

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



***Pichia pastoris* MAYASINA SIĞIR LAKTAT DEHİDROGENAZ GENİNİN
AKTARIMI VE LAKTİK ASİT ÜRETİMİ**

Fırat AYAS

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

ŞUBAT 2018

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**

***Pichia pastoris* MAYASINA SIĞIR LAKTAT DEHİDROGENAZ GENİNİN
AKTARIMI VE LAKTİK ASİT ÜRETİMİ**

Fırat AYAS

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

ŞUBAT 2018

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ

***Pichia pastoris* MAYASINA SIĞIR LAKTAT DEHİDROGENAZ GENİNİN
AKTARIMI VE LAKTİK ASİT ÜRETİMİ**

Fırat AYAS

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

Bu tez 07/02/2018 tarihinde jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mehmet İNAN (Danışman)	
Doç. Dr. İrfan TURHAN	
Doç. Dr. Ömer ŞİMŞEK	
Yrd. Doç. Dr. Barçın KARAKAŞ BUDAK	
Yrd. Doç. Dr. Yakup ULUSU	

ÖZET

***Pichia pastoris* MAYASINA SIĞIR LAKTAT DEHİDROGENAZ GENİNİN AKTARIMI VE LAKTİK ASİT ÜRETİMİ**

FIRAT AYAS

Doktora Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mehmet İNAN

Şubat 2018, 67 sayfa

Laktik asit gıdadan kozmetiğe, tıptan kimya endüstrisine çok geniş bir alanda kullanım imkanına sahiptir. Laktik asidin, L (+)-laktik asit ve D (-)-laktik asit olmak üzere iki optik izomeri vardır. İzomerlerin saf olarak üretimi sadece fermentasyon yolu ile mümkündür. D (-)-laktik asit insan metabolizmasında asidoz ve kemik erimesine neden olabilmektedir. Ancak L (+)-laktik asit, biyolojik olarak tüketilebilmesi ve ilaç amaçlı kullanılabilmesi bakımından önemlidir.

Pichia pastoris, biyoteknoloji ve ilaç endüstrisinde rekombinant protein üretimi için ihtiyaç duyulan bir ekspresyon sistemi olmasıyla birlikte araştırmacılar tarafından da sıklıkla kullanılmaktadır. *P. pastoris*, bakteriler gibi, tek karbon kaynağı olarak metanol, glukoz, gliserol veya etanol içeren ucuz besiyerlerinde hızla gelişim gösterebilmektedir. Bu tez çalışması kapsamında *P. pastoris* mayasında L (+)-laktik asit üretimi hedeflenmiştir. Bunun sebebi, bu mayanın şimdiye kadar laktik asit üretiminde kullanılan mikroorganizmalardan çok daha düşük pH'larda gelişme gösterebilmesidir. Ayrıca, L(+)-laktik asidin D(-)-laktik aside göre kullanımı daha yaygındır.

Laktik asit üretimi için gen kaynağı olarak sığır (*Bos taurus*) genomuna ait L-laktat dehidrogenaz geni kullanılmıştır. Çalışmanın ilk aşamasında *P. pastoris* Δ PDC (pirüvat dekarboksilaz) geni inaktif hale getirilmiştir. Pirüvatı L-laktik aside yükseltgeyecek olan L-laktat dehidrogenaz geni mayaya gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (GAP) ve pirüvat dekarboksilaz (PDC) promotorlarına bağlı olarak aktarılmıştır. Üretim ön çalışmaları çalkalamalı inkübatörde erlenler ölçeğinde yapılmıştır. Daha sonra, *P. pastoris* suşlarının L-laktik asit üretim kapasiteleri, kesikli fermentör koşullarında yapılan çalışmada en yüksek X33 pGAP-LDH ve FA115 pPDC-LDH tek kopya suşları tarafından yaklaşık 9,5 g/L (0,19 g/g) olarak gerçekleştirildiği belirlenmiştir. Kesikli beslemeli fermentör çalışmasında ise, L-laktik asit üretimini en yüksek FA115 pPDC-LDH iki kopya suşu 38,0 g/L (0,27 g/g) ile sağlamıştır.

Bununla birlikte, ileride yapılabilecek; promotorların yeniden tasarımı, yeni promotorların kullanımı, gen kopya sayısının arttırılması, fermentasyon koşulları optimize edilmesi gibi modifikasyonlarla çok daha yüksek L-laktik asit üretim verimleri elde edilebileceği düşünülmektedir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, yapılacak olan benzer çalışmalara ışık tutacak niteliktedir.

ANAHTAR KELİMELEER: Laktat dehidrogenaz, Laktik asit, *Pichia pastoris*, Pirüvat dekarboksilaz

JÜRİ: Prof. Dr. Mehmet İNAN

Doç. Dr. İrfan TURHAN

Doç. Dr. Ömer ŞİMŞEK

Yrd. Doç. Dr. Barçın KARAKAŞ BUDAK

Yrd. Doç. Dr. Yakup ULUSU

ABSTRACT

EXPRESSION OF BOVINE LACTATE DEHYDROGENASE GENE in YEAST *Pichia pastoris* AND LACTIC ACID PRODUCTION

Firat AYAS

PhD. Thesis in Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet INAN

February 2018, 67 pages

Lactic acid has the possibility to use in a wide range, for example medicine, food, cosmetics, chemical industry, etc. Lactic acid has two optical isomers: L (+)-lactic acid and D (-)-lactic acid. Pure production of these isomers is possible only with fermentation. D (-)-lactic acid can cause acidosis and osteoclasts in human metabolism. However, L (+)-lactic acid is important for its bioavailability and for pharmaceutical use.

Pichia pastoris is an expression system required for recombinant protein production in the biotechnology and pharmaceutical industry, and is frequently used by researchers. *P. pastoris*, like bacteria, can grow rapidly in cheap media containing methanol, glucose, glycerol or ethanol as a carbon source. In this thesis study, production of L (+)-lactic acid in *P. pastoris* was aimed. This is why this yeast can exhibit activity at much lower pH than the microorganisms used to produce lactic acid up to now. Furthermore, the use of L (+) - lactic acid compared to D (-) - lactic acid is more common.

The L-lactate dehydrogenase gene from bovine genome was used as a gene source for lactic acid production. In the first step of the study, *P. pastoris* Δ PDC (pyruvate decarboxylase) gene was inactivated. The L-lactate dehydrogenase gene, which oxidizes pyruvate to L-lactic acid, was expressed under the control of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAP) and pyruvate decarboxylase (PDC) promoters. Preliminary production studies were done in shake flask scale in a shaker incubator. L-lactic acid production was determined to be approximately 9,5 g/L (0,19 g/g) by X33 pGAP-LDH and FA115 pPDC-LDH single copy *P. pastoris* strains in batch fermentation conditions. In fed-batch fermentation studies, the highest L-lactic acid production was 38,0 g/L (0,27 g/g) by FA115 pPDC-LDH two-copy strain.

However, further studies are expected to yield higher yields with modifications such as optimizing the fermentation conditions, redesigning the promoters, using new promoters and increasing the gene copy number of the LDH. The results obtained from this study will shed light on similar work in the future.

KEYWORDS: Lactate dehydrogenase, Lactic acid, *Pichia pastoris*, Pyruvate decarboxylase

COMMITTEE: Prof. Dr. Mehmet INAN

Assoc. Prof. Dr. Irfan TURHAN

Assoc. Prof. Dr. Omer SIMSEK

Asst. Prof. Dr. Barcin KARAKAS BUDAK

Asst. Prof. Dr. Yakup ULUSU

ÖNSÖZ

Moleküler biyoloji uygulamalarından tıp, ilaç, gıda ve tarım gibi geniş bir alanda faydalanılmaktadır. Bu nedenle moleküler biyoloji biliminde yapılan gelişmeler, kullanıldığı alanlardaki rolüne bağlı olarak büyük imkanlar sağlamaktadır.

Bu çalışma kapsamında *Pichia pastoris* mayasında L(+)-laktik asit üretimini gerçekleştirmesi amaçlanmıştır. Bunun sebebi, bu mayanın şimdiye kadar laktik asit üretiminde kullanılan mikroorganizmalardan çok daha düşük pH'larda aktivite gösterebilmesidir. Bununla birlikte L(+)-laktik asit D(-)-laktik aside göre biyolojik olarak tüketilebilmesi ve ilaç amaçlı kullanılabilmesi bakımından daha önemlidir. Ayrıca, farklı promotorlar kullanılarak fermentör koşullarında rekombinant olarak L(+)-laktik asit üretimleri gerçekleştirilmiştir. Üretimler, *P. pastoris*'te ilk defa kullanılan *PDC* (*pirüvat dekarboksilaz*) ve çok yaygın kullanıma sahip olan *GAP* (*gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz*) promotorları ile aktarılan sığır (*Bos taurus*) genomuna ait L-laktat dehidrogenaz geni ile yapılmıştır. Sonuç olarak yüksek ölçekte rekombinant protein üretiminin yapılabileceği gösterilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, yapılacak olan benzer çalışmalara ışık tutacak niteliktedir.

Bu çalışma süresince, bilgi ve tecrübeleri ile beni yönlendiren ve tüm desteğiyle hep yanımda olan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mehmet İNAN'a gösterdiği emek ve ayırdığı zaman için sonsuz minnetimi sunarım.

Tez çalışmamın gerçekleşmesi sürecinde göstermiş oldukları ilgi, destek ve yönlendirmeleri için Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü (BATEM) idarecilerine ve mesai arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Ayrıca laboratuvar çalışmalarında bilgi birikimlerini, deneyimlerini ve her türlü yardımlarını benden esirgemeyen Mert KARAOĞLAN, Semiramis GEREDİLİ YILMAZ, Fidan ERDEN KARAOĞLAN ve tüm Gıda Güvenliği ve Tarımsal Araştırmalar Merkezi çalışanlarına çok teşekkür ederim.

Tez çalışmalarına katkı ve yönlendirmelerinden dolayı TİK üyesi Doç. Dr. İrfan TURHAN; ayrıca Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü ve Gıda Mühendisliği Bölümü çalışanlarına teşekkür ederim.

Başta eşim İlkay AYAS, kızlarım Bulut Ece ve Umay Ada olmak üzere maddi ve manevi hiçbir desteği esirgemeyen aileme ve dostlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Allah hepinizden razı olsun.

Doktora öğrenimim boyunca 2211-C Yurt İçi Doktora Burs Programı kapsamında öğrenimimi destekleyen TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı'na (TÜBİTAK-BİDEB) teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ	v
AKADEMİK BEYAN	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI.....	3
3. MATERYAL VE METOT.....	7
3.1. Materyal	7
3.1.1. Suşlar ve plazmitler	7
3.1.2. Kimyasallar	8
3.1.3. Primerler	9
3.2. Metot.....	9
3.2.1. Genomik DNA izolasyonu	9
3.2.2. Polimeraz zincir reaksiyonu	10
3.2.3. Agaroz jel elektroforezi ve jelin görüntülenmesi.....	11
3.2.4. PZR ürünlerinin saflaştırılması	12
3.2.5. Jelden DNA parçalarının ekstraksiyonu	12
3.2.6. Plazmit izolasyonu	12
3.2.7. DNA ve plazmit konsantrasyonlarının ölçülmesi	12
3.2.8. Ligasyon ve gen aktarımı işlemleri	13
3.2.9. <i>Pichia pastoris</i> 'e ait pirüvat dekarboksilaz (PDC) geninin inaktif hale getirilmesi.....	13
3.2.10. Southern blot analizi.....	15
3.2.11. Erlenmayer deneyleri	16
3.2.12. Fermentörde üretim	17
3.2.13. PDC enzim aktivite analizi	18
3.2.14. Toplam protein ölçümü	19
3.2.15. İstatistiksel Analiz	19
4. BULGULAR	20
4.1. PDC Geninin İnaktif Hale Getirilmesi	20

4.2. <i>Pichia pastoris</i> GAP Promotoru Kullanılarak L-Laktik Asit Üretimi.....	32
4.2.1. Ekspresyon vektörleri ve klonlama çalışmaları	32
4.2.2. Erlenmayer koşullarında üretim çalışmaları	39
4.3. <i>Pichia pastoris</i> PDC Promotoru Kullanılarak L-Laktik Asit Üretimi	42
4.3.1. Ekspresyon vektörleri ve klonlama çalışmaları	42
4.3.2. Erlenmayer koşullarında üretim çalışmaları	52
4.3.3. Fermentör koşullarında üretim çalışmaları	53
4.3.3.1 Kesikli fermentör koşullarında üretim	53
4.3.3.2 Kesikli beslemeli fermentör koşullarında üretim	54
5. TARTIŞMA.....	58
6. SONUÇ	62
7. KAYNAKLAR	63
8. EKLER	66
Ek 1. Çalışmada kullanılan primerler	66
Ek 2. Çalışmada Kullanılan <i>Bos taurus</i> LDH geninin DNA Dizisi	67
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Doktora Tezi olarak sunduğum “*Pichia pastoris* Mayasına Sığır Laktat Dehidrogenaz Geninin Aktarımı ve Laktik Asit 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.

13/02/2018

Fırat AYAS

.....

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

μ	:Mikro (10^{-6})
dak	:Dakika
d/d	:Devir/dakika
<i>g</i>	:Göreceli santrifüj kuvveti (relative centrifugal force, rcf)
L	:Litre
m	:Mili (10^{-3})
M	:Molar
n	:Nano (10^{-9})
OD	:Optik yoğunluk (optical density)
s	:Saniye
sa.	:Saat
Tm	:Erime sıcaklığı (melting temperature)

Tezde ondalık yazım kullanılıyor ve ondalık ayırıcı olarak virgül kullanılmaktadır (“21,01”)

Kısaltmalar

bç	:Baz çifti
ABD	:Amerika Birleşik Devletleri
NCBI	:National Center of Biotechnology Information
Amp	:Amfisilin
BMGY	:Tamponlanmış karmaşık gliserol besiyeri
BMDY	:Tamponlanmış karmaşık glukoz besiyeri
DIG	:Digoksinin (digoxigenin)
DNA	:Deoksiribonükleik asit
FDA	:ABD Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration)
GRAS	:Genel olarak güvenli kabul edilen (Generally Regarded As Safe)
LB	:Luria-Bertani
LDH	:Laktat Dehidrogenaz
MD	:Temel glukoz besiyeri (minimal dektroz)
PDC	:Pirüvat dekarboksilaz
PZR	:Polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	:Ribonükleik asit
SSC	:Tuzlu sodyum sitrat (saline sodium citrate)
YNB	:Maya azot kaynağı (Yeast Nitrogen Base)
YPD	:Maya pepton dektroz (yeast peptone dextrose)
TE	:Tris-EDTA
TAE	:Tris-Asetat-EDTA
GAP	:Gliseraldehit-3-fosfat
V	:Volt
KV	:Kilovolt

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Laktik asidin yapısı.....	3
Şekil 2.2. Mikrobiyal fermentasyon ya da kimyasal sentezle laktik asit üretimi.....	4
Şekil 3.1. Küt uçlu PZR ürünlerinin klonlanmasında kullanılan pJET1.2 plazmiti.....	7
Şekil 3.2. <i>P. pastoris</i> histidin geninin (<i>HIS4</i>) mevcut bulunduğu pA0815 plazmiti.....	8
Şekil 3.3. Protein ekspresyonu için kullanılan pPICZαB ve pGAPZαB vektörleri.....	8
Şekil 3.4. <i>P. pastoris</i> 'e ait <i>PDC</i> geninin pJET1.2 plazmiti üzerinde gen yer değiştirme ile <i>HIS4</i> geni kullanılarak inaktif edilmesinin şematik gösterimi.....	14
Şekil 4.1. PZR ile elde edilen <i>P. pastoris</i> <i>PDC</i> geninin jelde görüntülenmesi. GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas) kullanılmıştır. 56.3-64.2°C arası farklı sıcaklıklarda oluşan <i>PDC</i> geni (1683 bp).....	20
Şekil 4.2. <i>PDC</i> geninin pJET1.2 vektörüne aktarılmasıyla elde edilen pJET1.2- <i>PDC</i>	21
Şekil 4.3. Plazmit izolasyonu sonrası elde edilen 4 farklı plazmidin <i>ScaI</i> enzimi ile kesimi. 1kb: GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas); 1-4: seçilen kolonilerden elde edilen plazmitlerin <i>ScaI</i> enzimi ile kesilmesi.....	22
Şekil 4.4. Plazmit izolasyonu sonrası elde edilen pJET- <i>PDC</i> plazmitinin <i>SacI</i> enzimi ile restriksiyon analizi ve jelden kesimi. 1kb: GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas).....	23
Şekil 4.5. İzolasyon sonrası elde edilen pA0815 plazmiti ile <i>BglII</i> ve <i>BamHI</i> restriksiyon enzimlerinin bu plazmit üzerindeki kesim noktaları.....	24
Şekil 4.6. <i>BglII</i> ve <i>BamHI</i> restriksiyon enzimleri ile kesilen pA0815 plazmitinden <i>HIS4</i> geninin düşürülmesi. 1kb: GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas).....	24
Şekil 4.7. <i>HIS4</i> genini içeren plazmiti bulmak için 12 adet koloniden elde edilen DNA'ların <i>BglII</i> restriksiyon enzimi ile kesilerek jelde kontrolü. 1kb: GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas).....	25
Şekil 4.8. 12. koloniye ait pJET- <i>PDC</i> :: <i>HIS4</i> plazmitinin doğruluğunun teyidi için <i>BglII</i> ve <i>XbaI</i> restriksiyon enzimleri ile kesilerek jelde kontrolü. 1kb: GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas).....	26
Şekil 4.9. pJET- <i>PDC</i> :: <i>HIS4</i> olarak isimlendirilen plazmit ile bu plazmitin doğruluğunun teyidi için kullanılan <i>BglII</i> ve <i>XbaI</i> restriksiyon enzimlerinin kesim noktaları.....	26
Şekil 4.10. PZR sonucunda 4658 bp uzunluğundaki <i>PDC</i> :: <i>HIS4</i> fragmentinin jel görüntüsü.....	27

Şekil 4.11. <i>PDC</i> geninin inaktif edilmesi için kullanılan <i>PDC::HIS4</i> fragmenti şematik olarak gösterimi.....	27
Şekil 4.12. 17 adet klondan elde edilen genomik DNA'nın <i>PDCFATG</i> ve <i>PDCRSTP</i> primerleri ile yapılan PZR ürünlerinin ve beklenen 4658 bç <i>PDC::HIS4</i> fragmentinin jel görüntüsü.....	28
Şekil 4.13. Southern blot analizinin şematik gösterimi.....	29
Şekil 4.14. Southern blot analizinde kullanılacak DNA probu için <i>SacI</i> enzimi ile <i>PDC</i> geninin kesilmesi ve 398 bç uzunluğundaki probu oluşturacak parçanın jelden alınması. 1kb:GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas).....	29
Şekil 4.15. <i>PDC</i> geni üzerinden elde edilen ve etiketlenen DIG etiketli probun etkinlik düzeyi.....	30
Şekil 4.16. ΔPDC inaktif suşların Southern blot analizi ile doğrulanması için 12. ve 18. klonlara ait seçilen 8 adet tek kolonilerin genomik DNA'ların <i>EcoRI</i> enzimi ile kesimini gösteren jel görüntüsü. 1kb: GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas), DIG: DIG etiketli markır.....	30
Şekil 4.17. 12. ve 18. klonlara ait seçilen 8 adet tek kolonilerde ΔPDC inaktif suşların belirlenmesi için yapılan Southern blot analizi sonucu X-ışını filminin görüntüsü. 1kb:GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas), DIG: DIG etiketli markır.....	31
Şekil 4.18. L-laktik asit üretimleri için kullanılan <i>Bos taurus</i> L-laktat dehidrogenaz geni.....	32
Şekil 4.19. a) <i>pGAPZB</i> plazmiti, b) <i>EcoRI</i> ve <i>XbaI</i> restriksiyon enzimleri ile kesilip jelden alınması. 1kb:GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas).....	32
Şekil 4.20. <i>pUC57-LDH</i> plazmitinden <i>LDH</i> geninin <i>EcoRI</i> ve <i>XbaI</i> restriksiyon enzimleri ile kesilerek jelden alınması. 1kb:GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas).....	33
Şekil 4.21. <i>LDH</i> geninin lineer <i>pGAPZB</i> plazmitine ligasyonunun şematik gösterimi.....	34
Şekil 4.22. <i>pGAPZB-LDH</i> plazmiti için seçilen 6 adet koloninin <i>EcoRI</i> ve <i>XbaI</i> restriksiyon enzimleri ile kontrolü. 1kb:GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas).....	34
Şekil 4.23. a) <i>pGAPZB-LDH</i> 'nin <i>AvrII</i> enzimi ile kesilerek lineer hale getirilmesi ve b) jel görüntüsü. 1kb:GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas).....	35
Şekil 4.24. <i>pGAPZB-LDH</i> 'nin X33 ve ΔPDC geni inaktif FA115 suşlarına aktarımının PZR ile kontrolü. F1-10: FA115 suşları, X1-10: X33 suşları 1kb: GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas).....	36

Şekil 4.25. Southern blot için kullanılacak DNA probunun GAP <i>Bgl</i> II-F ve GAPE <i>Eco</i> RI-R primerleri yardımıyla PZR ile çoğaltılması. 1kb:GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas).....	37
Şekil 4.26. GAP promotoru üzerinden elde edilen ve etiketlenen DIG probun etkinlik düzeyi.....	37
Şekil 4.27. FA115 ve X-33 suşlarından elde edilen genomik DNA'ların <i>Bst</i> XI restriksiyon enzimi ile kesimini gösteren jel görüntüsü. 1kb:GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas), DIG: DIG etiketli markır.....	38
Şekil 4.28. pGAPZB-LDH aktarılan suşların Southern blot analizi sonucu X-ışını filminin görüntüsü. İşaretli bantlar tek kopya bağlanmaları göstermektedir. 1kb: GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas), DIG: DIG etiketli markır.....	39
Şekil 4.29. Erlenmayer koşullarında LDH genini tek kopya olarak içeren X33 ve FA115 suşlarına ait gelişim, pH değişimi, L-laktik asit ve etanol değişim grafikleri....	41
Şekil 4.30. PDCprom <i>Bgl</i> II-F ve PDCprom <i>Asu</i> II-R primerleri kullanılarak PZR ile elde edilen PDC promotoru.....	42
Şekil 4.31. PDCprom <i>Bgl</i> II-F ve PDCprom <i>Asu</i> II-R primerleri ile yapılan PZR'nin jel görüntüsü. 1kb:GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas).....	43
Şekil 4.32 a) pGAPZB plazmitinin <i>Bgl</i> II ve <i>Asu</i> II (<i>Bsp</i> 119I) restriksiyon enzimleri ile kesilip b) jelden alınması. 1kb:GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas)...	43
Şekil 4.33. PDC promotorunun lineer pGAPZB plazmitine ligasyonunun (pPDCpromZB) şematik gösterimi.....	44
Şekil 4.34. pPDCpromZB plazmiti için seçilen 8 adet koloninin <i>Asu</i> II (<i>Bsp</i> 119I) restriksiyon enzimi ile kontrolü. 1kb:GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas).....	45
Şekil 4.35. a) pGAPZB-LDH ve b) pPDCpromZB'nin <i>Asu</i> II (<i>Bsp</i> 119I) ve <i>Xba</i> I enzimleri ile kesilerek lineer hale getirilmesi.....	46
Şekil 4.36 a) pGAPZ-Bt-LDH ve b) pPDCpromZB'nin <i>Asu</i> II (<i>Bsp</i> 119I) ve <i>Xba</i> I enzimleri ile kesilmesi sonucu jelden alınma görüntüsü. 1kb:GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas).....	46
Şekil 4.37. LDH geninin pPDCpromZB plazmitine ligasyonunun şematik gösterimi.....	47
Şekil 4.38. a) pPDCpromZB-LDH plazmiti <i>Asu</i> II (<i>Bsp</i> 119I) ve <i>Xba</i> I restriksiyon enzimi ile kesilmesi ve b) jelde kontrolü. 1kb:GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas).....	48

Şekil 4.39 a) pPDCpromZB-LDH plazmitini lineer hale getirmek için <i>PdmI</i> restriksiyon enzimi kullanılması ve b) jelde kontrol edilmesi. 1kb:GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas).....	49
Şekil 4.40. Southern blotta kullanılan DIG etiketli prob için <i>PDCprom</i> 'un <i>SspI</i> restriksiyon enzimi ile kesilip jel üzerinden alınması. 1kb:GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas).....	50
Şekil 4.41. <i>PDC</i> promotoru üzerinden elde edilen ve DIG etiketli probun etkinlik düzeyi.....	50
Şekil 4.42. FA115 ve X-33 suşlarından elde edilen genomik DNA'ların <i>ScaI</i> restriksiyon enzimi ile kesimini gösteren jel görüntüsü. 1kb:GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas), DIG: DIG etiketli markır.....	51
Şekil 4.43. pPDCpromZB-LDH aktarılan suşların Southern blot analizi sonucu X-ışını filminin görüntüsü. 1kb:GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas), DIG: DIG etiketli markır.....	52
Şekil 4.44. Erlenmayer koşullarında tek kopya suşlara ait L-laktik asit (g/L), glukoz (g/L), etanol (g/L) ve OD _{600nm} değerlerine ait grafikler.....	53
Şekil 4.45. Kesikli fermentör çalışmasına ait L-laktik asit (g/L), glukoz (g/L), etanol (g/L) ve OD _{600nm} sonuçlarına ait grafikler.....	54
Şekil 4.46. Fermentör uygulaması sırasında çekilen fotoğraf (Sistem; Sartorius Stedim Biostat® B 2x5 L Bioreactor).....	57

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. PZR reaksiyon karışımı.....	10
Çizelge 3.2. PZR ısı döngü programı için süre ve sıcaklık koşulları.....	11
Çizelge 3.3. PTM1 tuzlarının bileşimi.....	17
Çizelge 4.1. %2, %4, %6 ve %8 glukoz içeren BMDY besiyerinde 150 ve 200 d/d'da 12., 24. ve 36. saatlerde L-Laktik asit (g/L), OD ve L-Laktik asit / OD ortalama değerleri.....	40
Çizelge 4.2. Kesikli fermentör çalışmasına ait yaş hücre ağırlığı ve OD _{600nm} sonuçları.....	55
Çizelge 4.3. Kesikli fermentör çalışmasına ait glukoz (g/L), L-laktik asit (g/L) ve etanol (g/L) sonuçları.....	56
Çizelge 5.1. Kesikli-beslemeli fermentör çalışmasında elde edilen sonuçların ortalamaları, standart sapma değerleri ve aralarındaki farkların Duncan çoklu karşılaştırma testine göre önem seviyeleri.....	60
Çizelge 5.2. Daha önce yapılan bazı rekombinant laktik asit üretim çalışmalarına ait verim (g/g) değerleri.....	61

1. GİRİŞ

Plastik, bir petrokimya sanayi ürünü olması sebebiyle doğada en az birkaç yüzyılda ayrışabilmekte ve bu özelliği nedeniyle dünyayı çevresel bir felaketin eşiğine getirmektedir. Bu nedenle doğada parçalanabilir -biyobozunur- materyaller üzerine uzun bir süredir araştırmalar yapılmakta ve kullanımları yaygınlaşmaktadır. Bunlar arasında, yakın zamanda ortaya çıkan polilaktik asit (PLA), su ve karbondioksit parçalanma özelliği ile gelişime çok açık doğa dostu bir materyaldir. Laktik asit (LA); gıdalarda lezzet artırıcı ve koruyucu olarak kullanılmakla birlikte kimya, ilaç, deri ve tekstil sanayinde önemli ve çok yönlü olarak kullanılan bir kimyasaldır. Dünya ticaretinde laktik asit, yıllık ortalama %30'la en yüksek artış sağlayan ticari ürünlerden biri haline gelmiştir (Wee vd. 2006).

Son yıllarda laktik asit üzerine yapılan çalışmalarda optik saflık derecesinin; kristalizasyon, termostabilite, biyolojik bozulma derecesi ve performans değerleri gibi fiziksel özellikleri üzerinde çok etkili olduğu bildirilmektedir. Bu durumda yüksek saflık için uygulanan üretim teknolojisi çok önemlidir. Fakat bu noktadaki kritik konu ucuz hammadde ile yüksek saflıkta laktik asit üretimidir. Bakterilerden laktik asit üretimi biraz maliyetlidir, çünkü bazı karmaşık karbon kaynaklarına ve minerallere ihtiyaç duyarlar. Ayrıca, yüksek asitli ortamlara dayanımları azdır; bu yüzden, laktik asit üretimleri sırasında verimi arttırmak için sürekli olarak laktat oluşturulup ortamdan uzaklaştırılması gerekmektedir (Zhou vd. 2003; Narayanan vd. 2004; Okano vd. 2010).

Laktik asit üretiminde alternatif konukçu organizma olarak maya türlerine ilgi artmıştır. Örneğin, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*, *Candida boidinii*, *Pichia pastoris* ucuz büyüme ortamında gelişen, düşük pH ve organik asitlere nispeten daha dayanıklı organizmalardır (Porro vd. 1999; Branduardi vd. 2006).

Pichia pastoris, biyoteknoloji ve ilaç endüstrisinde rekombinant protein üretimi için ihtiyaç duyulan bir ekspresyon sistemi olmasıyla birlikte araştırmacılar tarafından da sıklıkla kullanılmaktadır. *P. pastoris*, bakteriler gibi, tek karbon kaynağı olarak metanol, glukoz, gliserol veya etanol içeren ucuz besiyerlerinde hızla gelişim gösterebilmektedir. Buna ilaveten, bizler gibi, ökaryotik bir organizmadır ve birçok ökaryotik transkripsiyon sonrası modifikasyonları gerçekleştirebilmesi, heterolog proteinleri hem hücre içi hem hücre dışı olarak çok yüksek miktarlarda üretebilme kapasitesine sahip olması nedeniyle bakterilere göre daha iyi olanaklar sağlamaktadır (Cos vd. 2006; Branduardi vd. 2006; Qin vd. 2011).

P. pastoris fermentör ortamında çok yüksek hücre yoğunluğuna çıkabildiği için 1970'li yıllarda tek hücre proteini üretiminde kullanılmıştır. Bu mayanın yüksek hücre yoğunluğuna çıkabilmesi Crabtree-negatif olmasından kaynaklanmaktadır. Diğer bir ifadeyle, aerobik ortamda yüksek karbon konsantrasyonunda neredeyse etanol üretimi gerçekleştirmez. Fakat GAP promotörü kontrolü altında rekombinant protein üretimi esnasında, oksijen seviyesinin hipoksik şartlara düştüğü anda (oksijen seviyesinin aerobik organizmalar için kritik seviyeye indiği zaman), ortamda etanol oluştuğu ve etanolün ilerleyen safhalarda katabolize edildiği gözlenmiştir. Bu şartların da rekombinant protein üretimini arttırdığı ortaya konulmuştur (İnan ve Meagher 2001; Baumann vd. 2008; Qin vd. 2011).

Bu tez kapsamında *P. pastoris* mayasında L(+)-laktik asit üretimi hedeflenmiştir. Bunun sebebi, bu mayanın şimdiye kadar laktik asit üretiminde kullanılan mikroorganizmalardan çok daha düşük pH'larda aktivite gösterebilmesidir. Ayrıca, L(+)-laktik asit D(-)-laktik aside göre biyolojik olarak tüketilebilmesi ve ilaç amaçlı kullanılabilmesi bakımından daha önemlidir.

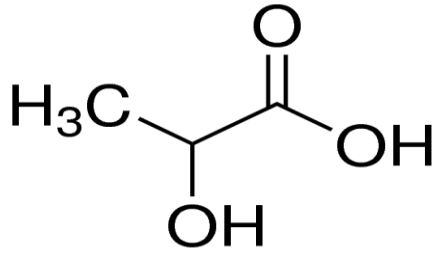
Tezin başlangıç aşamasında *P. pastoris* ΔPDC (pirüvat dekarboksilaz) geninin inaktif hale getirilmesi sağlanmıştır. Daha sonra pirüvatı L-laktik aside yükseltgeyecek olan sığır (*Bos taurus*) genomuna ait L-laktat dehidrogenaz geni, *P. pastoris*'te ilk defa kullanılan *PDC* (pirüvat dekarboksilaz) ve çok yaygın kullanıma sahip olan *GAP* (gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz) promotorları ile aktarılmıştır. Laktik asit üretim çalışmaları ilk aşamada çalkalamalı inkübatörde erlenler içerisinde yapılmıştır. Daha sonra suşların üretim kapasiteleri, kesikli (batch) ve kesikli beslemeli (fed-batch) fermentör koşullarında ortaya konmuştur.

2. KAYNAK TARAMASI

Laktik asit (Şekil 2.1), 1780 yılında Carl Wilhelm Scheele tarafından keşfedilen, kimyasal formülü $\text{CH}_3\text{CHOH-COOH}$ ve kimyasal adı 2-hidroksipropanoik asit veya 2-hidroksipropiyonik asit olan, bir organik hidroksi asittir. İsmi latince “lactis” yani sütte gelmektedir. 1808 yılında, Jons Jacob Berzelius fazla efor sarf edilen kasta laktik asit üretildiğini keşfetmiştir. Kimyasal yapısı 1873 yılında Johannes Wislicenus tarafından tayin edilmiştir. İlk ticari olarak üretimi 1881'de büyük ölçüde ekşimiş sütte yapılmıştır; bu yüzden “süt asidi” de denir. Sütte bulunan laktoz, laktik maya denilen bakteriler tarafından laktik aside dönüştürülür.

Laktik asit her insanın vücudunda oluşan tabii bir organik bileşik olup kas, kan ve vücudun değişik organlarında bulunur. Laktat ile aynı anlamda kullanılır; laktat, laktik asidin sodyum (Na) ve potasyum (K) tuzudur.

Laktik asidin temel kaynağı, glikojen olarak adlandırılan, karbohidratın yıkımı sonucu oluşan bir yan üründür.

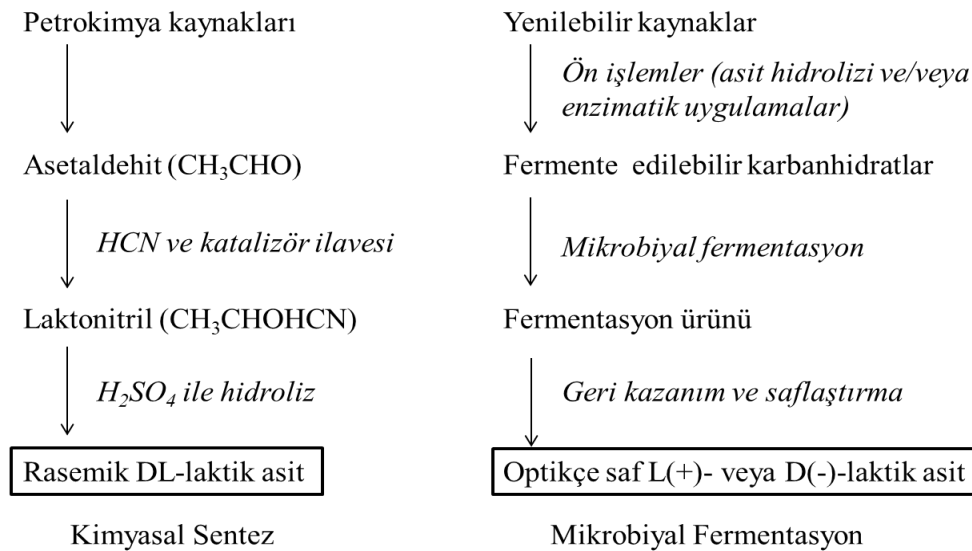


Şekil 2.1 Laktik asidin yapısı (Anonymous 1)

Plastik bir petrokimya sanayi ürünüdür. Doğada en az birkaç yüzyılda ayrışabilmekte ve bu özelliği nedeniyle dünyada büyük çevresel sorunlara sebep olmaktadır. Bu nedenle doğada parçalanabilir -biyobozunur- materyaller üzerine uzun bir süredir araştırmalar yapılmakta ve kullanımları yaygınlaşmaktadır. Bunlar arasında, yakın zamanda ortaya çıkan polilaktik asit (PLA), su ve karbondioksit parçalanma özelliği ile gelişime çok açık doğa dostu bir materyaldir. Laktik asit (LA); gıdalarda lezzet artırıcı ve koruyucu olarak kullanılmakla birlikte kimya, ilaç, deri ve tekstil sanayinde önemli ve çok yönlü olarak kullanılan bir kimyasaldır (Wee vd. 2006; Nampoothiri vd. 2010).

Son yıllarda laktik asit üzerine yapılan çalışmalarda optik saflık derecesinin; kristalizasyon, termostabilite, biyolojik bozulma derecesi ve performans değerleri gibi fiziksel özellikleri üzerinde çok etkili olduğu bildirilmektedir. Bu durumda yüksek saflık için uygulanan üretim teknolojisi çok önemlidir. Fakat bu noktadaki kritik konu maliyettir yani ucuz hammadde ile yüksek saflıkta laktik asit üretimidir. Bakterilerden laktik asit üretimi biraz maliyetlidir, çünkü kısmen karmaşık karbon kaynaklarına ve minerallere ihtiyaç duyarlar. Ayrıca, yüksek asitli ortamlara dayanımları azdır; bu yüzden, laktik asit üretimleri sırasında verimi arttırmak için sürekli olarak laktat oluşturulup ortamdan uzaklaştırılması gerekmektedir (Zhou vd. 2003; Narayanan vd. 2004; Henton vd. 2005; Okano vd. 2010).

Laktik asit, mikrobiyal fermentasyon ya da kimyasal sentezle üretilmektedir (Şekil 2.2). 1960'ların başında, ısı-kararlı laktik asit ihtiyacı nedeniyle laktik asit sentezlemek için kimyasal bir yöntem geliştirilmiştir. Ancak laktik asidin dünyadaki üretiminin %90'ı bakteriyel fermentasyonla yapılmaktadır. Laktik asidin L(+)-laktik asit ve D(-)-laktik asit olmak üzere iki optik izomeri vardır. Laktik asidin bir gıda katkı maddesi olarak kullanımı FDA (ABD Gıda ve İlaç İdaresi) tarafından GRAS (genel olarak güvenli kabul) olarak sınıflandırılır, ancak D(-)-laktik asit insan metabolizmasında asidoz ve kemik erimesine neden olabilmektedir. L(+)-laktik asit, biyolojik olarak tüketilebilmesi ve ilaç amaçlı kullanılabilmesi bakımından daha önemlidir. Rasemik DL-laktik asit kimyasal sentez ile petrokimya kaynağı kullanılarak üretilir. Optik olarak saf L(+)- ya da D(-)- laktik asit fermentasyon ile yenilenebilir substratlardan elde edilebilmektedir. Laktik asidin optik saflığı, polilaktik asidin (PLA) fiziksel özellikleri için çok önemlidir ve ticari kullanımlara uygun kristalleşmesi yüksek bir PLA için optik olarak saf bir L(+)- ya da D(-)-laktik asit rasemik DL-laktik asitten daha fazla polimerize edilebilir. Petrokimya kaynaklarının sınırlı olması ve petrokimya sanayiinden kaynaklanan kirliliğe karşı çevreci bir alternatif sunması nedeniyle biyoteknolojik laktik asit üretimi ile ilgili çalışmaların sayısı son zamanlarda önemli miktarda artmıştır (Branduardi vd. 2006; Wee vd. 2006; Okano vd. 2010). Dünya ticaretinde laktik asit, yıllık ortalama %30'la en yüksek artış sağlayan ticari metallerden biri haline gelmiştir (Nampoothiri vd. 2010; Okano vd. 2010)



Şekil 2.2. Mikrobiyal fermentasyon ya da kimyasal sentezle laktik asit üretimi (Narayanan vd. 2004).

Pichia pastoris, biyoteknoloji ve ilaç endüstrisinde rekombinant protein üretimi için ihtiyaç duyulan bir ekspresyon sistemi olmasıyla birlikte araştırmacılar tarafından da sıklıkla kullanılmaktadır. *P. pastoris*, bakteriler gibi, tek karbon kaynağı olarak metanol, glukoz, gliserol veya etanol içeren ucuz besiyerlerinde hızla gelişim gösterebilmektedir. Buna ilaveten, *P. pastoris*, bizler gibi ökaryotik bir organizmadır ve birçok ökaryotik transkripsiyon sonrası modifikasyonları gerçekleştirebilmesi, heterolog proteinleri hem hücre içi hem hücre dışı olarak çok yüksek miktarlarda üretebilme kapasitesine sahip

olması nedeniyle bakterilere göre daha iyi olanaklar sağlamaktadır (Daly vd. 2005; Cos vd. 2006; Qin vd. 2011). Buna ilaveten proteolitik işlemler, disülfid köprüsü oluşumu ve glikozilasyon gibi post-translasyonel modifikasyonları gerçekleştirme yeteneğine sahiptir. Kancalı kurt (Hookworm) enfeksiyonuna karşı aşı, botulizm nörotoksinine karşı aşı ve insan serum albumini *P. pastoris*'de üretilen eczacılık proteinlerine örnek olarak verilebilir (İnan vd. 1999). *P. pastoris* ekspresyon sistemi, diğer sistemlerle karşılaştırıldığında yüksek düzeyde protein ekspresyonu gerçekleştirebiliyor olmakla birlikte, sistemin verimliliğini arttırmak için çalışmalar yapılmaya devam edilmektedir (İnan ve Meagher 2001; Macauley-Patrick vd. 2005; Qin vd. 2011; Potvin vd. 2012).

İki akademik araştırma laboratuvarı tarafından, iki farklı *P. pastoris* suşunun genom sekansı belirlenmiştir. Genom sekansının mevcudiyeti, *P. pastoris*'in araştırmalarda ve endüstriyel uygulamalarda değerlendirilmesine öncülük edecektir (Cereghino ve Cregg 2000; Mattanovich vd. 2009).

P. pastoris fermentör ortamında çok yüksek hücre yoğunluğuna çıkabildiği için 1970'li yıllarda tek hücre proteini üretimi için geliştirilmiştir. Bu mayanın yüksek hücre yoğunluğuna çıkabilmesi Crabtree-negatif olmasından kaynaklanmaktadır. Diğer bir ifadeyle, aerobik ortamda yüksek karbon konsantrasyonunda etanol üretimi gerçekleştirmez. Crabtree-pozitif olarak sınıflandırılan ekmek mayasında (*S. cerevisiae*) aerobik şartlarda yüksek şeker (glukoz) konsantrasyonunda etanol üretimi gerçekleşir (Van Urk vd. 1989). Bu mekanizmayı bulunduran mayalar Crabtree-pozitif olarak sınıflandırılır. *P. pastoris* ise crabtree-negatif bir mayadır. Fakat literatürde ulaşılan bazı çalışmalarda, *P. pastoris*'in oksijenli (aerobik) fermentasyon ortamında az da olsa etanol üretimini gerçekleştirdiği ve bu yan ürün olarak üretilen etanolün, alkol oksidaz promotorunu baskıladığı ve rekombinant protein üretimini olumsuz etkilediği ortaya konulmuştur (İnan ve Meagher 2001; Sohn vd. 2010). Fakat GAP promotoru kontrolü altında rekombinant protein üretimi esnasında, oksijen seviyesinin hipoksik (hypoxic) şartlara düştüğü anda (oksijen seviyesinin aerobik organizmalar için kritik seviyeye indiği zaman), ortamda etanol oluştuğu ve etanolün ilerleyen safhalarda katabolize edildiği gözlenmiştir. Bu şartların da rekombinant protein üretimini arttırdığı ortaya konulmuştur (Baumann vd. 2008; Qin vd. 2011).

Laktik asit, genellikle şekerlerden laktik asit fermentasyonu yapan laktik asit bakterilerinin birkaç türü tarafından doğal olarak üretilir. Bakteriyel fermentasyon işlemi hızlı ve verimlidir, ancak laktik asit bakterileri karmaşık azot kaynakları gerektiren fermentasyon ortamına ihtiyaç duyarlar ve bu da işlemin maliyetini artırmaktadır (Shengde vd. 2003; Nampoothiri vd. 2010). Kalsiyum karbonat ya da diğer tamponlayıcı kimyasalların kullanımı laktik asit bakterileri için zararlı olan bir ortam oluşturur. Laktik asit üretimi için, alternatif konukçu organizma olarak maya türlerine ilgi artmıştır (Porro vd. 1999; Branduardi vd. 2006). Örneğin, *Saccharomyces cerevisiae* (Adachi vd. 1998; Colombie' vd. 2003; Saitoh vd. 2005; Ishida vd. 2006; Branduardi vd. 2006), *Candida utilis* (Tamakawa vd. 2012), *Candida boidinii* (Osawa vd. 2009), *Pichia stipitis* (İlmén vd. 2007) ucuz büyüme ortamı içinde yetiştirilen, düşük pH ve organik asitlere nispeten daha dayanıklı organizmalardır.

Yapılan bir çalışmada, *Bos taurus* kaynaklı laktat dehidrogenaz (LDH) geninin, GAP promotorunun kontrolü altında *P. pastoris* X-33 suşuna ilk defa aktarıldığı bildirilmiştir. Söz konusu çalışmada, *P. pastoris*'in solunum metabolizması bilinmesine

rağmen farklı oksijen düzeyleri altında test edilmiş ve düşük oksijen seviyesinin fermentatif metabolizmayı hızlandırarak %20 oranında daha fazla L-laktik asit üretimine neden olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, bu çalışmada iki laktat taşıyıcı promotor değerlendirilmiş; bunlardan biri *Saccharomyces cerevisiae*'dan elde edilen *Jen1p*, diğeri ise ilk defa tanımlanan *P. pastoris* promotoru *PAS*. Bütün suşların gliserol tüketimi ve laktik asit üretimi kesikli beslemeli fermentasyon koşullarında değerlendirilmiştir. En iyi üretim 0,7 g/g verimle hem LDH hem de laktat taşıyıcı aktiviteye sahip *PAS* promotoru kontrolü altında üretim yapan suшта elde edilmiştir (de Lima vd. 2016).

Ilmén ve arkadaşları (2007) doğal olarak ksilozu kullanabilen *Pichia stipitis*'in genetik olarak tasarlanmış suşlarında L-Laktik asit üretimi yapmışlardır. *ADH1* promotoru kontrolü altında *Lactobacillus helveticus*'a ait L-laktat dehidrogenaz (LDH) genini aktararak bir *P. stipitis* suşu oluşturmuşlar ve ksiloz, glukoz ve bu iki şekerden oluşan bir karışımı laktik asit üretimi için karbon kaynağı olarak kullanmışlardır. Çalışmada kullanılan *P. stipitis* suşunun ksilozu L-laktik aside çevirmede hem miktar hem de verim açısından glukozu göre daha başarılı olduğu bulunmuştur. 100 g/litre ksiloz içeren besi yerinden 58 g/litre laktik asit elde edilirken, 94 g/litre glukoz içeren besi yerinden 41 g/litre laktik asit elde edilmiştir. Her iki şekerin varlığında (97 g/litre ksiloz+glukoz), 58 g/litre laktik asit üretilmiştir. LDH geni aktarılmamış suşa göre; ksiloz içeren ortamda etanol veriminde yaklaşık %15 ila %30 azalma saptanmışken glukoz içeren ortamda %70 ila %80 arası bir azalma belirlenmiştir. Sonuç olarak ilk defa, bir maya türünde ksiloz kullanılarak laktik asit üretim yapılmış ve verimli bir fermentasyon sağlanmıştır.

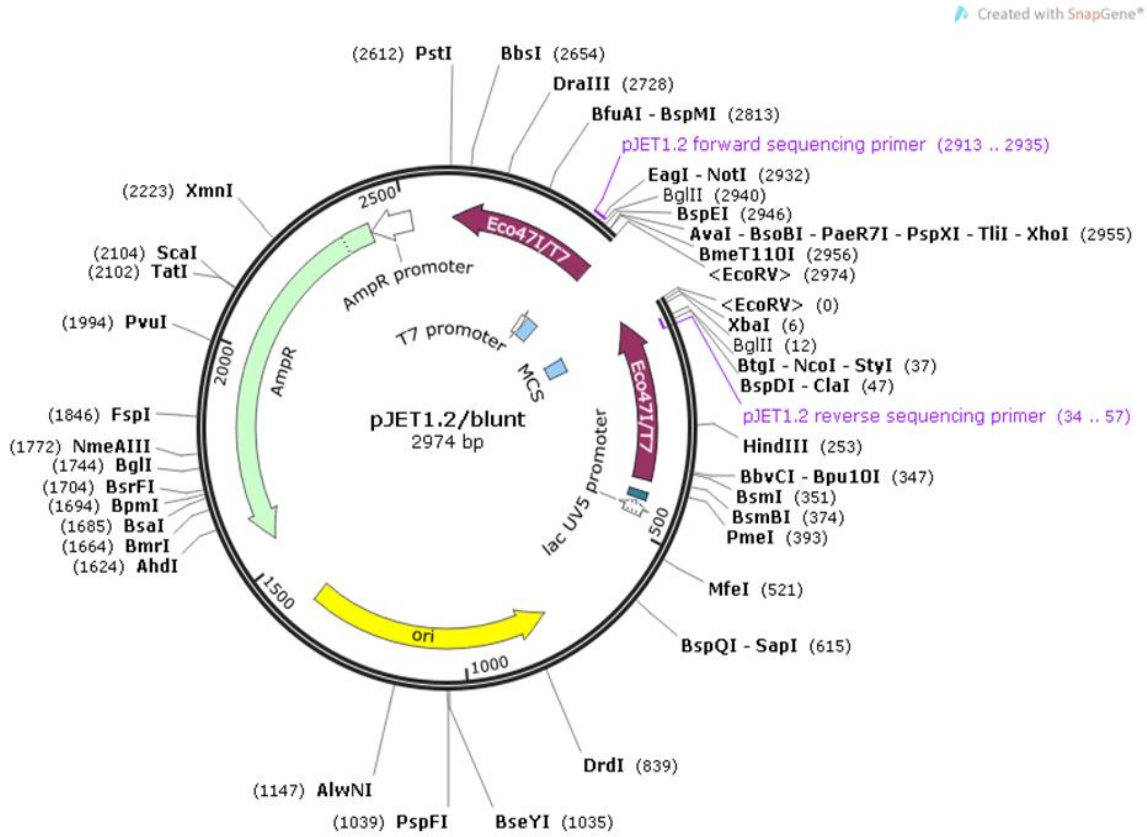
3. MATERİYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Suşlar ve plazmitler

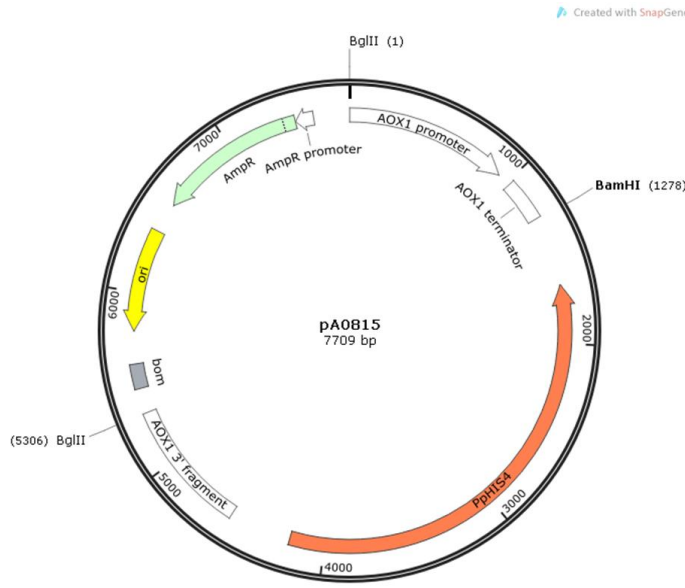
Klonlama konukçusu olarak ve plazmitlerin çoğaltılması amacıyla kimyasal gen aktarımına uygun *E. coli* suşu XL1-Blue, *PDC* genleri inaktif suşların elde edilmesi için *P. pastoris* GS115 (his4-) suşu, *GAP* ve *PDC* promotorları ile rekombinant L-laktik asit üretimi çalışmalarında *P. pastoris* X33 (yabanıl tip) suşu konukçu olarak kullanılmıştır.

Gen klonlamaları için pJET1.2 (Fermentas) klonlama vektörü seçilmiştir (Şekil 3.1). *P. pastoris* histidin geni (*HIS4*), *PDC* geninin inaktif hale getirilmesi için seleksiyon markırı olarak kullanılmış ve pA0815 plazmitinden (Şekil 3.2) elde edilmiştir.

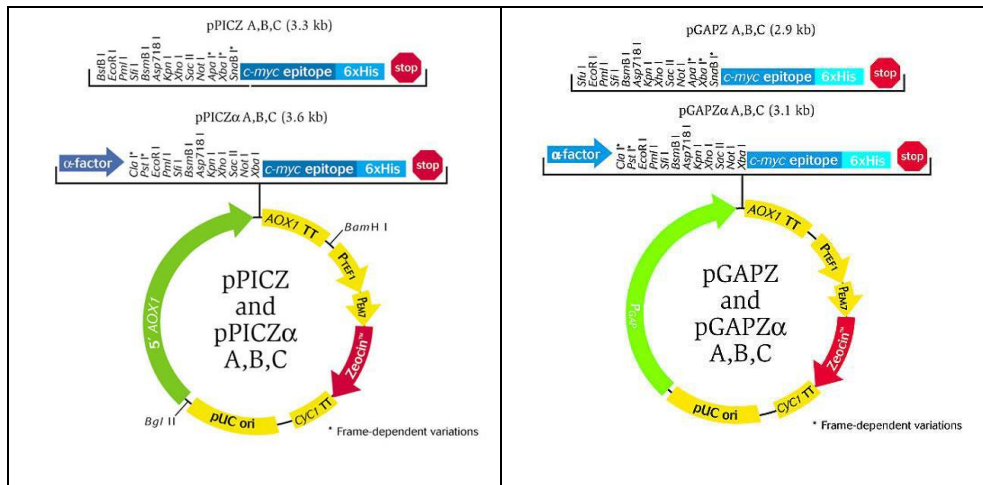


Şekil 3.1. Küt uçlu PZR ürünlerinin klonlanmasında kullanılan pJET1.2 plazmiti

P. pastoris *GAP* ve *PDC* promotorlarının rekombinant L-laktik asit üretiminde karşılaştırılması için, bu çalışmada pGAPZαB ve pPDCZαB ekspresyon vektörleri kullanılmıştır. Söz konusu vektörler, laboratuvarımızda mevcut bulunan pPICZαB ve pGAPZαA vektörlerinden (Invitrogen, CA, ABD) (Şekil 3.3) elde edilmiştir.



Şekil 3.2. *P. pastoris* histidin geninin (*HIS4*) mevcut bulunduğu pA0815 plazmiti



Şekil 3.3. Protein ekspresyonu için kullanılan pPICZαB ve pGAPZαB vektörleri

3.1.2. Kimyasallar

LB Miller (%0,5 maya ekstraktı, %1 pepton ve %1 NaCl) ve LB Lennox (%0,5 maya ekstraktı, %1 pepton ve %0,5 NaCl) katı ve sıvı besiyerleri *Escherichia coli* XL1-Blue suşlarının geliştirilmesinde uygun antibiyotik eklemeleri ile kullanılmıştır (Luria vd. 1960).

YPD (%1 maya ekstraktı, %2 pepton, %2 glukoz), MD (%1,34 YNB, 4×10^{-5} biyotin, %2 glukoz) ve BMDY (%2 pepton, %1 maya ekstrakt, %2 glukoz, 100 mM pH

6 fosfat tamponu) *P. pastoris*'in geliştirilmesi için katı ve sıvı olarak kullanılan besiyerleridir (İnan vd. 2007).

Bütün çalışma boyunca kullanılan restriksiyon endonükleazları ve bunların tampon çözeltileri Fermentas (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA ABD) firmasından sağlanmış, ayrıca endonükleaz uygulamaları üretici firmanın talimatları doğrultusunda yapılmıştır. Yapılan ligasyon işlemlerinde Fermentas ve Roche (Roche, Almanya) ligasyon kitleri firma talimatlarında belirtildiği şekilde kullanılmıştır. Kullanılan kimyasalların tamamı Merck (Darmstadt, Almanya) ve Sigma-Aldrich (MO, ABD) firmalarından sağlanmıştır. KOD HotStart DNA Polymerase (Novagen, Almanya) enzim kiti PZR analizlerinde üretici firmanın talimatlarında belirtildiği şekilde kullanılmıştır.

Gen ve protein homoloji taramalarında Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi Ağı Servisi (Bethesda, MD, ABD; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) kullanılmıştır.

3.1.3. Primerler

DNAMAN 7.0 (Lynnon Corporation) programı tüm DNA analizlerinde ve primer yapımında kullanılmıştır. Çalışmalarda kullanılan oligonükleotitler (primer) ve *Bos taurus LDH* geni Macrogen Inc. (Seul, Güney Kore) firmasından sağlanmıştır. Kullanılan primerlerin listesi Ek 1'de ve *Bos taurus LDH* genine ait DNA sekansı Ek 2'de verilmiştir.

3.2. Metot

P. pastoris'de gen aktarımı haricinde uygulanan bütün moleküler biyoloji teknikleri Sambrook ve Russell (2001)'de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. *P. pastoris*'de gen aktarımı çalışmaları İnan vd (2007)'de uygulandığı gibi yapılmıştır.

3.2.1. Genomik DNA izolasyonu

P. pastoris DNA'sının saflaştırılması için MasterPure™ Maya DNA Saflaştırma Kiti (Epicentre Biotechnologies, WI, ABD) üretici firma tarafından verilen talimatlara göre kullanılmıştır.

İlk önce YPD agar (%2 pepton, %1 maya ekstraktı, %2 glukoz, %1,5 Agar) üzerinde gelişen saf kültürlerden tek tek koloniler seçilmiş, ardından bu koloniler 4 mL YPD sıvı besiyerine ekilerek çalkalamalı inkübatörde (Innova 44R, New Brunswick Scientific, NJ, ABD) bir gece boyunca gelişime bırakılmışlardır. Geliştirilen kültürden alınan 2.0 mL örneğin santrifüjlenmesi ile elde edilen hücre peletine DNA saflaştırma kiti talimatları doğrultusunda zimolaz enzimi içeren liziz solüsyonu ile muamele edilmiş ve *P. pastoris* hücre duvarının parçalanması sağlanmıştır. Proteinleri uzaklaştırmak için çökeltme çözeltisi ile muamele edildikten sonra süpernatantta bulunan DNA %100

etanol ile çöktürülmüş ardından Tris-EDTA (pH 7,5) tamponunda çözülmüştür. Üretici firmanın talimatları doğrultusunda genomik DNA'nın saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Bütün santrifüj işlemleri 20.000 *g*'de, Centrifuge 5424 (Eppendorf, Almanya) cihazı ile yapılmıştır. Elde edilen genomik DNA izolatları, çalışmalarda kullanılmak üzere 4°C'de saklanmıştır.

3.2.2. Polimeraz zincir reaksiyonu

Bütün PZR reaksiyonları için, TGradient (Biometra Biomedizinische Analytik GmbH, Almanya) thermocycler (ısı döngü cihazı) ve KOD HotStart DNA Polymerase (Novagen, Almanya) enzim kiti üretici firmaların talimatları doğrultusunda kullanılmıştır.

PZR reaksiyonlarında kullanılan primerlerin listesi Ek 1'de verilmiştir. Isı döngü cihazında kullanılan bağlanma sıcaklıkları, en düşük bağlanma sıcaklığına sahip primerin bağlanma sıcaklığına göre $\pm 5^{\circ}\text{C}$ olacak şekilde ayarlanmıştır. Isı döngü cihazında amplifikasyon basamağı için öngörülen süre, beklenen PZR ürünün kbç cinsinden büyüklüğüne bağlı olarak enzim kitinin önerdiği süreye göre belirlenmiştir. Cihaz kapak sıcaklığı reaksiyon boyunca 99°C 'de tutulmuş ve reaksiyon bitiminde tüplerin bekletileceği sıcaklık ise 4°C olarak ayarlanmıştır. PZR reaksiyon karışımı ve konsantrasyonları Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. PZR reaksiyon karışımı

Bileşen	Final Konsantrasyon	Hacim
ddH ₂ O	-	130 μl
10XKOD Reaksiyon Tamponu	1x	20 μl
2mM dNTP Mix	0,2 mM	20 μl
25 mM MgSO ₄	1,5 mM	12 μl
10 μM PDCFATG (T _m :64)	15 pmol	6 μl
10 μM PDCRSTP (T _m :58)	15 pmol	6 μl
Kalıp DNA (5ng/ μl)	-	2 μl
KOD polimeraz (1U/ μl)	0,02U/ μl	4 μl
Toplam		200 μl

Gradient PZR denemelerinde 35 döngü içeren düz program kullanılmıştır. Çizelge 3.2'de uygulanan döngü programı için uygulanan şartlar verilmiştir.

Çizelge 3.2 PZR ısı döngü programı için süre ve sıcaklık koşulları

Sıra	Basamak	Sıcaklık	Süre	Sirkülasyon
1	Denatürasyon	95°C	02:00	
2	Denatürasyon	95°C	00:30	
3	Bağlanma	56-68°C gradient	00:10	
4	Uzama	70°C	01:30	34 kere 2'ye git
5	Son uzama	70°C	05:00	
6	Bekleme	4°C	∞	

Elektroforez içinde PZR ürünleri %1'lik agaroz jelde 1×TAE (Tris-Asetat-EDTA pH 8,3) tamponunda yürütüldükten sonra en yoğun tek bant halinde görüntülediği sıcaklık, primerlerin en uygun bağlanma sıcaklığı olarak belirlenmiştir. Daha sonraki reaksiyonlar tespit edilen bu sıcaklıkta yapılmıştır. MinElute PCR Purification Kit (Qiagen, CA, ABD) yardımı ile PZR ürünleri kullanılmadan önce gen aktarımı çalışmalarının daha sağlıklı yürütülmesi amacıyla üretici firmanın talimatları doğrultusunda saflaştırılmıştır. Yine aynı amaçla, MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen, CA, ABD) jel üzerinde bulunan hedef bantın kesilerek ekstrakte edilmesinde kullanılmıştır.

3.2.3. Agaroz jel elektroforezi ve jelin görüntülenmesi

Agaroz jel elektroforezi; genomik DNA saflaştırılma kalitesinin belirlenmesinde, PZR ürünlerinin ve restriksiyon enzimleri ile yapılan çalışmaların doğrulanmasında kullanılmıştır. Agaroz jel hazırlanırken ilk aşamada, 1×TAE tampon çözeltisi (Tris-Asetat-EDTA, 40 mM Tris, 20 mM asetik asit, 1 mM EDTA) içerisine %1 oranında agaroz (SeaChem, FMC Bioproducts, ME, ABD) ilave edilerek çözündürülmüştür. İkinci aşamada ise bu çözeltiye 20 µl/L etidiyum bromür çözeltisi (10 mg/mL) ilave edilerek mikrodalga fırın içerisinde berrak hale gelinceye kadar ısıtılmıştır. Daha sonra, çalışmalarımız için uygun ebatta ve şekildeki jel kalıplarına dökülmüş, seçilen taraklar yerleştirilmiş ve jel donuncaya kadar beklenmiştir. Taraklar çıkarıldıktan sonra oluşan jel kuyularına yüklenecek örnekler uygun hacimde hazırlanmıştır. Örnekler ve GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas) isimli markır, jel bloğu elektroforez tankında 1×TAE tampon içindeyken jel kuyularına yerleştirilmiştir. Bunu takiben DNA örnekleri jel içinde elektroforez uygulaması ile 120V doğru akım altında ve 45-90 dakika süreyle yürütülmüştür. Elektroforez sonucu jel içinde moleküler büyüklüklerine göre yatay bantlar oluşturan DNA molekülleri, etidiyum bromür yardımıyla jel görüntüleme sisteminin (Vilber Lourmant E-Box-VX2) UV ışık (312 nm) kaynağı sayesinde fotoğraflanmıştır. Kullanılan markır sayesinde de bantların molekül büyüklüğü yaklaşık olarak belirlenmiştir.

3.2.4. PZR ürünlerinin saflaştırılması

MinElute PCR Purification Kiti (Qiagen, CA, ABD) firmanın talimatları doğrultusunda PZR ürünü saflaştırılması işlemlerinde kullanılmıştır. Elde edilen DNA 10-20 µL 10 mM Tris (pH 8,0) elüsyonu içerisine alınmıştır. Saflaştırma işlemleri Centrifuge 5424 (Eppendorf, Almanya) santrifüj cihazı ile $>20000\times g$ kuvveti uygulanarak yapılmıştır.

3.2.5. Jelden DNA parçalarının ekstraksiyonu

Düşük erime noktasına sahip, %1'lik agaroz jelde (SeaKem, FMC Bioproducts, ME, ABD) DNA parçaları elektroforez ile yürütülüp farklı büyüklükteki bantlara ayrılmış ve daha sonra seçilen bant jelden kesilmiştir. MinElute Gel Extraction Kiti (Qiagen, CA, ABD) ile jelden DNA saflaştırma işlemleri üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Elde edilen DNA 10-20 µL 10 mM Tris (pH 8,0) elüsyonu içerisine alınmıştır. Saflaştırma işlemleri santrifüj cihazı ile $>20000\times g$ kuvveti uygulanarak yapılmıştır.

3.2.6. Plazmit izolasyonu

E.coli XL1-Blue hücreleri 3-4 mL antibiyotikli sıvı besiyerinde çoğaltılmak üzere 37°C'de 18-24 saat inkübe edilmiş, daha sonra hücreler QIAprep®Spin Miniprep Kiti (Qiagen, CA, ABD) ile üretici firmanın talimatları doğrultusunda plazmit izolasyonuna tabi tutulmuşlardır. Plazmit izolasyonunda Centrifuge 5424 (Eppendorf, Almanya) cihazı ile $>20,000\times g$ kuvvetinde santrifüj uygulanmıştır. Elde edilen plazmit 50 µL 10 mM Tris (pH 8,0) içerisine alınmıştır. Bunu takiben restriksiyon enzimleriyle yapılan kesimler ile plazmitin kalitesi ve doğruluğu tespit edilmiştir.

3.2.7. DNA ve plazmit konsantrasyonlarının ölçülmesi

PZR ürünlerinin, jelden kesilip ekstrakte edilen elüsyonların, plazmit izolatlarının ve genomik DNA saflaştırılması sonucu elde ettiğimiz izolatların DNA miktarı Qubit Fluorometer cihazı (Invitrogen, ABD) ile PicoGreen boya (Molecular Probes®, Invitrogen, CA, ABD) kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda ölçülmüştür. Bu talimata göre ilk önce kurve 0-1000 ng/µL standart DNA dilüsyonları kullanılarak hazırlanmıştır. Örneklerin ve standartların dilüsyonlarının hazırlanmasında 1×TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5) tampon çözeltisi kullanılmıştır. DNA miktarı hazırlanan standart kurve üzerinden cihaz tarafından otomatik olarak hesaplanmıştır.

3.2.8. Ligasyon ve gen aktarımı işlemleri

Fermentas (Fermentas, MD, ABD) ve Roche (Roche, Almanya) ligasyon kitleri üretici firmaların talimatları doğrultusunda ligasyon işlemlerinde kullanılmıştır. Ligasyon işlemlerinde plazmit ile ligasyonu yapılacak olan DNA parçasının molar oranları 1:3 veya 1:5 olacak şekilde hesaplanmıştır. Çalışmada kullanılan ligasyon reaksiyonları son hacim 15-25 µL olacak şekilde ayarlanmıştır.

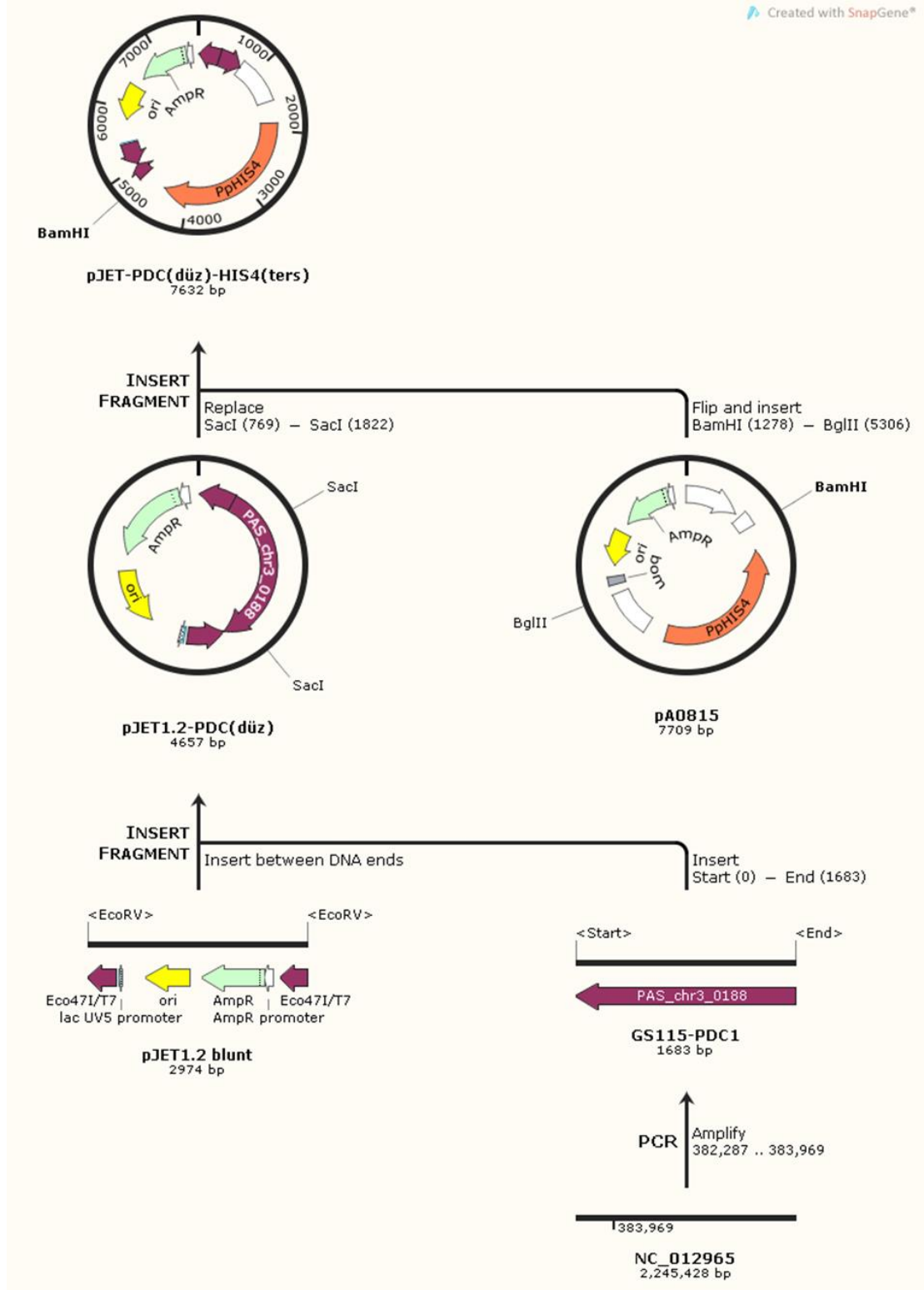
Gen aktarımı işlemi *E.coli* XL1-Blue suşu ile *P. pastoris* hücrelerinde farklı şekilde uygulanmıştır.

Kimyasal gen aktarımı için seçilen *E.coli* XL1-Blue suşu, CaCl₂ metodu ile kimyasal gen aktarımına yetenekli hale getirilmiştir. Kimyasal gen aktarımı işlemleri için buz üstünde tutulan hücrelere 1-5 µL arasında ligasyon karışımı veya plazmit çözeltisi eklenmiş ve karışımın ya da plazmidin hücrelere yaklaşması için 30 dakika süre ile inkübasyona tabi tutulmuştur. Ligasyonun gerçekleştirildiği tüpler ısı bloğunda (Techne Dri-Block DB-2D) 42°C'de 60 sn tutularak, hücreler içerisine istenen fragmentlerin girmesi için ısı şoku uygulanmış ve ardından tekrar buz üzerine alınarak 5 dakika inkübe edilmiştir. Bu işlemler sonunda, 200 µL Luria-Bertani (LB) Miller (5 g/L maya ekstraktı, 10 g/L pepton, 10 g/L NaCl) veya Luria-Bertani (LB) Lennox (5 g/L maya ekstraktı, 10 g/L pepton, 5 g/L NaCl) sıvı besiyerlerinden tüp içerisine ilave edilmiş ve çalkalamalı inkübatörde 37°C'de 1 saatlik inkübasyon uygulanmıştır. Inkübasyon sonunda tüpte bulunan sıvı, içerisinde 25 µg/mL zeosin içeren LB Lennox agar veya 100 µg/mL amfisilin içeren LB Miller agar bulunan petrilere yayma yöntemi ile ekilmiştir. Petrilere ekilen *E.coli* XL1-Blue suşu 37°C'de bir gece üremeye bırakılmıştır.

P. pastoris hücreleri elektroporasyonla gen aktarımına tabi tutulmuş ve bunun için öncelikle Lityum asetat metodu ile gen aktarımına uygun hale getirilmiştir (Wu ve Letchworth 2004). *P. pastoris* hücreleri elektrokimyasal gen aktarımından önce -80 °C'den alınıp buz üstünde bekletilmiştir. Daha sonra lineer hale getirilmiş DNA parçası veya plazmit 1-10 µL arasında olacak şekilde hücrelerin üzerine eklenmiş ve tüm karışım 2 mm genişliğe sahip elektroporasyon küvetlerine boşaltılmıştır. Elektroporasyon işlemi, küvetin Eppendorf Eporator (Eppendorf Eporator 4309) cihazına yerleştirilip 1500 V gerilime 5 ms süre maruz bırakılması sonucu tamamlanmıştır. Bu işleme tabi tutulan tüp içerisindeki hücreler buz üzerine alınmış ve üzerlerine önceden soğutulmuş 1 M sorbitol çözeltisinden 1 mL eklenmiştir. Ayrı bir tüpe alınan karışım, 30°C'de 1 saat süreyle inkübasyona bırakıldıktan sonra 100 µg/mL zeosin ilaveli YPD veya MD agar içeren plakalara yayma ekimi gerçekleştirilmiştir. Ekimi yapılan *P. pastoris* hücrelerinin 30°C'de 2-3 gün süre ile çoğaltılmaları sağlanmıştır.

3.2.9. *Pichia pastoris*'e ait pirüvat dekarboksilaz (PDC) geninin inaktif hale getirilmesi

P. pastoris'e ait PDC geninin pJET1.2 plazmiti üzerinde gen yer değiştirme ile *HIS4* geni kullanılarak inaktif edilmesinin şematik gösterimi Şekil 3.4'de verilmiştir.



Şekil 3.4. *P. pastoris*'e ait *PDC* geninin pJET1.2 plazmiti üzerinde gen yer değiştirme ile *HIS4* genini kullanarak inaktif edilmesinin şematik gösterimi.

PDCFATG / PDCRSTP primerleri kullanılarak PZR'de çoğaltılan *PpPDC* geni (1683 bp), jel pürifikasyonundan sonra, Thermo Scientific CloneJET PCR Cloning Kit kullanılarak pJET1.2 vektörüne kit protokolüne göre aktarılmıştır. Elde edilen plazmit, CaCl_2 metodu ile kompetent hale getirilen *E.coli* XL1 Blue hücrelerine aktarımı yapılmıştır. Seçilen beyaz koloniler amfisilinli LB sıvı besiyerinde 37°C'de inkübe edilmiştir. Plazmit DNA'lar Plasmid MiniPrep kitle (Qiagen) birlikte tam otomatik olarak QIAcube cihazı ile izole edilmiştir. *PpPDC* geninin plazmite bağlandığının doğrulanması için elde edilen plazmitlere kesme analizi yapılmıştır (Sca I kesme enzimi ile kesilen plazmitlerde %1 agaroz jelde ayrıldığında 3625 ve 1032 bp uzunluğundaki fragmentlerin varlığına bakılmıştır).

Yeni plazmit pJET1.2-PDC, *PpPDC* geninin orta bölümünün (398 bp-1451 bp arası) düşürülmesi için kesme enzimiyle (Sac I) kesilmiştir. Daha sonra %1 agaroz jelde ayrılmaları sağlanmış ve 3604 bp'ye sahip bölüm kesilip jelin saflaştırılmasıyla plazmit elde edilmiştir. Elde edilen plazmit lineer olarak kalıp üzerine tekrar bağlanmaması için defosforilasyona tabi tutulmuştur. Laboratuvarımızda mevcut bulunan *Pichia* ekspresyon vektörü pA0815 kesme enzimleri (BamH I – Bgl II) ile kesilip HIS4 geni elde edilmiş ve lineer hale getirilmiş plazmide bağlanmıştır. Daha sonra PDCFATG / PDCRSTP primerleri kullanılarak *PpPDC::HIS4* geni PZR ile çoğaltılmıştır.

Elde edilen bu gen elektroporator vasıtasıyla kompetent *P. pastoris* GS115 suşlarına aktarılmış ve bu suşlar MD katı besiyerlerine ekilmiştir. Bu besiyerlerinde oluşan kolonilerden alınıp YPD katı besiyerine çizilmiştir. Buradan alınan tek kolonilerin YPD sıvı besiyerinde çoğaltılması sağlanmış ve "Epicentre Masterpure Yeast DNA Purification Kit" kullanılarak genomik DNA'nın saflaştırılması yapılmıştır. Elde edilen maya DNA'sı, PZR ile *PpPDC::HIS4* geninin genoma girip girmediği kontrol edilmiştir. Bulunan olumlu sonuçların devamında Southern Blot metoduyla genin doğru yere bağlanıp bağlanmadığı kontrol edilmiştir. Southern Blot metoduyla doğrulanmış *PDC* geni inaktif suşa FA115 ismi verilmiştir.

3.2.10. Southern blot analizi

Southern blot analizi *P. pastoris* hücrelerinin gen aktarımı sonrası MD veya YPD plakalarda seleksiyonu yapılan kolonilerin inaktif suş olup olmadığının belirlenmesi ve L-laktat dehidrogenaz geninin farklı promotorlar kullanılarak istenilen noktaya yerleştirildiğinin doğrulanması amacıyla gerçekleştirilmiştir. Elektroporasyonla gen aktarımına tabi tutulmuş hücreler içerisinden seçilen koloniler YPD besiyerinde çoğaltılarak uygun prosedürle genomik DNA izolasyonları yapılmış ve DNA izolatları daha önceden belirlenen kesme enzimleriyle (*ScaI*, *BstXI* ve *EcoRI*) muamele edilmiştir. Kesim işleminden sonra %0,8 agaroz jele yüklenen örnekler elektroforezde 120 Voltta 2 saat 1×TAE tamponu içinde yürütülmüştür. Bu işlemden sonra jel alınıp orbital çalkalayıcı üzerinde ilk önce 45 dakika denatürasyon çözeltisiyle (0,5 M NaOH ve 1,5 M NaCl) ve ardından 30 dakika nötralizasyon çözeltisi [0,5 M Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA ve 1,5 M NaCl] ile muameleye tabi tutulmuştur. 10×SSC blotlama tamponuyla (0,3 M sodyum sitrat, 1 mM EDTA ve 3 M NaCl) ıslatılan Naylon Membran (20×20 cm Positively Charged Nylon Membran, Roche, ABD) çalkalayıcıdan alınan jelin alt yüzü ile temas edecek şekilde yerleştirilmiştir. Blotlama işlemleri 10×SSC blotlama tamponu

yardımıyla 2-3 saat süre içerisinde tamamlanmış ve ardından hibridizasyon aşamasına geçilmiştir. Hibridizasyonun başlangıcında membran kısa süreliğine kuruması için kağıt havlu üzerinde bekletilmiş daha sonra ultraviyole çapraz bağlayıcı (CL-1000 Ultraviolet Crosslinker, UVP, CA, ABD) içinde 3 defa 120 mJ enerji seviyesinde uygulama yaparak DNA moleküllerinin membran üzerine bağlanması sağlanmıştır. Membran son aşamada hibridizasyon tüpünderken üzerine ön hibridizasyon çözeltisi eklenerek 1 saat ön hibridizasyona tabi tutulmuş ve hemen ardından DIG etiketli probu içeren hibridizasyon çözeltisi eklenerek 41°C’de bir gece hibridizasyona bırakılmıştır.

Hibridizasyon aşamasını takiben membran orbital çalkalayıcı üzerinde bir kap içine alınarak sırasıyla ilk yıkama çözeltisi (2XSSC + %0,1 SDS) ve ikinci yıkama çözeltisi (0,5XSSC + %0,1 SDS) ile muamele edilerek yıkanmıştır. Bu ilk işlemin ardından, membran üzerine sırasıyla kapatma tamponunda (1xDIG blocking solution) ilave edilip 1 saat, yıkama tamponunda [0,1 M maleik asit (pH 7,5), %0,3 (v/v) Tween 20] 2 kez ilave edilip 5’er dakika, anti-DIG antikor çözeltisinde ilave edilip 1 saat, yıkama tamponunda 4 kere ilave edilip 5’er dakika ve dedeksiyon tamponunda [0,1 M Tris (pH 9,5) ve 0,1 M NaCl] ilave edilip 5 dakika yıkanmıştır. Bu işlemlerin ardından membran şeffaf polipropilen folyo içine yerleştirilerek üzerine birkaç damla CSPDR (alkali fosfataz substratı) çözeltisi damlatılmıştır. Daha sonra folyo içindeki hava boşlukları alınarak 37°C’de 10 dakika bekletilmiştir. Son aşamada membran, X-ışını kaseti içine X-ışını filmiyle üst üste gelecek şekilde kapatılıp karanlık odada 30-60 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda Kodak film geliştirme çözeltileriyle karanlık odada muamele edilerek elde edilen X-ışını filmi üzerindeki bantlar gözlenmiştir.

3.2.11. Erlenmayer deneyleri

Seçilen transformant hücreler 5 ml YPD besiyeri içeren test tüplerine ekilmiş ve 28°C’de 24 saat 250 d/d’de inkübasyona tabi tutulmuşlardır. Bu hücreler, başlangıç yoğunluğu $OD_{600nm}=0,1$ olacak şekilde, 50 ml %2,5 ve %5 glukoz içeren BMDY (%2 pepton, %1 maya ekstrakt, 100 mM pH 6 fosfat tamponu) sıvı besiyerinde 250 ml’lik erlenmayerler için inokulum olarak kullanılmıştır. Inkübasyon 28°C’de 150 ve 200 d/d’de gerçekleştirilmiştir. Her 6 saatte bir örnekler alınarak gelişen hücreler $4000\times g$ ’de 5 dakika santrifüjleme ile çöktürülüp üstte kalan sıvı analiz edilmek üzere saklanmıştır. Çalkalamalı inkübatördeki (Innova 44R, New Brunswick, NJ ABD) yukarıda belirtilen parametreler kullanılarak yapılan optimizasyon çalışmalarıyla suşların L-laktik asidi ne kadar ürettikleri YSI 2700 Select Biochemistry Analyzer (YSI Life Sciences, Ohio USA) ile belirlenmiş ve en verimli klon seçilerek 2 ml’lik kriyo tüplerde ilerideki çalışmalarda kullanılmak üzere -80°C’de muhafaza edilmiştir.

LDH geninin olarak *GAP* ve *PDC* promotorları ile rekombinant L-laktik asit üretiminin erlenmayer şartlarında karşılaştırılması işleminde klonlar, -80°C’deki kültürden YPD sıvı besiyerine ekilmiş ve 30°C’de çalkalamalı inkübatörde bir gece inkübe edilmiştir. Ertesi gün hücre yoğunluğunu artırmak amacıyla BMDY besiyerine 0,1 OD olacak şekilde ekimleri yapılmıştır. Klonlar, 72 saat boyunca, 30°C’de 200 d/d hızda, çalkalamalı inkübatörde indüksiyona bırakılmıştır. Her 12 saatte bir süpernatantlardan örnekler alınarak OD, pH ve L-laktik asit analiz edilmiştir. Denemeler 3 paralelli olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.12. Fermentörde üretim

Kullanılan besiyeri ve inokulumun hazırlanması: Belirlenen klonlar 5 ml YPD içeren test tüpünde 28°C'de 24 sa. 250 d/d'de inkübe edilmiştir. Bu kültür BMGY besiyeri (%2 pepton, %1 yeast ekstrakt, %1 gliserol, %1,34 YNB ve 100 mM fosfat tamponu pH 7,0) içeren engelli erlenler için inokulum olarak kullanılmıştır. Maya ön kültürü, 600 nm'deki optik yoğunluğu 10-15 oluncaya kadar çalkalamalı inkübatörde yaklaşık 24 saat geliştirilmiştir. Erlenlerde geliştirilen kültür %3 oranında 5L hazneli fermentör için inokulum olarak kullanılmıştır. Fermentasyon işlemleri 5L çalışma hacimli fermentörlerde yapılmıştır.

Kesikli Fermentasyon: Kesikli fermentasyonda kullanılan besiyeri temel tuzlu besiyeri (basal salts medium, BSM) ve 4,55 mL/L PTM1 tuzlarından oluşmaktadır. BSM besiyeri, litrede, 50 g glukoz, 26,7 mL %85 H₃PO₄, 0,93 g CaSO₄, 18,2 g K₂SO₄, 14,9 g MgSO₄.7H₂O, 4,13 g KOH ve 2 mL %5'lik köpük kırıcı olacak şekilde hazırlanmıştır. PTM1 tuzlarının içeriği Çizelge 3.3'de verilmiştir (Zhang vd. 2007). Başlangıç fermentasyon hacmi 2 L olarak hesaplanmıştır. Fermentasyonlar 28°C' de ve pH kontrolü yapılmadan gerçekleştirilmiştir. Çözünmüş oksijen miktarı (Dissolved Oxygen, DO) saf oksijen beslemesi ve sabit karıştırma hızı ile başlangıçta %30 seviyesinde tutulmuştur. İnokulum olarak hazırlanan kültürden 60 mL aseptik olarak fermentör haznesine aktarılmıştır. Glukozun tükenmesi, çözünmüş oksijen miktarındaki ani ve keskin bir artışla tespit edilmiştir. Bu noktadan sonra fermentasyon sonlandırılmıştır.

Çizelge 3.3. PTM1 tuzlarının bileşimi

Bileşen	Hacim
CuSO ₄ .5H ₂ O	2 g/L
ZnCl ₂	7 g/L
NaI	0,08 g/L
FeSO ₄ .7H ₂ O	22,0 g/L
MnSO ₄ .H ₂ O	3,0 g/L
Biotin	0,2 g/L
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,2 g/L
Borik asit	0,02 g/L
CoCl ₂	0,5 g/L
H ₂ SO ₄	2 mL

Kesikli Beslemeli Fermentasyon: Başlangıç fermentasyon hacmi 2 L olarak hesaplanmıştır. Fermentasyonlar 28°C' de ve pH 5,0'de gerçekleştirilmiş, pH kontrolü %28'lik (w/v) amonyum hidroksit çözeltisi ile yapılmıştır. Çözünmüş oksijen miktarı (Dissolved Oxygen, DO) saf oksijen beslemesi ve karıştırma hızında yapılan kademeli

değişikliklerle %30 seviyesinde tutulmuştur. İnokulum olarak hazırlanan kültürden 60 mL aseptik olarak fermentör haznesine aktarılmıştır. Fermentasyon süreci 2 aşamadan oluşmaktadır; Kesikli Faz ve Üretim fazı.

Kesikli Faz: Kesikli fazda kullanılan besiyeri temel tuzlu besiyeri (basal salts medium, BSM) ve 4,55 mL/L PTM1 tuzlarından oluşmaktadır. BSM besiyeri, litrede, 40 g glukoz, 26,7 mL %85 H₃PO₄, 0,93 g CaSO₄, 18,2 g K₂SO₄, 14,9 g MgSO₄.7H₂O, 4,13 g KOH ve 2 mL %5'lik köpük kırıcı olacak şekilde hazırlanmıştır.

Besiyerinin pH'sı PTM1 tuzlarının ilavesinden sonra ayarlanmıştır. Kesikli faz sonunda 100g/L civarında bir (yaş) hücre yoğunluğuna ulaşılması hedeflenmektedir.

Üretim Fazı: Glukozun tükenmesi, çözünmüş oksijen miktarındaki ani ve keskin bir artışla tespit edilerek, bu noktadan sonra 100 g/L glukoz ilave edilip beslemeli fazda üretim gerçekleştirilmiştir (Zhang vd. 2007). Seçilen klonların glukozu farklı hızlarda tüketmesi sebebiyle üretim fazına geçiş farklı zamanlarda olmuştur. Denemeler iki tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.13. PDC enzim aktivite analizi

PDC aktivitesi için kontrol suşu olarak X33 seçilmiştir. FA115 (*Apdc*) inaktif suşun etanolde üreyememesi nedeniyle X33 ve FA115 hücreleri ilk olarak 3 mL YPD besiyerinde 28°C 250 d/d çalkalamalı inkübatörde 24 saat boyunca geliştirilmiştir. İnkübasyon sonunda analizin yapılacağı 50 mL YPD besiyerine 0,1 OD olacak şekilde seyreltilmiş ve 28°C 250 d/d çalkalamalı inkübatörde 24 saat boyunca geliştirilmiştir. Daha sonra, 4°C'de 10000xg kuvvetinde 5 dakika santrifüj yapılarak alınan hücre peleti 20 mL 1 M sorbitol ile 2 defa yıkanmıştır. 200 mg yaş hücre peleti 2 mL hacimli tüplere alınmış ve üzerlerine önce hücre duvarını kırmak için kullanılan tampondan (0,5 mM EDTA, 1 M HEPES, 1 M DTT, 200 mM PMSF, 1,5 M NaCl, 1 M MgCl₂, %10 gliserol) 1 ml eklenmiştir. Daha sonra hücreler üzerine, yaklaşık 0,5 mL boncuk (0,5 mm çapında, Zirconia/SILICA, Biospec Products, ABD) eklemesi yapılarak Tissue Lyser II (Qiagen, CA, ABD) cihazında 30 frekansındaki çalkalamalarla 1'er dakikalık işlem 5 defa uygulanmıştır. Hücrelerin içinde olduğu tüpler, sıcaklığın yükselmesini engellemek için aralarda 5'er dakika buz üzerinde tutulmuşlardır. İşlem sonunda 4°C'de, 20000xg kuvvetinde, 10 dakika santrifüjlenen tüplerden alınan üst sıvı fazlar yapılacak analize kadar ve analizleri sırasında buz üzerinde bırakılmışlardır.

PDC enzim aktivitesi, spektrofotometrik olarak kullanılan kitin protokolü doğrultusunda tayin edilmiştir [Enzymatic assay of pyruvate decarboxylase (EC 4.1.1.1), Sigma]. Pirüvatın, pirüvat dekarboksilaz enzimi tarafından asetaldehite yükseltgenmesi sonucu oluşan β-NADH elektron reseptörünün β-NAD'a indirgenmesi ile değişen absorbansın ölçümü bu testin prensibini oluşturmaktadır.

PDC aktivitesi, UV-spektrofotometre (Aquamate Plus, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ABD) ile 340 nm dalga boyunda absorbansta meydana gelen değişiklik gözlenerek tespit edilmiştir. Bütün çalışmalar oda sıcaklığında (25°C) gerçekleştirilmiştir. 200 mM sodyum sitrattan 2,7 mL, 1 M sodyum pirüvattan 0,1 mL,

6,4 mM β -NADH'dan 0,05 mL, 200 ünite/mL alkol dehidrogenazdan 0,05 mL alınıp karıştırılmış, oda sıcaklığında bir süre tutulmuş ve UV küvetlere alınarak 340 nm'de absorbansı sabitlenene kadar bekletilmiştir. Daha sonra konsantrasyonu 100 ng/ml protein olacak şekilde örnekten 0,1 mL eklenerek reaksiyon başlatılmış ve absorbanstaki değişiklik 6 dakika boyunca her dakika kaydedilmiştir.

3.2.14. Toplam protein ölçümü

Örneklerde toplam protein konsantrasyonları Pierce Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) ile, firma tarafından verilen protokol doğrultusunda ölçülmüştür. 0,9 mL Bradford çözeltisi içine 0,1 mL örnek koyulmuş ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilerek 595 nm dalga boyunda spektrofotometrede okuma yapılmıştır. Protein standart kurvesi 0-500 μ g/mL protein standartı ile hazırlanmıştır.

3.2.15. İstatistiksel Analiz

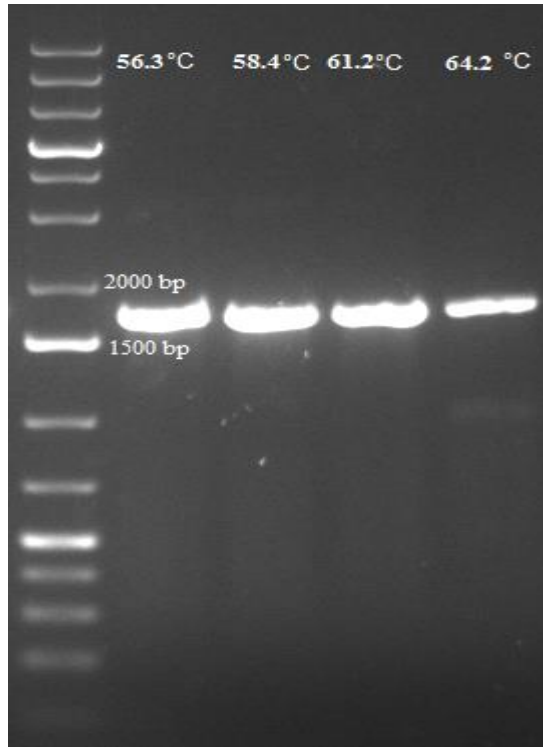
Elde edilen fermentör sonuçları SAS paket programı kullanılarak varyans analizi ve Duncan Çoklu Karşılaştırma Testine tabi tutulmuştur (Düzgüneş vd. 1987).

4. BULGULAR

4.1. PDC Geninin İnaktif Hale Getirilmesi

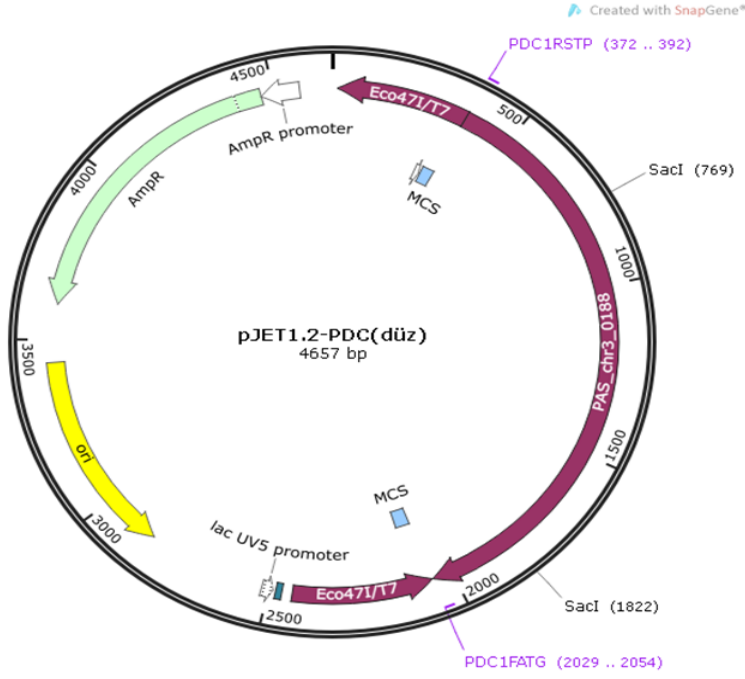
PDC geni (1683 bç) *P. pastoris* GS115 suşunun genomik DNA'sından polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile elde edilmiştir. YPD sıvı besiyerinde çoğaltılan *P. pastoris* GS115 suşu genomik DNA'sı Maya Genomik DNA Saflaştırma Kiti (Epicentre, Madison, WI, ABD) kullanılarak üreticinin kitle birlikte verdiği talimatlara göre izole edilmiştir. DNA konsantrasyonu Qubit Fluorometer (Invitrogen) ile belirlenmiş ve 5 ng/μL olacak şekilde seyreltilerek PZR reaksiyonunda kullanılmıştır. PZR reaksiyonu ile *PDC* geninin eldesi için kullanılacak primer çifti, ileri PDCFATG 5'-ATGGCTGAAATAACACTAGGAAGCTTA-3' ve geri PDCRSTP 5'-TTAAGCTGCGTTGGTCTGGC-3' olarak belirlenmiştir. Primerler, NCBI GenBank NC_012965 katılım numaralı *P. pastoris* GS115 *PDC* gen dizisi kullanılarak tasarlanmıştır.

PZR reaksiyonu toplam hacim 50 μL olacak şekilde ve 4 farklı sıcaklık değerinde gradient PZR olarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen PZR ürünlerinin 5'er μL'si kontrol için %1 agaroz jelde yürütülmüş ile 1683 bç uzunluğunda beklenen *PDC* geninin elde edildiği görülmüştür (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. PZR ile elde edilen *P. pastoris* *PDC* geninin jelde görüntülenmesi. GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas) kullanılmıştır. 56.3-64.2°C arası farklı sıcaklıklarda oluşan *PDC* geni (1683 bç)

PZR ile elde edilen *PDC* geninin saflaştırılması MinElute PCR Purification Kit (Qiagen) kullanılarak üretici firmanın vermiş olduğu talimatlar doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Elde edilen *PDC* geninin pJET1.2 plazmitine (CloneJet Cloning Kit, Fermentas) (Şekil 3.1) ligasyonu yapılmış ve sonuçta oluşan yeni plazmit pJET1.2-PDC (4657 bp) olarak adlandırılmıştır (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. *PDC* geninin pJET1.2 vektörüne aktarılmasıyla elde edilen pJET1.2-PDC

Daha sonra pJET-PDC plazmiti kompetent *E. coli* XL1-Blue hücrelerine transfer edilmiş ve 100 µg/mL amfisilin içeren LB Miller agar plakalarına ekilerek 37°C’de bir gece inkübasyona bırakılmış ve oluşan kolonilerin seleksiyonu yapılmıştır. Plakalarda gelişen kolonilerden 4 tanesi seçilerek 100 µg/mL amfisilin içeren 3 mL LB Miller sıvı besiyerine ekilerek 37°C’de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Çoğaltılan bu kolonilerden Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) ile pJET-PDC plazmiti izole edilmiştir.

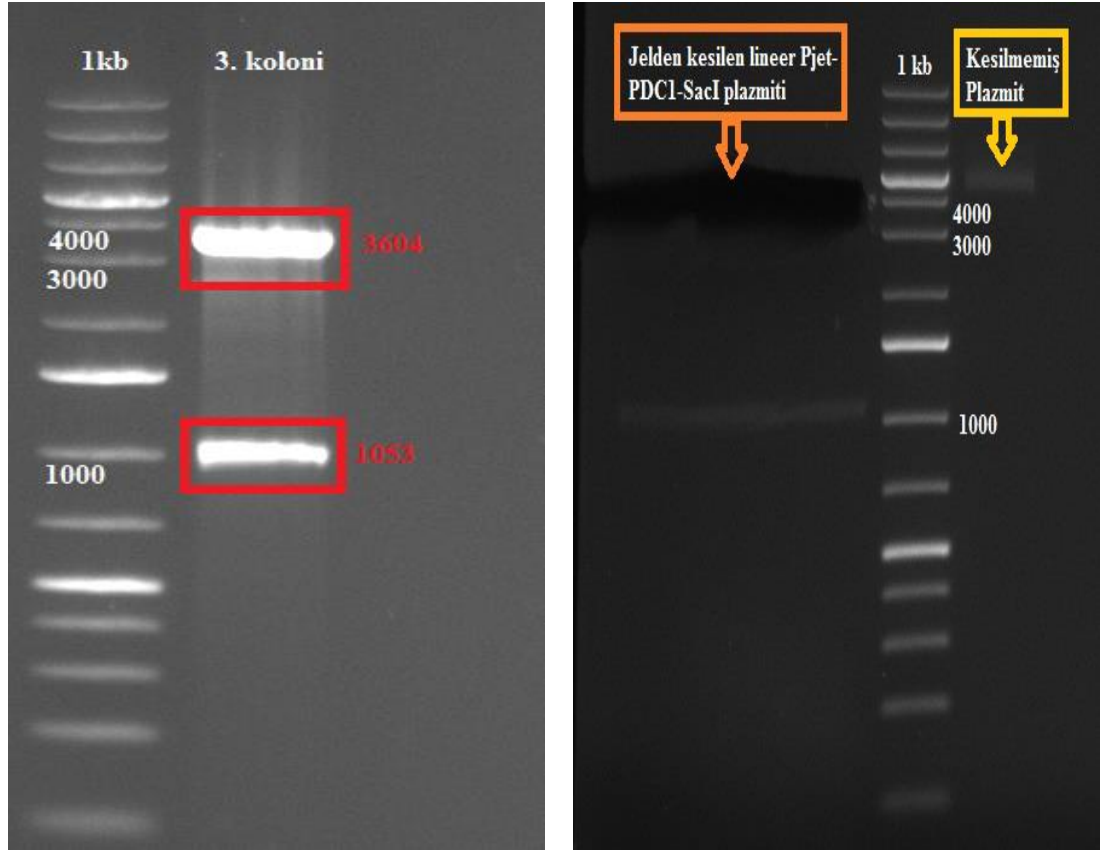
Elde edilen plazmitlerden doğru bağlantıya sahip olanını tespit etmek için kesme enzimi ile doğrulama analizi yapılmıştır. Bu amaç için seçilen *SacI* kesme enzimi ile plazmitler kesilerek %1 agaroz jelde ayrılmış ve enzimle kesim sonucu oluşması beklenen 3625 ve 1032 bp uzunluğundaki fragmentlerin varlığına bakılmıştır (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Plazmit izolasyonu sonrası elde edilen 4 farklı plazmidin *ScaI* restriksiyon enzimi ile kesimi. 1kb: GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas); 1-4: seçilen kolonilerden elde edilen plazmitlerin *ScaI* enzimi ile kesilmesi

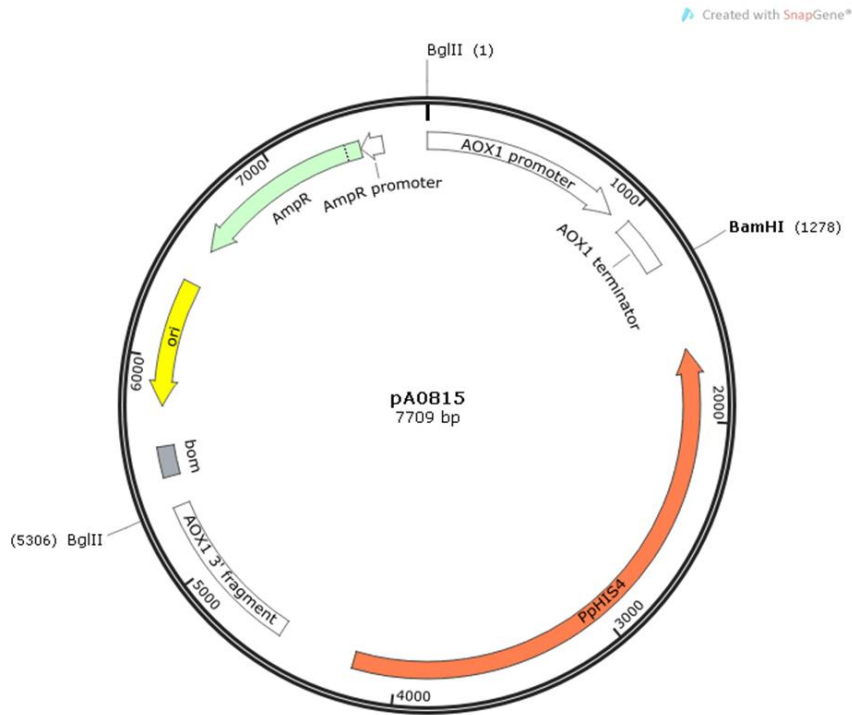
Restriksiyon enzimleri ile kesilen plazmitler jelde yürütülmüş ve teorik olarak 3625 ve 1032 bp uzunluğunda olması beklenen fragmentlerin 3. koloniden elde edilen plazmitlerde olduğu görülmüştür. Diğer 3 koloniden elde edilen plazmitlerde beklenen fragmentlerden farklı bantlar gözlenmiştir. Bunlardan 1. ve 2. koloniden elde edilen plazmitlerde *PDC* geninin ters olarak PJET1.2 plazmiti içerisine girmiş olma ihtimali bulunmaktadır.

3. koloni hücreleri içerisinde bulunan pJET-PDC plazmiti, *SacI* restriksiyon enzimi ile 1683bp uzunluğundaki *PDC* geninin içerisinde yer alan 1053 bp büyüklüğündeki bir bölgeden (398-1451 bp arası) kesilmiştir (Şekil 4.2 ve Şekil 4.4). *PDC* geninin inaktif hale getirilmesi için pA0815 plazmitinden elde edilen *HIS4* geni kullanılmıştır.



Şekil 4.4. Plazmit izolasyonu sonrası elde edilen pJET-PDC plazmitinin *SacI* enzimi ile restriksiyon analizi ve jelden kesimi. 1kb: GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas)

SacI restriksiyon enzimi ile kesilen pJET-PDC plazmiti içinde yer alan *PDC* geninin orta bölgesinden 1053 bp uzunluğunda DNA parçasının düşürülmesiyle lineer hale getirilmiştir (Şekil 4.4). Bununla birlikte *BglII* ve *BamHI* restriksiyon enzimleri ile kesilen pA0815 (Şekil 4.5) plazmitinden de *HIS4* geni elde edilmiştir (Şekil 4.6). Hedeflenen DNA parçaları, jelden kesilerek saflaştırmaya tabi tutulmuşlardır.

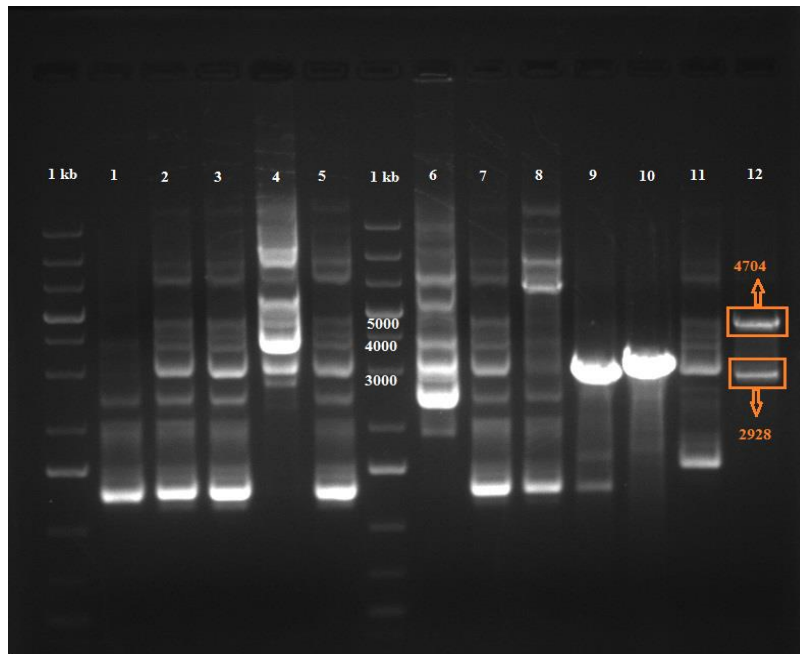


Şekil 4.5. İzolasyon sonrası elde edilen pA0815 plazmiti ile *Bgl*II ve *Bam*HI restriksiyon enzimlerinin bu plazmit üzerindeki kesim noktaları



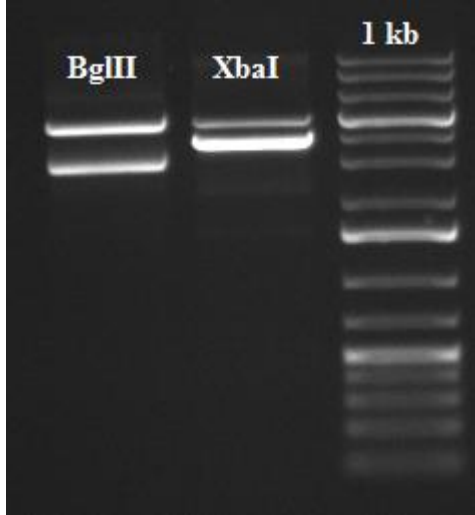
Şekil 4.6. *Bgl*II ve *Bam*HI restriksiyon enzimleri ile kesilen pA0815 plazmitinden *HIS4* geninin düşürülmesi. 1kb: GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas)

Lineer hale getirilen pJET-PDC-SacI plazmiti ve *HIS4* geni ligasyon öncesi, DNA blunting enzimi (Fermentas) ile küt uçlu hale getirilmiştir. Bu işlemin ardından pJET-PDC-SacI plazmitine defosforilasyon işlemi (Roche Kit) uygulanmıştır. Daha sonra Rapid DNA Dephos&Ligation Kit (Roche) kullanılarak firma protokolü doğrultusunda ligasyon gerçekleştirilmiştir. Ligasyon işleminin ardından reaksiyon karışımı kompetent *E. coli* XL1-Blue hücrelerine aktarılmıştır. Aktarma işleminin ardından *E. coli* hücreleri amfisilinli agar plakalara ekilmiştir. Gen aktarımı sonrası plakalarda oluşan kolonilerden *HIS4* genini içeren plazmiti bulmak amacıyla rastgele 12 koloni seçilmiş ve plazmit saflaştırılmıştır. Saflaştırma sonrası DNA'lar *Bgl*II restriksiyon enzimi ile kesilerek jelde kontrol edilmiştir (Şekil 4.7). *Bgl*II enzimi ile kesim sonucu beklenen 4704 ve 2928 bp DNA parçaları 12. koloniden elde edilen plazmitte gözlenmiştir.



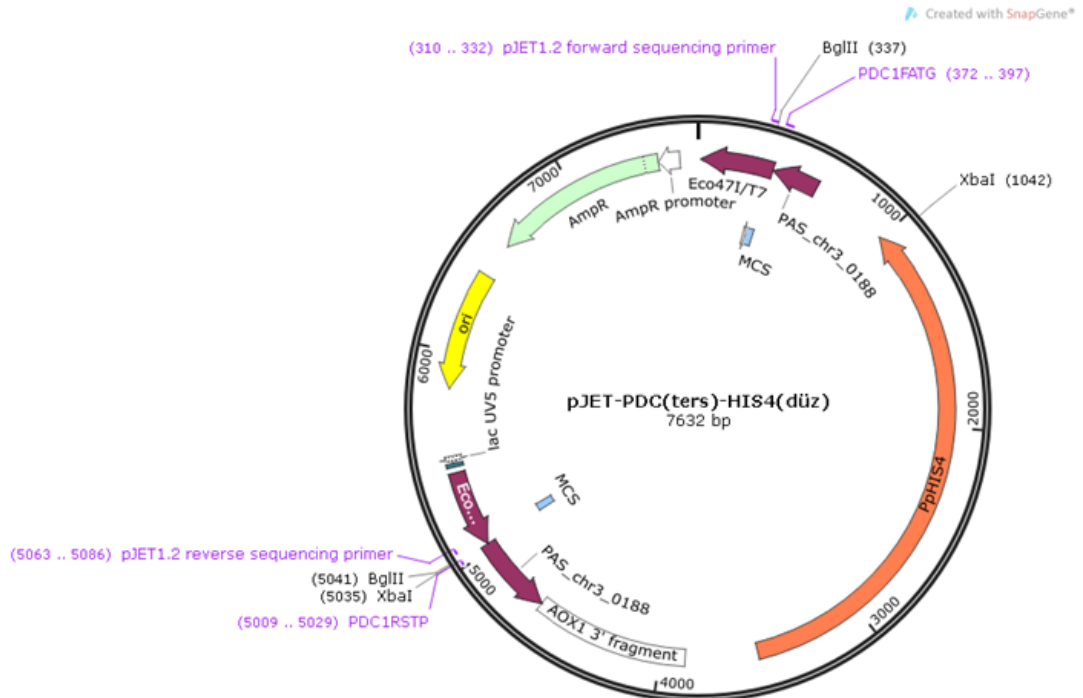
Şekil 4.7. *HIS4* genini içeren plazmiti bulmak için 12 adet koloniden elde edilen DNA'ların *Bgl*II restriksiyon enzimi ile kesilerek jelde kontrolü. 1kb: GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas)

İnaktivasyon işlemine pJET-PDC::*HIS4* olarak isimlendirilen 12. koloniye ait plazmit ile devam edilmiştir. Bu plazmitin doğruluğunun teyidi için *Bgl*II (2928 ve 4704 fragmentleri) ve *Xba*I (3639 ve 3993 fragmentleri) restriksiyon enzimleri ile kesilerek jelde kontrol edilmiştir (Şekil 4.8).



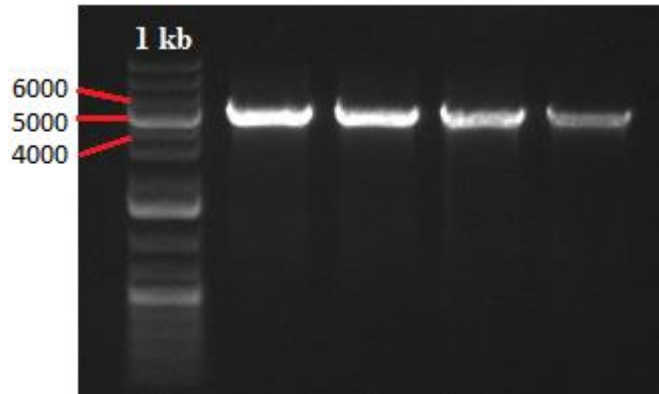
Şekil 4.8. 12. koloniye ait pJET-PDC::HIS4 plazminin doğruluğunun teyidi için *Bgl*III ve *Xba*I restriksiyon enzimleri ile kesilerek jelde kontrolü. 1kb: GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas)

pJET-PDC::HIS4 olarak isimlendirilen plazmit ile bu plazmitin doğruluğunun teyidi için kullanılan *Bgl*III ve *Xba*I restriksiyon enzimlerinin kesim noktaları Şekil 4.9'da gösterilmiştir.



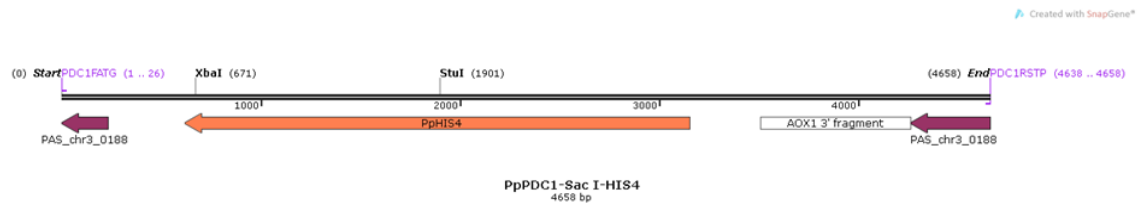
Şekil 4.9. pJET-PDC::HIS4 olarak isimlendirilen plazmit ile bu plazmitin doğruluğunun teyidi için kullanılan *Bgl*III ve *Xba*I restriksiyon enzimlerinin kesim noktaları.

P. pastoris PDC geninin inaktif hale getirilmesi için kullanılacak olan *PDC::HIS4* DNA fragmentinin elde edilmesi için yapılan PZR'da, kalıp olarak pJET-*PDC::HIS4* plazmitinden yararlanılmıştır. PDC geninin elde edilmesinde kullanılan PDCFATG ve PDCRSTP primerleri, söz konusu PZR için de kullanılmıştır. PZR sonucunda 4658 bp uzunluğundaki *PDC::HIS4* fragmenti elde edilmiştir. PZR ürünlerinin jel görüntüsü Şekil 4.10'de gösterilmiştir.



Şekil 4.10. PZR sonucunda 4658 bp uzunluğundaki *PDC::HIS4* fragmentinin jel görüntüsü.

PDC geninin inaktif edilmesi için kullanılacak olan *PDC::HIS4* fragmenti şematik olarak Şekil 4.11'de verilmiştir. Elde edilen *PDC::HIS4* fragmenti *P. pastoris* mayasına aktarılmak üzere kullanılmıştır.

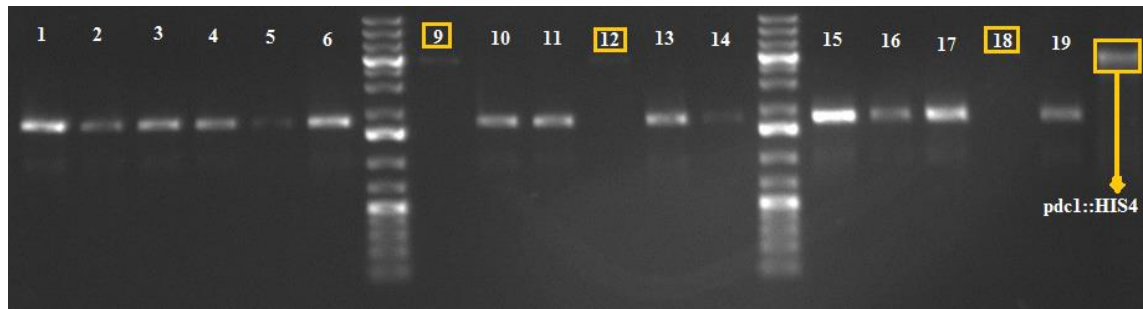


Şekil 4.11. PDC geninin inaktif edilmesi için kullanılan *PDC::HIS4* fragmenti şematik olarak gösterimi.

pJET-*PDC::HIS4* plazmitinden PZR ile elde edilen $\Delta pdc::his4$ fragmenti MinElute PCR Purification Kit (Qiagen) ile firma protokolünde belirtildiği gibi saflaştırılmıştır. Bunun ardından, fragmentin yaklaşık 3 μ g kadarının Lityum asetat metodu ile gen aktarımına uygun hale getirilen *P. pastoris* GS115 suşuna elektroporasyon yöntemi ile aktarımı sağlanmıştır. Bu işlem 1,5 kV/5ms şartlarında elektroporator (Eppendorf) cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

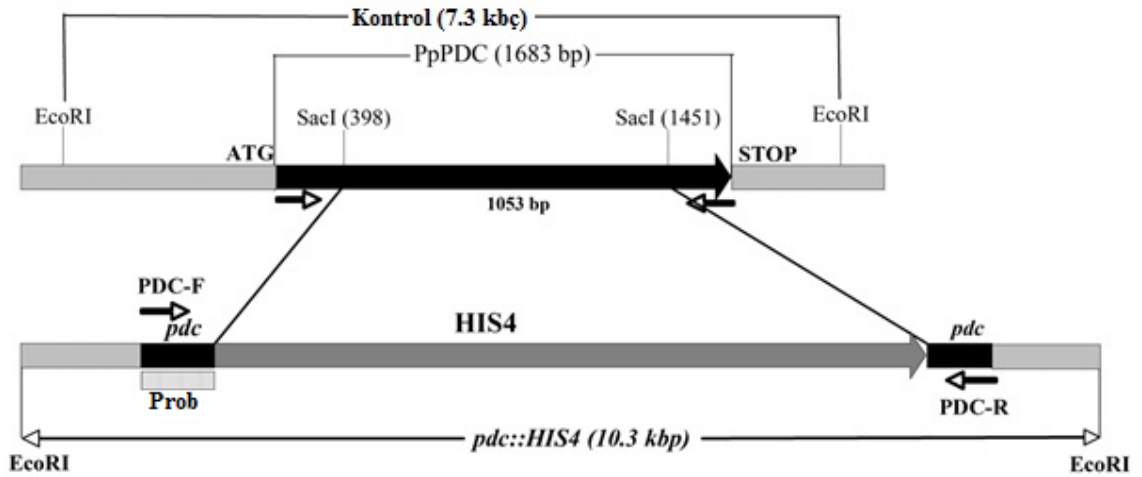
P. pastoris'te *PDC* geni inaktif hale getirilirken GS115 suşu seçilmiştir. Bunun sebebi GS115 suşunda seleksiyon markırı olarak kullanılan *HIS4* geninin inaktif olması ve hücrelerin gelişebilmesi için histidine gereksinim duymasıdır. *P. pastoris* GS115 suşunun genomuna $\Delta pdc::his4$ içinde aktardığımız *HIS4* geni sayesinde minimal besiyerinde histidine gerek duymadan gelişebilen koloniler elde edilmiştir.

Gen aktarımı işleminin ardında hücreler MD plakalara ekilmiş ve 2 gün 30°C'de gelişime bırakılmıştır. 2 gün sonrasında MD plakalarda gelişen kolonilerden YPD agar besiyerine ekimler gerçekleştirilmiştir. 30°C'de 2 gün YPD agar besiyerinde gelişen tek kolonilerden 20 tanesi alınıp, YPD sıvı besiyerine ekim yapılmıştır. Bu 20 koloni, sıvı besiyerinde, 30°C çalkalamalı inkübatörde, bir gece gelişime bırakılmış ve Masterpure Yeast DNA Kit (Epicentre) ile firma protokolü doğrultusunda DNA izolasyonları yapılmıştır. *PDC* geninin *HIS4* geni ile inaktif hale getirilip getirilmediğinin kontrolü için, saflaştırma sonunda konsantrasyonları belirlenen 17 koloninin genomik DNA'larından 5 ng/μL alınıp PZR'de kalıp olarak kullanılmıştır. PDCFATG ve PDCRSTP primerleri ile yapılan PZR ürünlerinin %1'lik agaroz jelde yürütülmesi ile, beklenen 4658 bp fragmentin 9., 12. ve 18. kolonilerden elde edilen genomik DNA'dan sağlandığı belirlenmiştir (Şekil 4.12).



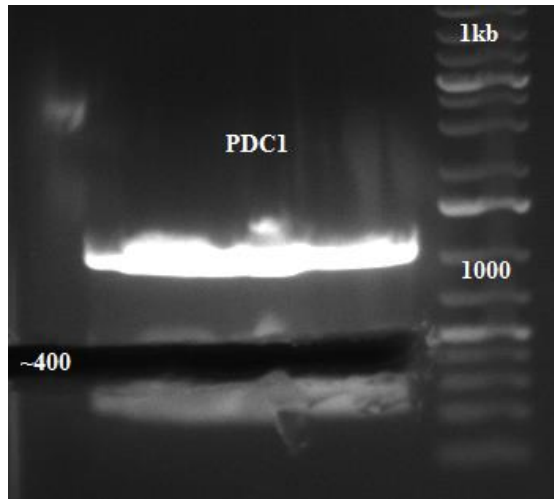
Şekil 4.12. 17 adet klonlardan elde edilen genomik DNA'nın PDCFATG ve PDCRSTP primerleri ile yapılan PZR ürünlerinin ve beklenen 4658 bp *PDC::HIS4* fragmentinin jel görüntüsü.

PZR sonucunda *PDC::HIS4* geninin genomik DNA içerisinde olduğu doğrulanmıştır. Daha sonra 9., 12. ve 18. klonların genomik DNA'sında Southern blot analizi yapılmıştır. Bunun için radyoaktif olmayan DIG HighPrime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche) üreticinin talimatları doğrultusunda kullanılmıştır. Southern blot analizinin şematik gösterimi Şekil 4.13'de verilmiştir.



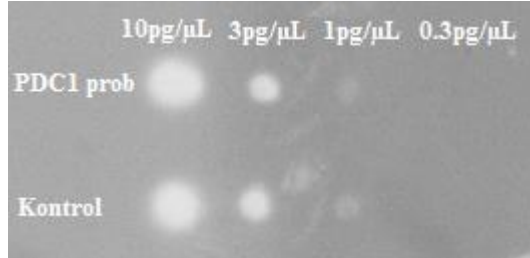
Şekil 4.13. Southern blot analizinin şematik gösterimi

Oluşturulan $\Delta pdc::his4$ fragmenti *Pichia pastoris* genomu içerisine yerleştiği zaman, 4028 bç uzunluğundaki *HIS4* geni *PDC* geni içinden düşürülen 1032 bç uzunluğundaki DNA'nın yerine geçecektir. Southern blot sonucunda *PDC::HIS4* geninin genomik DNA içerisinde istenen yerde olduğu doğrulanmıştır. Metotda ilk önce, Southern blot için kullanılan prob PZR ile çoğaltılan *PDC* geninin *SacI* restriksiyon enzimi ile kesilmesiyle elde edilmiştir. Bu işlem sonrası oluşan DNA parçası jelden alınarak (Şekil 4.14) saflaştırılmış ve DIG etiketlemeye hazır hale getirilmiştir. DNA probu *PDC* geninin ilk 398 bç uzunluğundaki bölgesinden tasarlanmış ve daha sonra DIG ile etiketlenmiştir.



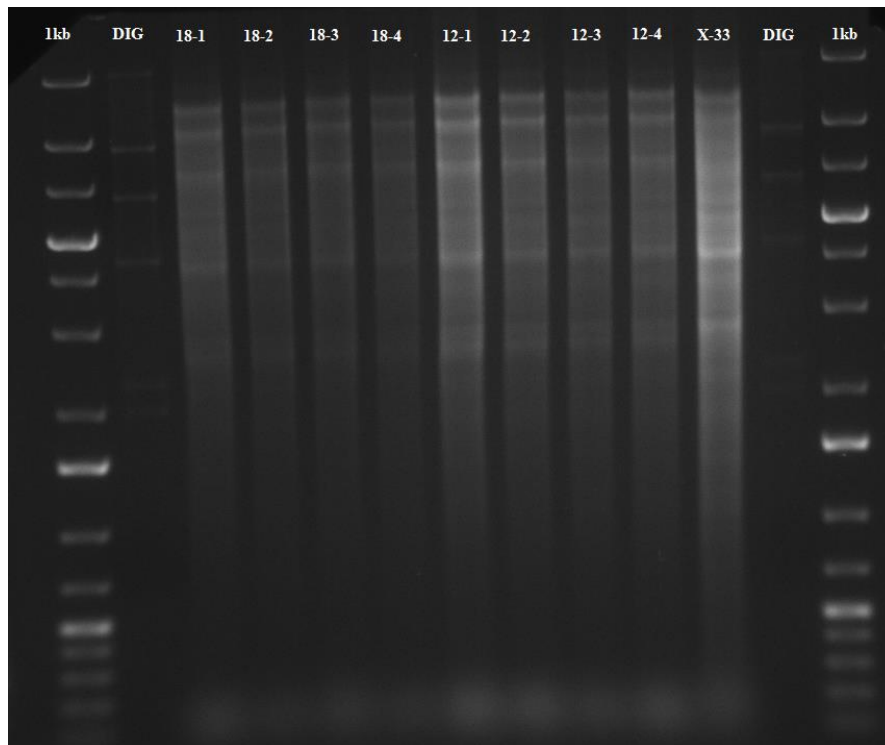
Şekil 4.14. Southern blot analizinde kullanılacak DNA probu için *SacI* enzimi ile *PDC* geninin kesilmesi ve 398 bç uzunluğundaki probu oluşturacak parçanın jelden alınması. 1kb:GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas)

Prob için yaklaşık 3 µg DNA etiketleme işlemine tabi tutulmuştur. Probu oluşturan reaksiyon karışımı DIG HighPrime DNA Labeling and Detection Starter Kit II talimatları doğrultusunda hazırlanmış ve 37°C’de yaklaşık 20 saat boyunca inkübasyona tabi tutulmuştur. Elde edilen probun etkinlik düzeyi Şekil 4.15’de verilmiştir.



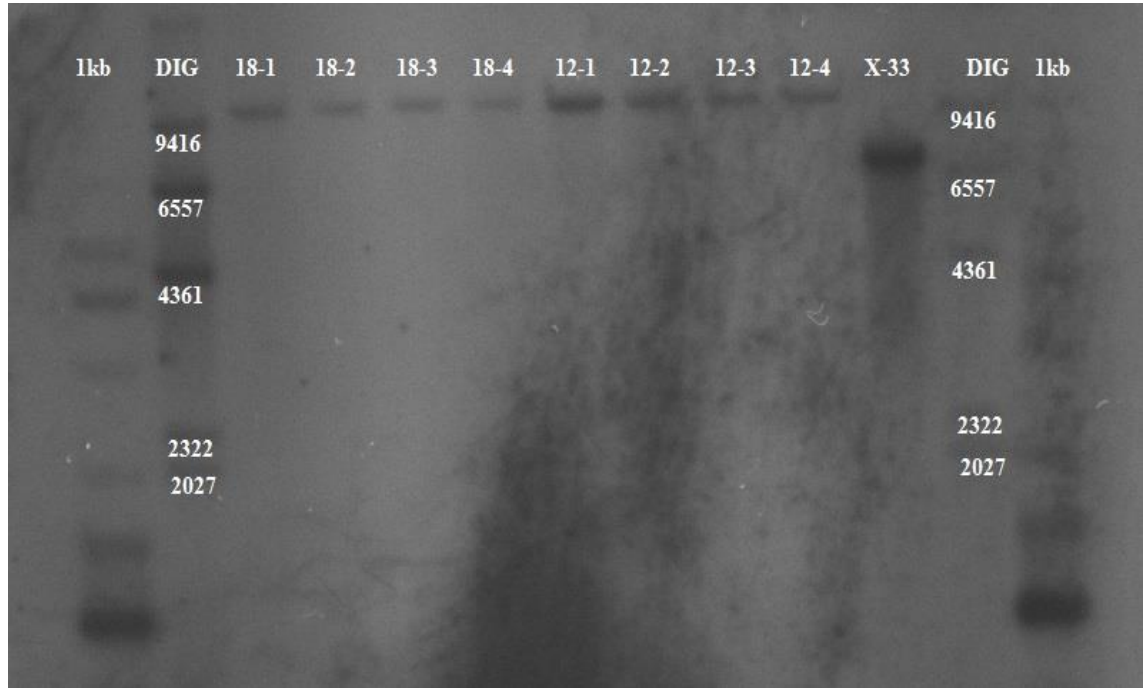
Şekil 4.15. *PDC* geni üzerinden elde edilen ve etiketlenen DIG etiketli probun etkinlik düzeyi

Southern blot analizinde probun kalitesi protokolde verilen ölçülere göre uygun bulunmuş ve akabinde ilk olarak *PDC* geni inaktif hale geldiğini düşündüğümüz GS115 suşları ve negatif kontrol olarak X-33 konukçu suşundan elde edilen genomik DNA’lar *EcoRI* restriksiyon enzimi ile kesilmiştir (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. Δpdc inaktif suşların Southern blot analizi ile doğrulanması için 12. ve 18. klonlara ait seçilen 8 adet tek kolonilerin genomik DNA’ların *EcoRI* enzimi ile kesimini gösteren jel görüntüsü. 1kb: GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas), DIG: DIG etiketli markır

X-ışını filmi üzerinde teorik olarak negatif kontrol X-33 suşlarında 7309 bç, ΔPDC geni inaktif suşlarda ise 10284 bç büyüklüğünde bantlar beklenmektedir. Protokole uygun olarak gerçekleştirilen Southern blot analizi ile inaktif suşlar belirlenmiştir (Şekil 4.17). Seçilen 2 klonunda da ΔPDC geninin inaktif olduğu görülmüştür. Devam eden çalışmalarda 12. klon kullanılmış ve 12. klonu FA115 ismi verilmiştir.



Şekil 4.17. 12. ve 18. klonlara ait seçilen 8 adet tek kolonilerde ΔPDC inaktif suşların belirlenmesi için yapılan Southern blot analizi sonucu X-ışını filminin görüntüsü. 1kb:GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas), DIG: DIG etiketli markır

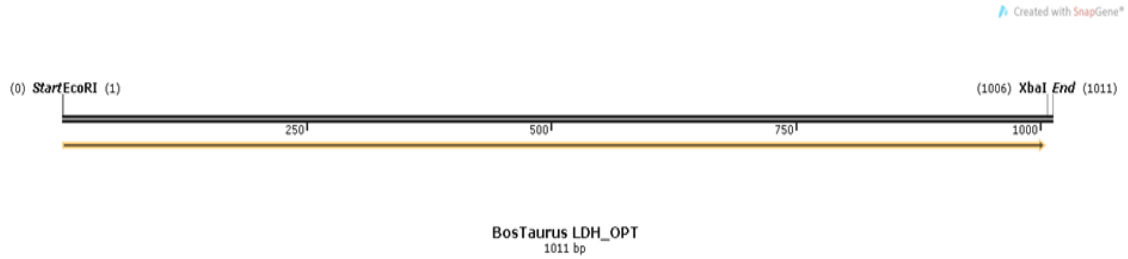
FA115 (*Apdc* inaktif) suşunun etanolde gelişmediği kontrol olarak X33 kullanılarak belirlenmiştir.

Pirüvat dekarboksilaz (PDC) hücre içi enziminin aktivite ölçümü spektrofotometrik olarak enzim aktivitesi ölçüm kitinin protokolü [Enzymatic assay of pyruvate decarboxylase (EC 4.1.1.1), Sigma] doğrultusunda yapılmıştır. Bunun için ilk önce hücre içi proteinler uygun tampon içine alınarak toplam protein konsantrasyonları ölçülmüştür. Ölçüm sonunda toplam protein, kontrol olarak seçilen X-33 suşunda 1,43 mg/mL FA115 suşunda ise 0,95 mg/mL olarak belirlenmiştir. PDC aktivitesi ise X-33 ve FA115 suşlarında sırasıyla 1196,1 U/g and 19,3 U/g olarak tespit edilmiştir. Bu sonuca göre %98 oranında bir aktivite azalması söz konusu olmuş ve kimyasal olarak PDC enziminin artık FA115 suşunda neredeyse olmadığı belirlenmiştir.

4.2. *Pichia pastoris* GAP Promotoru Kullanılarak L-Laktik Asit Üretimi

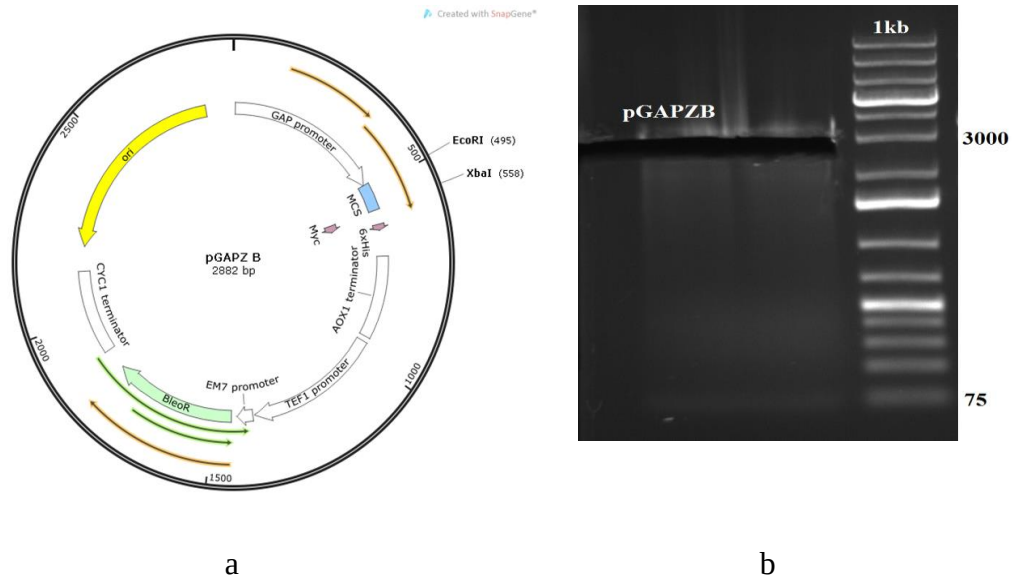
4.2.1. Ekspresyon vektörleri ve klonlama çalışmaları

L-laktik asit üretimi için, ilk olarak L-laktat dehidrogenaz geninin (*LDH*) *GAP* promotoru ile aktarılması sağlanmıştır. Rekombinant L-laktik asit üretimleri Ek 8.2’de sekansı verilen *Bos taurus LDH* (Şekil 4.18) geninin klonlanması ile gerçekleştirilmiştir.



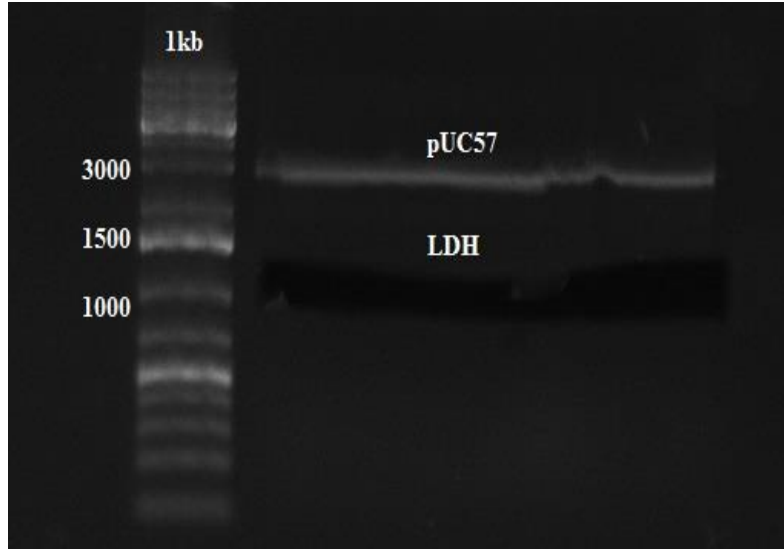
Şekil 4.18. L-laktik asit üretimleri için kullanılan *Bos taurus* L-laktat dehidrogenaz geni

GAP promotoru ile *LDH* geninin ekspresyon kasetini oluşturmak için, ilk olarak *GAP* promotorunu içeren ticari pGAPZB plazmiti, *EcoRI* ve *XbaI* restriksiyon enzimleri ile kesilip jelden alınmıştır (Şekil 4.19).



Şekil 4.19 a) pGAPZB plazmiti, b) *EcoRI* ve *XbaI* restriksiyon enzimleri ile kesilip jelden alınması. 1kb:GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas)

LDH geni bulunduğu pUC57-*LDH* plazmitinden, pGAPZB plazmitini kesmede kullandığımız *EcoRI* ve *XbaI* kesme enzimleri ile kesilerek jelden alınmıştır (Şekil 4.20).

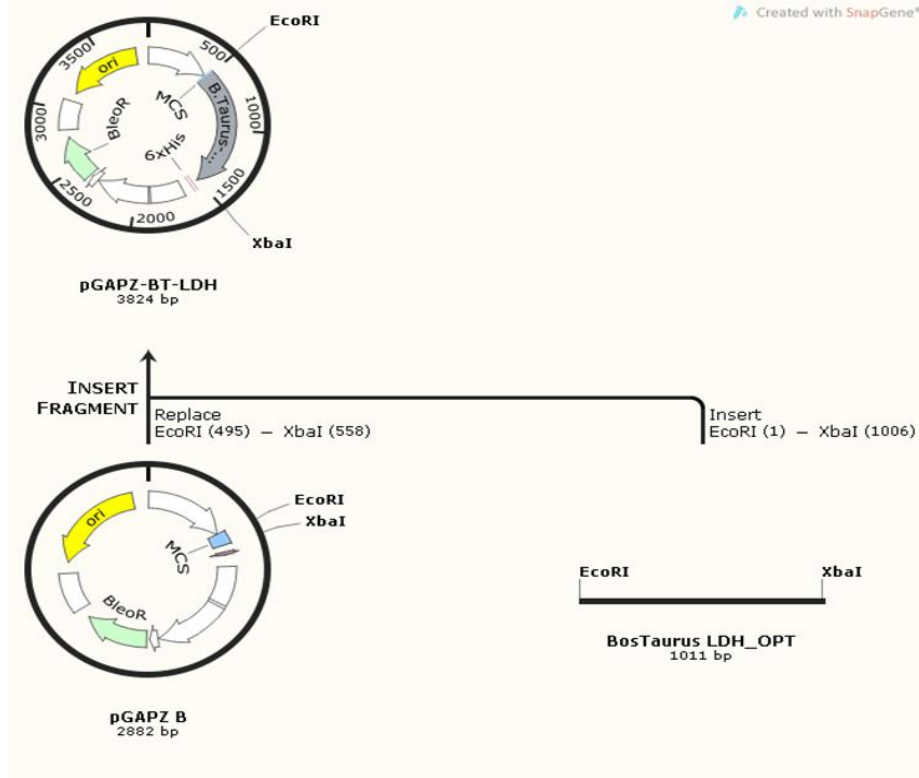


Şekil 4.20. pUC57-*LDH* plazmitinden *LDH* geninin *EcoRI* ve *XbaI* restriksiyon enzimleri ile kesilerek jelden alınması. 1kb:GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas)

Daha sonra *LDH* geninin lineer pGAPZB plazmitine ligasyonu yapılmıştır. *LDH* geninin lineer pGAPZB plazmitine ligasyonunun şematik gösterimi Şekil 4.21’de verilmiştir.

Ligasyon sonrası elde edilen karışımın *E. coli* XL1-Blue hücrelerine aktarımı yapılmıştır. Ardından içerisinde LB Lennox (25 µg/mL zeosin içeren) katı besiyerine hücrelerin ekimleri yapılmıştır. Ligasyon sonucu elde edilen pGAPZB-*LDH* plazmiti için gelişen hücrelerden 6 adet koloni seçilmiş ve *EcoRI* ve *XbaI* restriksiyon enzimleri ile kesilip kontrolü yapılmıştır (Şekil 4.22). Kesme enzimleriyle kesilen plazmitte 1005 bp ve 2819 bp uzunluğunda DNA parçalarının oluşumu belirlenmiştir.

Sonuç olarak seçilen 6 koloniden sadece 3. ve 6. kolonilerdeki plazmitlerin doğru olduğu tespit edilmiş ve ilerleyen çalışmalarda kullanılmak üzere 6. koloni hücreleri -80°C’de muhafaza edilmiştir. Söz konusu yeni plazmitimiz pGAPZB-*LDH* olarak isimlendirilmiştir.

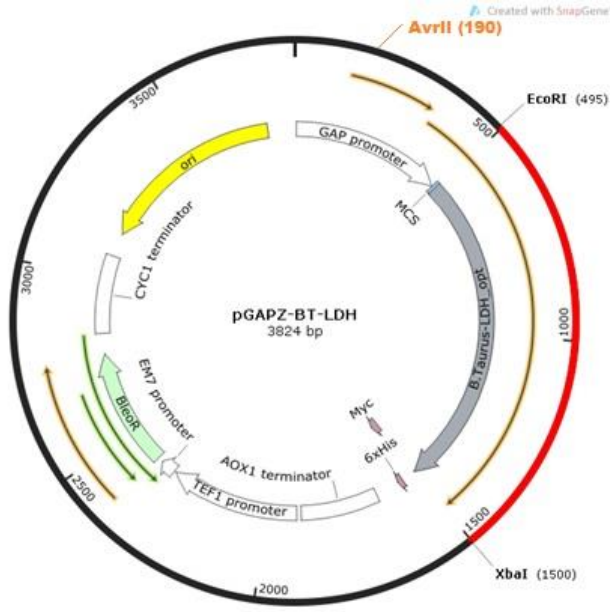


Şekil 4.21. LDH geninin lineer pGAPZB plazmitine ligasyonunun şematik gösterimi.

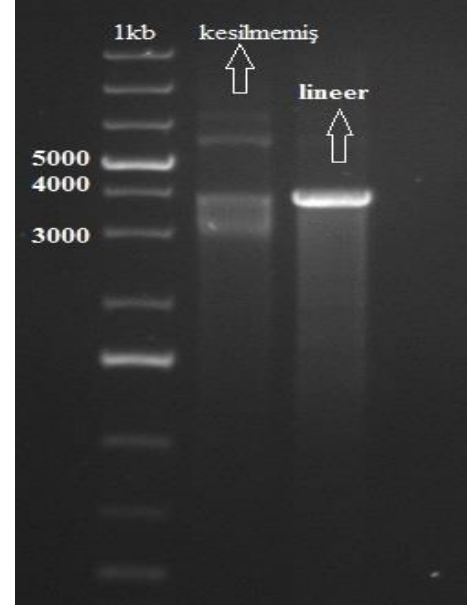


Şekil 4.22. pGAPZB-LDH plazmiti için seçilen 6 adet koloninin *EcoRI* ve *XbaI* restriksiyon enzimleri ile kontrolü. 1kb:GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas).

Elde edilen pGAPZB-LDH ekspresyon plazmiti tek bir noktadan ve GAP promotor bölgesinin içinden kesen AvrII enzimi ile kesilerek (Şekil 4.23 A ve 4.23 B) lineer hale getirilmiştir.



a

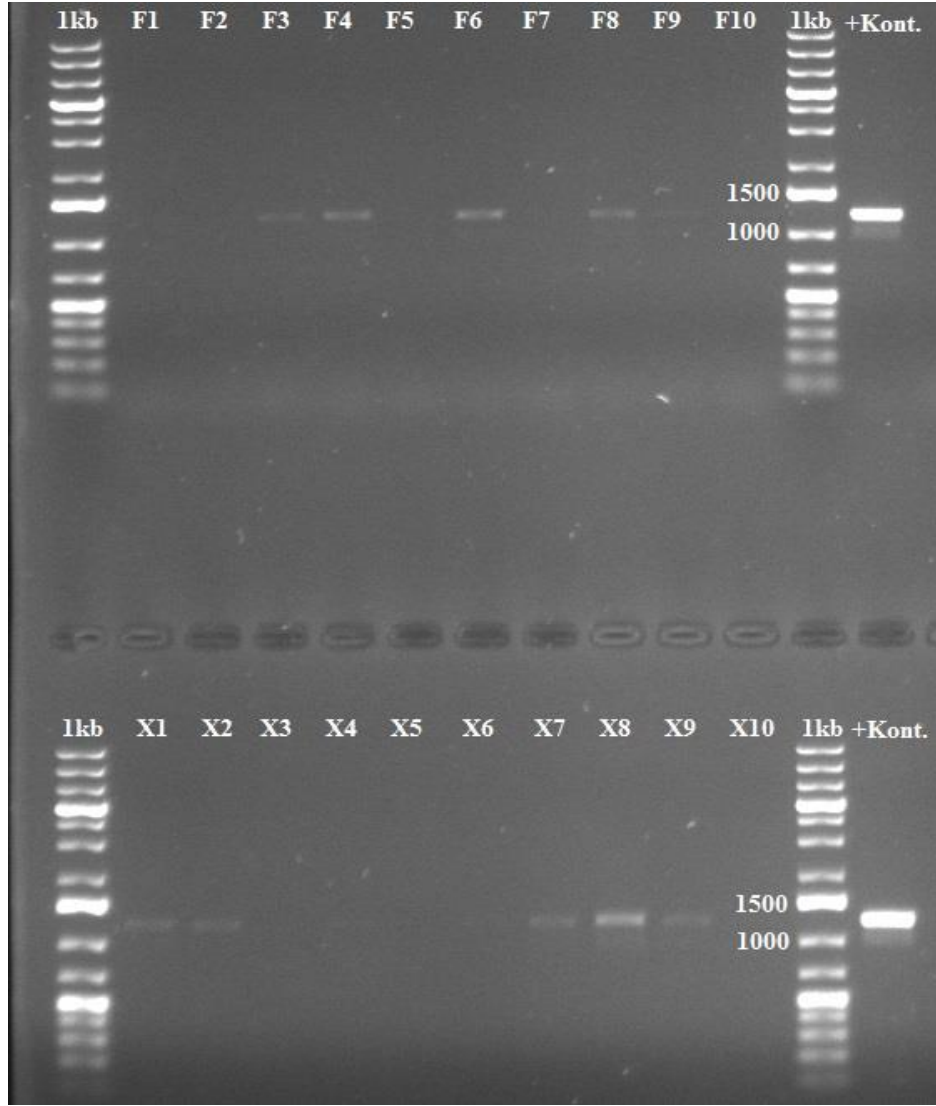


b

Şekil 4.23. a) pGAPZB-LDH'nin AvrII enzimi ile kesilerek lineer hale getirilmesi ve **b)** jel görüntüsü. 1kb:GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas).

Daha sonra kompetent *P. pastoris* X33 ve Δpdc geni inaktif FA115 suşlarına gen aktarımına başlanmıştır. Gen aktarımı işlemi için elektroporasyon (eppendorf eporator) tekniği kullanılmış, bu işlem cihazın 1500 Voltta 5 ms çalışacak şekilde ayarlanmasıyla gerçekleştirilmiştir. Elektroporasyon işlemi gerçekleştirilmiş hücreler 100 μ g/mL zeosin içeren YPD katı besiyerlerine ekilmiş, 30°C'de 2 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. 2 gün sonrasında gelişen kolonilerden onar tanesinin YPD sıvı besiyerine ekimleri yapılmış ve bu koloniler 30°C'de bir gece çalkalamalı inkübatörde çoğaltılmıştır.

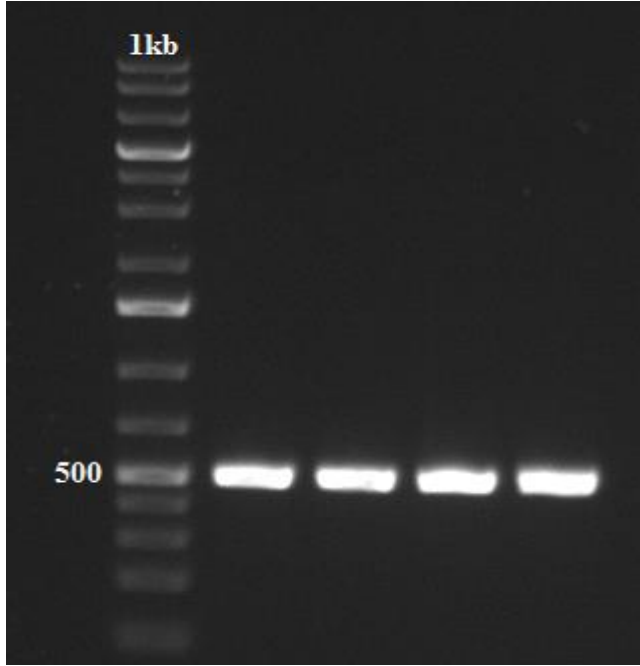
Elde edilen klonların genomik DNA izolasyonunun ardından, pGAPZB-LDH'nin X33 ve FA115 suşlarına aktarımı PZR ile 3'AOX ve PGAPF primerleri kullanılarak kontrol edilmiştir (Şekil 4.24).



Şekil 4.24. pGAPZB-LDH'nin X33 ve Δpdc geni inaktif FA115 suşlarına aktarımının PZR ile kontrolü. F1-10: FA115 suşları, X1-10: X33 suşları 1kb: GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas).

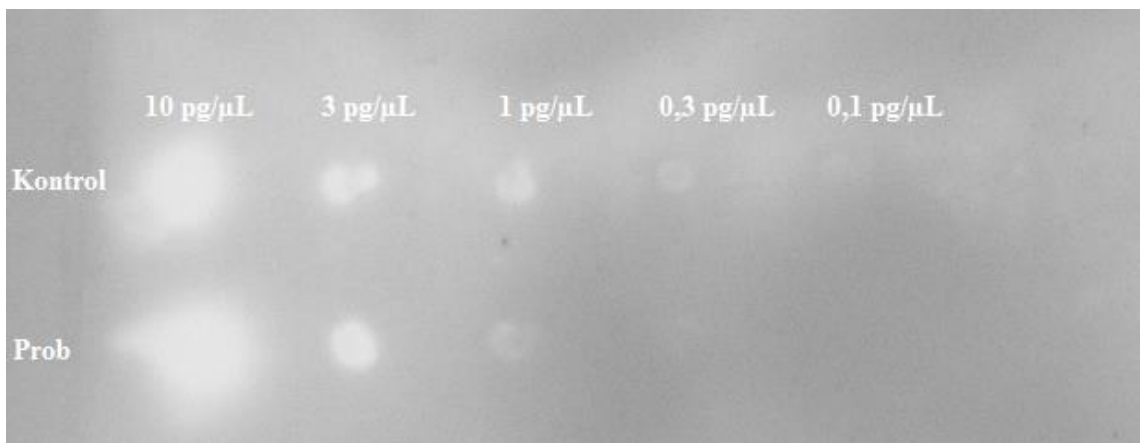
PZR sonuçlarına göre gen aktarımı görülen, FA115 suşlarından F3, F4, F6 ve F8 klonları ile X33 suşlarından X1, X7, X8 ve X9 klonlarına Southern blot analizi uygulanmıştır. Bu analiz sayesinde, genin genomda doğru yere bağlanıp bağlanmadığı tespit edilmiş ve gen kopya sayısının belirlenmesi sağlanmıştır. Bunun için radyoaktif olmayan DIG HighPrime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche) üreticinin talimatları doğrultusunda kullanılmıştır.

Öncelikle Southern blot analizi için kullanılacak DNA probu *GAP* promotor bölgesinin ilk 495 bp uzunluğundaki kısmından tasarlanmış ve *GAPBg/III-F* ve *GAP_{EcoRI}-R* primerleri yardımıyla PZR ile çoğaltılarak (Şekil 4.25) DIG ile etiketlemeye hazır hale getirilmiştir.



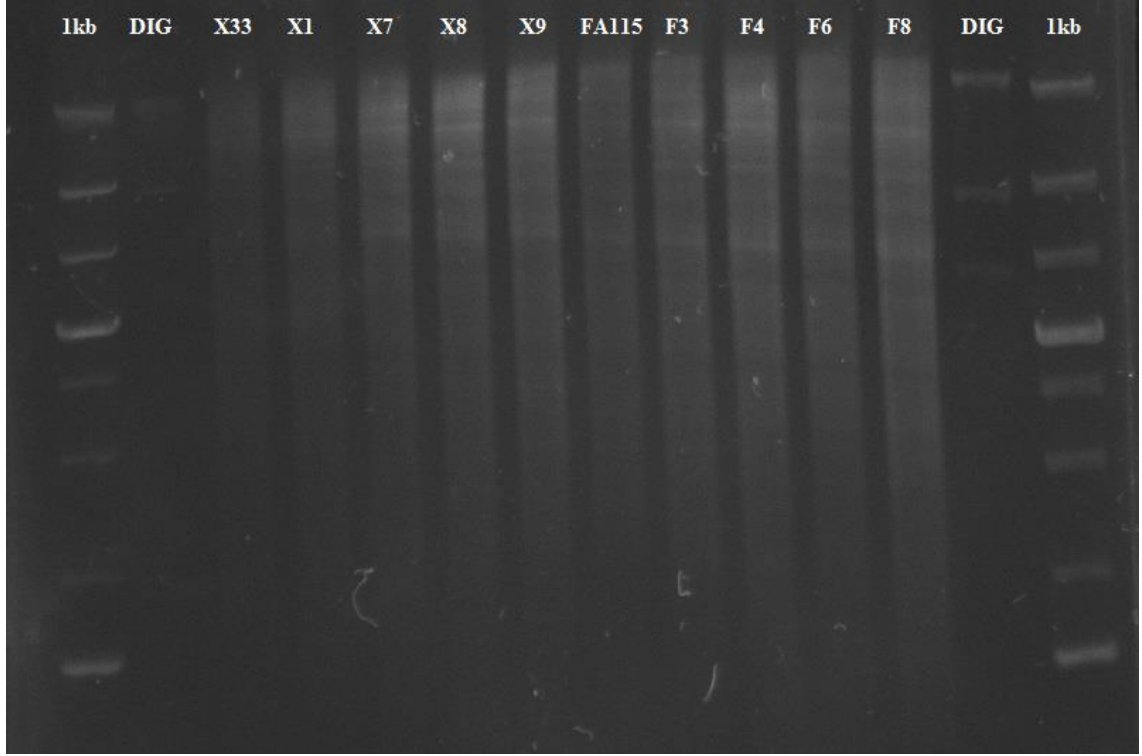
Şekil 4.25. Southern blot için kullanılacak DNA probunun *GAPBglII-F* ve *GAPEcoRI-R* primerleri yardımıyla PZR ile çoğaltılması. 1kb: GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas).

Prob için yaklaşık 3 µg DNA etiketleme işlemine tabi tutulmuştur. DIG etiketli probu oluşturacak reaksiyon karışımı DIG kitin talimatları doğrultusunda hazırlanmış ve 37°C’de yaklaşık 20 saat boyunca inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyon sonucu elde edilen probun etkinlik düzeyi Şekil 4.26’da verilmiştir.



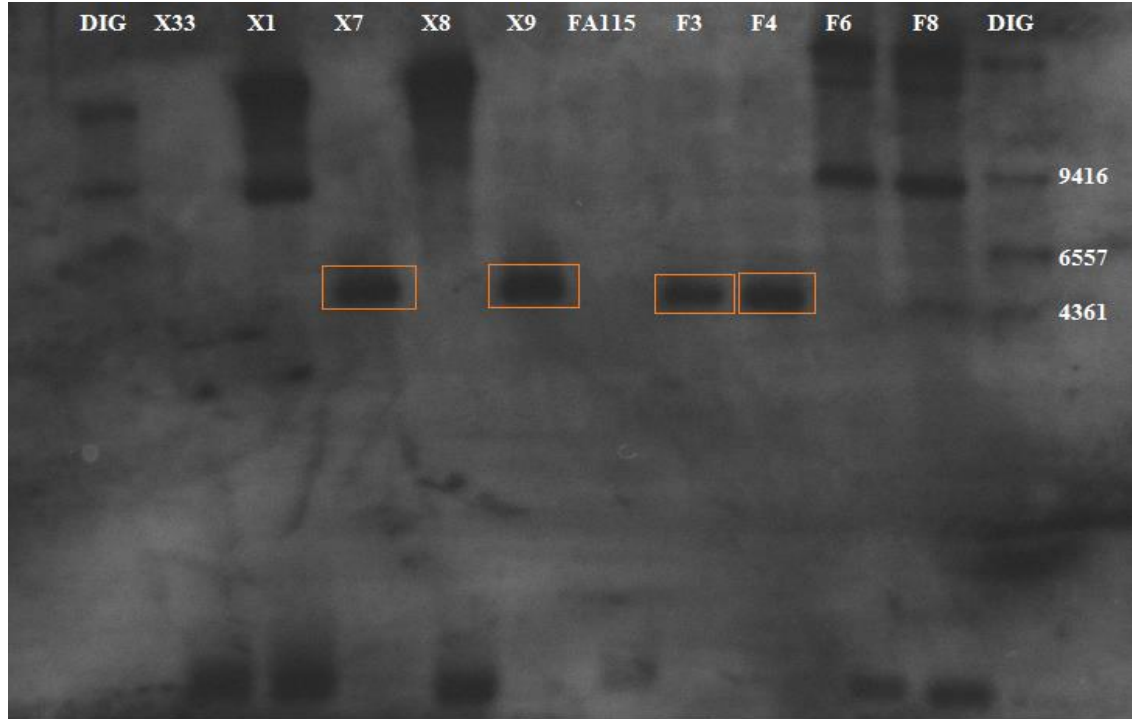
Şekil 4.26. *GAP* promotoru üzerinden elde edilen ve etiketlenen DIG probun etkinlik düzeyi

Southern blot analizinde kullanılacak probun uygunluğu görülmüş ve bunun ardından ilk olarak FA115 ve X-33 suşlarından elde edilen genomik DNA'lar, DNAMAN 7.0 programı kullanılarak yapılan restriksiyon analizi sonucu belirlenen *Bst*XI restriksiyon enzimi ile kesilmiştir (Şekil 4.27).



Şekil 4.27. FA115 ve X-33 suşlarından elde edilen genomik DNA'ların *Bst*XI restriksiyon enzimi ile kesimini gösteren jel görüntüsü. 1kb:GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas), DIG: DIG etiketli markır

X-ışını filmi üzerinde teorik olarak, tek kopya için pGAPZB-LDH'den 3830 bp, *Bst*XI fragmentinden ise 1208 bp gelen olmak üzere toplam 5038 bp büyüklüğünde bantlar beklenmektedir. Protokole uygun olarak gerçekleştirilen Southern blot analizi ile pGAPZB-LDH aktarılan suşlar belirlenmiştir (Şekil 4.28).



Şekil 4.28. pGAPZB-LDH aktarılan suşların Southern blot analizi sonucu X-ışını filminin görüntüsü. İşaretli bantlar tek kopya bağlanmaları göstermektedir. 1kb: GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas), DIG: DIG etiketli markır

X33 ve FA115 suşlarına *GAP* promotoru kullanılarak aktarılan *LDH* geni X7, X9, F3 ve F4 klonlarında tek kopya bantına sahip olduğu belirlenmiştir. Diğer klonlarda ise genin bilinmeyen sayıda ve genomda farklı yerlere bağlandığı gözlenmiştir.

Pichia pastoris mayasında L-laktik asit üretimi için, *GAP* promotoru kullanılarak aktarılan *LDH* genini tek kopya ekspresyon plazmiti olarak içeren klonlar, ilk olarak erlenmayer koşullarında test edilmiştir. Bunun ardından kesikli ve kesikli beslemeli fermentasyon koşullarında denemeler gerçekleştirilmiştir.

4.2.2. Erlenmayer koşullarında üretim çalışmaları

GAP promotoru kullanılarak aktarılan *LDH* genini taşıyan FA115 suşu 5 ml YPD besiyeri içeren test tüplerine ekilmiş ve 28°C'de 24 saat 250 d/d'de inkübasyona tabi tutulmuştur. Bu hücreler, başlangıç yoğunluğu $OD_{600nm}=0,1$ olacak şekilde, 50 ml %2, %4, %6 ve %8 glukoz içeren BMDY (%2 pepton, %1 maya ekstrakt ve 100 mM pH 6 fosfat tamponu) sıvı besiyerinde 250 ml'lik erlenmayerler için inokulum olarak kullanılmıştır. İnkübasyon 28°C'de 150 ve 200 d/d'de 2 paralelli olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Gelişen hücrelerden 12., 24. ve 36. saatlerde örnekler alınarak, 5 dakika 4000×g kuvvetinde santrifüjleme ile çöktürülüp üstte kalan sıvı analiz edilmek üzere saklanmıştır.

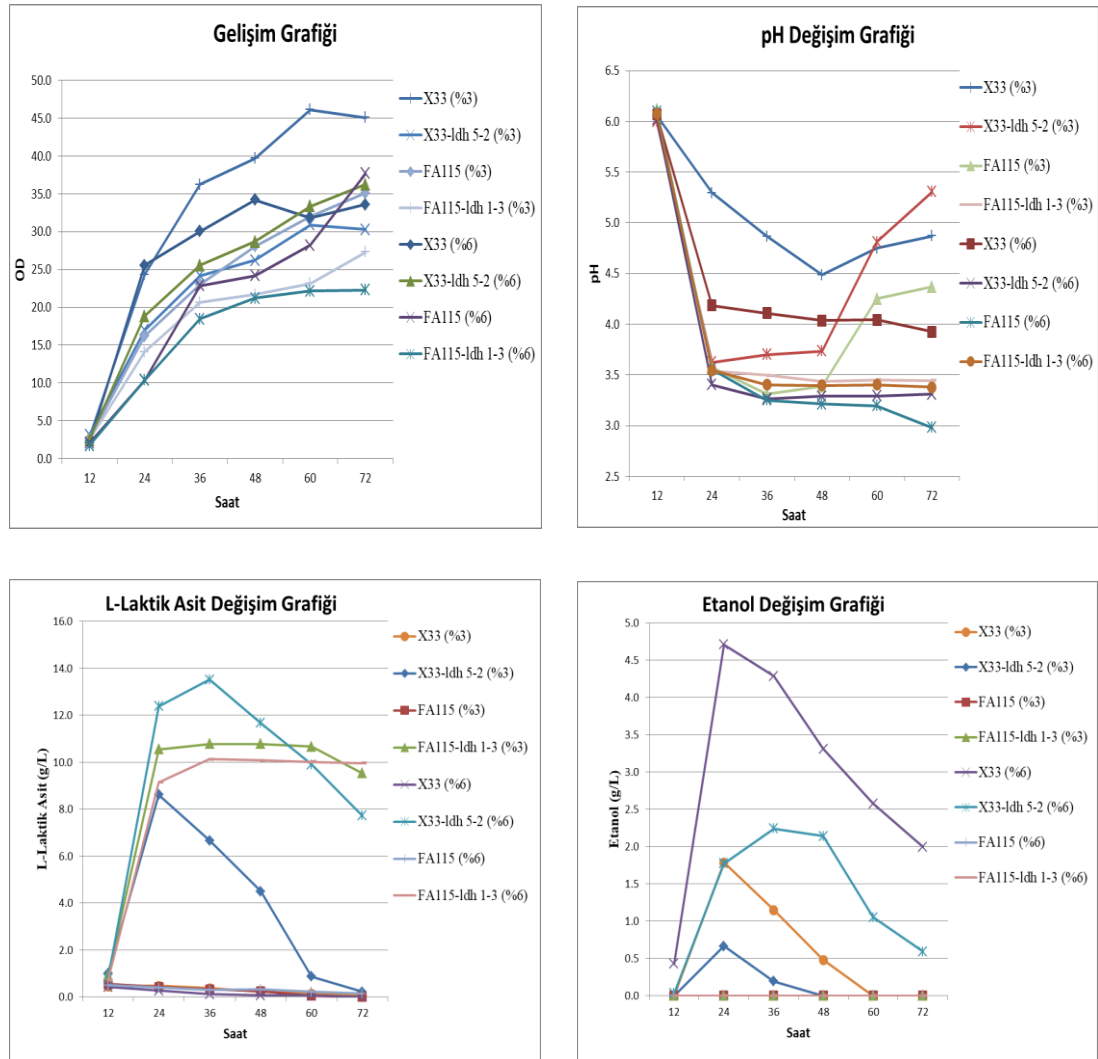
Erlenmayer koşullarında yapılan üretim çalışmalarıda, suşların L-Laktik asidi ne kadar ürettikleri, YSI 2700 Select Biochemistry Analyzer cihazı ile belirlenmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. %2, %4, %6 ve %8 glukoz içeren BMDY besiyerinde 150 ve 200 d/d'de 12., 24. ve 36. saatlerde L-Laktik asit (g/L), OD ve L-Laktik asit / OD ortalama değerleri

d/d	% Glukoz	Suş	Süre	L-Laktik Asit (g/L)	OD	L-Laktik Asit / OD
150	%2 Glukoz	FA115-LDH	12.Saat	0,68±0,05	2,40	0,28
150	%4 Glukoz	FA115-LDH	12.Saat	0,70±0,04	2,15	0,33
150	%6 Glukoz	FA115-LDH	12.Saat	0,73±0,01	1,92	0,38
150	%8 Glukoz	FA115-LDH	12.Saat	0,73±0,02	1,82	0,40
150	%4 Glukoz	FA115	12.Saat	0,58±0,04	2,42	0,24
200	%2 Glukoz	FA115-LDH	12.Saat	0,80±0,06	2,56	0,31
200	%4 Glukoz	FA115-LDH	12.Saat	0,75±0,03	2,50	0,30
200	%6 Glukoz	FA115-LDH	12.Saat	0,75±0,01	2,30	0,33
200	%8 Glukoz	FA115-LDH	12.Saat	0,75±0,07	1,80	0,42
200	%4 Glukoz	FA115	12.Saat	0,58±0,06	2,44	0,24
150	%2 Glukoz	FA115-LDH	24.Saat	7,70±0,35	8,40	0,92
150	%4 Glukoz	FA115-LDH	24.Saat	6,90±0,14	9,40	0,73
150	%6 Glukoz	FA115-LDH	24.Saat	5,23±0,15	7,70	0,68
150	%8 Glukoz	FA115-LDH	24.Saat	6,48±0,32	8,50	0,76
150	%4 Glukoz	FA115	24.Saat	0,55±0,03	7,70	0,07
200	%2 Glukoz	FA115-LDH	24.Saat	4,43±0,05	16,60	0,27
200	%4 Glukoz	FA115-LDH	24.Saat	10,50±0,42	16,30	0,64
200	%6 Glukoz	FA115-LDH	24.Saat	8,83±0,18	14,40	0,61
200	%8 Glukoz	FA115-LDH	24.Saat	7,55±0,28	10,60	0,71
200	%4 Glukoz	FA115	24.Saat	0,48±0,02	14,80	0,03
150	%2 Glukoz	FA115-LDH	36.Saat	6,65±0,14	18,60	0,36
150	%4 Glukoz	FA115-LDH	36.Saat	10,83±0,11	15,10	0,72
150	%6 Glukoz	FA115-LDH	36.Saat	12,33±0,15	11,30	1,09
150	%8 Glukoz	FA115-LDH	36.Saat	12,25±0,31	12,20	1,00
150	%4 Glukoz	FA115	36.Saat	0,53±0,01	12,20	0,04
200	%2 Glukoz	FA115-LDH	36.Saat	0,95±0,07	25,80	0,04
200	%4 Glukoz	FA115-LDH	36.Saat	9,83±0,15	23,00	0,43
200	%6 Glukoz	FA115-LDH	36.Saat	9,20±0,42	20,70	0,44
200	%8 Glukoz	FA115-LDH	36.Saat	9,50±0,35	22,60	0,42
200	%4 Glukoz	FA115	36.Saat	0,38±0,01	26,50	0,01

Yapılan denemeden elde edilen sonuçlara göre çalkalamalı inkübasyonda 150 d/d'de yapılan L-laktik asit üretimi (12,33 g/L) 200 d/d'de yapılanı göre (10,50 g/L) daha yüksek değerlere ulaşmıştır. Bu sonuca göre daha sonra yapılan erlenmayerle çalkalamalı inkübasyon çalışmalarında 150 d/d'lik hız kullanılmıştır.

X33 ve FA115 suşlarına *GAP* promotörü kullanılarak aktarılan LDH genini tek kopya ekspresyon plazmiti olarak içeren klonlar ile LDH geni aktarılmamış suşlar; erlenmayerde, %5 glukoz koşullarında, iki tekerrürlü olarak L-laktik asit üretiminde kullanılmışlardır. Söz konusu denemeye ilişkin sonuçlar Şekil 4.29'da bulunan grafikler içerisinde verilmiştir.



Şekil 4.29. Erlenmayer koşullarında LDH genini tek kopya olarak içeren X33 ve FA115 suşlarına ait gelişim, pH değişimi, L-laktik asit ve etanol değişim grafikleri

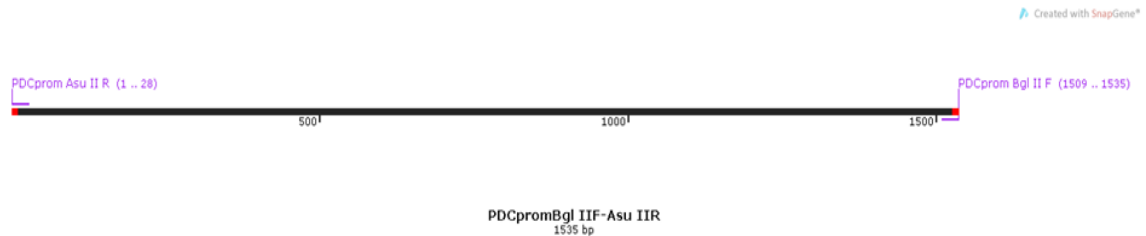
LDH geninin tek kopya olarak *GAP* promotoru ile rekombinant L-laktik asit üretiminin erlenmayer şartlarında karşılaştırılması işleminde klonlar, -80°C'deki kültürden YPD sıvı besiyerine ekilmiş, 30°C çalkalamalı inkübatörde bir gece inkübe edilmiş ve ertesi gün hücre yoğunluğunu artırmak amacıyla BMDY besiyerine 0,1 OD olacak şekilde aktarılmıştır. Daha sonra, 72 saat boyunca, 30°C'de 150 d/d hızda çalkalamalı inkübatörde gelişime bırakılmıştır. Her 12 saatte bir örnekler alınarak OD, pH, etanol ve L-laktik asit değerleri analiz edilmiştir. Denemeler 3 paralelli olarak gerçekleştirilmiştir.

GAP promotoru kullanılarak aktarılan *LDH* genini tek kopya olarak taşıyan X33 ve FA115 suşları erlenmayer koşullarında birbirine yakın miktarlarda L-laktik asit (13,5 ve 10,8 g/L) üretimi gerçekleştirmişlerdir. Ancak X33 *GAP-LDH* suşu aynı zamanda etanol üretimi de gerçekleştirdiği için glukozu daha hızlı tüketmiş ve L-laktik asidi karbon kaynağı olarak kullanmaya başlamıştır.

4.3. *Pichia pastoris* PDC Promotoru Kullanılarak L-Laktik Asit Üretimi

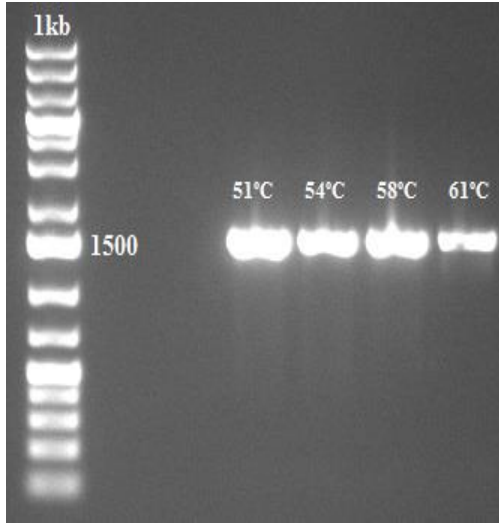
4.3.1. Ekspresyon vektörleri ve klonlama çalışmaları

FA115 suşunun eldesiyle etanol metabolizmasının kapatılmasının ardından L-laktik asit üretimi için ikinci olarak *PDC* promotoru kullanılması amaçlanmıştır. Bunun için ilk olarak X33 genomik DNA'sı üzerinden *PDCpromBglII-F* ve *PDCpromAsuII-R* primerleri kullanılarak PZR ile *PDC* promotoru elde edilmiştir (Şekil 4.30).



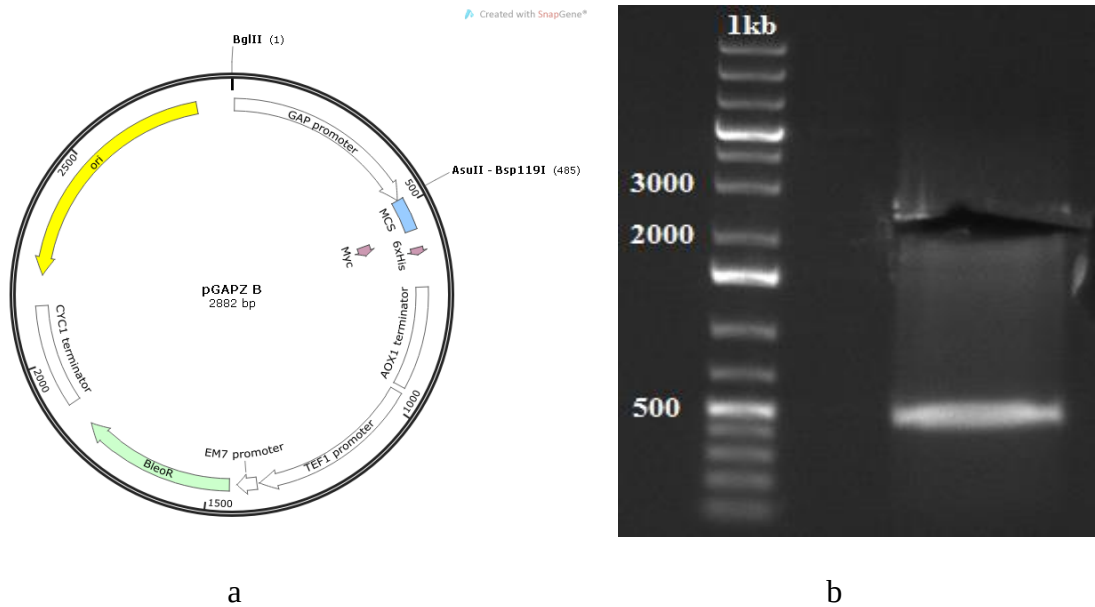
Şekil 4.30. *PDCpromBglII-F* ve *PDCpromAsuII-R* primerleri kullanılarak PZR ile elde edilen *PDC* promotoru

PZR ile çoğaltılan *PDC* promotoru agaroz jelde görüntülenmiştir (Şekil 4.31). Daha sonra *PDC* promotoruna ait fragment izole edilmiştir.



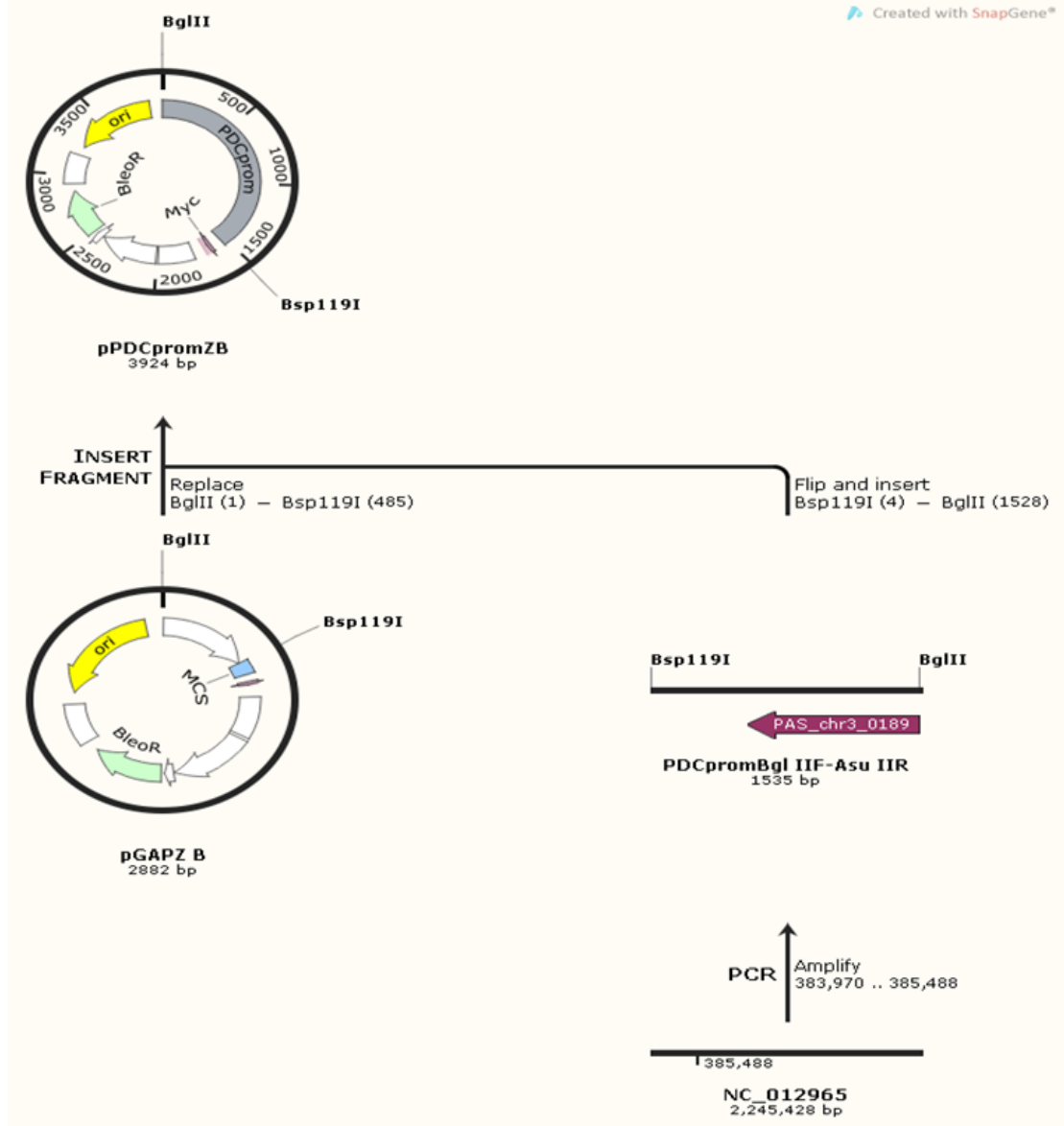
Şekil 4.31. PDCprom*Bgl*II-F ve PDCprom*Asu*II-R primerleri ile yapılan PZR'nin jel görüntüsü. 1kb:GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas)

Bunu takiben lineer hale getirmek ve ligasyona uygun olması için pGAPZB (2882 bç) plazmiti *GAP* promotorunun bulunduğu bölgeden *Bgl*II ve *Asu*II (*Bsp*119I) restriksiyon enzimleriyle kesilmiştir (Şekil 4.32a). Jel üzerinden 2392 bç uzunluğundaki DNA parçası alınıp ligasyon için izole edilmiştir (Şekil 4.32b).



Şekil 4.32 a) pGAPZB plazmitinin *Bgl*II ve *Asu*II (*Bsp*119I) restriksiyon enzimleri ile kesilip **b)** jelden alınması. 1kb:GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas)

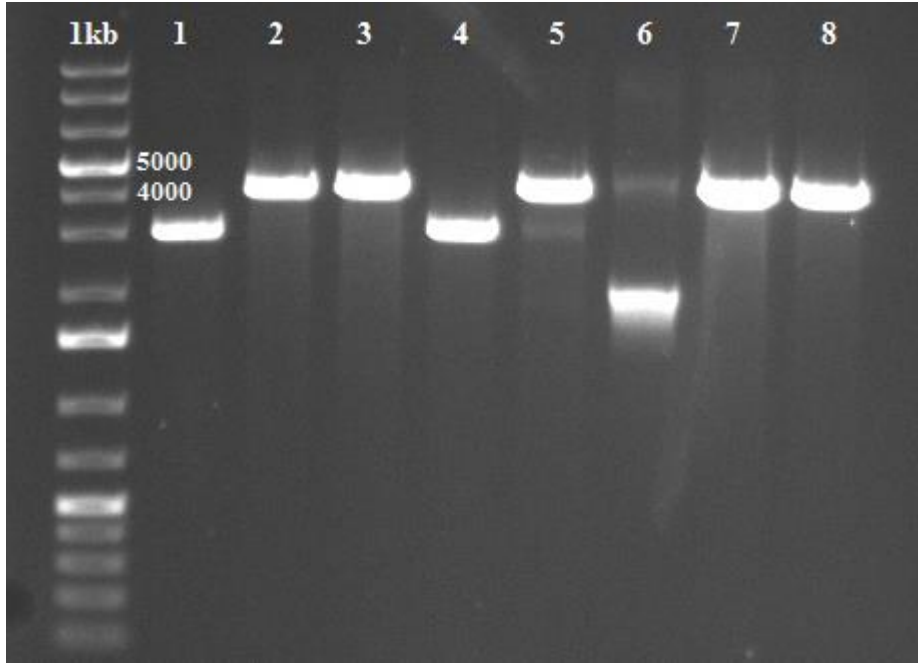
PDC promotorunun lineer pGAPZB plazmitine ligasyonunun şematik gösterimi Şekil 4.33’de verilmiştir. Yeni plazmit pPDCpromZB olarak isimlendirilmiştir.



Şekil 4.33. PDC promotorunun lineer pGAPZB plazmitine ligasyonunun (pPDCpromZB) şematik gösterimi

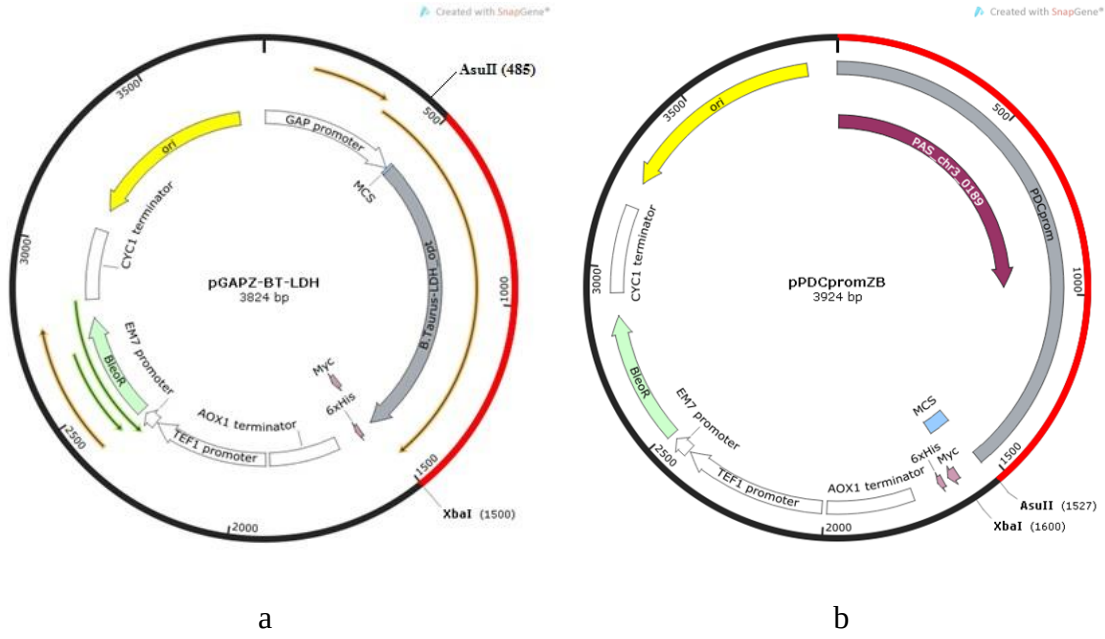
Ligasyon sonrası elde edilen karışım *E. coli* XL1-Blue hücrelerine aktarılmıştır. Ardından içerisinde LB Lennox (25 µg/mL zeosin içeren) katı besiyerine sahip plakalara üreyebilmeleri için hücrelerin ekimleri yapılmıştır.

Ligasyon sonucu elde edilen pPDCpromZB plazmiti için gelişen hücrelerden 8 adet koloni seçilmiştir. Daha sonra *AsuII* (*Bsp119I*) restriksiyon enzimi ile kesilmiş ve jelde yürütülüp kontrolü yapılmıştır (Şekil 4.34). Jel üzerinde yaklaşık olarak 3900 bp uzunluğunda DNA parçalarının oluşumu beklenmiştir. Sonuç olarak seçilen 8 koloniden sadece 2., 3., 7. ve 8. kolonilerdeki plazmitlerin doğru olduğu tespit edilmiş ve ilerleyen çalışmalarda kullanılmak üzere 7. koloni hücreleri -80°C sıcaklıkta muhafaza altına alınmıştır.



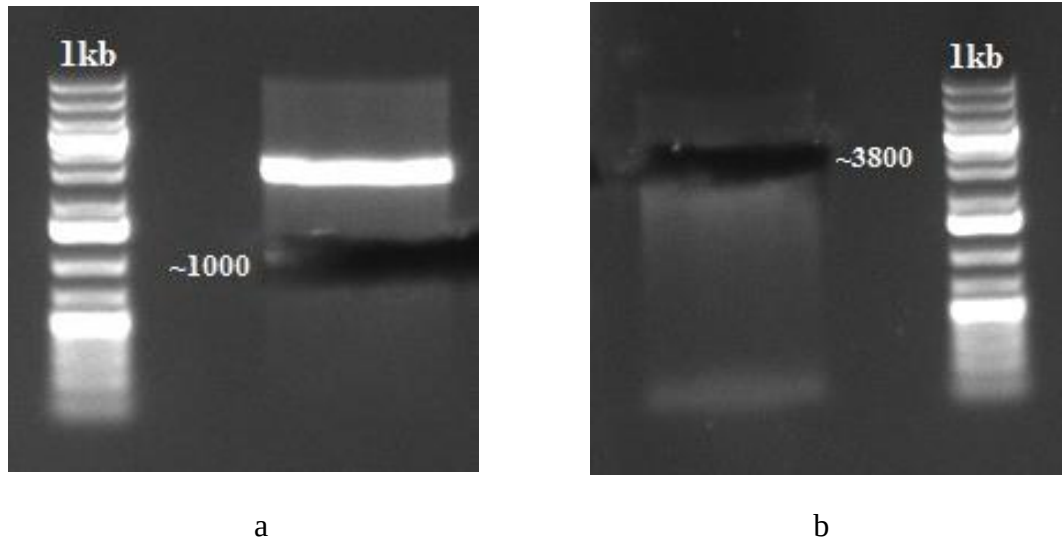
Şekil 4.34. pPDCpromZB plazmiti için seçilen 8 adet koloninin *AsuII* (*Bsp119I*) restriksiyon enzimi ile kontrolü. 1kb:GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas)

L-laktik asit üretiminde kullanılacak *Bos taurus* L-laktat dehidrogenaz (LDH) geninin elde edilen ekspresyon plazmiti pPDCpromZB'ye ligasyonu için ilk önce pGAPZB-LDH (Şekil 4.35a) ve pPDCpromZB plazmitleri *AsuII* (*Bsp119I*) ve *XbaI* enzimleri ile (Şekil 4.35b) kesilmiştir.



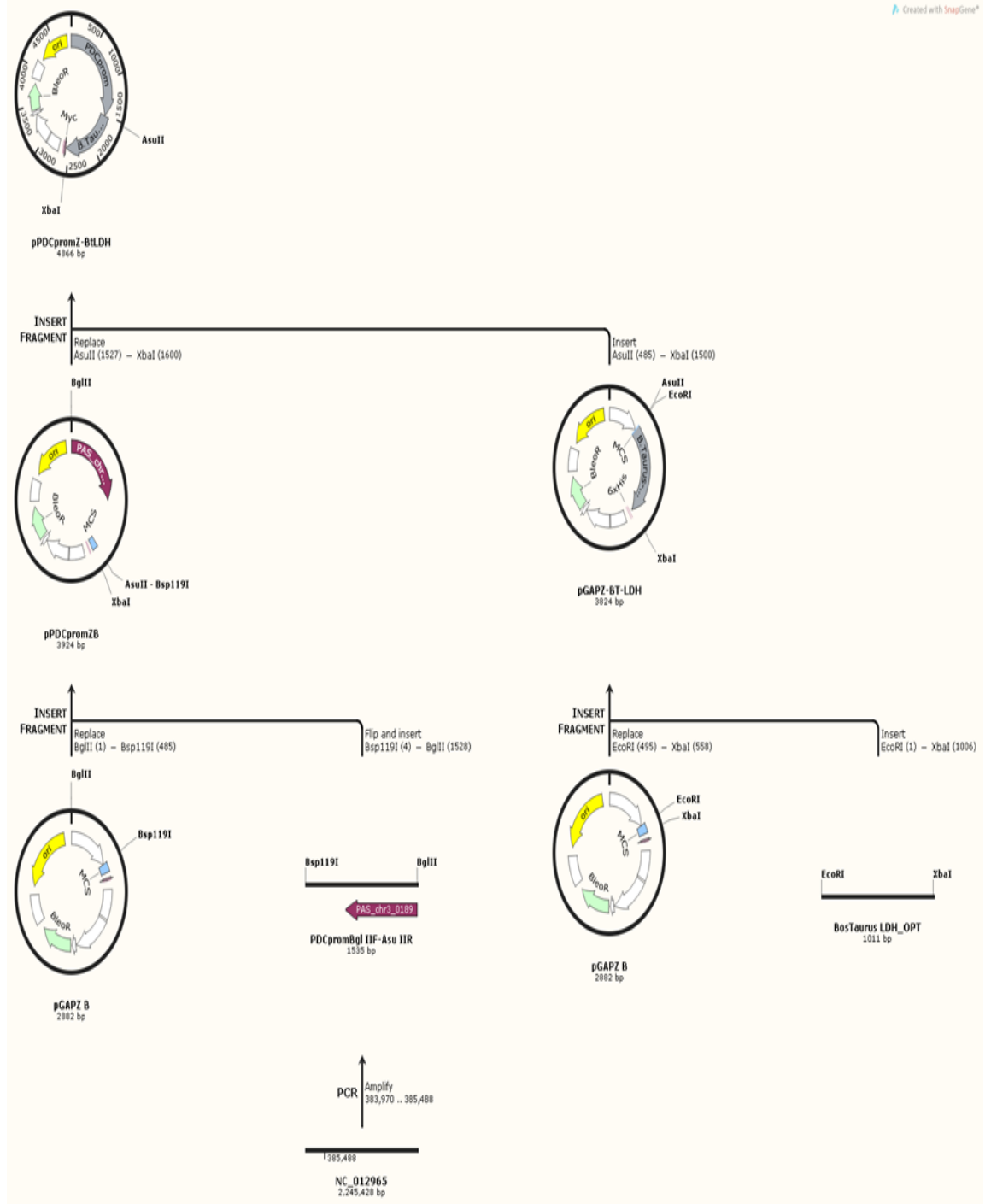
Şekil 4.35. a) pGAPZ-BT-LDH ve b) pPDCpromZB'nin AsuII (*Bsp119I*) ve XbaI enzimleri ile kesilerek lineer hale getirilmesi

pGAPZ-BT-LDH ve pPDCpromZB'nin AsuII (*Bsp119I*) ve XbaI enzimlerle kesimleri sonucu pPDCpromZB-LDH plazmitini elde etmek amacıyla jelden alınma görüntüleri Şekil 4.36'da gösterilmiştir.



Şekil 4.36. a) pGAPZ-BT-LDH ve b) pPDCpromZB'nin AsuII (*Bsp119I*) ve XbaI enzimleri ile kesilmesi sonucu jelden alınma görüntüsü. 1kb:GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas)

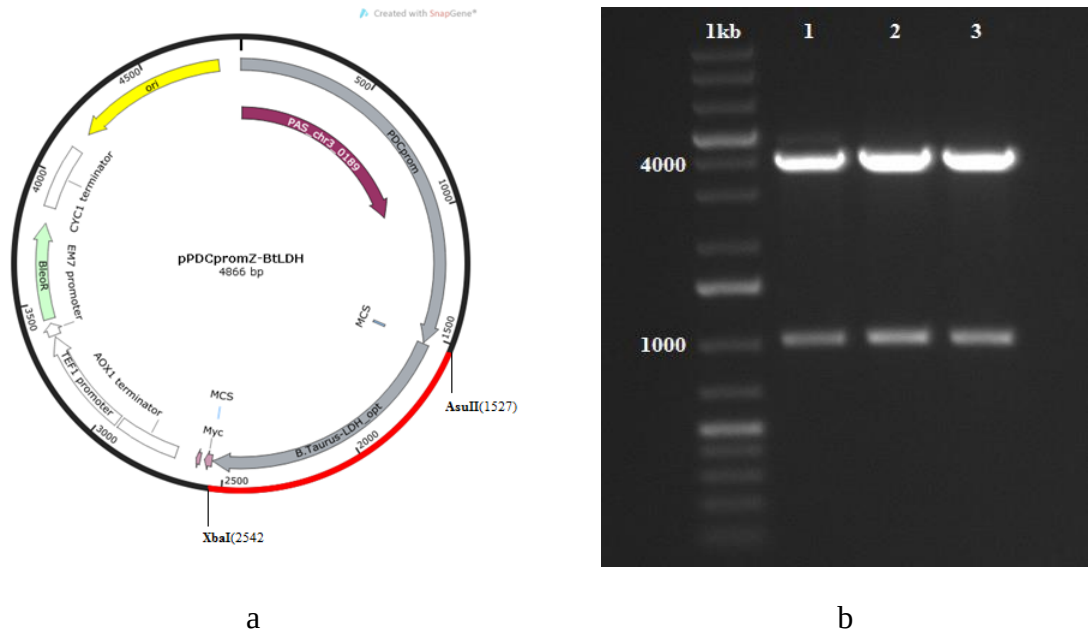
LDH geninin *pPDCpromZB* plazmitine ligasyonunun şematik gösterimi Şekil 4.37’de verilmiştir. Yeni plazmit *pPDCpromZB-LDH* olarak isimlendirilmiştir.



Şekil 4.37. *LDH* geninin *pPDCpromZB* plazmitine ligasyonunun şematik gösterimi

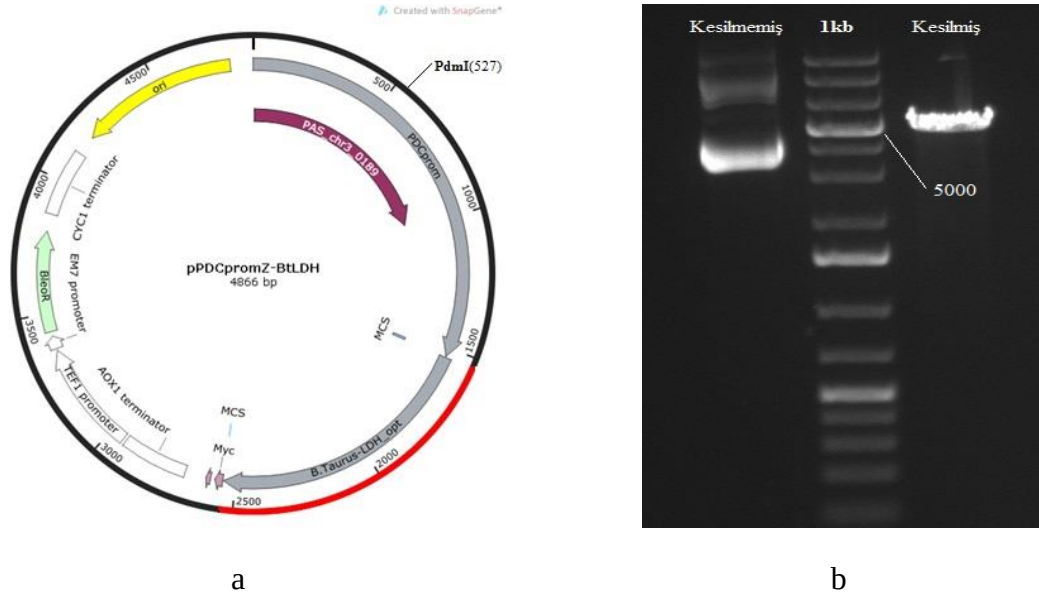
Ligasyon sonrası elde edilen karışımın *E. coli* XL1-Blue hücrelerine aktarımı yapılmıştır. Ardından içerisinde LB Lennox (25 µg/mL zeosin içeren) katı besiyeri bulunan plakalara üreyebilmeleri için hücrelerin ekimleri yapılmıştır. Ligasyon sonucu elde edilen pPDCpromZB-LDH plazmiti için gelişen hücrelerden 3 adet koloni seçilmiştir.

Daha sonra *AsuII* (*Bsp119I*) ve *XbaI* restriksiyon enzimleri ile seçilen bu koloniler kesilmiş (Şekil 4.38a) ve jelde yürütülüp kontrolü yapılmıştır (Şekil 4.38b). Jel üzerinde yaklaşık olarak 3850 bp ve 1000 bp uzunluğunda DNA parçalarının oluşumu beklenmiştir. Sonuç olarak seçilen 3 koloniden yalnız 2. ve 3. kolonilerdeki plazmitlerin doğru olduğu tespit edilmiş ve hücreler -80°C sıcaklıkta muhafaza edilmiştir.



Şekil 4.38. a) pPDCpromZB-LDH plazmiti *AsuII* (*Bsp119I*) ve *XbaI* restriksiyon enzimi ile kesilmesi ve **b)** jelde kontrolü. 1kb: GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas)

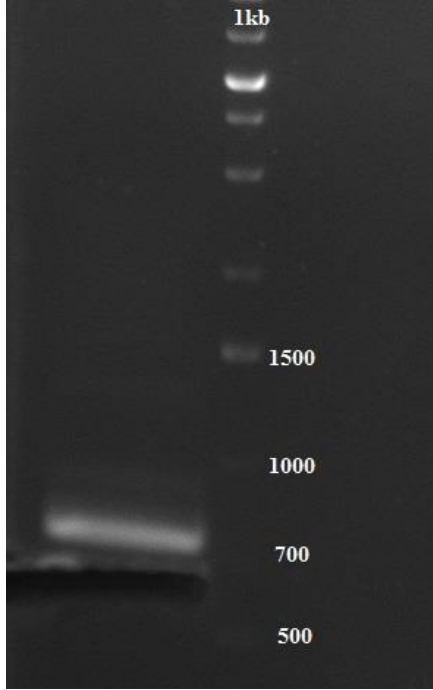
P. pastoris X33 ve FA115 suşlarına aktarılmak üzere 2. koloni hücrelerine ait pPDCpromZB-LDH plazmiti kullanılmıştır. Plazmiti lineer hale getirmek için *PdmI* restriksiyon enzimi kullanılmıştır (Şekil 4.39a). Enzimle kesme işlemi jelde kontrol edilmiştir (Şekil 4.39b).



Şekil 4.39 a) pPDCpromZB-LDH plazmitini lineer hale getirmek için *PdmI* restriksiyon enzimi kullanılması ve **b)** jelde kontrol edilmesi. 1kb:GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas)

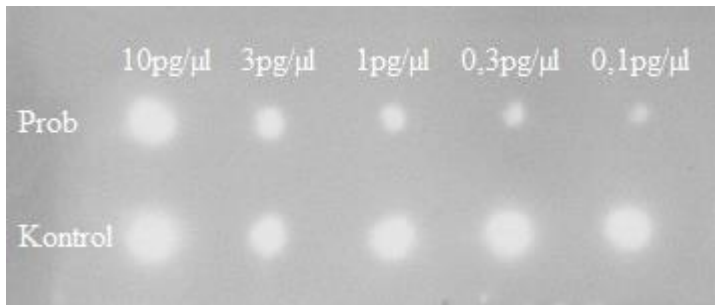
Daha sonra kompotent *P. pastoris* X33 ve FA115 suşlarına gen aktarımına başlanmıştır. Gen aktarımı işlemi için elektroporasyon (eppendorf eporator) tekniği kullanılmış, bu işlem cihazın 5 ms 1500 Volt uygulayacak şekilde ayarlanmasıyla gerçekleştirilmiştir. Aktarma işlemi gerçekleştirilmiş hücreler 100 µg/mL zeosin içeren YPD katı besiyerlerine ekilmiş, 30°C’de 2 gün inkübasyona bırakılmıştır. 2 gün sonrasında gelişen kolonilerden onar tanesinin YPD sıvı besiyerine ekimleri yapılmış ve 30°C’de bir gece çalkalamalı inkübatörde çoğaltılmışlardır. Genomik DNA’nın saflaştırılmasının ardından klonların doğruluğunun ve gen kopya sayısının belirlenmesi amacıyla Southern blot analizi yapılmıştır. Bunun için radyoaktif olmayan DIG HighPrime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche) üreticinin talimatları doğrultusunda kullanılmıştır.

Metotta ilk önce, Southern blotta kullanılan prob için PDCprom *SspI* restriksiyon enzimi ile kesilip jel üzerinden 620 bç uzunluğundaki fragment alınmış (Şekil 4.40) ve DIG ile etiketlemeye hazır hale getirilmiştir.



Şekil 4.40. Southern blotta kullanılan DIG etiketli prob için *PDC*prom'un *Ssp*I restriksiyon enzimi ile kesilip jel üzerinden alınması. 1kb:GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas)

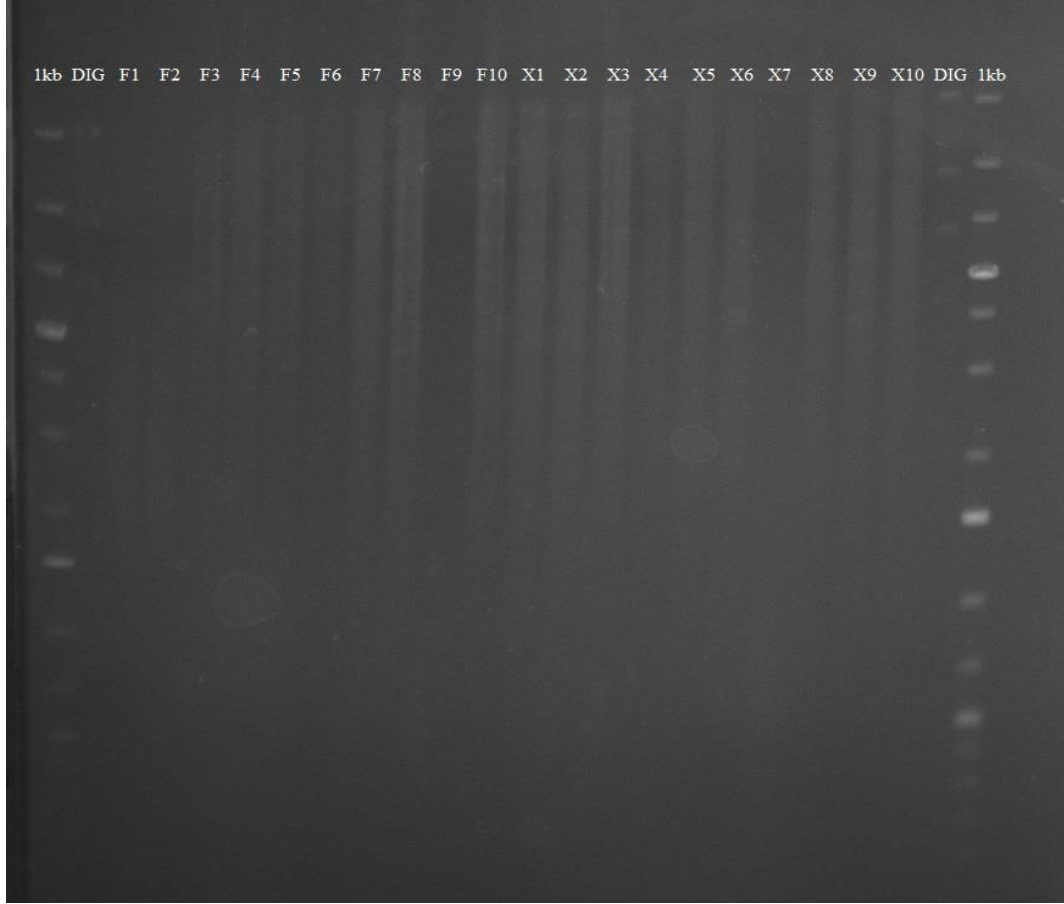
Prob için yaklaşık 3 µg DNA etiketleme işlemine tabi tutulmuştur. Probu oluşturan reaksiyon karışımı DIG kitin talimatları doğrultusunda hazırlanmış ve 37°C'de yaklaşık 20 saat boyunca inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyon sonucu elde edilen probun etkinlik düzeyi Şekil 4.41'de verilmiştir.



Şekil 4.41. *PDC* promotoru üzerinden elde edilen ve DIG etiketli probun etkinlik düzeyi

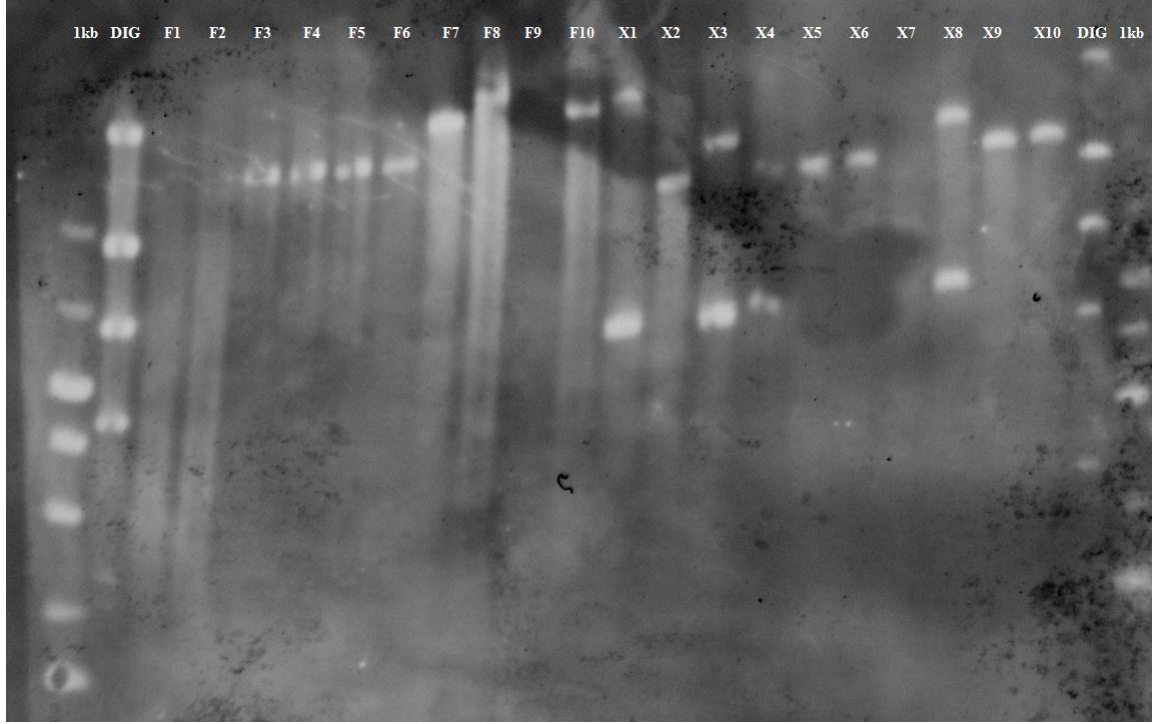
Southern blot analizinde kullanılacak probun uygunluğu görülmüş ve bunun ardından ilk olarak FA115 ve X-33 suşlarından elde edilen genomik DNA'lar

DNAMAN 7.0 programı kullanılarak yapılan restriksiyon analizi sonucu belirlenen *ScaI* restriksiyon enzimi ile kesilmiştir (Şekil 4.42).



Şekil 4.42. FA115 ve X-33 suşlarından elde edilen genomik DNA'ların *ScaI* restriksiyon enzimi ile kesimini gösteren jel görüntüsü. 1kb:GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas), DIG: DIG etiketli markır

Jel üzerinden membrana aktarılan DNA parçaları hibridizasyon aşamasından sonra X-ışını filmi üzerinde kontrol edilmiştir. Teorik olarak, tekli bağlanma için *pPDCpromZB-LDH*'dan 4866 bp, *ScaI* fragmentinden ise 5275 bp gelen olmak üzere toplam 5486 bp büyüklüğünde, ikili bağlanma için 10352 bp ve üçlü bağlanma için ise 15218 bp uzunluğunda bantlar beklenmiştir. Protokole uygun olarak gerçekleştirilen Southern blot analizi ile *pPDCpromZB-LDH* ekspresyon kaseti aktarılan suşlar belirlenmiştir (Şekil 4.43).



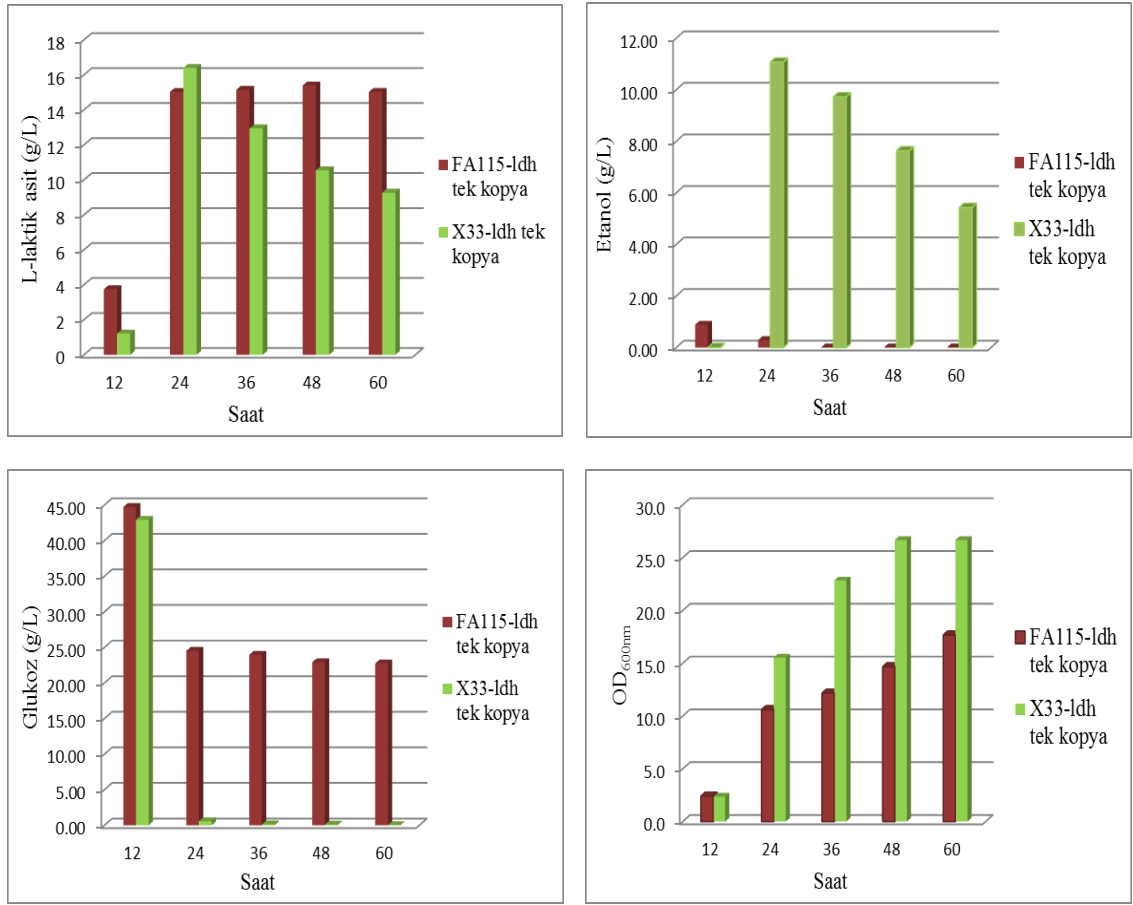
Şekil 4.43. pPDCpromZB-LDH aktarılan suşların Southern blot analizi sonucu X-ışını filminin görüntüsü. 1kb:GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas), DIG: DIG etiketli markır

X33 ve FA115 suşlarına *PDC* promotoru kullanılarak aktarılan *LDH* geni F3, F4, F5, F6, X2, X5, X6, X9 ve X10 klonlarında tek kopya bantına sahipken F7’de iki ve F10’da ise üç kopya bantı gözlenmiştir. Diğer klonlarda bilinmeyen sayıda ve farklı yerlerde bantlar belirlenmiştir.

Pichia pastoris mayasında L-laktik asit üretimi için, *PDC* promotoru kullanılarak aktarılan *LDH* genini tek, iki ve üç kopya ekspresyon plazmiti olarak içeren klonlar, ilk olarak erlenmayer koşullarında test edilmiştir. Bunun ardından kesikli ve kesikli beslemeli fermentasyon koşullarında denemeler gerçekleştirilmiştir.

4.3.2. Erlenmayer koşullarında üretim çalışmaları

PDC promotoru kullanılarak aktarılan *LDH* genini tek kopya olarak taşıyan X33 ve FA115 suşu 5ml YPD besiyeri içeren test tüplerine ekilmiş ve 28°C’de 24 saat 250 d/d’de inkübasyona tabi tutulmuşlardır. Bu hücreler, başlangıç yoğunluğu OD_{600nm}=0,1 olacak şekilde, 50 ml %6 glukoz içeren BMDY (%2 pepton, %1 maya ekstrakt ve 100 mM pH 6 fosfat tamponu) sıvı besiyerinde 250 ml’lik erlenmayerler için inokulum olarak kullanılmıştır. Inkübasyon 28°C’de 150 d/d’de gerçekleştirilmiştir. 12., 24., 36., 48. ve 60. saatlerde gelişen hücrelerden örnekler alınarak OD_{600nm}, glukoz (g/L), etanol (g/L) ve L-laktik asit (g/L) parametreleri analiz edilmiştir. Söz konusu denemeye ilişkin sonuçlar Şekil 4.44 içerisinde bulunan grafiklerde verilmiştir.



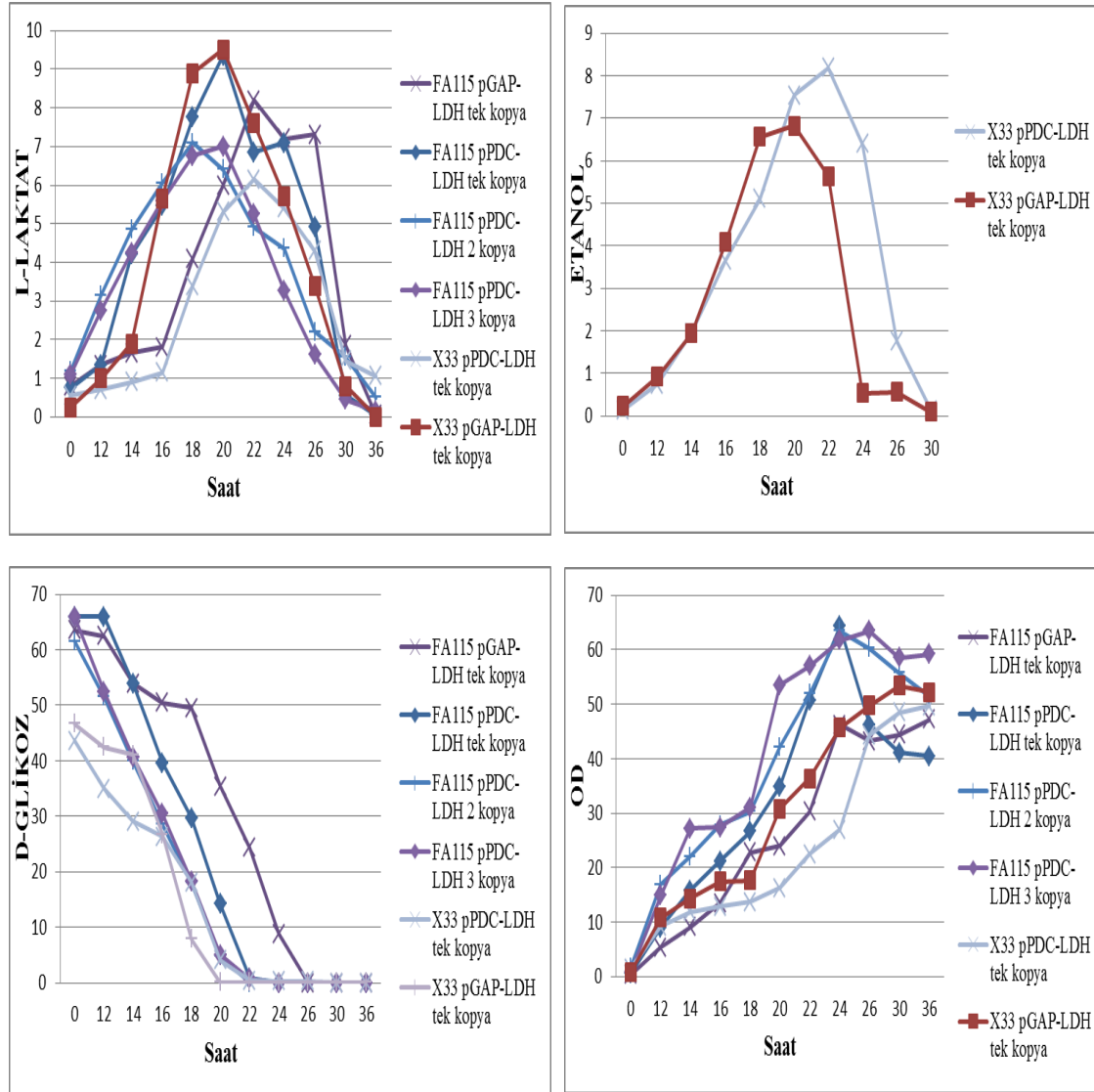
Şekil 4.44. Erlenmayer koşullarında tek kopya suşlara ait L-laktik asit (g/L), glukoz (g/L), etanol (g/L) ve OD_{600nm} değerlerine ait grafikler

PDC promotoru kullanılarak aktarılan *LDH* genini tek kopya olarak taşıyan X33 ve FA115 suşları erlenmayer koşullarında 24. saatte birbirine yakın miktarlarda L-laktik asit ($16,4 \pm 0,3$ ve $15,0 \pm 0,5$ g/L) üretimi gerçekleştirmişlerdir. Ancak X33-ldh suşu aynı zamanda etanol üretimi de gerçekleştirdiği için glukozu 24 saat sonunda tüketmiş ve L-laktik asidi karbon kaynağı olarak kullanmaya başlamıştır.

4.3.3. Fermentör koşullarında üretim çalışmaları

4.3.3.1 Kesikli fermentör koşullarında üretim

GAP ve *PDC* promotorları vasıtasıyla *LDH* geni aktarılmış *Pichia pastoris* suşları kullanarak kesikli fermentör (başlangıç aşamasından itibaren sıcaklık ve oksijen seviyesinin sabit tutulduğu, ayrıca gerekli zamanlarda köpük kırıcı eklendiği ortam) çalışması yapılmıştır. Söz konusu fermentörlere ait L-laktik asit (g/L), glukoz (g/L), etanol (g/L) ve OD_{600nm} sonuçları Şekil 4.45’de görülen grafiklerde verilmiştir.



Şekil 4.45. Kesikli fermentör çalışmasına ait L-laktik asit (g/L), glukoz (g/L), etanol (g/L) ve OD_{600nm} sonuçlarına ait grafikler

GAP ve *PDC* promotorları vasıtasıyla *LDH* geni aktarılmış *Pichia pastoris* suşları kullanılarak kurulan kesikli fermentör çalışmasında, L-laktik asit (g/L) üretimini en yüksek X33 p*GAP-LDH* (9,5 g/L) ve FA115 p*PDC-LDH* (9,4 g/L) tek kopya suşları tarafından gerçekleştirildiği belirlenmiştir.

4.3.3.2 Kesikli beslemeli fermentör koşullarında üretim

GAP ve *PDC* promotorları ile *LDH* geni aktarılmış *Pichia pastoris* suşları kullanılarak kurulan kesikli beslemeli fermentör koşulları (başlangıç aşamasından itibaren sıcaklık, pH ve çözünmüş oksijen sabit tutulduğu; gerekli zamanlarda köpük

kırııcı eklendiği, ayrıca glukozun bittiği noktada 200 g besleme yapıldığı ortam) çalışmasında elde edilen OD_{600nm} ve yaş hücre ağırlığı sonuçları Çizelge 4.2’de, verilmiştir.

Çizelge 4.2. Kesikli fermentör çalışmasına ait yaş hücre ağırlığı ve OD_{600nm} sonuçları

X33 pGAP-LDH tek kopya			X33 pPDC-LDH tek kopya			FA115 pGAP-LDH tek kopya		
Süre (Saat)	OD _{600nm}	Yaş hücre ağırlığı (g/L)	Süre (Saat)	OD _{600nm}	Yaş hücre ağırlığı (g/L)	Süre (Saat)	OD _{600nm}	Yaş hücre ağırlığı (g/L)
12	9,4	24,6	12	8,2	24,9	12	6,2	22,3
14	17,2	31,5	14	17,4	46,6	14	10,5	31,3
16	27,5	56,6	16	31,1	65,5	16	15,4	35,8
18*	45,5	72,4	17*	40,3	70,9	18	25,8	42,7
20	47,9	80,1	20	51,8	73,5	20	29,7	51,5
21	52,8	87,1	21	58,4	86,7	21*	34,7	60,3
22	56,8	92,4	22	58,8	88,6	22	31,4	57,4
23	72,0	108,7	23	61,2	97,3	23	32,6	63,1
24	79,4	105,6	24	74,0	109,4	24	34,9	70,6
25	78,6	107,8	25	84,8	120,0	25	40,6	80,3
26	96,8	113,4	26	101,6	114,4	26	45,0	82,1
30	84,0	115,2	30	95,6	109,4	28	56,8	95,4
						30	67,6	113,5
						36	69,6	110,8
FA115 pPDC-LDH tek kopya			FA115 pPDC-LDH 2 kopya			FA115 pPDC-LDH 3 kopya		
Süre (Saat)	OD _{600nm}	Yaş hücre ağırlığı (g/L)	Süre (Saat)	OD _{600nm}	Yaş hücre ağırlığı (g/L)	Süre (Saat)	OD _{600nm}	Yaş hücre ağırlığı (g/L)
12	7,9	24,4	12	8,6	30,5	12	9,4	33,0
14	9,6	28,8	14	13,6	33,8	14	13,0	40,5
16	14,8	32,0	16	18,2	38,3	16	18,0	45,8
18	19,1	43,3	18	25,1	47,9	18	28,3	62,4
20	28,4	66,3	20	31,7	60,1	20	37,4	65,6
22	34,5	73,8	21,5*	41,0	65,8	22*	47,2	71,0
23*	41,4	77,3	23	47,5	63,8	23	57,6	73,6
25	54,0	86,7	24	51,3	69,5	24	64,5	78,9
26	53,4	92,6	25	58,4	77,3	25	73,8	86,7
27	59,6	95,5	26	69,0	93,8	26	85,0	103,2
28	66,2	97,8	28	84,0	108,5	28	88,0	127,9
29	73,8	110,4	30	109,0	130,3	30	114,0	148,8
30	88,2	120,9	36	128,0	169,0	36	156,0	187,0
32	101,0	122,0						
34	110,8	129,1						

*200g glukozun eklendiği zaman

GAP ve *PDC* promotorları ile *LDH* geni aktarılmış *Pichia pastoris* suşları kullanılarak kesikli beslemeli fermentör çalışması yapılmıştır. Elde edilen glukoz (g/L), L-laktik asit (g/L) ve etanol (g/L) sonuçları ise Çizelge 4.3’te verilmiştir.

Çizelge 4.3. Kesikli fermentör çalışmasına ait glukoz (g/L), L-laktik asit (g/L) ve etanol (g/L) sonuçları

X33 pGAP-LDH tek kopya				X33 pPDC-LDH tek kopya				FA115 pGAP-LDH tek kopya		
Süre (Saat)	Glukoz (g/L)	L-Asit (g/L)	Etanol (g/L)	Süre (Saat)	Glukoz (g/L)	L-Asit (g/L)	Etanol (g/L)	Süre (Saat)	Glukoz (g/L)	L-Asit (g/L)
0	51,4	0,1	0,2	0	54,0	0,1	0,1	0	52,4	0,1
12	39,8	2,2	0,3	12	33,6	1,9	0,2	12	42,6	1,1
14	25,2	3,5	0,7	14	24,4	2,5	0,3	14	35,4	1,5
16	12,3	5,6	1,3	16	13,5	3,5	0,3	16	30,2	2,5
18	1,3	7,8	1,7	17	1,2	4,8	0,2	18	23,2	3,5
+Glukoz	124,6	7,0	1,3	+Glukoz	121,5	4,6	0,2	20	7,0	4,5
20	122,4	9,6	1,7	20	87,0	7,3	0,5	21	3,0	5,4
21	105,8	12,5	2,1	21	78,2	9,0	0,7	+Glukoz	123,0	4,0
22	86,4	15,0	2,5	22	65,9	10,3	0,9	22	113,6	4,5
23	69,1	18,5	3,2	23	48,3	11,9	1,4	23	111,8	6,4
24	52,5	22,0	3,9	24	35,0	14,1	3,5	24	108,6	7,1
25	36,6	28,2	4,9	25	20,8	15,4	6,4	25	103,5	7,9
26	5,4	25,6	6,5	26	7,2	18,0	8,4	26	90,0	9,2
30	4,5	25,0	3,9	30	4,7	17,8	6,0	28	57,3	19,7
								30	4,7	26,0
								36	4,9	23,9

FA115 pPDC-LDH tek kopya			FA115 pPDC-LDH 2 kopya			FA115 pPDC-LDH 3 kopya		
Süre (Saat)	Glukoz (g/L)	L-Asit (g/L)	Süre (Saat)	Glukoz (g/L)	L-Asit (g/L)	Süre (Saat)	Glukoz (g/L)	L-Asit (g/L)
0	46,6	0,1	0	49,4	0,08	0	49,0	0,06
12	47,2	0,5	12	41,0	2,36	12	42,0	2,20
14	42,4	1,0	14	36,6	3,22	14	36,4	3,54
16	30,4	1,5	16	28,3	4,26	16	29,2	4,46
18	24,2	2,2	18	21,6	5,78	18	22,8	5,98
20	18,1	2,9	20	12,0	7,26	20	11,3	7,46
22	7,4	3,5	21,5	1,4	8,36	22	1,4	7,92
23	3,2	3,8	+Glukoz	111,0	7,70	+Glukoz	117,5	7,40
+Glukoz	113,0	3,7	23	105,5	8,85	23	110,0	8,50
25	98,6	5,0	24	97,0	9,80	24	104,5	9,55
26	88,5	7,3	25	89,5	11,40	25	94,0	11,35
27	79,0	11,0	26	78,0	14,00	26	83,0	14,05
28	60,7	15,9	28	21,5	29,20	28	25,2	24,4
29	40,5	19,1	30	5,6	38,00	30	8,0	31,20
30	26,7	25,7	36	5,8	25,60	36	4,7	27,30
32	8,1	31,4						
34	4,0	30,8						

GAP ve *PDC* promotorları vasıtasıyla *LDH* geni aktarılmış *Pichia pastoris* suşları kullanılarak kurulan kesikli fermentör çalışmasında, L-laktik asit üretimini en yüksek FA115 p*PDC-LDH* iki kopya suşu 38,0 g/L ile sağlamıştır. Bunu takiben

sırasıyla, FA115 pPDC-LDH tek kopya ve üç kopya suşlarının 31,4 ve 31,2 g/L ürettikleri görülmüştür. FA115 pGAP-LDH tek kopya suşunun 26,0 g/L, X33 pGAP-LDH ve X33 pPDC-LDH tek kopya suşlarının ise 28,0 ve 18,0 g/L L-laktik asit ürettikleri belirlenmiştir.

Fermentör koşullarında yapılan üretim çalışmalarının tamamı, Şekil 4.46'da aktif bir çalışma sırasında çekilen fotoğrafı görülen, Sartorius Stedim Biostat® B reaktöründe gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.46. Fermentör uygulaması sırasında çekilen fotoğraf (Sistem; Sartorius Stedim Biostat® B 2x5 L Bioreactor)

5. TARTIŞMA

Son zamanlarda büyük önem kazanan polilaktik asit (PLA), su ve karbondioksit parçalanma özelliği ile biyobozunur mataeryallere alternatif bir kaynaktır. Laktik asit (LA); gıdalarda lezzet artırıcı ve koruyucu; kimya, ilaç, deri ve tekstil sanayinde önemli ve çok yönlü kullanımı olan bir kimyasaldır. Dünya ticaretinde laktik asit, yıllık ortalama %30'la en yüksek artış gösteren ticari metallerden biri haline gelmiştir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda laktik asidin optik saflığının; kristalizasyon, termostabilite, biyolojik bozulma derecesi ve performans değerleri gibi fiziksel özellikleri üzerinde çok etkili olduğu bildirilmektedir. Bu bakımdan yüksek saflıkta laktik asit üretimi için uygulanan teknolojiler önem kazanmıştır. Fakat yüksek saflıkta elde edilen laktik asidin düşük maliyetli olması önemlidir. Bakterilerden laktik asit üretimi bakterilerin zengin besin maddelerine ihtiyaç duydukları için maliyetlidir. Ayrıca, yüksek asitli ortamlara dayanımları azdır; bu yüzden, laktik asit üretimi sırasında verimi arttırmak için laktik asidin ortamdaki uzaklaştırılması gerekmektedir.

Laktik asit üretimi için, alternatif ekspresyon sistemleri olarak maya türlerine ilgi artmıştır. Örneğin, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*, *Candida boidinii*, *Pichia stipitis* ucuz büyüme ortamında gelişen, düşük pH ve organik asitlere nispeten daha dayanıklı organizmalardır.

Pichia pastoris rekombinant protein üretiminde konukçu organizma olarak yaygın ve başarılı bir şekilde kullanılan metilotrofik bir mayadır. *P. pastoris*, biyoteknoloji, ilaç endüstrisi ve akademik araştırmacılar tarafından rekombinant protein üretimi için ihtiyaç duyulan bir ekspresyon sistemidir. *P. pastoris*, bakteriler gibi, tek karbon kaynağı olarak metanol, glukoz, gliserol veya etanol içeren ucuz besiyerlerinde hızla gelişme gösterebilmektedir. Ayrıca, insanlar gibi, ökaryotik bir organizmadır ve birçok ökaryotik transkripsiyon sonrası modifikasyonları gerçekleştirebilmesi, heterolog proteinleri hem hücre içi hem hücre dışı olarak çok yüksek miktarlarda üretebilme kapasitesine sahip olması, bakterilere göre daha iyi olanaklar sağlamaktadır.

Bu tez kapsamında *P. pastoris* mayasında L(+)-laktik asit üretimi gerçekleştirilmiştir. *P. pastoris*'in laktik asit üretimi için kullanılmasının sebebi laktik asit üretiminde kullanılan mikroorganizmalardan çok daha düşük pH'larda gelişme gösterebilmesidir. Buna ilaveten, L(+)-laktik asit biyolojik olarak tüketilebilmesi ve ilaç amaçlı kullanılabilmesi bakımından D(-)-'ye göre daha önemlidir.

Çalışmanın ilk aşamasında *P. pastoris* PDC (pirüvat dekarboksilaz) geni inaktif hale getirilmiştir. Pirüvatı L-laktik aside yükseltgeyecek olan L-laktat dehidrogenaz geni mayaya GAP (Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz) ve PDC (pirüvat dekarboksilaz) promotorları kontrolü altında üretilmiştir. Gen kaynağı olarak sığır (*Bos taurus*) L-laktat dehidrogenaz geni kullanılmıştır. Üretim çalışmaları çalkalamalı inkübatörde erlenler içerisinde yapılmıştır. Daha sonra, verimli suşlar 5-L fermentör ortamında kesikli ve yarı-kesikli fermentasyon kültürlerinde üretimler gerçekleştirilmiştir.

PpPDC geninin inaktif hale getirilmesi için ilk önce PDCFATG / PDCRSTP primerleri kullanılarak PZR'de çoğaltılan *PpPDC* geni, jel pürifikasyonundan sonra

pJET1.2 vektörüne aktarılmıştır. Elde edilen yeni plazmit pJET1.2-*PDC* olarak adlandırılmıştır. Plazmit *E.coli* XL1 Blue hücrelerine aktarımı yapılmış ve rekombinant klonlar mavi/beyaz tarama yöntemi ile seçilmiştir. Yeni plazmit pJET1.2-*PDC*, *PpPDC* geninin orta bölümünün düşürülmesi için kesme enzimiyle (*SacI*) kesilmiştir. *Pichia* ekspresyon vektörü pA0815 kesme enzimleri (*Bam*HI – *Bgl*II) ile kesilip *HIS4* geni elde edilmiş ve lineer hale getirilmiş plazmide bağlanmıştır. Daha sonra PZR ile aktarılabacak inaktif gen elde edilmiştir. Bu gen elektroporator vasıtasıyla kompetent *P. pastoris* GS115 suşlarına aktarılmıştır. Önce PZR’da genin *P. pastoris* GS115 genomuna girdiği belirlenmiştir. Daha sonra Southern Blot metoduyla genom üzerinde doğru yere bağlandığı belirlenen suşlar -80°C’de muhafaza altına alınmıştır. Ayrıca, elde edilen suşun etanol üretimi gerçekleştirmediği belirlenmiştir. Bununla birlikte, aynı suşun pirüvat dekarboksilaz enzim aktivitesi göstermediği için *P. pastoris*’te *PDC* geninin bir kopya olduğu sonucuna varılmıştır. Söz konusu analizler ve testler sonucunda *PDC* geninin inaktif olduğu ispatlanmıştır. Elde edilen bu suşa FA115 ismi verilmiştir. Bu çalışmayla ilk defa laktik asit üretimi için *Pichia pastoris PDC* (pirüvat dekarboksilaz) geni inaktif hale getirilmiştir.

Pirüvatı L-laktik aside yükseltgeyecek olan sığır (*Bos taurus*) genomuna ait L-laktat dehidrogenaz (*LDH*) geni mayaya *GAP* promotor kontrolü altında üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada ilk önce *LDH* geninin, kesme enzimleriyle (*Eco*RI – *Xba*I) kesilip lineer hale getirilmiş *P. pastoris* ekspresyon vektörü olan *pGAPZB*’ye bağlanması sağlanmıştır. Bağlanma sonucu oluşan plazmidin (*pGAPZB-BtLDH*) *PDC* geninin inaktif hale getirildiği suş (FA115) ile X-33 suşuna aktarımı yapılmıştır. Daha sonra Southern Blot metodu sayesinde, plazmidin genom üzerinde doğru yere bağlandığı belirlenen suşlar -80°C’de muhafaza altına alınmıştır.

İkinci aşamada, sığır (*Bos taurus*) genomuna ait L-laktat dehidrogenaz (*L-LDH*) geni, *pGAPZB-BtLDH* plazmidinden kesme enzimleriyle (*Asu* II – *Xba* I) kesilip saflaştırılmıştır. *pGAPZB* plazmidinden *GAP* promotor bölgesi kesilip (*Asu* II – *Bgl* II) yerine, *PDC* promotor bölgesi yerleştirilmiştir. Oluşan *pPDCpromZB* plazmidini daha sonra kesme enzimleriyle (*Asu* II – *Xba* I) kesilip, içerisine elde ettiğimiz *L-LDH* geni yerleştirilmiştir (*pPDCZ-BtLDH*). Son aşamada, elde edilen plazmit FA115 ile X-33 suşuna gen aktarımı yapılmıştır. Ardından Southern Blot metoduyla genom üzerinde doğru yere bağlandığı belirlenen suşlar -80°C’de muhafaza altına alınmıştır. *GAP* promotoru çok yaygın kullanılması rağmen, ilk defa bu çalışmayla *P. pastoris*’te *PDC* promotoru kullanılmıştır.

Yapılan ilk denemeden elde edilen sonuçlara göre, *GAP* promotoru kullanılarak aktarılan *LDH* genini tek kopya olarak taşıyan FA115 suşu; erlenmayer koşullarında, çalkalamalı inkübasyonda 150 d/d’de yapılan L-laktik asit üretimi, 200 d/d’de yapılan göre daha yüksek değerlere ulaşmıştır. Bu sonuca göre daha sonra yapılan erlenmayerle çalkalamalı inkübasyon çalışmalarında 150 d/d kullanılmıştır.

GAP promotoru kullanılarak aktarılan *LDH* genini tek kopya olarak taşıyan X33 (13,5 g/L), FA115 (10,8 g/L) suşuna göre %5 glukoz koşullarında nispeten daha yüksek miktarlarda L-laktik asit üretimi gerçekleştirmiştir. *PDC* promotoru kullanılarak aktarılan *LDH* genini tek kopya olarak taşıyan X33 (16,4 g/L) ve FA115 (15,0 g/L) suşları erlenmayer koşullarında 24. saatte birbirine yakın miktarlarda L-laktik asit üretimi gerçekleştirmişlerdir. Ancak X33-ldh suşu aynı zamanda etanol üretimi de

gerçekleştirdiği için glukozu daha hızlı tüketmiş ve L-laktik asidi karbon kaynağı olarak kullanmaya başlamıştır.

GAP ve *PDC* promotorları kontrolü altında LDH geni aktarılmış *P. pastoris* suşları kullanılarak kesikli fermentör çalışmasında, L-laktik asit üretimini en yüksek X33 *pGAP-LDH* ve FA115 *pPDC-LDH* tek kopya suşları tarafından yaklaşık 9,5 g/L olarak gerçekleştirildiği belirlenmiştir.

Çizelge 5.1’de kesikli-beslemeli fermentör çalışmasında elde edilen sonuçların ortalamaları, standart sapma (STD) değerleri ve aralarındaki farkların Duncan çoklu karşılaştırma testine göre önem seviyeleri verilmiştir. Yapılan çoklu karşılaştırma testine göre verilen harfler (A, B, C ve D) arasındaki farklar önemli bulunmuştur.

Çizelge 5.1. Kesikli-beslemeli fermentör çalışmasında elde edilen sonuçların ortalamaları, standart sapma değerleri ve aralarındaki farkların Duncan çoklu karşılaştırma testine göre önem seviyeleri.

Kullanılan Suş	Ortalama	STD	Önem Seviyesi*
FA115 <i>PDC-LDH</i> iki kopya	38.0	1.1	A
FA115 <i>PDC-LDH</i> tek kopya	31.4	2.0	B
FA115 <i>PDC-LDH</i> üç kopya	31.2	2.4	B
X33 <i>GAP-LDH</i> tek kopya	28.2	2.7	C
FA115 <i>GAP-LDH</i> tek kopya	26.0	1.0	C
X33 <i>PDC-LDH</i> tek kopya	18.0	1.8	D

Aynı harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark Duncan çoklu karşılaştırma testine göre önemli değildir ($P < 0.05$)

Kesikli-beslemeli fermentör çalışmasında; L-laktik asit üretimini en yüksek (A), 38,0 g/L ile FA115 *pPDC-LDH* iki kopya suşu sağlamıştır. Sırasıyla, FA115 *pPDC-LDH* tek kopya ve üç kopya suşlarının 31,4 ve 31,2 g/L üretim değerleri arasında fark görülmemiş olup ikinci seviyede (B) bir üretim elde edilmiştir. X33 *pGAP-LDH* ile FA115 *pGAP-LDH* tek kopya suşlarının 28,0 ve 26,0 g/L üretim değerleri arasında fark görülmemiş olup üçüncü seviyede (C) bir üretim sağlamışlardır. X33 *pPDC-LDH* tek kopya suşu ise 18,0 g/L L-laktik asit üretimi ile en düşük (D) L-laktik asit üretimi gerçekleştirmiştir.

Laktik asidin rekombinant olarak üretildiği birçok araştırma mevcut bulunmaktadır. Bu araştırmalar arasından bazıları ile ilgili bulgular Çizelge 5.2’de verilmiştir.

Çizelge 5.2. Daha önce yapılan bazı rekombinant laktik asit üretim çalışmalarına ait verim (g/g) değerleri.

Organizma	Verim (g/g)*	Referanslar
<i>Escherichia coli</i>	0,80-0,99	Chang vd. 1999; Zhou vd. 2003
<i>Lactobacillus plantarum</i>	0,85-0,97	Wee vd. 2006; Okano vd. 2010
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	0,23-0,37	Liaud vd. 2015
<i>S. cerevisiae</i>	0,16-0,82	Adachi vd. 1998; Saitoh vd. 2005; Ishida vd. 2006; Branduardi vd. 2006
<i>Candida utilis</i>	0,69-0,91	Tamakawa vd. 2012
<i>Pichia stipitis</i>	0,59	Ilmén vd. 2007
<i>P. pastoris</i>	0,70	de Lima vd. 2016
<i>P. pastoris</i>	<u>0,27</u>	<u>Bu çalışma</u>

* gram laktik asidin gram toplam şeker miktarına oranı

Yukarıda belirtilen hem *P. pastoris* hem de diğer mikroorganizmalarda suşlarında yapılan laktik asit üretim çalışmalarında elde edilen verim bu çalışmadan elde edilen sonuca göre daha yüksek bulunmuştur

En düşük L-laktik asit üretimini her iki fermentör ortamında da gerçekleştiren X33 pPDC-LDH suşu aynı zamanda en yüksek etanol üretimlerini sağlamıştır. Bunun sebebinin suşun aynı sekans üzerinden hem etanol hem de L-laktik asit üretmeye çalışması olduğu düşünülmektedir.

pGAP-LDH genini tek kopya olarak içeren X33 ve FA115 suşları birbirine çok yakın L-laktik asit üretimi gerçekleştirmiş, X33 pGAP-LDH suşunun bir taraftan etanol üretimi yaptığı düşünülürse daha farklı bir fermentör koşulunda daha yüksek verimler elde edileceği tahmin edilmektedir.

Her iki fermentör koşulunda da, *PDC* promotorundan *GAP* promotoruna göre ya benzer ya da daha fazla L-laktik asit üretimi elde edilmiştir. İlk defa bu çalışmayla denenilen *PDC* promotorunun gelecekte birçok çalışma için kaynak olabileceğini göstermektedir.

6. SONUÇ

Moleküler biyoloji uygulamalarından tıp, ilaç, gıda ve tarım gibi geniş bir alanda faydalanılmaktadır. Bu nedenle moleküler biyoloji biliminde yapılan gelişmeler, kullanıldığı alanlardaki rolüne bağlı olarak büyük imkanlar sağlamaktadır.

Bu çalışma kapsamında *P. pastoris* mayasında L(+)-laktik asit üretimi gerçekleştirilmiştir. *P. pastoris* şimdiye kadar laktik asit üretiminde kullanılan mikroorganizmalardan çok daha düşük pH'larda aktivite gösterebilmesi ve gereksinim duyduğu gelişim ortamının maliyetinin daha az olmasıdır.

Çalışmada ilk olarak *P. pastoris* PDC (pirüvat dekarboksilaz) geni inaktif hale getirilmiştir. Pirüvat dekarboksilaz enzim aktivitesi tayininden elde edilen sonuca göre *P. pastoris*'te başka aktif PDC geni olmadığı sonucuna varılmıştır. Bu çalışmayla ilk defa laktik asit üretimi için *P. pastoris* PDC geni inaktif hale getirilmiştir.

Ayrıca, farklı promotorlar kullanılarak fermentör koşullarında rekombinant olarak L(+)-laktik asit üretimleri gerçekleştirilmiştir. Üretimler, *P. pastoris*'te ilk defa kullanılan PDC (pirüvat dekarboksilaz) ve çok yaygın kullanıma sahip olan GAP (gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz) promotorları ile karşılaştırılmış ve tek bir kesikli beslemeli fermentör denemesinde 38,0 g/L L-laktik asitlik bir üretime ulaşarak yüksek miktarda rekombinant protein üretiminin yapılabileceği gösterilmiştir. Fermentör çalışmalarında, PDC promotorundan elde edilen L-laktik asit üretim miktarları GAP promotoruna göre ya benzer ya da daha yüksek bulunmuştur. Bu da ilk kez bu çalışmayla denenen PDC promotorunun, gelecekte de birçok çalışma için kaynak oluşturabileceğini göstermiştir.

Bununla birlikte, ileride yapılabilecek; promotorların yeniden tasarımı, yeni promotorların kullanımı, gen kopya sayısının artırılması, fermentasyon koşulları optimize edilmesi gibi modifikasyonlarla çok daha yüksek L-laktik asit üretim verimleri elde edilebileceği düşünülmektedir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, yapılacak olan benzer çalışmalara ışık tutacak niteliktedir.

7. KAYNAKLAR

- Adachi, E., Torigoe, M., Sugiyama, M., Nikawa, J.I. and Shimizu, K. 1998. Modification of metabolic pathways of *Saccharomyces cerevisiae* by the expression of lactate dehydrogenase and deletion of pyruvate decarboxylase genes for the lactic acid fermentation at low pH value. *J. Ferm. Bioeng*, 86:284–289.
- Anonymous 1: Lactic acid. https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/structure9/043/mfcd00004520.eps/jcr_content/renditions/mfcd00004520-large.png Eriřim tarihi:16.12.2017
- Baumann, K., Maurer, M., Dragosits, M., Cos, O. and Ferrer, P. 2008. Hypoxic Fed-Batch Cultivation of *Pichia pastoris* Increases Specific and Volumetric Productivity of Recombinant Proteins. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 100: 177-183.
- Branduardi, P., Sauer, M., De Gioia, L., Zampella, G., Valli, M., Mattanovich, D. and Porro, D. 2006. Lactate production yield from engineered yeasts is dependent from the host background, the lactate dehydrogenase source and the lactate export. *Microbial Cell Factories*, 5:4.
- Cereghino, J.L. and Cregg J.M. 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev*, 24: 45-66.
- Chang, D.E., Jung, H.C., Rhee, J.S. and Pan, J.G. 1999. Homofermentative production of D- or L-lactate in metabolically engineered *Escherichia coli* RR1. *Appl Environ Microbiol*, 65:1384–1389
- Colombie', S., Dequin, S. and Sablayrolles, J.M. 2003. Control of lactate production by *Saccharomyces cerevisiae* expressing a bacterial LDH gene. *Enzyme Microb. Technol*, 33: 38–46.
- Cos, O., Ram3n, R., Montesinos, J.L. and Valero, F. 2006. Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: A review. *Microbial Cell Factories*, 5:17.
- Daly, R. And Hearn, M.T.W. 2005. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *Journal of Molecular Recognition*, 18: 119–138.
- De Lima, P.B.A., Mulder, K.C.L., Melo, N.T.M., Carvalho, L.S., Menino, G.S., Mulinarı, E., De Castro, V.H., Dos Reis, T.F., Goldman, G.H., Magalh3es, B.S. and Parachin, N.S. 2016. Novel homologous lactate transporter improves L-lactic acid production from glycerol in recombinant strains of *Pichia pastoris*. *Microb Cell Fact*, 15:158.
- Düzgüneş, O., Kesici, T., Kavuncu, O. ve Gürbüz, F. 1987. Araştırma ve Deneme Metotları. Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Yayınları No: 1021, Ankara, 229 s.
- Henton, D.E., Gruber, P., Lunt, J. and Randall, J. 2005. Polylactic acid technology, p. 527–577. In A.K. Moharty, M. Mishra, and L.T. Drzal (ed.), Natural fibers, biopolymers and biocomposites. CRC Press, Boca Raton, FL.

- Ilmén, M., Koivuranta, K., Ruohonen, L., Suominen, P., and Penttilä, M. 2007. Efficient Production of L-Lactic Acid from Xylose by *Pichia stipitis*. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 73(1): 117–123.
- Inan, M., Chiruvolu, V., Eskridge, K.M., Vlasuk, G.P., Dickerson, K., Brown, S. and Meagher, M.M. 1999. Optimization of temperature–glycerol–pH conditions for a fed-batch fermentation process for recombinant hookworm (*Ancylostoma caninum*) anticoagulant peptide (AcAP-5) production by *Pichia pastoris*. *Enzyme and Microbial Technology*, Volume 24(7): 438–445.
- Inan, M. and Meagher, M.M. 2001. The Effect of Ethanol and Acetate on Protein Expression in *P. pastoris*. *Journal of Bioscience and Bioeng*, 92(4): 337–341.
- Inan, M., Aryasomayajula, D., Sinha, J. and Meagher, M.M. 2006. Enhancement of protein secretion in *Pichia pastoris* by overexpression of protein disulfide isomerase. *Biotechnol Bioeng*, 93: 771–778.
- Inan, M., Fanders, S.A., Zhang, W., Hotez, P.J., Zhan, B. and Meagher, M.M. 2007. Saturation of the Secretory Pathway by Overexpression of a Hookworm (*Necator americanus*) Protein (Na-ASP1). In: Cregg J.M. (eds) *Pichia Protocols*. pp 65–75. *Methods in Molecular Biology*, vol 389. Humana Press, NY, ABD.
- Ishida, N., Saitoh, S., Onishi, T., Tokuhira, K., Nagamori, E., Kitamoto, K. and Takahashi, H. 2006. The effect of pyruvate decarboxylase gene knockout in *Saccharomyces cerevisiae* on L-lactic acid production. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70: 1148–1153.
- Liaud, N., Rosso, M-N., Fabre, N., Crapart, S., Herpoël-Gimbert, I., Sigoillot, J-C., Raouche, S. and Levasseur, A. 2015. L -lactic acid production by *Aspergillus brasiliensis* overexpressing the heterologous *ldha* gene from *Rhizopus oryzae*. *Microbial Cell Factories*, 14:66.
- Luria, S.E., Adams, J.N. and Ting R.C. 1960. Transduction of lactose-utilizing ability among strain of *E. coli* and *S. dysenteriae* and the properties of the transducing phage particles. *Virology*, 12: 348–390.
- Macauley-Patrick, S., Fazenda, M.L., Mcneil, B. and Harvey, L.M. 2005. Heterologous protein production using the *P. pastoris* expression system. *Yeast*, 22: 249–270.
- Mattanovich, D., Graf, A., Stadlmann, J., Dragosits, M., Redl, A., Maurer, M., Kleinheinz, M., Sauer, M., Altmann, F. and Gasser, B. 2009. Genome, secretome and glucose transport highlight unique features of the protein production host *Pichia pastoris*. *Microb Cell Factories*, 8:29.
- Nampoothiri, K.M., Nair, N.R. and John, R.P. 2010. An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research. *Bioresource Technology*, 101: 8493–8501.
- Narayanan, N., Roychoudhury, P.K. and Srivastava, A. 2004. L (+) lactic acid fermentation and its product polymerization. *Electronic Journal of Biotechnology*, Vol.7 (2): 167–179.
- Okano, K., Tanaka, T., Ogino, C., Fukuda, H. and Kondo, A. 2010. Biotechnological production of enantiomeric pure lactic acid from renewable resources: recent achievements, perspectives, and limits. *Appl Microbiol Biotechnol*, 85:413–423.

- Osawa, F., Fujii, T., Nishida, T., Tada, N., Ohnishi, T., Kobayashi, O., Komeda, T. and Yoshida, S. 2009. Efficient production of L-lactic acid by Crabtree-negative yeast *Candida boidinii*. *Yeast*, 26: 485–496.
- Porro, D., Bianchi, M.M., Brambilla, L., Menghini, R., Bolzani, D., Carrera, V., Lievense, J., Liu, C.L., Ranzi, B.M., Frontali, L. and Alberghina, L. 1999. Replacement of a metabolic pathway for large-scale production of lactic acid from engineered yeasts. *Appl Environ. Microbiol*, 65: 4211–4215.
- Potvin, G., Ahmad, A. and Zhang, Z. 2012. Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: A review. *Biochemical Engineering Journal*, 64: 91–105.
- Qin, X., Qian, J., Yao, G., Zhuang, Y., Zhang, S. and Chu, J. 2011. GAP Promoter Library for Fine-Tuning of Gene Expression in *Pichia pastoris*. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 77(11): 3600–3608.
- Saitoh, S., Ishida, N., Onishi, T., Tokuhira, K., Nagamori, E., Kitamoto, K. and Takahashi, H. 2005. Genetically engineered wine yeast produces a high concentration of L-lactic acid of extremely high optical purity. *Appl Environ Microbiol*, 71: 2789–2792.
- Sambrook, J. and Russell, D.W. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY.
- Shengde, Z., Shanmugam, K.T., and Ingram, L.O. 2003. Functional Replacement of the *Escherichia coli* D-Lactate Dehydrogenase Gene (*ldhA*) with the L-Lactate Dehydrogenase Gene (*ldhL*) from *Pediococcus acidilactici*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 2237–2244.
- Sohn, S.B., Graf, A.B., Kim, T.Y., Gasser, B., Maurer, M., Ferrer, P., Mattanovich, D. and Lee, S.Y. 2010. Genome-scale metabolic model of methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and its use for *in silico* analysis of heterologous protein production. *Biotechnology Journal*, 5: 705–715.
- Tamakawa, H., Ikushima, S., and Yoshida, S. 2012. Efficient production of L-lactic acid from xylose by a recombinant *Candida utilis* strain. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 113(1): 73–75.
- Van Urk, H., Postma, E., Scheffers, W.A. and Van Dijken, J. 1989. Glucose transport in crabtree-positive and crabtree-negative yeasts. *Journal of General Microbiology*, 135(9): 2399–2406.
- Wee, Y.-J., Kim, J.-N. and Ryu, H.-W. 2006. Biotechnological Production of Lactic Acid and Its Recent Applications. *Food Technol. Biotechnol.*, 44(2): 163–172.
- Zhang, W., Inan, M. And Meagher, M.M. 2007. Rational Design and Optimization of Fed-Batch and Continuous Fermentations. *Pichia* Protocols, Methods in Molecular Biology Series, 389, 2nd edition, Humana Press Inc., pp. 65–75, Totowa, NJ.
- Zhou S., Causey, T.B., Hasona, A., Shanmugam, K.T. and Ingram, L.O. 2003. Production of optically pure D-lactic acid in mineral salts medium by metabolically engineered *Escherichia coli* W3110. *Appl Environ Microbiol*, 69: 399–407.

8. EKLER

Ek 1. Çalışmada kullanılan primerler

Primer adı	Hedef gen/Amaç	Sekans
PDCFATG	PDC Dizileme ve plasmit doğrulama	5'-ATGGCTGAAATAACACTAGGAACTTA-3'
PDCRSTP	PDC Dizileme ve plasmit doğrulama	5'-TTAAGCTGCGTTGGTCTGGC-3'
pGAP Forward	Plasmit doğrulama	5'-GTCCCTATTTCAATCAATTGAA-3'
3' AOX1	Plasmit doğrulama	5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'
PDCprom Bgl II F	PDCprom Dizileme ve plasmit doğrulama	5'-AAAGATCTGGTCATACAATATGGGCTC-3'
PDCprom Asu II R	PDCprom Dizileme ve plasmit doğrulama	5'-TTTTCGAATGTTGTGTACTAGCTAATTG-3'

Ek 2. Çalışmada Kullanılan *Bos taurus* LDH geninin DNA Dizisi

LDH gen sekansı :1011 bç ds-DNA

Kaynak :*Bos Taurus*

Orijin

```

1      gaattcatgg ctaccttgaa agaccagctt atccaaaact tgcttaaaga agagcatgtc
61     ccacaaaaca aaatcacaat cgtcggtgtc ggtgctgttg gtatggcttg tgccatttcc
121    atcttgatga aagatcttgc tgacgagggt gccttggttg atgtcatgga ggacaagctt
181    aaaggtgaaa tgatggattt gcaacatgga tcattgttcc ttagaactcc taagatcggt
241    agtggttaaag actacaacgt caccgctaac tccagattgg ttattatcac tgcagggtgct
301    agacaacagg agggagaatc cagattgaac ctgttcaga gaaacgtcaa cattttaag
361    ttcattatcc caaacatcgt taaatactct cctaattgca agttgcttgt tgttccaat
421    ccagttgata tttgacata tgtcgcttgg aaaatctcag gtttcctaa gaacagagtt
481    attggttcag gatgtaattt ggacagtgcc agattcagat attgatggg agagagactt
541    ggagttcatc cattgtcttg ccacggttgg atttgggtg aacacggaga ttctccgtt
601    cctgtctggt caggtgttaa cgtcgctgga gttagtttga aaaatcttca tccagagttg
661    ggaactgatg cagacaagga acaatggaaa gctgtccaca agcaggttgt cgattctgcc
721    tacgaggtta ttaagtgaa ggggtacaca tcttgggcaa tcggacttcc cgtcgccgac
781    ttggcagaaa gtatcatgaa gaacctaga agagttcatc ctattccac catgatcaaa
841    ggtttgtacg gaattaagga agatgttttc cttccgtcc catgtatttt gggcctaaaat
901    ggaatctcag acgttgtaa ggttactttg acacacgaag aggaagcttg ttgaagaaa
961    tccgctgata cattgtgggg aatccagaaa gagttgcagt ttagtctag a

```

ÖZGEÇMİŞ

Fırat AYAS

firatayas@hotmail.com



ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans 1999-2003	Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Ens., Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Adana
Lisans 1995-1999	Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Adana

MESLEKİ VE İDARİ GÖREVLER

Mühendis 2016- Devam Ediyor	Yüreğir İlçe Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü, Adana
Mühendis 2011-2016	Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Antalya
Kalite Mühendisi 2005-2011	Aygül Un San. Tic. Ltd. Şti, Gaziantep
Proje Sorumlusu (BTC) 2004-2005	Bilkent Catering A.Ş., Kahramanmaraş

ESERLER:

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

Ulusal hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

1. Tuğrul Ay, S., Çınar, A., Ayas, F., Yüksel, K., Çınar, O. and Karabak, S. 2017. Mediterranean Region Studies of Mainstreaming Biodiversity Conservation and Sustainable Use for Improved Human Nutrition and Wellbeing Project. Anadolu, J. of AARI, 27 (2) 2017, 9-16
2. Ayas, F., Vuran, F.A., Yüksel, K., Çınar, O., Tuğrul Ay, S and Karabak, S. 2017. The Antioxidant Capacities and Consumption Per Capita Of Edible Wild Species and Local Varieties Collected from Turkey within the GEF-Funded Biodiversity for Food and Nutrition (BFN) Project. Anadolu, J. of AARI, 27 (2) 2017, 46-53
3. Çınar, A., Tuğrul Ay, S., Ayas, F., Karabak, S., Güzelsoy, N. and Uçurum, Ö. 2017. Foxtail Lilly (*Eremurus spectabilis* M.Bieb) as Priority Species of Biodiversity for “Food and Nutrition Project” of Turkey. Anadolu, J. of AARI, 27 (2) 2017, 69-73
4. Adanacıoğlu, N., Tan, A., Karabak, S., Güzelsoy, N., Ayas, F., Aykas, L., Taş, N. and Taylan, T. 2017. Economically Important Wild Mushroom Saffron Milk Cap (*Lactarius deliciosus* (L.) Gray) of Aegean Region, Turkey. Anadolu, J. of AARI, 27 (2) 2017, 91-96
5. Karık, Ü., Çiçek, F., Oğur, E., Tutar, M. ve Ayas, F., 2016. Türkiye’de Yayılış Gösteren Defne (*Laurus nobilis* L.) Populasyonlarının Meyve Özellikleri. Anadolu, J. of AARI 26 (1) 2016, 1-16
6. Karık, Ü., Çiçek, F., Oğur, E., Tutar, M. ve Ayas, F., 2015. Türkiye Defne (*Laurus nobilis* L.) Populasyonlarının Uçucu Yağ Bileşenleri. Anadolu, J. of AARI 25 (1) 2015, 1-16
7. Yıldız Turgut, D., Dal, B., Ayas, F., 2014. Farklı Hasat Zamanlarının Valencia Late Portakal Çeşidinin Bazı Fitokimyasal Özellikleri Üzerine Etkisi. Hasad Bitkisel Üretim, yıl:29, sayı:346.
8. Gölükcü, M., Toker, R., Ayas, F., Çınar, N., 2014. Kudret narı (*Momordica charantia* L.) tohumunun bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri ile tohum yağının yağ asitleri bileşimi. Derim, 31 (1):17-24.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan bildiriler

1. Tuğrul Ay, S., Çınar, A., Ayas, F., Yüksel, K., Çınar, O. and Karabak, S. 2017. Mediterranean Region Study of “Mainstreaming Biodiversity Conservation and Sustainable use for Improved Human Nutrition and Wellbeing” Project. Abstract book p31-32. International Symposium on Biodiversity and Edible Wild Species. 3-5 April 2017, Antalya, Turkey. (Sözlü Bildiri)
2. Tuğrul Ay, S., Çınar, A., Ayas, F., Karabak, S., Güzelsoy, N. and Uçurum, Ö. 2017. Foxtail Lilly (*Eremurus spectabilis* M.Bieb) as Priority Species of Biodiversity for “Food and Nutrition Project” of Turkey. Abstract book p35. International Symposium on Biodiversity and Edible Wild Species. 3-5 April 2017, Antalya, Turkey. (Sözlü Bildiri)

3. Ayas, F., Yüksel, K., Çınar, O., Vuran, F. A. and Tuğrul, Ay S. 2017. The Antioxidant Capacities Of Wild Species Collected from Turkey within the GEF-funded Biodiversity for Food and Nutrition (BFN) Project. Abstract book p36. International Symposium on Biodiversity and Edible Wild Species. 3-5 April 2017, Antalya, Turkey. (Sözlü Bildiri)
4. Alpınar, A. and Ayas, F. 2017. Research on the Nutritional Value of *Arum dioscoridis* (Araceae) Which is Used as a Traditional Dish 'Tırşik' in Turkey. Abstract book p40. International Symposium on Biodiversity and Edible Wild Species. 3-5 April 2017, Antalya, Turkey. (Sözlü Bildiri)
5. Adanacioğlu, N., Tan, A., Karabak, S., Güzelsoy, N., Ayas, F., Aykas, L., Taş, N. and Taylan, T. 2017. Economically Important Wild Mushroom Saffron Milk Cap (*Lactarius deliciosus* (L.) Gray) of Aegean Region, Turkey. Abstract book p74. International Symposium on Biodiversity and Edible Wild Species. 3-5 April 2017, Antalya, Turkey. (Sözlü Bildiri)
6. Tanriseven, M., Çınar, A. and Ayas, F. 2017. Chemical Composition of the *Thymus sipyleus* Boiss. subsp. *rosulans* (Borbas) Jalas Essential Oil from Turkey. Abstract book p174. International Symposium on Biodiversity and Edible Wild Species. 3-5 April 2017, Antalya, Turkey. (Poster).
7. Tanriseven, M., Çınar, A., Ayas, F. and Yıldırım, K. 2017. Screening Antibacterial Activity of *Thymus sipyleus* Boiss. subsp. *rosulans* (Borbas) Jalas Essential Oil Against Human Pathogens. Abstract book p175. International Symposium on Biodiversity and Edible Wild Species. 3-5 April 2017, Antalya, Turkey. (Poster).
8. Çınar, N., Uysal, F., Ayas, F., Toker, R. and Karatekin, N. 2017. Fruits Features in Western Mediterranean Region Hawthorn (*Crataegus* spp). Abstract book p273. International Symposium on Biodiversity and Edible Wild Species. 3-5 April 2017, Antalya, Turkey. (Poster).
9. Ayas F., Karaoğlu M. and İnan M. 2016. Metabolic Engineering of *Pichia pastoris* for Lactic Acid Production. Pichia 2016 Protein Expression Conference. Abstract book p52. 3-6 April, Antalya, Turkey. (Poster).
10. Tuğrul Ay S., Çınar A., Ayas F., Uçurum Ö., Tokat E., Güzelsoy N. and Özkan İ. 2015. *Gypsophyla arrostii* and *Ferulago trachycarpa* Species from Medicinal Foods in Mediterranean Region of "Mainstreaming biodiversity conservation and sustainable use for improved human nutrition and wellbeing" Project. 19. International Conference "Functional and Medical Foods, Bioactive Compounds and Biomarkers: Longevity and Quality of Life" Kobe/Japan, 17-18 November, (Poster).
11. Ayas, F., Tanriseven M., Vuran F.A. 2015. Antibacterial Activity and Essential Oil Composition of the *Achillea wilhelmsii* C. Koch, from Turkey. 11th International Symposium on the Natural Compounds. Book of Abstracts p196. 1-4 October 2015, Antalya, Turkey. (Poster).
12. Tanriseven M., Ayas, F., Çınar, A. 2015. Chemical Composition of the *T. Cherlerioides* var. *İsauricus* Jalas Essential Oil, from Turkey. 11th International Symposium on the Natural Compounds. Book of Abstracts p195. 1-4 October 2015, Antalya, Turkey. (Poster).

13. Tuğrul Ay, S., Temirkaynak, M., Çınar, O., Ayas, F., 2014. Essential Oil Content and Composition of Mountain Tea (*Sideritis congesta* and *Sideritis perfoliata*) Species Grown in Native And Field Conditions. 29th International Horticultural Congress, 17-22 August, Avustralya/ Brisbane, (Sözlü Bildiri).
14. Çınar, O., Demiray, K., Ayas, F. 2013. Analyses of essential oil components of *Teucrium chamaedrys*, *Achillea wilhelmsii* C. Koch and *Ballota nigra* using GC-MS. First Mediterranean Symposium on Medicinal and Aromatic Plants. April 17-20 2013, Gazimagosa, KKTC (Poster).

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan bildiriler

1. Çınar N., Ayas F., Yeğın A., N., Toker R. ve Uysal F. 2016. Batı Akdeniz Bölgesi *Crataegus* (Alıç) Taksonlarında Fenolik/ Flavonoid Madde Miktarları, Antioksidan ve Antimikrobiyal Aktivite Değerleri, III. Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Sempozyumu, Özet Kitabı, sayfa: 48, 4-6 Ekim 2016, Spice Hotel Belek - Antalya. (Sözlü Bildiri)
2. Vuran F.A., Ayas F. ve Yüceol F. 2016. Anadolu'da Doğal Olarak Yetişen *Ricinus communis* L. (Hintyağı) Bitkisine Ait Meyve ve Tohumların Yağ İçerikleri Yönünden İncelenmesi. III. Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Sempozyumu, Özet Kitabı, sayfa: 132, 4-6 Ekim 2016, Spice Hotel Belek - Antalya. (Poster)
3. Ayas F., Vuran F.A. ve Yüceol F. 2016. *Amorpha fruticosa* L. (Yalancı Çivit) Bitkisi Meyvesinde Yağ Asitleri Bileşimi ve Uçucu Yağ Bileşenleri. III. Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Sempozyumu, Özet Kitabı, sayfa: 133, 4-6 Ekim 2016, Spice Hotel Belek - Antalya. (Poster)
4. Tanriseven M., Ayas F. ve Çınar A. 2016. *Origanum vulgare* subs. hirtum Uçucu Yağının Bileşenlerinin ve Antibakteriyel Aktivitesinin İncelenmesi. III. Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Sempozyumu, Özet Kitabı, sayfa: 135, 4-6 Ekim 2016, Spice Hotel Belek - Antalya. (Poster)
5. Tanriseven M., Ayas F. ve Çınar A. 2016. *Sideritis argyrea* Uçucu Yağ ve Ekstraktının Antimikrobiyal Aktivitesinin İncelenmesi. III. Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Sempozyumu, Özet Kitabı, sayfa: 136, 4-6 Ekim 2016, Spice Hotel Belek - Antalya. (Poster)
6. Tanriseven M. ve Ayas F. 2016. *Pelargonium graveolens* Uçucu Yağ ve Ekstraktının Antibakteriyel Aktivitesinin İncelenmesi. III. Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Sempozyumu, Özet Kitabı, sayfa: 137, 4-6 Ekim 2016, Spice Hotel Belek - Antalya. (Poster)
7. Çınar N., Ayas F., Arı N., Uysal F., Toker R., 2015. Batı Akdeniz Bölgesi'nde Yayılış Gösteren Alıç (*Crataegus* spp.) Taksonlarının Lokasyon ve Toprak Özellikleri, XII. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi, Bildiri Özetleri Kitabı, sayfa: 379, 14-17 Eylül 2015, Muğla. (Poster)
8. Yıldız Turgut, D., Ayas, F., Çınar, O., 2014. Domatesin Geleneksel Yöntemle Reçele İşlenmesi ve Bazı Kimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi. 4. Geleneksel Gıdalar Sempozyumu-Adana 17-19 Nisan. (Poster)

9. Çınar, N., Uysal, F., Toker, R., Ayas, F., 2014. Batı Akdeniz Florası Alıç (*Crataegus*) Türleri. Özet kitabı syf. 391. 22. Ulusal Biyoloji Kongresi, Eskişehir. (Poster)
10. Çınar, N., Göktürk R.S., Uysal, F., Ayas, F., Toker, R., 2014. Antalya Florası'ndan Nadir Bir Tür: Geyik Elması (*Eriolobus trilobatus* (Labill. ex Poiret) M. Roem) Özet kitabı syf. 601. 22. Ulusal Biyoloji Kongresi, Eskişehir. (Poster)
11. Vuran, F. A., Ayas, F., 2014. Bazı Turunçgil Çeşitlerine Ait Çiçeklerin Uçucu Yağ Bileşenlerinin Belirlenmesi. Bildiri kitabı syf. 318. II. Tıbbi Ve Aromatik Bitkiler Sempozyumu-Yalova 23-25 Eylül. (Poster)
12. Çınar, O., Ayas, F., Yüksel, K., 2014. Gölgede Ve Fırında Kurutmanın *Lavandula angustifolia* Bitkisinin Uçucu Yağ Oranı Ve Uçucu Yağ Bileşimine Etkisinin İncelenmesi. Bildiri kitabı syf. 488. II. Tıbbi Ve Aromatik Bitkiler Sempozyumu-Yalova 23-25 Eylül. (Poster)
13. Ayas, F., Toker, R., Çınar, N., Uysal, F., 2014. Alıç (*Crataegus orientalis*) Yaprığında Farklı Ekstraksiyon Uygulamalarının Antioksidan Aktivite, Toplam Fenolik Madde ve Flavonoid Miktarları Üzerine Etkileri. Bildiri kitabı syf. 666-671. II. Tıbbi Ve Aromatik Bitkiler Sempozyumu-Yalova 23-25 Eylül. (Poster)
14. Tuğrul Ay, S., Çınar, O., Ayas, F., 2014. Antalya Florasında Doğadan Toplanan *Sideritis lycia* Türünün Kalite Özelliklerinin Belirlenmesi. Özet kitabı syf. 175. II. Tıbbi Ve Aromatik Bitkiler Sempozyumu-Yalova 23-25 Eylül. (Poster)
15. Tuğrul Ay, S., Çınar, O., Demiray, K., Ayas, F. 2012. Antalya florasında doğadan toplanan *Sideritis congesta* türünün kalite özelliklerinin belirlenmesi. Bildiri kitabı syf. 370-373. Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Sempozyumu 13-15 Eylül 2012 Tokat. (Poster)
16. Tuğrul Ay, S., Çınar, O., Demiray, K., Ayas, F. 2012. Antalya florasında doğadan toplanan *Dorystoechas hastata* türünün kalite özelliklerinin belirlenmesi. Bildiri kitabı syf. 374-377. Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Sempozyumu 13-15 Eylül 2012 Tokat. (Poster)
17. Tuğrul Ay, S., Tanriseven, M., Çınar, O., Demiray, K., Ayas, F. 2012. Antalya florasında doğadan toplanan ve kültüre alınan *Sideritis stricta* türünün kalite özelliklerinin belirlenmesi. Bildiri kitabı syf. 260-264. Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Sempozyumu 13-15 Eylül 2012 Tokat. (Poster)

Diğer Yayınlar

1. Ayas, F. 2016. Turunçgil Çeşitleri Ve Kalite Parametreleri. TarımTürk Kasım-Aralık 2016 Sayı:62 syf 48-52
2. Ayas, F. 2016. Sebze Ürünlerinin İşlenmesi ve Değerlendirilmesi. Çitçi ve Köy Dünyası Dergisi, TZOB yayınları, Aralık 2015, basım tarihi: 20.01.2016 syf 56-57.
3. Ayas, F. 2013. Besin değeri ve tıbbi özellikleri bakımından turunçgiller. Türktarım Dergisi Ocak-Şubat 2013, syf 29-31.