorganizma tarafından kullanılarak etanole dönüştürülür (Moraes ve ark., 1999; Öner, 2006).

2.4.4. Gıda endüstrisi

Amilazlar fırınlama, bira yapımı, sindirime yardımcı maddelerin hazırlanması, kek üretimi, meyve suları ve nişasta şurupları gibi işlenmiş gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Couto ve Sanroman, 2006). Fırıncılık endüstrisinde amilazlar ekmeğin hamuruna undaki nişastayı daha sonra maya tarafından fermente edilebilen daha küçük dekstrinlere parçalamak için eklenebilir. Hamura α -amilaz eklenmesi fermantasyon hızının artmasına ve hamurun viskozitesinin azalmasına neden olur, bu da hamur veriminde iyileşmelere neden olur. Ayrıca hamurda ilave şeker oluşturarak ekmeğin tadını, kabuk rengini ve kızarma kalitesini artırır. Amilazlar aynı zamanda bira veya meyve sularının artırılmasında veya lifin sindirilebilirliğini arttırmak amacıyla hayvan yemlerinin ön işleminde de kullanılır (Gavrilescu ve Chisti, 2005; Ghorai ve ark., 2009).

Amilaz enzimi meyve sularını berraklaştırmak için kullanılır. Amilaz enziminin nişastayı parçalamak ve meyve suyunu berraklaştırmak gibi önemli bir işlevi vardır. Berraklaştırma, taze sıkılmış meyve suyundaki çözünmeyen bulanık maddeleri destekleyen koloidal bitkisel karbonhidratların yarı kararlı emülsiyonunun, bulanık meyve suyunun viskozitesini ve opaklığını azaltarak "parçalanması" işlemidir. Şeffaf, benekli bir görünüm oluşturan bir işlemdir. Meyveler pektin ve diğer polisakkaritleri içerdiğinden, bu maddeler membran filtrasyonu sırasında kirlenmeye neden olabilir. Enzim ilavesi pektin ve nişastayı parçalar. Enzimatik olarak saflaştırılmış meyve suyu, viskoziteyi azaltır ve santrifüjleme veya filtreleme yoluyla ayırmayı kolaylaştırır. Sonuç olarak, meyve suyu daha konsantre bir tada, renge ve daha iyi bir berraklığa sahip olur.

2.4.5. Tekstil endüstrisi

Amilazlar tekstil endüstrisinde haşıl sökme işleminde kullanılmaktadır. Dokuma işleminin hızlı ve güvenli olması için kumaş üretiminden önce ipliğe nişasta gibi haşıl maddeleri uygulanır. Nişasta çok çekici bir boyuttur çünkü ucuzdur, dünyanın çoğu bölgesinde kolayca bulunur ve oldukça kolay bir şekilde uzaklaştırılabilir. Nişasta daha sonra tekstil terbiye endüstrisinde ıslak işlemlerle dokuma kumaştan çıkarılır. Haşıl sökme, dokuma işlemi sırasında çözgü ipliğinin kopmasını önlemek için güçlendirme maddesi olarak görev yapan nişastanın kumaştan uzaklaştırılmasını içerir. α -amilazlar seçici olarak boyutu giderir ve liflere saldırmaz (Ahlawat ve ark., 2009; Gupta ve ark., 2003).

2.4.6. Kağıt endüstrisi

Kağıt hamuru ve kağıt endüstrisinde α -amilazların kullanımı, kaplanmış kağıttaki nişastanın modifikasyonu, yani düşük viskoziteli, yüksek moleküler ağırlıklı nişastanın üretimi içindir. Kaplama işlemi kağıdın yazma kalitesini artırmak için yeterince pürüzsüz ve güçlü yüzeyini oluşturmaya yarar. Bu uygulamada, doğal nişastanın viskozitesi kağıt boyutlandırma için çok yüksektir ve bu, polimerin α -amilazlar ile kısmen parçalanmasıyla değiştirilebilir. Nişasta, kağıt için iyi bir kaplama olmasının yanı sıra, kaliteyi ve silinebilirliği artıran bir maddedir (Bruinenberg ve ark., 1996; Gupta ve ark., 2003).

2.5. *Aspergillus niger* α -amilaz geni

α -amilaz enziminin rekombinant üretimi için gen kaynağı olarak *Aspergillus niger* (Gen Bank KU668705.1) bu tez çalışmasında kullanılmıştır. *Aspergillus niger* α -amilaz enzimi toplam 567 aminoasitten oluşmaktadır (Şekil 2.4.). Protein içerisinde muhtemel 10 tane glikozilasyon bölgesi bulunmaktadır. Yaklaşık moleküler ağırlığı 58kDa civarındadır.

MDGRWİİSLVVTLGİSTVNAASRDQWİGRSİYQİVTDRFARSDNSTTAACDAAQGN YCGGSFQGIİNKLDYİQDLG
FDAİWİSPAQTQİSARTADLSAYHGYWPNDLYSİNSHFGTPEKELQALSSTLHDRGMYLMLDİVVGDMAWAGNSST
VDYSTFKPFDDQKYFHD FRLSSDPTNETCVLECWMGDTVVSPLDRNEDEQVQNILGSWİSELVSNYSİDGLRİDV
LNİAPDFFSNFTKSSGVFTVGEGATADAADVCPQLQPSLNGLLNYPLYİLTDAFNTTNGNLSİTESİSYTKGQCEDVL
ALGTFTANQDVPRFGSYTSDİSLARNİLTSSMLADGİPİLYYGEEQHLTGSYNPVNREALWLTNYSMHSTSLPTLVQS
LNRLRSYASGDGEQYTKSQSGSDYLSYLSAPİYNSTHİLATRKGFAGNQVSVSVSNLGAKPASKATTKİTLGSDETG
FQPKQNVTEİLSCKTYVTDSSGNLAVDLSSDGGPRVYPTDSLKDSTDİCGDQTKSATPSSSAASSVSPİQSKGSETCL
FGVPLGİSTLVTVAMATSYAFİ

Şekil 2. 4. *Aspergillus niger* α -amilaz proteininin sekansı. Muhtemel glikozilasyon bölgeleri sarı ile vurgulanmıştır

Amilaz enziminin rekombinant üretiminde *Pichia pastoris* ekspresyon sisteminde başka gen kaynakları ve başka promotor kullanan çalışmalar literatürde mevcuttur. Bu çalışmalar Çizelge 2.1.'de özetlenmiştir.

Çizelge 2. 1. Amilaz enziminin *Pichia pastoris* 'te üretildiği çalışmalar

Gen kaynağı	Kullanılan promotor	Referans
<i>Bacillus subtilis</i> PY22	<i>AOX1</i>	Karakaş ve ark. 2010
<i>Aspergillus niger</i>	<i>AOX1</i>	Zeng ve ark. 2011
<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>AOX1</i>	Wang ve ark. 2015
<i>Aspergillus niger</i>	<i>AOX1</i>	Wang ve ark. 2018
<i>Thermomyces dupantii</i>	<i>AOX1</i>	Wang ve ark. 2019
<i>Bacillus subtilis</i> PY22	<i>SNT5</i>	Güllü, 2020

2.6. Ekspresyon sistemi olarak *Pichia pastoris*

P. pastoris, metanolü karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabilen ve hem temel araştırma hem de endüstriyel prosesler için ekonomik, hızlı ve etkili metilotrofik bir mayadır (Parashar ve Satyanarayana, 2017). *P. pastoris* mayası; kısa sürede yüksek hücre yoğunluğuna çıkabilmesi, genetik olarak kolay manipüle edilmesi, iyi karakterize edilmiş ekspresyon vektörleri, birçok promotora sahip olması ve yabancı DNA'yı homolog rekombinasyon yoluyla hücre genomuna entegre edebilmesi gibi avantajlara sahiptir. *P. pastoris*, bakteri gibi ucuz büyüme ortamlarında hızla büyüeyebilen tek hücreli bir mayadır. Ancak ökaryotik oldukları için polipeptit katlanması, disülfid bağı oluşumu ve glikozilasyon gibi transasyon sonrası değişiklikleri yapabilmektedirler. Bu değişiklikler ökaryotik proteinler için gereklidir ve bakteriler için bu modifikasyonları yapmak mümkün değildir (Hagenson, 1991). Bu, *Pichia* ekspresyon sistemlerine, rekombinant proteinlerin üretiminde bakterilere göre bir avantaj sağlar. Ayrıca, oldukça güçlü indüklenabilir alkol oksidaz I (AOX1) ve yapısal gliseralehid-3-fosfat dehidrojenaz (GAP) promotorlarına sahip vektörlerin varlığı, rekombinant protein üretimi için konakçı vektörlerin geliştirilmesini kolaylaştırmış, büyük esneklik ve kolaylık sağlamıştır. AOX1 ve GAP promotorları, rekombinant protein üretimi için yaygın bir şekilde kullanılan promotorlardır. Promotorların farklı güçleri ve kontrol mekanizmaları sayesinde konakçı organizmalar yabancı proteinlerin ekspresyonunu yapabilmektedir. Rekombinant protein üretiminde temel amaç en fazla miktarda proteini en kısa sürede elde etmek olsa da proteinin doğru katlanmasını sağlamak için daha zayıf promotorlar tercih edilebilir. Bu nedenle halen alternatif promotorlar keşfedilmekte ve bu promotorların kontrol mekanizmaları araştırılmaktadır. *Saccharomyces cerevisiae* alkol dehidrojenaz (*ADH*) genine %74 homoloji gösteren *P. pastoris* alkol dehidrojenaz (*ADH*) geni Karaoğlu ve ark., (2016-b) tarafından yapılan çalışma ile karakterize edilmiş ve *ADH* geninin promotorunun *AOX1* ve *GAP* promotoruna alternatif olarak kullanılabileceği gösterilmiştir (Karaoğlu ve ark., 2016-a). Yine aynı grup tarafından yapılan diğer bir çalışmada ise *ADH* promotorunun regülasyon bölgeleri belirlenmiş ve bu bölgeler eklenerek veya çıkarılarak beş farklı sentetik *ADH* promotoru oluşturulmuştur (Erden-Karaoğlu ve ark., 2022). Sentetik promotorlar, etanol ile indüklenerek engelli erlenmayer seviyesinde hücre dışı ksilanaz üretimi için test edilmiştir. Bu promotor varyantlarının, doğal promotorun %165 ila %200'ü arasında değişen oranlarda ksilanaz üretimini arttırdığı gösterilmiştir. En yüksek aktiviteyi sergileyen *ADH* sentetik promotor 5 (*SNT5*), fermentör ölçeğinde ayrıca test edilmiş olup, endüstriyel prosesler için etkili olabileceği değerlendirilmiştir (Erden-Karaoğlu ve ark., 2022). *SNT5* promotoru kullanılarak *Bacillus subtilis* PY22 gen kaynaklı α -amilaz enziminin üretimi yapılmış ve 1403 U/mg protein üretildiği tespit edilmiştir (Güllü, 2020). Dolayısıyla sentetik olarak elde edilen bir *ADH* promotoru olan *SNT5* promotorunun *P. pastoris*'te rekombinant protein üretiminde bahsedilen diğer güçlü promotorlara alternatif olarak kullanılabileceği gösterilmiştir.

Endüstriyel biyoteknoloji uygulamalarının yoğunlaşması ve artması, dünya ve ülkemiz açısından ekonomik büyüme için biyoteknolojinin anahtar sektörler arasında yer alacağının bir göstergesidir. Biyoteknolojinin endüstri uygulamaları arasında biyoyakıtlar, biyoplastikler, aşı, protein, antikor ve enzimlerin üretilmesini görebilmekteyiz. Bu bağlamda ülkemiz için önümüzdeki dönemde endüstriyel biyoteknolojiye gereken önemi vererek, ülkemizi bu alanda küresel düzeyde rekabet

edebilir seviyeye taşımak ve özellikle ithalata bağımlı olduğumuz sektörlerde yerli üretimi destekleyerek ülke ekonomisine katkıda bulunabiliriz. Türkiye büyük ve dinamik bir gıda endüstrisine sahiptir ve ülkemizde her geçen gün artan gıda üretimine paralel olarak enzim tüketimi de artmaktadır. Bununla birlikte, Türkiye’de enzim üretiminin çok kısıtlı miktarda olması nedeniyle yerli enzim üretimi ile ilgili çalışmalar önem arz etmektedir. Bu konuda ülkemizde yaşanan en güncel gelişme, 6 Mayıs 2020 tarihinde 31119 sayılı Resmi Gazete’de yayınlanan karar ile ilk kez modern biyoteknolojik yöntemlerle ticari olarak yerli enzim (rekombinant *Aspergillus oryzae*’den α -amilaz, glukoamilaz ve hemiselülaz) üretimine izin verilmiş olmasıdır (Biyogüvenlik kararı karar no:2, 2020). Gıda enzimleri ile ilgili yasal düzenlemelere sahip olan Türkiye’nin ticari enzim üretiminde söz sahibi olması, ülkemizde gerçekleştirilen Ar-Ge çalışmalarının çıktılarının büyük ölçüğe aktarılması ile mümkün olacaktır.

Bütün bu bilgiler ışığında, bu tez çalışması kapsamında gıda endüstrisi dahil olmak üzere farklı birçok endüstriyel alanda kullanım imkanı olan *Aspergillus niger* α -amilaz enziminin biyoteknolojik yöntemler kullanılarak *Pichia pastoris* ekspresyon sisteminde rekombinant üretimi yapılmıştır. Bu amaçla pSNT5 α -AnAMY ekspresyon vektörü *P. pastoris* MK115-PDI suşuna transforme edilmiş ve etanol ile indüklenebilen SNT5 promotörü kontrolünde ekspresyonu gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmalar dikkate alındığında sentetik olarak dizayn edilmiş etanol ile indüklenebilen SNT5 promotörü kontrolünde *Aspergillus niger* α -amilaz enzimi ilk kez bu çalışma kapsamında üretilmiş ve rekombinant α -amilaz enziminin endüstriyel boyutta üretimi için bir biyoproses geliştirilmiştir. Çalışmada kullanılan MK115-PDI *Pichia* suşu, hücre dışına protein ekspresyonunu kolaylaştıran ve üretilen proteinin doğru katlanmasını ve disülfid bağı oluşumu gibi post-translasyonel modifikasyonların yapılmasını destekleyen PDI şaperon proteinini genomunda 4 kopya olarak içeren bir suştur. Çalışma bu özellikleri bakımından özgünlük taşımaktadır.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Gen Kaynağı

Amilaz enziminin üretimi için gen kaynağı olarak *Aspergillus niger* (Gen Bank KU668705.1) tercih edilmiş ve bu gen *Pichia pastoris*'e göre kodon optimize şekilde GenScript (ABD) firmasından pUC57 vektörü içinde temin edilmiştir. pUC57-AnAMY plazmidi öncelikle *E. coli* NEB5α hücrelerine transforme edilmiş ve amfisilin içeren LB miller agar plakada seçilimi yapılan transformant hücrelerin kontrolü yapıldıktan sonra -80°C stokları yapılmıştır.

3.1.2. Suşlar ve plazmitler

Klonlama çalışmalarında *E. coli* NEB5α suşu, protein ekspresyonunda konakçı hücre olarak *P. pastoris* MK115-PDI suşu kullanılmıştır. pSNT5α plazmidi ekspresyon vektörünü oluşturmak için kullanılmıştır. Tüm mikroorganizmalar -80 °C'de (gliserol içeren ortam da) muhafaza edilmişlerdir.

3.1.3. Besiyerleri ve antibiyotikler

E. coli NEB5α hücrelerinin gelişimi için LB miller (%0.5 yeast ekstrakt, %1 pepton ve %1 NaCl) ve/veya LB Lennox besiyeri (%1 pepton, %0.5 yeast ekstrakt ve %0,5 NaCl) kullanılmıştır. pUC57 plazmidinin gelişiminde besiyerine amfisilin ve pSNT5α plazmidinin gelişiminde zeosin antibiyotikleri ilave edilmiştir. 100 mg/ml konsantrasyondaki amfisilin ve zeosin antibiyotiğinin stok çözeltileri 0.22 µm'lik bir filtreden (Corning, MA, AB) geçirilerek sterilize edilmiştir. 1.5 ml alikotlanıp -20 °C'de depolanmıştır. *E. coli* NEB5α suşları için kullanılan antibiyotikler 25 µg/ml Zeosin veya 100–150 µg/ml Amfisilin. *P. pastoris* suşları için 100-500-1000 µg /ml zeosin eklemesi yapılmıştır.

Çalışmada *P. pastoris* suşu için kullanılan besiyerleri: YPD (%1 yeast ekstrakt, %2 pepton, %2 glukoz); BMGY (%2 pepton, %1 yeast ekstrakt, %1 gliserol, %1,34 YNB, %4×10⁻⁵ biotin ve 100 mM fosfat tamponu pH 7,0); BMEY (10 g/l maya ekstraktı, 20 g/l soyton, 13.4 g/l YNB, 4×10⁻⁵g/l biotin, %10 saf etanol ve 0.1 M potasyum fosfat tamponu pH 3.0-7.0) şeklindedir. Çalışmada kullanılan tüm kimyasallar moleküler biyoloji kalitesindedir. Sigma-Aldrich (ABD), Difco (Fransa) ve Merck'ten (Almanya) markalarından temini sağlanmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. Liyofilize şekilde gelen plazmid DNA'nın hazırlanması

Kodon optimize olarak dizayn edilen ve pUC57 plazmidi içerisinde gelen amilaz geni üretici firmanın talimatlarına uygun olarak -20°C'de muhafaza edilmiştir. Liyofilize halde gelen plazmid +4°C'de 6000xg'de 2 dk santrifüj edilerek çöktürülmüş ve ardından üzerine 40 µl EB tamponu ilave edilerek kullanıma hazır hale getirilmiştir.

3.2.2. *E. coli* NEB5α hücrelerinin transformasyona yetenekli hale getirilmesi

E. coli NEB5α hücreleri kimyasal yöntemle CaCl₂ kullanılarak Chang ve ark., (2017) tarafından tanımlanan yönteme göre kompetent hale getirilmiştir. -80 °C’de saklanan *E. coli* NEB5α hücrelerinden öncelikle LB broth besiyerine ekilmiş ve gece boyu gelişime bırakılmıştır.

E. coli NEB5α hücreleri CaCl₂ yöntemi ile kompetent hale getirilmiştir (Chang ve ark., 2017). LB Miller plakada tek koloni düşecek şekilde geliştirilen *E. coli* suşunun 3 mL LB Miller sıvı besiyerine tek koloniden ekimi yapılarak geceboyu 37°C çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün gelişen kültürün optik yoğunluğu ölçülerek 150 mL LB Miller sıvı besiyerine başlangıç OD değeri 0.01 olacak şekilde ekilerek OD değeri 0.3-0.4 olana kadar (yaklaşık 3 saat) 37°C çalkalamalı inkübatörde geliştirilmiştir. Kültür beklenen OD değerine ulaştığında 3000xg’de 4°C’de 10 dakika süre ile santrifüjlenerek hücreler hasat edilmiştir. İşlemler bu aşamadan sonra buz üzerinde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen hücre peleti buz üzerinde bekletilmiş soğuk 20 mL 0.1 M CaCl₂ çözeltisi içinde süspanse edilmiş ve 30 dakika buz üzerinde bekletilmiştir. Bir önceki şartlarda santrifüjlenerek tekrar hasat edilen hücre peleti 5 mL %15 gliserol içeren 0.1 M CaCl₂ çözeltisi içinde resüspanse edilmiş ve 100 µL’lik hacimler sıvı halinde -80°C’ye kaldırılmıştır.

3.2.3. *P. pastoris* MK115-PDI hücrelerinin transformasyona yetenekli hale getirilmesi

P. pastoris hücreleri Lityum Asetat Yöntemine (Wu ve Letchworth, 2004) göre kompetent hale getirilmişlerdir. Kompetent yapılmak istenen MK115-PDI *P. pastoris* suşu, donmuş kültürden ya da +4°C’de saklanan agar plakasındaki tek kolonilerden test tüpü içerisinde 3 mL YPD sıvı besiyerine ekilmiş, 225 rpm 28°C çalkalamalı inkübatörde geceboyu geliştirilmiştir. Ertesi gün, geceboyu gelişen kültürden başlangıç OD₆₀₀ değeri 0.1 olacak şekilde 250 mL hacimli engelli erlen içerisinde 80 mL YPD besiyerine ekim yapılmıştır. OD₆₀₀ değeri 2.0-2.5 olana kadar geliştirilen hücreler, +4°C’de 3000 g hızında 5 dakika süre ile 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°C’de 3000xg hızında 5 dakika santrifüjlenerek hasat edilen hücreler 3 kez 2 mL buz soğukluğundaki 1 M sorbitol ile yıkanmış, daha sonra son konsantrasyon 10¹⁰ hücre/mL olacak şekilde buz soğukluğundaki maya resüspansiyon tamponu (1 M sorbitol, %20 gliserol) içinde süspanse edilmiş, 80 µL’lik hacimler halinde -80°C’de saklanmıştır.

3.2.4. pUC57-AnAMY plazmidinin *E. coli* NEB5α hücrelerine transformasyonu

-80 °C’de muhafaza edilen kompetent *E. coli* NEB5α hücreleri buz üzerinde çözdürülerek, 1 ng/µl’ye seyreltilmiş olan pUC57-AnAMY plazmidinden 1 µl eklenmiştir. Otuz dakika buz üzerinde inkübasyona bırakıldıktan sonra 42 °C’de 2 dakika

ısı şokuna uğratılmıştır. Ardından hücreler buz üzerinde 5 dakika bekletilip soğutulmuş, 200 µl LB Miller sıvı besiyeri eklenmiş ve 1 saat süresince 37°C çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra transformasyon karışımı 100 µg/mL amfisilin antibiyotiği içeren LB Miller agar plakalara farklı miktarlarda (50-75-100 µL) ekilerek 37 °C’de 1 gece inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası plakalarda oluşan teke düşmüş kolonilerden seçim yapılmış ve sıvı besiyerine ekilerek 37 °C’de gece boyu geliştirilen hücrelerden hem plazmit izolasyonu yapılmış hem de gliserol stokları hazırlanarak -80 °C’de saklanmıştır.

3.2.5. pSNT5α vektörünün ve amilaz genini taşıyan pUC57 plazmid DNA’sının izolasyonu

pSNT5α vektörünü taşıyan *E. coli* NEB5α hücresi zeosin antibiyotiği içeren LB Lennox sıvı besiyerin ekilmiş ve 37°C’ de 1 gece inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra kültür 15.000×g’de 10 dakika santrifüjlenerek hücre pelleti ve süpernatant kısmı birbirinden ayrılmıştır. Hücre pelletlerinden plazmit izolasyonu Bio Basic Plazmid Mini-Prep Kiti kullanılarak, protokol doğrultusunda yapılmıştır. İzole edilen plazmitlerin DNA miktar ölçümlerinde Spectrostar Nano cihazı kullanılmıştır. Önce cihazın kalibrasyonu yapılmış ve florometrik olarak plazmit DNA konsantrasyonları ölçülmüştür. Amilaz genini elde etmek için ise daha önce *E. coli* NEB5α hücrelerine transforme edilmiş ve -80°C’de muhafaza edilen hücrelerden pUC57-AnAMY plazmidinin izolasyonu yine aynı kit kullanılarak izole edilmiş ve konsantrasyonları belirlenmiştir.

3.2.6. Ligasyon için pSNT5α vektörünün ve *Aspergillus niger* α-amilaz geninin jelden kesilmesi ve saflaştırılması

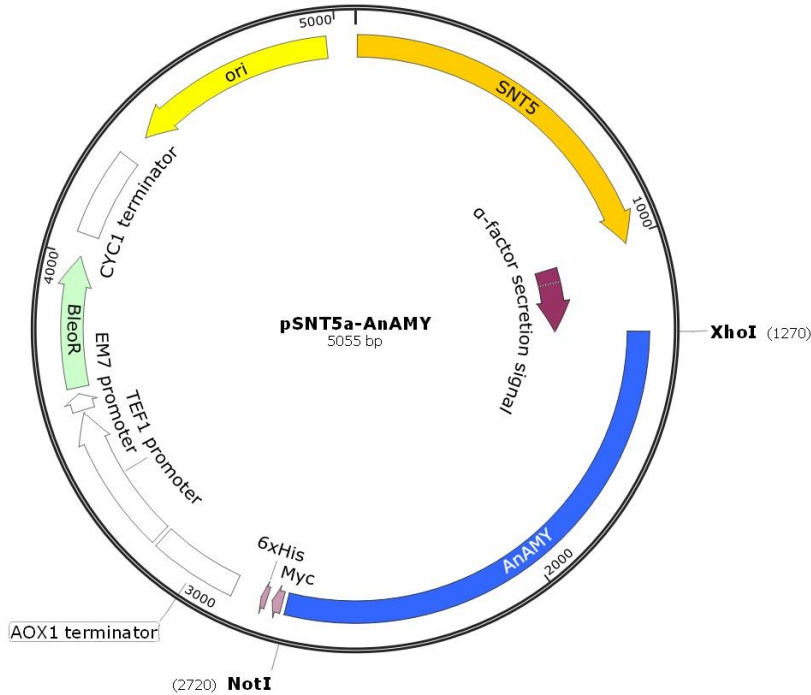
Bir önceki aşamada izolasyonu yapılan ve konsantrasyonları belirlenen pSNT5α vektörü ve pUC57-An-AMY plazmidi *XhoI-NotI* klonlama enzimleriyle kesilmiştir. Kesme işlemi için 1 µg plazmide 1 U enzim olacak şekilde enzimler eklenmiş, 10X enzim tamponu ve nükleaz arı su (NFW) eklenerek toplam 10 µl reaksiyon karışımı hazırlanmış ve 37 °C’de 1 saat inkübasyona bırakılarak hem vektör hem de plazmit kesilmiştir (Çizelge 3.1). Ardından kesilen örnekler %1’lik agaroz jele yüklenerek 1X TAE tamponu (Tris-asetat-EDTA, 1 mM EDTA, 40 mM Tris ve 20 mM asetik asit) ile kullanılarak 90 V elektrik akımında 45 dakika yürütülmüştür. Jelde büyüklüklerine göre farklı hızda koşan DNA parçaları elektrik akımı etkisiyle birbirlerinden ayrılmış ve beklenen büyüklükteki DNA parçaları White/UV Transilluminator, UVP, cihazında görüntülenerek DNA parçaları jelden kesilmiş ve kesilen DNA’ların jelden ekstraksiyonu MinElute Gel Extraction Kit (QIAGEN, Almanya) kullanılarak kit protokolüne göre yapılmıştır.

Çizelge 3. 1. Restriksiyon enzimleri ile Plazmid DNA'nın kesim reaksiyonu

10X Enzim Tamponu	1 µl
Restriksiyon Enzimleri (<i>XhoI</i> ve <i>NotI</i>)	1 µl/1 µl
Plazmid DNA	2 µl
Steril Su (NFW)	10 µl'ye tamamlanmıştır.

3.2.7. α -amilaz geninin pSNT5 α vektörüne ligasyonu ve pSNT5- α -Amilaz ekspresyon vektörünün *E. coli* NEB5 α hücrelerine transformasyonu

α -amilaz DNA parçasının pSNT5 α vektörüne ligasyonu T4 DNA ligaz (Thermo Scientific™) ile kitin protokolü doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Ligasyon işlemi için toplam 20 µl içerisinde 50 ng vektör DNA'sı 150 ng insert DNA'sı ile karıştırılmış, 10X T4 DNA ligasyon tamponu varlığında 1 U T4 DNA ligaz enzimi eklenmiştir. 25 °C sıcaklıkta 30 dakika inkübasyona bırakıldıktan sonra, elde edilen ligasyon karışımının 5 µl'si *E. coli* NEB5 α hücrelerine transformasyonu daha önce 3.2.4 bölümünde anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Ligasyon karışımının kalan miktarı -20°C'de saklanmıştır. Ligasyon sonunda pSNT5 α -AnAMY ekspresyon vektörü oluşturulmuştur (Şekil 3.1.).

**Şekil 3. 1.** pSNT5 α -AnAMY ekspresyon vektörünün haritası.

3.2.8 pSNT5 α -AnAMY ekspresyon vektörünün restriksiyon enzimleriyle doğrulanması

Ligasyon sonrası *E. coli* NEB5 α hücrelerine transformasyonu yapılan pSNT5 α -AnAMY ekspresyon vektörünün doğrulanması amacıyla, plazmid izolasyonu yapılmış ve izole edilen plazmitler *BsiWI*, *AdeI*, *Eco32I*, *HindIII* ve *ScaI* restriksiyon enzimleriyle 37 °C’de 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda enzimlerle kesilen plazmitler %1’lik agaroz jele yüklenerek elde edilen fragmentler beklenen bant büyüklükleri ile kıyaslanarak oluşturulan ekspresyon vektörü doğrulanmıştır.

3.2.9 pSNT5 α -AnAMY ekspresyon vektörünün lineer hale getirilmesi ve *P. pastoris* MK115-PDI suşuna transformasyonu

pSNT5- α -amilaz plazmidinin yetenekli *P. pastoris* MK115-PDI konakçısına transformasyonu amacıyla pSNT5 α -AnAMY ekspresyon vektörünü tek bir noktadan kesen *BsiWI* enzimi ile 37 °C’de 1 saat boyunca inkübe edilmiştir. Kesim sonucunda lineer hale getirilmiş pSNT5 α -AnAMY ekspresyon vektörü agaroz jele yüklenerek görüntülenmiştir. Lineer hale geldiğinden emin olunan ekspresyon vektörü MinElute® PCR Purification Kiti (Qiagen, Almanya) kullanılarak saflaştırılmış ve DNA konsantrasyonu ölçülerek transformasyona hazır hale getirilmiştir. Lineer plazmidlerin kompetent *P. pastoris* MK115-PDI konakçı suşuna transformasyonu elektroporasyon yöntemi ile yapılmıştır. Buz üzerinde bekletilerek çözdürülen 80 μ l kompetent *P. pastoris* MK115-PDI konakçı suşu üzerine 10 μ l lineer DNA (yaklaşık 3-5 μ g) eklenmiş, pipetlenerek karıştırılmış ve buz soğukluğundaki 2 mm elektroporasyon küvetine (Electroporation Cuvettes-Thermo Scientific™) aktarılmıştır. Küvetler 5 dakika buz üzerinde inkübasyona bırakılmış ve sonrasında Eppendorf Eporator (Eppendorf Eporator 4309) cihazında 4-5 ms süreyle 1600 V elektrik akımına tabi tutulmuştur. Hemen ardından buz soğukluğundaki 1 mL 1M sorbitol eklenmiş ve 1.5 mL’lik santrifüj tüpüne alınmıştır. 28 °C’de 2 saat inkübe edilen hücreler 100 μ g/mL, 500 μ g/mL ve 1000 μ g/mL konsantrasyonlarında zeosin içeren YPD agar plakalarına yayılmış ve 28 °C sıcaklıkta 3 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında gelişen kolonilerden seçilerek teke düşürme çizimleri yapılmış ve ardından engelli erlenmayer ölçeğinde protein ekspresyonu yapılarak α -amilaz enzimi üreten klonlar seçilmiştir.

3.2.10 Engelli erlenmayer ölçeğinde α -amilaz enzimi üretimi

Teke düşürme çizimi sonrasında YPD agar plakada gelişen maya hücreleri seçilerek YPD sıvı besiyerinde 225 rpm, 28°C’de OD₆₀₀ değeri 6-8 olana kadar geliştirilmiştir. Daha sonra 250 ml’lik engelli erlenmayerde 30 ml BMGY (pH6) besiyerine başlangıç OD₆₀₀’si 0.1 olacak şekilde hücreler inoküle edilmiş ve 18-20 saat boyunca 28°C ve 225 rpm’de gelişime bırakılmıştır. BMGY besiyerinde yaklaşık 10-13 OD olan hücreler +4°C 3000xg’de 15 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatantları dökülerek elde edilen hücre peleti, farklı pH’lardaki 30 ml BMEY (pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0) besiyeri içinde süspanse edilmiş ve inkübasyona 120 saat boyunca farklı sıcaklık (20°C, 24°C, 28°C) ve sabit karıştırma hızında devam edilmiştir. Protein üretimi etanol ile indüklenebilen SNT5 promotörü kontrolünde yapıldığı için protein ekspresyonu boyunca her 12 saatte bir BMEY besiyerindeki son konsantrasyonu %1 olacak şekilde etanol eklenmesi yapılmıştır. 120 saatlik üretim boyunca saat başı örnek alınmış ve üretim tamamlandıktan sonra kültür hasat edilmiştir. Süpernatant örnekleri 0.45 PES filtreden

geçirilerek toplam protein, enzim aktivitesi ve SDS-PAGE analizlerinde kullanılmak üzere -80 °C’de muhafaza edilmiştir.

3.2.11. Toplam protein ölçümü

Süpernatant örneklerindeki toplam protein konsantrasyonu Coomassie Plus- The Better Bradford Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) protokolüne uygun olarak ölçülmüştür. Bovine serum albümin standard olarak kullanılmış ve reaksiyon sonunda absorbanları spektrofotometrede 595 nm dalga boyunda ölçülerek protein konsantrasyonları hesaplanmıştır.

3.2.12 α -amilaz enzim aktivitesinin ölçümü

Protein üretimi esnasında toplanan örneklerden elde edilen süpernatant örnekleri α -amilaz enzim aktivitesini belirlemek için kullanılmıştır. Enzim aktivitesinin ölçümünde DNSA kolorimetrik yöntemi kullanılmıştır. Enzim aktivitesi ölçümünde kullanılan solüsyonlar ve içerikleri Ek-1 ve Ek-2’de verilmiştir. Amilaz enzim aktivitesi ölçümü için öncelikle 200 μ L süpernatant örneği %1 çözünebilir nişasta içeren 200 μ L substrat çözeltisi ile 50°C sıcaklıkta 5 dakika inkübe edilmiştir. Ardından 200 μ L DNS çözeltisi eklenerek 95°C sıcaklıkta 15 dakika inkübe edilmiş ve inkübasyon tamamlandıktan sonra örnekler 3 dakika buz üzerinde bekletilip soğutulmuş ve soğutulan örnekler 1800 μ L saf su ilave edilmiştir. Örneklerin absorban ölçümü spektrofotometrede 540 nm.’de yapılmıştır. Enzim aktivitesi hesabında kullanılmak üzere standart kalibrasyon grafiği %0.3 (a/h) saf maltoz içeren çözeltinin seyreltmeleri yapılarak hazırlanan standartların absorban değerleri kullanılarak çizilmiştir (Ek-2). Hem standartların hem de örneklerin absorbanları 200 μ L substrat çözeltisi ve 200 μ L pH tamponunun (20°C’de pH 6.9 olacak şekilde ayarlanan 6.7 mM NaCl içerikli 20 mM sodyum fosfat tamponu) 50°C sıcaklıkta 5 dakika inkübe edilmesinin ardından 200 μ L DNS çözeltisi eklenerek 95°C sıcaklıkta 15 dakika inkübe edilmesi ve 3 dakika buz üzerinde soğutulup 1800 μ L saf su ilave edilerek hazırlanan köre karşı okutularak ölçülmüştür. α -amilaz enzimi için bir enzim ünitesi; 50°C sıcaklık ve pH 6.9 koşullarında, 1 dakikada, 1.0 mg maltoz açığa çıkarmak için gerekli olan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. Enzim aktivitesi hesabında aşağıdaki eşitlik kullanılmıştır.

$$\text{Aktivite (U/mL)} = \frac{\text{OD}}{\text{Eğim}} * \frac{\text{Toplam hacim(mL)}}{\text{Enzim miktarı (mL)}} * \frac{1}{\text{İnkübasyon süresi (dk)}} * \text{Seyreltme Faktörü}$$

3.2.13. Lugol çözeltisi kullanılarak ME+nişasta agar plakalarındaki kolonilerden α -amilaz salgılanmasının görüntülenmesi

Elde edilen maya suşlarında α -amilaz enziminin üretimini enzim aktivitesi ölçüm metodu dışında başka bir metodla doğrulamak için, taranan klonların YPD sıvı saf kültüre ekimleri yapılmıştır. Ertesi gün gelişen hücreler 12-13 OD olunca BMGY pH 6.0 besiyerine aktarılmıştır. Gelişen kültür üretimlerinden %0.4 nişasta içeren ME agar plakalara (%0.34 maya nitrojen bazı, %4 x %10⁻⁵ biyotin, %1 etanol, %1.5 agar, %0.4 çözünür nişasta) ekimleri yapılmış ve 28°C’de 2 gün inkübasyona bırakılmıştır. Protein

üretiminde kullanılan SNT5 promotörü etanol ile indüklenebilen bir promotor olduğu için 24 ve 48. saatlerde plakaların kapaklarına 100 µl etanol eklenmiştir. İkinci günün sonunda gelişmekte olan kolonilerin üzerine %5 lugol solüsyonundan 10 ml eklenmiş ve koloni çevresinde şeffaf zon oluşumu gözlemlenmiştir.

3.2.14. SDS-PAGE analizi

SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE), Mini-PROTEAN Tetra Dikey Elektroforez Hücresi (BioRad, ABD) cihazında %5 poliakrilamid yükleme jeli ve %10 poliakrilamid ayırma jeli 1 mm hazırlanarak uygulanmıştır. Protein üretimi tespit edilecek olan süpernatant örnekleri, toplam 30 µl olacak şekilde 1:3 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 inkübasyona bırakılmış ve proteinlerin denatürasyonu sağlanmıştır. Hazırlanan örneklerden 20 µl alınarak jel kuyucuklarına yüklenmiştir. Protein örnekleri, elektroforez işlemi boyunca 1X TGS (0.025 M Tris base, 0.192 M Glisin, % 0.1 SDS, pH 8.3) tamponunda 120 V akımda 120 dakika koşturulmuştur. Elektroforez işleminden sonra jel, Coomassie brilliant blue içeren boyama tamponu (%10 Asetik asit, %50 Metanol, %0.1 coomassie blue staining) ile 1 saat orbital çalkalayıcı üzerinde boyanmış, boya içermeyen yıkama tamponu (%10 Asetik asit, %10 Metanol) ile proteine bağlanmayan fazla boyanın arınması için protein bantları görünür hale gelene kadar yaklaşık 1 saat yıkanmıştır. Sonrasında akrilamid jel ChemiDoc MP görüntüleme sistemi ile görüntülenmiş, aynı jel içerisindeki bir kuyucuğa yüklenen protein standardı (Precision Plus Protein Dual Color Standards (Bio-Rad, ABD) yardımıyla hizalama yöntemi ile istenilen proteinin doğrulaması yapılmıştır.

3.2.15 EndoHf enzimi muamelesi

Üretilen rekombinant α -amilaz enziminin post-translasyonel bir modifikasyon olan glikozilasyona uğrayıp uğramadığını görmek amacıyla *EndoHf* enzimi ile reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Toplam protein miktarı belirlenmiş süpernatant örneğinden yaklaşık 3 µg protein örneği için 10X glikoprotein denatürasyon tamponundan 2 µl eklenerek 100 °C'de 10 dakika inkübe edilmiş ve hemen ardından 1 dakika buzda bekletilmiştir. 4 µl 10X GS reaksiyon tamponundan ve 0.6 µl *EndoHf* enziminden eklenmiş ve nükleaz saf su eklenerek reaksiyon hacmi 40 µl'ye tamamlanmış ve 37 °C'de 3 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında *EndoHf* ile maumele edilen ve edilmeyen örnekler SDS-PAGE ile analiz edilmiştir.

3.2.16. 5L hacimli biyoreaktörde α -amilaz enzimi üretimi

Rekombinant α -amilaz enzimini büyük ölçekte üretmek için 5 L'lik biyoreaktör (Sartorius Stedim BIOSTAT B) kullanılmıştır. Dondurulmuş kültür 100 mL BMGY (pH 6.0) besiyerine aktarılmış ve yaklaşık 20 saat 28 °C'de 225 rpm'de (yaklaşık 10 OD_{600nm}'de) inkübe edilmiştir. Bu kültür 2 L FM22 besiyerine (42.2 g/L KH₂PO₄, 5 g/L (NH₄)₂SO₄, 0.79 g/L CaSO₄, 14.9 g/L K₂SO₄, 4.13 g/L MgSO₄·7H₂O, 40 g/L gliserol, pH 6.0) inokulasyon için kullanılmıştır. FM22 besiyeri otoklavlandıktan sonra %25 (v/v) NH₄OH kullanılarak pH'sı 6.0'a ayarlanmış ve 1 litre besiyeri için 1 ml PTM4 tuzu (2 g/L CuSO₄·5H₂O, 0.08 g/L NaI, 3 g/L MnSO₄·H₂O, 0.2 g/L Na₂ MoO₄·2H₂O, 0.02 g/L H₃BO₃, 0.5 g/L CaSO₄·2H₂O, 0.5 g/L CoCl₂, 7 g/L ZnCl₂, 22g/L FeSO₄·7H₂O, 0.2 g/L biotin, 1 ml H₂SO₄) eklenmiştir. Besiyerindeki çözünmüş oksijen (dissolved oxygen, DO)

miktarını takip etmek amacıyla DO probu kalibrasyonu yapılmış ve ardından hazırlanan inokulum aseptik şartlarda biyoreaktöre verilmiştir. Fermantasyon kesikli faz ve yarı-kesikli faz olmak üzere iki farklı aşamada gerçekleştirilmiştir. Kesikli fazda besiyeri içerisinde bulunan gliserol hücreler tarafından kullanılmıştır. Kesikli faz yaklaşık 20 saat sürdürülmüş ve çözünmüş oksijenin pik yapmasıyla tamamlanmıştır. DO'nun aniden yükselmesi ortamda gliserolün tükenmesinin bir göstergesidir. Bu karbon kaynağının tükenme sinyalinden sonra, ikinci aşama olan protein ekspresyonun esas olarak gerçekleşeceği yarı-kesikli faz başlatılmış ve bu fazda %50 gliserol, %10 etanol ve %0.4 PTM4 tuzu içeren besleme solüsyonu kullanılmıştır. Yarı kesikli faz boyunca besleme hızı, ilk 2 saatlik fermantasyon sırasında 7.3 mL/L/sa'de sabit tutulmuş, daha sonra biyoreaktöre profil girilerek besleme hızı 31.2 mL/L/sa'ye kademeli olarak yükseltilmiş ve fermantasyonun sonuna kadar 31.2 mL/L/sa'de sabit tutulmuştur.

Kesikli fazda sıcaklık ve pH sırasıyla 28 °C ve 6.0'da sabit tutulmuş, yarı-kesikli fazın başlangıcında ise sıcaklık ve pH, optimum protein üretim koşullarına (pH 6.0 ve 24 °C sıcaklık) ayarlanmıştır. Sıcaklık, DO pikinden kısa bir süre sonra 24 °C'ye ayarlanmıştır. Fermantasyon pH değeri, %25 (v/v) NH₄OH ile kontrol edilmiş ve ayrıca azot kaynağı olarak da kullanılmıştır. Çözünmüş oksijen seviyesinin %20 doygunlukta kalması karıştırma, hava (1.5 vvm) ve ayrıca saf oksijen ilave edilerek kontrol edilmiştir. pH ve oksijen konsantrasyonu uygun problemlerle (Hamilton, Reno, Nevada) belirlenmiştir. Fermantasyon boyunca farklı zamanlarda süpernatantlar toplanmış ve bu örnekler yaş hücre ağırlığı (WCW g/L), SDS-PAGE, toplam protein (g/L) ve enzim aktivitesini (U/L) belirlemek için analiz edilmiştir. Tüm analizler üç paralel halinde yapılmıştır.

3.2.17. Enzimin karakterizasyonu

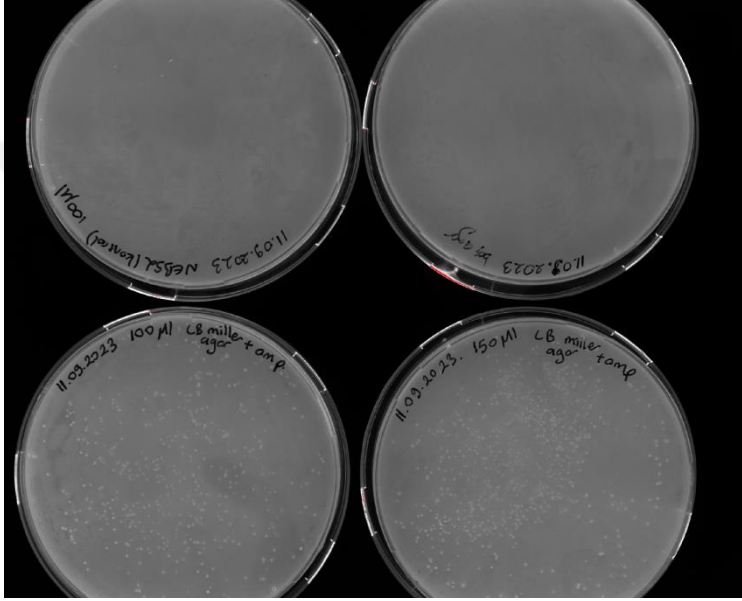
Üretimi yapılan enzimin biyokimyasal karakterizasyonunu belirlemek amacıyla, enzimin maksimum aktivite gösterdiği optimum pH ve sıcaklık değerleri ve ayrıca pH ve sıcaklığın enzimin stabilitesi üzerine etkisi test edilmiştir. Maksimum α -amilaz enzimi aktivitesi için optimum sıcaklığı belirlemek amacıyla 30, 40, 50, 60, 70 ve 80 °C sıcaklıklarında enzim aktivitesi belirlenmiştir. Enzimin reaksiyonu bu sıcaklıklarda gerçekleştirilmiş ve absorbanslar 540nm'de okunmuştur. α -amilaz enziminin termal stabilitesi için süpernatantlar 30 ila 80 °C arasındaki sıcaklıklarda 1 saat boyunca inkübe edilmiş ve ardından hemen enzim aktivitesi ölçülmüştür.

α -amilaz enzim aktivitesinin optimum pH'sını belirlemek amacıyla %1 nişasta içeren substrat çözeltisi pH 5.0-9.0 aralığındaki çeşitli tamponlar kullanılarak hazırlanmasıyla test edilmiştir. Enzim aktivitesi ölçümündeki diğer parametreler aynı kalmak koşuluyla reaksiyon sonunda absorbanslar ölçülmüş ve aktivite hesaplanmıştır. pH'nın enzim stabilitesi üzerindeki etkisini incelemek için, süpernatant örnekleri pH 5.0-9.0 aralığında ayarlanmış 6.7mM NaCl içeren 20 mM sodyum fosfat tamponu ile oda sıcaklığında 1 saat boyunca inkübe edilmiş ve her bir tampon içine %1'lik çözünabilir nişasta çözeltisi eklendikten sonra enzim aktivitesi standart yöntemle ölçülmüştür. Bağlı aktiviteler, standart metotta belirtilen sıcaklık ve pH'da enzimin aktivitesi %100 kabul edilerek hesaplanmıştır.

4. BULGULAR

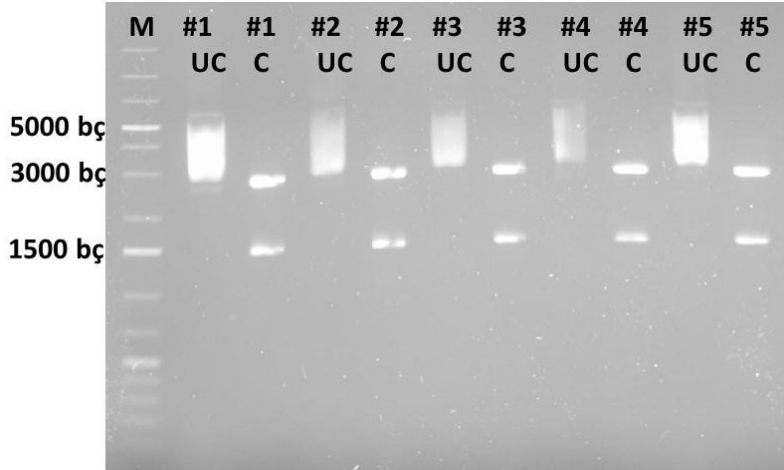
4.1. pUC57-AnAMY vektörünün *E. coli* hücrelerine transformasyonu ve doğrulanması

Aspergillus niger α -amilaz DNA'sını taşıyan pUC57-AnAMY plazmidli liyofilize şekilde laboratuvarımıza geldikten sonra ve *E. coli* NEB5 α hücrelerine transforme edilmiş ve transformant hücrelerin seçilimi amfisilinli LB Miller agar plakalarda gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.1.). Beklendiği üzere, bünyesinde pUC57-AnAMY ekspresyon kasedini bulundurmayan boş konakçı *E. coli* NEB5 α hücreleri gelişmemiş ve pUC57-AnAMY plazmidini bulunduran *E. coli* NEB5 α hücreleri antibiyotikli seçim ortamında gelişmiştir.



Şekil 4. 1. pUC57-AnAMY vektörünün yetenekli *E. coli* NEB5 α hücrelerine transformasyonu

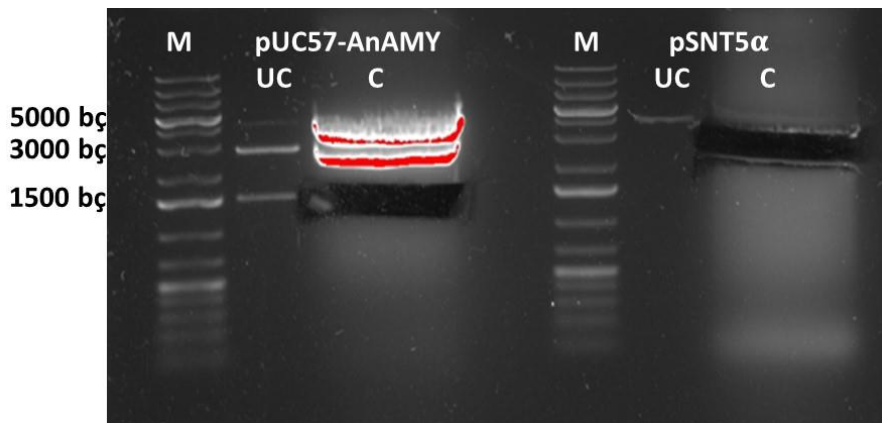
Amfisilinli LB Miller agarda gelişen kolonilerden 10 tane seçilerek aynı sırayla numaralandırılmış transformantlar LB miller sıvı besiyerinde geliştirilerek stok kültür hazırlanmış ve plazmid izolasyonları yapılarak kontrol edilmiştir. Seçilen *E.coli* NEB5 α pUC57-AnAMY transformant hücrelerinden 5 tanesinden plazmit izolasyonu yapılmış ve plazmitler *Xho*I ve *Not*I restriksiyon enzimleriyle kesilerek doğrulanmıştır. Restriksiyon enzimleriyle kesimleme sonucu beklenen fragmentler 2717 bp ve 1447 bp olup agaroz jelde görüntülenmiştir (Şekil 4.2.). Agaroz jel sonucuna göre doğrulanan plazmitlerden #1 nolu plazmit seçilerek çalışmalara devam edilmiştir.



Şekil 4. 2. pUC57-AnAMY plazmitlerinin *XhoI* ve *NotI* restriksiyon enzimleri ile kesimi. M: GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD), sırasıyla 1, 2, 3, 4 ve 5 nolu plazmitlerin enzimlerle kesilmemiş ve enzimlerle kesilmiş halleri yüklenmiştir.

4.2. pSNT5α vektörünün ve AnAMY genine ait DNA parçasının jelden ekstraksiyonu

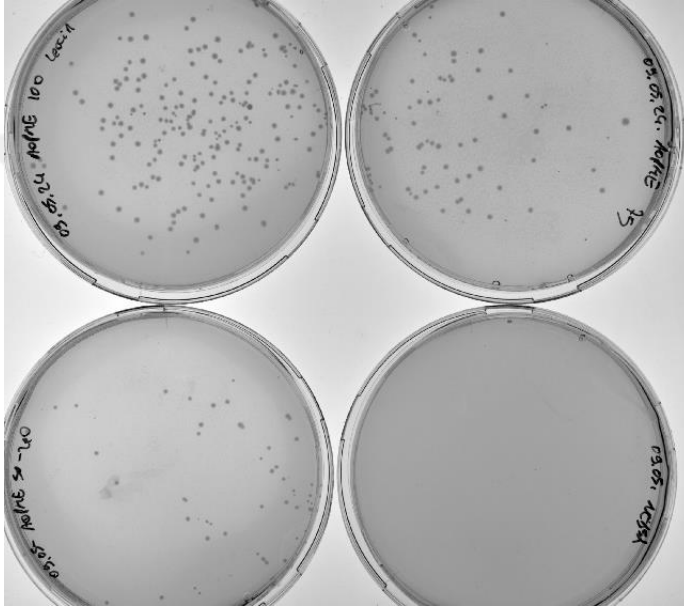
pSNT5α ve pUC57-AnAMY plazmitleri daha önce *E. coli* NEB5α hücrelerine transforme edilmiş -80°C stokta bulunan hücrelerden izole edilmiştir. Her iki plazmitte *XhoI* ve *NotI* klonlama enzimleri ile kesilmiştir (Şekil 4.3.). Kesim sonucu reaksiyon karışımı agaroz jele yüklenmiştir. pUC57-AnAMY plazmidi kesildiğinde 2717 bp ve 1447 bp olmak üzere iki farklı fragment elde edilmiş ve α-amilaz enzimini kodlayan DNA bölgesini elde etmek için 1447 bp büyüklüğündeki (AnAMY) bant jelden kesilerek izolasyonu yapılmıştır. Aynı şekilde pSNT5α plazmidi *XhoI* ve *NotI* enzimleriyle kesildiğinde 3605 bp büyüklüğündeki parça jelden kesilerek izole edilmiş ve ligasyona hazır pSNT5α vektörü elde edilmiştir.



Şekil 4. 3. Vektör ve insert parçalarının agaroz jelden kesilmesi M: GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD), pUC57-AnAMY ve pSNT5α plazmitlerinin uncut ve cut halleri sırasıyla jele yüklenmiştir.

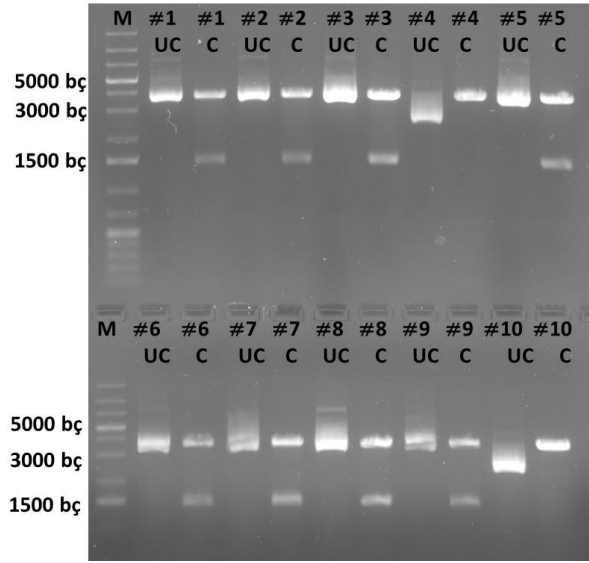
4.3. pSNT5 α -AnAMY ekspresyon vektörünün oluşturulması ve restriksiyon analizi ile doğrulanması

Jelden ekstraksiyonu yapılan ve konsantrasyonları ölçülen pSNT5 α vektörü ve *Aspergillus niger* α -amilaz enzimini kodlayan gen bölgesinin ligasyonu yapılmıştır. Oluşturulan ekspresyon vektörü *E. coli* NEB5 α hücrelerine transforme edilmiş ve transformant hücrelerin seçilimi zeosinli LB Lenox agar plakalarda gerçekleştirilmiştir. Beklendiği üzere, bünyesinde pSNT5 α -AnAMY ekspresyon kasedini bulundurmayan boş konakçı *E. coli* NEB5 α hücreleri gelişmemiş ve pSNT5 α -AnAMY plazmidini bünyesinde bulunduran *E. coli* NEB5 α hücreleri antibiyotikli seçim ortamında gelişmiştir (Şekil 4.4.).



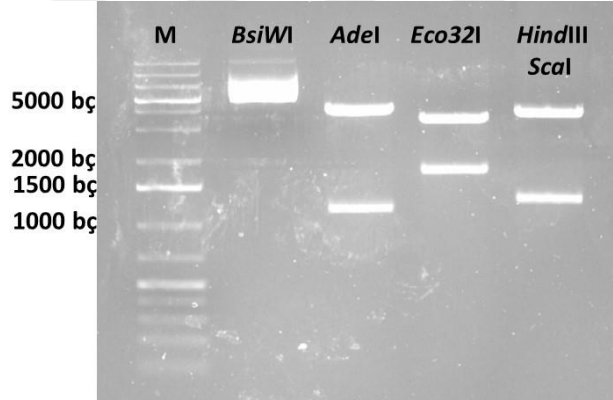
Şekil 4. 4. pSNT5 α -AnAMY ekspresyon vektörünün yetenekli *E. coli* NEB5 α hücrelerine transformasyonu sonucu zeosinli plakalarda gelişen koloniler.

Zeosinli LB Lenox agarda gelişen kolonilerden toplam 10 tane seçilmiş, aynı sırayla numaralandırılmış ve stok kültür hazırlanmıştır. Transformant hücrelerden plazmid izolasyonu yapılarak çoğaltılan plazmidleri doğrulamak amacıyla öncelikle *XhoI*-*NotI* klonlama restriksiyon enzimleriyle kesim reaksiyonu kurulmuştur (Şekil 4.5.). Restriksiyon kesimi sonucu 3605 bp ve 1453 bp fragmentleri beklenmekte olup agaroz jelde kontrol edilmiş ve plazmitlerden 4 ve 10 numaralı plazmit hariç geri kalan 8 tane plazmit doğrulanmıştır.



Şekil 4.5. pSNT5α-AnAMY ekspresyon vektörünün *XhoI* ve *NotI* restriksiyon enzimleriyle doğrulanması. M: GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD). Plazmitler numara sırasına göre uncut ve cut şekilde yüklenmiştir.

Doğrulanmış plazmitlerden 7 numaralı plazmit seçilmiş ve plazmidi farklı bölgelerden kesen *BsiWI*, *Adel*, *Eco32I*, *HindIII-ScaI* enzimleri ile tekrar kesim reaksiyonu kurulmuştur (Şekil 4.6.). Bu enzimlerle kesim sonucu beklenen fragmentler şu şekildedir: *BsiWI*: 5055 bp, *Adel*: 3895 bp- 1160 bp, *Eco32I*: 3327 bp- 1728 bp, *HindIII-ScaI*: 3756 bp- 1299 bp

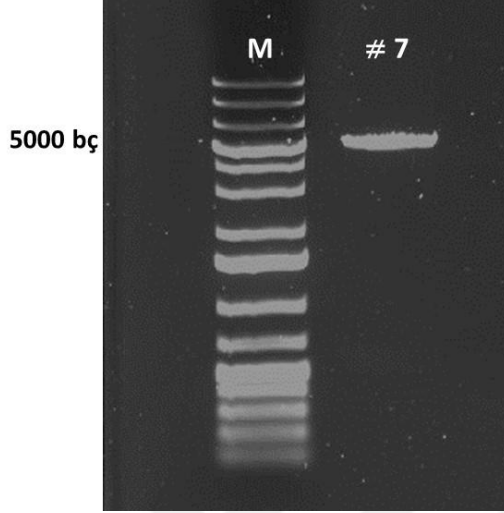


Şekil 4. 6. pSNT5α-AnAMY ekspresyon vektörünün *BsiWI*, *Adel*, *Eco32I*, *HindIII-ScaI* enzimleriyle doğrulanması M: GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD).

Restriksiyon analizi sonucu beklenen fragmentler agaroz jelde görüntülenmiş ve 7 nolu plazmit doğrulanarak *Pichia* hücrelerine transformasyon işlemine geçilmiştir.

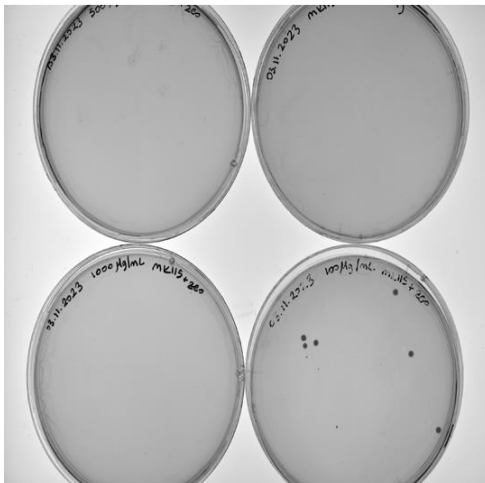
4.4. pSNT5 α -AnAMY ekspresyon vektörünün lineer hale getirilmesi ve *P. pastoris* MK115-PDI suşuna transformasyonu

pSNT5 α -AnAMY ekspresyon vektörünün MK115-PDI suşuna transforme edilmesi için vektörü tek bir noktadan kesen *Bsi*WI enzimi ile kesilerek lineer hale getirilmiş ve agaroz jelde görüntülenmiştir (Şekil 4.7.).



Şekil 4.7. *Bsi*WI restriksiyon enzimiyle lineer edilen pSNT5 α -AnAMY ekspresyon vektörünün agaroz jel görüntüsü M: GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD).

Lineer hale geldiği görülen ekspresyon vektörü kompetent *P. pastoris* MK115-PDI hücrelerine elektroporasyon yöntemiyle transforme edilmiştir. Transformasyondan sonra farklı konsantrasyonlarda zeosin (100 μ g/mL, 500 μ g/mL ve 1000 μ g/mL) içeren YPD plakalara ekim yapılarak gelişime bırakılmıştır (Şekil 4.8.). Sadece 100 μ g/mL zeosin içeren plakada koloni gelişimi gözlenmiş ve 10 tane klon seçilerek ve teke düşürme çizimleri yapıldıktan sonra rekombinant protein ekspresyonu çalışmalarına geçilmiştir.



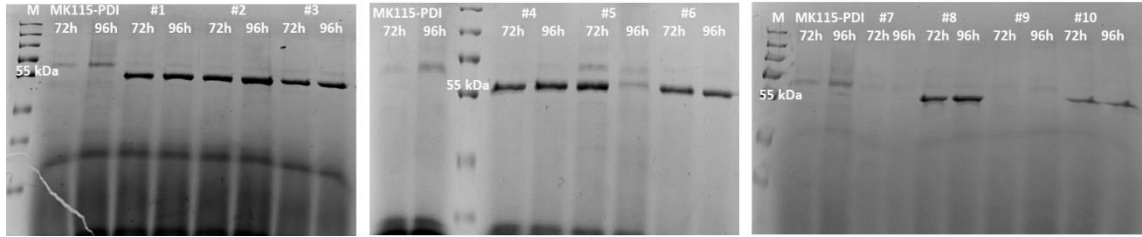
Şekil 4. 8. Lineer edilen pSNT5 α -AnAMY ekspresyon vektörünün *P. pastoris* MK115-PDI hücrelerine transformasyonu.

4.5. Engelli Erlenmayer Ölçeğinde α -Amilaz Üretimi

Teke düşürme çizimi yapılan 10 farklı klon ile engelli erlenmayer ölçeğinde rekombinant protein üretimi yapılarak α -amilaz enzimi üreten klon tespit edilmiştir. Klonlar YPD sıvı besiyerinde geliştirildikten sonra BMGY (pH 6.0) besiyerine alınmış OD₆₀₀ absorbans değerleri 12-13 olana kadar geliştirilmiş, ardından BMEY (pH 6.0) besiyerine transfer edilerek 96 saat boyunca protein üretimi *P. pastoris* hücrelerinin normal gelişim şartları olan pH 6.0, 28 °C sıcaklık ve 225 rpm karıştırma hızında çalkalamalı inkübatörde yapılmıştır (Şekil 4.9.). Üretimin 72 ve 96. saatlerinde alınan örneklerden elde edilen süpernatantlar SDS-PAGE ile analiz edilmiştir (Şekil 4.10.).



Şekil 4. 9. Çalkalamalı inkübatörde engelli erlenlerde α -amilaz enzimi üretimi



Şekil 4. 10. α -amilaz enzimi üretimi için klonların taranması

Şekil 4.10'da görüldüğü gibi 10 farklı klon taranmış, 7 ve 9 nolu klonlar dışında bütün klonlarda α -amilaz enziminin üretildiği 58 kDa büyüklüğündeki protein bandının SDS-PAGE jelinde tespit edilmesiyle belirlenmiştir. α -amilaz genini içermeyen MK115-PDI suşu negatif kontrol olarak kullanılmış ve 58 kDa büyüklüğündeki protein bandı MK115-PDI suşuna ait süpernatant örneğinde tespit edilmemiştir.

4.6. Lugol çözeltisi ile klonların α -amilaz üretiminin kontrolü

Üretime alınan 10 klonun ayrıca ME agar+nişasta plakalarına ekimi yapılarak gelişime bırakılmış ve 2 gün sonunda lugol çözeltisi eklenerek α -amilaz enzimi üreten klonlar doğrulanmıştır (Şekil 4.11.). Lugol çözeltisi eklendiğinde etrafında şeffaf zon oluşturan klonların α -amilaz enzimi ürettiği bilinmektedir. Elde edilen sonuçlar SDS-PAGE sonuçlarıyla birbirini doğrulamaktadır. Şekil 4.11'de görüldüğü gibi 7 ve 9 nolu klonların etrafında zon oluşumu gözlemlenmemiş, diğer bütün klonlarda zon oluşmuştur. α -amilaz genini içermeyen MK115-PDI suşu negatif kontrol olarak kullanılmış ve etrafında zon oluşumu tespit edilmemiştir.

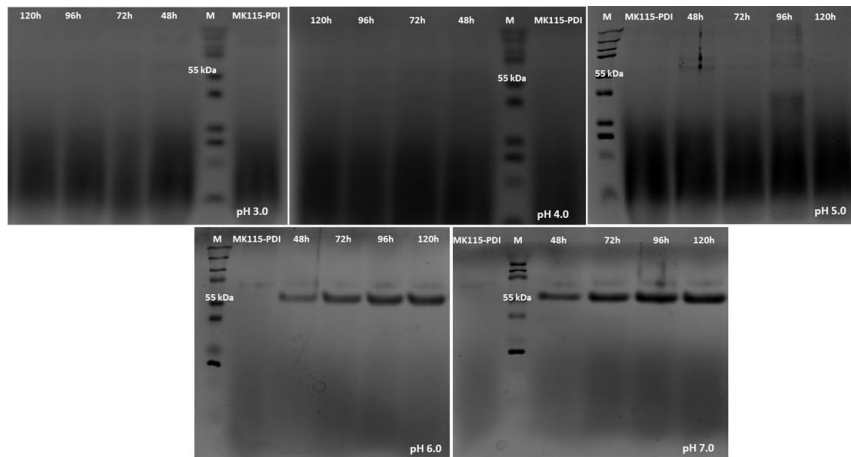


Şekil 4. 11. α -amilaz ekspresyonunun (a) etanol ilaveli plakalara ekilmesi (b) lugol çözeltisi ile ME+nişasta agar plakalarda tespit edilmesi.

En iyi protein üretiminin yapıldığı pH ve sıcaklığı belirlemek için SDS-PAGE ve lugol testi sonuçlarına göre 2 numaralı klon optimizasyon çalışmaları için seçilmiştir.

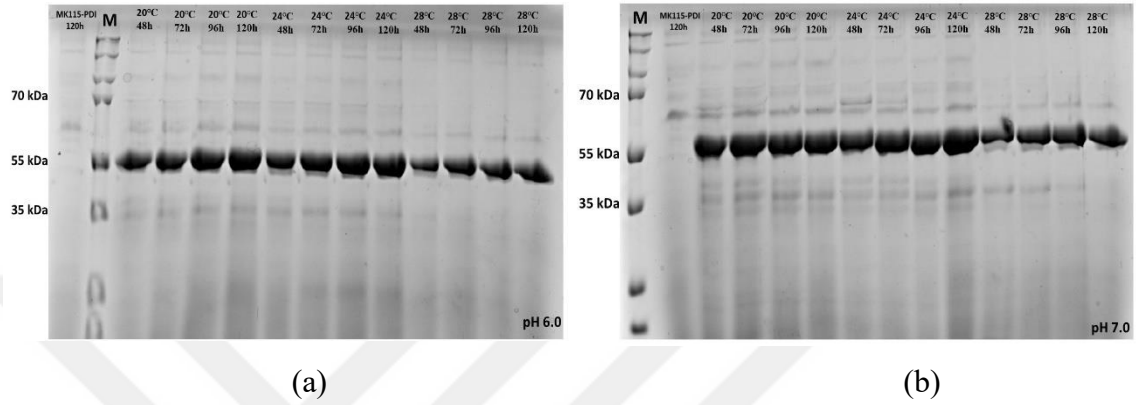
4.7. α -amilaz üretim koşullarının optimizasyonu

α -amilaz enzimini ürettiği tespit edilen 2 numaralı klon ile öncelikle 3, 4, 5, 6 ve 7 pH'larında 28 °C sıcaklıkta protein üretimi yapılmıştır. Negatif kontrol olarak kullanılmak üzere üretim yapılan bütün pH'larda MK115-PDI suşuda geliştirilmiştir. Üretimler 120 saat sürmüş ve üretim boyunca her 24 saatte bir örnek alınmış, santrifüj edilerek süpernatantlar toplanmış ve örnekler SDS-PAGE ile analiz edilmiştir (Şekil 4.12.). SDS-PAGE jel görüntüleri incelendiğinde α -amilaz enziminin pH 6.0 ve pH 7.0 koşullarında çok iyi üretildiği ancak asidik pH'larda (3, 4 ve 5) enzim üretiminin olmadığı tespit edilmiştir.



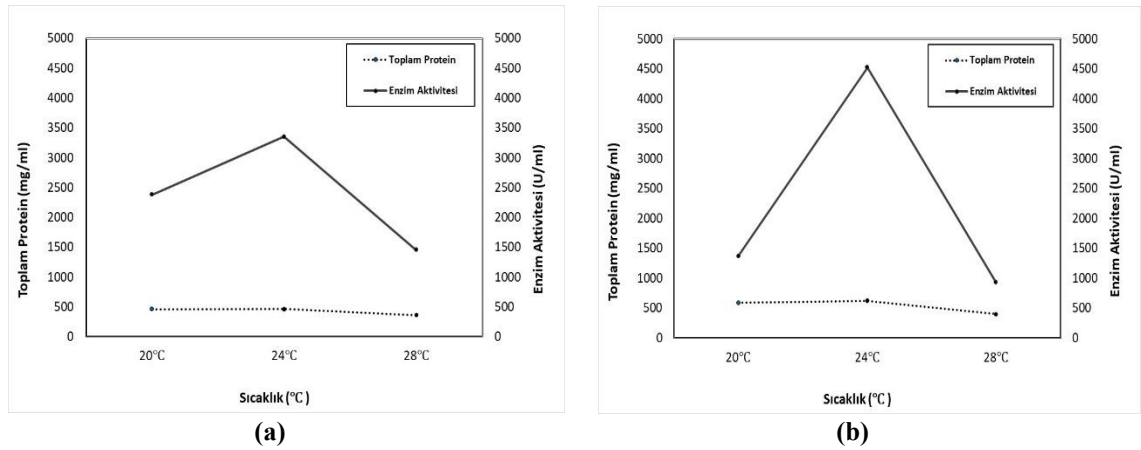
Şekil 4. 12. *P. pastoris* #2 klonunun farklı pH'larda (pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 ve 7.0) α -amilaz enzimi üretimi. M: PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, ABD). MK115-PDI: Negatif kontrol. Her bir pH için sırasıyla; 48, 72, 96 ve 120. saat örnekleri SDS-PAGE jeline yüklenmiştir.

SDS-PAGE analizi ve α -amilaz enzim aktivitesi sonuçları birlikte değerlendirildiğinde; farklı sıcaklık denemeleri pH 6 ve pH 7 koşullarında üretim yapılarak optimize edilmiştir. α -amilaz enziminin optimum üretim sıcaklığını tespit etmek amacıyla üretim pH'ları 6 ve 7'de sabit tutularak 20 °C, 24 °C ve 28 °C sıcaklık koşullarında protein ekspresyonu yapılmıştır. Üretimler 120 saat sonunda tamamlanmış ve alınan örnekler SDS-PAGE ile analiz edilmiştir (Şekil 4.13.).



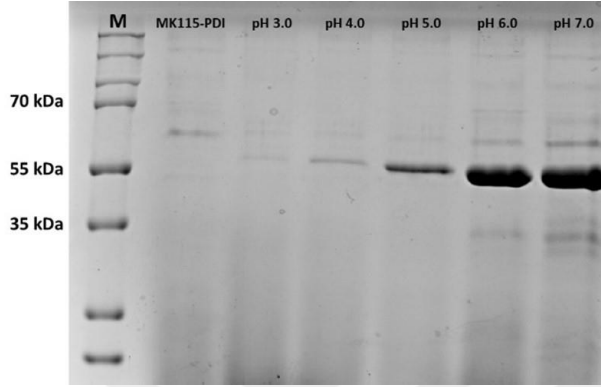
Şekil 4. 13. *P. pastoris* #2 klonunun (a) pH 6.0'da farklı sıcaklıklarda (20°C, 24°C, 28°C) (b) pH 7.0'de farklı sıcaklıklarda (20°C, 24°C, 28°C) α -amilaz enzimi üretimi. M: PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, ABD). MK115-PDI: Negatif kontrol

Toplanan örneklerden ayrıca farklı sıcaklık denemeleri ve pH 6.0 ve pH 7.0 koşullarında α -amilaz enziminin aktivitesi ve toplam protein sonuçlarına bakıldığında; α -amilaz enziminin optimum üretim sıcaklığının 24°C olduğu saptanmıştır. 24°C pH 6.0'da toplam protein 463 mg/ml, enzim aktivitesi 3349 U/ml; 24°C pH 7.0'da ise toplam protein 623 mg/ml, enzim aktivitesi 4519 U/ml olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.14.).



Şekil 4. 14. *P. pastoris* #2 klonunun a) pH 6.0'da farklı sıcaklıklarda (20°C, 24°C, 28°C) b) pH 7.0'de farklı sıcaklıklarda (20°C, 24°C, 28°C) toplam protein ve α -amilaz enzim aktivitesi.

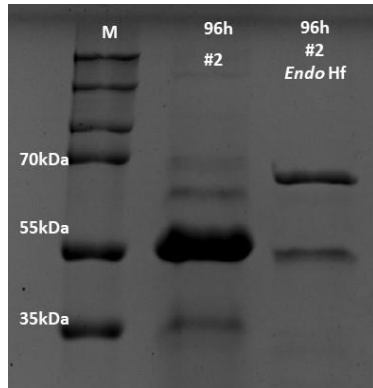
Erlenmayer ölçeğinde farklı sıcaklık ve farklı pH'lar altında enzim üretimi yapılarak optimum üretim koşulları belirlenmiştir. Yapılan bütün analizlere göre *P. pastoris* MK115-PDI suşunda SNT5 promotörü kontrolünde rekombinant α -amilaz enziminin en iyi üretim koşullarının pH 7.0 ve 24°C olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.15.). Elde edilen bu verilerle biyoreaktörde üretim yapılması planlanmış dolayısıyla üretimler tamamlandıktan sonra kültürün pH'sı yeniden ölçülmüş ve üretim sonunda kültürlerin pH'sının bir derece düştüğü tespit edilmiştir. Bu sebeple biyoreaktörde üretim için optimum pH 6 sıcaklık ise 24°C olarak seçilmiştir.



Şekil 4. 15. *P. pastoris* #2 klonunun 24°C sıcaklık ve farklı pH'larda (3.0, 4.0, 5.0, 6.0 ve 7.0) α -amilaz enzimi üretiminin SDS-PAGE görüntüsü.

4.8. α -Amilaz enziminin EndoHf ile deglikozilasyonu

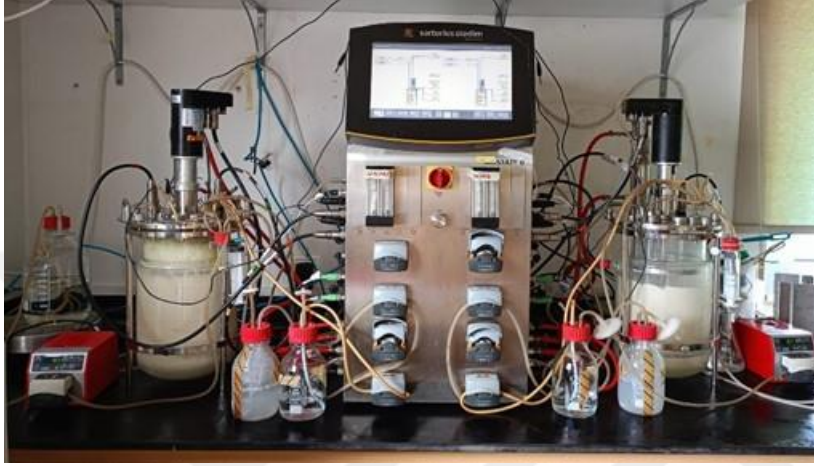
SDS-PAGE analizi sonucu elde edilen jel görüntülerinde rekombinant α -amilaz enzimine ait bantlara ek olarak çoğul bantlar olduğu gözlenmiştir. Bunun nedeninin proteinin glikozilasyona uğraması ve *P. pastoris* mayası tarafından hücre dışına salgılanması sonucunda olabileceği düşünülmüştür. Glikozilasyonun tespiti ve glikolize olmayan rekombinant proteinin molekül ağırlığının doğrulanması için önce protein denatüre edilip ardından *EndoHf* enzimi ile muamele edilmiş ve SDS-PAGE analizi ile tekrar görüntülenmiştir (Şekil 4.16.). SDS-PAGE analizi değerlendirildiğinde proteinin bant büyüklüğünde bir değişiklik görülmemiş, dolayısıyla proteinin glikolizasyona uğramadığı tespit edilmiştir.



Şekil 4. 16 α -Amilaz enziminin *EndoHf* ile deglikozilasyonunun SDS-PAGE görüntüsü.

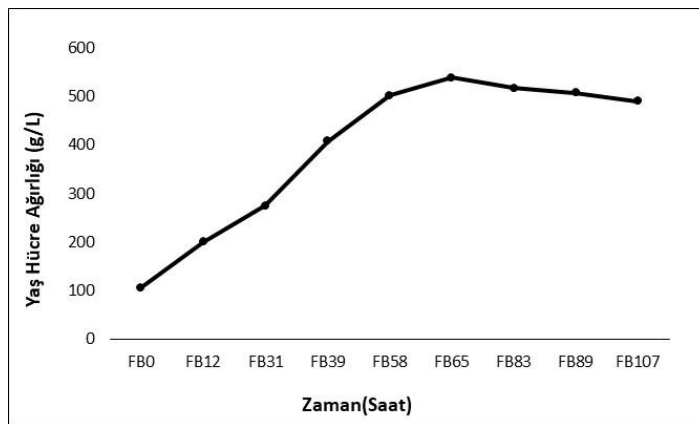
4.9. Biyoreaktörde α -amilaz enzimi üretimi

Biyoreaktörde α -amilaz enziminin büyük ölçekte üretilmesi için besiyeri ve fermantasyon koşulları *Pichia* Fermentation Process Guidelines'a uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Fermantasyon çalışmaları, engelli erlen üretiminde en iyi olduğu belirlenen klon ile iki hazneli 5 L Biostat B (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Almanya) biyoreaktöründe kesikli ve yarı kesikli (besleme) olmak üzere iki aşamada gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.17.).



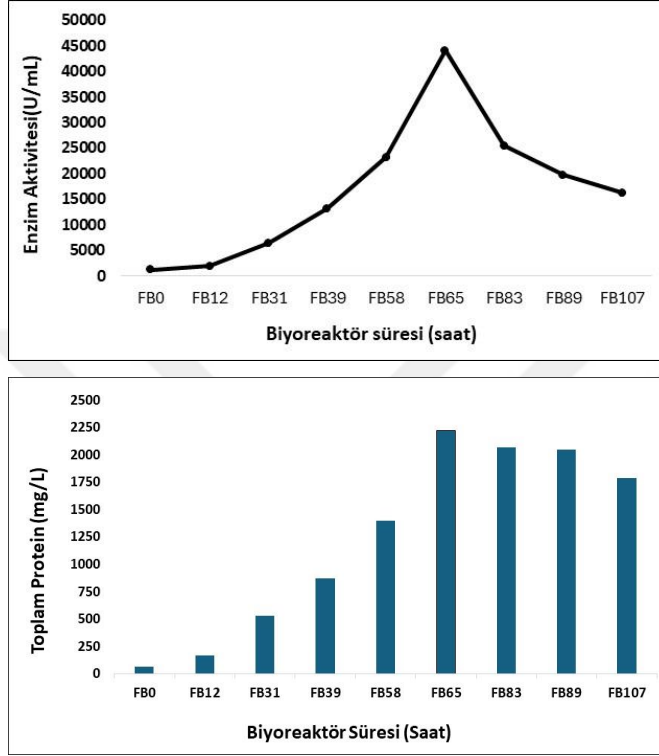
Şekil 4. 17. Çalışmadaki fermantasyonların gerçekleştirildiği Biostat B biyoreaktörü

Rekombinant *A. niger* α -amilaz enziminin üretimi için belirlenen optimum üretim şartlarında (pH 6.0 ve 24 °C) 5 L ölçekli biyoreaktörde protein üretimi gerçekleştirilmiştir. İki aşamalı fermantasyon stratejisi uygulanmıştır. Birinci aşama kesikli faz olup bu aşamada 24 saatlik gelişim sonunda yaş hücre ağırlığı (Wet Cell Weight, WCW) 106 g/L'ye ulaşmıştır (Şekil 4.18.). Fermantasyonun 2. aşaması olan yarı-kesikli faz 107 saatte tamamlanmış ve bu aşamada WCW değeri 490 g/L olarak hesaplanmıştır.

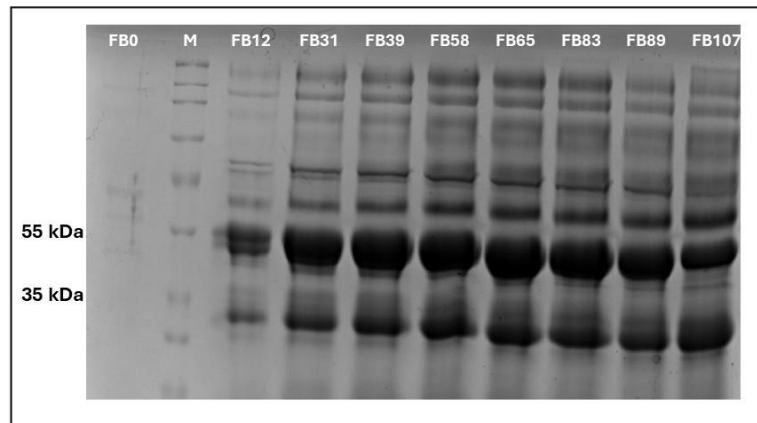


Şekil 4. 18. İki aşamalı fermantasyon boyunca hücre gelişimi

Fermantasyon boyunca farklı zamanlarda alınan örneklerde toplam protein ve enzim aktivitesi ölçümleri (Şekil 4.19.) ve SDS-PAGE analizi (Şekil 4.20.) yapılmıştır. 107 saatlik fermantasyon sonunda en yüksek sonuçlar 65. saatte bulunmuştur. En yüksek toplam protein 2223 mg/L ve enzim aktivitesi 44062 U/mL olarak tespit edilmiştir. SDS-PAGE jeli incelendiğinde ise 58 kDa büyüklüğündeki protein bantlarının fermantasyon boyunca arttığı görülmüştür.



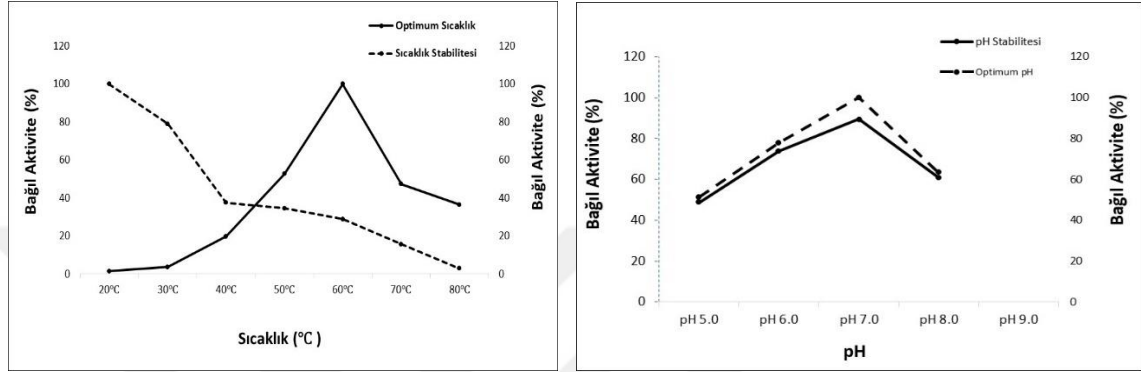
Şekil 4. 19. 5L'lik biyoreaktörde SNT5 promotörü kontrolü altında yapılan rekombinant α -amilaz ekspresyonunun enzim aktivitesi ve toplam protein miktarı



Şekil 4. 20. 5L'lik biyoreaktörde SNT5 promotörü kontrolü altında yapılan rekombinant α -amilaz ekspresyonunun SDS-PAGE analizi.

4.10. Rekombinant α -amilaz enziminin biyokimyasal karakterizasyonu

Sıcaklığın α -amilaz aktivitesi üzerindeki etkisi 20-80 °C arasındaki sıcaklıklar kullanılarak belirlenmiştir. Enzim 60°C'de optimum aktivite göstermiştir (Şekil 4.21.). α -amilaz aktivitesinin 60°C'ye kadar yavaş yavaş yükseldiği, daha sonra 60°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda aktivitenin keskin bir şekilde düştüğü gözlemlenmiştir. (Şekil 4.22.), α -amilaz enziminin termal stabilitesi düşünülerek dikkate alındığında, 20-50°C arasında enzim aktivitesinde yaklaşık %40'lık bir düşüş olduğu görülmektedir. 60°C'den sonra, enzim aktivitesi yaklaşık %70'lik bir azalma ile sabit kalmıştır.



Şekil 4. 21. Sıcaklık ve pH'nın α -amilaz enziminin aktivitesi ve stabilitesi üzerine etkileri.

Optimum pH, standart test koşulları altında pH 5-9 aralığında ve 50 °C'de belirlenmiştir. Enzimin optimum pH'sı 7.0 olarak bulunmuştur (Şekil 4.21). Asitlik azaldıkça enzim aktivitesinde ve stabilitesinde artış görülürken, alkali pH aralığında daha düşük enzim aktivitesi gözlenmiştir. pH 9.0'da enzim aktivitesi tespit edilememiştir. Rekombinant α -amilaz pH 5.0-8.0 aralığında stabilitesini korurken pH 9.0'da enzimin stabilitesini kaybettiği tespit edilmiştir (Şekil 4.21).

5. TARTIŞMA

α -amilaz önemli bir endüstriyel enzimdir. Günden güne amilaza olan talep endüstriyel, gıda, ziraat vb. alanlarda artmaktadır ve çeşitli endüstriyel uygulamalarda kullanımı için enzimin ekonomik üretimi esastır.

Bu tezin amacı; metilotrofik bir maya olan *P. pastoris*'te gıda endüstrisinde kullanılan amilaz enziminin etanol ile indüklenebilen sentetik bir ADH promotörü olan SNT5 promotörü kontrolünde ilk kez üretilerek hücre dışına salgılanmasıdır. SNT5 promotörü henüz çok yeni bir promotör olup rekombinant protein üretiminde yüksek verim için umut vermektedir. Çalışmada üretilmiş olan amilaz enzimi için gen kaynağı olarak *Aspergillus niger* seçilmiştir. Çünkü ticari olarak satılan Amylase AG 300L (Novozymes, Danimarka) ve meyve suyu üretiminde kullanılan enzimler bu mikroorganizmalardan elde edilmektedir.

Çalışmada üretilen enzimlerin ticari enzimlere muadil olabilmesi için aynı gen kaynağı seçilmiştir. SNT5 promotörü kontrolünde ticari enzimle aynı gen kaynağına sahip rekombinant amilaz enziminin üretimi için endüstriyel ölçekte uygulanabilecek bir biyoproses ilk kez bu çalışma ile geliştirilmiştir. Buna ek olarak üretilen enzimin laboratuvar ölçeğinde araştırılması ve moleküler yöntemlerle rekombinant üretiminin geliştirilerek, endüstriyel üretime uyarlanabilmesi için temel veriler elde edilmiştir.

Klonlama sonucunda oluşturulan #2 numaralı klon; engelli erlenmayer ölçeğinde, 24°C, pH 6.0 (pH değeri üretim için en uygun olarak belirlenmiştir.) ve 225 rpm koşullarında, 96 saat boyunca, %1 etanol ile indüklenerek α -amilaz enzimi üretilmiştir. #2 numaralı klonun amilaz aktivitesi 3349 U/mL ve protein konsantrasyonu 463 mg/mL olarak hesaplanmıştır. #2 numaralı klon, 5 L hacimli biyoreaktörde, 24°C, pH 6.0 ve etanol ile indüklenerek 107 saat boyunca rekombinant α -amilaz üretimi gerçekleştirilmiştir. Biyoreaktörde üretim sonucunda, α -amilaz enzimi zamana bağlı olarak artış göstermiş ve en yüksek aktivite 65. saatte 44062 U/mL olarak hesaplanmıştır. Toplam protein miktarı ise 2223 mg/L'ye ulaşmıştır. Engelli erlen ile biyoreaktör üretimi karşılaştırıldığında α -amilaz enzim aktivitesinin yaklaşık 13 kat arttığı gözlemlenmiştir.

Kato ve ark., (2001) tarafından yapılan çalışmada fare tükürüğünden α -amilaz geni (olgun form) izole edilmiştir. Bu çalışmada amilaz enziminin rekombinant üretimi, *P. pastoris* GS115 suşunda AOX1 promotörünün kontrolü altında yapılmış, 154.7 U/mL enzim aktivitesi ve 240 mg/L protein elde edilmiştir.

Parashar ve Satyanarayana (2016) tarafından yapılan çalışmada, *B. acidicola* TSAS1 kaynaklı rekombinant α -amilaz üretimi için hem AOX1 promotörü (Amy-AOX) hem de AOX1 ve GAP promotörünün her ikisini de içeren (Amy-GAP-AOX) ekspresyon vektörü *P. pastoris* X-33 suşuna klonlanmış ve 1 kopya olan Amy-AOX ile 3 kopya olan Amy-GAP-AOX klonları fermentör koşullarında üretime alınmıştır. α -amilaz aktiviteleri; Amy-AOX ile 130 U/mL (1080 U/g), Amy-GAP-AOX ile 245 U/mL (1890 U/g) olarak saptanmıştır.

Zeng ve ark. 2011 tarafından yapılan çalışmada *A. niger* α -amilaz enzimi *P. pastoris*'te metanol ile indüklenebilen AOX1 promotörü kontrolünde engelli erlenmayer ölçeğinde 168 saat boyunca üretilmiştir. Fermantasyon sonunda 2838 U/mL enzim aktivitesi elde edilmiştir. Yapılan çalışmada rekombinant enzimin moleküler ağırlığı 58 kDa olarak tespit edilmiştir. Enzimin maksimum aktivite gösterdiği koşullar pH 4 ve 70°C sıcaklık olarak belirlenmiştir.

Bacillus licheniformis'in gen kaynağı olarak kullanıldığı başka bir çalışmada ise, α -amilaz geni *P. pastoris*'e göre kodon optimize şekilde klonlanmıştır. Enzim üretimi AOX1 promotörü kontrolünde yapılmıştır. 5 ve 50 L'lik biyoreaktörlerde yapılan üretimler sonucunda sırasıyla 8100 ve 11000 U/mL enzim aktivitesi elde edilmiştir. Yapılan bu çalışma kodon optimize gen kullanımı ile yabancıl tip gene göre 2.3 kat daha fazla enzim üretildiğini göstermiştir (Wang ve ark., 2015).

Wang ve ark. (2019) tarafından yapılan çalışmada *Thermomyces dupontii* L18 , α -amilaz geni *P. pastoris* GS115 hücrelerine transforme edilmiş ve yapılan protein ekspresyonu çalışması sonunda 38.314 U/mL enzim aktivitesi elde edilmiştir. SDS-PAGE analizine göre rekombinant enzimin moleküler ağırlığı 59.2 kDa olarak tespit edilmiştir. Enzim maksimum aktivitesini pH 6.5 ve 60°C sıcaklıkta göstermiştir.

B. subtilis PY22 α -amilaz enziminin rekombinant üretiminin *P. pastoris*'te yapıldığı çalışmada metanol ile indüklenebilen AOX1 promotörü kullanılmıştır (Karakaş ve ark. 2010). 72 saat boyunca engelli erlenlerde yapılan çalışma sonunda amilaz enzim aktivitesi 44 U/mL ve toplam protein miktarı 22 mg/mL olarak tespit edilmiştir. Rekombinant proteinin moleküler ağırlığı yaklaşık olarak 60 kDa olarak belirlenmiştir. 60°C sıcaklık ve pH 7 altında enzimin maksimum aktiviteye ulaştığı görülmüştür.

B. subtilis PY22 α -amilaz geni ile yapılan başka bir çalışmada ise rekombinant protein üretimi *P. pastoris* GS115 suşunda SNT5 promotörü kontrolünde gerçekleştirilmiştir (Güllü, 2020). Doksan altı saat boyunca engelli erlenlerde protein üretilmiş ve aktivitesi 215 U/mL olarak hesaplanmıştır. 5L ölçekli biyoreaktörde yapılan üretim sonunda ise 90. saatte 2219 U/mL enzim aktivitesi elde edilmiştir. Ayrıca yapılan SDS-PAGE analizi ile rekombinant proteinin moleküler ağırlığı 70 kDa olarak tespit edilmiştir. Enzimin optimum çalışma koşulları ise 60°C sıcaklık ve pH 7 olarak belirlenmiştir.

Rydberg ve ark., (1999), tarafından, *P. pastoris* GS115'te insan pankreasından izole edilen α -amilaz enziminin ekspresyonu yapılmış ve proteinin 56 kDa büyüklüğünde olduğu bulunmuştur.

İncelenen çalışmalarda proteinin (α -amilaz enzimi) moleküler ağırlığının genellikle **50-70 kDa** arasında değiştiği gözlenmiştir. Enzimin karakteristik özelliklerinden biri olan moleküler ağırlığın, izole edildiği kaynağa ve üretilen proteinin glikolize yapıda olma durumuna göre farklılık gösterdiği sonucuna varılmıştır.

Üretilen rekombinant α -amilaz aktivitesi üzerinde sıcaklığın etkisi 20-80 °C arasındaki sıcaklıklar kullanılarak belirlenmiştir. Enzim 60°C'de optimum aktivite göstermiştir. α -amilaz aktivitesinin 60°C'ye kadar yavaş yavaş yükseldiği, daha sonra 60°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda aktivitenin keskin bir şekilde düştüğü gözlemlenmiştir.

20-50°C arasında enzim aktivitesinde yaklaşık %40'lık bir düşüş olduğu görülmektedir. 60°C'den sonra, enzim aktivitesi yaklaşık %70'lik bir azalma ile sabit kalmıştır. Optimum pH, standart test koşulları altında pH 5.0-9.0 aralığında ve 50 °C'de belirlenmiştir. Enzimin optimum pH'sı 7.0 olarak bulunmuştur. Asitlik azaldıkça enzim aktivitesinde ve stabilitesinde artış gözlenmiştir. pH 9.0'da enzim aktivitesi tespit edilememiştir. Rekombinant α -amilaz pH 5.0-8.0 aralığında stabilitesini korurken pH 9.0'da enzimin stabilitesini kaybettiği tespit edilmiştir.

Liu ve Xu (2008) tarafından yapılan çalışmada, *Bacillus* sp. YX1'den elde edilen α -amilazın özellikleri ve enzimin satbil olduğu sıcaklıklar araştırılmıştır. Test edilen değerler 40 ila 50 °C arasındadır ve 60 °C'nin üzerinde aktivitede keskin bir düşüş gözlemlendiği bildirilmiştir. Enzimin optimum pH 5'de çalıştığı ve 1 saat boyunca pH 4.5 ile 11 arasında tutulduğunda aktivitesinin %80'inin korunduğunu anlaşılmıştır.

Yapılan çalışmaların değerlendirilmesi sonucunda, α -amilaz enziminin optimum çalışma koşullarının genellikle 40°C-60°C ve pH 5.0-8.0 arasında değiştiği gözlenmiştir. Fakat hem enzimin optimum koşulları hem de pH ve sıcaklık stabilitesi enzimin kaynağına göre değişiklik göstermektedir. Sıcaklık ve pH gibi parametrelerinin enzimin kullanıldığı alanlarda önemli olması sebebi ile α -amilazın kullanımında; istenilen özelliklere sahip enzim kaynağı tercih edilmekte veya protein mühendisliği vb. teknikler kullanılarak istenilen özellikte enzimler tasarlanmaktadır. Bu çalışma sonucu elde edilen mikrobiyal kaynaklı rekombinant α -amilaz enziminin; gıda, tekstil, ilaç, biyoyakıt üretimi vb. alanlarda kullanıma uygun olduğu saptanmıştır.

6. SONUÇLAR

Bu çalışmada, *A. niger* α -amilaz enzimi metilotrofik bir maya olan *P. pastoris*'te etanol ile indüklenebilir SNT5 promotorunun kontrolü altında ekstraselüler olarak üretilmiştir. Bu amaçla *P. pastoris*'e göre kodon optimizasyonu yapılan α -amilaz geni pSNT5 α vektörüne genetik mühendisliği teknikleri kullanılarak yerleştirilmiş ve pSNT5 α -AnAMY ekspresyon vektörü oluşturulmuştur. Rekombinant proteinin hücre dışı üretiminin hedeflendiği bu çalışmada, verimin artırılabilmesi ve çalışmanın temel amacı doğrultusunda yüksek miktarda enzim üretimine ulaşılabilmek amacıyla; enzimin doğru bir şekilde katlanarak 3 boyutlu yapısını kazanmasını ve disülfid bağı oluşumunu katalize ederek hücre dışı sekresyonu artırıcı etkisi olduğu daha önceki çalışmalarda ispatlanmış PDI şaperonu kullanılmıştır. Oluşturulan ekspresyon vektörü 4 kopya PDI şaperon proteini içeren *P. pastoris* MK115-PDI suşuna transforme edilmiştir. Oluşturulan klonun rekombinant α -amilaz enzimi üretim koşulları optimize edilerek, 5L'lik biyoreaktörde iki aşamalı fermantasyon yapılmış ve 58 kDa büyüklüğündeki α -amilaz enziminin üretimi gerek yapılan SDS-PAGE analizleri gerekse toplam protein ve enzim aktivitesi ölçüm sonuçlarıyla gösterilmiştir. Yapılan bütün bu çalışmalar sonucunda elde edilen çıktılar şu şekilde özetlenebilir:

1. Transformasyon sonucunda 10 tane klon elde edilmiş ve bu klonların α -amilaz üretimi *P. pastoris* için standart üretim koşullarına karşılık gelen, 28 °C sıcaklık ve pH 6.0'da BMEY besiyerinde gerçekleştirilmiştir. Ekspresyon sonunda örnekler SDS-PAGE ile analiz edilmiş ve #2 numaralı klon üretim klonu olarak seçilmiş ve bundan sonraki çalışmaların hepsinde #2 numaralı klon kullanılmıştır.
2. Sıcaklık (20°C, 24°C ve 28°C) ve pH'nın (pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 ve 7.0) α -amilaz üretimi üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla engelli erlenmayer ölçeğinde üretim yapılmıştır. Sonuçlar, maksimum enzim aktivitesi ve protein konsantrasyonunun 24°C ve pH 6.0 koşullarında elde edildiğini göstermiştir. En yüksek toplam protein konsantrasyonu 463 mg/mL ve α -amilaz enzim aktivitesi 3349 U/mL olarak belirlenmiştir.
3. Üretim koşulları olarak belirlenen 24°C sıcaklık ve pH 6.0 kullanılarak 5L hacimli biyoreaktörde ölçek büyütülerek üretim yapılmıştır. 107 saatlik fermantasyon sonunda en yüksek 65. saate 2223 mg/L protein ve 44062 U/mL enzim aktivitesi elde edilmiştir.
4. Rekombinant α -amilaz enziminin optimum aktivite sıcaklığı 60°C ve optimum aktivite için pH 7.0 olarak belirlenmiştir.

Sonuç olarak; bu çalışmanın sonuçları *P. pastoris*'in rekombinant *A. niger* α -amilaz üretimi için çok uygun bir ekspresyon sistemi olduğunu göstermiştir. Rekombinant α -amilaz üretiminde *P. pastoris*'in etanol ile indüklenebilir SNT5 promotoru ve MK115-PDI suşunun iyi bir kombinasyon oluşturduğu görülmüştür. Biyoreaktörde optimum şartlar altında iki aşamalı fermantasyon protokolü uygulayarak endüstriyel kullanım için yüksek miktarda α -amilaz elde etmek için bir bioproses geliştirilmiştir.

7. KAYNAKLAR

- Ahlawat, S.; Dhiman, S.S.; Battan, B.; Mandhan, R.P.; Sharma, J. (2009). Pectinase production by *Bacillus subtilis* and its potential application in biopreparation of cotton and micropoly fabric. *Process Biochemistry* 44, 521–526.
- Barrero, J.J. Casler, J.C. Valero, F. Ferrer, P. and Glick, B.S. 2018. An improved secretion signal enhances the secretion of model proteins from *Pichia pastoris*. *Microbial Cell Factories*, (17):161.
- Biyogüvenlik Kararı (Karar No:2). Resmi Gazete Sayı:31119. <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2020/05/20200506-8.pdf> Son erişim tarihi: 24.07.2024
- Bruinenberg, P.M.; Hulst, A.C.; Faber, A.; Voogd, R.H. (1996) A process for surface sizing or coating of paper. In: European Patent Application
- Burrell, M.M. 2003. Starch: the need for improved quality or quantity—an overview. *Journal of Experimental Botany*, 54(382): 451-456.
- Cereghino, J.L. and Cregg, J. 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*, (24):45-66.
- Chang, A.Y. Chau, WY. Landas, J.A. and Yvonne, P. 2017. Preparation Of Calcium Competent *Escherichia coli* And Heat-Shock Transformation. *JEMI Methods*, (1):22-25.
- Chen, J. Chen, X. Dai, J. Xie, G. Yan, L. Lu, L. and Chen, J. 2015. Cloning, enhanced expression and characterization of an α -amylase gene from a wild strain in *B. subtilis* WB800. *International Journal of Biological Macromolecules*, (80): 200-207.
- Cherry, H.M. Hossain, T. and Anwar, M.N. 2004. Extracellular glucoamylase from the isolate *Aspergillus fumigatus*, *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 7(11): 1988-1992.
- Chi, Z.; Chi, Z.; Liu, G.; Wang, F.; Ju, L.; Zhang, T. (2009). *Saccharomycopsis fibuligera* and its applications in biotechnology. *Biotechnol Adv* 27, 423-431
- Couto, S.R.; Sanromán, M.A. (2006). Application of solid-state fermentation to food industry- A review. *Journal of Food Engineering* 76, 291-302.
- Das R, Kayastha AM (2019) β -Amylase: general properties, mechanism and panorama of applications by immobilization on nao-structures. *Biocatalysis*. Springer, New York, pp 17-38.
- Delmer, D. P. and Amor, Y. 1995. Cellulose biosynthesis. *The Plant Cell*, 7(7): 987.
- Du, R. Song, Q. Zhang, Q. Zhao, F. Kim, R. C. Zhou, Z. and Han, Y. 2018. Purification and characterization of novel thermostable and Ca-independent α -amylase produced by *Bacillus amyloliquefaciens* BH072. *International Journal of Biological Macromolecules*, (115): 1151-1156.

- Erden-Karaoğlu, F., Karaoğlu, M., Yılmaz, G. Yılmaz, S. ve İnan, M. 2022. Deletion analysis of *Pichia pastoris* alcohol dehydrogenase 2 (ADH2) promoter and development of synthetic promoters. *Biotechnology Journal*, 17(2): 1-14.
- Fidancı, U.R. 2009. Karbonhidratlar, Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Biyokimya Ders Notları. http://80.251.40.59/veterinary.ankara.edu.tr/fidanci/Ders_Notlari/Ders_Notlari/Karbonhidratlar. [Son erişim tarihi: 18.05.2024].
- Gavrilescu, M.; Chisti, Y. (2005). Biotechnology-a sustainable alternative for chemical industry. *Biotechnol Adv* 23, 471-499.
- Ghorai, S.; Banik, S.P.; Verma, D.; Chowdhury, S.; Mukherjee, S.; Khowala, S. (2009). Fungal biotechnology in food and feed processing. *Food Res. Int.* 42, 577–587.
- Gopinath SC, Anbu P, Arshad MK, Lakshmipriya T, Voon CH, Hashim U, Chinni SV (2017) Biotechnological processes in microbial amylase production. *BioMed Res Int* 2017:1-9.
- Guo, Y. Tu, T. Yuan P. Wang, Y. Ren, Y. Yao, B. Luo, H. 2019. High-level expression and characterization of a novel aspartic protease from *Talaromyces leycettanus* JCM12802 and its potential application in juice clarification. *Food Chemistry*, 281(1):197-203.
- Gupta, R.; Gigras, P.; Mohapatra, H.; Goswami, V.K.; Chauhan, B. (2003). Microbial -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochem* 38, 159-1616.
- Güllü, Ş. (2020) *Pichia pastoris*'te rekombinant bakteriyel alfa amilaz üretimi. Yüksek lisans tezi, Akdeniz Üniversitesi, Antalya, s.22.
- Hagenson, M.J. 1991. Production of recombinant proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Food and Bioprocess Technology*, (12):193-212.
- Hannah, L.C. and James, M. 2008. The complexities of starch biosynthesis in cereal endosperms. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(2): 160-165
- Hmidet, N.; El-Hadj Ali, N.; Haddar, A.; Kanoun, S.; Alya, S.; Nasri, M. (2009). Alkaline proteases and thermostable -amylase co-produced by *Bacillus licheniformis* NH1: Characterization and potential application as detergent additive. *Biochemical Engineering Journal* 47, 71–79.
- James, J.A. and Lee, B.H. 1997. Glucoamylases: microbial sources, industrial applications and molecular biology-a review. *Journal of Food Biochemistry*, 21(6): 1-52.
- Janeček, Š. 1994. Sequence similarities and evolutionary relationships of microbial, plant and animal α -amylases. *European Journal of Biochemistry*, 224(2): 519-524.
- Jobling, S. 2004. Improving starch for food and industrial applications. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(2): 210-218.
- John, F. K. 1987. Enzyme technology. In: Rehm, H.J. and Reed, G. (Ed.), *Biotechnology* 7A, Lincoln, UK. pp. 37-62.
- Joshi, V.K. Chauhan, S.K. and Lal, B.B. 1991. "Extraction of juice from peaches, plums and apricot by pectinolytic treatment" *J. Food Proc. Technol*, 28(1): 64–65.

- Karakas, B. Inan, M. and Certel, M. 2010. Expression and characterization of *Bacillus subtilis* PY22 α -amylase in *Pichia pastoris*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 64(3-4): 129-134.
- Karaoğlu, M. 2016b. *Pichia pastoris* etanol metabolizması üzerine çalışmalar. Doktora tezi, Akdeniz Üniversitesi, Antalya, s.109.
- Kato, S. Ishibashi, M. Tatsuda, D. Tokunaga, H. and Tokunaga, M. 2001. Efficient expression, purification and characterization of mouse salivary α -amylase secreted from methylotrophic yeast. *Pichia pastoris*. *Yeast*, 18(7): 643-655.
- Kıran, Ö.E. Çömlekçioğlu, U. ve Dostbil, N. 2006. Bazı mikrobiyal enzimler ve endüstrideki kullanım alanları, *KSÜFen ve Mühendislik Dergisi*, 9 (1):12-19.
- Kilara, A. 1982. Enzymes and their uses in the processed apple industry: a review. *Process Biochemistry*, (17): 35–41.
- Kirk, O.; Borchert, T.V.; Fuglsang, C.C. (2002). Industrial enzyme applications. *Curr Opin Biotechnol* 13, 345-351
- Konsoula, Z. and Liakopoulou-Kyriakides, M. 2007. Co-production of α -amylase and β -galactosidase by *Bacillus subtilis* in complex organic substrates, *Bioresource Technology*, 98(1): 150-157.
- Kumar V (2011) Identification of the sequence motif of glycoside hydrolase 13 family members. *Bioinformation* 6:61-63.
- Lee, B.H. 1996. Fundamentals of Biotechnology, Vch Publishers, Usa, 431p.
- Maarel van der MJE, Veen van der B, Uitdehaag JCM, Lemmhuys H, Dijkhuizen L (2002) Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *Journal of Biotechnology* 94:137-155.
- Martin, C. and Smith, A.M. 1995. Starch biosynthesis. *The Plant Cell*, 7(7): 971.
- Meyer, A.S. Köser, C. ve Adler-Nissen, J. 2001. Efficiency of Enzymatic and Other Alternative Clarification and Fining Treatments on Turbidity and Haze in Cherry Juice. *Food Biotechnology and Engineering Group*, 49(1):3644-3650.
- Mitidieri, S.; Souza Martinelli, A.H.; Schrank, A.; Vainstein, M.H. (2006). Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus niger*: a comparative study with commercial detergent formulations. *Bioresour Technol* 97, 1217-1224
- Moraes, L.M.P.; Filho, S.A.; Ulhoa, C.J. (1999). Purification and some properties of an -amylase glucoamylase fusion protein from *Saccharomyces cerevisiae*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 15, 561-564.
- Morell, M.K. and Myers, A.M. 2005. Towards the rational design of cereal starches. *Current Opinion in Plant Biology*, 8(2): 204-210.
- Mukherjee, A.K.; Borah, M.; Raí, S.K. (2009). To study the influence of different components of fermentable substrates on induction of extracellular -amylase synthesis by *Bacillus subtilis* DM-03 in solidstate fermentation and exploration of feasibility for inclusion of - amylase in laundry detergent formulations. *Biochem. Eng. J.* 43, 149– 156

- Negi, S. and Banerjee, R. (2010). Optimization of culture parameters to enhance production of amylase and protease from *Aspergillus awamori* in a single fermentation. *African Journal of Biochemistry Research*, 4(3):73-80.
- Nielsen JE, Borchert TV. Protein engineering of bacterial alpha-amylases. *Biochim Biophys Acta*. 2000; 1543:253- 274.
- Novic, S.J. Rozzel, J.D. and Barredo, J.L. 2005. Methods in biotechnology. *Microbial Enzymes and Biotransformations*, (17):256-257.
- Olsen, H.S.O.; Falholt, P. (1998). The Role of Enzymes in Modern Detergency. *Journal of Surfactants and Detergents* 1, 555–567.
- Öner, E.T. (2006). Optimization of ethanol production from starch by an amylolytic nuclear petite *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Yeast* 23, 849–856
- Pandey, A. Nigam, P. Soccol, C.R. Soccol, V. T. Singh, D. and Mohan, R. 2000. Advances in microbial amylases, *Biotechnology and Advanced Biochemistry*, (31): 135-152.
- Parashar, D. and Satyanarayana, T. 2016. A chimeric α -amylase engineered from *Bacillus acidicola* and *Geobacillus thermoleovorans* with improved thermostability and catalytic efficiency. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 43(4): 473-484.
- Pena, D.A. Gasser, B. Zanghellini, J. Steiger, M.G. and Mattanovich, D. 2018, Metabolic engineering of *Pichia pastoris*. *Metabolic Engineering*, (50): 2–15.
- Polaina, J. and MacCabe, A. P. 2007. *Industrial Enzymes*, pp. 531-547.
- Rao, B.M. Tanksale, M.A. Ghathe, S.M. and Deshpande, V.V. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62(3):597-635.
- Roumbouts, F. M. and Pilnik, W. 1978. Enzymes in fruits and vegetable juice technology. *Process Biochemistry*, (13): 9–13.
- Rydberg, E.H. et al. 1999. Cloning, mutagenesis, and structural analysis of human pancreatic α -amylase expressed in *Pichia pastoris*. *Protein Science*, 8(3): 635-643.
- Sharma AK, Sharma V, Saxena J, Chandra R, Alam A, Prakash A (2015) Isolation and screening of amylolytic bacteria from soil. *Int J Sci Res Agric Sci* 2:159-165.
- Sharma P, Mondal K, Mondal Chandra K, Thakur N (2022). Hunt for α -amylase from metagenome and strategies to improve its thermostability: a systematic review. *World journal of Microbiology and Biotechnology* 38:203
- Sivaramakrishnan, S. Gangadharan, D. Nampoothiri, K.M. Soccol, C.R. and Pandey, A. 2006. “ α -Amylase from microbial sources – an overview on recent developments”, *Food Technology and Biotechnology*, 44(2): 173-184.
- Sun, L. H., Qin, T., Liu, Y., Zhao, H., Xia, X. and Lei, X. 2018. Cloning, expression, and characterization of a porcine pancreatic α -amylase in *Pichia pastoris*. *Animal Nutrition*, 4(2): 234-240.
- Sundarram A, Pandurangappa T, Murthy K (2014) α -Amylase production and applications review. *J Appl Environ Microbiol* 2:166-175.

- Wang, J., Li, Y., Lu, F. 2018. "Molecular cloning and biochemical characterization of an α -amylase family from *Aspergillus niger*", *Electronic Journal of Biotechnology*, 32, 55-62.
- Wang, Y.C., Zhao, N., Ma, J.W., Liu, J., Yan, Q.J., Jiang, Z.Q. 2019. "High-level expression of a novel α -amylase from *Thermomyces dupontii* in *Pichia pastoris* and its application in maltose syrup production", *International Journal of Biological Macromolecules*, 127, 683-692.
- Yang, H. Liu, L. Shin, H. D. Chen, R.R. Li, J. Du, G. and Chen, J. 2013. Comparative analysis of heterologous expression, biochemical characterization optimal production of an alkaline α -amylase from alkaliphilic *Alkalimonas amylolytica* in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. *Biotechnology Progress*, 29(1): 39-47.
- Zeman, N.W. and Mccrea, J.M. 1985. Alpha-amylase production using a recombinant DNA organism. *Cereal Foods World*. 30(1): 777-780.
- Zeng, Q., Wei, C., Jin, J., Wu, C., Huang, B. 2011. "Cloning of the gene encoding acid-stable alpha-amylase from *Aspergillus niger* and its expression in *Pichia pastoris*", *African Journal of Food Science*, 5(12), 668-675.

8. EKLER

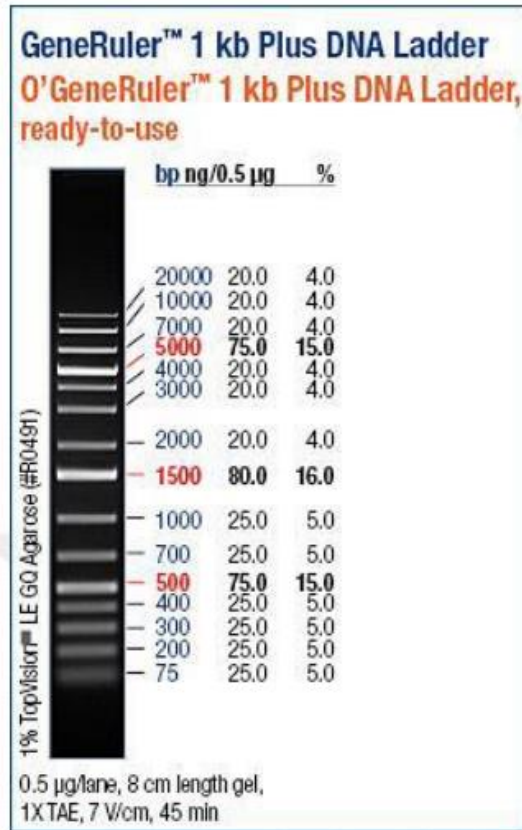
EK-1. DNSA yönteminde kullanılan çözeltiler ve hazırlanışı

A Çözeltisi (pH tamponu)	20°C’de pH 6.9 olacak şekilde ayarlanan 6.7 mM NaCl içerikli 20 mM sodyum fosfat tamponu
B Çözeltisi (Substrat çözeltisi)	pH tamponu ile çözülebilir nişastanın (%1 olacak şekilde) 15 dakika kaynatılmasıyla hazırlanan çözelti
C Çözeltisi (DNS bileşeni)	12 g sodyum potasyum tartaratın 8 ml 2 M NaOH içinde çözülmesiyle hazırlanan çözelti
D Çözeltisi (DNS bileşeni)	3,5-dinitrosalisilik asitle 20 ml hacimde 96 mM konsantrasyonda hazırlanan çözelti
E Çözeltisi (DNS çözeltisi)	Çözelti C’nin yavaşça çözelti D’ye ilave edilmesiyle ve saf su ile 40 ml hacme tamamlanmasıyla hazırlanan çözelti
F Çözeltisi (Standart grafiği için)	%0.3 (a/h) saf maltoz içeren çözelti
Örnek Çözeltisi (Süpernatant-tampon çözeltisi)	pH tamponu ile uygun oranda seyreltilmiş süpernatant örneği

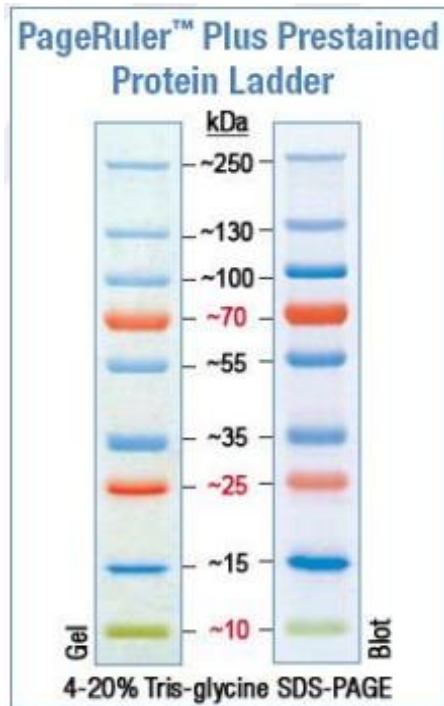
EK-2. DNSA yönteminin aşamaları ve kullanılan bileşen miktarları

Tepkime Bileşenleri	Enzim veya Standart	Kör
Substrat Çözeltisi	200 µl	200 µl
50°C sıcaklıkta 2-3 dakika tutularak çözeltinin reaksiyon sıcaklığına gelmesinin sağlanması		
Örnek Çözeltisi	200 µl	--
pH Tamponu	--	200 µl
50°C sıcaklıkta 5 dakika inkübe edilmesi		
DNS Çözeltisi	200 µl	200 µl
95°C sıcaklıkta 15 dakika inkübe edilmesi		
Örneklerin 3 dakika buz üzerinde bekletilmesi		
Soğutulan örneklerle 1800 µL saf su ilave edilmesi		
Absorbans ölçümü (540 nm)		

EK-3. Çalışmada kullanılan DNA ve protein standartları

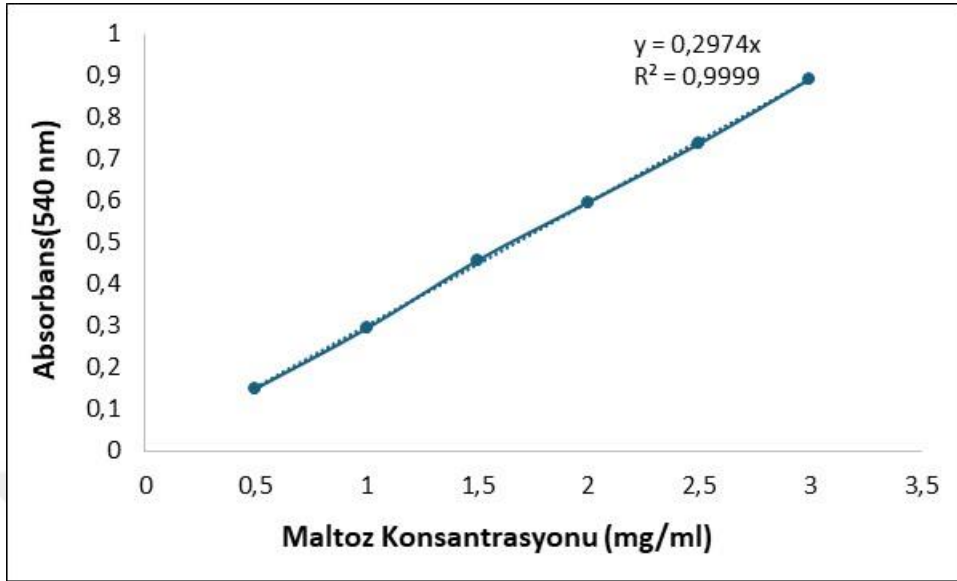


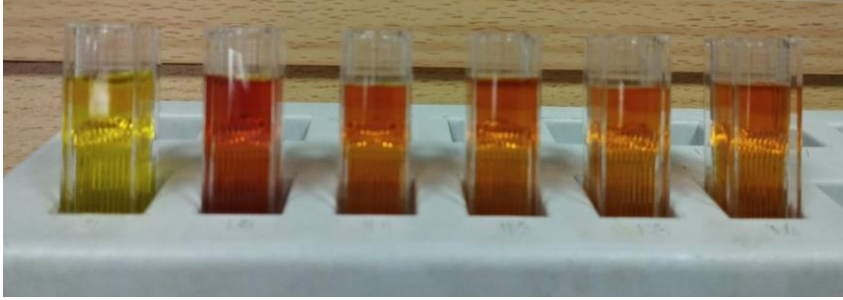
DNA standardı (GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD))



PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, ABD)

EK-4. DNSA yöntemiyle α -amilaz aktivitesinin ölçümü için çeşitli konsantrasyonlardaki maltoz çözeltisiyle elde edilen standart eğri grafiği.



EK-5. DNSA yöntemi ile α -amilaz aktivitesi tayini

ÖZGEÇMİŞ

FATMANUR MAVİ

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans 2022-2024	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Antalya
Lisans 2016-2022	Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Antalya

Uluslararası Kongrelerde sunulan bildiriler

1. Mavi F, Uras A, Ersöz F, İnan M, Özçelik A. Recombinant production of α -amylase used in fruit juice production. 3rd. International Food Chemistry Congress, February 29- March 03, 2024, Antalya/TÜRKİYE (Poster presentation).

Projeler

1. Meyve Suyu Üretiminde Kullanılan Enzimlerin Rekombinant Üretimi ve Kullanım İmkanlarının Araştırılması (TÜBİTAK Proje No: 222O454)- Bursiyer
2. Rekombinant *Bordetella pertussis* Fim2 proteininin proteomik analizi (TÜBİTAK Proje No: 123Z599)- Bursiyer

