

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



Pichia pastoris'te REKOMBİNANT BAKTERİYEL ALFA AMİLAZ ÜRETİMİ

Şeyda GÜLLÜ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ŞUBAT 2020

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



Pichia pastoris'te REKOMBİNANT BAKTERİYEL ALFA AMİLAZ ÜRETİMİ

Şeyda GÜLLÜ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ŞUBAT 2020

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Pichia pastoris*'te REKOMBİNANT BAKTERİYEL ALFA AMİLAZ ÜRETİMİ**

Şeyda GÜLLÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez
Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından
yüksek lisans tez projesi olarak FYL-2019-4327 nolu proje ile desteklenmiştir.

ŞUBAT 2020

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Pichia pastoris'te REKOMBİNANT BAKTERİYEL ALFA AMİLAZ ÜRETİMİ

Şeyda GÜLLÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 03/02/2020 tarihinde jüri tarafından Oybirliği / ~~Oyçokluğu~~ ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mehmet İNAN (Danışman)

Doç. Dr. İrfan TURHAN

Dr. Öğr. Üyesi Hatice Reyhan ÖZİYCI



ÖZET

Pichia pastoris'te REKOMBİNANT BAKTERİYEL ALFA AMİLAZ ÜRETİMİ

Şeyda GÜLLÜ

Yüksek Lisans Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mehmet İNAN

Şubat 2020; 84 sayfa

Endüstriyel amilazların en önemli ve sık kullanılan formlarından biri olan α -amilazlar; gıda, ilaç, tekstil, deterjan, biyoyakıt üretimi ve kirli suların arıtılması gibi birçok alanda tercih edilen bir biyokatalizördür. α -amilazlar (α -1,4-glukan-glukanohidrolaz, EC 3.2.1.1), nişasta molekülündeki α -(1,4)-glikozidik bağlarının iç kısımlarına etki ederek nişastanın hidrolizini katalizler. Bunun sonucunda α -amilazlar; glikoz, maltoz, maltotrioz ve α -limit dekstrin gibi; α -konformasyonuna sahip monomerleri ve farklı uzunluktaki polimerleri oluştururlar. α -amilazlar birçok bitki, hayvan, bakteri ve mantarda yaygın olarak bulunmaktadır. Ancak kullanım alanlarında duyulan ihtiyaca bağlı olarak; yüksek verimlilikte enzim üretimi ve endüstriyel koşullarda arzu edilen özelliklere sahip α -amilazların eldesi için rekombinant suşlar tercih edilmektedir. *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) rekombinant protein üretiminde sıklıkla kullanılan metilotrofik bir mayadır. *P. pastoris* birçok promotora sahip olmasına rağmen, etanol metabolizmasında sorumlu olan *ADH2* (*alkol dehidrogenaz*) promotörü, yüksek ekspresyon seviyesi nedeniyle dikkat çekmektedir.

Bu çalışmada, *Bacillus subtilis* PY22 α -amilaz geni (*AmyE*); tam uzunluktaki ve olgun formunu kodlayan dizinin, sentetik *ADH2* (*ADH2SNT5*) promotörünü içeren ekspresyon vektörüne ligasyonu gerçekleştirilmiş ve *P. pastoris* GS115 suşuna klonlanmıştır. Elde edilen klonlardan, gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonları (GT-PZR) analizi ile tek kopya olduğu belirlenen; *P. pastoris* GS115-p*ADH2SNT5* α - α -Amilaz-Full Length (FL) ve *P. pastoris* GS115-p*ADH2SNT5* α - α -Amilaz-Mature (MF) üretim klonları olarak seçilmiştir. FL ve MF klonları, engelli erlen, 96 saat boyunca etanol ile indüklenerek rekombinant protein üretimi gerçekleştirilmiştir. FL ve MF klonunun en yüksek α -amilaz aktiviteleri sırasıyla 74.2 ± 0.94 U/ml ve 215 ± 3.18 U/ml olarak hesaplanmıştır. FL ve MF klonlarının üretimi arasında yaklaşık 3 kat fark olması nedeni ile büyük ölçekli üretim için uygun olan klon MF klonu olarak seçilmiştir.

MF klonu, 5 L hacimli biyoreaktörde, 28°C, pH 6.0 ve normoksik koşullarda (çözünür oksijen oranı %20), sabit μ (μ : 0.028 sa^{-1}) stratejisine uygun şekilde etanol ile indüklenerek 90 saat süresince α -amilaz üretimi gerçekleştirilmiştir. MF klonunun büyük ölçekli üretimi sonucunda α -amilaz enzimi zamana bağlı olarak artış göstermiş ve en yüksek α -amilaz aktivitesi 90. saatte 2219 ± 52.18 U/ml (1403 U/mg) olarak hesaplanmıştır. Engelli erlen ile biyoreaktör üretimi karşılaştırıldığında α -amilaz enziminin yaklaşık 10 kat arttığı gözlenmiştir.

Rekombinant α -amilaz enziminin karakterizasyonu gerçekleştirilmiş ve SDS-PAGE analizi sonucu proteinin moleküler ağırlığının yaklaşık 80 kDa boyutlarında olduğu saptanmıştır. Enzimin optimum çalışma koşulları 60°C sıcaklık ve pH 7.0 olarak

belirlenmiştir. α -amilazın, 1 saat süresince farklı sıcaklıklarda inkübe edilmesi sonucunda, 50°C’de %81 ve 60°C’de %65 aktivitenin korunduğu tespit edilmiştir. Enzim aktivitesi 1 saat sonunda pH 6.0-7.5 değerleri arasında %80’nin üzerinde stabil kalmıştır. 10 mM konsantrasyonundaki Ca^{2+} ve Mg^{2+} iyonları enzim aktivitesini artırırken, aynı konsantrasyondaki Fe^{2+} , Zn^{2+} ve Cu^{2+} iyonları aktiviteyi düşürmüştür.

Bu çalışma sonucunda, rekombinant bakteriyel kaynaklı α -amilaz enziminin, *P. pastoris* ekspresyon sisteminde güçlü ve alternatif olarak kullanılabilen *ADH2* promotorunun kontrolünde, büyük ölçekli üretimde, başarıyla ifade edildiği saptanmıştır.

ANAHTAR KELİMELEER: α -Amilaz, Sentetik *ADH2* promotoru, *Pichia pastoris*, Rekombinant protein üretimi

JÜRİ: Prof. Dr. Mehmet İNAN

Doç. Dr. İrfan TURHAN

Dr. Öğr. Üyesi Hatice Reyhan ÖZİYCI

ABSTRACT

PRODUCTION OF RECOMBINANT BACTERIAL ALPHA AMYLASE IN *Pichia pastoris*

Seyda GULLU

MSc Thesis in Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet INAN

February 2020; 84 pages

α -amylase which is one of the most important and commonly used forms of industrial amylases, is a biocatalyst preferred in many fields such as food, pharmaceutical, textile, detergent, biofuel production and treatment of contaminated water. α -amylases (α -1,4-D-glucan glucanohydrolase, EC 3.2.1.1), catalyze the hydrolysis of starch by acting on the inner parts of α -(1,4)-glucosidic bonds in the starch molecule. As a result, α -amylases create of monomers and polymers of different lengths with α -conformation such as glucose, maltose, maltotriose and α -limit dextrins. α -amylases are commonly found in many plants, animals, bacteria and fungi. However, depending on the need in applications, recombinant strains are preferred for the production of high efficiency enzymes and to obtained of α -amylases having desirable properties in industrial conditions. *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) is a methylotrophic yeast which is used in commonly recombinant protein production. Despite *P. pastoris* has several promoters, *ADH2* (*alcohol dehydrogenase*) promoter which is responsible for ethanol metabolism is remarkable because of high expression level.

In this study, *Bacillus subtilis* PY22 α -amylase gene (*AmyE*); the sequence encoding the full-length and mature form was ligated into the expression vector containing the synthetic *ADH2* (*ADH2SNT5*) promoter and was cloned to *P. pastoris* GS115 strain. The obtained clones were selected *P. pastoris* GS115-pADH2SNT5 α -Amylase-Full Length (FL) and *P. pastoris* GS115-pADH2SNT5 α -Amylase-Mature (MF) production clones which were determined single copy by Real-Time Polymerase Chain Reactions (RT-PCR) analysis. This clones (FL and MF) were produced recombinant protein by inducing with ethanol during 96 hours in shake flasks. The highest α -amylase activities of FL clone and MF clone are 74.2 ± 0.94 U/ml and 215 ± 3.18 U/ml, respectively. Due to approximately 3-fold difference between the production of FL and MF clones, the MF clone was chosen for large scale production.

The MF clone was induced with ethanol according to the constant μ (μ : 0.028 sa^{-1}) strategy, at 28°C , pH 6.0 and normoxic conditions (dissolved oxygen %20), in 5 L volume bioreactor and α -amylase production was carried out during 90 hours. As a result of the large scale production of MF clone, α -amylase enzyme was increased in time and the highest α -amylase activity (90th hour) was calculated 2219 ± 52.18 U/ml (1403 U/mg). When the production of bioreactor and shake flask were compared, it was observed that α -amylase enzyme increased approximately 10 times.

The characterization of the recombinant α -amylase enzyme was carried out and according to SDS-PAGE analysis, the molecular weight of the protein was detected approximately 80 kDa. The optimum working conditions of the enzyme were determined temperature of 60°C and pH 7.0. Consequently, incubation of the α -amylase at different temperatures for a hour, it was found that 80% and 65% activity was maintained at 50°C and 60°C, respectively. The enzyme activity was stable above 80% at pH 6.0-7.5 during a hour. The α -amylase activity was increased by Ca^{2+} and Mg^{2+} ions at 10 mM concentration but it was decreased by Fe^{2+} , Zn^{2+} and Cu^{2+} ions at the same concentration.

As a result of this study, it was observed that recombinant bacterial α -amylase enzyme was successfully expressed in large scale production under the control of *ADH2* promoter, which is strong and can used as alternative in *P. pastoris* expression system.

KEYWORDS: α -Amylase, Synthetic *ADH2* promoter, *Pichia pastoris*, Recombinant protein production

COMMITTEE: Prof. Dr. Mehmet INAN

Assoc. Prof. Dr. Irfan TURHAN

Assist. Prof. Dr. Hatice Reyhan ÖZİYCI

ÖNSÖZ

Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji alanı benim her zaman ilgimi çeken ve üzerinde araştırmalar yapıp çalışmak istediğim bir alan olmuştur. Bu nedenle Gıda Mühendisliği okumama rağmen kendimi bu alanda geliştirmeme destek olan, alanında oldukça geniş bilgi ve tecrübe sahibi danışman hocam sayın Prof. Dr. Mehmet İNAN'la çalışmak benim için oldukça büyük bir şanstı. Laboratuvar cihaz ekipmanları ve malzemeleri açısından uygun bir çalışma ortamı sunduğu, tecrübe ve bilgi birikimini paylaşarak bu alanda bana yol gösterdiği için kendisine çok teşekkür ederim.

Değerli jüri üyelerim sayın Doç. Dr. İrfan TURHAN ve sayın Dr. Öğr. Üyesi Hatice Reyhan ÖZİYCI hocalarıma tezime zaman ayırarak inceledikleri ve katkı sağladıkları için çok teşekkür ederim.

Bu alanda çalışmaya başladığım ilk zamandan itibaren tüm sorularıma bıkmadan yanıt veren, karşılaştığım sorunlarda yardımcı olan, tezimi fikir ve önerileri ile destekleyen Gürkan YILMAZ'a, tüm yardımlarından dolayı sayın Dr. Öğr. Üyesi Barçın KARAKAŞ BUDAK'a, Arş. Gör. Fatma ERSÖZ'e, Dr. Semiramis YILMAZ'a, Uzm. Dr. Aysun ÖZÇELİK'e ve tezimin tüm sürecinde bana destek olan canım ekip arkadaşlarım Merve HADİMİOĞLU'na ve Özgül GÜZEL'e çok teşekkür ederim.

Lisans hayatımdan beri yanıma kar kalmış diyebildiğim, destekleriyle bana güç veren canım dostlarım Uğur Kanuni KESKİN'e, Gülsüm ÖZ'e, Gamze POLAT'a ve Deniz KARADAĞ'a çok teşekkür ederim.

Benden bir an olsun desteklerini esirgemeyen, iyi ya da kötü fark etmeksizin her anımda kendimi kanatlarının altında güvende hissedebildiğim, yeri geldiğinde dostum, sırdaşım, bu hayattaki en büyük şansım olan canım annem Ferayya GÜLLÜ'ye, canım babam Ali GÜLLÜ'ye ve biricik dayım Oğuz BAHCIVAN'a sonsuz teşekkür ederim.

Projeye verdiği destekten dolayı Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Koordinasyon Birimi'ne ve yüksek lisans tez dönemim boyunca 2210-C Yurt İçi Öncelikli Alanlar Yüksek Lisans 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	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI	3
2.1. Substrat Olarak Nişasta	3
2.2. Amilaz Grubu Enzimler	5
2.2.1. Amilazlar ile ilgili çalışmaların tarihsel gelişimi.....	7
2.2.2. α -Amilaz enzimi ve diğer amilazlar	7
2.2.3. α -Amilazın yapısı ve etki mekanizması.....	9
2.2.4. α -Amilaz enzimi kaynakları	11
2.2.5. α -Amilaz enziminin biyokimyasal özellikleri	11
2.2.5.1. Substrat spesifikliğı.....	11
2.2.5.2. Moleküler ağırlık	12
2.2.5.3. Sıcaklık ve pH.....	12
2.2.5.4. Metal iyonları etkisi	13
2.2.6. Endüstride α -amilaz kullanımı ve uygulama alanları	13
2.2.6.1. Gıda endüstrisi	13
2.2.6.2. Diğer endüstriler	14
2.3. Rekombinant Protein Üretiminde Konakçı Suş Olarak <i>Pichia pastoris</i> (<i>Komagataella phaffii</i>)	15
2.3.1. Yapısal ve indüklenebilir promotorlar.....	17
2.3.2. <i>ADH2</i> promotoru ve etanol metabolizmasındaki rolü	20
2.4. α -Amilaz Enzimi Üretimi ile İlgili Yapılan Çalışmalar	22
3. MATERYAL VE METOT	27
3.1. Materyal.....	27
3.1.1. Kullanılan kimyasallar ve restriksiyon enzimleri	27

3.1.2. Tampon ve stok çözeltiler.....	27
3.1.3. Gen kaynağı, konakçı suşlar ve taşıyıcı plazmidler.....	27
3.1.4. Besiyerleri, gelişim ortamları ve antibiyotikler	28
3.2. Metot	28
3.2.1. pADH2SNT5 α -Fito plazmidinin izolasyonu ve pADH2SNT5 α -Fito plazmidinden fitaz geninin düşürülmesi	28
3.2.2. Plazmid izolasyonu	28
3.2.3. Plazmid DNA'nın restriksiyon enzimleri ile kesim reaksiyonu	29
3.2.4. Agaroz jel elektroforezi	29
3.2.5. Jelden DNA parçalarının ekstraksiyonu	30
3.2.6. DNA ve plazmid konsantrasyonunun ölçülmesi	30
3.2.7. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile α -amilaz geninin eldesi	34
3.2.8. <i>E. coli</i> ve <i>P. pastoris</i> hücrelerinin kompetent hale getirilmesi.....	30
3.2.9. pADH2SNT5 α plazmid parçasının α -amilaz geni ile ligasyonu ve pADH2SNT5 α -Amilaz plazmidinin <i>E. coli</i> 'ye transformasyonu	31
3.2.10. Koloni PZR.....	32
3.2.11. <i>P. pastoris</i> GS115'e transformasyon.....	33
3.2.12. Kolonilerden ME+Nişasta agar plakalarda α -amilaz salgılanmasının lugol çözeltisi ile görüntülenmesi	33
3.2.13. Genomik DNA izolasyonu	34
3.2.14. Gen kopya sayısının belirlenmesi (gerçek zamanlı PZR).....	34
3.2.15. Engelli erlende protein üretimi	35
3.2.16. Hücre yoğunluğunun belirlenmesi.....	36
3.2.17. α -Amilaz aktivitesinin belirlenmesi.....	36
3.2.18. SDS-PAGE analizi.....	38
3.2.19. Toplam protein tayini	38
3.2.20. <i>EndoH_f</i> ile deglikozilasyon.....	39
3.2.21. Hücre bankasının hazırlanması.....	39
3.2.22. İnokulümün hazırlanması	39
3.2.23. Biyoreaktör çalışmaları ile rekombinant α -amilaz üretimi.....	40
3.2.23.1. Kesikli faz	41
3.2.23.2. Yarı-kesikli faz.....	42

3.2.24. α -Amilaz enziminin karakterizasyonu.....	43
3.2.24.1. Enzimin optimum çalıştığı pH'nın ve pH stabilitesinin belirlenmesi.....	43
3.2.24.2. Enzimin optimum çalıştığı sıcaklığın ve sıcaklık stabilitesinin belirlenmesi.....	44
3.2.24.3. Metal iyonlarının enzim aktivitesine etkisinin belirlenmesi.....	44
4. BULGULAR.....	45
4.1. pADH2SNT5 α -Fito Plazmidinin İzolasyonu, Plazmidin Doğrulanması ve pADH2SNT5 α Plazmid Parçasının Eldesi.....	45
4.2. α -Amilaz Geninin PZR ile Çoğaltılması.....	45
4.3. pADH2SNT5 α Vektörünün α -Amilaz Geni ile Ligasyonu ve pADH2SNT5 α - α -Amilaz Plazmidinin <i>E. coli</i> 'ye Transformasyonu.....	46
4.4. α -Amilaz Enzimi Ekspresyonunda Kullanılan Plazmidlerin Oluşturulması.....	48
4.5. Doğrulan Ekspresyon Vektörlerinin Lineerleştirilmesi ve <i>P. pastoris</i> GS115'e Transformasyonu.....	49
4.6. Seçilen Klonların α -Amilaz Salgılama Yeteneklerinin Belirlenmesi.....	50
4.7. Gerçek Zamanlı PZR ile Seçilen Klonların Gen Kopya Sayılarının Belirlenmesi.....	50
4.8. Engelli Erlende α -Amilaz Üretimi.....	51
4.8.1. Engelli erlende etanol indükleme ile üretilen α -amilaz enziminin SDS-PAGE analizi ve aktivite sonuçları.....	52
4.8.2. Engelli erlende glikoz indükleme ile üretilen α -amilaz enziminin SDS-PAGE analizi ve aktivite sonuçları.....	55
4.9. α -Amilaz Enziminin <i>EndoH_f</i> ile Deglikozilasyonu.....	56
4.10. Rekombinant α -Amilaz Enziminin Biyoreaktörde Üretimi.....	57
4.10.1. Fermentasyon prosesinin aşamaları.....	57
4.10.2. Biyoreaktörde üretilen α -amilaz enziminin SDS-PAGE analizi, toplam protein miktarı ve aktivite sonuçları.....	59
4.11. α -Amilaz Enziminin Karakterizasyonu.....	61
4.11.1. Enzimin optimum çalıştığı pH'nın ve pH stabilitesinin belirlenmesi.....	61

4.11.2. Enzimin optimum çalıştığı sıcaklığın ve sıcaklık stabilitesinin belirlenmesi.....	62
4.11.3. Metal iyonlarının enzim aktivitesine etkisinin belirlenmesi.....	63
5. TARTIŞMA	65
6. SONUÇLAR	69
7. KAYNAKLAR	71
8. EKLER.....	80
ÖZGEÇMİŞ	



AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*Pichia pastoris*'te Rekombinant Bakteriyel Alfa Amilaz 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.

03/02/2020

Şeyda GÜLLÜ

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

a	: Ağırlık
bç	: Baz çifti
dk	: Dakika
g	: Gram
xg	: Göreceli santrifüj kuvveti
h	: Hacim
kDa	: Kilo dalton
l	: Litre
m	: Mili, Metre
M	: Molar
n	: Nano (10^{-9})
OD	: Optik yoğunluk
rpm	: Devir/dakika
sa	: Saat
s	: Saniye
T _m	: Çözülme sıcaklığı
U	: Ünite
V	: Volt
μ	: Mikro (10^{-6}), spesifik gelişim hızı (sa^{-1})

Tezde ondalık yazım ayırıcı olarak nokta kullanılmıştır (ör: 21.01).

Kısaltmalar

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
BSA	: Bovine serum albümin

BMGY	: Tamponlanmış kompleks gliserol besiyeri
BMEY	: Tamponlanmış kompleks etanol besiyeri
ÇO	: Çözünmüş oksijen
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DNSA	: Dinitro salisilik Asit
DTT	: Dithiothreitol
LB	: Luria-Bertani besiyeri
LiAc	: Lityum asetat
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
TAE	: Tris-asetat-EDTA
TGS	: Tris-Glisin-EDTA
Yha	: Yaş hücre ağırlığı
YNB	: Maya azot kaynağı
YPD	: Maya özütü pepton dekstroz

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Nişasta moleküllerinin bileşenleri olan (a) amiloz ve (b) amilopektinin kimyasal yapıları	4
Şekil 2.2. Elektron mikroskobu ile görüntülenmiş (a) patates nişastası; (b) mısır nişastası; (c) buğday nişastası ve (d) pirinç nişastası granül yapıları	4
Şekil 2.3. Nişasta granülünün yapısı.....	5
Şekil 2.4. Nişastanın enzimatik parçalanmasında görev alan çeşitli enzimler ve açığa çıkardıkları ürünler	8
Şekil 2.5. <i>B. subtilis</i> 'e ait α -amilaz molekülünün (a) kristal yapısı; (b) kalsiyum iyonları ve aktif bölgesine bağlanan maltopentaoz molekülü ile oluşturduğu kompleks yapı	10
Şekil 2.6. Glikozit bağın kırılması esnasında gerçekleşen üç basamaklı katalitik mekanizma	10
Şekil 2.7. Doğal <i>ADH2-900</i> ve sentetik <i>ADH2-SNT5</i> promotorları	21
Şekil 2.8. Mayalarda etanol metabolizması	21
Şekil 3.1. Çalışmadaki fermentasyonların gerçekleştirildiği Biostat B (Sartorius Stedim Systems, Almanya) biyoreaktörü.....	40
Şekil 4.1. pADH2SNT5 α -Fito plazmidinin <i>NotI</i> ve <i>XhoI</i> restriksiyon enzimleri ile kesiminin jel görüntüsü	45
Şekil 4.2. PZR sonrası elde edilen ürünlerin jel görüntüsü.....	46
Şekil 4.3. Pozitif klonun Koloni PZR ile doğrulanması	47
Şekil 4.4. Seçilen klonların kesim reaksiyonu ile doğrulanması	47
Şekil 4.5. Ligasyon sonrası elde edilen pADH2SNT5 α - α -Amilaz-Full Length (FL) plazmidinin görüntüsü	48
Şekil 4.6. Ligasyon sonrası elde edilen pADH2SNT5 α - α -Amilaz-Mature Form (MF) plazmidinin görüntüsü	48
Şekil 4.7. Plazmidlerin <i>Kpn2I</i> restriksiyon enzimi ile lineerleştirilmesinin kontrolü	49
Şekil 4.8. YPD agarda gelişen transformant <i>P. pastoris</i> kolonilerinin görüntüsü	49
Şekil 4.9. Klonların (a) nişasta ilaveli minimal etanol plakalara ekilmesi ve (b) α -amilaz salgılanmasının lugol çözeltisi ile görüntülenmesi	50

Şekil 4.10. Engelli erlenlerde α -amilaz enziminin üretimi	52
Şekil 4.11. <i>P. pastoris</i> GS115 MF-12 klonunun farklı pH'larda α -amilaz enzimi üretiminin zamana bağlı örneklerinin SDS-PAGE görüntüsü	52
Şekil 4.12. (a) ve (b) DNSA yöntemi ile α -amilaz aktivitesi tayini	53
Şekil 4.13. <i>P. pastoris</i> GS115 MF-12 klonunun farklı pH'larda α -amilaz enzimi üretiminin zamana bağlı örneklerinin aktivite sonuçları.....	53
Şekil 4.14. FL-13 ve MF-12 klonunun pH 6.0'da α -amilaz enzimi üretiminin zamana bağlı örneklerinin SDS-PAGE görüntüsü.....	54
Şekil 4.15. FL-13 ve MF-12 klonunun pH 6.0'da α -amilaz enzimi üretiminin zamana bağlı örneklerinin aktivite sonuçları	54
Şekil 4.16. MF-12 klonunun pH 6.0'da glikoz indüklemeye ve etanol indüklemeye ile α -amilaz enzimi üretiminin zamana bağlı örneklerinin SDS-PAGE görüntüsü	55
Şekil 4.17. MF-12 klonunun pH 6.0'da glikoz indüklemeye ve etanol indüklemeye ile α -amilaz enzimi üretiminin zamana bağlı örneklerinin aktivite sonuçları.....	56
Şekil 4.18. MF-12 klonunun α -amilaz enzimi üretimi 96. saat örneği ve <i>EndoH_f</i> enzimi ile muamele edilmiş aynı örneğin SDS-PAGE görüntüsü	56
Şekil 4.19. Fermentasyon prosesi	58
Şekil 4.20. Biyoreaktör koşullarında sabit- μ stratejisine göre gerçekleştirilen yarı-kesikli faz esnasında belirlenen biyokütle miktarı	59
Şekil 4.21. Biyoreaktör koşullarında zamana bağlı alınan örneklerin SDS-PAGE görüntüsü.....	59
Şekil 4.22. Biyoreaktör koşullarında zamana bağlı alınan örneklerin α -amilaz aktivitesi	60
Şekil 4.23. Biyoreaktör koşullarında zamana bağlı alınan örneklerin toplam protein miktarı.....	60
Şekil 4.24. α -amilaz enziminin 50°C'de farklı pH'larda gösterdiği aktivite değerleri	61
Şekil 4.25. α -amilaz enziminin 50°C'de farklı pH'larda gösterdiği kararlılığın aktivite değerleri.....	62
Şekil 4.26. α -amilaz enziminin pH 6.9'da farklı sıcaklıklarda gösterdiği aktivite değerleri.....	62
Şekil 4.27. α -amilaz enziminin pH 6.9'da farklı sıcaklıklarda gösterdiği kararlılığın aktivite değerleri.....	63

Şekil 4.28. α -amilaz enziminin pH 6.9 ve 50°C sıcaklıkta farklı konsantrasyonlardaki metal iyonlarında gösterdiği aktivite değerleri 64



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. GH13 ailesi enzimlerinden bazıları	6
Çizelge 2.2. Mikrobiyal kaynaklı α -amilazların özellikleri	13
Çizelge 2.3. <i>P. pastoris</i> promotorları	19
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan suşlar	27
Çizelge 3.2. Plazmid DNA'nın restriksiyon enzimleri ile kesim reaksiyonu	29
Çizelge 3.3. PZR'de kullanılan primerler	30
Çizelge 3.4. KOD-PZR reaksiyon karışımının hazırlanması	31
Çizelge 3.5. PZR ısı döngü programı için süre ve sıcaklık koşulları	31
Çizelge 3.6. SYBR Green karışımının hazırlanması	35
Çizelge 3.7. Gerçek zamanlı PZR programı için süre ve sıcaklık koşulları	35
Çizelge 3.8. DNSA yönteminde kullanılan çözeltiler ve hazırlanışı	37
Çizelge 3.9. DNSA yönteminin aşamaları ve kullanılan bileşen miktarları	37
Çizelge 3.10. <i>EndoH_f</i> enzimi ile deglikozilasyonun aşamaları	39
Çizelge 3.11. BSM tuzunun içeriği	41
Çizelge 3.12. PTM1 tuzunun içeriği	42
Çizelge 3.13. Zamana karşı etanol besleme profili	43
Çizelge 4.1. Klonların Gerçek Zamanlı PZR ile belirlenen gen kopya sayıları	51

1. GİRİŞ

Amilazlar, uluslararası enzim piyasasında en üst sıralarda (%25-33 oranında) talep gören karbonhidratazlardan biri olup bu grup içerisinde yer alan α -amilazlar en yüksek paya sahiptir (Sun vd. 2018). α -amilazlar (α -1,4-glukan-glukanohidrolaz, EC 3.2.1.1), nişasta moleküllerindeki α -1,4-D-glikozidik bağlarını, rastgele şekilde, hidroliz ederek; glikoz, maltoz, maltotrioz ve α -limit dekstrinleri oluşturan endoamilazlardır (Janeček 1994).

Endüstriyel enzimler arasında yer alan α -amilazlar; fırıncılık ürünleri, nişasta sakkarifikasyonu, kağıt, tekstil, ilaç ve biyoyakıt üretimi gibi geniş bir uygulama alanına sahip olan, en önemli biyokatalizörlerden biridir (Parashar ve Satyanarayana 2016a). α -amilaz ile nişastanın hidroliz hızı; sıcaklık, pH, substrat konsantrasyonu ve yapısı, enzim konsantrasyonu, Ca^{2+} iyonlarının varlığı ve diğer stabilize edici ajanlar gibi birçok koşula bağlıdır. Bu nedenle kullanım alanına uygun özelliğe sahip α -amilazlar tercih edilmektedir (Sivaramakrishnan vd. 2006). α -amilazların karakteristik özellikleri (moleküler ağırlıkları, optimum çalışma sıcaklığı ve pH'sı vb.) izole edildiği kaynağa göre oldukça farklılık göstermektedir (Sharma ve Satyanarayana 2013).

Bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalardan izole edilen α -amilazlar, kaynak yönünden oldukça geniş bir dağılım göstermektedir. Ancak ürün kararlılığı, yığın (bulk) üretimin uygun maliyetli oluşu, üretim proseslerinin modifikasyonları ve optimizasyonunun kolaylığı gibi avantajlar nedeniyle endüstriyel üretim için mikrobiyal kaynaklara olan ilgi artmaktadır (Burhan vd. 2003). Özellikle mantar ve bakteriyel kaynaklardan elde edilen enzimler endüstriyel alanlarda yüksek oranda kullanılmaktadır (Gupta vd. 2003). Bunun yanı sıra, gelişmekte olan kullanım alanları ve endüstriyel ihtiyaca bağlı olarak; enzim üretimi (verimi) yüksek, pH toleransı, termostabilite, Ca^{2+} iyonu bağımsızlığı (Ca^{2+} iyonuna gereksinim duymaması) gibi özelliklere sahip ve maliyet bakımından uygun α -amilazlara talebin artması nedeni ile mikroorganizmaların genetik düzeyde manipüle edilerek istenilen özelliklere sahip enzimlerin tasarlanabileceği yöntemler geliştirilmektedir (Sivaramakrishnan vd. 2006; Parashar ve Satyanarayana 2016a). Bu yöntemlerden biri olan rekombinant protein üretiminde; mayalar diğer ökaryotik ve prokaryotik ekspresyon konakçılarına kıyasla sık tercih edilen konakçı-vektör sistemlerinden biri haline gelmiştir (Romanos vd. 1992).

Metanolü karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabilen *P. pastoris* hem temel araştırmalar hem de endüstriyel işlemler için ekonomik, hızlı ve etkili bir ekspresyon sistemi olması ile karakterize edilen metilotrofik bir mayadır (Parashar ve Satyanarayana 2017; Zepeda vd. 2018). *P. pastoris* mayası; yüksek hücre yoğunluklarına kısa sürede ulaşabilmesi, iyi karakterize edilmiş ekspresyon vektörlerinin genetik manipülasyonun kolay olması, birçok promotora sahip olması, yabancı DNA'nın homolog rekombinasyon prosedürleri ile hücre genomuna entegre edilebilmesi, diğer konakçı ökaryotlara göre daha düşük maliyetli ve yüksek miktarda hedef protein salgılayabilmesi, ifade edilen proteinlerin translasyon sonrası modifikasyonları (sinyal dizisinin işlenmesi, disülfid köprü oluşumu, O- ve N- bağlı glikolizasyonlar vs.) gerçekleştirebilmesi gibi avantajları nedeniyle diğer ökaryotik ve prokaryotik ekspresyon konakçılarına kıyasla daha çok tercih edilmektedir (Cereghino ve Cregg 2000; Demain 2005; Zepeda vd. 2018).

P. pastoris ekspresyon sisteminde; arpa, fare, domuz, *B. amyloliquefaciens* ve *B. subtilis* gibi farklı kaynaklardan izole edilen α -amilazların üretimi gerçekleştirilmiştir (Li vd. 2011). Ancak *P. pastoris* ekspresyon sisteminde mevcut bazı darboğazların olması nedeniyle bu tıkanıklıkların elimine edilmesi ve yüksek verimli heterolog proteinlerin üretimi için; kodon optimizasyonu, sekresyonda etkili yardımcı faktörlerin birlikte transformasyonu, gen kopya sayısının artırılması, yeni promotorların keşfedilmesi veya mevcut promotorların geliştirilmesi gibi stratejiler uygulanmaktadır (Parashar ve Satyanarayana 2016b).

Bu amaçla Karaoglan vd. (2016) yaptığı bir çalışmada; *P. pastoris* mevcut promotorlarından biri olan ve etanol metabolizmasında etanolün yıkımında görev alan *ADH2* (alkol dehidrogenaz) geninin regülasyonundan sorumlu *ADH2* promotorunun, *AOX1* (alkol oksidaz) ve *GAP* (gliseraldehit tri fosfat dehidrogenaz) promotorlarına karşı verimliliğini araştırmak üzere *Aspergillus niger* kaynaklı ksilanaz genini kullanarak rekombinant protein üretimlerini karşılaştırmıştır. Fermentör ortamında uygun koşullarda 72 saat boyunca gerçekleştirilen indüksiyon fazı sonunda en yüksek ksilanaz üretiminin *ADH2* promotoru kontrolünde gerçekleştiği ve bu üretimin *AOX1* promotoruna göre 1.8 kat, *GAP* promotoruna göre 6.4 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir.

Güçlü bir ekspresyon seviyesine sahip olduğu belirlenen *ADH2* promotorunun geliştirilmesi üzerine yapılan başka bir çalışmada; *ADH2* promotorunda sondan silme analizleri gerçekleştirilerek promotor aktivitesi için gerekli en kısa DNA bölgesi tespit edilmiştir. Doğal *ADH2* olarak isimlendirilen promotor bölge üzerinde içten silme analizleri ile pozitif regülasyondan sorumlu bölgeler ve negatif regülasyondan sorumlu bölgeler saptanmıştır. Pozitif regülasyondan sorumlu bölgelerin farklı kombinasyonları ile oluşturulan sentetik promotorlardan en yüksek aktivite gösteren promotorun sentetik 5-*ADH2* (*ADH2SNT5*) promotoru olduğu belirlenmiştir (Karaoglan 2016a).

Bu tez çalışmasında, *B. subtilis* PY22 kaynaklı α -amilaz geni (*AmyE*), *P. pastoris* GS115 suşuna klonlanarak rekombinant olarak üretimi gerçekleştirilmiştir. *P. pastoris*'e entegre edilen ekspresyon vektöründe; sentetik *ADH2* (*ADH2SNT5*) promotoru, sekresyon sinyali olarak α -çiftleşme faktörü (α -pre-pro sekansı), selektif belirteç olarak zeosin antibiyotik direnç geni ve tam uzunluktaki (full lenght) veya olgun (mature) formdaki α -amilaz genini kodlayan dizi bulunmaktadır. Oluşturulan klonların, α -amilaz salgılanmasının ön denemeleri ve gerçek zamanlı PZR analizi ile tek kopya olduklarının doğrulanması sonucunda, *P. pastoris* GS115-pADH2SNT5 α - α -Amilaz-Full Lenght (9614 bp) ve *P. pastoris* GS115-pADH2SNT5 α - α -Amilaz-Mature (9491 bp) üretim klonları olarak seçilmiştir. Seçilen klonların 96 saat boyunca sürdürülen indükleme fazı sonunda aktiviteleri karşılaştırılmış ve verimliliği yüksek olan klon biyoreaktörde büyük ölçekli üretime tabi tutulmuştur. α -amilazın karakterizasyonu gerçekleştirilerek, enzimin optimum çalışma koşulları (pH ve sıcaklık) ve farklı konsantrasyonlardaki metal iyonlarının aktivite üzerindeki etkisi belirlenmiştir.

2. KAYNAK TARAMASI

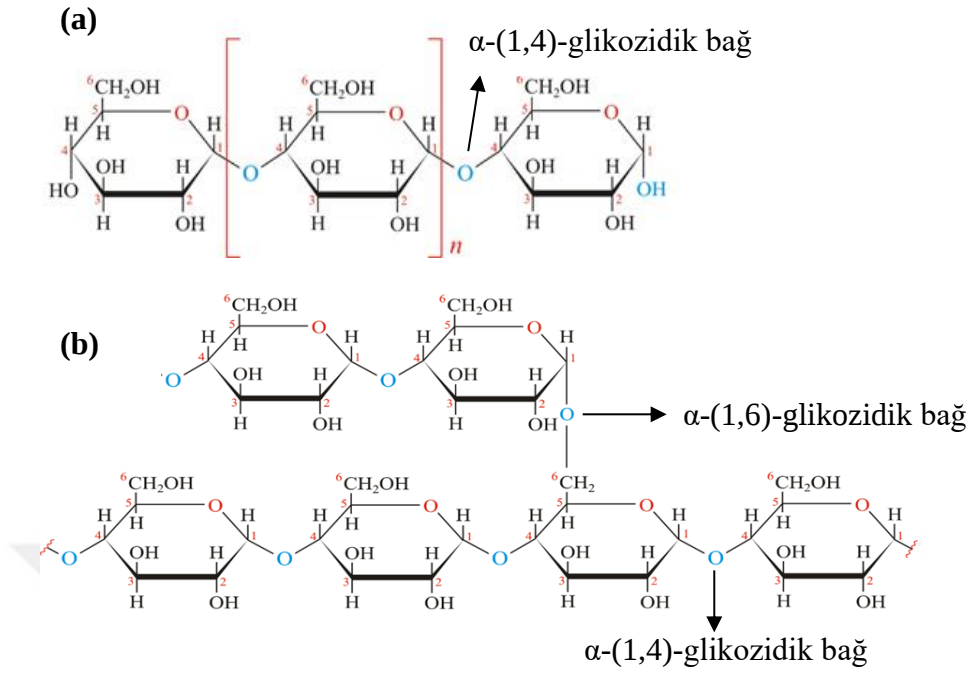
2.1. Substrat Olarak Nişasta

Nişasta, bitkiler tarafından depo maddesi olarak üretilen suda çözünmeyen granüler formdaki yapılar olup doğada en fazla bulunan polisakkaritlerden biridir. Bitkilerde, güneş enerjisinin kimyasal enerjiye dönüşmesi sonucu gerçekleşen fotosentezin temel ürünü olan nişasta; son ürün olarak yapraklarda bulunan kloroplastlarda, tohum, yumru ve kök gibi organlarda bulunan amiloplastlarda en yaygın depo şeklidir (Martin ve Smith 1995; Morell ve Myers 2005). Patates, mısır, buğday, pirinç, kassava ve tapyoka gibi besinlerde önemli oranda bulunur (Polaina ve MacCabe 2007).

İnsan beslenmesindeki rolü oldukça büyük olan nişastanın temel kaynağını kuru maddenin yaklaşık %70'ini oluşturduğu tahıllar almakta ve bu besinler toplam kalori ihtiyacının yaklaşık %80'ini karşılamaktadır (Hannah ve James 2008). Bunun yanı sıra kök ve yumrular da nişasta bakımından zengindir. Yıllık olarak; tahıllardan yaklaşık 2050 milyon ton, kök ve yumrulardan ise yaklaşık 679 milyon ton nişasta üretimi gerçekleştirilmektedir (Burrell 2003). Nişasta, biyolojik parçalanabilirlik ve işlenebilirlik özelliği sayesinde beslenmede temel olarak tüketilen bir gıda olmakla kalmayıp gıda endüstrisi dışında birçok endüstriyel alan için de hammadde olarak kullanılabilmektedir (Jobling 2004).

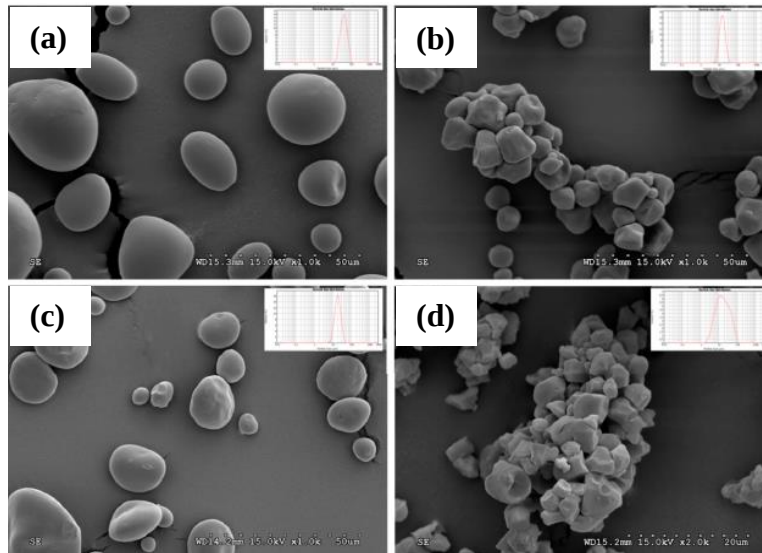
Nişastanın biyosentezi, bileşik glukanların üretimi ve granül içerisinde organize bir şekilde yerleşmelerini içermektedir. Nişasta granülünün oluşumu, bitkilerde sıralı ve üç boyutlu polisakkarit yapılarının oluşumu için basit bir model olarak görülmektedir. Bu model selüloz biyosentezi gibi diğer yüksek dereceli biyosentetik sistemlerdeki granüler yapılanmanın biyokimyasal temelini anlamak için oldukça önemlidir (Delmer ve Amor 1995).

Nişasta granülü, üç boyutlu ve kısmen kristalli bir yapıya yerleştirilmiş farklı glikoz polimerlerinden oluşur. Bu granüllerde bulunan polimerler; dallanma şekline, zincir uzunluklarına ve molekül ağırlıklarına göre amiloz ve amilopektin olmak üzere iki formda bulunur. Amiloz, glikoz birimleri arasında α -1,4-D-glikozidik bağ ile bağlanmış, molekül ağırlığı 10000 ile 60000 dalton arasında değişen lineer bir polimerdir. Amilopektin ise, glikoz birimleri arasında α -1,4 bağlarına ek olarak, α -1,6-D-glikozidik bağlar ile yan zincirler içeren, molekül ağırlığı 50000 ile 1000000 dalton arasında değişen dallanma gösteren bir polimerdir (John 1987; James ve Lee 1997; Norouzian vd. 2006). Amiloz ve amilopektinin kimyasal yapıları Şekil 2.1'de gösterilmektedir.



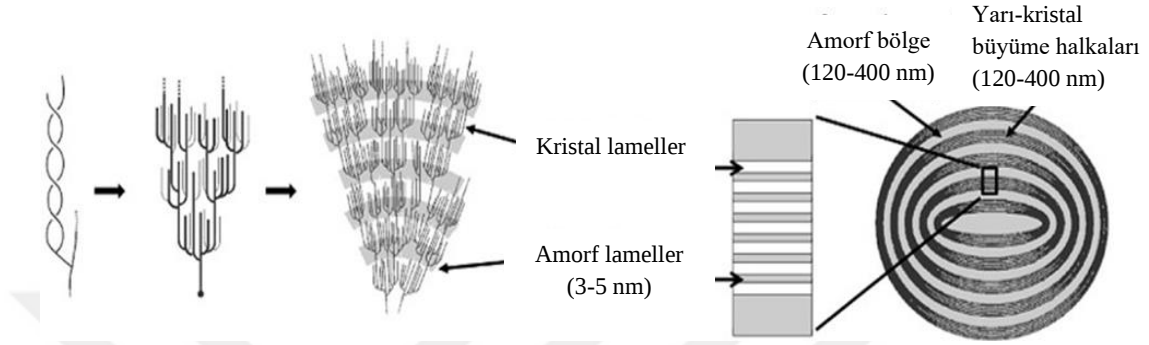
Şekil 2.1. Nişasta moleküllerinin bileşenleri olan (a) amiloz ve (b) amilopektinin kimyasal yapıları (Korma vd. 2016)

Nişastanın yapısındaki; amiloz ve amilopektin içeriği ile granüllerin şekli, yapısı ve büyüklüğü bitkinin orjinine göre değişiklik göstermektedir (Slattery vd. 2000; van der Maarel vd. 2002). Şekil 2.2’de elektron mikroskobu ile görüntülenmiş, farklı kaynaklardan elde edilen nişastaların kendilerine özgü granül morfolojileri gösterilmektedir.



Şekil 2.2. Elektron mikroskobu ile görüntülenmiş (a) patates nişastası (1000x); (b) mısır nişastası (1000x); (c) buğday nişastası (500x) ve (d) pirinç nişastası (2000x) granül yapıları (Domene-López vd. 2019)

Nişasta granülleri, birbirini takip eden yarı-kristal büyüme halkaları ve amorf bölgelerden oluşmaktadır. Yarı-kristal büyüme halkaları; yaklaşık 9-10 nm genişliğinde, dönüşümlü olarak birbirini takip eden, amorf bölge ve kristal lamellerden meydana gelmektedir. Kristal lameller, amilopektin zincirlerinin sola doğru α -helix şeklinde paketlenmesiyle oluşur. Amorf bölge ise amiloz ve kristal yapıda olmayan amilopektin polimerlerini içermektedir (Andersson 2001; Blennow vd. 2003). Şekil 2.3'te nişasta granüllerinin moleküler bazlı yapısı gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Nişasta granülünün yapısı (Coultate 2002; O'Neill ve Field 2015)

Bu yüksek dereceli, suda çözünmeyen molekül yapının sentezlenmesi ve parçalanabilmesi için spesifik enzimlere ihtiyaç duyulmaktadır (O'Neill ve Field 2015). Nişasta granülleri, su ve yüksek sıcaklığın etkisi ile değişime uğrayarak şişer ve bunun sonucunda çözünerek jelatinleşir. Jelatin haline gelen nişasta, amilazlar tarafından hidroliz edilirler (John 1987; Ratnayake ve Jackson 2008).

2.2. Amilaz Grubu Enzimler

En önemli ve en eski endüstriyel enzimlerden biri olan amilazlar; nişasta, glikojen vb. molekülleri, dekstrinler ve daha düşük sayıda glikoz ünitelerinden meydana gelen ürünlere dönüştüren enzimlerdir (Windish ve Mhatre 1965).

α -amilaz ailesi, yaklaşık 30 farklı enzim spesifikliğı içeren en büyük glikozit hidrolaz, transferaz ve izomeraz ailesidir (Henrissat 1991). Nişasta dönüştürücü bu enzimlerin çoğu, aminoasit dizilerine göre sınıflandırıldığında, glikozil hidrolaz 13 (GH13) ailesinin bir üyesidir (Reddy vd. 2003).

Çizelge 2.1. GH13 ailesi enzimlerinden bazıları (Reddy vd. 2003; Mojssov 2012)

Enzim	EC numarası	Ana substrat
Amilosükraz	EC 2.4.1.4	Sükroz
Sükroz fosforilaz	EC 2.4.1.7	Sükroz
α -1,4-glukan dallandırıcı enzim	EC 2.4.1.18	Nişasta, glikojen
Siklomaltodekstrin glukanotransferaz	EC 2.4.1.19	Nişasta
Amilomaltaz	EC 2.4.1.25	Nişasta, glikojen
α -amilaz	EC 3.2.1.1	Nişasta
α -glukozidaz	EC 3.2.1.20	Nişasta
Pullulanaz	EC 3.2.1.41	Pullulan
Siklomaltodekstrinaz	EC 3.2.1.54	Doğrusal ve siklo maltodekstrin
İzopullulanaz	EC 3.2.1.57	Pullulan
Glukan α -1,4-maltotetrahidrolaz	EC 3.2.1.60	Nişasta
İzoamilaz	EC 3.2.1.68	Amilopektin
Glukan α -1,6-glukozidaz	EC 3.2.1.70	Nişasta
Glukan α -1,4-maltohekzaozidaz	EC 3.2.1.98	Nişasta
Maltojenik α -amilaz	EC 3.2.1.133	Nişasta
Neopullulanaz	EC 3.2.1.135	Pullulan

GH13 ailesi; katalitik modülün üç boyutlu yapısının benzerliğine dayanan, klan adı verilen, daha büyük bir birime göre de sınıflandırılmıştır. Glikozidazlar ve transglikozidazlar için tanımlanan 14 klan (A-N) arasında, α -amilaz ailesi (GH13) 8. klan olan GH-H klanına aittir (MacGregor 2005). Bu kavram 1992 yılında önerilmiş olup α -amilaz ailesinin üyeleri için ortak olan özellikler tanımlanmıştır (Takata 1992).

α -amilaz grubu enzimlerin ortak özellikleri:

- α -glikozidik bağlar üzerinde etkili olmalı, α -anomerik monosakkaritler veya oligosakkaritler oluşturabilmek için α -glikozidik bağları hidrolize etmeli ya da transglikolizasyon aktivitesi göstererek glikozidik bağlar oluşturabilmelidir.
- Birincil yapılarında bulunan katalitik etki ve substrat bağlanma bölgeleri açısından dört korunmuş bölgeye sahip olmalıdır.
- Katalitik bölgede görev alan Asp, Glu ve Asp kalıntılarını içeren, $(\beta/\alpha)_8$ veya TIM fiçisi yapısında bulunmalıdır.

Aspergillus oryzae (TAKA/TAA), *Bacillus amyloliquefaciens* (BAA), *Bacillus licheniformis* (BLA), *Bacillus subtilis* (BSUA), *Pseudoalteromonas haloplanktis* (AHA), *Pyrococcus woesei* (PWA) ve *Pyrococcus furiosus* (PFA) kaynaklı amilazların yapılarının X-ışını kristalografisi analizleri ile ortak yapısal özelliklere sahip olduğu ortaya koyulmuştur (Kuriki ve Imanaka 1999; Fitter 2005).

Daha spesifik bir sınıflandırma için Oslancová vd. (2002) ve Janeček vd. (2003) GH13'teki aileleri tanımlama üzerine girişimlerde bulunmuşlardır. Stam vd. (2006), GH13 ailesini, sekans benzerliği ve filogenetik yapılandırma kriterlerine göre 35 alt aileye bölmeyi önermiştir. 2017 yılında, GH13' te 42 alt aile bulunmakta olup, bu sayı hala güncellenmektedir (Zhang vd. 2017). Janeček vd. (2014), GH ailelerinden α -amilaz aktivitesine sahip olan enzimleri; GH13-1, 5, 6, 7, 15, 24, 27, 28, 32, 36 ve 37 olarak özetlemiştir.

2.2.1. Amilazlar ile ilgili çalışmaların tarihsel gelişimi

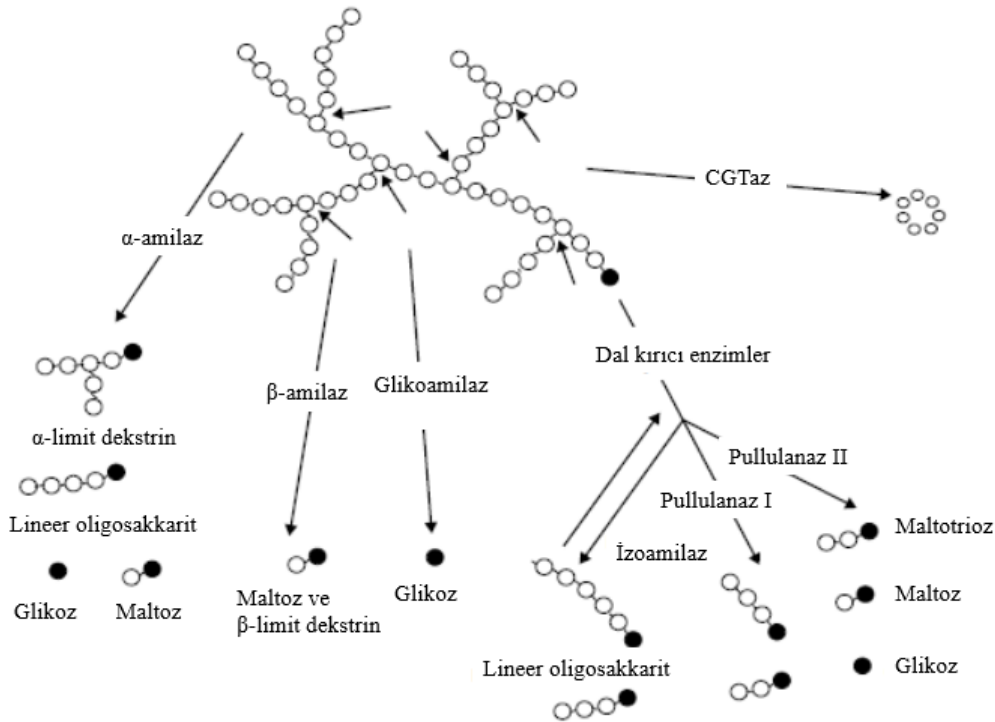
Amilazların tarihi, 1811 yılında Kirchhoff'un buğday nişastasının zamanla dekstrin ve şekere dönüştüğünü tespit etmesi sonucunda ilk nişasta indirgeyici enzimin keşfi ile başlamıştır (Gupta vd. 2003). 1833 yılında Anselme Payen ve Jean-Francois Persoz, arpadan nişastanın glikoza hidrolizinden sorumlu enzimi izole etmiş ve günümüzde amilaz olarak bilinen bu enzimler Yunanca fermentasyon anlamındaki 'diastaz' olarak isimlendirilmiştir. Bunu çeşitli sindirim amilazlarının keşfi takip etmiştir. 1890'lara gelindiğinde J. Takamine, sindirime yardımcı olarak kullanılan 'taka diastaz' olarak bilinen enzimin, *A. oryzae*'dan üretimini gerçekleştirmiş ve 1894 yılında ABD'de mikrobiyal enzim üretimi üzerine ilk patenti almıştır. Patent çalışmalarının yanı sıra Miles Laboratories şirketini kurarak, ilk endüstriyel amilaz üretimini de gerçekleştirmiştir (Neidleman 1991; Poulsen ve Bucholz 2002).

1916 yılında Stocks, çeşitli pankreatik rahatsızlıklar için kan ve idrarda bulunan amilaz aktivitesinin uygun bir test olduğunu bildirmiştir (Salt ve Schenker 1976). 1930'larda Ohlsson, nişasta sindirim enzimlerinin, malt ile reaksiyonu sonucunda elde edilen anomerik şeker tipine (α ve β) göre sınıflandırılmasını önermiştir (Gupta vd. 2003; Erenler 2009). α -amilaz enzimi ise endüstriyel boyutlarda ilk kez 1939 yılında Japonya'da *B. subtilis* suşu kullanılarak üretilmiş ve ilerleyen yıllarda da bu suşun α -amilaz enzimi üretimi için kullanımı daha geniş boyutlara ulaşmıştır. 1984 yılında fungal bir kaynaktan elde edilen amilaz enzimi, endüstriyel olarak üretilmiş ve daha sonra sindirim bozukluklarının tedavisinde ilaç olarak kullanılmıştır (Mojsov 2012). Günümüzde ise bu enzimler; gıda, fermentasyon, tekstil, ilaç sektörlerinden; kağıt, deterjan gibi endüstrilere kadar değişen uygulamalar ile büyük önem taşır hale gelmiştir (Sivaramakrishnan vd. 2006; Bhanja vd. 2007; Sindhu vd. 2017).

2.2.2. α -Amilaz enzimi ve diğer amilazlar

Nişasta üzerinde çok çeşitli enzimler etki edebilmekte ve bu enzimler etki ettikleri bağlara göre; endoamilazlar, ekzoamilazlar, dallanma kırıcı enzimler ve transferazlar olarak dört grupta incelenmektedir (Şekil 2.4) (van der Maarel vd. 2002).

- ❖ Endoamilazlar: Nişasta molekülündeki α -1,4 glikozidik bağlarını iç kısımlardan keserek hidrolize ederler ve hidroliz sonucunda farklı uzunluklarda α -anomerik ürünler oluştururlar. α -amilaz (EC 3.2.1.1), bir endoamilaz olarak bilinir (Pandey vd. 2000; Aiyer 2005).
- ❖ Ekzoamilazlar: Nişasta molekülündeki α -1,4 veya α -1,6 glikozidik bağlarını dış kısımlardan (indirgen olmayan uçtan) hidrolize ederler ve hidroliz sonucunda α veya β -anomerik ürünler oluştururlar. β -amilaz (EC 3.2.1.2) ve glukoamilaz (EC 3.2.1.3) birer ekzoamilazdır (Wong ve Robertson 2002b).
- ❖ Dal Kırıcı Enzimler: Nişasta ve/veya pullulan molekülündeki sadece α -1,6 glikozidik bağları üzerinde spesifik aktivite göstererek hidrolize etmeleri sonucu uzun, doğrusal polisakkaritler oluştururlar. Buna ek olarak; tepkime koşullarına, enzime ve substrata bağlı olarak α -1,4 bağlarını iç kısımlarından hidroliz ederek α -amilaz gibi davranabilirler. İzamilaz (EC 3.2.1.68) ve pullulanazlar (EC 3.2.1.41) dal kırıcı enzimlerdir (Kubo 1999; Aiyer 2005).
- ❖ Transferazlar: Donör moleküldeki α -1,4 glikozidik bağını ayırır ve ayrılan kısmı yeni bir glikozidik bağ oluşturmak üzere bir akseptöre transfer ederler. Amilomaltaz (EC 2.4.1.25) ve siklodekstrin glikozil transferaz (CGTaz) (EC 2.4.1.19) bu grupta yer almaktadır (van der Maarel vd. 2002).



Şekil 2.4. Nişastanın enzimatik parçalanmasında görev alan çeşitli enzimler ve açığa çıkardıkları ürünler (Bertoldo ve Antranikian 2002)

Nişastanın tamamen parçalanmasında birden fazla amilaz çeşidi görev alır. Ancak en çok talep edilen amilazlardan biri α -amilazlardır (Gupta vd. 2003).

α -amilazlar (α -1,4-glukan-glukanohidrolaz, EC 3.2.1.1): Nişasta moleküllerindeki α -1,4-D-glikozidik bağlarını iç kısımlardan, rastgele şekilde, hidroliz ederek; glikoz, maltoz, maltotrioz ve α -limit dekstrin gibi α -konformasyonuna sahip monomer ve farklı uzunluktaki polimerlerin oluşmasını sağlayan, karbonhidratazlar grubunun üyesi enzimlerdir (Wiseman 1987; Janeček 1994).

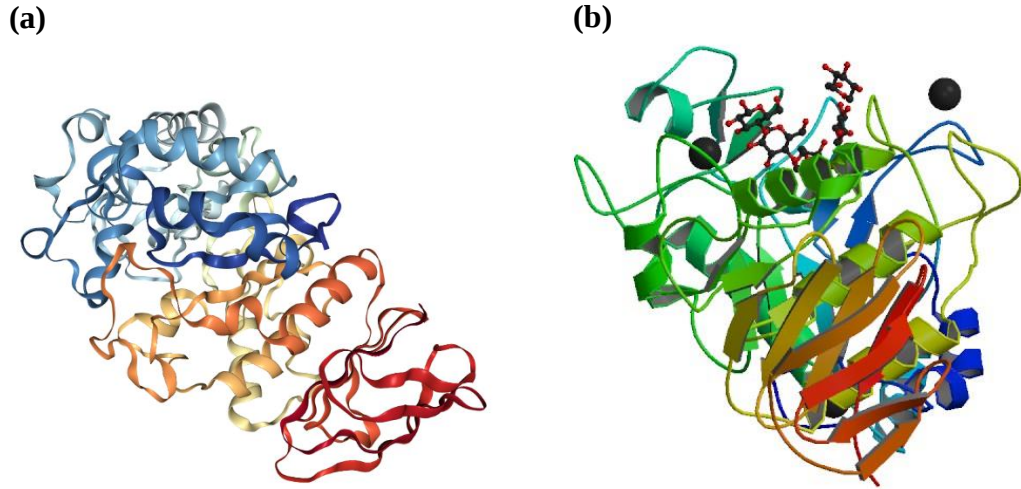
2.2.3. α -Amilazın yapısı ve etki mekanizması

TIM fiçisi veya $(\beta/\alpha)_8$, ilk olarak tavuk kası trioz fosfat izomeraz enziminde tespit edildiğinden, ismini bu enzimden alan bir yapıdır (Banner vd. 1975). 8 alternatif β -tabaka ve α -sarmalın katlanması ile meydana gelmektedir. TIM fiçisi; α -amilaz ailesi enzimlerinin tüm üyelerinde bulunan, aktif bölge ile yakından ilişkili, β 3, β 4, β 5 ve β 7 zincirlerini kapsayan dört korunmuş bölge içerir (Kuriki 2005).

1. bölge: Substratın glikoz kalıntısıyla etkileşen β 3 zincirinin C-terminal ucunda bulunan His kalıntısı,
2. bölge: Kataliz sırasında nükleofil görevi gören β 4 zincirinde yer alan Asp kalıntısı,
3. bölge: Proton alıcı/verici olarak işlev gören β 5 zincirinde bulunan Glu kalıntısı,
4. bölge: Substratın glikoz kalıntısıyla hidrojen bağı oluşturabilen β 7 zincirindeki Asp ve His kalıntısıdır.

GH13 ailesinin üyesi olan α -amilazlar, N-terminali ve C-terminali kısımları olmak üzere iki büyük bölgeden (domain) oluşur. N-terminal bölge, A ve B olarak iki alana bölünmüştür. A bölgesi (katalitik bölge), $(\beta/\alpha)_8$ veya TIM fiçisi yapısını içerir ve yüksek oranda korunur (Horvátová vd. 2001). B bölgesi, üç iplikçikli antiparalel β -tabakalı yapıdan oluşur ve TIM fiçisinin β 3 ve α 3 zincirleri arasında uzanan çıkıntılardır. Bu bölgedeki β -tabakalı yapı düzensizdir ve α -amilazlar arasında değişiklik göstermesi nedeni ile substrat spesifikliğı, Ca^{2+} iyonunun bağlanması ve termostabilite gibi özelliklerin belirlenmesinde rol oynar (Janeček vd. 1997). C bölgesi ise α -amilazların C-terminal kısmını oluşturur ve katalitik $(\beta/\alpha)_8$ fiçisini takip eden, 5-10 zincirli antiparalel β -tabakalı yapıdan meydana gelmektedir (Kuriki ve Imanaka 1999; van der Maarel vd. 2002). Tüm TIM fiçisi enzimlerine benzer şekilde, α -amilazlar da katalitik ve substrat bağlama kalıntılarını C-terminalindeki β -tabakalı iplikçiklerde ve bu iplikçiklerden uzanan ilmiklerde taşır (Svensson 1994; Ali vd. 2011). Bazı α -amilazlar ise; A, B ve C bölgelerine ek olarak C-terminalde bulunabilen D ve E bölgeleri gibi nişasta bağlama bölgesi (SBDs) olarak tanımlanan ham nişastanın bağlanmasını ve degradasyonunu kolaylaştırdığı, termostabilitede rol oynadığı bilinen, katalitik olmayan bölgeler içerirler (Iefuji vd. 1996; Mótyán vd. 2011).

Genel olarak bilinen α -amilazların çoğu A ve B bölgesi arasındaki alanda korunmuş, stabilite ve aktivite için gerekli bir Ca^{2+} iyonu içerirler (Nielsen ve Borchert 2000). Şekil 2.5'te *B. subtilis* kaynaklı α -amilaz enziminin yapısında bulunan kalsiyum iyonları ve aktif bölgesine bağlanan maltopentaoz ($\text{C}_{30}\text{H}_{52}\text{O}_{26}$) molekülü ile oluşturduğu kompleks görülmektedir.

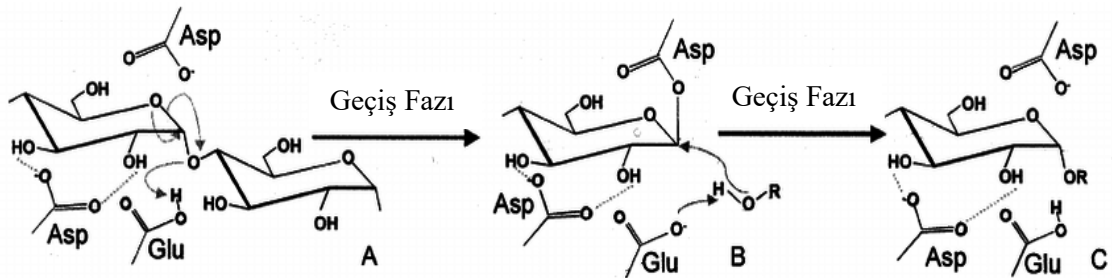


Şekil 2.5. *B. subtilis*'e ait α -amilaz molekülünün (a) kristal yapısı; (b) kalsiyum iyonları (siyah) ve aktif bölgesine bağlanan maltopentaoz molekülü (kırmızı-gri) ile oluşturduğu kompleks yapı (RCSB Protein veritabanı; Fujimoto vd. 1998)

α -amilazların katalitik mekanizması; çift yer değiştirmeli, üç basamaklı bir tepkime olarak gerçekleşmektedir (Şekil 2.6) (Nielsen vd. 1999; van der Maarel vd. 2002).

1. basamak: Glikozidik oksijenin aktif bölgede bulunan bir proton donörü (Glu261) tarafından protonlanması,
2. basamak: Bir nükleofilin (Asp231), -1 alt bölgesindeki şeker kalıntısının C1 karbonuna nükleofilik bir atakta bulunması,

3. basamak: Substratın glikan kısmı ayrıldığında; bir su molekülünün, protonunu vermiş olan Glu261 kalıntısı tarafından aktive edilmesi ve bu su molekülünün, nükleofilin oksijeni ile -1 alt bölgesindeki şeker kalıntısının C1 karbonu arasındaki kovalent bağı hidroliz etmesidir. Böylece katalitik döngü tamamlanmış olur.



Şekil 2.6. Glikozit bağı kırılması esnasında gerçekleşen üç basamaklı katalitik mekanizma (van der Maarel vd. 2002)

2.2.4. α -Amilaz enzimi kaynakları

Karbonhidrat metabolizmasında önemli rol oynayan α -amilazlar; oldukça geniş bir kaynak rezervine sahip olup bitki, hayvan ve mikroorganizmalar tarafından üretilmektedir (Sivaramakrishnan vd. 2006). Bitkisel kaynaklı α -amilazlar; arpa, pirinç ve kassava bitkilerinden izole edilebilmektedir (Polaina ve MacCabe 2007). Yapılan bir çalışmada, kassava püre atık suyunun, geniş pH ve sıcaklık aralığında aktif olan bir α -amilaz kaynağı olduğu tespit edilmiştir (Pandey vd. 2000; Oboh 2005). Hayvansal kaynaklı α -amilazlar; öküz, sığır ve domuz gibi hayvanların tükürük bezi, mide, pankreas veya karaciğerlerinden izole edilebilmektedir (Cichoke 1999). Mikrobiyal kaynaklı α -amilazlar ise birçok mantar, maya ve bakteriden izole edilebilmekte olup, *B. subtilis*, *B. stearothermophilus*, *B. licheniformis* ve *B. amyloliquefaciens* gibi *Bacillus* türü bakteriler ile *A. oryzae*, *A. niger* ve *A. awamori* gibi *Aspergillus* türü fungusların iyi birer α -amilaz üreticisi olduğu bilinmektedir (Pandey vd. 2000; Konsoula ve Liakopoulou-Kyriakides 2007).

Bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalardan elde edilen amilazlar uzun yıllar boyunca gıdalarda katkı maddesi olarak kullanılmıştır. Ancak yığın (bulk) üretimin maliyet etkinliği, ürün kararlılığı, üretim proseslerinin modifikasyonları ve optimizasyonunun kolaylığı gibi avantajlar nedeniyle endüstriyel üretim için mikrobiyal kaynaklara olan ilgi artmaktadır (Burhan vd. 2003; Rana vd. 2013).

Bunun yanı sıra, gelişmekte olan kullanım alanları ve endüstriyel ihtiyaca bağlı olarak; enzimin üretimini (verimini) artırmak, termostabilite, pH toleransı, Ca^{2+} iyonu bağımsızlığı ve ham nişasta hidrolizi etkinliği gibi özelliklere sahip α -amilazlara talebin artması nedeni ile mikroorganizmaların genetik düzeyde manipüle edilebileceği ve istenen özelliklere sahip enzimlerin tasarlanabileceği çeşitli yöntemler geliştirilmektedir (Sivaramakrishnan vd. 2006; Parashar ve Satyanarayana 2016a). Genetik mühendisliği teknikleri kullanılarak istenilen kaynaktan elde edilen α -amilaz geni; *E. coli*, *S. cerevisiae*, *B. subtilis* ve *P. pastoris* gibi konakçı suşlara transforme edilmesi ile rekombinant enzimin ekspresyonu gerçekleştirilmektedir (Lévêque vd. 2000; Knox vd. 2004; Karakas vd. 2010; Chen vd. 2015).

2.2.5. α -Amilaz enziminin biyokimyasal özellikleri

2.2.5.1. Substrat spesifikliğı

α -amilazlar; amiloz, amilopektin ve maltotrioz dahil olmak üzere diğer substratlar ile karşılaştırıldığında, nişastaya karşı yüksek spesifiklik göstermektedir (Antranikian 1992). Ancak yapılan başka bir çalışmada; çözünebilir nişasta, amiloz, amilopektin, glikojen, maltodekstrinler, α ve β siklodekstrinler denenmiş ve *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010T α -amilazı için en iyi substratın amiloz olduğu tespit edilmiştir (Aguilar vd. 2000). Elde edilen veriler α -amilazların substrat spesifikliğinin enzim kaynağına göre farklılık gösterdiğini doğrulamaktadır.

2.2.5.2. Moleküler ağırlık

Yapılan çalışmalarda α -amilazların moleküler ağırlıklarının 10-210 kDa arasında değiştiği ancak genel olarak 40 ile 70 kDa arasında dağılım gösterdiği ifade edilmiştir (Gupta vd. 2003; Sharma ve Satyanarayana 2013). *Chloroflexus aurantiacus* α -amilazının 210 kDa ile tespit edilen en yüksek moleküler ağırlığa sahip olduğu, *Bacillus caldolyticus* α -amilazının ise 10 kDa ile tespit edilen en düşük moleküler ağırlığa sahip olduğu bildirilmiştir (Grootegoed vd. 1973; Ratanakhanokchai vd. 1992).

Karbonhidrat kısımların eklenmesi (glikolizasyon) proteinin moleküler ağırlığını artıran faktörlerden biridir. *A. oryzae*, *B. stearothermophilus* ve *B. subtilis* suşlarından izole edilen α -amilazın glikoprotein yapıda olduğu tespit edilmiştir (Gupta vd. 2003). *Schwanniomyces castelii* suşundan elde edilen α -amilazda ise toplam moleküler ağırlığının %56 oranında karbonhidrat içerdiği saptanmıştır (Sills vd. 1984).

2.2.5.3. Sıcaklık ve pH

α -amilazlar enzim kaynağına göre farklılık gösteren, optimum sıcaklık ve pH değerlerine sahiptir. Optimum sıcaklık, mikroorganizmanın gelişimi ile ilişkili olup, genellikle enzimi üreten mikroorganizmaların büyüme sıcaklığından daha yüksektir. Optimum aktivite gösterdikleri sıcaklığa göre; 90-95°C termofilik, 50-70°C mezofilik ve 10-20°C soğuk-aktif olmak üzere üç grupta değerlendirilmektedir (Chen vd. 2015).

Termal stabilite α -amilazların endüstriyel kullanımı açısından önemli olmakla birlikte; Ca^{2+} iyonu, substrat ve diğer stabilizatörlerin varlığı gibi birçok faktörden etkilenmektedir. Ca^{2+} iyonunun termostabilite üzerindeki dengeleyici etkisi; protein yapısındaki Ca^{2+} iyonları tarafından hidrofobik kalıntıların tuzla çökmesi, böylece daha kompakt bir yapı oluşmasını sağlamasıdır (Goyal vd. 2005).

α -amilazların optimum pH değeri 2.0-12.0 arasında geniş bir dağılım göstermektedir (Sharma ve Satyanarayana 2013). Çoğu bakteri ve mantardan elde edilen α -amilazlar asidik ile nötr aralıkta optimum pH değerine sahiptir (Pandey vd. 2000). Ancak yapılan araştırmalar sonucunda; alkalofilik *Bacillus sp.* kaynaklı α -amilazın pH 9.0-10.0 değerleri arasında, aşırı alkalofilik *Bacillus sp.* GM8901 kaynaklı α -amilazın ise pH 11.0-12.0 değerleri arasında optimum aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Lee vd. 1994; Kim vd. 1995).

α -amilazlar genellikle 4.0-11.0 arasında değişen geniş bir pH aralığında karardır ancak dar bir aralıkta kararlılığa sahip α -amilazların da olduğu bildirilmiştir (Gupta vd. 2003). Çizelge 2.2’de farklı mikroorganizma kaynaklarından izole edilen α -amilazların optimum aktivite gösterdiği sıcaklık ve pH değerleri gösterilmektedir.

Çizelge 2.2. Mikrobiyal kaynaklı α -amilazların özellikleri (Dey vd. 2016)

Mikroorganizma	α -Amilazların Özellikleri	
	Optimum Sıcaklık (°C)	Optimum pH
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	70-80	5.0-6.0
<i>Bacillus licheniformis</i> TSI-4	70	7
<i>Pyrococcus furiosus</i>	100	5.5
<i>Thermococcus</i> (HJ21)	95	5
<i>Paecilomyces varioti</i>	60	4
<i>Geobacillus sp.</i> LH8	80	5.0-7.0
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> TSWK1-1	70	7.0
<i>Bacillus strain</i> HUTBS62	90	4.4
<i>Pyrococcus woesei</i>	100	6.5-7.5
<i>Bacillus stearothermophilus</i> US100	80	5.5
<i>Bacillus laterosporus</i>	60	7.0
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 9945a	99	6.0

2.2.5.4. Metal iyonları etkisi

α -amilazların bir çoğu metalloenzimlerdir; yapısal bütünlüklerini, stabilitelerini ve aktivitelerini korumak için Ca^{2+} gibi iyonlara ihtiyaç duymaktadırlar (Tanaka ve Hoshino 2002). Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} vb. metal iyonlarının da α -amilazların aktivitesinde etkili olduğu bilinmektedir (Pandey vd. 2000). Ca^{2+} iyonu varlığında enzim aktivitesi üzerinde göze çarpan bir etkinin olmaması enzimin Ca^{2+} iyonundan bağımsız olduğunu (Ca^{2+} iyonuna gereksinim duymaması) göstermektedir (Parashar ve Satyanarayana 2016a). Alkalifilik *Bacillus sp.* ANT-6'nın α -amilaz aktivitesi Ca^{2+} iyonu varlığında artarken, *B. thermooleovorans* NP54'ten izole edilen termostabil α -amilazın üretimi veya aktivitesi için Ca^{2+} iyonu gerekmediği rapor edilmiştir (Malhotra vd. 2000; Burhan vd. 2003).

2.2.6. Endüstride α -amilaz kullanımı ve uygulama alanları

Birçok alanda talep gören α -amilazlar, enzim satışlarında oldukça yüksek pazar payına sahip olup (küresel enzim pazarının yaklaşık %30'u) giderek artan bir önem kazanmaktadır (Sivaramakrishnan vd. 2006).

2.2.6.1. Gıda endüstrisi

Fırıncılık ürünleri, nişasta endüstrisi, içecek ve alkollü içecek endüstrisi α -amilazların sıklıkla kullanıldığı alanlardır.

1955 yılında ABD’de, 1963 yılında ise İngiltere’de GRAS (Generally Recognized As Safe) kategorisinde olduğu onaylandıktan sonra fungal α -amilazlar, ekmekte katkı maddesi olarak kullanılmaya başlanmıştır. Günümüzde, fungal kaynaklı α -amilazların yanı sıra mantar, bakteri gibi diğer mikrobiyal kaynaklar veya arpa maltından elde edilen α -amilazlar da kullanılmaktadır (Gupta vd. 2003).

Ekmek ve fırıncılık ürünlerinde yapılan α -amilaz takviyesi, uygulandığı üründe; fermentasyon oranını artırır, hamurun viskozitesini düşürür, ürün hacminde ve dokusunda iyileşmelere neden olur, hamurdaki şeker miktarını artırması nedeni ile tat, renk ve kızarma kalitesini artırır. Bunun sonucunda; daha fazla hacim, daha iyi renk ve daha yumuşak bir yapı kazandırarak lezzet ve tekstürel açıdan kaliteli ürünler üretmek amacıyla uzun yıllardır tercih edilmektedir (Van Dam ve Hille 1992). α -amilazların fırıncılık ürünlerinde kullanılmasının amaçlarından biri de, pişmiş ürünlerin raf ömrünü azaltan bayatlamayı geciktirmesidir. Ancak α -amilazın fazla kullanılması halinde ekmekte yapışkan bir yapıya neden olmaktadır (Gupta vd. 2003).

α -amilazların en yaygın uygulamalarından biri de nişasta endüstrisidir. Bu enzim nişastanın; glikoz, maltoz veya yüksek fruktozlu şeker şuruplarına dönüştürülebilmesi için nişasta sıvılaştırma işleminde kullanılmaktadır (Nielsen ve Borchert 2000). İki aşamalı olarak gerçekleştirilen nişasta sıvılaştırma işlemi, oldukça termostabil ve asidik pH'lara toleranslı bir α -amilaz enzimi gerektirmektedir (Nisha ve Satyanarayana 2013).

1. aşama: Moleküller içi ve arası bağlara sahip, yoğun bir şekilde paketlenmiş polikristal yapıdaki ham nişasta, enzimlere karşı oldukça dayanıklı olduğundan 100-105°C’de yaklaşık 5 dakika pişirilerek jelatinizasyonu sağlanır.

2. aşama: α -amilaz ile yaklaşık 3 saat boyunca muamele edilerek nişastanın sıvılaştırılması sağlanır. Nişastanın doğal pH’sı 3.2-4.5 arasında iken bu aşamada kullanılan enzimlerin çoğu pH 6.0-6.5 civarında aktif olması nedeni ile önce ortamın pH’sı enzimin aktif olduğu değerlere getirilir ve α -amilaz enzimi ile muamele edilir ya da asidik pH'lara tolerans gösteren α -amilazlar kullanılır (Parashar ve Satyanarayana 2016a).

Nişastanın sıvılaştırılması işleminden sonra, 50-60°C gibi sıcaklıklarda glikoamilaz enzimi ile sakkarifikasyon işlemi gerçekleştirilir (Goyal vd. 2005). İçecek endüstrinde de uygulama alanı bulan α -amilaz enzimi; meyve sularının berraklaştırılmasında ve alkollü içeceklerde fermente edilebilir şekerin oluşması sonucu mayanın şekeri kullanarak alkol üretmesinde rol oynamaktadır (Wiseman 1987).

2.2.6.2. Diğer endüstriler

Gıda endüstrisi dışında α -amilazlar; deterjan, tekstil, kağıt, atık suların arıtılması, biyoetanol üretimi ve sağlık gibi bir çok alanda da kullanılmaktadır (van der Maarel vd. 2002; Aiyyer 2005; Ali vd. 2014).

Deterjan endüstrisinde; yüksek sıcaklık, alkali pH ve yüzey aktif maddelerin varlığına dayanabilen ve bu koşullarda aktivite gösteren enzimler tercih edilmektedir (Fujiwara 2002). α -amilaz enzimi; kumaş, fayans ve seramik gibi yüzeylerdeki nişasta

bazlı lekelerin çıkarılmasında ve deterjanların yumuşatılarak kullanıma daha uygun hale getirilmesinde kullanılır (Nielsen ve Borchert 2000).

Tekstil ürünleri için modern üretim süreçlerinde, dokuma esnasında, çözgü üzerinde önemli bir baskı oluşur ve bu aşamada ipliğin kopmaması amacıyla dişlilere çıkarılabilir bir koruyucu tabaka uygulanır. Nişasta; ucuz olması, kolay bulunabilmesi ve kolayca çıkarılabilmesi nedeni ile dayanıklılığı artırmada kullanılan (haşılama işleminde) materyallerden biridir. Nişastanın kullanılması durumunda, haşıl sökme için α -amilaz uygulaması gerekmektedir. α -amilaz, nişastayı suda çözünür ve yıkandığında tekstil ürününden uzaklaştırılabilir dekstrinlere dönüştürür (Hendriksen vd. 1999).

α -amilaz enzimi kağıt endüstrisinde, kağıdın kaplanması için yüksek moleküler ağırlıklı ve düşük viskoziteye sahip özellikteki nişastanın üretiminde kullanılmaktadır. Nişastanın viskozitesini düşürerek kağıdın işlem sırasında mekanik hasarlara karşı korunmasını, kolayca şekillenmesini ve kaplanmasını sağlamaktadır. Ayrıca kağıt üzerindeki fazla nişastanın uzaklaştırılmasında da α -amilazlar kullanılır (van der Maarel vd. 2002).

Sağlık alanında; yetersiz beslenmeyi veya obeziteyi önlemede alınan oral tabletlerin bileşiminde, trans-membran regülatörünün eksikliği nedeniyle enzim üretiminin engellendiği kistik fibroz tedavisinde ve klinik tanı uygulamalarında α -amilazlar sıklıkla kullanılan biyokatalizörlerdendir (Sindhu vd. 2017). Bazı ekstremofil kaynaklı α -amilazların; yüksek tuz konsantrasyonu, düşük su aktivitesi ve inhibitörlere karşı direnç gösteren özelliklere sahip olması nedeniyle potansiyel olarak atık su arıtma süreçlerinde kullanılabilir olduğu bildirilmiştir (Ali vd. 2014).

2.3. Rekombinant Protein Üretiminde Konakçı Suş Olarak *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*)

Yüksek verimli ekspresyon sistemleri kullanarak ekonomik açıdan uygun rekombinant proteinler üretmek için yüksek ölçekli farklı üretim stratejileri geliştirilmektedir (Kato vd. 2001). Mayalar, diğer ökaryotik ve prokaryotik ekspresyon konakçılarına kıyasla rekombinant genlerin üretiminde umut verici konakçı-vektör sistemlerinden biri haline gelmiştir (Romanos vd. 1992). Bu amaçla *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Yarrowia lipolytica* gibi mayalar sıklıkla tercih edilmektedir (Kato vd. 2001).

Metilotrofilik bir maya olan *P. pastoris*, heterolog protein üretimi için çok fazla avantaja sahip olması nedeni ile en önemli maya sistemlerinden biri olarak öne çıkmaktadır (Li vd. 2007). Philips Petroleum Company tarafından 1970'li yıllarda tek hücre protein üretimi için kullanılan *P. pastoris* ekspresyon sistemi; insan, hayvan, bitki, mantar, bakteri kaynaklı çok çeşitli protein ürünlerinin (enzimler, antijenler ve antikorlar gibi) ticarileştirilmesi için elverişli bir platform haline gelmiştir (Tschopp ve Cregg 1991; Parashar ve Satyanarayana 2016b). Piyasada mevcut olarak, *P. pastoris*'te üretilen 70'ten fazla ürün bulunmaktadır. *Pichia*'da üretilen birkaç farmasötik ürün de ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından insan kullanımı için onaylanmıştır (Parashar ve Satyanarayana 2016b).

Son yıllarda, 26S rRNA dizisine göre yapılan sınıflandırmada *Komagataella phaffii* olarak isimlendirilen *P. pastoris* mayası ilk kez 1919 yılında Guilliermond tarafından; küresel veya oval şekilli olan, tek veya çiftler halinde bulunan ve morfolojisi oldukça değişkenlik gösteren bir maya olarak tanımlanmıştır (Kurtzman 2009; Zepeda vd. 2018). *P. pastoris* metilotrofilik bir maya olup, gelişebilmesi için gereken tüm karbon ve enerjiyi metanolden sağlayabilmektedir. Bu mayaların büyüme ortamına metanol eklendiğinde, metanol metabolizmasında anahtar rol oynayan enzimleri içeren zarlı organeller ve peroksizomlar kuvvetli bir şekilde indüklenmekte ve kitlesel olarak artış göstermektedir (Yurimoto vd. 2011).

P. pastoris’in; yüksek hücre yoğunluğuna kısa sürede ulaşabilmesi, endotoksin ve bakteriyofaj kontaminasyonlarını elemine etmesi, üretim verimliliğinin yüksek olması, iyi karakterize edilmiş ekspresyon vektörlerinin kolayca manipüle edilebilmesi, birçok promotora sahip olup farklı karbon kaynakları ile indüklenebilmesi, ekspres edilen proteinlerin; polipeptit katlanmaları, glikolizasyon, metilasyon, asilasyon gibi translasyon sonrası modifikasyonları gerçekleştirebilmesi, salgılanan doğal proteininin düşük miktarda olması ve hedef proteinlerin hücre dışına salgılanabilmesi diğer ifade sistemlerine göre tercih edilmesinin nedenleri arasındadır (Cereghino ve Cregg 2000; Cregg 2007).

P. pastoris’te rekombinant bir sistemin verimliliğini çeşitli genetik ve fizyolojik faktörler belirlemektedir. Bu faktörler; heterolog genin kodon optimizasyonu, gen kopya sayısı, kullanılan promotor, transkripsiyon ve translasyon proseslerinin verimliliği, sekresyon sinyalleri, üretim şartlarının optimizasyonu (sıcaklık, pH, karbon kaynağı, üretim hacmi, besleme profili vb.), üretim şekli (hücre içi, hücre dışı veya hücre yüzeyi), proteinin katlanması ve salgılanmasıdır (Hohenblum vd. 2004). Gen kopya sayısındaki artış ile salgılama seviyesinin doyumluğa ulaşmaması şartıyla, üretkenliği önemli ölçüde artırabileceğini gösteren çok fazla çalışma bulunmaktadır. Bu da kopya sayısı ile heterolog protein üretimi arasında doğrusal bir korelasyon olduğunu göstermektedir (Parashar ve Satyanarayana 2017).

P. pastoris için geliştirilen epizomal vektörler (maya plazmid) stabil olmadığından, ekspresyon vektörleri *P. pastoris*’in genomuna entegre edilir. Bu şekilde oluşturulan integrantlar selektif baskının eksikliğinde bile stabil kalabilmektedir (Li vd. 2007).

Ekspresyon vektörü genel olarak; promotor sekansı (*AOX1*, *GAP*, *FLD1*, *PEX8*, *YPT1* vb.), tekli ya da çoklu klonlama bölgesi, transkripsiyon terminasyon sekansı-poli A kuyruğu, replikasyon orijini, seçim belirteci (*ADE1*, *ARG4*, *G418*, *HIS4*, *URA3*, *Zeo^r*, *Amp^r* vb.) ve sekresyon sinyalini (*PHO1*, *SUC2*, *pGKL*, *PHA-E*, α -faktör vb.) içermektedir (Cereghino ve Cregg 2000; Spohner vd. 2015). Ekspresyon vektörlerine yabancı proteinin eklenmesi genellikle *E. coli*’de gerçekleştirilir. Bu nedenle ekspresyon vektörleri *E. coli* (aracı vektör) / *P. pastoris*’e göre dizayn edilmektedir (Cereghino ve Cregg 2000).

P. pastoris ekspresyon sisteminde birçok sekresyon sinyali kullanılmaktadır. Ancak *S. cerevisiae* kaynaklı 19 amino asitlik sinyal peptidi içeren pre bölgesi ve 60 amino asitten oluşan pro bölgesini içeren α -faktör pre-pro sekresyon sinyali en yaygın kullanılanıdır. *P. pastoris*’te α -pre-pro sekansı esas olarak *KEX2* geninin ürünü

(prohormon-endoproteaz) ve *STE13* (dipeptidil amino peptidaz) geninin ürünü ile kesilmektedir (Daly ve Hearn 2005).

Salgılanan proteini önemli ölçüde artırabilmek için mayaya uygun bir strateji geliştirilir. *P. pastoris* mayası için oluşturulan sistem genellikle 3 aşamalı olarak gerçekleştirilmektedir (Higgins ve Cregg 1998).

1. aşama: Fermentöre alınacak hücrelerin, erlende (500 ml-1000 ml) gliserol gibi fermente olmayan bir karbon kaynağında geliştirilmesi,
2. aşama: Gelişen hücrelerin limit miktarda gliserol bulunan fermentör ortamına alınarak biyokütlesinin artırılması,
3. aşama: Fermentör ortamındaki gliserolün tükenmesi sonrasında promotora uygun indüklemeye yapılarak protein ekspresyonunun gerçekleştirilmesidir.

2.3.1. Yapısal ve indüklenebilir promotorlar

P. pastoris mayası için rekombinant proteinin üretimini etkileyen en önemli faktörlerden birisi ekspresyon vektöründe yer alan promotorun seçimidir (Hohenblum vd. 2004). *P. pastoris* ekspresyon sistemini daha etkin ve verimli bir şekilde kullanarak heterolog protein üretimindeki başarıyı artırabilmek için mevcut promotorların geliştirilmesi veya alternatif promotorların keşfine yönelik çalışmalar devam etmektedir. Stadlmayr vd. (2010) genom dizisinin tamamlanmasından faydalanarak, 24 farklı promotorun (regülatör sekans) potansiyel olarak kullanımı için uygulanabilirliğini karşılaştırmıştır.

P. pastoris ile rekombinant protein üretiminde en yaygın kullanılan promotorlardan biri, metanol metabolizmasında görev alan ve metanol ile indüklenebilen alkol oksidaz 1 (*AOX1*) promotorudur (Cregg vd. 2000). Alkol oksidaz, metanolün formaldehite oksidasyonunu katalizleyen metanol metabolik yolunun ilk enzimidir. *P. pastoris* genomunda, alkol oksidaz enzimini kodlayan iki alkol oksidaz geni (*AOX1* ve *AOX2*) vardır. *AOX1* geni; hücredeki alkol oksidaz aktivitesinin yaklaşık %90'ından sorumlu olup, güçlü ve oldukça sıkı şekilde düzenlenmiş bir promotora (*pAOX1*) sahip iken, *AOX2* geni ise alkol oksidaz aktivitesinin yaklaşık %10'undan sorumludur (Cos vd. 2006). Metanol metabolizmasında rol oynayan *AOX1* promotoru, metanol ile güçlü bir şekilde indüklenirken glikoz, gliserol ve etanol varlığında baskılanmaktadır (Tschopp vd. 1987; Inan ve Meagher 2001). Buna ek olarak trehaloz, sorbitol ve mannitolün *AOX1* promotoru üzerinde baskılayıcı bir etkisi olmadığı gözlenmiştir (Inan ve Meagher 2001).

Metanolü kullanabilme yeteneklerine göre değişiklik gösteren üç tip *P. pastoris* konakçı suşu mevcuttur. Yabanıl tip (doğal fenotip) olan suşlar; metanol kullanımı pozitif fenotipe (*Mut⁺*) sahip iken, *AOX1* genindeki silinmelerden kaynaklı olarak metanol kullanımı yavaş fenotipte (*Mut^S*) suşlar, hem *AOX1* hem de *AOX2* genindeki silinmelerden kaynaklı olarak metanolü kullanamayan (*Mut⁻*) fenotipte suşlar da bulunmaktadır. *AOX* genlerinin silinmesi, yabanıl tipte olan suşlara göre daha az metanol gerektirdiğinden büyük ölçekli üretimlerde avantaj sağlamakla birlikte rekombinant protein üretiminde de yabanıl tip suşlardan daha iyi olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Chiruvolu vd. 1997; Cereghino ve Cregg 2000).

AOX1 promotoru gibi indüklenabilir promotorların kullanıldığı ekspresyon sistemlerinde biyokütle birikimi ve protein üretimi ayrı fazlarda gerçekleşmekte bu nedenle üretilen protein, hücrelerde stres oluşturmadiğından gelişmelerini etkilememektedir. Bu durum toksik proteinlerin ekspresyonunda da oldukça önemli bir avantaj sağlamaktadır (Ahmad vd. 2014). Ancak *AOX1* promotorunun metanol ile indüklenmesi, metanolün son derece yanıcı ve tehlikeli bir madde olması nedeni ile ölçek büyütme prosesleri için tercih edilmeyen bir durumdur. Yangın tehlikesine karşı alınabilecek önlemlerin maliyetli olmasından dolayı fermentör gibi büyük ölçekli üretimlerde kullanımı sınırlıdır (Ahmad vd. 2014).

P. pastoris'te rekombinant protein üretiminde yaygın olarak kullanılan bir diğer promotor ise glikoz varlığında yapısal olarak ekspresyon gösteren *GAP* (gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz) promotorudur (Cereghino ve Cregg 2000). P_{GAP} ; metanol indüksiyonu gerektirmemesi yönünden avantaj sağlarken, yapısal olarak ifade edilmesi nedeniyle toksik proteinlerin üretiminde kullanılamaması önemli bir dezavantaj oluşturmaktadır (Cos vd. 2006). Buna ek olarak, *GAP* promotorunun kontrolü altında gerçekleştirilen heterolog protein üretimi esnasında ortamda bir miktar etanol olmasının, P_{GAP} üzerinde baskılayıcı bir etki göstermediğı, hatta protein üretimini artırdığı tespit edilmiştir (Baumann 2008).

Alternatif olarak kullanılabilen *FLD1* promotoru, formaldehit dehidrogenaz enziminin ekspresyonunda görev alan ve birbirinden bağımsız olarak, metanol-amonyum sülfat ya da glikoz-metilamin varlığında indüklenabilen güçlü bir promotordur (Shen vd. 1998). Yapısal promotorlardan bir diğeri, salgılamada rol alan GTPaz enzimini kodlayan *YPT1* genidir. P_{YPT1} ; glikoz, metanol veya mannitol içeren ortamda, düşük seviyede ifade edilmektedir (Shen vd. 1998). Literatürde bulunan *P. pastoris* promotorları ve yaklaşık ekspresyon seviyeleri Çizelge 2.3'te özetlenmiştir.

Çizelge 2.3. *P. pastoris* promotorları (Vogl ve Glieder 2013; Ahmad vd. 2014; Özçelik vd. 2019)

İndüklenebilir Promotorlar			
Gen adı	Gen ürünü	Regülasyonu	Ekspresyon seviyesi
<i>AOX1</i>	Alkol oksidaz 1	Metanol indüksiyonu	Güçlü
<i>ADH2</i>	Alkol dehidrogenaz	Etanol indüksiyonu	Güçlü
<i>DAS</i>	Dihidroksi aseton sentaz	Metanol indüksiyonu	Güçlü
<i>ENO1</i>	Enolaz	Gliserol indüksiyonu	
<i>FLD1</i>	Formaldehit dehidrogenaz	Metanol/metilamin indüksiyonu	Güçlü
<i>GUT1</i>	Gliserol kinaz	Gliserol ve etanol indüksiyonu	
<i>PEX8</i>	Peroksizomal matriks proteini	Metanol/ oleat indüksiyonu	Zayıf
Yapısal Promotorlar			
Gen adı	Gen ürünü	Regülasyonu	Ekspresyon seviyesi
<i>GAP</i>	Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz	Glikoz varlığında	Güçlü
<i>GCW14</i>	Glikozil fosfatidil inositol	Gliserol, glikoz ve metanol varlığında	Zayıf
<i>PET9</i>	İç mitokondiyal membranda ADP/ATP taşıyıcı		%10-1700 (P_{GAP})
<i>PGK1</i>	3-Fosfoglisarat kinaz	Glikoz varlığında	%10 (P_{GAP})
<i>SDH</i>	Sorbitol dehidrogenaz		Güçlü
<i>TEF1</i>	Translasyon uzama faktörü 1 α	Gliserol ve glikoz varlığında	Güçlü
<i>YPT1</i>	GTPaz		Zayıf

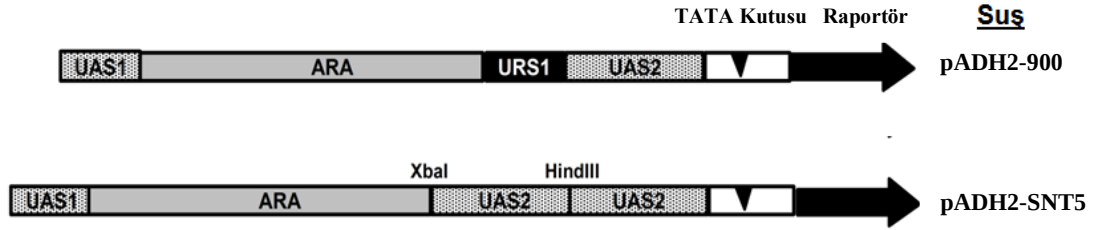
2.3.2. *ADH2* promotörü ve etanol metabolizmasındaki rolü

P. pastoris mayası Crabtree-negatif bir mayadır. Crabtree-negatif mayalar (*C. albicans*, *H. polymorpha*, *K. lactis*, *P. pastoris* vb.) aerobik koşullar altında şekerleri metabolize eder ve yüksek glikoz konsantrasyonlarında etanol üretemez. Ancak *P. pastoris* mayasının aerobik koşullarda gerçekleşen fermentasyon ortamında az miktarda da olsa etanol ürettiği gözlenmiştir (Inan ve Meagher 2001). Ortamda etanol bulunması durumunda *AOX1* promotörü baskılanmakta ve *P_{AOX1}* kontrolü altında gerçekleştirilen rekombinant protein üretimini olumsuz etkilemektedir (Inan ve Meagher 2001). Bu nedenle *P. pastoris*'in etanol metabolizmasının aydınlatılması amacıyla, benzerlik gösterdiği ve etanol metabolizması üzerine kapsamlı bilgilerin mevcut olduğu *S. cerevisiae* mayasından faydalanılmıştır. 7 *ADH* genine sahip olan *S. cerevisiae*'de *ADH1* geni etanol üretiminden sorumlu iken, *ADH2* geni etanol tüketiminden sorumludur (de Smidt vd. 2008).

P. pastoris GS115 genomunun dizilenmesi sonucunda bir tane alkol dehidrogenaz (*ADH*) geni tanımlanmıştır (De Schutter vd. 2009). Literatürde *ADH* geninin isimlendirilmesinde farklılıklar görülmektedir. Cregg ve Tolstorukov (2012) tarafından alınan US 8,222,386 no'lu patentte bu gen, *ADH1* geni ve genin regülasyonundan sorumlu olan promotor bölgesi de *ADH1* promotörü olarak isimlendirilmiştir. NCBI veri tabanında ise bu gen, *S. cerevisiae adh3* amino asit dizisine benzerliği sebebiyle *ADH3* geni olarak isimlendirilmiştir (De Schutter vd. 2009). Ancak son olarak Karaoglan vd. (2019) yaptıkları çalışmada, etanol tüketiminden sorumlu olan geni karakterize etmişler ve *ADH2* geni olarak tanımlamışlardır. Bu tez kapsamında; Karaoglan vd. (2019) tarafından yapılan tanımlama baz alınmış olup, *ADH2* promotörü olarak ifade edilmiştir. *ADH2* geni, *P. pastoris* etanol metabolizmasında etanolün yıkımında görev alan tek gen olup bu genin regülasyonundan, etanol ile indüklenebilen ve güçlü bir ekspresyon seviyesi gösteren *ADH2* promotörü sorumludur (Karaoglan 2016b).

Karaoglan vd. (2016) yaptığı bir çalışmada; *ADH2* promotörünün kontrolünde gerçekleştirilen bir rekombinant protein üretiminin, *AOX1* ve *GAP* promotörlerine karşı verimliliğini araştırmak üzere, *Aspergillus niger* kaynaklı ksilanaz genini kullanılarak üç farklı promotor (*P_{ADH2}*, *P_{AOX1}* ve *P_{GAP}*) kontrolünde klonlanmış ve rekombinant protein üretimini karşılaştırmıştır. Fermentör ortamında; 30°C, pH 5.0 ve çözünmüş oksijen seviyesi (%ÇO) %30 koşullarında, 72 saat boyunca *P_{ADH2}* etanolle, *P_{AOX1}* metanolle ve *P_{GAP}* glikozla beslenerek ksilanaz üretimi gerçekleştirilmiştir. Bunun sonucunda; ksilanaz aktivitesi *P_{ADH2}* 3725 U/ml, *P_{AOX1}* 2095 U/ml ve *P_{GAP}* 580 U/ml olarak ölçülmüştür. Sonuçlar *ADH2* promotörünün diğer güçlü promotörlere alternatif olabileceğini göstermektedir.

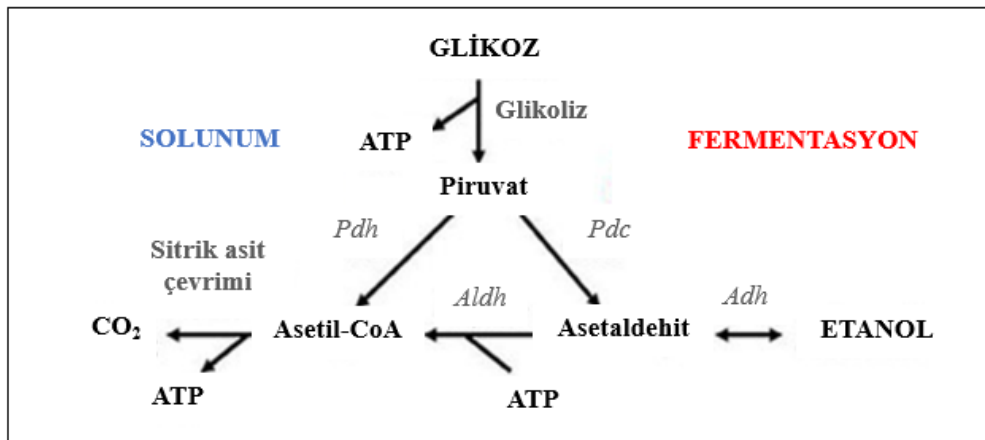
Diğer bir çalışmada; *ADH2* promotörü üzerinde sondan silme analizleri gerçekleştirilerek promotor aktivitesinin değişmediği en kısa DNA bölgesi 900 bp olarak belirlenmiş ve doğal *ADH2* promotörü olarak tanımlanmıştır. Doğal *P_{ADH2}* üzerinde içten silme analizleri ile pozitif regülasyondan sorumlu bölgeler (UAS, Upstream Activator Site) ve negatif regülasyondan sorumlu bölgeler (URS, Upstream Repressor Site) belirlenmiştir. Belirlenen UAS bölgeleri ile farklı kombinasyonlarla 5 sentetik *ADH2* promotörü oluşturulmuş ve en yüksek aktivite gösteren promotor sentetik 5-*ADH2* (*ADH2SNT5*) promotörü olarak belirlenmiştir (Şekil 2.7) (Karaoglan 2016a).



Şekil 2.7. Doğal *ADH2-900* ve sentetik *ADH2-SNT5* promotorları (Karaoğlu 2016a)

Etanol metabolizması araştırılan hemen hemen her türün, alkol dehidrogenazı kodlayan en az iki farklı *ADH* geni bulunmaktadır. *P. pastoris*'in etanol metabolizmasında rol oynayan; biri etanol üretiminden (*ADH900*, XM_002491163) diğeri ise etanol tüketiminden (*ADH2*, XM_002491337) sorumlu olduğu iki *ADH* geni bildirilmiştir. Etanol katabolizmasından sorumlu olan *ADH2* geni, *ADH900* geninin eksikliğinde etanol üretiminde küçük bir rol oynamaktadır (Karaoğlu vd. 2019).

Alkol dehidrogenazlar (*ADH*; EC 1.1.1.1), karbon kaynağının (glukoz) en iyi şekilde kullanılmasını sağlayan, solunum ve fermentasyon gibi iki ana metabolik yolu birbirine bağlayarak hücrel enerji metabolizmasında önemli bir rol oynayan enzimlerdir. Her iki metabolik yol da bir şeker molekülünün glikoliz yoluyla iki ATP ve iki NADH eldesi sonucu iki piruvat molekülüne dönüştürülmesi ile başlar. Piruvat molekülü sadece solunum yolu, sadece fermentasyon yolu veya her iki metabolik yolu kullanarak bozunur (Pfeiffer ve Morley 2014). Solunumda, piruvat molekülü sitrik asit çevrimine katılarak ATP ve CO₂'ye yükseltgenir. Oksijen molekülü, elektron taşıma zincirindeki son elektron alıcısı olduğundan, solunum yalnızca aerobik koşullarda gerçekleşmektedir. Fermentasyonda ise piruvat, piruvat dekarboksilaz ve alkol dehidrogenaz enzimlerinin reaksiyonu katalizlemesiyle önce asetaldehit ve son olarak etanole dönüştürülür. Organizmaların fermentasyon kabiliyeti, oksijen sınırlı olmaya başladığı durumlarda hücrel aktivitelerine devam etmelerini sağlamaktadır (Karaoğlu vd. 2019). Ayrıca mayanın solunumu için etanol karbon ve enerji kaynağı olarak kullanıldığında; alkol dehidrogenaz (*ADH2*) tarafından asetaldehit, aldehit dehidrogenaz (*Aldh*) tarafından asetata, sonrasında Asetil-CoA'ya ve en son sitrik asit çevrimine katılarak ATP, CO₂ ve H₂O'ye dönüştürülür (Şekil 2.8) (Zepeda vd. 2018).



Şekil 2.8. Mayalarda etanol metabolizması (Pfeiffer ve Morley 2014)

2.4. α -Amilaz Enzimi Üretimi ile İlgili Yapılan Çalışmalar

İnsan pankreasından izolen edilen α -amilaz geninden (HPA) ters transkriptaz ile cDNA elde edilmiş ve *P. pastoris* GS115'e klonlanmıştır. Erlende üretime alınan klonun α -amilaz verimi 20 mg/L olarak hesaplanmıştır. 56 kDa boyutunda gözlenen proteinin glikolize formda olduğu ve 10-13 arasında şeker kalıntısı içerdiği tespit edilmiştir (Rydborg vd. 1999).

Fare tükürük salgısından izolen edilen α -amilaz geni; *P. pastoris* GS115, *S. cerevisiae* 20B-12 ve *K. lactis* MD2/1 konakçı suşlarına klonlanmıştır. *P. pastoris* GS115 suşuna; AOX promotoru kontrolü altında, pGKL-128 kDa (pre-pro sinyal) sekresyon sinyali kullanılarak ve olgun (mature) formdaki fare α -amilaz geni ile oluşturulan vektör (pPAM) entegre edilmiştir. *S. cerevisiae* 20B-12 suşunda ise α -çiftleşme faktörü (pre-pro sinyal) sekresyon sinyali kullanılmıştır. Üretilecek ortamın optimize edilmesi sonucu; *P. pastoris* YCM (%1 maya ekstraktı, %2 kazamino asit ve %0.5 metanol)-gliserol-YNB-asparajin besiyerinde, *S. cerevisiae* ve *K. lactis* YCD (%1 maya ekstraktı, %2 kazamino asit ve %2 glikoz) besiyerinde rekombinant enzimin üretimi gerçekleştirilmiştir. Enzim aktiviteleri *K. lactis* 'te 1.2 U/ml, *S. cerevisiae* 'de 1.8 U/ml ve *P. pastoris* 'te 154.7 U/ml (240 mg/L) olarak belirlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada; mikroorganizmaya uygun seçilen gelişme sıcaklığının ve yüksek kopya oluşturulmasının α -amilaz aktivitesini artırdığı bildirilmiştir (Kato vd. 2001).

Topraktan izole edilen *Bacillus* sp. YX-1 kaynaklı, ham nişastayı hidroliz edebilen α -amilaz enziminin uygun besiyerinde üretimi sonrasında elde edilen enzim saflaştırılmış ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. 44 saat boyunca sürdürülen üretim fazı sonunda elde edilen en yüksek aktivite 53 U/ml olarak ölçülmüştür. Moleküler ağırlığı 56 kDa olduğu belirlenen α -amilazın spesifik aktivitesi, kültür süpernatantında 17.9 U/mg iken saflaştırma aşamalarından sonra 607 U/mg olarak hesaplanmıştır. Enzimin optimum çalıştığı sıcaklık 40-50°C olmakla birlikte 60°C ve üzerinde aktivitede ani bir düşüş gözlenmiştir. Optimum çalıştığı pH değerinin 5.0 olduğu ve pH 4.5-11.0 arasında 1 saat bekletildiğinde aktivitenin %80'i korunduğu tespit edilmiştir (Liu ve Xu 2008).

B. subtilis PY22'den α -amilaz enzimini kodlayan gen izole edilmiş (*AmyE*), aminoasit dizisi belirlenmiş (*B. subtilis* 168/*AmyE* ile %99 benzerlik) ve pPICZ α A vektörü kullanılarak *P. pastoris* KM71H (AOX promotoru içeren) konakçı suşuna transformasyonu gerçekleştirilmiştir. Transform edilen, farklı kopya sayılarına sahip klonlar arasında α -amilaz üretimi taraması yapılmış ve 4 nolu klonun (2 kopya) en iyi üretici olduğu belirlenmiştir. Engelli erlende üretimi gerçekleştirilen rekombinant suşun 72 saat sonunda α -amilaz aktivitesi 44 U/ml (22 mg/ml) iken yabanıl türün (*B. subtilis* PY22) en yüksek α -amilaz aktivitesi 120 mU/ml olarak ölçülmüştür. Gen verici (donör) hücre ile konakçı hücre üretimi arasında doğrudan bir karşılaştırma zor olmakla birlikte, 72 saat sonunda hücre içermeyen kültürde rekombinant enzimin α -amilaz aktivitesinin donör hücreye göre 370 kat fazla olduğu bildirilmiştir. Üretim sonucu kısmen saflaştırılan rekombinant α -amilaz karakterize edilmiş ve teorik olarak tam uzunluktaki gen dizisinin (glikolize formdaki protein) moleküler ağırlığının 72.28 kDa olduğu belirtilmiştir. Rekombinant enzimin optimum çalışma şartlarının 60°C sıcaklıkta ve pH 7.0'de olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca 0.1 M konsantrasyonda Ca^{2+} iyonu içeren tamponun aktiviteyi %41 oranında artırdığı gözlenmiştir (Karakas vd. 2010).

Önceki çalışmalarda *Rhizopus oryzae* (RoAmy) kaynaklı α -amilaz enzimi, *E. coli* ve *S. cerevisiae*'de üretilmiş fakat elde edilen rRoAmy verimlerinin çok düşük olduğu görülmüştür. Bu nedenle RoAmy, AOX ve GAP promotorlarının kontrolünde *P. pastoris* GS115 suşlarına klonlanarak yüksek düzeyde üretimi hedeflenmiştir. Mut⁺ suşu (41.1 mg/L) ile; Mut^S suşuna göre 8 kat, GAP ile kontrol edilen suşa göre 24 kat, önceki çalışmada kullanılan *S. cerevisiae*'ye göre 50 kat ve *E. coli*'ye göre 400 kat daha yüksek üretim gözlenmiştir. En yüksek verime sahip olan, 6 kopya içeren, *P. pastoris* GS115/Mut⁺ (α -pre-pro sinyali içermeyen, tam uzunluktaki RoAmy kodlayan diziyi içeren) suşu; erlende 46.2 U/ml, fermentörde üretime alındığında ise 120 saat sonunda 448.6 U/ml aktivite göstermiştir (Li vd. 2011).

Medaka balığından (*Oryzias latipes*) izole edilen α -amilaz geninden cDNA elde edilmiş ve olgun (mature) formdaki α -amilazı kodlayan gen (OLAmy) *P. pastoris* KM71 ve *S. cerevisiae* BJ350 suşlarına klonlanmıştır. İki konakçı suş için kullanılan ekspresyon vektörleri aynı olup sadece içerdikleri promotor (*P. pastoris* için P_{AOX} ve *S. cerevisiae* için P_{GALI}) sekansları farklıdır. Her iki konakçı suş erlende üretime alınıp aktiviteleri karşılaştırıldığında, *S. cerevisiae* BJ350 suşu çok düşük bir ekspresyon seviyesi göstermiştir. Bu nedenle 2 L'lik erlende üretime (büyük ölçekli üretim) *P. pastoris* KM71 suşu alınmıştır. Üretilen enzim karakterize edildiğinde, optimum sıcaklığı 49°C, optimum pH'sı 7.12 ve optimum NaCl konsantrasyonu 150 mM olarak belirlenmiştir. Enzimin; buğday ve mısır nişastasında gösterdiği aktivite, patates ve tatlı patates nişastasında gösterdiği aktiviteye göre çok daha yüksek bulunmuştur (Mizutani vd. 2012).

Alkalifilik *Alkalimonas amylolytica* N10'dan elde edilen alkalın α -amilaz geni, kodon kullanımı optimize edilerek *E. coli* BL21 ve *P. pastoris* GS115 konakçı suşlarına klonlanmıştır. *E. coli* BL21 (AmyA) suşuna transforme edilen ekspresyon vektörü, pET-22b (+) plazmidine olgun (mature) formdaki α -amilaz geninin ligasyonu ile oluşturulmuştur. *P. pastoris* GS115 (AmyB) suşuna transforme edilen ekspresyon vektörü ise AOX promotoru kontrolünde ve α -pre-pro sekresyon sinyali içeren pPIC9K plazmidine olgun formdaki α -amilaz geninin ligasyonu ile oluşturulmuştur. Kültür ortamından elde edilen rekombinant enzimler (AmyA ve AmyB) saflaştırılmış ve AmyA'nın spesifik aktivitesi 16 U/mg, AmyB'nin spesifik aktivitesi ise 16.6 U/mg olarak belirlenmiştir. Saflaştırılan AmyA ve AmyB enzimlerinin karakterizasyonu gerçekleştirilmiş olup moleküler ağırlıkları yaklaşık 60 kDa olarak tespit edilmiştir. Her iki enzimin de en yüksek aktivite gösterdiği pH 9.5'tir ancak en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık AmyB'nin 55°C iken AmyA'nın 50°C'dir. Bu nedenle AmyB'nin AmyA'ya göre daha termostabil olduğu gözlenmiştir. 1 mM konsantrasyonundaki Ca²⁺, Co²⁺ ve Na⁺ iyonları enzim aktivitesini az miktarda artırırken, aynı konsantrasyondaki Mg²⁺, Fe³⁺, Fe²⁺, Zn²⁺, Mn²⁺ ve Cu²⁺ iyonları bu aktiviteyi düşürmüştür. Fermentör koşullarında gerçekleştirilen üretim sonucunda α -amilaz aktivitesi *E. coli*'de 61 U/ml, *P. pastoris*'te ise 600 U/ml olarak tespit edilmiş ve büyük ölçekli üretimde *P. pastoris*'in daha uygun bir konakçı suş olduğu bildirilmiştir (Yang vd. 2013).

Sentetik tuzdan izole edilen zorunlu bir halofilik olan *Aspergillus gracilis* mantarından α -amilaz enzimi üretimi hücre dışı olarak gerçekleştirilmiş, elde edilen enzim kolon kromatografisi ile saflaştırılmış ve karakterizasyonu yapılmıştır. Protein büyüklüğü 35 kDa boyutlarında ve tek bant halinde olduğu gözlenmiştir. Enzimin spesifik aktivitesi 131.02 U/mg olarak hesaplanmıştır. pH 3.0-8.0 arasında ölçülen en yüksek aktivitenin pH 5.0'te ve 30-90°C sıcaklık değerleri arasında en yüksek aktivitenin

60°C’de olduğu saptanmıştır. BaCl₂, MgCl₂, HgCl₂, CaCl₂ iyonları aktiviteyi az miktarda artırırken; FeCl₂, ZnCl₂, EDTA ve b-Merkaptoetanol ise aktiviteyi az miktarda azaltmıştır. NaCl konsantrasyonunun etkisine bakıldığında en yüksek aktivite %30 NaCl konsantrasyonunda ölçülmüştür. Tüm bu sonuçlar değerlendirildiğinde *Aspergillus gracilis* kaynaklı α -amilazın atık suların arıtılması için kullanımının uygun olduğu bildirilmiştir (Ali vd. 2014).

Bacillus amyloliquefaciens kaynaklı α -amilaz enzimini kodlayan *amy1* geni *B. subtilis* WB800 konakçı suşuna klonlanmıştır. 1209.9 U/mg (634 U/ml) olarak belirlenen spesifik aktivite rekombinant enzimin saflaştırılması ile 5566 U/mg’a yükselmiştir. 60 kDa büyüklüğündeki rekombinant enzim, pH 6.0 ve 60°C sıcaklıkta maksimum aktivite göstermiştir. 2 mM konsantrasyondaki Hg²⁺, Pb²⁺ ve Cu²⁺ iyonlarının enzimi inhibe ettiği, aynı konsantrasyondaki Mn²⁺ ve Ca²⁺ iyonlarının aktiviteyi önemli oranda artırdığı görülmüştür. Yabani tür (*B. amyloliquefaciens*) ile *B. subtilis* WB800-Amy1 karşılaştırıldığında verimliliğin 1.48 kat arttığı gözlenmiştir (Chen vd. 2015).

Bacillus acidicola kaynaklı α -amilaz enziminin (*Ba-amy*) N-terminal sekansı ile *Geobacillus thermoleovorans* kaynaklı α -amilaz enziminin (*Gt-amy*) C-terminal sekansı kullanılarak oluşturulan *Ba-Gt-amy* kimerik enzimi *E. coli*’de *csp* promotörü kontrolünde ekspres edilmiştir. Kimerik α -amilazın karakterize edilmesi ile moleküler ağırlığı 68 kDa, optimum aktivite gösterdiği sıcaklık 60-70°C arasında ve optimum aktivite gösterdiği pH 4.0-5.0 arasında gözlenmiştir. EDTA, Ca²⁺, Na²⁺ ve K⁺ iyonlarının aktivite üzerinde önemli ölçüde bir etkisi olmaz iken; Mn²⁺, Cu²⁺, Pb²⁺ ve Ag²⁺ iyonları inhibe edici etki göstermiştir. *Ba-Gt-amy* kimerik enziminin, *Bacillus acidicola* kaynaklı α -amilaz enzimine (*Ba-amy*) göre katalitik etkisi ve ham nişasta üzerindeki adsorbsiyonunda artış gözlenmiştir. *Ba-Gt-amy*; asit stabilitesi, termostabilite ve Ca²⁺ iyonu bağımsızlığı gibi özelliklere sahip olması nedeni ile alt jelatinleşme sıcaklıklarında ham nişasta sakkarifikasyonuna yönelik uygun bir katalizör olduğu bildirilmiştir (Parashar ve Satyanarayana 2016a).

B. acidicola TSAS1 kaynaklı rekombinant α -amilaz üretimi için hem AOX promotörü (Amy-AOX) hem de AOX ve GAP promotörünün her ikisini de içeren (Amy-GAP-AOX) ekspresyon vektörü oluşturularak *P. pastoris* X-33 suşuna klonlanmıştır. Gerçek zamanlı PZR ile analiz edilen klonlardan; Amy-AOX 1 kopya, Amy-GAP-AOX 3 kopya olduğu belirlenmiştir. Erlende optimize edildikten sonra (pH 5.5, 30°C ve karışık beslemede metanol/gliserol oranı 9:1) fermentör koşullarında üretime alınan Amy-AOX ile yabani türe göre 13 kat fazla aktivite gözlenmiştir. α -amilaz aktiviteleri ölçüldüğünde; Amy-AOX ile 130 U/ml (1080 U/g), Amy-GAP-AOX ile 245 U/ml (1890 U/g) olduğu belirlenmiştir (Parashar ve Satyanarayana 2016b).

Parashar ve Satyanarayana (2016a) tarafından yapılan önceki bir çalışmada oluşturulan *Ba-Gt-amy* kimerik enzimin hücre dışı ekspresyonun gerçekleştirilebilmesi için bu kimerik gen AOX promotörünü içeren vektöre klonlanmış ve *P. pastoris* X-33 genomuna homolog rekombinasyon yoluyla entegre edilmiştir. Farklı kopya sayıları oluşturularak α -amilaz aktiviteleri karşılaştırılmış ve 1 kopya 70 U/ml, 3 kopya 150 U/ml, 5 kopya 200 U/ml ve 8 kopya 250 U/ml aktivite göstermiştir. 8 kopya olan klon; üretim şartları optimize edildikten sonra tekrar üretildiğinde, erlende 310 U/ml, fermentörde ise 750 U/ml (120 mg/L) enzim aktivitesi ölçülmüştür. *P. pastoris*’te üretilen rekombinant

α -amilazın karakteristik özellikleri *E. coli*'de üretilen ile benzerlik göstermiştir (Parashar ve Satyanarayana 2017).

Domuz pankreatik α -amilaz geninden (PPA) toplam RNA izolasyonu yapılmış ve gerçek zamanlı PZR ile mature formdaki PPA proteinini (sinyal peptidi olmayan olgun formdaki protein) kodlayan cDNA elde edilmiştir. PPA sekansını içeren ekspresyon vektörü (pPICZ α A-PPA), *P. pastoris* X-33 suşuna klonlanmıştır. AOX1 promotörü kontrolünde (metanol indükleme ile) 72 saat boyunca sürdürülen fermentasyon sonunda elde edilen rekombinant enzimin verimi 65 mg/L olarak belirlenmiştir. Afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzimin en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık 50°C olarak tespit edilmiş ancak 55°C'den sonra aktivitede ani bir düşüş gözlenmiştir. En yüksek aktivite gösterdiği pH değeri ise 7.5 olarak bulunmuş ve pH 5.5-9.5 arasında aktivitenin %50'sinden fazlası korunmuştur. Aktivite; Ca²⁺ iyonunun konsantrasyonuna bağlı olarak artarken, Zn²⁺ iyonu tarafından inhibe edilmiştir (Sun vd. 2018).

Aktif bölgedeki mutasyonlar yoluyla, katalitik kalıntıların pKa değerlerini azaltarak, *B. subtilis* CN7 kaynaklı Ca²⁺ iyonundan bağımsız α -amilazın (*Amy7C*) asidik adaptasyonunu rasyonel bir şekilde yapılandırmak üzere, *Amy7C*'nin üç katalitik kalıntısındaki üç mutasyon (R172K, A270K ve N271H) tanımlanmıştır. Bu üç mutasyonu içeren toplamda beş adet farklı kombinasyonlardan (tekli ve çiftli) oluşan mutantlar oluşturulmuş ve *E. coli*'de ekspres edilerek karakterize edilmiştir. Çift mutantların daha avantajlı olduğu belirlenmiş ve en iyi mutant olan A270K/N271H'de optimum çalışma pH'sında iki birim düşüş (pH 6.5'ten 4.5'e) gözlenmiştir. α -amilazın yabani türdeki spesifik aktivitesi 956.54 U/mg iken A270K/N271H mutantında bu spesifik aktivitenin 2296.84 U/mg'a yükseldiği tespit edilmiştir (Wang vd. 2018).

Baldan izole edilen *B. amyloliquefaciens* BH072 kaynaklı bakteriyel α -amilaz, erlen içerisinde uygun besiyerinde üretime alınmış ve üretilen enzim saflaştırılarak karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Saflaştırılma işlemlerinden önce enzimin spesifik aktivitesi 102.41 U/mg iken saflaştırıldıktan sonra yaklaşık 21 kat artarak 2162.42 U/mg'a yükselmiştir. Proteinin büyüklüğü 68 kDa olarak belirlenmiştir. Bakteriyel α -amilazın optimum pH 7.0' de çalıştığı ancak pH 6.0-8.0 arasında 160 dakika tutulduğunda enzim aktivitesinin %75'inin korunduğu gözlenmiştir. Optimum çalıştığı sıcaklığın ise 60°C olduğu belirlenmiştir. 80°C'ye kadar stabil olduğu tespit edilen enzim aktivitesi 42 saat sonunda; 65°C'de %86.87, 70°C'de %79.34, 75°C'de %75.13 ve 80°C'de %71.62 oranında korunmuştur. Ca²⁺ iyonunun konsantrasyonundaki değişim aktiviteyi etkilememiştir. Bu sonuç *B. amyloliquefaciens* BH072 kaynaklı α -amilazın termostabil ve Ca²⁺ iyonundan bağımsız olduğunu göstermektedir (Du vd. 2018).

A. oryzae S2 suşunun *AmyA* genomik dizisinin 9 ekzonunun birleştirilmesiyle oluşturulan sentetik cDNA dizisi, *P. pastoris* SMD1168H'ye klonlanarak, AOX promotörü kontrolü altında ekspresyonu gerçekleştirilmiştir. Metanol tarafından 72 saatlik bir indüksiyondan sonra, hücre dışı α -amilaz üretiminin 72 U/ml olduğu belirlenmiştir. Kültür süpernatantında 386.6 U/mg olarak belirlenen spesifik aktivite, His-etiketli *rAmyA*'nin afinite kromatografi yöntemi ile saflaştırılması sonucunda 5150 U/mg'a yükselmiştir. Rekombinant enzimin optimum çalıştığı koşullar; 60° C sıcaklık ve pH 5.6'da olduğu tespit edilmiş ve termostabilitesinin doğal enzime göre arttığı bildirilmiştir. 4 mM konsantrasyonundaki iyonların etkisi incelendiğinde; Mg²⁺, Ca²⁺ ve

Fe^{2+} iyonları aktiviteyi önemli oranda artırırken, Cu^{2+} iyonunun enzimi inhibe ettiği gözlenmiştir (Trabelsi vd. 2019).

Tüm bu literatür verileri incelendiğinde; α -amilaz enziminin, yeni keşfedilen birçok mikrobiyal kaynaktan izole edildiği veya rekombinant olarak üretildiği gözlenmiştir. Özellikle rekombinant ekspresyon sistemlerinden biri olan *P. pastoris* mayasında daha önce *AOX*, *GAP* vb. promotorların kontrolünde gerçekleştirilen α -amilaz enzimi üretiminin, ilk defa *ADH2* promotorunun (*ADH2SNT5* sentetik formu) kontrolünde üretilecek olması nedeniyle çalışma özgün nitelikte olup farklı kaynaklardan izole edilen α -amilazların da bu promotor kontrolünde başarıyla üretilebilmesi için örnek bir çalışma olması hedeflenmiştir.



3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasallar ve restriksiyon enzimleri

Çalışmada kullanılan kimyasallar Merck (Almanya) ve Sigma-Aldrich (MO, ABD) firmalarından temin edilmiş olup moleküler biyoloji saflığındadır. Kullanılan restriksiyon enzimleri ve bunların tampon çözeltileri ise Thermo Fisher Scientific (MA, ABD) firmasından temin edilmiştir.

3.1.2. Tampon ve stok çözeltiler

Hazırlanan tüm tamponlar ve stok çözeltileri 121°C’de 20 dakika otoklavlanarak (Hirayama, Japonya) veya 0.22 µm filtreden geçirilerek (Corning, MA, ABD) sterilize edilmiş ve +4°C ya da oda sıcaklığında muhafaza edilmişlerdir.

3.1.3. Gen kaynağı, konakçı suşlar ve taşıyıcı plazmidler

Laboratuvarımızda mevcut olan Genscript’ten temin edilen pUC57 vektörü içerisindeki *B. subtilis* PY22 α-amilaz (*amyE*) geni, enzim üretiminde gen kaynağı olarak kullanılmıştır. -80°C stokta mevcut olarak bulunan *alkol dehidrogenaz* (*ADH2*) promotorlarından sentetik *ADH2SNT5* promotorunu içeren pADH2SNT5α-Fito/HIS4 plazmidi, ekspresyon plazmidi olarak kullanılmıştır.

α-amilaz (*amyE*) geni klonlama çalışmaları için; *E. coli* DH5α ve *P. pastoris* GS115 (Invitrogen, CA, ABD) suşları kullanılmış olup kullanılan *E. coli* ve *P. pastoris* suşlarının genotip özellikleri Çizelge 3.1’de gösterilmiştir. Tüm mikroorganizmalar %25 gliserol içeren uygun ortamda -80°C’de muhafaza edilmiştir. Çalışmalarda kullanılan suşlar, ana stoktan agar plakalara tek koloni düşecek şekilde çizim yapılarak, *P. pastoris* 30°C’de 3 gün, *E. coli* 37°C’de 1 gün boyunca inkübatörde geliştirilmiş ve +4°C’de muhafaza edilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan suşlar

Kullanılan Suş	Genotipi	Kullanım amacı	Kaynak
<i>E. coli</i> DH5α	F- 80dlacZ M15 (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1hsdR17(rk-, mk+) phoAsupE44-thi-1 gyrA96 relA1	Plazmidlerin çoğaltılması ve saklanması	Invitrogen, CA, ABD
<i>P. pastoris</i> GS115	<i>his4</i>	Kontrol ve konakçı (protein ekspresyonu)	Invitrogen, CA, ABD

3.1.4. Besiyerleri, gelişim ortamları ve antibiyotikler

E. coli suşlarının gelişiminde LB Miller (%0.5 maya özütü, %1 pepton ve %1 NaCl) veya LB Lennox (%0.5 maya özütü, %1 pepton ve %0.5 NaCl) besiyerleri kullanılmıştır. *P. pastoris* suşlarının gelişiminde YPD (%1 maya ekstraktı, %2 pepton, %2 glukoz) besiyeri, *P. pastoris* üretim suşunda α -amilaz üretiminde BMGY (10 g/l maya ekstraktı, 20 g/l soyton, 13.4 g/l YNB, 4×10^{-5} g/l biotin, %10 gliserol, ve 0.1 M potasyum fosfat tamponu, pH 6.0), BMEY (10 g/l maya ekstraktı, 20 g/l soyton, 13.4 g/l YNB, 4×10^{-5} g/l biotin, %10 saf etanol ve 0.1 M potasyum fosfat tamponu pH 6.0) ve BYED (30 g/l maya ekstraktı, 13.4 g/l YNB, 4×10^{-5} g/l biotin, 20 g/l glikoz ve 0.1 M potasyum fosfat tamponu pH 6.0) besiyerleri kullanılmıştır.

Sıvı ve katı besiyerlerinde kullanılan plazmidin üzerindeki direnç genine göre uygun antibiyotik ilaveleri yapılmıştır. Zeosin (InvivoGen, CA, ABD) ve amfisilin (Roche, Almanya) antibiyotiklerinin stok solüsyonları 100 mg/ml konsantrasyonunda hazırlanmış ve 0.22 μ m filtreden (Corning, MA, AB) geçirilerek sterilize edilmiştir. 1'er ml alikotlanarak -20°C'de saklanmıştır. Antibiyotikli besiyeri hazırlamak için otoklav ile sterilize edilen besiyerleri 55°C'ye soğutulduktan sonra buz üzerinde çözdürülmüş olan antibiyotiklerden, *E. coli* suşları için 25 μ g/ml zeosin veya 100-150 μ g/ml amfisilin, *P. pastoris* suşları için ise 100 μ g/ml zeosin olacak şekilde ilave edilmiştir.

3.2. Metot

Çalışmalarda kullanılan moleküler biyoloji teknikleri Sambrook ve Russel (2001)'a ve kit protokolüne göre gerçekleştirilmiştir. *P. pastoris*'te klonlama çalışmalarında Inan vd. (2007) kaynak olarak kullanılmıştır. Gen ve protein taramalarında Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi Ağ Servisi (Bethesda, MD, ABD; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) kullanılmıştır.

3.2.1. pADH2SNT5 α -Fito plazmidinin izolasyonu ve pADH2SNT5 α -Fito plazmidinden fitaz geninin düşürülmesi

-80°C stokta bulunan ADH2SNT5 α -Fito plazmidini içeren *E. coli* DH5 α klonu, zeosin içeren LB Lennox sıvı besiyerine ekim yapılarak çalkalamalı inkübatörde 37°C de gece boyu inkübasyona bırakılmış ve pADH2SNT5 α -Fito plazmidinin izolasyonu Qiaprep Spin Miniprep Kit'i (Qiagen, Almanya) ile gerçekleştirilmiştir. İzole edilen plazmidin *NotI* ve *XhoI* restriksiyon enzimleri ile kesimi ve %1'lik agaroz jelde yürütülmesi ile doğrulanmıştır. Doğrulan plazmitten istenilen büyüklükteki molekül ağırlığına sahip (7631 bp) fitaz geni düşürülmüş pADH2SNT5 α plazmid parçası, MinElute Gel Extraction Kit'i (Qiagen, Almanya) ile jel pürifikasyonu yapılarak elde edilmiştir.

3.2.2. Plazmid izolasyonu

E. coli'den plazmid izolasyonu Qiaprep Spin Miniprep Kiti (Qiagen, Almanya) kullanılarak protokole uygun şekilde gerçekleştirilmiştir. Zeosin içeren LB Lennox sıvı besiyerinde, çalkalamalı inkübatörde 37°C'de yaklaşık olarak 18 saat geliştirilen hücrelerden örnek alınmış ve 11000xg'de 1 dakika santrifüjlenmiştir. Daha sonra süpernatantı atılmış pelet RNaz A içeren Tris Cl-EDTA tamponunda resüspanse

edilmiştir. NaOH/SDS tamponunun eklenmesi ile hücreler parçalanmış, sonrasında asidik potasyum asetat eklenmesi sonucunda lizat nötralize edilmiştir. Lizatın santrifüjlenmesi ile denatüre olmuş proteinler ve hücre artıkları çöktürülmüştür. Süpernatantta çözünmüş halde kalan plazmid DNA'nın miniprep kolonundan geçirilerek kolona tutunması sağlanmıştır. Etanol içeren yıkama çözeltisinin kolondan geçirilmesi ile tuzlar uzaklaştırılmış ve 50 µl elüsyon tamponu (10 mM Tris·Cl, pH 8.0) ile plazmid kolondan alınmıştır.

3.2.3. Plazmid DNA'nın restriksiyon enzimleri ile kesim reaksiyonu

Plazmidlerin izolasyonu yapıldıktan sonra doğrulanması ve istenen DNA parçasının plazmitten elde edilebilmesi için restriksiyon enzimleri ile kesimi gerçekleştirilmiştir. Öncelikle, plazmidi iki noktadan kesen enzim veya enzimler belirlenmiştir. Plazmidlerin konsantrasyonları ölçüldükten sonra 1 µg plazmidde 1 U enzim olacak şekilde, 10X enzim tamponu ve su eklenerek toplam 100 µl içerisinde reaksiyon karışımı hazırlanmıştır (Çizelge 3.2). 37°C'de 1 saat inkübasyondan sonra kesilmiş plazmidlerin değerlendirilmesi, kontrol olarak kesilmemiş plazmid ile birlikte %1 agaroz jele yüklenerek agaroz jel elektroforezi ile yapılmıştır.

Çizelge 3.2. Plazmid DNA'nın restriksiyon enzimleri ile kesim reaksiyonu

10X Reaksiyon Tamponu	10 µl
Restriksiyon Enzimleri (<i>NotI</i> ve <i>XhoI</i>)	4 µl/4 µl
DNA (Plazmid DNA)	10 µl
Steril Su (NFW)	100 µl'ye tamamlanmıştır

3.2.4. Agaroz jel elektroforezi

PZR ürünlerinin, genomik DNA'ların ve plazmidlerin doğrulanması ve izolasyonlarının kalitesinin kontrolünde agaroz jel elektroforezi kullanılmıştır. Agaroz jel hazırlanırken, 100 ml 1xTAE tampon çözeltisine (Tris-Asetat-EDTA, 1 mM EDTA, 40 mM Tris ve 20 mM asetik asit) %1 oranında olacak şekilde 1 gr agaroz (SeaChem, FMC Bioproducts, ME, ABD) ilave edilerek mikrodalgada çözündürülmüştür. 60°C'ye soğutulduktan sonra içerisine 2 µl etidyum bromür çözeltisi (10 mg/ml, Invitrogen, CA, ABD) eklenmiştir. Uygun ebatta seçilen jel kalıplarına dökülen jel donuncaya kadar bekletilmiştir. Jel katılaştıktan sonra örnekler, 6X yükleme boyası ile karıştırılıp jel kuyucuklarına yaklaşık 10 µl yüklenmiştir. DNA standardı olarak GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD) kullanılmış ve jele 5 µl yüklenmiştir. Örnekler, 1xTAE tamponu içerisinde 100-120V akımda, 45-60 dakika kadar yürütülmüştür. Agaroz jel içerisinde moleküler büyüklüklerine göre farklı hızlarda ilerleyen DNA molekülleri bantlar halinde birbirinden ayrılmış ve etidyum bromürün UV ışınları altında (312 nm) ışımaya yapmasıyla, jel görüntüleme sisteminde (Vilber Lourmat EBox-VX2, Fransa) görüntülenmiştir.

3.2.5. Jelden DNA parçalarının ekstraksiyonu

Agaroz jelde yürütülen örneklerden, istenen büyüklükteki DNA parçası jelden kesilmiş ve jel pürifikasyonu MinElute Gel Extraction Kit'e (Qiagen, Almanya) uygun şekilde gerçekleştirilmiştir. Kite verilen talimatlar doğrultusunda jel hacminin 3 katı kadar bağlama tamponu eklenip jelin 50°C'de 10 dakika bekletilerek çözünmesi sağlanmıştır. Sonrasında 10 µl 3 M sodyum asetat (pH 5.0) ve jel hacminde izopropanol (%100) eklenmiştir. Karışım spin kolona yüklenmiş ve santrifüjlenerek kolondan geçirilmesi ile DNA'nın, yüksek tuz varlığında silika membrana bağlanması sağlanmıştır. Kolondan yıkama tamponu santrifüj işlemi uygulanarak geçirilmiş, süzüntü atıldıktan sonra kolon boş olarak tekrar santrifüjlenerek yıkama tamponunda bulunan etanolün tamamen uzaklaştırılması sağlanmıştır. Son aşama olarak kolon temiz bir santrifüj tüpüne aktarılmış, membranın üzerine 12 µl elüsyon tamponu (10 mM Tris-Cl, pH 8.0) eklenmiş ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra santrifüjlenerek DNA parçasının elüsyonu yapılmıştır. Santrifüj işlemleri 17900xg hızında 1 dakika süresince Centrifuge 5424 (Eppendorf, Almanya) cihazı ile oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.

3.2.6. DNA ve plazmid konsantrasyonunun ölçülmesi

Elde edilen plazmid DNA, genomik DNA ve PZR ürünü DNA parçalarının konsantrasyonunun ölçülmesi Qubit dsDNA BR Assay Kit'e (Invitrogen, CA, ABD) uygun şekilde gerçekleştirilmiştir. Qubit tamponu, örnek ve boya karışımı ile hazırlanan toplam 200 µl'lik karışım, iki standarda karşı Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen, CA, ABD) cihazında okutularak örneklerin konsantrasyonu ölçülmüştür.

3.2.7. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile α -amilaz geninin eldesi

pUC57- α -Amilaz plazmidini içeren *E. coli* XL1-Blue hücreleri, amfisilinli LB Miller sıvı besiyerine inokule edilerek 37°C'de, gece boyu, çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün gelişen transformant *E. coli* hücrelerinden plazmid izolasyonu Qiaprep Spin Miniprep Kiti (Qiagen, CA, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İzole edilen pUC57- α -Amilaz plazmidi; PZR için kalıp DNA olarak kullanılmış olup, tasarlanan primer çiftleri (Çizelge 3.3) ile PZR reaksiyonu KOD Hot Start Polymerase Kit (EMD Biosciences, San Diego, CA, ABD) protokolüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir. PZR sonucunda α -amilaz geninin; tam uzunluktaki (full length, 1983 bp) formu ile olgun (mature, 1860 bp) formu çoğaltılmıştır.

Çizelge 3.3. PZR'de kullanılan primerler

Primer	Sekans (Kaynak: Sentegen)
F-Amy-XhoI	5'-AAACTCGAGAAGAGAATGTTTGCAAAACGATTCAAAACCTC-3'
F-Amy-mtr-XhoI	5'-AAACTCGAGAAGAGACTTACAGCACCGTCGATCAAAAG-3'
R-Amy-NotI	5'-AAAGCGGCCGCTTAATGGGGAAGAGAACCG-3'

Çizelge 3.4. KOD-PZR reaksiyon karışımının hazırlanması

Bileşen	Final Konsantrasyon	Hacim
Steril Ultra Saf Su	-	65 µl
10XKOD Reaksiyon Tamponu	1x	10 µl
2mM dNTP Karışımı	0.2 mM	10 µl
25 mM MgSO ₄	1.5 mM	6 µl
10 µM İleri (forward) primer	15 pmol	3µl
10 µM Geri (reverse) primer	15 pmol	3 µl
Kalıp DNA (1-5 ng/µl)	-	1 µl
KOD DNA Polimeraz (1 U/µl)	0.02 U/µl	2 µl
TOPLAM		100 µl

Çizelge 3.5. PZR ısı döngü programı için süre ve sıcaklık koşulları

Basamaklar	Sıcaklık (°C)	Süre (s)	Döngü Komutu
İlk Denatürasyon	95	120	 30 kez 2.'ye git
Denatürasyon	95	20	
Bağlanma (T _m)	58	10	
Uzama	70	55	
Son Uzama	72	120	
Bekleme	4	∞	

Çizelge 3.4 ve Çizelge 3.5'te döngü programı için gerekli reaksiyon karışımı ve uygulanan koşullar gösterilmiştir. Reaksiyonun kontrolü, örneğin 5 µl'sinin 1 µl 6X jel yükleme boyası ile karıştırılarak etidyum bromür içeren %1 agaroz jelde yürütülmesi ve UV jel görüntüleme sisteminde istenilen DNA parçanın görüntülenmesi ile sağlanmıştır.

PZR sonucu elde edilen ürünlerin saflaştırılması MinElute PCR Purification Kit'e (Qiagen, Almanya) uygun şekilde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen α -amilaz geninin, F-Amy-XhoI/R-Amy-NotI ve F-Amy-Mtr-XhoI/R-Amy-NotI primerleri ile çoğaltılması sonrasında, genin uçlarının ligasyona uygun hale getirilmesi için NotI ve XhoI enzimleri ile kesimi gerçekleştirilmiştir.

3.2.8. *E. coli* ve *P. pastoris* hücrelerinin kompetent hale getirilmesi

E. coli hücreleri CaCl₂ yöntemi ile kompetent hale getirilmiştir. -80°C stoktan alınan ve LB Lennox plakaya tek koloni düşecek şekilde ekimi yapılan *E. coli* DH5 α suşu 37°C'de gece boyu gelişmeye bırakılmıştır. Gelişen tek koloniden, 3 ml LB Lennox sıvı

besiyerine inokule edilerek 37°C’de, gece boyu, çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün gelişen kültürün optik yoğunluğu (OD₆₀₀) ölçülerek 50 ml LB Lennox sıvı besiyerine başlangıç OD₆₀₀ değeri 0.01 olacak şekilde ekilmiş ve OD₆₀₀’si 0.3 olana kadar (yaklaşık 3 saat) 37°C’de çalkalamalı inkübatörde geliştirilmiştir. Beklenen OD₆₀₀ değerine ulaşan kültür +4°C’de 3000xg’de 5 dakika boyunca santrifürlenerek hücreler hasat edilmiştir. Bu aşamadan sonraki işlemler buz üzerinde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen hücre peleti 5 ml 0.1 M CaCl₂ çözeltisi içerisinde süspanse edilmiş ve 30 dakika buz üzerinde bekletilmiştir. Aynı şartlarda tekrar santrifürlenerek hasat edilen hücre peleti 1.5 ml %15 gliserol içeren 0.1 M CaCl₂ çözeltisi içinde resüspanse edilmiş ve daha sonra kullanılmak üzere 100 µl’lik hacimler halinde -80°C’de muhafaza edilmiştir.

P. pastoris GS115 suşu hücreleri Lityum Asetat (LiAc) yöntemine (Wu ve Letchworth 2004) göre kompetent hale getirilmiştir. *P. pastoris* GS115 suşu, -80°C stoktan alınarak YPD plakaya tek koloni düşecek şekilde ekimi yapılmış ve 3 gün boyunca 28°C sıcaklıkta inkübasyona bırakılmıştır. Gelişen tek kolonilerden test tüpü içerisindeki 3 ml YPD sıvı besiyerine inokule edilmiş, 28°C sıcaklık ve 225 rpm karıştırma koşullarındaki çalkalamalı inkübatörde gece boyu geliştirilmiştir. Ertesi gün, gelişen kültürden başlangıç OD₆₀₀’si 0.1 olacak şekilde 250 ml’lik engelli erlen içerisinde 80 ml YPD sıvı besiyerine ekim yapılmıştır. OD₆₀₀ değeri 1.3-1.5 olana kadar 250 rpm ve 28°C koşullarındaki çalkalamalı inkübatörde geliştirilmiştir. Hücreler istenilen OD₆₀₀’ye ulaştıktan sonra +4°C’de 3000xg hızında 5 dakika süresince santrifürlenerek hasat edilmiş, süpernatant kısmı uzaklaştırılmıştır. Hücre peleti, 8 ml lityum asetat karışımı (100 mM LiAc, 10 mM DTT, 0.6 M Sorbitol, 10 mM Tris-HCl pH 7.4) içerisinde süspanse edilmiş ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda aynı koşullarda tekrar santrifürlenerek hasat edilen hücreler buz soğukluğundaki 1.5 ml 1 M sorbitol içinde resüspanse edilmiş ve 2 ml hacimli santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Tekrar santrifürlenerek hasat edilen hücreler buz soğukluğundaki 1.5 ml 1 M sorbitol ile 3 kez yıkanmış, daha sonra son konsantrasyon 10¹⁰ hücre/ml olacak şekilde buz soğukluğundaki maya resüspansiyon tamponu (1 M sorbitol, %20 gliserol) içerisinde resüspanse edilmiş, daha sonra kullanılmak üzere 80 µl’lik hacimler halinde -80°C’de muhafaza edilmiştir.

3.2.9. pADH2SNT5α plazmid parçasının α-amilaz geni ile ligasyonu ve pADH2SNT5α-α-Amilaz plazmidinin *E. coli*’ye (DH5α) transformasyonu

pADH2SNT5α plazmid parçası ve α-amilaz genini kodlayan her iki formdaki (tam uzunluktaki formu ve olgun formu) DNA segmentlerinin ligasyona uygun hale getirilmesi için *NotI* ve *XhoI* enzimleri ile kesimi gerçekleştirilmiştir. Küt ve yapışkan uçlu DNA parçalarının vektörlere ligasyon işlemleri Rapid DNA Dephosphate and Ligation Kiti (Roche, Almanya) kullanılarak, üretici talimatlarına uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

Ligasyon işlemi için; toplam 10 µl içerisinde 50 ng vektör DNA, 150 ng insert DNA karıştırılmış, 1X T4 DNA ligasyon tamponu varlığında 5 U T4 DNA ligaz eklenmiştir. 22°C sıcaklıkta 5 dakika inkübasyon sonrası, elde edilen DNA segmentlerinin ligasyonu sağlanarak transformasyona hazır hale getirilmiştir. Ligasyon karışımının 1/10’u ile yetenekli *E. coli* DH5α hücrelerine transformasyon işlemine devam edilmiş, karışımın kalan miktarı -20°C’de saklanmıştır.

-80°C'den çıkarılan 100 µl *E. coli* DH5α kompetent hücrelerinin üzerine 5 µl ligasyon karışımı (pADH2SNT5α-α-Amilaz-Full Lenght veya pADH2SNT5α-α-Amilaz-Mature) eklenmiş ve 30 dakika buz üzerinde tutulmuştur. Ardından 42°C'de 1 dakika ısı şokuna maruz bırakılan hücreler 5 dakika buz üzerinde bekletilerek soğutulmuştur. Hücreler buz üzerinden alınmış ve üzerine 1 ml LB Lennox sıvı besiyeri eklenerek 37°C de çalkalamalı inkübatörde 1 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Transformant hücreler 25 µg/ml zeosin içeren LB Lennox agara 100 µl ekilmiş ve 37°C'de gece boyu geliştirilmiştir.

Transformant *E. coli* hücrelerinden pozitif klonların doğrulanması ve seçimi; Koloni PZR ve kesim reaksiyonu (*XhoI* ve *NotI*) ile sağlanmıştır. Doğrulan klonlardan -80°C'ye gliserol stoğu yapılmıştır.

3.2.10. Koloni PZR

Transformant *E. coli* hücrelerinin istenen plazmidi taşıyıp taşımadığının kontrolü ilk olarak koloni PZR ile yapılmıştır. Transformasyon sonucunda gece boyu 37°C inkübasyondan sonra plakada oluşan koloniler, 200 µl PZR tüpleri içinde 75 µl zeosinli besiyerine ekilmiş ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildikten sonra PZR reaksiyon karışımında kalıp olarak kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak aktarılan plazmidin kendisi, negatif kontrol olarak ise transformant olmayan *E. coli* kolonisi kullanılmıştır. PZR reaksiyon sonucu %1 agaroz jelde yürütülerek kontrol edilmiştir. Aktarılan plazmidi taşıdığı doğrulan kolonilerden ikişer tanesi, tekrar zeosinli (25 µg/ml) LB Lennox besiyerine inokule edilerek 37°C'de, gece boyu, çalkalamalı inkübatörde, inkübasyona bırakılmış ve gelişen hücrelerden plazmid izolasyonu yapılmıştır.

3.2.11. *P. pastoris* GS115'e transformasyon

Doğrulama sonucu seçilen; pADH2SNT5α-α-Amilaz-Full Lenght ve pADH2SNT5α-α-Amilaz-Mature Form plazmidleri *Kpn2I* restriksiyon enzimi ile lineer hale getirilmiş ve %1'lik agaroz jelde görüntülenerek kontrolü sağlanmıştır. pADH2SNT5α-α-Amilaz plazmidleri *Kpn2I* restriksiyon enzimi ile lineer hale getirildikten ve saflaştırıldıktan sonra Lityum Asetat transformasyon metodu (Wu ve Letchworth, 2004) ile *P. pastoris* GS115 (Lityum Asetat yöntemi ile kompetent hale getirilen) kompetent hücrelerine aktarılmıştır. Elektroporasyon işlemi gerçekleştirmek için, 80 µl'lik elektrokompotent maya hücrelerine 4-5 µg doğrusallaştırılmış plazmid eklenip karıştırıldıktan sonra buz soğukluğundaki 2 mm elektroporasyon küvetine aktarılmış ve 5 dakika buzda bekletilmiştir. Süre sonunda karışım 1500 V akıma 5 ms süresince maruz bırakılmıştır. Sonrasında hemen 1 ml 1 M'lık soğuk sorbitol eklenerek 1.5 ml'lik santrifüj tüpüne aktarılmıştır. 30°C'de 1-2 saat inkübe edilen transformant hücreler farklı zeosin miktarı içeren (100 µg/ml, 500 µg/ml ve 1000 µg/ml) YPD plakalar üzerine yayılarak, 3 gün süresince 28°C sıcaklıkta inkübasyona tabi tutulmuştur. Plakalarda oluşan kolonilerin kontrolü gerçek zamanlı PZR ve α-amilaz salgılanmasının ön denemeleri ile sağlanmıştır.

3.2.12. Kolonilerden ME+Nişasta agar plakalarda α -amilaz salgılanmasının lugol çözeltisi ile görüntülenmesi

α -amilaz salgılanmasının bir ön kontrolü olarak; seçilen klonların sıvı saf kültür üretimlerinden nişasta ilaveli ME agara (%0.34 maya azot bazı, 4×10^{-5} biotin, %1 etanol, %1.5 agar, %0.4 çözülebilir nişasta) ekimleri gerçekleştirilmiştir. 28°C sıcaklıkta 2 gün boyunca inkübasyona bırakılan kolonilere indüksiyonun sağlanması için petri kapağına 24. ve 48. saatlerde 100 µl etanol eklenmiştir. Gelişen koloniler üzerine lugol çözeltisi eklenerek etraflarında berrak alan (zon) oluşumu olup olmadığı gözlenmiştir. Seçilen rekombinant suşların ön kontrolüne göre α -amilaz salgılanması olan suşların gerçek zamanlı PZR ile de doğrulanması sonucu üretim klonları seçilmiştir.

3.2.13. Genomik DNA izolasyonu

Gerçek Zamanlı PZR'de kullanılacak olan *P. pastoris* suşlarından genomik DNA izolasyonu için MasterPure Yeast DNA Purification Kiti (Epicentre Biotechnologies, WI, ABD) kullanılmıştır. Genomik DNA izolasyonunda, YPD agarda (%2 pepton, %1 maya ekstraktı, %2 glukoz, %1,5 agar) geliştirilen saf kültürdeki tek koloniden alınarak 3 ml YPD sıvı besiyerine ekim yapılmış ve çalkalamalı inkübatörde 28°C 225 rpm'de 24 saat geliştirilen kültürler kullanılmıştır. Gelişen kültürlerden tüplere örnek alınmış ve 5 dakika süresince 20000xg'de santrifüjlenmiştir. Sonrasında süpernatant kısım uzaklaştırılırken, kalan pelet üzerine 200 µl zimolaz enzimi içeren liziz solüsyonu eklenerek maya hücre duvarının parçalanması sağlanmıştır. Hücreler, -80°C'de 20 dakika bekletildikten sonra 95°C'de 2 dakika tutulmuş ve bu işlem art arda 6 kez tekrarlanmıştır. Daha sonra 30 sn yüksek devirde karıştırılmış, üzerine 200 µl kloroform eklenmiş ve 2 dakika daha karıştırılmıştır. Diş macunu rengini alan karışım 3 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Üstteki sıvı tabakadan alınarak içinde 400 µl %100 etanol bulunan yeni tüplere aktarılmış ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübe edilen örnekler 5 dakika santrifüjlenmiş, pelet kısmın üzerine 500 µl %70 etanol eklenmiş ve 2 dakika daha santrifüj edilmiştir. Pelet alınarak 60°C'de 10-12 dakika vakumlu kurutucuda bekletilmiş ve üzerine 20 µl TE tamponu eklenerek çözülmüştür. Son olarak 1 µl RNAz enzimi ilavesi ile 37°C'de en az 1 saat inkübe edilerek RNA'ların parçalanması sağlanmıştır. Elde edilen genomik DNA'lar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.14. Gen kopya sayısının belirlenmesi (gerçek zamanlı PZR)

Seçilen klonların kopya sayıları, *P. pastoris*'ten izole edilen genomik DNA'larına gerçek zamanlı PZR uygulanarak analiz edilmiştir. Gerçek Zamanlı PZR, Rotor gene SYBR Green PCR Kit'ine uygun şekilde gerçekleştirilmiştir. Kalibratör suş GS115, Referans gen *GAP* ve kopya sayısı belirlenecek promotor *ADH* olarak belirlenmiştir.

Genomik DNA'lar 5 ng'a seyreltilerek; kopya sayısı belirlenecek promotor (*ADH*) primerleri R-*ADH2A1*, F-*ADH2A1* ve referans gen primerleri (*GAP*), R-*GAPrt*, F-*GAPrt* 1:10 oranında seyreltilerek kullanılmıştır. SYBR Green karışımı (Çizelge 3.6) her bir primer çifti için ayrı hazırlanmış olup, gerçek zamanlı PZR tüplerine dağıtıldıktan sonra üzerine kalıp DNA'lar eklenmiştir. Reaksiyonun kurulduğu tüpler, Rotor Gene (Qiagen, Almanya) cihazına yerleştirilip program ayarlanmıştır.

Çizelge 3.6. SYBR Green karışımının hazırlanması

Sybr Green Tamponu	6.25 µl
İleri Primer	0.375 µl
Geri Primer	0.375 µl
Kalıp DNA	2 µl
Nükleaz İçermeyen Su	3.5 µl
TOPLAM	12.5 µl

Eşik değeri; bir örnekten üretilen sinyalin, arka plan floresanından daha büyük olduğu nokta olarak tanımlanmaktadır. C_t değeri ise eşik değerini aşmak için gerekli PZR döngü sayısıdır. Çizelge 3.7’de döngü programı için gerekli reaksiyon koşulları gösterilmiştir.

Çizelge 3.7. Gerçek zamanlı PZR programı için süre ve sıcaklık koşulları

Sıra	Sıcaklık (°C)	Süre (s)	Döngü Komut
PZR Başlangıç Adımı	95	300	
Denatürasyon	95	5	35-40 Döngü
Uzama	60	10	

Kopya sayıları $\Delta\Delta C_t$ ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) değerine göre belirlenmiştir. Verilerin normalizasyonu, referans olarak kullanılan GAP geni ile sağlanmıştır. Bu nedenle veriler, hesaplanan hedef gen kopyalarının referans genine oranı şeklinde verilmiştir.

C_t değeri manuel olarak belirlerken; elde edilen grafikte Threshold (eşik) değeri manuel olarak girilmiş, bu değere karar verirken log scale ekranında görünen grafikte eşik değeri logaritmik fazın başlangıcında, linear scale ekranında görünen grafikte eşik değeri logaritmik fazın ortalarında olacak şekilde ayarlanmıştır. Veriler değerlendirildiğinde; kalibratör suş 1 kopya olarak gösterilmiş, bu değer örneklerin değerinden çıkarılarak gen kopya sayısı bulunmuştur.

3.2.15. Engelli erlende protein üretimi

Gerçek zamanlı PZR ve α -amilaz salgılanmasının ön denemeleri sonucunda doğrulanan ve aynı kopya sayısına sahip olduğu tespit edilen rekombinant *P. pastoris* kolonilerinin 3 ml YPD sıvı besiyerine inokulumu yapılmış, 225 rpm, 28°C’de 20 saat geliştirilmiştir. Gelişen kolonilerin her biri 250 ml’lik engelli erlenlerdeki 50 ml BMGY besiyerine başlangıç OD₆₀₀’si 0.1 (yaklaşık 10⁶ hücre) olacak şekilde inokule edilmiş ve

16-18 saat boyunca 28°C ve 225 rpm’de geliştirilmiştir. BMGY (pH 6.0) besiyerinde çoğalan, yaklaşık 12 OD olan hücreler 3000xg’de 10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatantları uzaklaştırılmıştır. Elde edilen hücre peleti, farklı pH’lardaki 50 ml BMEY (pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 ve 7.0) besiyeri içinde süspanse edilmiş ve inkübasyona 96 saat boyunca aynı sıcaklık ve karıştırma koşullarında devam edilmiştir. Erlenmayer denemeleri 3 paralelli olarak yürütülmüştür. Örneklerden her birine 12 saatte bir yaklaşık 500 µl etanol eklemesi yapılmış, besiyerindeki etanol miktarının %1 olması sağlanmıştır. Ayrıca 24 saatte bir besiyerinden 1 ml örnek alınmış santrifüj edilerek süpernatantı ayrılmış ve enzim aktivitesi tayinlerinde kullanılmak üzere +4°C’ye kaldırılmıştır. Hücreler 96 saat sonunda 3000xg’de 10 dakika santrifüj edilerek hasat edilmiştir. En fazla enzimin üretildiği optimum pH’nın belirlenmesi için, BMGY besiyerinin pH’sı 6.0’da sabit tutulurken, BMEY besiyerinin pH’sı 3.0-7.0 arasında değiştirilerek üretim yapılmıştır.

Etanol ile beslemeye ek olarak glikoz ile besleme yapılmış olup α -amilaz enzimi, üretimleri karşılaştırılmıştır. Glikoz ile beslemede seçilen rekombinant *P. pastoris* kolonilerinin 3 ml YPD besiyerine inokulumu yapılmış, 225 rpm, 28°C’de 20 saat geliştirilmiştir. Gelişen kolonilerin her biri 250 ml’lik engelli erlenlerdeki 50 ml BYED (pH 6.0) besiyerine başlangıç OD₆₀₀’si 0.1 olacak şekilde inokule edilmiştir. İnkübasyona 96 saat boyunca 28°C sıcaklık ve 200 rpm karıştırma koşullarında devam edilmiştir. Erlenmayer denemeleri 3 paralelli olarak yürütülmüştür. Örneklerden her birine 24 saatte bir 5 ml %20’lik glikoz eklenmiş ve besiyerindeki glikoz miktarının %2 olması sağlanmıştır. Ayrıca 24 saatte bir besiyerinden 1 ml örnek alınmış santrifüj edilerek süpernatantı ayrılmış ve enzim aktivitesi tayinlerinde kullanılmak üzere +4°C’ye kaldırılmıştır. Hücreler 96 saat sonunda 3000xg’de 10 dakika santrifüj edilerek hasat edilmiştir.

3.2.16. Hücre yoğunluğunun belirlenmesi

Hücre yoğunlukları, tek kullanımlık spektrofotometre küvetleri ile Libra S50 (Biochrom, İngiltere) spektrofotometre cihazında, uygun besiyeri ile seyreltilen sıvı kültür örneklerinin, köre karşı, 600 nm dalga boyunda absorbanlarının ölçülmesiyle spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. 1 OD₆₀₀ değeri 10⁷ hücre sayısına denk gelmektedir (Chen vd. 2012).

3.2.17. α -Amilaz aktivitesinin belirlenmesi

Kültür süpernatantlarının α -amilaz aktivitesi kolorimetrik bir yöntem olan DNSA reaktifi yöntemi (Bernfeld 1955) ile gerçekleştirilmiştir. DNSA yöntemi uygulanırken kullanılan çözeltiler Çizelge 3.8’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.8. DNSA yönteminde kullanılan çözeltiler ve hazırlanışı

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

Çizelge 3.9. DNSA yönteminin aşamaları ve kullanılan bileşen miktarları

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

Analizlerde Ek-3'te bu yöntemle göre çözelti F'nin seyreltilmesi ile hazırlanan standart maltoz çözeltileri kullanılarak elde edilen standart eğriye bir örnek verilmiştir. Aktivite ölçümleri 3 paralelli olarak gerçekleştirilmiştir. Hem örnek analizleri hem de standart maltoz analizleri köre karşı okutularak absorbans değerleri ölçülmüştür. Standart eğriden elde edilen formülden örneğin α -amilaz enziminin aktivitesi hesaplanmıştır. Glikoz ile besleme yapılarak üretilen α -amilaz enzimi aktivite tayinlerinde kontrol örnekleri de analiz edilerek besiyerinden gelen glikoz (indirgen şeker) miktarı elimine edilmiştir.

Bir enzim ünitesi: 50° C ve pH 6.9 koşullarında, 1 dakikada, 1.0 mg maltoz açığa çıkarması için gerekli olan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

$$\text{Aktivite(U/ml)}: \frac{OD * \text{Dilüsyon miktarı}}{\text{Standart eğrinin eğimi} * \text{Enzim miktarı (ml)} * \text{İnkübasyon süresi (dk)}}$$

3.2.18. SDS-PAGE analizi

SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE) OWL P8D8 (Thermo Scientific) cihazı ile %5 poliakrilamid yükleme jeli (dH₂O, %30 akrilamid, 8X yükleme jeli tamponu, %20 SDS, %20 APS, TEMED) ve %10 poliakrilamid ayırma jeli (dH₂O, %30 akrilamid, 4X yükleme jeli tamponu, %20 SDS, %20 APS, TEMED) olacak şekilde hazırlanarak yürütülmüştür.

Protein üretimi için geliştirilen hücrelerden ayrılan süpernatantlar, toplam hacim 50 µL olacak şekilde 1:3 oranında 4X SDS jel yükleme tamponu (%8 SDS, %40 Glycerol, 200 mM Tris-Cl, pH 6.8, %0.4 Bromphenol Blue ve 0.1 M DTT) ile karıştırılarak hazırlanmış ve 70°C'de 10 dakika bekletilerek denatüre edilmiştir. Sonra buz üzerine alınmış ve hazırlanan jele 10 µl örnek yüklenmiştir.

Elektrofrez işlemi, jelin, 1X TGS (0.025 M Tris base, 0.192 M Glycine, %0.1 SDS, pH 8.3) tamponunda 150 V akımda 60 dakika yürütülmesi ile tamamlanmıştır. Daha sonra jel, Coomassie brillant blue içeren boyama tamponu (0.1 g Coomassie blue R250, %10 asetik asit, %20 metanol, %70 H₂O) ile 1 saat orbital çalkalayıcı üzerinde boyanmış, boya içermeyen aynı özellikteki tampon (%10 asetik asit, %20 metanol, %70 H₂O) ile protein bantları görünür hale gelene kadar yıkandıktan sonra Odyssey görüntüleme sistemi (Li-Cor, NE; ABD) ile görüntülenmiştir. Protein standardı olarak PageRuler Unstained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD) kullanılmıştır.

3.2.19. Toplam protein tayini

Süpernatant örneklerinde toplam protein miktarı tayini Bradford yöntemi kullanılarak Coomassie Plus Assay Kit protokolüne uygun şekilde ölçülmüştür. Protein standardında sığır serum albumini (BSA) kullanılmıştır. Protein konsantrasyonu, örneklerle birlikte okutulan BSA standart çözeltilerinin (25-2000 µg/ml) absorbans değerleri referans alınarak belirlenmiştir.

1.5 ml Bradford çözeltisi içerisine 50 µl süpernatant örneği eklenmiş ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiştir. İnkübe edilen örneklerin spektrofotometrede 595 nm dalga boyunda absorbansları okunmuştur. Standartların okutulması sonucu oluşturulan standart grafiğinden elde edilen formülden örneğin toplam protein miktarı

hesaplanmıştır. Analizlerde Ek-4'te bu yöntemle göre hazırlanan BSA standart çözeltileri kullanılarak elde edilen standart eğriye bir örnek verilmiştir.

3.2.20. *EndoH_f* ile deglikozilasyon

Glikozilasyonun tespiti ve glikolize olmayan rekombinant proteinin molekül ağırlığının doğrulanması için protein denatüre edildikten sonra *EndoH_f* enzimi ile muamele edilmiştir. Toplam protein tayini ile protein miktarı ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) belirlenen örneklerle uygulanan reaksiyon basamakları Çizelge 3.10'da gösterilmiştir.

Çizelge 3.10. *EndoH_f* enzimi ile deglikozilasyonun aşamaları

Reaksiyon Bileşeni	Miktar
1-20 μg Protein ($\sim 3 \mu\text{g}$)	18 μl
10X Glikoprotein Denatürasyon Tamponu	2 μl
100°C de 10 dakika inkübe edilmesi	
1 dakika buz üzerinde bekletilmesi	
10X GS Reaksiyon Tamponu	4 μl
<i>EndoH_f</i> Enzimi	0.6 μl
Ultra Saf Su	15.4 μl
37°C sıcaklıkta 3 saat inkübe edilmesi	

3.2.21. Hücre bankasının hazırlanması

Biyoreaktörde üretime alınan klonun standardizasyonunu sağlamak amacı ile hücre bankası hazırlanmıştır. -80°C stok kültürden YPD plakalara tek koloni düşürecek şekilde çizim yapılmış ve inkübatörde 28°C'de 3 gün geliştirilmiştir. Gelişen tek kolonilerden 3 ml YPD sıvı besiyerine inokulum yapılmış ve çalkalamalı inkübatörde, 28°C 225 rpm'de geceboyu geliştirilmiştir. Ertesi gün bu kültürden BYED besiyerine başlangıç OD₆₀₀'si 0.1 olacak şekilde ekim yapılmış, OD₆₀₀ değeri 10-12 olana kadar aynı koşullardaki çalkalamalı inkübatörde geliştirilmiştir. %80 gliserol ile 3:1 oranında karıştırılan kültür, tüplere 1.5 ml olacak şekilde dağıtılmış ve -80°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.22. İnokulumun hazırlanması

-80°C'den alınan hücre bankası çözülerek, 500 ml'lik engelli erlendeki 100 ml BMGY besiyeri içerisine ilave edilmiştir. Maya kültürü, OD₆₀₀ değeri 8-10 oluncaya kadar çalkalamalı inkübatörde yaklaşık 12 saat geliştirilmiştir. Gelişimi sağlanan 100 ml inokulumun tamamı, 2 L başlangıç besiyeri içeren biyoreaktöre aseptik olarak aktarılmıştır. Her bir biyoreaktör hazinesi için ayrı inokulum hazırlanmıştır.

3.2.23. Biyoreaktör çalışmaları ile rekombinant α -amilaz üretimi

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



Şekil 3.1. Çalışmadaki fermentasyonların gerçekleştirildiği Biostat B (Sartorius Stedim Systems, Almanya) biyoreaktörü

Sistemdeki pH, sıcaklık, karıştırıcı hızı, çözülmüş oksijen (% ÇO), hava ve oksijen hızı, köpüklenme ve besleme hızı proses süresince kontrol edilebilen parametrelerdir. Ortamın pH'sı pH probu ile anlık olarak ölçülür ve pH'nın ayarlanan değerinde sabit kalması için dahili bir pompa ile ortama baz solüsyonu ilave edilir. Sıcaklık ise sıcaklık probu tarafından anlık olarak ölçülerek sıcaklığın istenilen değerinde sabit kalması için harici bir soğutucu tarafından biyoreaktörün ceketine soğutma ajanlı sıvı akışı gerçekleştirilmektedir. Karıştırma işlemi, 2 adet 6 kanatlı disk takılı olan karıştırıcı tarafından gerçekleştirilir. Çözülmüş oksijen oranı (%) DO (dissolved oxygen) probu ile anlık olarak ölçülür ve % ÇO 'nun %20 değerinde kalması için ana oksijen kaynağı olarak sisteme kompresör tarafından sağlanan hava kullanılır. Hava oksijeninin yeterli olmadığı durumlarda, hava ile %0-100 aralığında saf oksijen karıştırılarak ortama verilir. Ortama verilen oksijenin homojen olarak dağılımını sağlamak için hava fermentasyon ortamına hava dağıtıcısı aracılığı ile sağlanır. Bu sayede hava sıvı içerisinde baloncuklar oluşturarak dağılır. Proses ilerledikçe oluşan köpüklenmeler seviye (köpük) probu ile tespit edilir, proba köpük değmesi sonucunda sisteme dahili bir pompa ile %5'lik köpük kırıcı solüsyon (Antifoam C Emulsion, Sigma A8011) ilave edilir. Besleme çözeltisi, biyoreaktör kontrol sistemine bağlı harici bir peristaltik pompa (Watson Marlow 120U, İngiltere) ile profile uygun bir şekilde biyoreaktöre verilir.

3.2.23.1. Kesikli faz

Fermentasyonun ilk aşaması olan kesikli faz, %4 gliserol içeren 2 L temel tuz besiyeri (BSM) (Çizelge 3.11) ve 4.55 ml/l PTM1 tuzlarından (Çizelge 3.12) oluşan fermentasyon ortamında gerçekleştirilmiş ve inokulum yapıldıktan sonra yaklaşık olarak 18-20 saat sürdürülmüştür. Fermentasyon 28°C ve pH 5.0'te gerçekleştirilmiş olup pH kontrolü %25'lik (a/h) amonyum hidroksit çözeltisi ile sağlanmıştır.

Çizelge 3.11. BSM tuzunun içeriği

Bileşen Adı ve Formülü	Miktar
Fosforik asit (H_3PO_4) (%85)	26.7 ml
Kalsiyum Sülfat ($CaSO_4$)	0.93 g
Potasyum Sülfat (K_2SO_4)	18.2 g
Magnezyum Sülfat-7H ₂ O ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	14.9 g
Potasyum Hidroksit (KOH)	4.13 g
Gliserol	40 g
Saf Su	1 L'ye tamamlama

Çizelge 3.12. PTM1 tuzunun içeriği

Bileşen Adı ve Formülü	Miktar
Bakır Sülfat-5H ₂ O (CuSO ₄ -5H ₂ O)	6 g
Sodyum İyodit (NaI)	0.08 g
Manganaz Sülfat-H ₂ O (MnSO ₄ -H ₂ O)	3 g
Sodyum Molibdat-2H ₂ O (Na ₂ MoO ₄ -2H ₂ O)	0.2 g
Borik Asit (H ₃ BO ₃)	0.02 g
Kobalt Klorit (CoCl ₂)	0.5 g
Çinko Klorit (ZnCl ₂)	20 g
Demir Sülfat-7H ₂ O (FeSO ₄ -7H ₂ O)	65 g
Biotin	0.2 g
Sülfürik Asit (H ₂ SO ₄)	5 ml
Saf Su	1 L'ye tamamlama

Çözünmüş oksijen seviyesi %20 değerine ayarlanmış %ÇO değeri istenilen değerin (%20) altına düştüğünde sistem tarafından öncelikle karıştırma hızı 600 rpm'den 900 rpm'e kadar çıkarılmış, karıştırma hızının yeterli olmadığı noktada sisteme giren hava %0-100 aralığında saf oksijenle karıştırılarak ortama verilmiştir. Böylece kesikli faz süresince %ÇO değeri otomatik olarak sabit tutulmuştur (cascade modu). Kesikli faz sonunda yaş hücre yoğunluğunun yaklaşık 100-120 g/L civarında olması beklenmiştir. Ortamdaki gliserolün varlığı çözünmüş oksijen seviyesi takip edilerek izlenmiş, gliserolün tükenmesi sonucu çözünmüş oksijen miktarında ani bir artış gözlenmiş ve böylece kesikli faz sonlandırılmıştır.

3.2.23.2. Yarı-kesikli faz

Fermentasyonun ikinci aşaması olan yarı-kesikli faz (besleme fazı), çözünmüş oksijen değerinin pik yaptığı (DO spike olma durumu) noktada kesikli fazın sonlanması ile birlikte esas olarak protein üretiminin gerçekleştiği fazdır. Bu fazda normoksik şartlarda (ÇO %20) gerçekleştirilen sabit spesifik gelişim hızı (sabit μ) stratejisi (üstel besleme) uygulanmıştır. μ :0.028 sa⁻¹ (deneysel olarak önceki bir çalışmada hesaplanan) olacak şekilde, *ADH2* promotörü için uygun indükleyici karbon kaynağı olan %100 etanol (12 ml/l PTM1 tuzu içeren) ile kademeli olarak artırılarak besleme yapılmıştır. Yarı-kesikli faz boyunca sıcaklık 28°C ve hava 1 vvm olarak sabit tutulurken, pH değeri 6.0 olacak şekilde profil girilmiştir. %ÇO değerinin %20'lerde tutulabilmesi için sistem

Cascade moduna alınarak karıştırma hızı (600-900 rpm) ve O₂ (%0-100) ile kontrolü sağlanmıştır. Fermentasyon işleminin zamana karşı besleme profili Çizelge 3.13'te verilmiştir. Rekombinant proteinin üretildiği etanol besleme fazı, profile uygun şekilde kademeli olarak artırılarak sürdürülmüş, biyoreaktörün maksimum seviyeye ulaşması nedeniyle 90. saat sonunda sonlandırılmıştır.

Çizelge 3.13. Zamana karşı etanol besleme profili

Zaman (0-90. saat)	Besleme Hızı (ml/l/sa)
0-18. saat	2.2
18-30. saat	4.3
30-42. saat	5.8
42-50. saat	6.7
50-58. saat	7.7
58-66. saat	8.6
66-74. saat	9.7
74-82. saat	10.6
82-90. saat	11.4

Belirli aralıklarla biyoreaktördeki hücre kültüründen yaklaşık 15 ml örnek alınmış, alınan örneklerden boş olarak tartımları yapılmış 2 ml'lik tüplere (3 paralelli) 1'er ml dağıtıldıktan sonra tüpler +4°C'de 15000xg'de 5 dakika süresince santrifüjlenerek hücreler çöktürülmüştür. Elde edilen süpernatant 0.45 µm filtreden geçirilerek analizlere kadar +4°C'de muhafaza edilmiş, pelet ise 2 kez 1'er ml ultra saf su içinde süspanse edilerek tekrar çöktürülmüş, yıkanan peletlerin tartımları yapılmıştır. Hücre konsantrasyonu yaş hücre ağırlığı olarak gravimetrik yöntemle hesaplanmış olup 3 paralelin ortalaması alınarak hücre konsantrasyonu g_{yha}/l olarak kaydedilmiştir. Yarı-kesikli faz esnasında spesifik gelişim hızı (µ), hücre konsantrasyon değerlerinin (yha, g/l) hacim (l) ile çarpılması sonucu elde edilen toplam biyokütle değerlerinin zamana karşı çizilen grafiğinden hesaplanmıştır.

3.2.24. α-Amilaz enziminin karakterizasyonu

3.2.24.1. Enzimin optimum çalıştığı pH'nın ve pH stabilitesinin belirlenmesi

Enzimin çalıştığı optimum pH'nın belirlenmesi için pH 5.0-9.0 aralığında (5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 ve 9.0) ayarlanmış 6.7 mM NaCl içerikli 20 mM sodyum fosfat tamponu kullanılmıştır. %1'lik nişasta çözeltisi her bir pH tamponu için ayrı ayrı hazırlanmıştır. Süpernatant örnekleri her pH'nın kendi tamponunda belirli oranlarda

seyreltilmiş ve diğer tepkime koşulları aynı tutularak (sıcaklık 50°C) DNSA reaktifi yardımıyla enzim aktivitesi spektrofotometrik (540 nm) olarak ölçülmüştür.

Enzimin pH stabilitesinin belirlenmesi için pH 5.0-9.0 aralığında ayarlanmış 6.7 mM NaCl içerikli 20 mM sodyum fosfat tamponu ile süpernatant örnekleri belirli oranlarda seyreltilmiş ve oda sıcaklığında (22°C) 1 saat inkübe edilmiştir. %1'lik nişasta çözeltisi her bir pH tamponu için ayrı ayrı hazırlanmış olup diğer tepkime koşulları aynı tutularak (sıcaklık 50°C) DNSA reaktifi ile enzim aktivitesi spektrofotometrik (540 nm) olarak ölçülmüştür.

3.2.24.2. Enzimin optimum çalıştığı sıcaklığın ve sıcaklık stabilitesinin belirlenmesi

Enzimin çalıştığı optimum sıcaklığın belirlenmesi için 20-80°C (20, 30, 40, 50, 60, 70 ve 80) arasındaki sıcaklıklarda çalışılmıştır. %1'lik nişasta çözeltisi pH 6.9 olacak şekilde ayarlanan 6.7 mM NaCl içerikli 20 mM sodyum fosfat tamponu kullanılarak hazırlanmıştır. Süpernatant örnekleri aynı tampon ile belirli oranlarda seyreltilerek hazırlanmış ve örnekler 20-80°C arasındaki sıcaklıklarda, diğer tepkime koşulları aynı tutularak (pH 6.9) DNSA reaktifi yardımıyla enzim aktivitesi spektrofotometrik (540 nm) olarak ölçülmüştür.

Enzimin sıcaklık stabilitesinin belirlenmesi için 20-80°C arasındaki sıcaklıklarda çalışılmıştır. Tampon çözeltisi olarak pH 6.9 olacak şekilde ayarlanan 6.7 mM NaCl içerikli 20 mM sodyum fosfat tamponu kullanılmıştır. Aynı tampon ile %1'lik nişasta çözeltisi ve belirli oranlarda seyreltilen süpernatant örnekleri hazırlanmış ve örnekler 20-80°C arasındaki sıcaklıklarda 1 saat inkübe edilmiştir. Diğer tepkime koşulları aynı tutularak (pH 6.9) DNSA reaktifi ile enzim aktivitesi spektrofotometrik (540 nm) olarak ölçülmüştür.

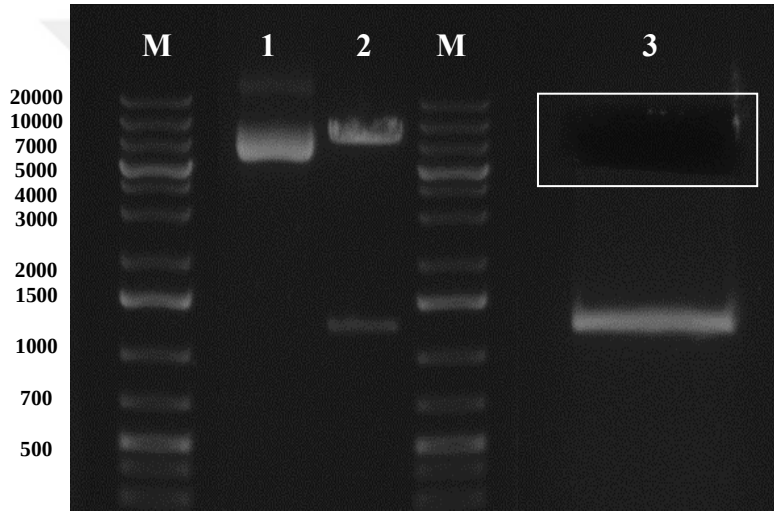
3.2.24.3. Metal iyonlarının enzim aktivitesine etkisinin belirlenmesi

Metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi için; CaCl₂, CuCl₂, FeCl₂, MgCl₂ ve ZnCl₂ çözeltileri kullanılmıştır. Tampon olarak pH 6.9 olacak şekilde ayarlanan 6.7 mM NaCl içerikli 20 mM sodyum fosfat tamponu, substrat çözeltisi olarak aynı tampon ile hazırlanmış %1'lik nişasta çözeltisi kullanılmıştır. Metal iyonları 2 ve 10 mM olacak şekilde ortama eklenmiştir. Kontrol olarak metal iyonu içermeyen ortam kullanılmış ve diğer tepkime koşulları aynı tutularak (pH 6.9) DNSA reaktifi ile enzim aktivitesi spektrofotometrik (540 nm) olarak ölçülmüştür. Kontrol ortamının enzim aktivitesi %100 olarak kabul edilmiş olup diğer metal iyonları ilave edilen ortamların aktivite değişimleri kontrole göre kıyaslanarak % şeklinde ifade edilmiştir. Her bir metal iyonu konsantrasyonun aynı konsantrasyondaki kontrole göre bağıl aktivite değişimi ve aynı metal iyonunun konsantrasyonları arası bağıl aktivite değişimi SPSS Statistics (PASW Statistics) programı kullanılarak iki yönlü ANOVA testi ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. pADH2SNT5 α -Fito Plazmidinin İzolasyonu, Plazmidin Doğrulanması ve pADH2SNT5 α Plazmid Parçasının Eldesi

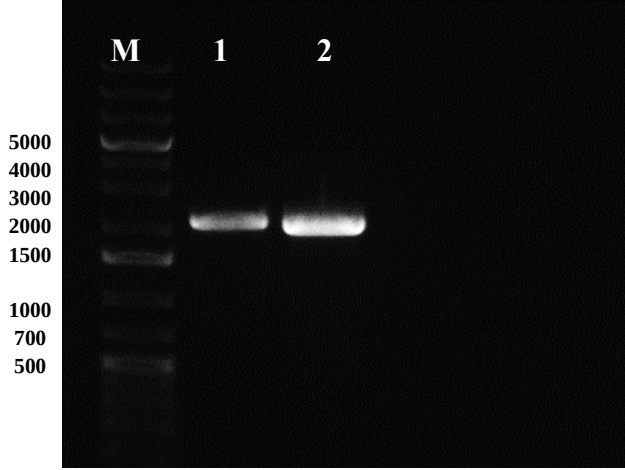
pADH2SNT5 α -Fito plazmidini içeren *E. coli* DH5 α klonunun zeosin içeren LB Lennox sıvı besiyerine inokulümü gerçekleştirilmiş, çalkalamalı inkübatörde 37°C’de gece boyu inkübasyona bırakılmış ve ertesi gün plazmid izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen pADH2SNT5 α -Fito plazmidinin, *Not*I ve *Xho*I restriksiyon enzimleri ile kesimi ve %1’lik agaroz jelde yürütülmesi sonucunda 7631 bç (fitaz geni düşürülmüş pADH2SNT5 α plazmid parçası) ve 1246 bç (fitaz geni) uzunluğundaki beklenen DNA parçalarının elde edilmesi ile doğrulanması sağlanmıştır. Doğrulanmış plazmitten istenilen büyüklükteki molekül ağırlığına sahip (7631 kDa) fitaz geni düşürülmüş, pADH2SNT5 α plazmid parçası jel pürifikasyonu yapılarak elde edilmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. pADH2SNT5 α -Fito plazmidinin *Not*I ve *Xho*I restriksiyon enzimleri ile kesiminin jel görüntüsü M: 1 kb DNA standardı, 1: pADH2SNT5 α -Fito plazmid (kesim olmayan kontrol), 2: pADH2SNT5 α -Fito plazmidinin doğrulanması (kesim kontrol), 3: pADH2SNT5 α plazmid parçasının (7631 bç) jelden kesilmesi

4.2. α -Amilaz Geninin PZR ile Çoğaltılması

pUC57- α -Amilaz plazmidini içeren *E. coli* XL1-Blue hücreleri, amfisilinli LB Miller sıvı besiyerine inokule edilerek 37°C’de, gece boyu, çalkalamalı inkübatörde geliştirilmiştir. Ertesi gün gelişen *E. coli* hücrelerinden plazmid izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen pUC57- α -Amilaz plazmid; PZR için kalıp DNA olarak kullanılmış olup, tasarlanan F-*Amyl*-*Xho*I/R-*Amyl*-*Not*I ve F-*Amyl*-*Mtr*-*Xho*I/R-*Amyl*-*Not*I primer çiftleri ile PZR reaksiyonu sonucunda α -amilaz geninin; tam uzunluktaki (full length, 1983 bç) formu ve olgun (mature, 1860 bç) formu elde edilmiştir. Elde edilen PZR ürünlerinin %1’lik agaroz jelde yürütülerek kontrolü sağlanmış (Şekil 4.2) ve bantların doğrulanması sonucunda saflaştırılmıştır.



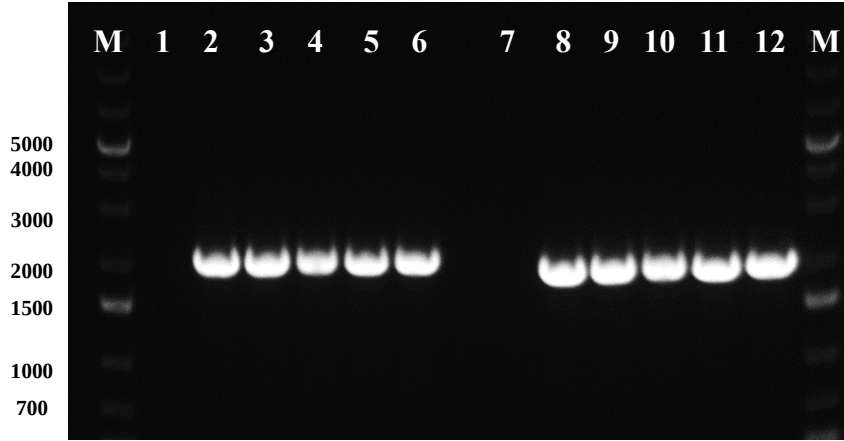
Şekil 4.2. PZR sonrası elde edilen ürünlerin jel görüntüsü M: 1 kb DNA standardı, 1: α -amilaz geninin tam uzunluktaki formu (1983 bç), 2: α -amilaz geninin olgun formu (1860 bç)

4.3. pADH2SNT5 α Vektörünün α -Amilaz Geni ile Ligasyonu ve pADH2SNT5 α - α -Amilaz Plazmidinin *E. coli*'ye Transformasyonu

Elde edilen pADH2SNT5 α plazmid parçası (7631 bç) ve α -amilaz genini kodlayan her iki formdaki (tam uzunluktaki formu-1983 bç ve olgun formu-1860 bç) DNA parçalarının uç kısımlarının ligasyona uygun hale getirilmesi için *NotI* ve *XhoI* restriksiyon enzimleri ile kesimi gerçekleştirilmiştir. Yapışkan uçlu hale getirilen DNA parçalarının vektöre ligasyon işlemleri sonucunda; pADH2SNT5 α plazmid parçası (7631 bç) ve α -amilaz geninin tam uzunluktaki formunun (1983 bç) ligasyonu ile pADH2SNT5 α - α -Amilaz-Full Length plazmidi (9614 bç), pADH2SNT5 α plazmid parçası (7631 bç) ve α -amilaz geninin olgun formunun (1860 bç) ligasyonu ile pADH2SNT5 α - α -Amilaz-Mature plazmidi (9491 bç) oluşturulmak üzere iki ayrı ligasyon kurulmuştur.

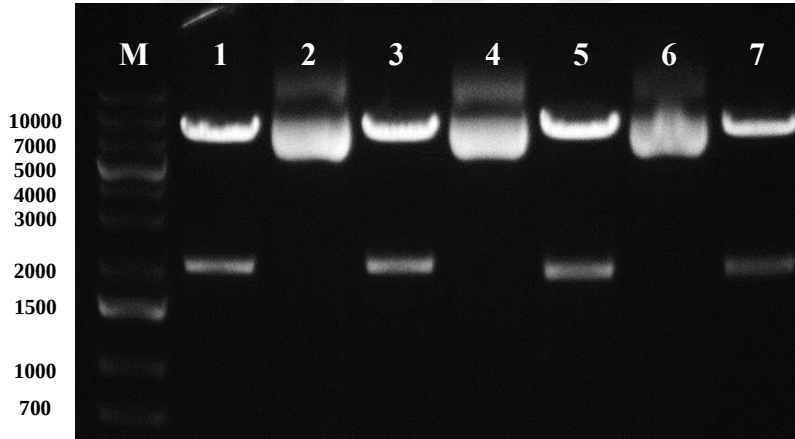
Ligasyon karışımları *E. coli* DH5 α hücrelerine transforme edilmiştir. Transformant hücreler 25 μ g/ml zeosin içeren LB Lennox plakalara ekilmiş ve 37°C'de gece boyu geliştirilmiştir. Plakada gelişen kolonilerden her iki plazmid için ayrı ayrı 5'er tane koloni seçilmiştir. Transformant *E. coli* hücrelerinden pozitif klonların doğrulanması ve seçimi, Koloni PZR ve kesim reaksiyonu (*XhoI* ve *NotI*) ile sağlanmıştır.

Pozitif klonların doğrulanması amacı ile ilk olarak Koloni PZR yapılmış olup, seçilen α -Amilaz-Full Length (1983 bç) ve α -Amilaz-Mature (1860 bç) formlarını içeren transformant *E. coli* hücreleri reaksiyon karışımında kalıp olarak kullanılmıştır. Aynı PZR koşullarında (Çizelge 3.3, Çizelge 3.4 ve Çizelge 3.5'te gösterildiği gibi) gerçekleştirilen reaksiyonda α -amilaz geni çoğaltılarak %1'lik agaroz jelde görüntülenmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Pozitif klonun Koloni PZR ile doğrulanması M: 1 kb DNA standardı, 1: Kalıp DNA içermeyen kontrol (Full Lenght primerleri ile), 2: Full L.-1, 3: Full L.-2, 4: Full L.-3, 5: Full L.-4, 6: Full L.-5; 7: Kalıp DNA içermeyen kontrol (Mature primerleri ile), 8: Mature F.-1, 9: Mature F.-2, 10: Mature F.-3, 11: Mature F.-4, 12: Mature F.-5

Jel görüntüsüne göre aktarılan plazmidi taşıdığı doğrulanmış kolonilerden; Full L.-1, Full L.-2 ve Mature F.-1, Mature F.-2 klonları seçilmiştir. Seçilen klonlar zeosinli (25 µg/ml) LB Lennox sıvı besiyerine inokule edilmiş ve çalkalamalı inkübatörde 37°C’de gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. Geliştirilen hücrelerden plazmid izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen plazmidlerin *XhoI* ve *NotI* restriksiyon enzimleri ile kesimi gerçekleştirilmiş olup %1’lik agaroz jelde görüntülenmiştir (Şekil 4.4).

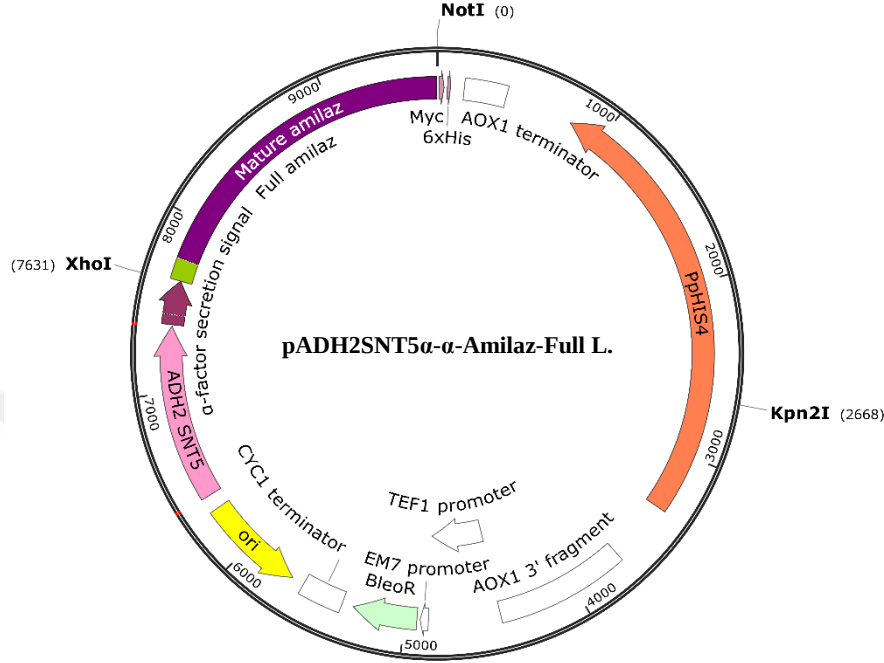


Şekil 4.4. Seçilen klonların kesim reaksiyonu ile doğrulanması M: 1 kb DNA standardı, 1: FL-1 plazmidi (kesim kontrol), 2: FL-1 plazmidi (kesim olmayan kontrol), 3: FL-2 plazmidi (kesim kontrol), 4: FL-2 plazmidi (kesim olmayan kontrol), 5: MF-1 plazmidi (kesim kontrol), 6: MF-1 plazmidi (kesim olmayan kontrol), 7: MF-2 plazmidi (kesim kontrol)

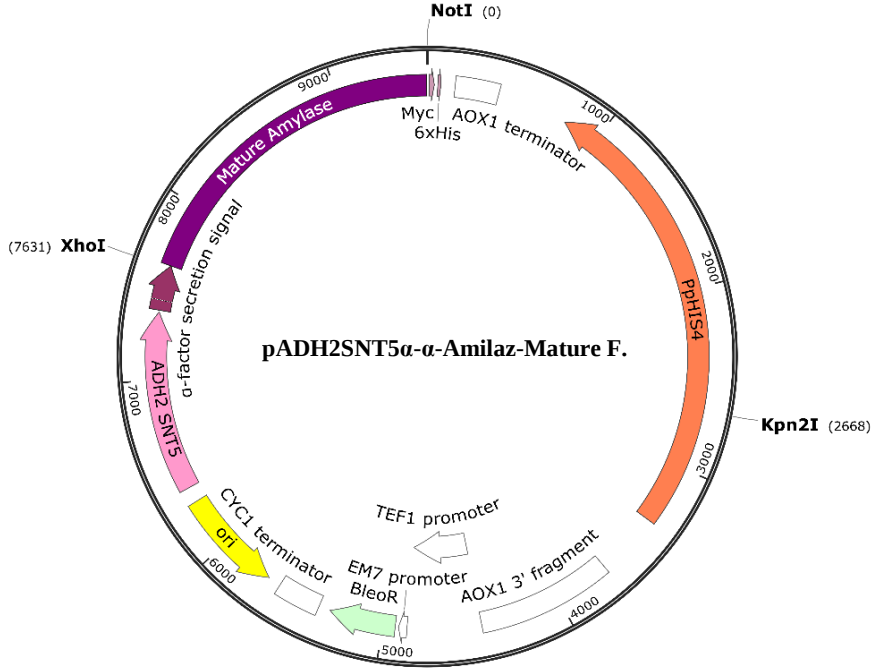
Şekil 4.4’te Full L.-1 klonu FL-1, Full L.-2 klonu FL-2, Mature F.-1 klonu MF-1 ve Mature F.-2 klonu MF-2 olarak gösterilmiştir. Kesim olmayan FL-1 ve FL-2 plazmidi 9614 bp, *XhoI* ve *NotI* enzimleri ile kesilen FL-1 ve FL-2 plazmidi 7631 bp ile 1983 bp, kesim olmayan MF-1 ve MF-2 plazmidi 9491 bp, *XhoI* ve *NotI* enzimleri ile kesilen MF-1 ve MF-2 plazmidi 7631 bp ile 1860 bp uzunluğunda olması beklenmiştir. Plazmidlerin

restriksiyon enzimleri ile doğrulanması sonucunda FL-2 ve MF-1 plazmidleri seçilmiştir. Doğrulan klonlardan -80°C'ye gliserol stoğu yapılmıştır.

4.4. α -Amilaz Enzimi Ekspresyonunda Kullanılan Plazmidlerin Oluşturulması



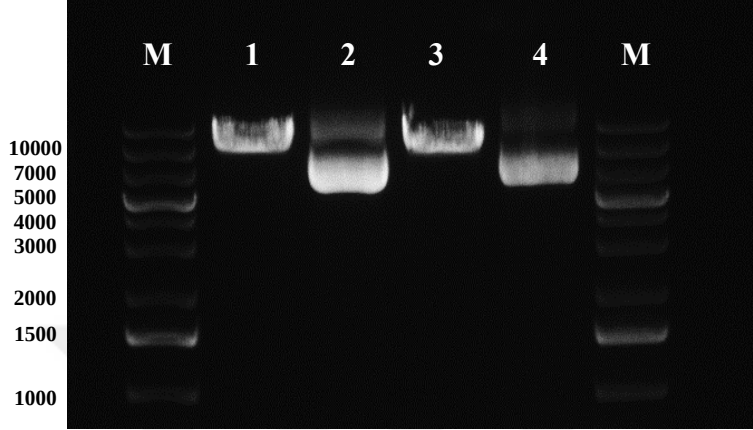
Şekil 4.5. Ligasyon sonrası elde edilen pADH2SNT5 α -Amilaz-Full Length (FL) plazmidinin görüntüsü (9614 bp)



Şekil 4.6. Ligasyon sonrası elde edilen pADH2SNT5 α -Amilaz-Mature Form (MF) plazmidinin görüntüsü (9491 bp)

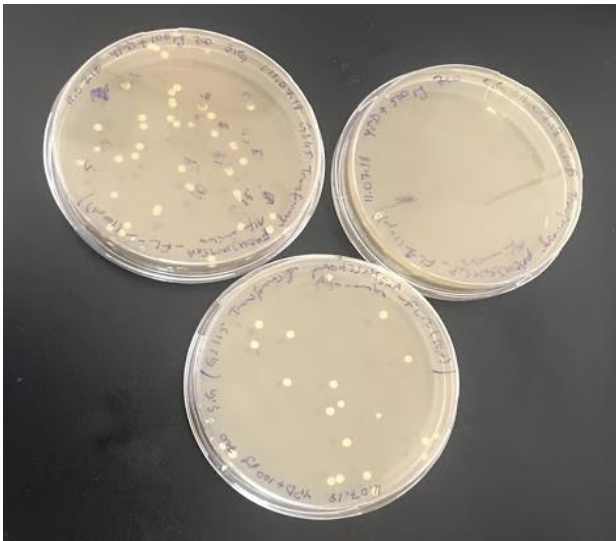
4.5. Doğrulan Ekspresyon Vektörlerinin Lineerleştirilmesi ve *P. pastoris* GS115'e Transformasyonu

Doğrulanma sonucu seçilen; pADH2SNT5 α - α -Amilaz-Full Length (2) ve pADH2SNT5 α - α -Amilaz-Mature Form (1) plazmidleri *Kpn*2I restriksiyon enzimi ile lineer hale getirilmiş ve %1'lik agaroz jelde yürütülerek kontrolü sağlanmıştır (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Plazmidlerin *Kpn*2I restriksiyon enzimi ile lineerleştirilmesinin kontrolü M: 1 kb DNA standardı, 1: FL-2 plazmidi (kesim kontrol), 2: FL-2 plazmidi (kesim olmayan kontrol), 3: MF-1 plazmidi (kesim kontrol), 4: MF-1 plazmidi (kesim olmayan kontrol)

pADH2SNT5 α - α -Amilaz plazmidleri *Kpn*2I restriksiyon enzimi ile lineer hale getirildikten ve saflaştırıldıktan sonra *P. pastoris* GS115 kompetent hücrelerine ayrı ayrı transforme edilmiştir. Transformant hücreler farklı zeosin miktarı içeren (100 μ g/ml, 500 μ g/ml ve 1000 μ g/ml) YPD plakalara yayılarak, 3 gün süresince 28°C sıcaklıkta inkübasyona tabi tutulmuştur. 1000 μ g/ml'lik plakalarda gelişim gözlenmez iken 500 μ g/ml ve 100 μ g/ml'lik plakalarda gelişim gözlenmiş olup gelişen kolonilerden rastgele seçilerek YPD sıvı besiyerine inokule edilmiştir (Şekil 4.8).

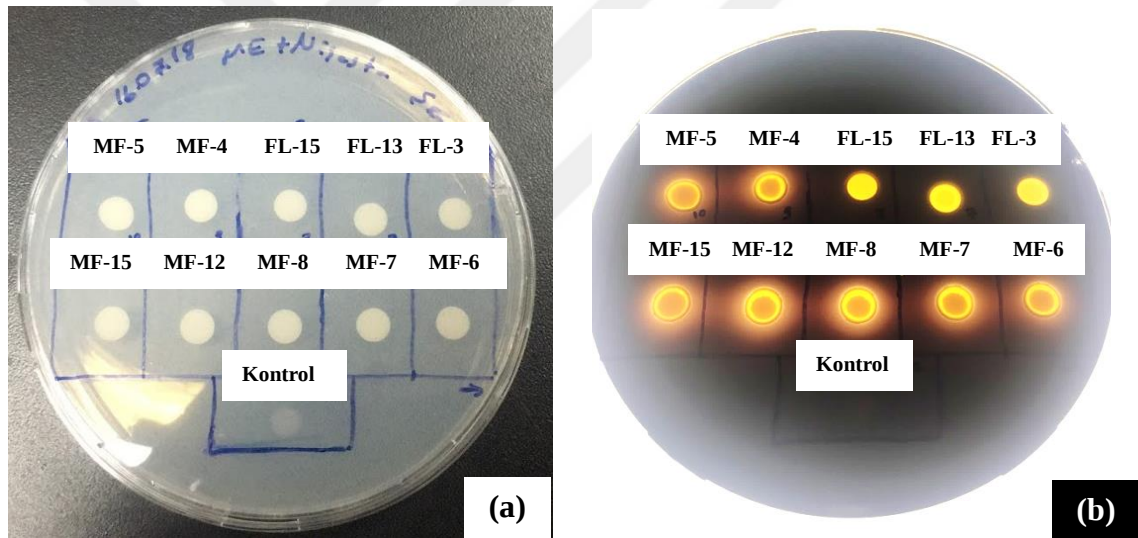


Şekil 4.8. YPD agarda gelişen transformant *P. pastoris* kolonilerinin görüntüsü

4.6. Seçilen Klonların α -Amilaz Salgılama Yeteneklerinin Belirlenmesi

Seçilen *P. pastoris* GS115 transformantlarının α -amilaz salgılama yeteneğini doğrulama amacı ile sıvı saf kültür üretimlerinden, nişasta ilaveli minimal etanol plakalara, transforme edilmiş 10 koloni ve transforme edilmemiş kontrol susu ekilmiş, 28°C sıcaklıkta 2 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Gelişen koloniler üzerine lugol çözeltisi eklenerek etraflarında berrak alan (zon) oluşumu olup olmadığı gözlenmiştir (Şekil 4.9).

Nişasta ilaveli plakaların lugol çözeltisi ile muamele edilmesi sonucunda koloni etrafında oluşan zon amilaz aktivitesi varlığını göstermektedir. Şekil 4.9'da gösterilen lugol çözeltisi ile boyanan plakada; MF-4, MF-5, MF-6, MF-7, MF-8, MF-12 ve MF-15 klonlarında benzer büyüklükte zonlar görünür iken FL-3, FL-13 ve FL-15 klonlarında zonlar net bir şekilde görülememiştir. Bunun sebebinin, FL klonlarının α -amilaz salgılamasının MF klonlarına göre oldukça düşük olması ile zonların yeterince belirgin olmaması ya da seçilen FL klonlarına transformasyonun doğru gerçekleşmemiş olması şeklinde yorumlanmıştır. Rekombinant suşların kopya sayılarının belirlenmesi, üretim klonlarının seçilmesi ve doğrulanması için gerçek zamanlı PZR uygulanmıştır.



Şekil 4.9. Klonların (a) nişasta ilaveli minimal etanol plakalara ekilmesi ve (b) α -amilaz salgılanmasının lugol çözeltisi ile görüntülenmesi

4.7. Gerçek Zamanlı PZR ile Seçilen Klonların Gen Kopya Sayılarının Belirlenmesi

Rekombinant *P. pastoris* GS115-pADH2SNT5 α - α -Amilaz-Full Length ve *P. pastoris* GS115-pADH2SNT5 α - α -Amilaz-Mature klonlarından izole edilen genomik DNA'ların gerçek zamanlı PZR yöntemi kullanılarak $\Delta\Delta C_t$ değerine göre gen kopya sayıları belirlenmiştir (Çizelge 4.1). Gerçek zamanlı PZR analizi sonucunda taranan tüm klonların tek kopya olduğu belirlenmiş ve *P. pastoris* GS115-pADH2SNT5 α - α -Amilaz-Full Length klonlarından FL-13 ve *P. pastoris* GS115-pADH2SNT5 α - α -Amilaz-Mature klonlarından MF-12 üretim klonu olarak seçilmiştir. Seçilen klonlardan -80°C'ye gliserol stoğu yapılmıştır.

Çizelge 4.1. Klonların Gerçek zamanlı PZR ile belirlenen gen kopya sayıları

Klon Adı	<i>ADH</i> (İlgili Gen) C_t	<i>GAP</i> (Referans Gen) C_t	$2^{-\Delta\Delta C_t}$	Kalibratör suş	Gen Kopya Sayısı
FL-3	13.62	13.87	2.41		1.41
FL-13	14.03	14.08	2.09		1.09
FL-15	12.67	12.79	2.19		1.19
MF-4	13.59	13.60	2.03		1.03
MF-5	13.49	13.45	1.97		0.97
MF-6	13.60	13.73	2.20		1.20
MF-7	14.01	14.04	2.06		1.06
MF-8	13.55	13.57	2.04		1.04
MF-12	12.88	12.91	2.06		1.06
MF-15	13.00	12.94	1.93		0.93
GS115	13.87	12.86	1.00	X	

4.8. Engelli Erlenle α -Amilaz Üretimi

α -amilaz salgılanmasının ön denemeleri ve gerçek zamanlı PZR sonucunda doğrulanan ve aynı kopya sayısına sahip olduğu belirlenen rekombinant *P. pastoris* GS115 FL-13 ve *P. pastoris* GS115 MF-12 klonları YPD sıvı besiyerine inokule edilmiş 225 rpm, 28°C’de 20 saat geliştirilmiştir. Gelişen hücrelerin BMGY (pH 6.0) besiyerine başlangıç OD₆₀₀’si 0.1 olacak şekilde ekimi gerçekleştirilmiş ve 16-18 saat boyunca 28°C ve 225 rpm’de inkübasyona bırakılmıştır. BMGY besiyerinde yaklaşık 12 OD olan hücreler BMEY (pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 ve 7.0) besiyerine aktarılmış, aynı sıcaklık ve karıştırma koşullarında 96 saat boyunca inkübasyona devam edilerek α -amilaz ekspresyonları gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.10). Engelli erlen denemeleri 3 paralelli olarak yürütülmüştür. Ekspresyonları *P. pastoris ADH2* promotörü kontrolünde gerçekleştiği için indükleme süresi boyunca örnekler 12 saatte bir toplam etanol miktarı %1 olacak şekilde etanol eklemesi yapılmıştır. Ayrıca her 24 saatte bir örnek alınarak α -amilaz enzim aktivitesi ve SDS-PAGE analizleri yapılmıştır.

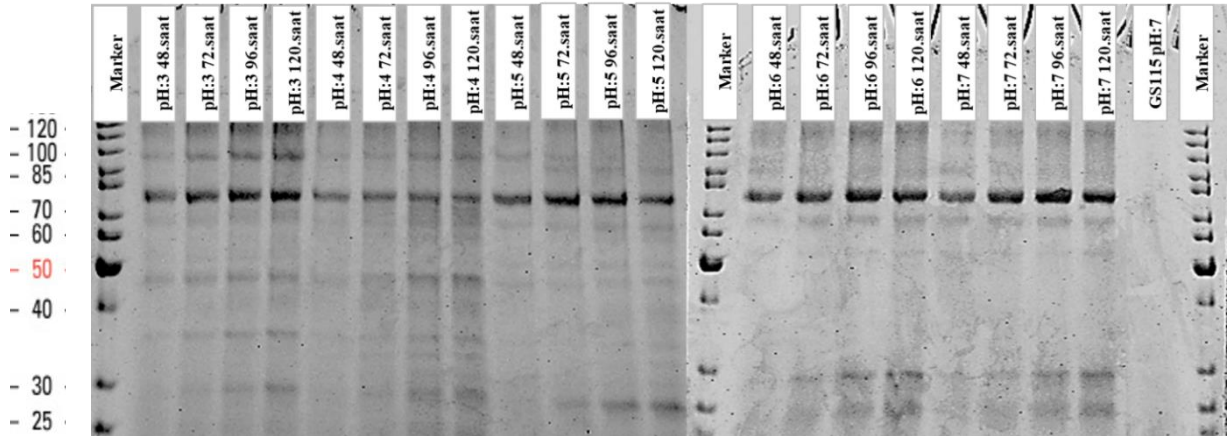
Etanol ile beslemeye ek olarak glikoz ile besleme yapılmış olup α -amilaz enzimi üretimleri karşılaştırılmıştır. Glikoz ile beslemede en iyi üretim sağlanan *P. pastoris* GS115 klonu (MF-12) YPD sıvı besiyerine inokule edilmiş 225 rpm, 28°C’de 20 saat geliştirilmiştir. Gelişen hücreler BYED (pH 6.0) besiyerine başlangıç OD₆₀₀’si 0.1 olacak şekilde inokule edilmiş ve inkübasyona 96 saat boyunca 28°C sıcaklık ve 200 rpm karıştırma koşullarında devam edilmiştir. Engelli erlen denemeleri 3 paralelli ve etanol indükleme ile eş zamanlı olarak yürütülmüştür. İndükleme süresi boyunca örnekler 24 saatte bir toplam glikoz miktarı %2 olacak şekilde glikoz eklemesi yapılmıştır. Ayrıca her 24 saatte bir örnek alınarak α -amilaz enzim aktivitesi ve SDS-PAGE analizleri yapılarak etanol besleme sonuçları ile karşılaştırılmıştır.



Şekil 4.10. Engelli erlenlerde α -amilaz enziminin üretimi

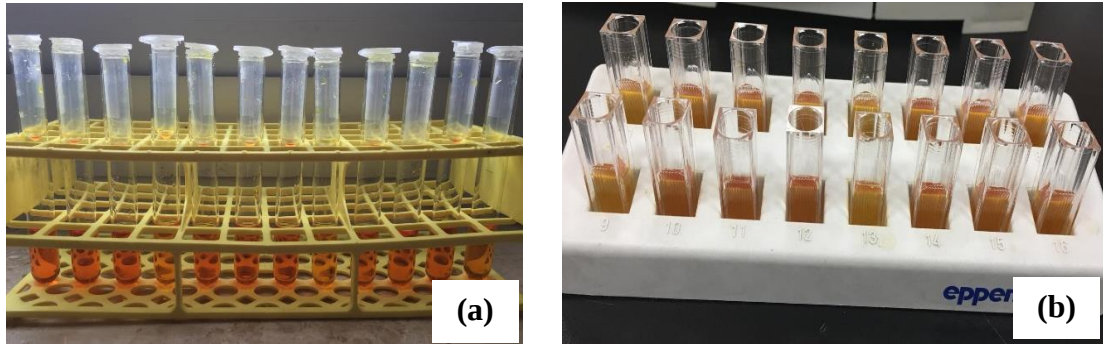
4.8.1. Engelli erlende etanol indüklemeye ile üretilen α -amilaz enziminin SDS-PAGE analizi ve aktivite sonuçları

En fazla enzimin üretildiği optimum pH'nın belirlenmesi için, tek kopya olduğu doğrulanmış klonlardan biri olan *P. pastoris* GS115 MF-12 klonu engelli erlende üretime alınmış, BMGY besiyerinin pH'sı 6.0'da sabit tutulurken, BMEY besiyerinin başlangıç pH'sı 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 ve 7.0 olacak şekilde değiştirilerek α -amilaz üretimi gerçekleştirilmiştir. İlk olarak SDS-PAGE analizi ile üretime alınan MF-12 klonunun farklı pH'larda (3.0, 4.0, 5.0, 6.0 ve 7.0) zamana bağlı (48. saat, 72. saat, 96. saat ve 120. saat) üretimleri her bir örnekten eşit hacimde yüklenerek karşılaştırılmıştır (Şekil 4.11).

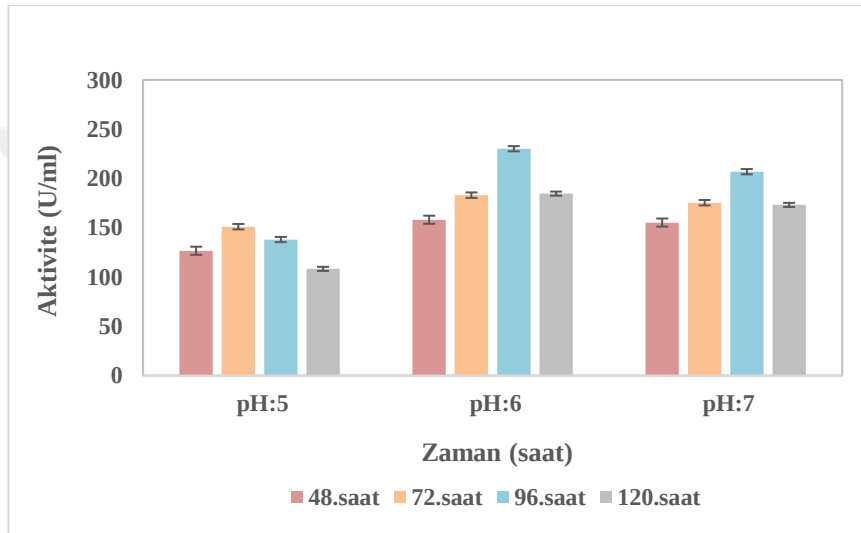


Şekil 4.11. *P. pastoris* GS115 MF-12 klonunun farklı pH'larda (pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 ve 7.0) α -amilaz enzimi üretiminin zamana bağlı (sırasıyla; 48. saat, 72. saat, 96. saat ve 120. saat) örneklerinin SDS-PAGE görüntüsü GS115: Negatif kontrol-*P. pastoris*

SDS-PAGE analizi sonucunda protein bantları (moleküler ağırlığı) yaklaşık 80 kDa boyutlarında görüntülenmiş olup sonuçların tam olarak doğrulanabilmesi için aynı örneklere α -amilaz aktivite tayini uygulanarak karşılaştırma yapılmıştır (Şekil 4.13).



Şekil 4.12. (a) ve (b) DNSA yöntemi ile α -amilaz aktivitesi tayini

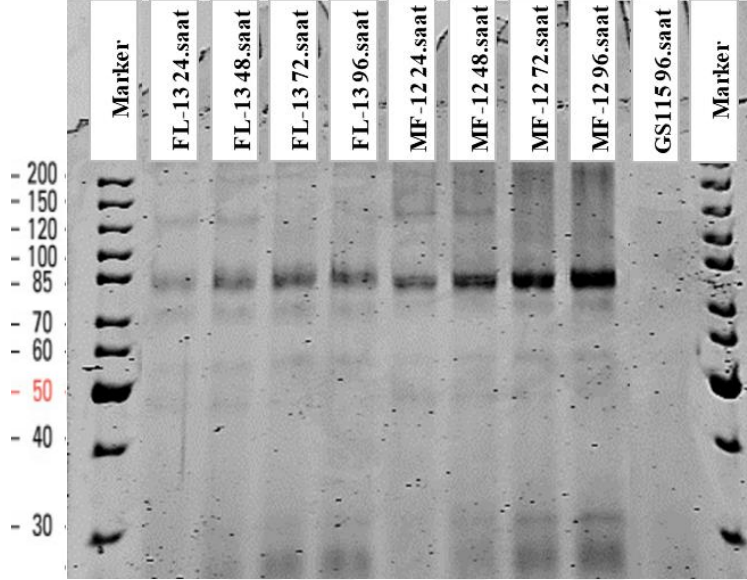


Şekil 4.13. *P. pastoris* GS115 MF-12 klonunun farklı pH'larda (pH 5.0, 6.0 ve 7.0) α -amilaz enzimi üretiminin zamana bağlı (sırasıyla; 48. saat, 72. saat, 96. saat ve 120. saat) örneklerinin aktivite sonuçları

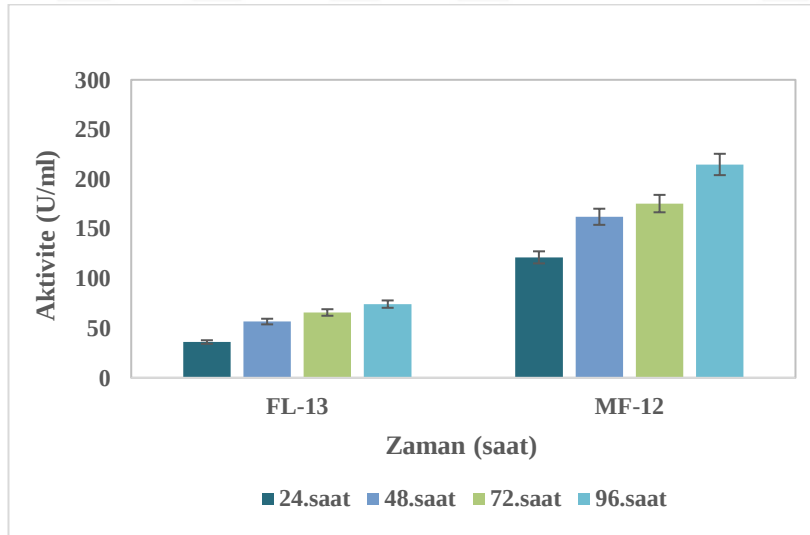
SDS-PAGE analizi ve α -amilaz aktivitesi tayini eş zamanlı olarak değerlendirildiğinde; pH 3.0 ve pH 4.0'te protein varlığı gözlenmiş olmasına rağmen düşük pH'da (3.0 ve 4.0) reaksiyon çalışmamış, okunan absorbans değerleri kör değerinin altında (sarı renkli bileşen oluşumu, negatif değer) kaldığı için aktivite ölçümü gerçekleştirilememiştir. pH 5.0'te ise hem protein bandı kalınlığı hem de aktivite tayini sonucu düşük olduğundan α -amilaz enzimi için bu pH'nın (5.0) uygun olmadığı tespit edilmiştir. pH 6.0 ve pH 7.0'de protein bandı kalınlığının ve aktivite tayini sonuçlarının benzer olduğu gözlenmiştir. Ancak biyoreaktörde α -amilaz enziminin üretimi göz önünde bulundurulduğunda pH 7.0'deki üretim koşullarında tuz vb. besiyeri bileşenlerinin çökmesi nedeniyle dezavantaj oluşturabileceği düşünülmüştür.

Bu değerlendirmeler sonucunda üretim için en uygun pH değerinin pH 6.0 olduğu belirlenmiş ve tüm üretimlerin bu pH'da gerçekleştirilmesi uygun görülmüştür. Buna ek olarak 120. saatteki örneklerde üretimin düştüğü gözlenmiş bu nedenle engelli erlen üretimleri 96. saatte sonlandırılmıştır.

Optimum pH'nın pH 6.0 olarak belirlenmesi sonrasında FL-13 ve MF-12 klonu pH 6.0'da üretime alınmış ve indüklenme fazı 96 saat sürdürülmüştür. Her iki klonun α -amilaz enzimi üretimleri SDS-PAGE analizi (Şekil 4.14) ve α -amilaz aktivitesi tayini (Şekil 4.15) ile karşılaştırılmıştır.



Şekil 4.14. FL-13 ve MF-12 klonunun pH 6.0'da α -amilaz enzimi üretiminin zamana bağlı (sırasıyla; 24. saat, 48. saat, 72. saat ve 96. saat) örneklerinin SDS-PAGE görüntüsü GS115: Negatif kontrol-*P. pastoris* GS115 suşu



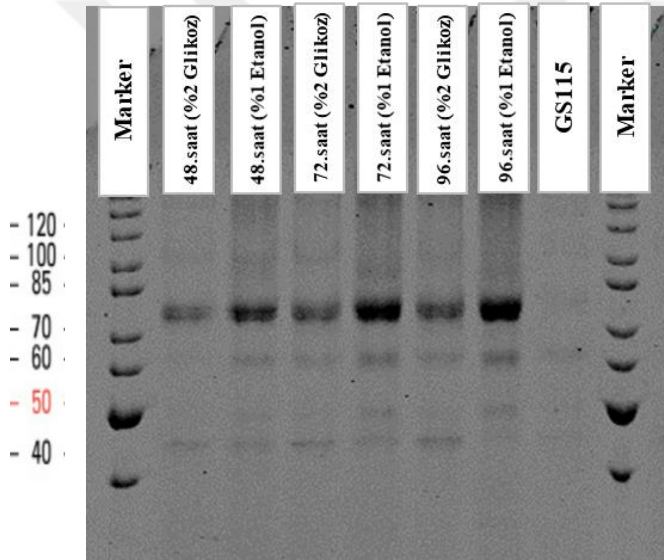
Şekil 4.15. FL-13 ve MF-12 klonunun pH 6.0'da α -amilaz enzimi üretiminin zamana bağlı (sırasıyla; 24. saat, 48. saat, 72. saat ve 96. saat) örneklerinin aktivite sonuçları

Tek kopya olduğu bilinen FL-13 ve MF-12 klonunun zamana bağlı α -amilaz enzimi üretimleri SDS-PAGE analizi ve α -amilaz aktivitesi tayini ile karşılaştırıldığında MF-12 klonunun FL-13 klonuna göre hem bant kalınlığının hem de aktivite tayini sonuçlarının yüksek olduğu tespit edilmiştir. MF-12 klonu en yüksek protein üretimini

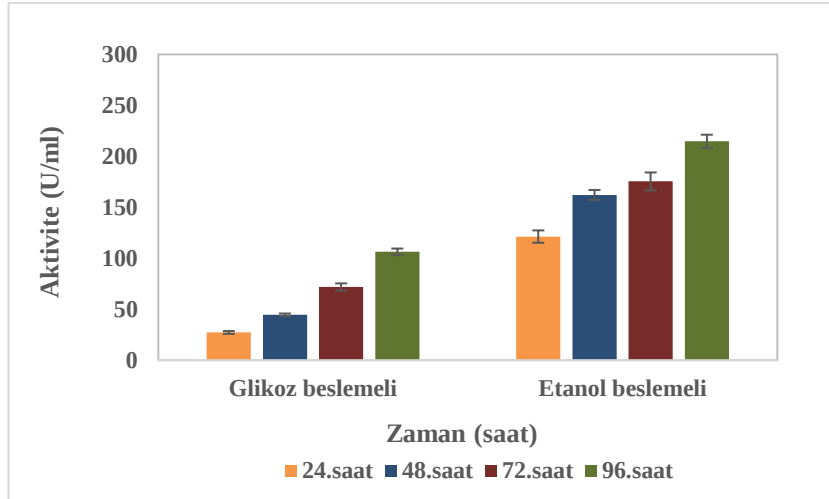
96. saatte gerçekleştirmiş, bu saat sonundaki α -amilaz aktivitesi 215 ± 3.18 U/ml olarak hesaplanmıştır. Tüm engelli erlen üretimleri 3 paralelli ve 2 tekerrürlü olacak şekilde gerçekleştirilerek değerlendirilmiştir.

4.8.2. Engelli erlende glikoz indüklemeye ile üretilen α -amilaz enziminin SDS-PAGE analizi ve aktivite sonuçları

En iyi üretimin olduğu belirlenen *P. pastoris* GS115-pADH2SNT5 α - α -Amilaz-Mature klonlarından MF-12 klonu *ADH2SNT5* promotoru tarafından kontrol edilmekte olup bu promotorun birincil indükleyici karbon kaynağının etanol olduğu bilinmektedir (Karaoglan vd. 2016). Ancak daha avantajlı bir karbon kaynağı olan glikozun da bu promotor için alternatif bir kaynak olabileceği düşünülerek α -amilaz enzimi üretimi hem etanol indüklemeye ile hem de glikoz indüklemeye ile gerçekleştirilmiştir. 96 saat sürdürülen indüklemeye fazı sonunda örnekler SDS-PAGE analizi (Şekil 4.16) ve α -amilaz aktivitesi tayini (Şekil 4.17) ile karşılaştırılmıştır.



Şekil 4.16. MF-12 klonunun pH 6.0'da glikoz indüklemeye veya etanol indüklemeye ile α -amilaz enzimi üretiminin zamana bağlı (sırasıyla; 48. saat, 72. saat ve 96. saat) örneklerinin SDS-PAGE görüntüsü GS115: Negatif kontrol-*P. pastoris* GS115 suşu

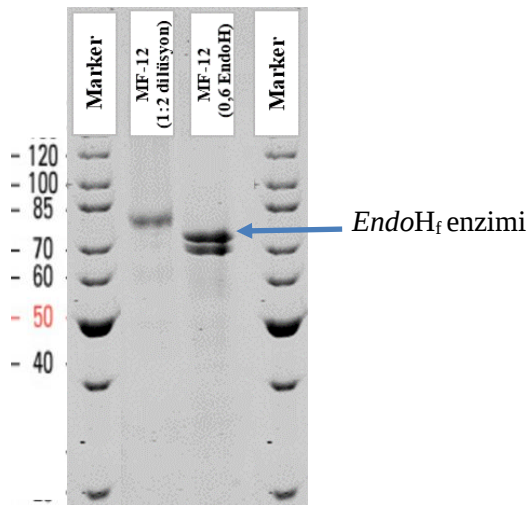


Şekil 4.17. MF-12 klonunun pH 6.0'da glikoz indüklemeye veya etanol indüklemeye ile α -amilaz enzimi üretiminin zamana bağlı (sırasıyla; 24. saat, 48. saat, 72. saat ve 96. saat) örneklerinin aktivite sonuçları

Yapılan karşılaştırma sonucunda; etanol ile indüklemeye, glikoz ile indüklemeye göre 2 kat daha fazla α -amilaz üretimi olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle biyoreaktörde gerçekleştirilecek üretimlerin etanol ile indüklenmesine karar verilmiştir.

4.9. α -Amilaz Enziminin *EndoH_f* ile Deglikozilasyonu

SDS-PAGE analizi sonucu elde edilen jel görüntülerinde rekombinant α -amilaz enzimine ait bantlara ek olarak çoğul bantlar olduğu gözlenmiştir. Bunun nedeninin proteinin glikozilasyona uğraması ve *P. pastoris* mayası tarafından hücre dışına salgılanması sonucunda olabileceği düşünülmüştür. Glikozilasyonun tespiti ve glikolize olmayan rekombinant proteinin molekül ağırlığının doğrulanması için protein denatüre edildikten sonra *EndoH_f* enzimi ile muamele edilmiş ve SDS-PAGE analizi (Şekil 4.18) ile tekrar görüntülenmiştir.



Şekil 4.18. MF-12 klonunun α -amilaz enzimi üretimi 96. saat örneği ve *EndoH_f* enzimi ile muamele edilmiş aynı örneğin SDS-PAGE görüntüsü

α -amilaz enziminin *EndoH_f* ile muamele edilmesi ve SDS-PAGE analizi ile görüntülenmesi sonucunda protein bandı kalınlığı artmış ve protein bandının yaklaşık 70 kDa (teorik olarak 68.2 kDa) boyutlarında olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuç ile proteinin glikolizasyona uğradığı ve birden fazla çeşitte glikozil ünitesi içerdiği doğrulanmıştır.

4.10. Rekombinant α -Amilaz Enziminin Biyoreaktörde Üretimi

4.10.1. Fermentasyon prosesinin aşamaları

Engelli erlen üretimlerinde en verimli suş olduğu tespit edilen MF-12 klonunun büyük ölçekte ekspresyonu 5 L hacimli biyoreaktörde uygun sıcaklık ve pH koşullarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmada gerçekleştirilen fermentasyon işlemleri iki aşamalı olarak kesikli ve yarı-kesikli sistemle yürütülmüştür.

Fermentasyonun ilk aşaması olan kesikli fazda, besiyeri olarak %4 gliserol içeren temel tuz besiyeri (BSM) ve PTM1 tuzlarından oluşan fermentasyon ortamı kullanılmıştır. Ortamın koşullarının; hava 1 vvm, 28°C ve pH 5.0'e ayarlanması sonrasında inokulum gerçekleştirilmiştir. İnokulum öncesi çözünmüş oksijen seviyesi %100 iken sonrasında mikroorganizma sayısındaki artışa bağlı olarak sürekli azalmış ve ÇO değeri %20'ye ayarlanarak DO probu ile kontrolü sağlanmıştır. %ÇO değeri %20'nin altına düştüğünde sistem tarafından öncelikle karıştırma hızı 600 rpm'den 900 rpm'e kadar kademeli olarak artırılmış, karıştırma hızı yetersiz geldiğinde ise sisteme giren hava %0-100 aralığında saf oksijenle karıştırılarak ortama verilmiştir. Yaklaşık 18 saat sonunda DO probunun ölçtüğü çözünmüş oksijen seviyesinde ani bir artış gözlenmiş ve ortamdaki gliserolün tükenmesi nedeni ile kesikli faz sonlandırılmıştır. Kesikli faz sonunda kültürden 0. saat örneği alınarak hücre konsantrasyonunun 102 g/L olduğu belirlenmiştir.

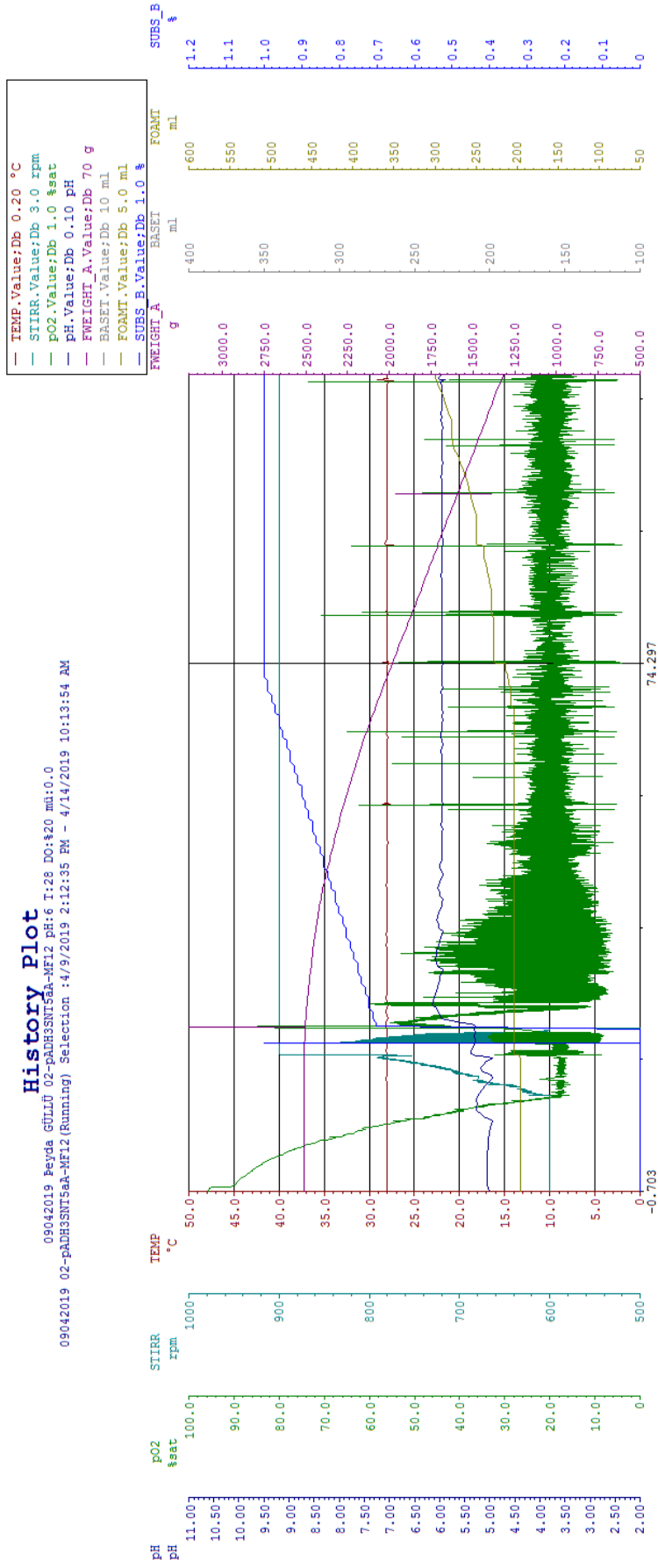
Kesikli fazın sonlandırılması sonrasında fermentasyonun ikinci aşaması olan yarı-kesikli faza (besleme fazı) geçilmiştir. Bu aşamada fermentasyon ortamı; hava 1 vvm, 28°C ve pH 6.0 olacak şekilde ayarlanmıştır. Normoksik şartlarda, sabit μ stratejisi için besleme profili girilerek %100 etanol (PTM1 tuzu içeren) ile besleme gerçekleştirilmiştir. %ÇO değeri tekrardan %20'ye ayarlanmış ve sistem Cascade moduna alınarak karıştırma hızı (600-900 rpm) ve O₂ (%0-100) ile indüklemeye fazının sonuna kadar kontrolü sağlanmıştır. Fermentasyon prosesi boyunca takibi sağlanan pH, sıcaklık, %ÇO, karıştırma hızı, besleme solüsyonun ağırlığı, ortama eklenen baz ve köpük kırıcı miktarı ve etanol besleme oranı Şekil 4.19'da gösterilmiştir.

Fermentasyon ortamından belirli aralıklarla örnek alınarak; yaş hücre ağırlığı ölçümü, α -amilaz aktivitesi tayini, SDS-PAGE analizi ve toplam protein tayini ile zamana bağlı rekombinant proteinin üretimi takip edilmiştir. Biyoreaktör üretimleri iki tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiş ve analiz sonuçları her iki tekerrür göz önünde bulundurularak değerlendirilmiştir.

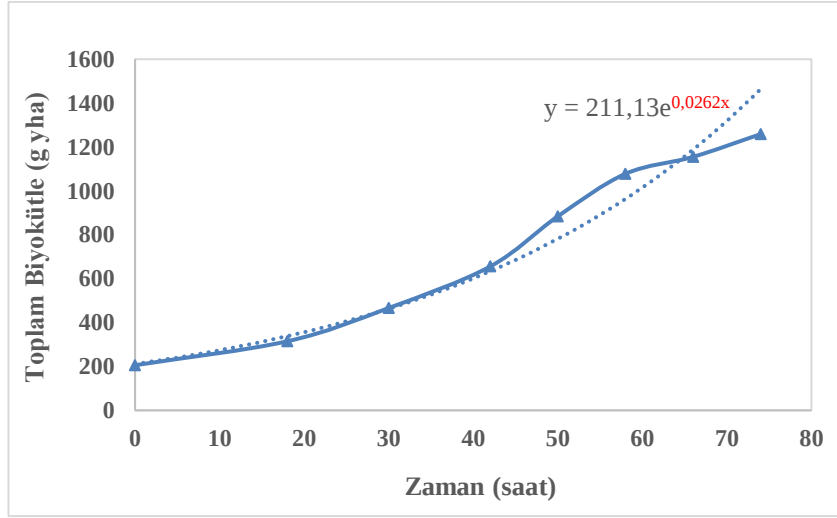
Şekil 4.20'de sabit- μ stratejisine göre gerçekleştirilen yarı-kesikli faz esnasında belirlenen biyokütle miktarları gösterilmiştir. Spesifik gelişim hızı 74. saate kadar $\mu:0.0262 \text{ sa}^{-1}$ olarak sabit tutulmuş ancak biyoreaktörün çalışma hacminin en üst (maksimum) seviyeye ulaşması ve oksijenin ortama yeterince dağılamaması gibi nedenler ile μ değeri sabit tutulamadığından fermentasyon 90. saatte sonlandırılmıştır.

History Plot

09042019 Beyda GÜLLÜ 02-paDH3SNT5a-MF12 pH:6 T:28 DO:820 mli:0.0
 09042019 02-paDH3SNT5a-MF12 (Running) Selection : 4/9/2019 2:12:35 PM - 4/14/2019 10:13:54 AM



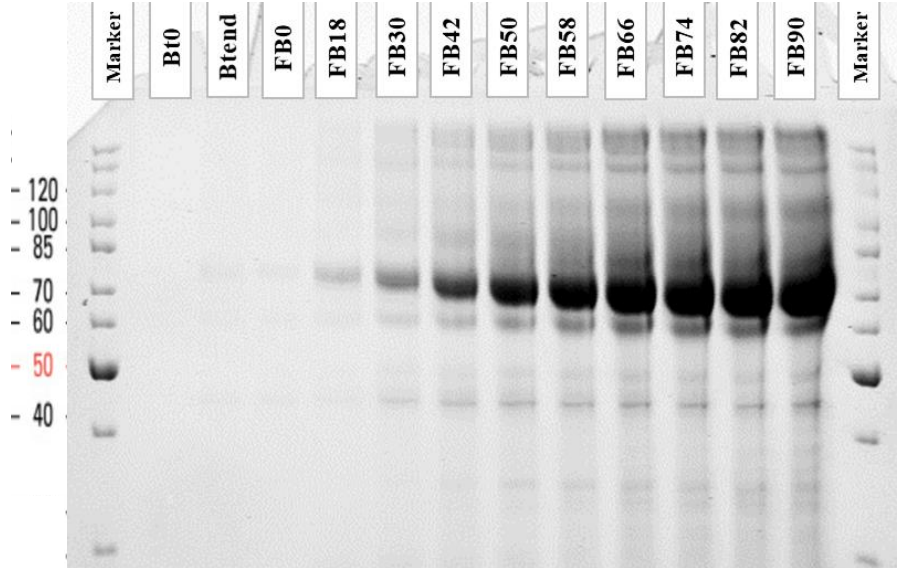
Şekil 4.19. Fermentasyon prosesi



Şekil 4.20. Biyoreaktör koşullarında sabit-μ stratejisine göre gerçekleştirilen yarı-kesikli faz esnasında belirlenen biyokütle miktarı

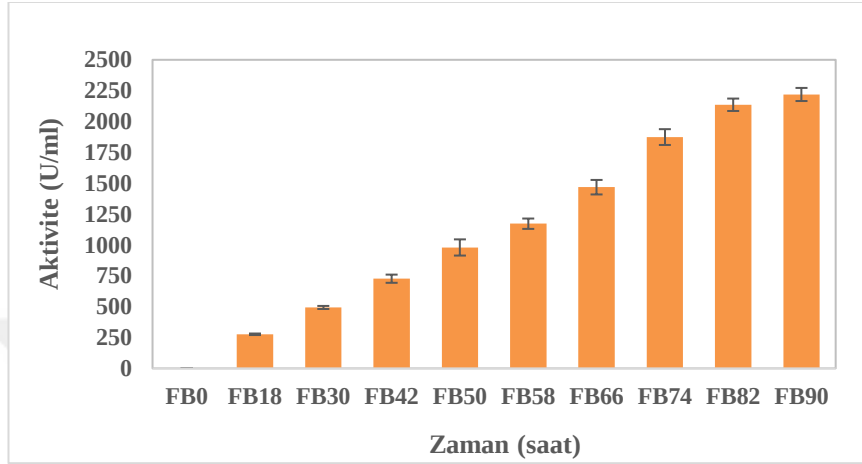
4.10.2. Biyoreaktörde üretilen α-amilaz enziminin SDS-PAGE analizi, toplam protein miktarı ve aktivite sonuçları

Biyoreaktörde üretime alınan MF-12 klonu 28°C ve pH 6.0 koşullarında 90 saat süresince etanol ile indüklenerek α-amilaz ekspresyonu gerçekleştirilmiştir. İlk olarak SDS-PAGE analizi ile MF-12 klonunun fermentasyon ortamından, zamana bağlı (kesikli faz; 0. ve 18. saat, yarı-kesikli faz; 0., 18., 30., 42., 50., 58., 66., 74., 82. ve 90. saat) alınan örnekler eşit hacimde (10 µl) yüklenerek enzim üretimi karşılaştırılmıştır (Şekil 4.21).

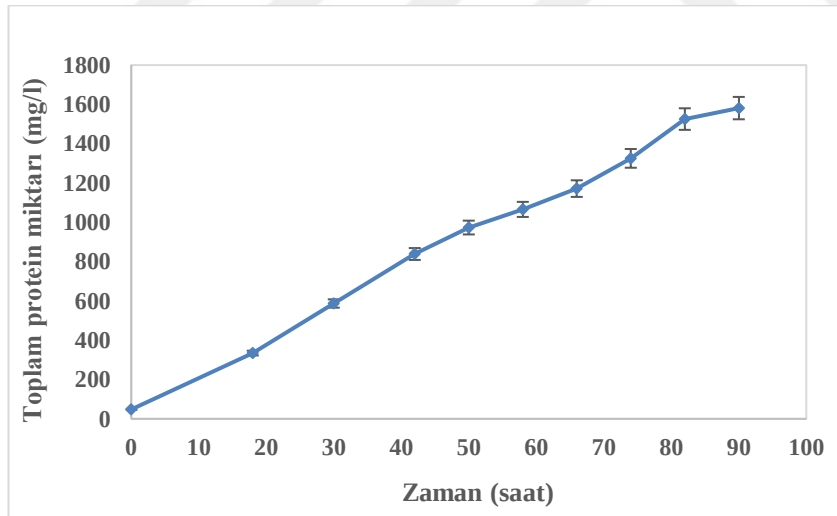


Şekil 4.21. Biyoreaktör koşullarında zamana bağlı alınan örneklerin SDS-PAGE görüntüsü Bt: Batch fazı (kesikli faz), FB: Fed-batch fazı (yarı-kesikli faz)

SDS-PAGE analizi sonucunda moleküler ağırlığının yaklaşık 80 kDa boyutlarında, zamana bağlı artış gösterdiği görüntülenmiş olup enzim miktarının tespit edilmesi için aynı örnekler α -amilaz aktivitesi tayini (Şekil 4.22) ve toplam protein tayini (Şekil 4.23) uygulanmıştır. Her iki analiz sonucuna göre α -amilaz enziminin spesifik aktivitesi hesaplanmıştır.



Şekil 4.22. Biyoreaktör koşullarında zamana bağlı alınan örneklerin α -amilaz aktivitesi
FB: Fed-batch fazı (yarı-kesikli faz)



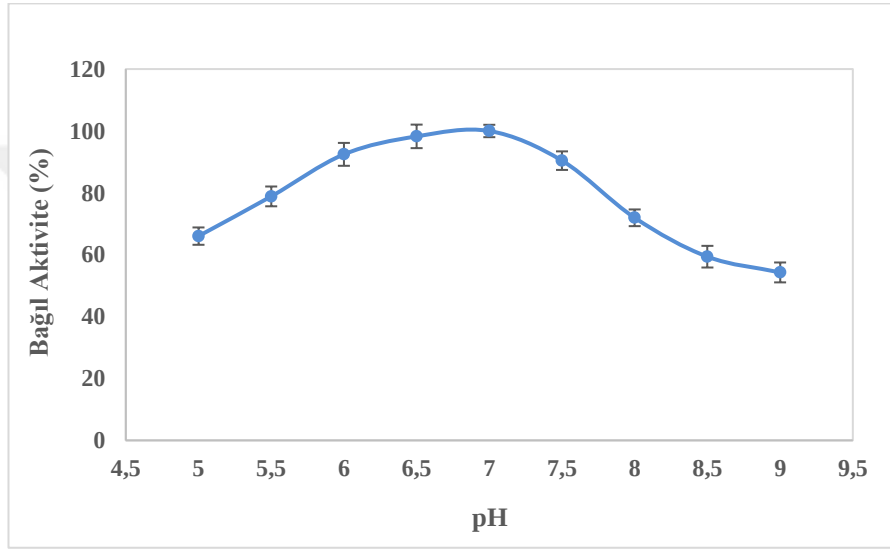
Şekil 4.23. Biyoreaktör koşullarında zamana bağlı alınan örneklerin toplam protein miktarı

Analiz sonuçları değerlendirildiğinde MF-12 klonunun büyük ölçekli üretimi sonucunda α -amilaz enziminin zamana bağlı olarak arttığı hem protein bantlarının kalınlaşması hem de aktivitenin artması ile doğrulanmıştır. En yüksek α -amilaz aktivitesi indükleme fazının son saati olan 90. saatte ölçülmüş olup bu değer 2219 ± 52.18 U/ml (spesifik aktivitesi: 1403 U/mg) olarak hesaplanmıştır. Engelli erlen (215 ± 3.18 U/ml) ile biyoreaktör üretimi karşılaştırıldığında α -amilaz enziminin yaklaşık 10 kat arttığı gözlenmiş olup biyoreaktör üretimi başarı ile sonuçlanmıştır.

4.11. α -Amilaz Enziminin Karakterizasyonu

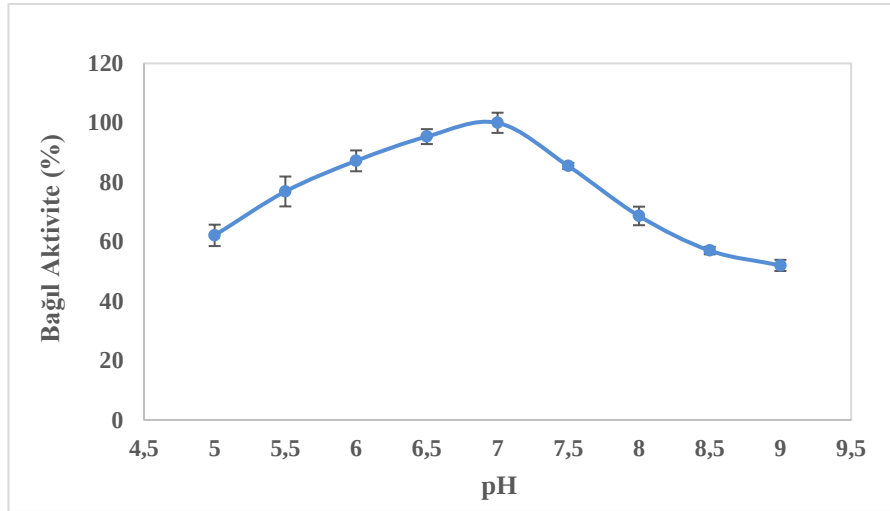
4.11.1. Enzimin optimum çalıştığı pH'nın ve pH stabilitesinin belirlenmesi

α -amilaz enziminin optimum aktivite gösterdiği pH değerinin tespiti için farklı pH'larda ölçülen aktivite sonuçları Şekil 4.24'te gösterilmiştir. Enzim aktivitesi en yüksek değere pH 7.0'de ulaştığı için optimum çalışma pH'sı 7.0 olarak belirlenmiş ve bu pH'daki bağıl aktivite değeri %100 olarak gösterilmiştir. Bu pH değerinin alt ve üst değerlerine doğru gidildikçe ölçülen aktivite değerinin pH 5.0'te %66'ya, pH 9.0'da ise %55'lere kadar düştüğü gözlenmiştir.



Şekil 4.24. α -amilaz enziminin 50°C'de farklı pH'larda gösterdiği aktivite değerleri

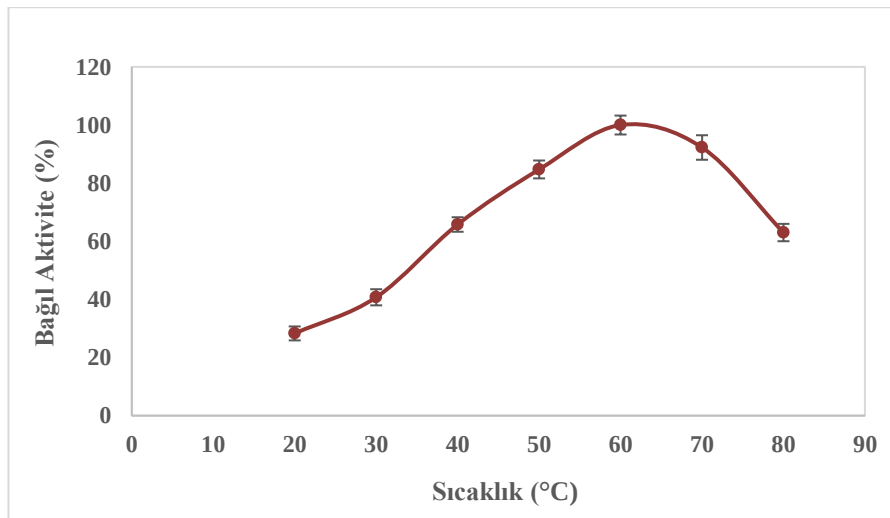
α -amilaz enziminin pH stabilitesinin belirlenmesi için farklı pH'larda, oda sıcaklığında (22°C), 1 saat inkübasyonu sonunda ölçülen aktivite sonuçları Şekil 4.25'te gösterilmiştir. Enziminin en yüksek kararlılık gösterdiği değerin pH 7.0'de olduğu tespit edilmiş ve bu pH'daki bağıl aktivite değeri %100 olarak gösterilmiştir. Genel olarak; pH 6.0-7.5 değerleri arasında stabilitenin %80'nin üzerinde korunduğu saptanmıştır. 1 saat süresince farklı pH'larda inkübe edilerek ölçülen örneklerin aktivite değerleri ile inkübe edilmeden (bekletilmeden) ölçülen örneklerin aktivite değerleri arasında belirgin bir düşüş olmadığı gözlenmiştir.



Şekil 4.25. α -amilaz enziminin 50°C'de farklı pH'larda gösterdiği kararlılığın aktivite değerleri

4.11.2. Enzimin optimum çalıştığı sıcaklığın ve sıcaklık stabilitesinin belirlenmesi

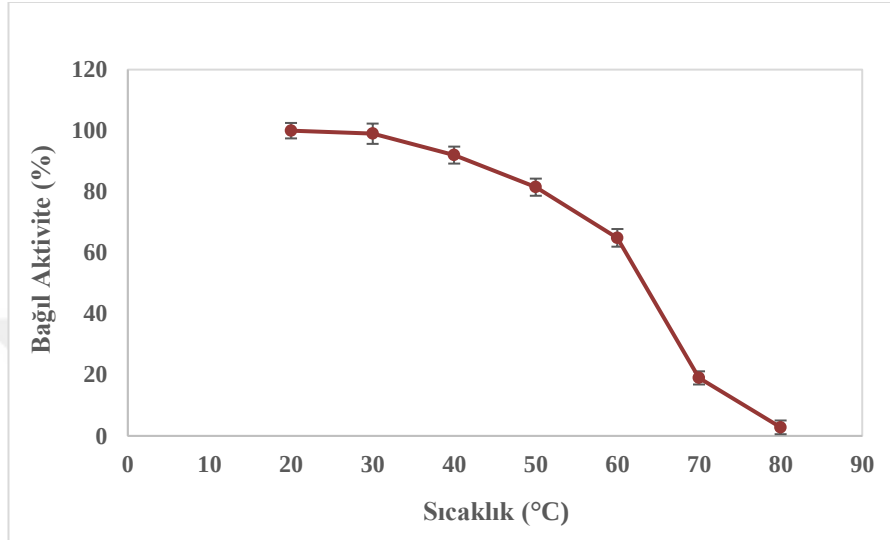
α -amilaz enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklığın tespiti için farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilen enzim aktivitesi tayinine ait sonuçlar Şekil 4.26'da gösterilmiştir. α -amilaz aktivitesi en yüksek değere 60°C'de ulaştığı için optimum çalışma sıcaklığı 60°C olarak belirlenmiş ve bu sıcaklıktaki bağıl aktivite değeri %100 olarak gösterilmiştir. 20°C'den 60°C'ye kadar olan sıcaklıklarda ölçülen aktivite değerlerinin sürekli artış gösterdiği ancak 60°C'den daha yüksek sıcaklıklarda aktivitenin düştüğü saptanmıştır.



Şekil 4.26. α -amilaz enziminin pH 6.9'da farklı sıcaklıklarda gösterdiği aktivite değerleri

α -amilaz enziminin sıcaklık stabilitesinin belirlenmesi için farklı sıcaklıklarda 1 saat inkübasyonu sonunda gerçekleştirilen enzim aktivitesi tayinine ait sonuçlar Şekil 4.27'de gösterilmiştir. Enzimin en yüksek kararlılık gösterdiği değerin 20°C'de olduğu

tespit edilmiş ve bu sıcaklıktaki bağıl aktivite değeri %100 olarak gösterilmiştir. 20°C ile 40°C sıcaklık değeri arasında stabilitenin %90'nın üzerinde korunduğu belirlenmiş ancak 50°C'den yüksek sıcaklıklarda stabilitede düşüş izlenmiştir. Enzimin en yüksek aktivite gösterdiği 60°C'de aktivitesinin %65'ini koruduğu saptanmıştır. 60°C'den yüksek sıcaklıklarda ise enzim aktivitesinde ani bir düşüş (%20≥) gözlenmiştir.



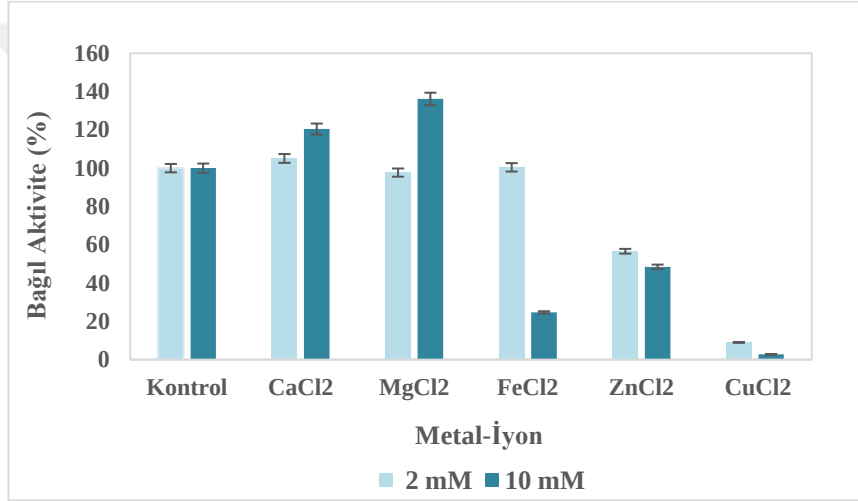
Şekil 4.27. α-amilaz enziminin pH 6.9'da farklı sıcaklıklarda gösterdiği kararlılığın aktivite değerleri

4.11.3. Metal iyonlarının enzim aktivitesine etkisinin belirlenmesi

Metal iyonlarının α-amilaz aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi için konsantrasyonları 2 mM ve 10 mM olan CaCl₂, CuCl₂, FeCl₂, MgCl₂ ve ZnCl₂ çözeltileri kullanılmıştır. Metal iyonlarının ortama eklenmesi ile gerçekleştirilen enzim aktivitesi tayinine ait sonuçlar Şekil 4.28'de gösterilmiştir. Kontrol ortamının enzim aktivitesi %100 olarak kabul edilmiş olup diğer metal iyonları ilave edilen ortamların aktivite değişimleri kontrole göre kıyaslanarak % şeklinde ifade edilmiştir.

Metal iyonlarının bağıl aktivite üzerindeki etkisi; hem her bir metal iyonunun aynı konsantrasyondaki kontrol grubuna göre hem de aynı metal iyonunun farklı konsantrasyonları arasındaki değişimine göre istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Metal iyonlarının aynı konsantrasyondaki kontrol grubuna göre bağıl aktivite değişimi incelendiğinde; 2 mM konsantrasyondaki Ca²⁺, Mg²⁺ ve Fe²⁺ iyonlarının bağıl aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı (p>0.05) ancak aynı konsantrasyondaki Zn²⁺ ve Cu²⁺ iyonlarının bağıl aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu (p<0.001) belirlenmiştir. 10 mM konsantrasyondaki tüm metal iyonlarının (Ca²⁺, Mg²⁺, Fe²⁺, Zn²⁺ ve Cu²⁺) bağıl aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu (p<0.001) saptanmıştır. Aynı metal iyonunun farklı konsantrasyonları arasındaki bağıl aktivite değişimi incelendiğinde; 2 mM ve 10 mM konsantrasyondaki Ca²⁺, Mg²⁺, Fe²⁺, Zn²⁺ ve Cu²⁺ iyonlarının farklı konsantrasyonu arasında istatistiksel olarak fark olduğu (p<0.001) tespit edilmiştir.

Tüm sonuçlar ayrıntılı olarak incelendiğinde; Ca^{2+} iyonunun 2 mM konsantrasyonu varlığında enzim aktivitesinde önemli oranda bir değişim gözlenmemiş, 10 mM konsantrasyonu varlığında ise aktivitenin %20 arttığı gözlenmiş ve enzim üzerinde aktivatör özellik göstermiştir. Mg^{2+} iyonunun da 2 mM konsantrasyonu varlığında enzim aktivitesinde belirgin bir değişiklik olmamış, 10 mM konsantrasyonu varlığında ise aktivatör etki göstererek aktivite değerini %36 artırdığı belirlenmiştir. Fe^{2+} iyonunun 2 mM konsantrasyonu varlığında enzim aktivitesi değişmemiş, 10 mM konsantrasyonu varlığında ise aktivitenin %25'lere kadar düşmesine neden olmuş ve enzim üzerinde inhibitör etki oluşturmuştur. Zn^{2+} iyonunun 2 mM ve 10 mM konsantrasyonu varlığında enzim aktivitesi üzerinde inhibe edici etkisi olduğu ve aktiviteyi %48'lere kadar düşürdüğü gözlenmiştir. Cu^{2+} iyonunun her iki konsantrasyonu da enzim üzerinde güçlü bir inhibitör özellik göstermiş ve aktivite değerini %10'ların altına düşürmüştür.



Şekil 4.28. α -amilaz enziminin pH 6.9 ve 50°C sıcaklıkta farklı konsantrasyonlardaki metal iyonlarında gösterdiği aktivite değerleri

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında; *B. subtilis* PY22 kaynaklı α -amilaz geninin *P. pastoris* mayasında *ADH2* promotoru (*ADH2SNT5*, sentetik *ADH2* promotoru) kontrolünde tam uzunlukta ve olgun formda rekombinant olarak üretilmesi sonucu, enzim üretiminde seçilen promotorun ve sentezlenen protein formunun aktivite üzerindeki etkisinin belirlenmesi, α -amilaz enziminin büyük ölçekli olarak üretilmesi ve enzimin karakterizasyonunun gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. Farklı kaynaklardan izole edilen (arpa, fare, domuz, *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* vb.) α -amilaz enziminin, rekombinant olarak üretimi *P. pastoris* (*AOX* ve *GAP* promotoru kontrolünde) mayası başta olmak üzere birçok konakçı suşta gerçekleştirilmiştir. Ancak literatürde *P. pastoris* konakçı suşunda, *ADH2* promotoru (önceden geliştirilen sentetik *ADH2SNT5* promotoru) kontrolünde rekombinant α -amilaz üretiminin bulunmaması bu çalışmanın özgün nitelikte olmasının başlıca nedenleri arasındadır.

Bu çalışmada *B. subtilis* PY22 α -amilaz geninin (*AmyE*); tam uzunluktaki formu ve olgun formu, *ADH2SNT5* promotoru kontrolünde, *P. pastoris* GS115 suşunda rekombinant olarak üretilmiştir. Her iki formun (FL ve MF) oluşturulan klonları engelli erlende etanol ile indüklenerek enzim üretimi gerçekleştirilmiş ve α -amilaz aktiviteleri karşılaştırılmıştır. En iyi üretime sahip olan klon (MF klonu) biyoreaktörde üretime alınarak α -amilaz enziminin yüksek oranda ekspresyonu sağlanmıştır. Son olarak rekombinant α -amilazın karakterizasyonu gerçekleştirilmiş; moleküler ağırlığı, optimum çalışma koşulları, pH ve sıcaklık stabiliteleri, iyonların etkisi ve glikolize olma durumu incelenmiştir.

Klonlama sonucunda oluşturulan ve tek kopya oldukları belirlenen FL ve MF klonları; engelli erlenlerde, 28°C, pH 6.0 (üretim için en uygun olduğu belirlenen pH değeri) ve 225 rpm koşullarında, 96 saat boyunca, %1 etanol ile indüklenerek α -amilaz enzimi üretilmiştir. FL ve MF klonunun α -amilaz aktiviteleri sırasıyla 74.2 ± 0.94 U/ml ve 215 ± 3.18 U/ml olarak hesaplanmış bunun sonucunda, iki klonun arasındaki farkın yaklaşık 3 kat olduğu gözlenmiştir. MF klonu, 5 L hacimli biyoreaktörde, 28°C, pH 6.0 ve normoksik koşullarda (ÇO %20), sabit μ (0.028 sa^{-1}) stratejisine uygun şekilde etanol ile indüklenerek 90 saat boyunca rekombinant α -amilaz üretimi gerçekleştirilmiştir. Biyoreaktörde üretim sonucunda, α -amilaz enzimi zamana bağlı olarak artış göstermiş ve en yüksek aktivite 90. saatte 2219 ± 52.18 U/ml (spesifik aktivitesi 1403 U/mg) olarak hesaplanmıştır. Engelli erlen ile biyoreaktör üretimi karşılaştırıldığında α -amilaz enzim aktivitesinin yaklaşık 10 kat arttığı saptanmıştır.

Kato vd. (2001) yaptıkları bir çalışmada, fare tükürük salgısından izole ettikleri α -amilaz genini (olgun formu); *P. pastoris* GS115 (*AOX* promotoru kontrolü altında, *pGKL*-128 kDa sekresyon sinyali ile), *S. cerevisiae* 20B-12 (α -çiftleşme faktörü sekresyon sinyali ile) ve *K. lactis* MD2/1 konakçı suşlarına klonlamış ve uygun besiyerlerinde üretimini gerçekleştirmiştir. Enzim aktiviteleri; *K. lactis*'te 1.2 U/ml, *S. cerevisiae*'de 1.8 U/ml ve *P. pastoris*'te 154.7 U/ml (240 mg/L) olarak belirlenmiştir. Toprakten izole edilen *Bacillus* sp. YX-1 kaynaklı α -amilaz enziminin uygun besiyerinde 44 saat boyunca üretimi sonrasında elde edilen en yüksek aktivite 53 U/ml olarak ölçülmüştür (Liu ve Xu 2008). Karakas vd. (2010) tarafından, *B. subtilis* PY22 α -amilaz enzimini kodlayan gen (bu çalışma ile aynı kaynaklı *AmyE* geni), *P. pastoris* KM71H (*AOX* promotoru içeren) konakçı suşuna klonlanmış ve en iyi üretici klon (2 kopya içeren)

belirlenmiştir. Engelli erlende üretimi gerçekleştirilen klonun 72 saat sonunda α -amilaz aktivitesi 44 U/ml (22 mg/ml) iken aynı süre sonunda yabanıl türün (*B. subtilis* PY22) en yüksek α -amilaz aktivitesi 120 mU/ml (yaklaşık 370 kat fazla) olarak ölçülmüştür.

R. oryzae kaynaklı α -amilaz enzimi (*RoAmy*), *AOX* ve *GAP* promotorlarının kontrolünde *P. pastoris* GS115 suşlarına transforme edilmiş ve oluşturulan *Mut*⁺ suşu ile; *Mut*^S suşuna göre 8 kat, *GAP* ile kontrol edilen suşa göre 24 kat, önceden oluşturulan rekombinant *S. cerevisiae*'ye göre 50 kat ve *E. coli*'ye göre 400 kat daha yüksek ekspresyon seviyesi göstermiştir. En yüksek verime sahip olan ve 6 kopya içeren, *P. pastoris* GS115/*Mut*⁺ (α -pre-pro sinyali içermeyen, tam uzunluktaki *RoAmy* kodlayan diziyi içeren) suşu; erlende 46.2 U/ml, fermentörde ise 120 saat sonunda 448.6 U/ml aktivite göstermiştir (Li vd. 2011). Yang vd. (2013) yaptığı bir çalışmada, alkalifilik *A. amylolytica* N10'dan elde edilen alkaline α -amilaz genini (olgun formu), kodon optimizasyonu yaparak *E. coli* BL21 (*AmyA*) ve *P. pastoris* GS115 (*AOX* promotoru kontrolünde) (*AmyB*) konakçı suşlarına klonlamıştır. Engelli erlende üretilen *AmyA* ve *AmyB* saflaştırılmış ve *AmyA*'nın spesifik aktivitesi 16 U/mg, *AmyB*'nin spesifik aktivitesi 16.6 U/mg olarak belirlenmiştir. Ancak fermentör koşullarında gerçekleştirilen üretim sonucunda α -amilaz aktivitesi *E. coli* ve *P. pastoris*'te sırasıyla 61 U/ml ve 600 U/ml olarak hesaplanmıştır. *B. amyloliquefaciens* kaynaklı α -amilaz enzimini kodlayan *amy1* geni *B. subtilis* WB800 konakçı suşuna klonlanması sonucunda üretilen α -amilaz aktivitesi 634 U/ml olarak belirlenmiş ve yabanıl tür (*B. amyloliquefaciens*) ile karşılaştırıldığında verimliliğin 1.48 kat arttığı gözlenmiştir (Chen vd. 2015).

Parashar ve Satyanarayana (2016b), *B. acidicola* TSAS1 kaynaklı rekombinant α -amilaz üretimi için hem *AOX* promotoru (*Amy-AOX*) hem de *AOX* ve *GAP* promotorunun her ikisini de içeren (*Amy-GAP-AOX*) ekspresyon vektörünü *P. pastoris* X-33 suşuna klonlamış ve 1 kopya olan *Amy-AOX* ile 3 kopya olan *Amy-GAP-AOX* klonlarını fermentör koşullarında üretime almıştır. α -amilaz aktiviteleri ölçüldüğünde; *Amy-AOX* ile 130 U/ml (1080 U/g) (yabanıl türe göre 13 kat fazla), *Amy-GAP-AOX* ile 245 U/ml (1890 U/g) olduğu saptanmıştır. Parashar ve Satyanarayana (2017) yaptıkları diğer bir çalışmada, *Bacillus acidicola* kaynaklı α -amilaz geni (*Ba-amy*) ile *G. thermoleovorans* kaynaklı α -amilaz genini (*Gt-amy*) kullanarak oluşturdukları *Ba-Gt-amy* kimerik enzimi *AOX* promotorunu içeren *P. pastoris* X-33 genomuna homolog rekombinasyon yoluyla entegre etmiştir. Farklı kopya sayıları oluşturularak α -amilaz aktiviteleri karşılaştırılmış ve 1 kopya 70 U/ml, 3 kopya 150 U/ml, 5 kopya 200 U/ml ve 8 kopya 250 U/ml aktivite gözlenmiştir. 8 kopya olan klon; üretim şartları optimize edilerek tekrar üretildiğinde, enzim aktivitesi; erlende 310 U/ml, fermentörde ise 750 U/ml ölçülmüştür. Trabelsi vd. (2019) tarafından, *A. oryzae* S2 α -amilazı (*AmyA*), *P. pastoris* SMD1168H'ye klonlanarak, *AOX* promotorunun kontrolü altında ekspresyonu gerçekleştirilmiştir. Metanol tarafından 72 saatlik bir indüksiyon sonunda α -amilaz üretiminin 72 U/ml olduğu tespit edilmiştir.

Bu çalışmada oluşturulan *P. pastoris* GS115-pADH2SNT5- α -Amilaz-Mature (MF) klonunun α -amilaz üretimi, tüm bu literatür verileri ile kıyaslandığında oldukça yüksek bir verim sağlandığı ve MF klonunun α -amilaz üretiminde diğer konakçı suşlara ve *P. pastoris* mayasında farklı promotorların (*AOX*, *GAP* vb.) kontrolünde gerçekleştirilen üretime göre başarılı bir üretim suşu olduğu tespit edilmiştir. Oluşturulan suşun verimli olmasındaki başlıca etkenlerin; ekspresyonun *ADH2* promotorunun sentetik formu olan ve pozitif regülasyondan sorumlu aktivatör bölgeleri

(UAS, Upstream Activator Site) içeren *ADH2SNT5* promotörü kontrolünde gerçekleşmesine ek olarak proteinin olgun formda sentezlenmesi olduğu belirlenmiştir.

SDS-PAGE analizi ile proteinin moleküler ağırlığının yaklaşık 80 kDa boyutlarında olduğu tespit edilmiştir. Rekombinant α -amilaz bantlarına ek olarak çoğul bantlar olduğu gözlenmiş ve *EndoH_f* ile muamele edilmesi sonucunda denatüre edilen α -amilazın protein bandının kalınlığının arttığı ve bandın yaklaşık 70 kDa (teorik olarak 68.2 kDa) boyutlarına düştüğü saptanmıştır. Bu sonuç ile proteinin glikolizasyona uğradığı doğrulanmıştır.

Rydberg vd. (1999) tarafından, insan pankreasından izolen edilen α -amilaz enziminin (HPA) *P. pastoris* GS115'te ekspresyonu sonucu, proteinin 56 kDa boyutunda ve glikolize formda olduğu (10-13 arasında şeker kalıntısı içeren) tespit edilmiştir. *B. subtilis* PY22 kaynaklı α -amilaz enziminin (glikolize formdaki protein) moleküler ağırlığının 72.28 kDa olduğu saptanmıştır (Karakas vd. 2010). Alkalifilik *A. amylolytica* N10 α -amilazı, *P. pastoris* GS115 suşunda rekombinant olarak üretilmesi sonucunda enzimin moleküler ağırlığı yaklaşık 60 kDa olarak tespit edilmiştir (Yang vd. 2013). Parashar ve Satyanarayana (2016a) tarafından oluşturulan *Ba-Gt-amy* kimerik enzimin *E. coli*'de *csp* promotörü kontrolünde rekombinant üretimi sonucu 68 kDa büyüklüğünde α -amilaz bandı gözlenmiştir. Baldan izole edilen *B. amyloliquefaciens* BH072 kaynaklı bakteriyel α -amilazın karakterizasyonu sonucunda proteinin büyüklüğü 68 kDa olarak belirlenmiştir (Du vd. 2018).

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

Üretilen rekombinant α -amilaz enziminin optimum çalışma koşulları pH 7.0 ve 60°C sıcaklıkta olduğu saptanmıştır. 1 saat sonunda, pH 6.0-7.5 değerleri arasında stabilitesinin %80'nin üzerinde, pH 5.0-8.0 arasında ise %60'ının korunduğu gözlenmiştir. α -amilaz enziminin, 1 saat süresince farklı sıcaklıklarda inkübe edilmesi sonucunda; en yüksek kararlılık gösterdiği değerin 20°C'de olduğu (%100), 20-40°C arasında stabilitenin %90'nın üzerinde, 50°C'de %81 ve 60°C'de %65 korunduğu, daha yüksek sıcaklıklarda ise aniden düştüğü tespit edilmiştir.

Liu ve Xu (2008) yaptıkları bir çalışmada, topraktan izole edilen *Bacillus* sp. YX-1 kaynaklı α -amilazın karakterizasyonunu gerçekleştirmiş ve optimum çalıştığı sıcaklık değerinin 40-50°C arasında olduğu, 60°C ve üzerinde ise aktivitede ani bir düşüş gözlemlendiğini bildirmiştir. Enzimin optimum çalıştığı pH değerinin 5.0 olduğu ve pH 4.5-11 arasında 1 saat bekletildiğinde aktivitenin %80'inin korunduğu tespit edilmiştir. *B. subtilis* PY22 α -amilazının (*AmyE*), optimum çalışma şartlarının 60°C sıcaklıkta ve pH 7.0'de olduğu belirlenmiştir (Karakas vd. 2010). Medaka balığı (*Oryzias latipes*) kaynaklı olgun (mature) formdaki α -amilazı kodlayan genin (*OLAmy*) *P. pastoris* KM71'de ekspresyonu sonucunda enzimin optimum sıcaklığı 49°C ve optimum pH'sı 7.12 olarak saptanmıştır (Mizutani vd. 2012). Ali vd. (2014) tarafından, sentetik tuzdan izole edilen zorunlu bir halofilik olan *A. gracilis* mantarından α -amilaz enzimi saflaştırılmış ve karakterizasyonu yapılmıştır. Ölçülen en yüksek aktivitenin pH 5.0'te ve 60°C sıcaklıkta olduğu bildirilmiştir. Chen vd. (2015), *B. subtilis* WB800 konakçı suşuna klonlandıkları,

B. amyloliquefaciens kaynaklı α -amilaz enziminin maksimum aktivite gösterdiği koşulları pH 6.0 ve 60°C sıcaklık olarak tespit etmiştir. Domuz pankreatik α -amilaz geninden (PPA) uygun formdaki PPA proteinini kodlayan cDNA elde edilerek, *P. pastoris* X-33 suşuna klonlanmıştır. Üretimi sonucu; enzimin en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık 50°C olarak tespit edilmiş ancak 55°C'den sonra aktivitede ani bir düşüş gözlenmiştir. En yüksek aktivite gösterdiği pH değeri ise 7.5 olarak belirlenmiş ve pH 5.5-9.5 arasında aktivitenin %50'sinden fazlası korunmuştur (Sun vd. 2018).

Yapılan çalışmaların değerlendirilmesi sonucunda, α -amilaz enziminin optimum çalışma koşullarının genellikle 40-60°C ve pH 5.0-8.0 arasında değiştiği gözlenmiştir. Ancak gerek enzimin optimum koşulları gerekse pH ve sıcaklık stabilitesi enzimin kaynağına göre farklılık göstermektedir. Sıcaklık ve pH gibi parametrelerin enzimin kullanılacağı alanlarda büyük önem arz etmesi nedeniyle α -amilazın kullanım alanlarına bağlı olarak; istenilen özelliklere sahip enzim kaynağı tercih edilmekte veya protein mühendisliği vb. teknikler kullanılarak arzu edilen özellikte enzimler tasarlanmaktadır. Bu çalışma sonucu elde edilen bakteriyel kaynaklı rekombinant α -amilaz enziminin; gıda, tekstil, ilaç, biyoyakıt üretimi vb. alanlarda kullanıma uygun olduğu saptanmıştır.

Çalışmada, farklı metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkisi incelendiğinde; 10 mM konsantrasyonundaki Ca^{2+} (%120) ve Mg^{2+} (%136) iyonlarının aktivatör etki göstererek enzim aktivitesini artırdığı ancak aynı konsantrasyondaki Fe^{2+} (%25), Zn^{2+} (%48) ve Cu^{2+} (%10>) iyonlarının inhibitör etki göstererek aktiviteyi düşürdüğü gözlenmiştir.

Yang vd. (2013), Alkalifilik *A. amylolytica* N10'dan elde edilen alkalik α -amilaz ile metal iyonlarını muamele ettiğinde; 1 mM konsantrasyonundaki Ca^{2+} , Co^{2+} ve Na^{+} aktiviteyi az miktarda artırdığını, aynı konsantrasyondaki Mg^{2+} , Fe^{3+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} ve Cu^{2+} iyonlarının ise aktiviteyi düşürdüğünü saptamıştır. *A. gracilis* mantarından izole edilen α -amilaz enziminin; BaCl_2 , MgCl_2 , HgCl_2 , CaCl_2 iyonları ile aktivitesi az miktarda artarken; FeCl_2 , ZnCl_2 , EDTA ve b-Merkaptoetanol ile aktivitesi azalmıştır (Ali vd. 2014). *E. coli*'de ekspres edilen *Ba-Gt-amy* kimerik enziminin aktivitesi üzerinde; EDTA, Ca^{2+} , Na^{2+} ve K^{+} iyonlarının önemli ölçüde bir etkisi olmaz iken; Mn^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} ve Ag^{2+} iyonları inhibe edici etki göstermiştir (Parashar ve Satyanarayana 2016a). Sun vd. (2018) yaptığı çalışmada, uygun formdaki domuz pankreatik α -amilazı üzerinde Ca^{2+} iyonu konsantrasyon artışına bağlı olarak aktivatör etki; Cu^{2+} , Fe^{2+} ve Zn^{2+} iyonları konsantrasyon artışına bağlı olarak inhibitör etki gösterdiğini bildirmiştir. *B. amyloliquefaciens* BH072 kaynaklı bakteriyel α -amilaz karakterize edildiğinde, Ca^{2+} iyonunun konsantrasyonundaki değişimin aktiviteyi etkilemediği (Ca^{2+} iyonundan bağımsız), Cu^{2+} ve Fe^{2+} iyonlarının aktiviteyi azalttığı saptanmıştır (Du vd. 2018). *A. oryzae* S2 kaynaklı *AmyA*'nın *P. pastoris* SMD1168H'ye klonlanması sonucu enzim üretilmiş ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. 4 mM konsantrasyonundaki iyonların etkisi incelendiğinde; Mg^{2+} , Ca^{2+} ve Fe^{2+} iyonları aktiviteyi önemli oranda artırırken, Cu^{2+} iyonunun enzimi inhibe ettiği gözlenmiştir (Trabelsi vd. 2019).

Çalışmada incelenen metal iyonlarının etkisi diğer çalışmalarla genel olarak tutarlılık göstermiştir. Ca^{2+} iyonu aktiviteyi konsantrasyona bağlı artırmış (Ca^{2+} iyonundan bağımsız olanlar hariç), Cu^{2+} ve Zn^{2+} iyonları aktiviteyi düşürmüş veya inhibe etmiş, Mg^{2+} ve Fe^{2+} iyonlarının etkisi ise enzime göre değişiklik (aktivatör veya inhibitör) göstermiştir.

6. SONUÇLAR

Yapılan bu tez çalışmasında, *ADH2SNT5* promotorunun rekombinant α -amilaz ekspresyonundaki başarısının ve sentezlenen α -amilaz protein formunun (tam uzunluktaki ve olgun formu) aktivite üzerindeki etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışma kapsamında; önceki bir çalışmada (Karaoğlu 2016a) oluşturulmuş olan sentetik *ADH2* (*ADH2SNT5*) promotoru kullanılarak, α -amilaz geninin doğal sinyalini içeren tam uzunluktaki (full lenght) formu ve olgun (mature) formunun *P. pastoris* GS115 suşunda rekombinant olarak üretimi gerçekleştirilmiş ve verimleri karşılaştırılmıştır. Verimliliği fazla olduğu belirlenen klon büyük ölçekli üretime alınarak, rekombinant α -amilaz enziminin yüksek oranda üretimi sağlanmıştır.

B. subtilis PY22 kaynaklı α -amilaz geninin (*AmyE*) her iki formu, sentetik *ADH2* (*ADH2SNT5*) promotoru ve sekresyon sinyali olarak α -çiftleşme faktörü (α -pre-pro sekansı) içeren ekspresyon vektörüne klonlanarak, *P. pastoris* GS115 suşuna transforme edilmiştir. Oluşturulan klonlardan, α -amilaz salgılanmasının ön denemeleri ve gerçek zamanlı PZR analizi ile tek kopya oldukları belirlenen iki klon (biri olgun diğeri tam uzunluktaki form) seçilerek engelli erlende üretime alınmıştır. Etanol ile indüklemeye yapılarak, 28°C, pH 6.0 (üretim için belirlenen en uygun pH değeri) ve 225 rpm koşullarında, 96 saat boyunca sürdürülen üretim fazı sonunda SDS-PAGE analizi uygulanmış ve proteinin moleküler ağırlığının yaklaşık 80 kDa boyutlarında olduğu tespit edilmiştir. Hem SDS-PAGE bantlarının kalınlığı hem de α -amilaz aktivitesi sonuçları zamana bağlı olarak artış göstermiş ve FL (*P. pastoris* GS115-pADH2SNT5 α - α -Amilaz-Full Lenght) klonunun en yüksek aktivitesi 74.2±0.94 U/ml, MF (*P. pastoris* GS115-pADH2SNT5 α - α -Amilaz-Mature) klonunun en yüksek aktivitesi ise 215±3.18 U/ml olarak belirlenmiştir. Aradaki yaklaşık 3 kat olan fark nedeni ile diğer analizler ve büyük ölçekli üretim için uygun olan klon, MF klonu olarak seçilmiştir.

En iyi üretimin olduğu belirlenen MF klonunun, *ADH2SNT5* promotoru tarafından kontrol edilmesinden dolayı birincil indükleyici karbon kaynağı olarak etanol kullanılmış olup avantajlı bir karbon kaynağı olan glikozun da bu promotor için kullanılabilirliği karşılaştırılmıştır. Etanol ile indüklemeye (215 U/ml), glikoz ile indüklemeye (106 U/ml) göre yaklaşık 2 kat fazla α -amilaz üretimi olduğu tespit edilmiştir.

SDS-PAGE analizine ait jel görüntülerinde, rekombinant α -amilaz bantlarına ek olarak çoğul bantlar olması ve proteinin teorik olarak hesaplanan moleküler ağırlığından (68.2 kDa) yüksek boyutlarda gözlenmesi nedeni ile glikolize olma durumunun incelenmesi için α -amilaz enzimi *EndoH* ile muamele edilmiştir. Denatüre edilen α -amilazın SDS-PAGE analizi ile görüntülenmesi sonucunda protein bandının yaklaşık 70 kDa boyutlarına düştüğü ve bandın kalınlığının arttığı tespit edilmiştir. Bu sonuç ile proteinin glikolizasyona uğradığı ve glikozil üniteleri içerdiği (yaklaşık %12) doğrulanmıştır.

Rekombinant α -amilaz enziminin büyük ölçekli üretimi için seçilen MF klonu, 5 L hacimli biyoreaktörde üretime alınmıştır. Fermentasyonun ilk aşaması olan kesikli faz sonunda kültürden alınan örneğin yaş hücre ağırlığı 102 g/L olduğu belirlenmiştir. İkinci aşama olan yarı-kesikli fazda (besleme fazı), 28°C, pH 6.0 ve normoksik koşullarda (ÇO: %20), sabit μ (μ : 0.028 sa⁻¹) stratejisine uygun şekilde etanol besleme ile 90 saat süresince

α -amilaz üretimi gerçekleştirilmiştir. MF klonunun büyük ölçekli üretimi sonucunda α -amilaz enzimi zamana bağlı olarak artış göstermiş ve en yüksek α -amilaz aktivitesi 90. saatte 2219 ± 52.18 U/ml (1403 U/mg) olarak hesaplanmıştır. Engelli erlen (215 ± 3.18 U/ml) ile biyoreaktör üretimi karşılaştırıldığında α -amilaz enziminin yaklaşık 10 kat arttığı gözlenmiştir.

Üretilen rekombinant α -amilaz enziminin karakterizasyonu gerçekleştirilmiş ve enzimin optimum çalıştığı koşulların pH 7.0 ve 60°C sıcaklıkta olduğu belirlenmiştir. α -amilazın, 1 saat süresince farklı pH'larda inkübe edilmesi sonucunda pH 6.0-7.5 değerleri arasında stabilitenin %80'nin üzerinde korunduğu saptanmıştır. Enzimin, 1 saat süresince farklı sıcaklıklarda inkübe edilmesi sonucunda en yüksek kararlılık gösterdiği değerin 20°C'de olduğu, 20-40°C sıcaklık değeri arasında stabilitenin %90'nın üzerinde korunduğu ancak 50°C'den yüksek sıcaklıklarda stabilitenin düştüğü belirlenmiştir. Enzimin en yüksek aktivite gösterdiği 60°C'de ise aktivitesinin %65'ini koruduğu saptanmıştır. 10 mM konsantrasyonundaki Ca^{2+} ve Mg^{2+} iyonları enzim aktivitesini artırırken, aynı konsantrasyondaki Fe^{2+} , Zn^{2+} ve Cu^{2+} iyonları inhibitör etki göstererek aktiviteyi düşürmüştür.

Tüm bu veriler doğrultusunda; rekombinant bakteriyel kaynaklı α -amilaz enziminin, *P. pastoris* ekspresyon sisteminde güçlü bir alternatif olarak kullanılabilecek *ADH2* promotorunun kontrolünde, büyük ölçekli üretimde başarıyla üretildiği ve buna ek olarak α -amilaz geninin olgun formunun ekspresyonunun aktivite (verimlilik) üzerinde önemli oranda etkisinin olduğu saptanmıştır.

Bu tez çalışmasının sonucu olarak hem gıda hem de gıda dışı diğer birçok alanda (tekstil, ilaç, biyoyakıt vb.) kullanılabilecek nitelikteki rekombinant α -amilazı, moleküler tekniklerle geliştirilen *ADH2SNT5* sentetik promotorun kontrolünde yüksek verimlilikle üreten *P. pastoris* suşu geliştirilmiştir. Ayrıca bu çalışma, *P. pastoris* konakçı suşunda *ADH2* promotoru kontrolünde rekombinant α -amilaz üretimi üzerine yapılan ilk çalışma olması nedeni ile özgün nitelikte olup *ADH2* promotorunun diğer rekombinant proteinlerin de büyük ölçekli üretiminde kullanılabilecek başarılı bir promotor olduğunu göstermektedir.

7. KAYNAKLAR

- Aguilar, G., Morlon-Guyot, J., Trejo-Aguilar, B. and Guyot, J. P. 2000. Purification and characterization of an extracellular α -amylase produced by *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010T, an amylolytic lactic acid bacterium. *Enzyme and Microbial Technology*, 27(6): 406-413.
- Ahmad, M., Hirz, M., Pichler, H. and Schwab, H. 2014. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98: 5301–5317.
- Aiyer, P.V. 2005. Amylases and their applications. *African Journal of Biotechnology*, 4(13): 1529-1535.
- Ali, I., Akbar, A., Yanwisetpakdee, B., Prasongsuk, S., Lotrakul, P., and Punnapayak, H. 2014. Purification, characterization, and potential of saline waste water remediation of a polyextremophilic α -amylase from an obligate halophilic *Aspergillus gracilis*. *BioMed Research International*, 2014: 106937.
- Ali, M. B., Ghram, M., Hmani, H., Khemakhem, B., Haser, R. and Bejar, S. 2011. Toward the smallest active subdomain of a TIM-barrel fold: Insights from a truncated α -amylase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 411(2): 265-270.
- Andersson, L. 2001. Studies on starch structure and the differential properties of starch branching enzymes, PhD Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, 36 p.
- Antranikian, G. 1992. Microbial degradation of starch. In: Winkelmann, G. (Ed.), *Microbial Degradation of Natural Products*, VCH, Weinheim, pp. 27-56.
- Banner, D.W., Bloomer, A.C., Petsko, G.A., Philips, D.C., Pogson, C.I., Wilson, I.A., Corran, P.H., Furth, A.J., Milman, J.D., Offord, R.E., Priddle, J.D. and Waley, S.G. 1975. Structure of chicken muscle triose phosphate isomerase determined by crystallography at 250 Å resolution, using amino acid sequence data. *Nature*, 255: 609-614.
- Baumann, K., Maurer, M., Dragosits, M., Cos, O., Ferrer, P. and Mattanovich, D. 2008. Hypoxic fed-batch cultivation of *Pichia pastoris* increases specific and volumetric productivity of recombinant proteins. *Biotechnology and Bioengineering*, 100(1): 177-183.
- Bertoldo, C. and Antranikian, G. 2002. Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria. *Current Opinion in Chemical Biology*, 6(2): 151-160.
- Bhanja, T., Rout, S., Banerjee, R. and Bhattacharyya, B.C. 2007. Comparative profiles of α -amylase production in conventional tray reactor and GROWTEKbioreactor, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 30: 369–376.
- Blennow, A., Hansen, M., Schulz, A., Jorgensen, K., Donald, A.M. and Sanderson, J. 2003. The molecular deposition of transgenically modified starch in the starch granule as imaged by functional microscopy. *Journal of Structural Biology*, 143 (3): 229-241.

- Burhan, A., Nisa, U., Gökhan, C., Ömer, C., Ashabil, A., and Osman, G. 2003. Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate ANT-6. *Process Biochemistry*, 38(10): 1397-1403.
- Burrell, M. M. 2003. Starch: the need for improved quality or quantity—an overview. *Journal of Experimental Botany*, 54(382): 451-456.
- Cereghino, J.L. and Cregg, J.M. 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*, 24: 45-66.
- Chen, J., Chen, X., Dai, J., Xie, G., Yan, L., Lu, L. and Chen, J. 2015. Cloning, enhanced expression and characterization of an α -amylase gene from a wild strain in *B. subtilis* WB800. *International Journal of Biological Macromolecules*, 80: 200-207.
- Chen, M. T., Lin, S., Shandil, I., Andrews, D., Stadheim, T. A. and Choi, B. K. 2012. Generation of diploid *Pichia pastoris* strains by mating and their application for recombinant protein production. *Microbial Cell Factories*, 11(1): 91.
- Chiruvolu, V., Cregg, J. M. and Meagher, M. M. 1997. Recombinant protein production in an alcohol oxidase-defective strain of *Pichia pastoris* in fedbatch fermentations. *Enzyme and Microbial Technology*, 21(4): 277-283.
- Cichoke, A. J. 1999. The complete book of enzyme therapy. Penguin.
- Coulter, T. P. 2002. Food: the chemistry of its components. *Food: the chemistry of its components*, 4th Ed., Royal Society of Chemistry, UK, pp. 512.
- Cregg, J. M. and Tolstorukov, I. I. 2012. *U.S. Patent No. 8,222,386*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Cregg, J.M. 2007. *Pichia* Protocols Methods in Molecular Biology Series, (389): 1-10.
- Cregg, J. M., Cereghino, J. L., Shi, J. and Higgins, D. R. 2000. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Molecular Biotechnology*, 16(1): 23-52.
- Cos, O., Ramón, 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(1): 17.
- Daly, R. and Hearn, M. T. 2005. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *Journal of Molecular Recognition: An Interdisciplinary Journal*, 18(2): 119-138.
- Delmer, D. P. and Amor, Y. 1995. Cellulose biosynthesis. *The Plant Cell*, 7(7): 987.
- Demain, A. L. 2005. Industrial mycology: past, present and future. In: An, Z. (Ed.), *Handbook of Industrial Mycology*, Marcel Dekker, pp. 1-25, New York.
- De Schutter, K., Lin, Y. C., Tiels, P., Van Hecke, A., Glinka, S., Weber-Lehmann, J., Rouzé, P., Van de Peer, Y. and Callewaert, N. 2009. Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris*. *Nature Biotechnology*, 27(6): 561.

- De Smidt, O., Du Preez, J. C. and Albertyn, J. 2008. The alcohol dehydrogenases of *Saccharomyces cerevisiae*: a comprehensive review. *FEMS Yeast Research*, 8(7): 967-978.
- Dey, T. B., Kumar, A., Banerjee, R., Chandna, P. and Kuhad, R. C. 2016. Improvement of microbial α -amylase stability: strategic approaches. *Process Biochemistry*, 51(10): 1380-1390.
- Domene-López, D., García-Quesada, J. C., Martín-Gullón, I. and Montalbán, M. G. 2019. Influence of starch composition and molecular weight on physicochemical properties of biodegradable films. *Polymers*, 11(7): 1084.
- Du, R., Song, Q., Zhang, Q., Zhao, F., Kim, R. C., Zhou, Z. and Han, Y. 2018. Purification and characterization of novel thermostable and Ca-independent α -amylase produced by *Bacillus amyloliquefaciens* BH072. *International Journal of Biological Macromolecules*, 115: 1151-1156.
- Fitter, J. 2005. Structural and dynamical features contributing to thermostability in α -amylases. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 62(17): 1925-1937.
- Fujimoto, Z., Takase, K., Doui, N., Momma, M., Matsumoto, T. And Mizuno, H. 1998. Crystal structure of a catalytic-site mutant α -amylase from *Bacillus subtilis* complexed with maltopentaose. *Journal of Molecular Biology*, 277(2): 393-407.
- Fujiwara, S. 2002. Extremophiles: Developments of their special functions and potential resource. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 94(6): 518-525.
- Goyal, N., Gupta, J. K. and Soni, S. K. 2005. A novel raw starch digesting thermostable α -amylase from *Bacillus* sp. I-3 and its use in the direct hydrolysis of raw potato starch. *Enzyme and Microbial Technology*, 37(7): 723-734.
- Grootegeod, J. A., Lauwers, A. M. and Heinen, W. 1973. Separation and partial purification of extracellular amylase and protease from *Bacillus caldolyticus*. *Archiv für Mikrobiologie*, 90(3): 223-232.
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V.K. and Chauhan, B. 2003. Microbial α amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*, 38: 1599-1616.
- Hannah, L. C. and James, M. 2008. The complexities of starch biosynthesis in cereal endosperms. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(2): 160-165.
- Hendriksen, H. V., Pedersen, S. and Bisgard-Frantzen, H. 1999. A process for textile warp sizing using enzymatically modified starches. *Patent application WO*, 99, 35325.
- Henrissat, B. 1991. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal*, 280(2): 309-316.
- Higgins, D. R. and Cregg, J. M. 1998. Introduction to *Pichia pastoris*. In: *Pichia* Protocols, Humana Press, pp. 1-15.
- Hohenblum, H., Gasser, B., Maurer, M., Borth, N. and Mattanovich, D. 2004. Effects of gene dosage, promoters, and substrates on unfolded protein stress of recombinant *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioengineering*, 85(4): 367-375.
- Horvatova, V., Janeček, Š. and Šturdík, E. 2001. Amylolytic enzymes: molecular aspects of their properties. *General Physiology and Biophysics*, 20: 7-32.

- Iefuji, H., Chino, M., Kato, M. and Iimura, Y. 1996. Raw-starch-digesting and thermostable α -amylase from the yeast *Cryptococcus* sp. S-2: purification, characterization, cloning and sequencing. *Biochemical Journal*, 318(3): 989-996.
- 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: *Pichia Protocols*, Humana Press, pp. 65-75.
- Inan, M. and Meagher, M. M. 2001. Non-repressing carbon sources for alcohol oxidase (AOX1) promoter of *Pichia pastoris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92: 585-589.
- James, J. A. and Lee, B. H. 1997. Glucoamylases: microbial sources, industrial applications and molecular biology-a review. *Journal of Food Biochemistry*, 21(6): 1-52.
- Janeček, Š., Svensson, B. and MacGregor, E. A. 2014. α -Amylase: an enzyme specificity found in various families of glycoside hydrolases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(7): 1149-1170.
- Janeček, Š., Svensson, B. and Henrissat, B. 1997. Domain evolution in the α -amylase family. *Journal of Molecular Evolution*, 45(3): 322-331.
- Janeček, Š. 1994. Sequence similarities and evolutionary relationships of microbial, plant and animal α -amylases. *European Journal of Biochemistry*, 224(2): 519-524.
- Jobling, S. 2004. Improving starch for food and industrial applications. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(2): 210-218.
- John, F. K. 1987. Enzyme technology. In: Rehm, H.J. and Reed, G. (Eds.), *Biotechnology* 7A, Lincoln, UK. pp. 37-62.
- Karakas, B., Inan, M. and Certel, M. 2010. Expression and characterization of *Bacillus subtilis* PY22 α -amylase in *Pichia pastoris*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 64 (3-4): 129-134.
- Karaoglan, M., Erden-Karaoglan, F., Yilmaz, S. and Inan, M. 2019. Identification of major ADH genes in ethanol metabolism of *Pichia pastoris*. *Yeast*.
- Karaoglan, M., Karaoglan, F.E. and Inan, M. 2016. Comprasion of ADH3 promotor with commonly used promoters for recombinant protein production in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 121: 112-117.
- Karaoğlu, F.E. 2016a. *Pichia pastoris* Alkol Dehidrogenaz (ADH3) promotoru üzerine çalışmalar. Doktora tezi, Akdeniz Üniversitesi, Antalya, 64 s.
- Karaoğlu, M. 2016b. *Pichia pastoris* etanol metabolizması üzerine çalışmalar. Doktora tezi, Akdeniz Üniversitesi, Antalya, 109 s.
- Kato, S., Ishibashi, M., Tatsuda, D., Tokunaga, H. and Tokunaga, M. 2001. Efficient expression, purification and characterization of mouse salivary α -amylase secreted from methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Yeast*, 18(7): 643-655.
- Kim, T. U., Gu, B. G., Jeong, J. Y., Byun, S. M., and Shin, Y. C. 1995. Purification and Characterization of a Maltotetraose-Forming Alkaline (alpha)-Amylase from an Alkalophilic *Bacillus* Strain, GM8901. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(8): 3105-3112.

- Knox, A. M., du Preez, J. C. and Kilian, S. G. 2004. Starch fermentation characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* strains transformed with amylase genes from *Lipomyces kononenkoae* and *Saccharomycopsis fibuligera*. *Enzyme and Microbial Technology*, 34(5): 453-460.
- Konsoula, Z. and Liakopoulou-Kyriakides, M. 2007. Co-production of α -amylase and β -galactosidase by *Bacillus subtilis* in complex organic substrates. *Bioresource Technology*, 98(1): 150-157.
- Korma, S. A., Niazi, S., Ammar, A. F., Zaaboul, F. and Zhang, T. 2016. Chemically modified starch and utilization in food stuffs. *International Journal of Nutrition and Food Sciences*, 5(4): 264.
- Kubo, A., Fujita, N., Harada, K., Matsuda, T., Satoh, H. and Nakamura, Y. 1999. The starch-debranching enzymes isoamylase and pullulanase are both involved in amylopectin biosynthesis in rice endosperm. *Plant Physiology*, 121(2): 399-410.
- Kuriki, T., Hondoh, H. and Matsuura, Y. 2005. The conclusive proof that supports the concept of the α -amylase family: structural similarity and common catalytic mechanism. *Biologia Bratislava*, 60: 13-16.
- Kuriki, T. and Imanaka, T. 1999. The concept of the α -amylase family: structural similarity and common catalytic mechanism. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 87(5): 557-565.
- Kurtzman, C. P. 2009. Biotechnological strains of *Komagataella (Pichia) pastoris* are *Komagataella phaffii* as determined from multigene sequence analysis. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36(11): 1435.
- Lee, S. P., Morikawa, M., Takagi, M. and Imanaka, T. 1994. Cloning of the aapT gene and characterization of its product, alpha-amylase-pullulanase (AapT), from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. strain XAL601. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(10): 3764-3773.
- Lévêque, E., Haye, B. and Belarbi, A. 2000. Cloning and expression of an α -amylase encoding gene from the hyperthermophilic archaeobacterium *Thermococcus hydrothermalis* and biochemical characterisation of the recombinant enzyme. *FEMS Microbiology Letters*, 186(1): 67-71.
- Li, P., Anumanthan, A., Gao, X. G., Ilangovan, K., Suzara, V. V., Düzgüneş, N. and Renugopalakrishnan, V. 2007. Expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 142(2): 105-124.
- Li, S., Sing, S. and Wang, Z. 2011. Improved expression of *Rhizopus oryzae* α -amylase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 79(1): 142-148.
- Liu, X. D. and Xu, Y. 2008. A novel raw starch digesting α -amylase from a newly isolated *Bacillus* sp. YX-1: purification and characterization. *Bioresource Technology*, 99(10): 4315-4320.
- MacGregor, E. A. 2005. An overview of clan GH-H and distantly related families. *Biologia*, 60(16): 5-12.
- Malhotra, R., Noorwez, S. M. and Satyanarayana, T. 2000. Production and partial characterization of thermostable and calcium-independent α -amylase of an

- extreme thermophile *Bacillus thermooleovorans* NP54. *Letters in Applied Microbiology*, 31(5): 378-384.
- Martin, C. and Smith, A. M. 1995. Starch biosynthesis. *The Plant Cell*, 7(7): 971.
- Mizutani, K., Toyoda, M., Otake, Y., Yoshioka, S., Takahashi, N. and Mikami, B. 2012. Structural and functional characterization of recombinant medaka fish alpha-amylase expressed in yeast *Pichia pastoris*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1824(8): 954-962.
- Mojsov, K. 2012. Microbial alpha-amylases and their industrial applications: a review. *International Journal of Management, IT and Engineering (IJMIE)*, 2(10): 583-609.
- Mótyán, J. A., Gyémánt, G., Harangi, J. and Bagossi, P. 2011. Computer-aided subsite mapping of α -amylases. *Carbohydrate Research*, 346(3): 410-415.
- Morell, M. K. and Myers, A. M. 2005. Towards the rational design of cereal starches. *Current Opinion in Plant Biology*, 8(2): 204-210.
- Neidleman, S.L. 1991. Enzymes in the food industry: a backward glance. *Food Technology*, 45(1): 88-91.
- Nielsen, J. E. and Borchert, T. V. 2000. Protein engineering of bacterial α -amylases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1543(2), 253-274.
- Nielsen, J. E., Beier, L., Otzen, D., Borchert, T. V., Frantzen, H. B., Andersen, K. V. and Svendsen, A. 1999. Electrostatics in the active site of an α -amylase. *European Journal of Biochemistry*, 264(3): 816-824.
- Nisha, M. and Satyanarayana, T. 2013. Characterization of recombinant amylopullulanase (gt-apu) and truncated amylopullulanase (gt-apuT) of the extreme thermophile *Geobacillus thermoleovorans* NP33 and their action in starch saccharification. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(14): 6279-6292.
- Norouzian, D., Akbarzadeh, A., Scharer, J. M. and Young, M. M. 2006. Fungal glucoamylases. *Biotechnology Advances*, 24(1): 80-85.
- Oboh, G. 2005. Isolation and characterization of amylase from fermented cassava (*Manihot esculenta* Crantz) waste water. *African Journal of Biotechnology*, 4(10): 1117-1123.
- O'Neill, E. C. and Field, R. A. 2015. Underpinning starch biology with in vitro studies on carbohydrate-active enzymes and biosynthetic glycomaterials. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 3: 136.
- Oslancová, A. and Janeček, Š. 2002. Oligo-1, 6-glucosidase and neopullulanase enzyme subfamilies from the α -amylase family defined by the fifth conserved sequence region. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 59(11): 1945-1959.
- Ozçelik, A.T., Yılmaz, S. and Inan, M. 2019. *Pichia pastoris* promoters. Brigitte Gasser and Diethard Mattanovich (Eds.), *Recombinant Protein Production in Yeast, Methods in Molecular Biology*, pp. 97-112.

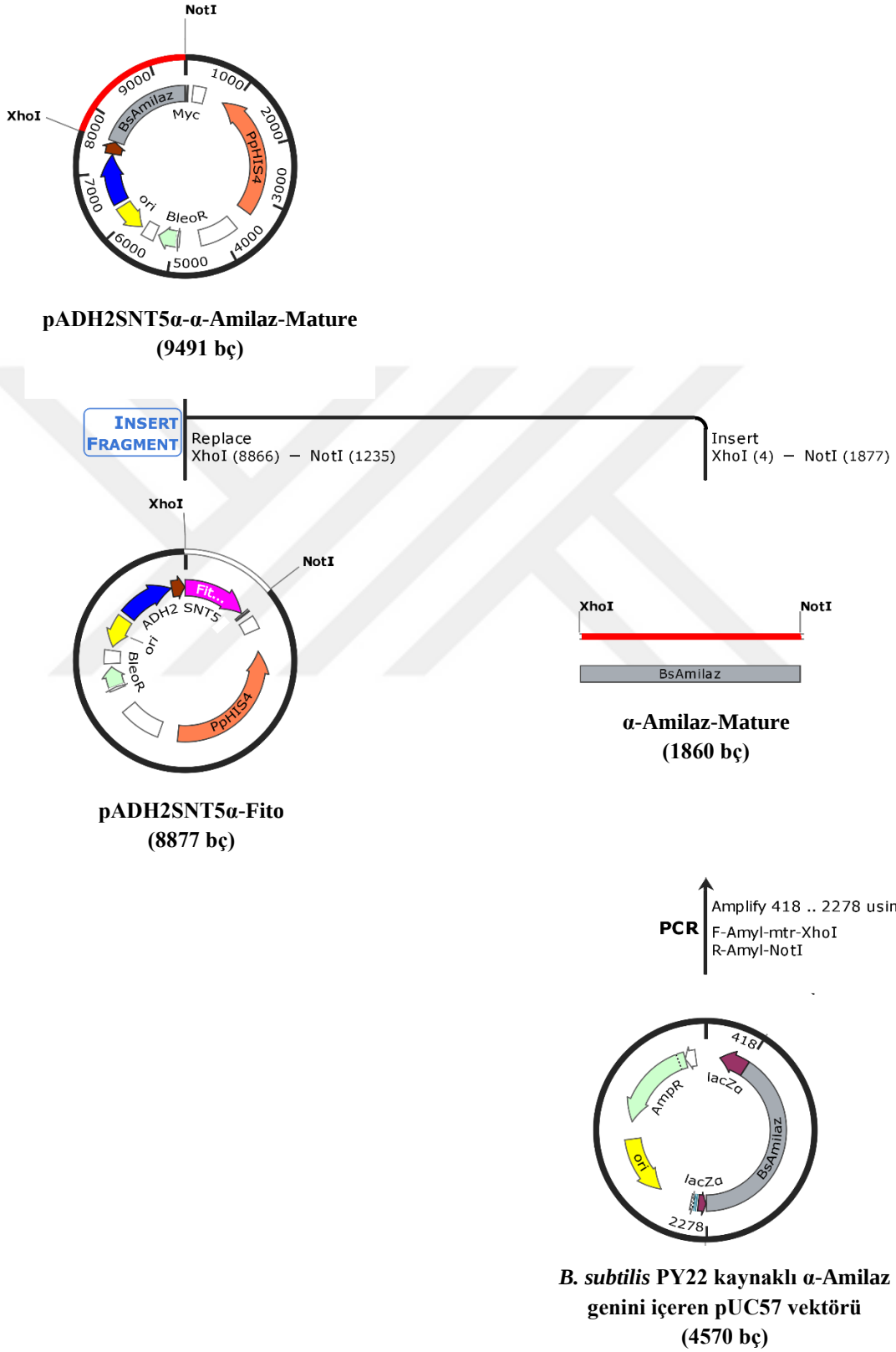
- Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C.R., Soccol, V. T., Singh, D. and Mohan, R. 2000. Advances in microbial amylases. *Biotechnology and Advanced Biochemistry*, 31: 135-152.
- Parashar, D., and Satyanarayana, T. 2017. Production of chimeric acidic α -amylase by the recombinant *Pichia pastoris* and its applications. *Frontiers in Microbiology*, 8: 493.
- Parashar, D. and Satyanarayana, T. 2016a. A chimeric α -amylase engineered from *Bacillus acidicola* and *Geobacillus thermoleovorans* with improved thermostability and catalytic efficiency. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 43(4): 473-484.
- Parashar, D. and Satyanarayana, T. 2016b. Enhancing the production of recombinant acidic α -amylase and phytase in *Pichia pastoris* under dual promoters [constitutive (GAP) and inducible (AOX)] in mixed fed batch high cell density cultivation. *Process Biochemistry*, 51(10): 1315-1322.
- Payen, A. and Persoz, J. F. 1833. Memoire sur la diastase, les principaux produits de ses reactions, et leur applications aux arts industriels. *Annales des Chimie et des Physique*, serie 2, 53: 73-92.
- Pfeiffer, T. and Morley, A. 2014. An evolutionary perspective on the Crabtree effect. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 1: 17.
- Polaina, J. and MacCabe, A. P. 2007. Industrial Enzymes, pp. 531-547.
- Poulsen, P. B. and Bucholz, K. 2002. History of enzymology with emphasis on food production. In: Whitaker, J.R. (Ed.) *Handbook of Food Enzymology*, Marcel Dekker Incorporated, New York, NY, pp. 11-20.
- Rana, N., Walia, A. and Gaur, A. 2013. α -Amylases from microbial sources and its potential applications in various industries. *National Academy Science Letters*, 36(1): 9-17.
- Ratanakhanokchai, K., Kaneko, J., Kamio, Y. and Izaki, K. 1992. Purification and properties of a maltotetraose and maltotriose-producing amylase from *Chloroflexus aurantiacus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(8): 2490-2494.
- Ratnayake, W. S. and Jackson, D. S. 2008. Starch gelatinization. *Advances in Food and Nutrition Research*, 55: 221-268.
- Reddy, N.S., Nimmagadda, A. and Sambasiva Rao K.R.S. 2003. An overview of the microbial α -amylase family. *African Journal of Biotechnology*, 2(12): 645-648.
- Pfeiffer, T. and Morley, A. 2014. An evolutionary perspective on the crabtree effect. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 1: 17.
- Romanos, M. A., Scorer, C. A. and Clare, J. J. 1992. Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast*, 8(6): 423-488.
- Rydberg, E. H. et al. 1999. Cloning, mutagenesis, and structural analysis of human pancreatic α -amylase expressed in *Pichia pastoris*. *Protein Science*, 8(3): 635-643.
- Salt, W. B. and Schenker, S. 1976. Amylase-its clinical significance: a review of the literature. *Medicine*, 55: 269-289.

- Sambrook, J. and Russel, D. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sharma, A. and Satyanarayana, T. 2013. Microbial acid-stable α -amylases: characteristics, genetic engineering and applications. *Process Biochemistry*, 48(2): 201-211.
- Shen, S., Sulter, G., Jeffries, T. W. and Cregg, J. M. 1998. A strong nitrogen source-regulated promoter for controlled expression of foreign genes in the yeast *Pichia pastoris*. *Gene*, 216(1): 93-102.
- Sills, A. M., Sauder, M. E. and Stewart, G. G. 1984. Isolation and characterization of the amylolytic system of *Schwanniomyces castelli*. *Journal Institute of Brewing*, 90: 311.
- Sindhu, R., Binod, P., Madhavan, A., Beevi, U. S., Mathew, A. K., Abraham, A., Pandey, A. and Kumar, V. 2017. Molecular improvements in microbial α -amylases for enhanced stability and catalytic efficiency. *Bioresource Technology*, 245: 1740-1748.
- Sivaramakrishnan, S., Gangadharan, D., Nampoothiri, K.M., Soccol, C.R. and Pandey, A. 2006. α -Amylase from microbial sources – an overview on recent developments. *Food Technology and Biotechnology*, 44(2): 173-184.
- Slattery, C. J., Kavakli, I. H. and Okita, T. W. 2000. Engineering starch for increased quantity and quality. *Trends in Plant Science*, 5(7): 291-298.
- Spohner, S. C., Müller, H., Quitmann, H. And Czermak, P. 2015. Expression of enzymes for the usage in food and feed industry with *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology*, 202: 118-134.
- Stadlmayr, G., Mecklenbräuker, A., Rothmüller, M., Maurer, M., Sauer, M., Mattanovich, D. and Gasser, B. 2010. Identification and characterisation of novel *Pichia pastoris* promoters for heterologous protein production. *Journal of Biotechnology*, 150(4): 519-529.
- Stam, M. R., Danchin, E. G., Rancurel, C., Coutinho, P. M. and Henrissat, B. 2006. Dividing the large glycoside hydrolase family 13 into subfamilies: towards improved functional annotations of α -amylase-related proteins. *Protein Engineering, Design and Selection*, 19(12): 555-562.
- Sun, L. H., Qin, T., Liu, Y., Zhao, H., Xia, X. and Lei, X. 2018. Cloning, expression, and characterization of a porcine pancreatic α -amylase in *Pichia pastoris*. *Animal Nutrition*, 4(2): 234-240.
- Svensson, B. 1994. Protein engineering in the α -amylase family: catalytic mechanism, substrate specificity and stability. *Plant Molecular Biology*, 25(2): 141-157.
- Takata, H., Kuriki, T., Okada, S., Takesada, Y., Iizuka, M., Minamiura, N. and Imanaka, T. 1992. Action of neopullulanase. Neopullulanase catalyzes both hydrolysis and transglycosylation at α -(1-4)- and α -(1-6)-glucosidic linkages. *Journal of Biological Chemistry*, 267(26): 18447-18452.

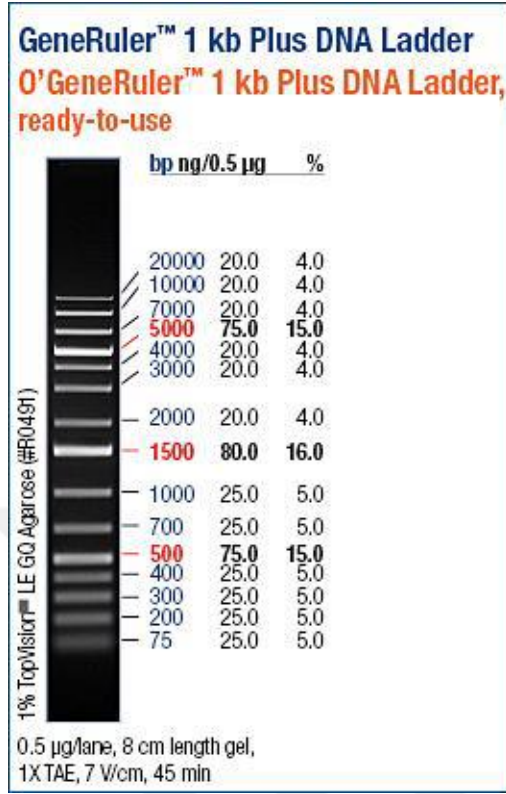
- Tanaka, A. and Hoshino, E. 2002. Calcium-binding parameter of *Bacillus amyloliquefaciens* α -amylase determined by inactivation kinetics. *Biochemical Journal*, 364(3): 635-639.
- Trabelsi, S., Sahnoun, M., Elgharbi, F., Ameri, R., Mabrouk, S. B., Mezghani, M., Hmida-Sayari, A. and Bejar, S. 2019. *Aspergillus oryzae* S2 AmyA amylase expression in *Pichia pastoris*: production, purification and novel properties. *Molecular Biology Reports*, 46(1): 921-932.
- Tschopp, J.F. and Cregg, J.M. 1991. Heterologous gene expression in methylotrophic yeast. In: Rokem, J.S. (Ed.), *Biology of Methylophils*, Butterworth-Heinemann, Boston, MA. pp. 305-322.
- Tschopp, J. F., Brust, P. F., Cregg, J. M., Stillman, C. A. and Gingeras, T. R. 1987. Expression of the lacZ gene from two methanol-regulated promoters in *Pichia pastoris*. *Nucleic Acids Research*, 15(9): 3859-3876.
- Van Dam, H. W. and Hille, J. D. R. 1992. Yeast and enzymes in bread making. *Cereal Foods World*, 37: 245-252.
- Van Der Maarel, M. J., Van der Veen, B., Uitdehaag, J. C., Leemhuis, H. and Dijkhuizen, L. 2002. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *Journal of Biotechnology*, 94(2): 137-155.
- Vogl, T. and Glieder, A. 2013. Regulation of *Pichia pastoris* promoters and its consequences for protein production. *New Biotechnology*, 30(4): 385-404.
- Wang, C. H., Liu, X. L., Huang, R. B., He, B. F. and Zhao, M. M. 2018. Enhanced acidic adaptation of *Bacillus subtilis* Ca-independent alpha-amylase by rational engineering of pKa values. *Biochemical Engineering Journal*, 139: 146-153.
- Windish, W.W. and Mhatre, N.S. 1965. Microbial amylases. *Advances in Applied Microbiology*, 7: 273-304.
- Wiseman, A., 1987. The application of enzymes in industry. In: Horwood, E. (Ed.), *Handbook of Enzymes Biotechnology*. Second Edition, Chichester, UK, pp. 274-373.
- Wong, D.W.S. and Robertson, G.H. 2002b. β -Amylases. In: Whitaker, J.R., Voragen, A.G.J. and Wong, D.W. (Eds.), *Handbook of Food Enzymology*, Marcel Dekker Incorporated, New York, NY. pp. 719-726.
- Yang, H., Liu, L., Shin, H. D., Chen, R. R., Li, J., Du, G. and Chen, J. 2013. Comparative analysis of heterologous expression, biochemical characterization optimal production of an alkaline α -amylase from alkaliphilic *Alkalimonas amylolytica* in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. *Biotechnology Progress*, 29(1): 39-47.
- Yurimoto, H., Oku, M. and Sakai, Y. 2011. Yeast methylotrophy: metabolism, gene regulation and peroxisome homeostasis. *International Journal of Microbiology*.
- Zepeda, A. B., Pessoa Jr, A. and Farias, J. G. 2018. Carbon metabolism influenced for promoters and temperature used in the heterologous protein production using *Pichia pastoris* yeast. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49: 119-127.

8. EKLER

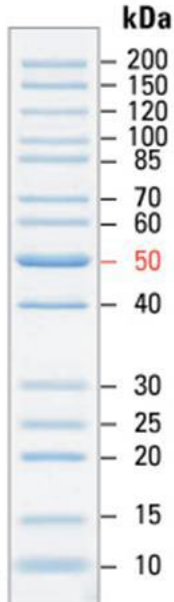
EK-1. pADH2SNT5 α - α -Amilaz-Mature Form (MF) oluřturulma basamakları



EK-2. Çalışmada kullanılan DNA ve protein standartları

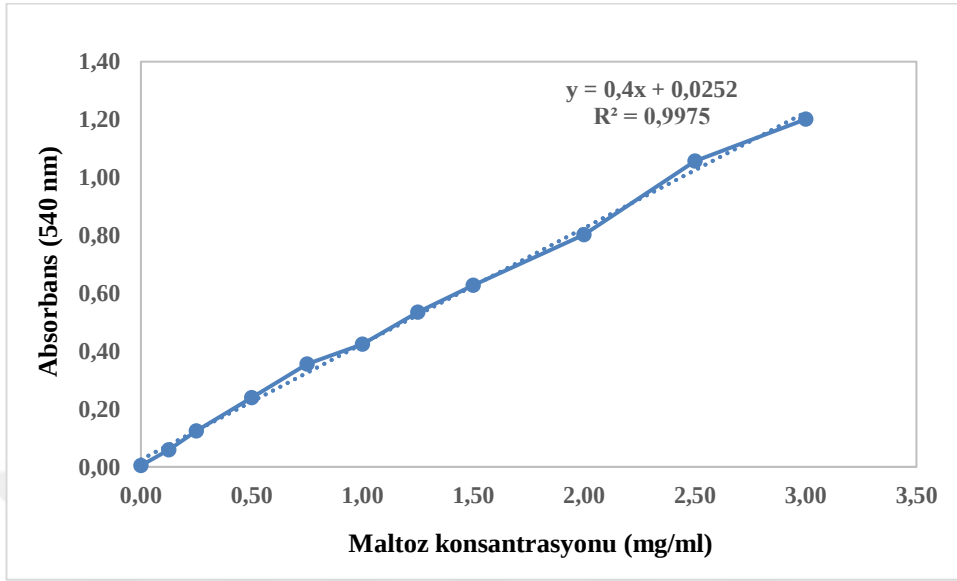


Agaroz jel elektroforezinde kullanılan DNA standardı: O'GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD)

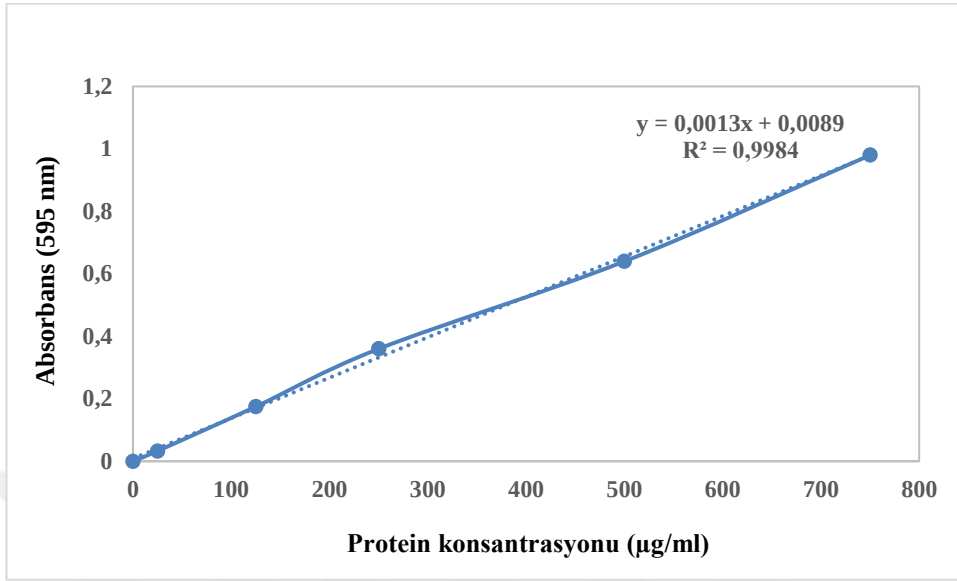


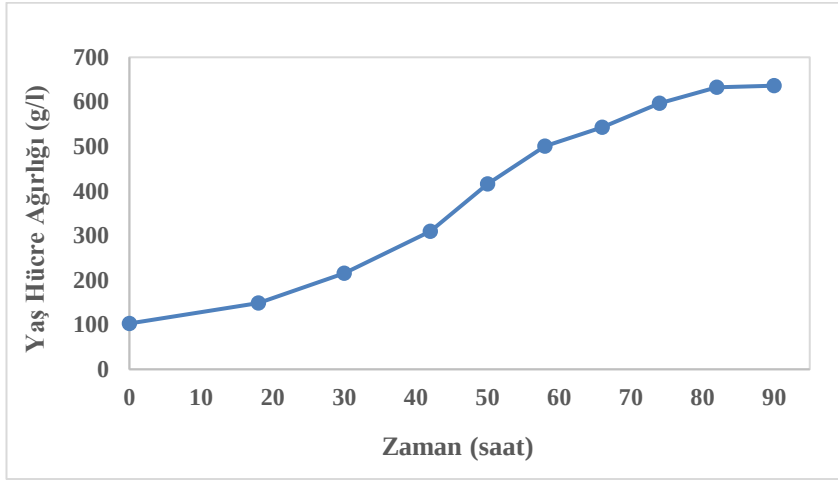
SDS-PAGE analizinde kullanılan protein standardı: PageRuler Unstained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD)

EK-3. DNSA yöntemine göre gerçekleştirilen α -amilaz aktivitesi tayinleri için farklı derişimlerde maltoz çözeltileri kullanılarak elde edilen standart eğri örneği



EK-4. Toplam protein tayini için farklı derişimlerde BSA standartları kullanılarak elde edilen standart eğri örneği

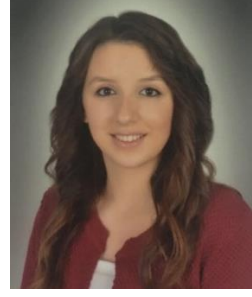


EK-5. Biyoreaktör koşullarında 90 saat süresince alınan örneklerin yaş hücre ağırlıkları

ÖZGEÇMİŞ

ŞEYDA GÜLLÜ

Seydagullu95@gmail.com



ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2017-2020	Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Antalya
Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2013-2017	Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Antalya